

プロテアソーム阻害薬は細胞内輸送を修飾することで
Kv1.5チャンネル活性を増加させる

鳥取大学医学部内科学第一教室 (主任 重政 千秋教授)

加 藤 克

Proteasome inhibitors increase the Kv1.5 channel
activities by modification of the intracellular trafficking.

Masaru KATO

*First Department of Internal Medicine, Tottori University
Faculty of Medicine Yonago 683-8504, Japan*

ABSTRACT

One mechanism for gain of normal Kv1.5 channel function with short half-lives is appropriate protein trafficking with fast degradation. The present study was designed to examine the cellular trafficking and degradation pathway of Kv1.5 expressed in COS7 cells by pulse chase, immunoblotting, immunofluorescence microscope and patch clamp techniques. Kv1.5 was a short-lived protein (half-life: 9.2hr) that was ubiquitinated. The turnover rate of the total pool of Kv1.5 protein was significantly attenuated by proteasome inhibitors (MG132) by 2.8 times, but was not influenced by lysosomal/endosomal inhibitors. Kv1.5 was localized in the endoplasmic reticulum (ER), the golgi complex (Golgi), and but not in endosomes. Pretreatment with MG132 increased Kv1.5 channels proteins in the ER, the Golgi. While the pretreatment with MG132 significantly increased the expressed Kv1.5 current, pretreatment with Brefeldine A or colchicine significantly reduced MG132-induced increases in Kv1.5, indicating that proteasome inhibitor facilitate the trafficking of Kv1.5 from the ER to cell membrane through the Golgi and microtubules. Kv1.5 channels are rapidly ubiquitinated and degraded by the proteasome. The proteasome inhibitor can increase functional Kv1.5 by facilitating the sorting of Kv1.5 from the ER to the plasma membrane, suggesting that Kv1.5 stability trafficking and function are regulated by the ubiquitin-proteasome system.

(Accepted on November 21, 2001)

Key words : ion channel, ubiquitin, proteasome, degradation

はじめに

Kv1.5 チャンネルは六回膜貫通型のイオンチャ

ネルであり, IK_{Kur} とよばれる外向きK⁺ 電流を構成する. これは主に心臓¹⁾, 血管平滑筋²⁾, 小脳などの神経細胞^{3, 4)}, 肺や骨格筋⁵⁾そして下垂体などの

内分泌器官^{6, 7})に多く発現し, その興奮性を司る重要なイオンチャンネルであり, 心臓では心室よりも心房⁸)に豊富に存在し心房筋の短い活動電位を作る役割を担っている. 近年, 僧帽弁膜症を有する慢性心房細動患者の心房筋ではKv1.5チャンネルの減少が証明されており^{9, 10}), このKv1.5チャンネルの減少が心房細動の難治化にも関連すると推定されている.

一般的に, 蛋白質の量は転写及び翻訳による合成とライソソームおよびプロテアソームによる分解により規定されている. イオンチャンネル蛋白質の合成に関する制御については多くの研究があるが, 分解による制御についての研究は少ない. 上皮Na⁺チャンネル, cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR)と呼ばれるCl⁻チャンネルやgap junctionを構成するConnexin43などは, チャンネル蛋白質の分解が著しく速いshort proteinであることが知られており¹¹), この速い分解にはユビキチン/プロテアソーム系が重要な役割を担うことが明らかになってきた. 細胞膜蛋白質のプロセッシングの過程では, まず核内で転写されたmRNAをもとに, 細胞質のリボソームで翻訳された蛋白質が小胞体へ輸送される. そこでシグナル配列の切断とコア糖鎖の転移が行われた後, 分子シャペロンにより品質管理を受け, 完全な糖鎖の修飾を受けた後, ゴルジ体を経て細胞膜へ輸送される^{12, 13}). 小胞体で品質管理を受けた不完全な蛋白質の一部はユビキチン化され, プロテアソームにより分解される経路とゴルジまたは細胞膜からリソソーム/エンドソーム系により分解される経路があるといわれている. このユビキチン/プロテアソーム系による分解はまずubiquitin-activating enzyme (E1), ubiquitin-conjugating enzyme (E2), およびubiquitin-ligase (E3)の働きで標的蛋白質のリジン残基に複数のユビキチン分子が共有結合する^{14, 15}). ユビキチン化された蛋白はスレオニンプロテアーゼである26Sプロテアソームにより分解される^{15, 16}). 最近の研究で, 前述のイオンチャンネル蛋白質のほかに細胞周期蛋白質, NFκB¹⁷), p53¹⁸), c-Jun¹⁹)などの核蛋白質もこの系により分解制御を受けていることが明らかにされている. 一方, 最近, チロシンキナーゼ受容体²⁰)や成長因子受容体²¹), 膜輸送体などの膜蛋白質はユビキチン化された後プロテアソーム系ではなくリソソーム/エンドソーム系により分解されること

