

論文内容要旨

論文題目

Angiotensin II Modulates KCNQ1/KCNE1 Currents in a Biphasic Manner and Induces Internalization of the KCNQ1 Protein

(アンジオテンシン II は KCNQ1/KCNE1 電流を二相性に修飾し、
KCNQ1 蛋白のインターナリゼーションを引き起こす)

責任分野： 耳鼻咽喉科学 分野

氏名： 岡崎 雅

【内容要旨】

[背景] 緩徐活性型遅延整流 K^+ 電流 (I_{Ks}) は、チャンネル孔を形成する主サブユニット KCNQ1 と副サブユニット KCNE1 の複合体チャンネルを流れ、アンジオテンシン II (Ang II) やエンドセリン等の各種受容体刺激により修飾される。Ang II はアンジオテンシン II 受容体 1 型 (AT_1R) に結合し、心臓電気活動に多様な影響を与えるが、心筋イオンチャンネルに対する作用については未だ不明な点が多い。近年、種々のイオンチャンネルがユビキチン化により修飾を受けることが知られてきた。その一つとして Nedd4/Nedd4-like family によるチャンネルのインターナリゼーションが報告されているが、それには標的チャンネルに存在する PY モチーフが関与している。本研究の目的は、1) 異所性発現させた I_{Ks} が AT_1R 刺激によってどのように修飾されるか、2) その修飾機構がどのようになっているか、インターナリゼーションの関与を含め、明らかにすることである。

[方法] アフリカツメガエル卵母細胞に human KCNQ1 (hKCNQ1), human KCNE1 (hKCNE1) と mouse AT_1R (m AT_1R) を共発現させた。その卵母細胞において、保持電位 -80 mV から +30 mV まで 5 秒間の脱分極パルスをかけ電流を惹起した。その際に流れる全細胞電流を 2 電極膜電位固定法によって記録し、Ang II (10^{-6} M) 投与によって m AT_1R を刺激した際の影響を検討した。hKCNQ1 の C 末端に PY モチーフが存在していたため、C 末端を欠失させた変異体 hKCNQ1(ΔC) と PY モチーフの変異体 hKCNQ1(P660A/Y662A) を作製し検討を加えた。チャンネルのインターナリゼーションは緑色蛍光蛋白 (GFP) で標識した hKCNQ1 (GFP-hKCNQ1, GFP-hKCNQ1(ΔC), GFP-hKCNQ1(P660A/Y662A)) を HEK293 細胞に発現させて観察した。

[結果] Ang II (10^{-6} M) で m AT_1R 刺激を行ったところ、野生型の hKCNQ1/hKCNE1 および hKCNQ1 の電流は一過性の増大とそれに引き続く減少の二相性変化を示した。それに対し、hKCNQ1(ΔC)/hKCNE1 の電流は増大するのみで、減少を示さなかった。hKCNQ1(P660A/Y662A)/hKCNE1 の電流は一過性の増大とそれに引き続く軽度の減少を示したが、野生型のような二相性変化は観察されなかった。m AT_1R 刺激による hKCNQ1 の細胞内局在の変化を検討した結果、GFP-hKCNQ1 ではチャンネルのインターナリゼーションが観察されたが、GFP-hKCNQ1(ΔC) と GFP-hKCNQ1(P660A/Y662A) ではインターナリゼーションが観察されなかった。

[考察] I_{Ks} チャンネルは、KCNQ1 と KCNE1 によって構成される。hKCNE1 を含まない野生型の hKCNQ1 電流が Ang II 投与によって二相性に修飾されたことから、今回の m AT_1R 刺激による電流の修飾に hKCNQ1 が関与することが示された。更に hKCNQ1 の C 末端を欠失させた hKCNQ1(ΔC)/hKCNE1 電流は増大するのみであったことから、二相性修飾の減少相における hKCNQ1 の C 末端の関与が示唆された。GFP-hKCNQ1 を用いてその細胞内局在を観察したところ、野生型の hKCNQ1 チャンネルのインターナリゼーションが確認できた。

