

氏 名	久保 多恵子
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	博士乙第414号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成27年 3月10日
学位論文題目	Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase prevents the decrease in the human ether-a-go-go related gene potassium current induced by Gq protein-coupled receptor stimulation. (ホスファチジルイノシトール4-リン酸5-キナーゼはGqタンパク質共役受容体刺激によるヒト急速活性型遅延整流カリウム電流の減少を抑制する)
審査委員	主査 教授 岡村 富夫 副査 教授 寺田 智祐 副査 教授 谷 眞至

論文内容要旨

*整理番号	418	(かりがな) 氏名	(くほ たえこ) 久保 多恵子
学位論文題目	Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase prevents the decrease in the human ether-a-go-go related gene potassium current induced by Gq protein-coupled receptor stimulation (ホスファチジルイノシトール4-リン酸5-キナーゼはGqタンパク質共役受容体刺激によるヒト急速活性型遅延整流カリウム電流の減少を抑制する)		
<p>【研究の目的】 HERG (Human Ether-a-go-go-Related Gene)チャネルは、ヒト心筋に発現するカリウムチャネルであり、活動電位の再分極過程を担う急速活性型遅延整流性カリウム電流 (I_{HERG})を構成する。HERG チャネルの機能低下に伴う I_{HERG} の減少は、遺伝性や薬剤による心室性不整脈の原因となることが知られている。I_{HERG} は、α_1アドレナリン受容体 (α_1R) や M_1ムスカリン受容体 (M_1R) などの Gq タンパク質共役型受容体 (GqRs)の刺激により速やかに減弱することが報告されており、GqRs 活性化にともなう細胞膜ホスファチジルイノシトール 4,5 ニリン酸 ($PI(4,5)P_2$) の減少がこれらの受容体刺激による HERG チャネル機能を修飾する可能性が指摘されている。ホスファチジルイノシトール-4-リン酸-5-キナーゼ ($PI(4)P5-K$) は、$PI(4,5)P_2$ の産生を中心的に担うリン脂質リン酸化酵素である。本研究では、GqRs 刺激を介した HERG チャネルの機能修飾を異種性発現システムに再構築するとともに、$PI(4)P5-K$ の過剰発現を通して HERG チャネルの機能制御における $PI(4,5)P_2$ の役割を明らかにし、その意義について検討することを目的とする。</p>			
<p>【方法】 発現ベクターに組み込んだ HERG、GqRs (α_1R あるいは M_1R) ならびに $PI(4)P5-K$ (N 末端に HA 標識)を様々な組み合わせで GFP と共に CHO 細胞に導入し、48 時間後から実験に供した。また、$PI(4)P5-K$ に点変異を導入してキナーゼ活性を欠損した $PI(4)P5-K-K138A$ 変異体を作製し、ネガティブコントロールとして使用した。単一の GFP 陽性細胞にホールセルパッチクランプ法を適用して I_{HERG} の計測を行い、HERG チャネルの機能変化をリアルタイムに記録した。一方、$PI(4)P5-K$ のタンパク質の発現や局在様式を、抗 HA 抗体を用いた免疫細胞化学法にて確認した。</p>			
<p>【結果】 HERG と GqRs を共発現した CHO 細胞を受容体特異的なリガンド (α_1R はフェニレフリン、M_1R はアセチルコリン) で刺激すると、I_{HERG} の大きさは濃度依存的に速やかに減少した。同時に、活性化 (チャネル開口) の膜電位依存性が脱分極側にシフトするととも</p>			