が示されおり, ユビキチン化された膜蛋白質がどのような系で分解され, プロテアソーム系が如何に関与しているかは不明である²²). さらに, Kv1.5チャンネルはshort-live蛋白質¹¹)に分類されているが, その分解経路およびそれに伴う細胞内輸送経路に関しては不明である.

今回, 著者はKv1.5cDNAをCOS7細胞に遺伝子導入して発現させ, Kv1.5チャンネルの分解経路と細胞内輸送経路について検討した. その結果, Kv1.5チャンネルはユビキチン化された後プロテアソーム系により急速に分解され, この過程においてはリソソーム/エンドソーム系の関与はほとんどないことが判明した. さらに, ユビキチン/プロテアソーム系を阻害することによりKv1.5チャンネル蛋白質は小胞体からゴルジ体, 微小管を経て細胞膜へと輸送される量が増加し, 機能的なKv1.5チャンネルが増えることも明らかにした.

方 法

薬剤と抗体 LipofectamineキットはGibco社より, ProteinG agarose beads, ECLキットはAmersham社より, MG132, Brefeldine A, コルヒチンはSigma社より, 抗Flag抗体, 抗マウスIgG抗体, 抗ユビキチン抗体はBiotechnology社より, Golgi-GFP, Endosome-GFPはClontech社より, Fluorescent conjugate抗マウスIgG抗体はMolecular probe社より購入した.

プラスミドの作製と遺伝子導入 rat-Kv1.5cDNAのC末端にFlagのepitope-tag (5'-GAC-TACAAGGACGATGACGACAAG-3'; N末-DYKDDDDK-C末)を付けCMV promoterを有する真核細胞発現ベクター (pRC/CMV) に組み込み込んだベクター (Flag-Kv1.5)をCOS7細胞に遺伝子導入し発現させた. 遺伝子導入はlipofectamineキットを用いて行った. その遺伝子導入効率は5-10%であった.

パルススチェイス法による蛋白質分解速度の測定

培養したCOS7細胞にFlag-Kv1.5を遺伝子導入(約3時間)し, その後DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)と, プロテアソーム阻害薬であるMG132 (50 μM/L) またはリソソーム/エンドソーム阻害薬であるクロロキン (0.4 mM/L) を含むDMEMにて培養した (37°C, 5% CO₂, 24時

間). 培養した細胞を phosphate-buffered saline (PBS) で 2 回洗浄後, メチオニン (Met) を含まない DMEM と, MG132 (50 μ M/L) またはクロロキニン (0.4 mM/L) 含有, Met 不含 DMEM で 4 時間培養した. PBS で 2 回後洗浄後 35 S-Met で細胞内蛋白質を 1 時間標識 (37°C, 5% CO₂) した. その後, PBS で 2 回洗浄後, 溶解液を加えて, 0, 1, 3, 6, 12, 18, 24 時間ごとに COS7 細胞を回収した (35 S-labeled methionine/Flag tagged protein). ProteinG agarose beads に抗 Flag 抗体を加え, 室温で 1 時間転倒混和し, 特異的 Flag 抗体を結合させた. その後, この抗 Flag 抗体結合 ProteinG agarose beads を 35 S-Met で標識した試料に加え, 転倒混和し結合させた (4°C, 24 時間). 免疫沈降後の試料を採取して, 電気泳動後, そのシグナルをフルオログラムで検出した.