更に hKCNQ1(Δ C)/hKCNE1 電流で減少相がみられず、かつ GFP-hKCNQ1(Δ C)ではインターナリゼーションが確認されなかったことから、mAT₁R 刺激により hKCNQ1 のインターナリゼーションが誘導された結果、減少相が引き起こされた可能性が示唆された。更に hKCNQ1(P660A/Y662A)/hKCNE1 電流で減少相がみられず、GFP-hKCNQ1(P660A/Y662A)でインターナリゼーションが生じなかったことから、インターナリゼーションが PY モチーフを介したもので、すなわち Nedd4/Nedd4-like family によるユビキチン化による可能性が示唆された。

平成 20 年 1 月 18 日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名：岡崎 雅

論文題目：Angiotensin II modulates KCNQ1/KCNE1 currents in a biphasic manner and induces internalization of the KCNQ1 protein

(アンジオテンシン II は KCNQ1/KCNE1 電流を二相性に修飾し、KCNQ1 蛋白のインターナリゼーションを引き起こす)

審査委員：主審査委員 早坂 清

㊦

副審査委員 貞弘 光章

㊦

副審査委員 久保田 功

㊦

審査終了日：平成 20 年 / 月 / 日

【 論文審査結果要旨 】

緩徐活性型遅延整流 K⁺電流 (IKs) は、KCNQ1 と KCNE1 の複合体チャネルを流れ、アンジオテンシン II (Ang II) 等の各種受容体刺激により修飾される。Ang II はアンジオテンシン II 受容体 1 型 (AT1R) を介し、心臓の生理活動に多様な影響を与えるが、心筋イオンチャネルに対する作用については未だ不明な点が多い。近年、Nedd4/Nedd4-like family によるユビキチン化とインターナリゼーションを介した種々のチャネルの修飾が報告されている。岡崎雅氏は、KCNQ1 と KCNE1 の異所性発現実験を行い、AT1R を介した Ang II の修飾とその機序について、解明を試みた。

方法として、アフリカツメガエル卵母細胞に human KCNQ1 (hKCNQ1), human KCNE1 (hKCNE1) および mouse AT1R (mAT1R) を共発現させ、2 電極膜電位固定法により全細胞電流を測定した。Ang II による修飾は、10⁻⁶ M の存在下に解析した。また、C 末端を欠失した変異体 hKCNQ1 (DC) と Nedd4/Nedd4-like family によるユビキチン化の標的 PY モチーフの変異体 hKCNQ1 (P660A/Y662A) を作成し、同様な発現実験を施行した。さらに、緑色蛍光蛋白 (GFP) で標識した hKCNQ1, hKCNQ1 (DC), hKCNQ1 (P660A/Y662A) を HEK293 細胞に発現させ、チャネルのインターナリゼーションへの影響を検索した。

結果は、Ang II 存在下では、野生型の hKCNQ1/hKCNE1 および hKCNQ1 の電流が一過性に増大し、その後減少する二相性変化が認められた。一方、hKCNQ1 (DC)/hKCNE1 の電流は増大したが、減少は認められず、hKCNQ1 (P660A/Y662A)/hKCNE1 の電流は、一過性の増大と続く軽度の減少を示したが、二相性変化は示さなかった。Ang II 存在下における hKCNQ1 の細胞内局在の検討では、インターナリゼーションが野生型 hKCNQ1 では観察されたが、hKCNQ1 (DC) と hKCNQ1 (P660A/Y662A) の変異体では観察されなかった。

hKCNQ1/hKCNE1 および hKCNQ1 の電流が、Ang II 投与によって二相性に修飾されたことから、mAT1R を介する修飾には hKCNQ1 が関与することが示された。更に、C 末端および PY モチーフの変異 hKCNQ1 では、減少相が消失し、野生型に認められたインターナリゼーションも消失したことから、mAT1R を介する修飾は、PY モチーフを標的とする Nedd4/Nedd4-like family によるユビキチン化そしてインターナリゼーションという機序によることが示唆された。

岡崎雅氏は、理に叶った研究を計画し、着実な手技を使って研究を遂行し、新たな知見を得て、結果を妥当に評価し考察を加えていることから、審査会は学位 (医学博士) の授与に値するものと判断した。