(備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。

2. ※印の欄には記入しないこと。

に、脱活性化（チャンネル閉口）の時間経過が速くなった。これらのリガンド刺激による I_{HERG} 抑制効果は、PI(4)P5-K を共発現させた細胞では、その程度が有意に減少していた。一方、リガンド非存在下での各種遺伝子発現細胞における I_{HERG} の電流密度（細胞膜面積あたりの電流量）は、GqRs を共発現した細胞においては HERG を単独で発現させた細胞に比べ、有意に小さかった。この GqRs の発現による HERG チャンネルの機能低下は、PI(4)P5-K を共発現することで有意に回復したが、PI(4)P5-K-K138A の共発現では、影響は認められなかった。一方、PI(4)P5-K は、GqRs を共発現しない細胞においては、 I_{HERG} の電流密度の増加作用を示さなかった。また免疫細胞化学染色法による PI(4)P5-K の細胞内局在の結果として、PI(4)P5-K は、細胞膜を含む細胞質内に広く分布することが確認された。

【考察】

・PI(4)P5-K の過剰発現は細胞膜の PI(4,5)P₂ レベルを上昇させると考えられている。従って、本研究において、GqRs の刺激による I_{HERG} の抑制効果が PI(4)P5-K の共発現により減弱したという結果は、HERG チャンネルの機能が PI(4,5)P₂ レベルの変化に応じて制御される可能性を示唆するものである。

・本研究では、リガンド非存在下で GqRs を発現した細胞において I_{HERG} の電流密度が減少することを見出した。細胞膜受容体のいくつかのタイプにおいては、リガンドの結合がない状態での基礎活性が実験的に示されている。したがって、GqRs を強制発現した細胞において細胞膜の PI(4,5)P₂ レベルが恒常的に減少し、それが I_{HERG} の電流密度の低下の直接的な原因となった可能性がある。事実、本研究では、PI(4,5)P₂ の産生を促す PI(4)P5-K の共発現が I_{HERG} の電流密度を回復させることも示している。

・HERG チャンネルの機能が先天的あるいは後天的に低下する QT 延長症候群の患者では、目覚まし時計などの聴覚刺激により心室頻拍や心室細動のような致死性不整脈が誘発されることが知られており、そこには自律神経活動を介した α_1 R 刺激による I_{HERG} の過度な減少が関与する可能性が指摘されている。HERG チャンネルの機能制御において、GqR 刺激と拮抗的な作用を発揮する PI(4)P5-K は抗不整脈作用を示すことが期待される。

【結論】PI(4)P5-K の過剰発現は、細胞膜 PI(4,5)P₂ レベルを増加させ、GqRs による HERG チャンネルの機能抑制に対して拮抗的に作用することが明らかとなった。 I_{HERG} の過度な減少は致死性不整脈の誘因となることから、PI(4)P5-K は HERG チャンネル機能を制御する新規抗不整脈薬の標的分子としての可能性がある。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	4 1 8	氏名	久保 多恵子
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11 ポイント、600 字以内で作成のこと。)</p> <p>本研究は、心筋の生理機能に深く関与する HERG (Human Ether-a-go-go Related Gene) チャネルの機能低下が遺伝性や薬剤性心室性不整脈の原因になることに注目し、同チャネルの機能調節機序について検討を加えた。特に Gq タンパク質共役型受容体 (GqR、α_1 及び M_1 受容体など) の刺激により I_{HERG} 電流 (急速活性型遅延整流性カリウム電流) が減少することから、HERG、GqR などを人工的に発現させた CHO 細胞を用いて実験した。</p> <p>その結果、HERG と GqR を共発現させた細胞では、I_{HERG} の電流密度が低下すると共に α_1 及び M_1 受容体アゴニストによる I_{HERG} 電流の減少が生じたが、PI(4)P5 キナーゼを共発現させることにより両者とも特異的に回復することが分かった。一方、GqR を共発現しない細胞では同キナーゼによる I_{HERG} 電流の増加は見られなかった。</p> <p>これらの結果より、HERG チャネルの機能制御において、GqR 刺激に拮抗作用を示す PI(4)P5 キナーゼは抗不整脈作用を有すると考えられる。</p> <p>以上のことから、本論文は心筋の生理的な膜電位調節機序について新しい知見を与えたものであり、学位論文の関連分野及び専攻学術の試問を受け合格したので、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 567 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 27 年 1 月 28 日)</p>			