免疫沈降法によるユビキチン化 Flag-Kv1.5 の検出 培養した COS7 細胞に Flag-Kv1.5 を遺伝子導入 (約 3 時間) し, その後 MG132 (50 μ M/L) 添加 24 時間後, 試料に溶解液を加え, ピペットで攪拌後遠心し, 上清を採取した. その後, ProteinG agarose beads 結合抗 Flag 抗体を加え 1 時間免疫沈降させ, 沈殿には電気泳動用 sample buffer を加えた. 10% SDS-PAGE ゲルを用い, 電気泳動 (200 mV, 180 mA, 40 分) 後, ニトロセルロース膜 (Immobilone P) に転写した後 (180 mA, 2 時間), 膜を PBS で 2 回洗浄後, 0.5% glutaraldehyde/0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0) に 20 分浸し, PBS で 2 回洗浄後, 5% ミルクにて blocking (4°C, 24 時間) した. 膜を Tris-buffered saline (TBS) で 1 回洗浄後, 1000 倍希釈した一次抗体 (抗ユビキチン抗体) を含む 0.5% ミルク + 0.1% Tween20 で 45 分間反応させた. TBST (1 \times TBS + 0.05% Tween20) で 2 回洗浄, TBS で 1 回洗浄後, 3000 倍希釈した二次抗体 (抗マウス IgG 抗体) を含む TBST で 30 分間反応した. その後 TBST で 3 回洗浄, TBS で 1 回洗浄後, ECL キットを用いてそのシグナルを検出した.

ウェスタンブロット法による Flag-Kv1.5 蛋白の検出 培養した COS7 細胞に Flag-Kv1.5 を遺伝子導入 (約 3 時間) し, その後 MG132 (50 μ M/L) を加え 24 時間後, 試料に溶解液を加え, ピペットで攪拌後遠心し, 上清を採取した. 10% SDS-PAGE ゲル

を用い, 電気泳動 (200 mV, 180 mA, 40 分) し, 膜に転写 (180 mA, 2 時間) した後, 膜を PBS で 2 回洗浄後, 5% ミルク + 0.1% Tween20 を加え blocking (4°C, 24 時間) を行った. 膜を TBS で 1 回洗浄後, 5% ミルクで 1000 倍希釈した一次抗体 (抗 Flag 抗体) を 45 分間反応させた. TBST で 2 回洗浄, TBS で 1 回洗浄後, 5% ミルクで 4000 倍希釈した二次抗体 (抗マウス IgG 抗体) で 30 分間反応させた. TBST で 3 回洗浄, TBS で 1 回洗浄後, ECL キットを用いてそのシグナルを検出した.

ホールセルパッチクランプ法による発現 Kv1.5 チャネルの測定 Flag-Kv1.5 および green fluorescent protein (GFP) を含んだプラスミドを COS7 細胞に遺伝子導入し, 培養 48~72 時間後にホールセルパッチクランプ法を用いて全膜電流を記録した. 保持電位 -60 mV より +60 mV まで 20 mV 毎の脱分極パルス (500 msec) を与えた. Kv1.5 チャネルの選択的阻害剤である 1 mM 4-アミノピリジン (4-AP) の存在下および非存在下でそれぞれ膜電流を記録し, 4-AP 感受性成分を Kv1.5 由来の I_{Kur} 電流とした. 脱分極直後のピーク電流値を計測し, 電流電圧曲線を求め, 電流値を比較した. 実験には, 細胞外液として Tyrode's 液 (mM/L): NaCl, 140; KCl, 5.4; CaCl₂, 1.8; MgCl₂, 0.5; N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES), 5.0 (pH = 7.4, NaOH で滴定), 細胞内液として電極内液: K-Aspartate, 140.0; MgCl₂, 5.0; K₂-ATP, 5.0; EGTA, 5.0; HEPES, 5.0 (pH = 7.2, KOH で滴定) を用いた.

共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫蛍光抗体染色による検討 カバーガラス上に COS7 細胞を培養し, Flag-Kv1.5 を遺伝子導入 (約 3 時間) し, MG132 (50 μ M/L) 存在下, 非存在下で 24 時間培養後, 4% パラホルムアルデヒドで固定した. 一次抗 Flag 抗体で 1 時間, 二次 Fluorescent conjugate 抗マウス IgG 抗体でさらに 1 時間反応させた後, 共焦点レーザー顕微鏡を用いてそのシグナルを観察し, Flag-Kv1.5 の細胞内局在を観察した. ゴルジ体の染色には Golgi-GFP を, エンドソーム染色には Endosome-GFP を Flag-Kv1.5 とともに発現させた.

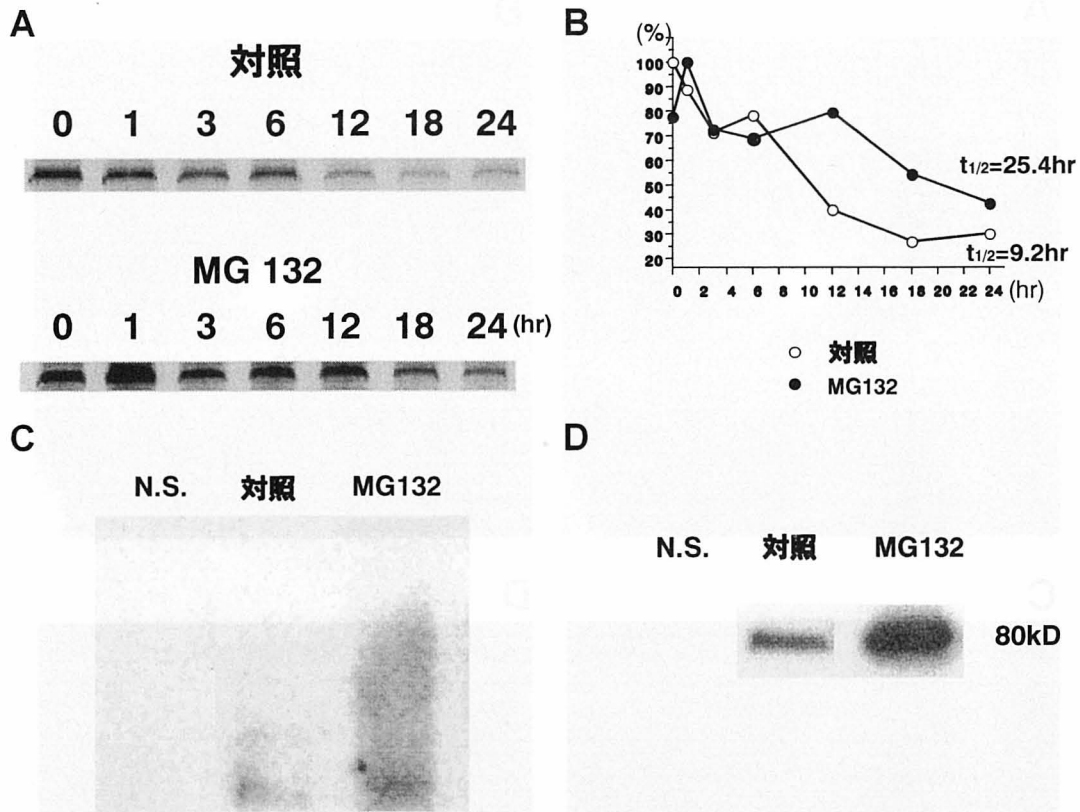


図1. パルス-チェイス法によるKv1.5チャンネル蛋白質分解速度測定 (A,B),免疫沈降法によるユビキチン化Kv1.5チャンネル蛋白質定量 (C),ウエスタンブロット法によるKv1.5チャンネル蛋白質の検出 (D).

結 果

プロテアソーム阻害によるKv1.5チャンネル蛋白質の分解速度時間の変化

プロテアソーム阻害剤のMG132存在下・非存在下でのパルス-チェイス法により検出されたFlag-Kv1.5チャンネル蛋白質の時間に伴う減少を示す(図1A).対照では12時間後にはFlag-Kv1.5チャンネル蛋白質を示すバンドの輝度が著明に減少しているが, MG132存在下12時間後でも明らかなバンドの輝度の減少を認めなかった. デンシトメトリーを用いてグラフ化し, Flag-Kv1.5の半減期を算出したもので, 対照の半減期は9.2時間で, MG132の前処置の半減期は25.4時間と2.8倍に延長した(図1B). 同様な実験4例を行った結果, MG132はFlag-Kv1.5の半減期を有意に延長した($P < 0.05$). 一方, リソソーム/エンドソーム阻害薬であるクロロキンの前処置では, Flag-Kv1.5の半減期の有意な延長は認めなかった ($t_{1/2} = 12.9$

時間, データ未提示).

プロテアソーム阻害によるKv1.5チャンネル蛋白質とユビキチン化の増加

免疫沈降法によりユビキチン化されたFlag-Kv1.5蛋白質量を示したものである(図1C). Flag-Kv1.5を組み込んでいないプラスミドを遺伝子導入したCOS7細胞(N.S.)に比べFlag-Kv1.5を組み込んだプラスミドを遺伝子導入したCOS7細胞(対照)ではユビキチン化に特有のスメアを認めた. さらに, MG132を前処置下することによりスメアの増強が認められた. この結果はFlag-Kv1.5チャンネルがユビキチン化を受けており, さらにプロテアソームを阻害するとその分解が止まり, ユビキチン化したFlag-Kv1.5チャンネルが蓄積することを示す. ウエスタンブロット法によるFlag-Kv1.5チャンネルを示す(図1D). 対照では80kDaのFlag-Kv1.5チャンネルのバンドが認められる. さらに, MG132前処置下でバンドの増強が

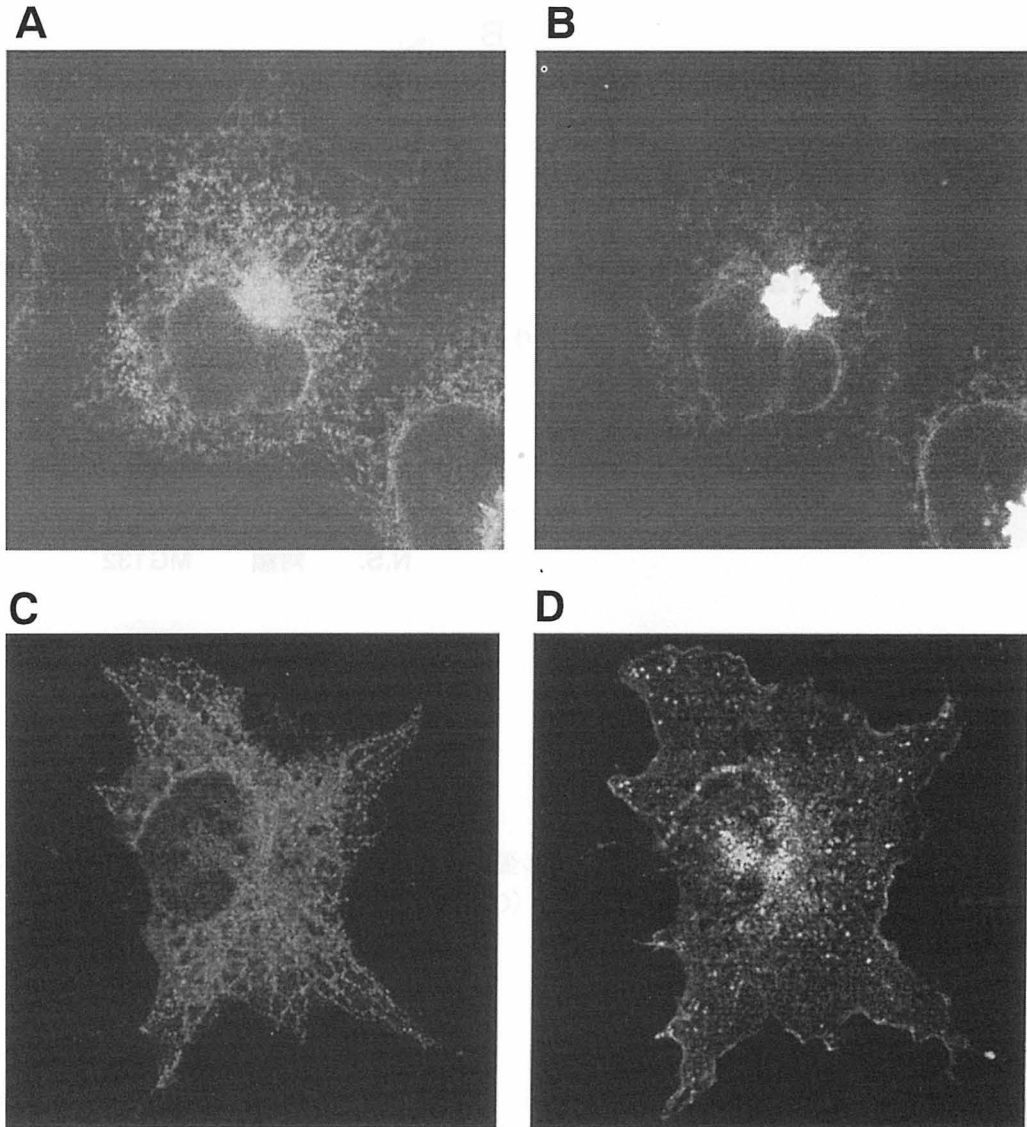


図2. 共焦点顕微鏡によるKv1.5チャンネル蛋白質 (A,C),ゴルジ体 (B),エンドソーム (D) の局在.

認められ,プロテアソームを阻害すると分解されるKv1.5チャンネルが減少し,結果としてKv1.5チャンネル蛋白質が増加することを示している.

プロテアソーム阻害によるKv1.5チャンネル蛋白質の細胞内局在変化

共焦点レーザー顕微鏡によりCOS7細胞でのFlag-Kv1.5の局在とゴルジ体,エンドソームのマーカールとの位置的な関係を調べた.図2Bはゴルジ体の細胞内局在を示し,ゴルジ体は核の周囲に存在する.図2Aは同一細胞でのKv1.5の細胞内局在を示すが,核の周囲と細胞質に網目状に存在す

るという2種類の分布を示す.核周囲に存在するKv1.5は,ゴルジ体と局在が一致している.また,細胞質のKv1.5は網目状の小胞体に存在する.図2Dは点状に分布しているエンドソームの局在を示し,図2Cに示す同一細胞でのKv1.5の局在と一致しないことより,Kv1.5はエンドソームには存在していないことが判明した.以上の形態学的所見は,Kv1.5が小胞体で合成された後ゴルジ体へと輸送されてプロセッシングを受けるものと考えられる.図3はMG132で前処置した時のKv1.5の局在を示すが,小胞体とゴルジ体のどちらでも増加している.

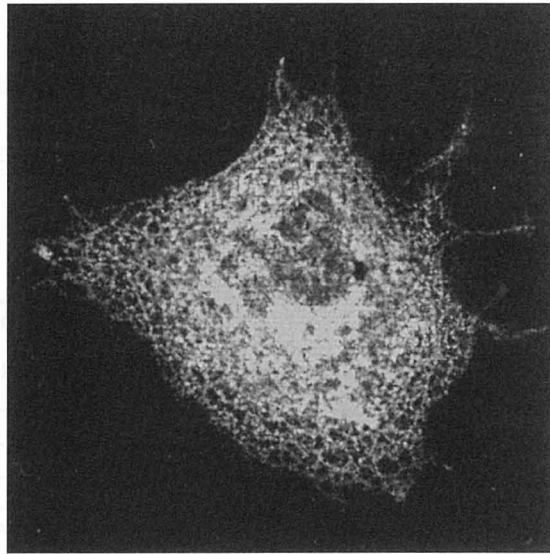


図3. 共焦点顕微鏡によるMG132前処置時Kv1.5チャンネル蛋白質の局在.

プロテアソーム阻害が細胞膜のKv1.5チャンネルに及ぼす効果

Flag-Kv1.5を発現させたCOS7細胞のMG132前処置・非前処置でのKv1.5チャンネル電流を記録したものである(図4). 保持電位 -60 mVから $+20$ mV間隔で500 msecの脱分極刺激を3秒に1度与えて得たKv1.5電流を記録した後, Kv1.5チャンネルの選択的阻害剤の4-APを投与により, 減少した電流成分をKv1.5チャンネルとした. 対照に比べMG132前処置では電流が増大し, さらに4-APで抑制されない電流成分を差し引いたKv1.5の電流もMG132の前処置で増大していることがわかる(図4A, 図4B). 4-AP感受性の電流成分と膜電位との関係をプロットしたものである(図4C). -20 mVより脱分極側で, MG前処置群では有意に電流の増大が認められた. この事実はプロテアソームを抑制することにより, 細胞膜のKv1.5チャンネルが増加することを示す.

プロテアソーム阻害によるKv1.5チャンネル電流増加作用に対するBrefeldine A及びコルヒチンの影響

前述の細胞内局在の結果から, Kv1.5チャンネルは小胞体からゴルジ体へと輸送され, MG132によりこの輸送系路が促進されるのみならずKv1.5電流の増加が引き起こされることを示している.

Brefeldine Aは小胞体からゴルジ体への蛋白質輸送を選択的に阻害するが, Brefeldine Aで前処置するとMG132によるKv1.5チャンネルの増加が有意に抑制されることより(図5), MG132のKv1.5チャンネルの増加は小胞体からゴルジ体への輸送量の増加によると考えられる. また, コルヒチンは微小管を切断する作用を有しているが, コルヒチンで前処置でもMG132のKv1.5チャンネル増加作用が減弱されることがわかる(図5). このことは, ゴルジ体から細胞膜への輸送は微小管を介している可能性を示し, MG132前処置によるKv1.5チャンネル増加は, ゴルジ体から微小管を介しての輸送の増加により生じることによると考えられる.

考 察

イオンチャンネルの半減期に関しては半減期の短いshort-lived proteinのイオンチャンネルと長いlong-lived proteinのイオンチャンネルの2種の報告があるが, Short-lived proteinについてはgap junctionを構成するチャンネルであるconnexin43が1.3時間¹¹⁾, 下垂体細胞でのKv1.5チャンネルが4時間⁶⁾, また上皮Na⁺チャンネル(EnaC)が1時間の半減期²³⁾と報告されている. Long-lived proteinの半減期は, N18 neuroblastoma cellsのvoltage-gated Na⁺チャンネルが26時間²⁴⁾であり, 神経・筋のアセチルコリン受容体が1日²⁵⁾, voltage-gated Ca²⁺チャンネルが15から20時間²⁶⁾と報告されている. 本研

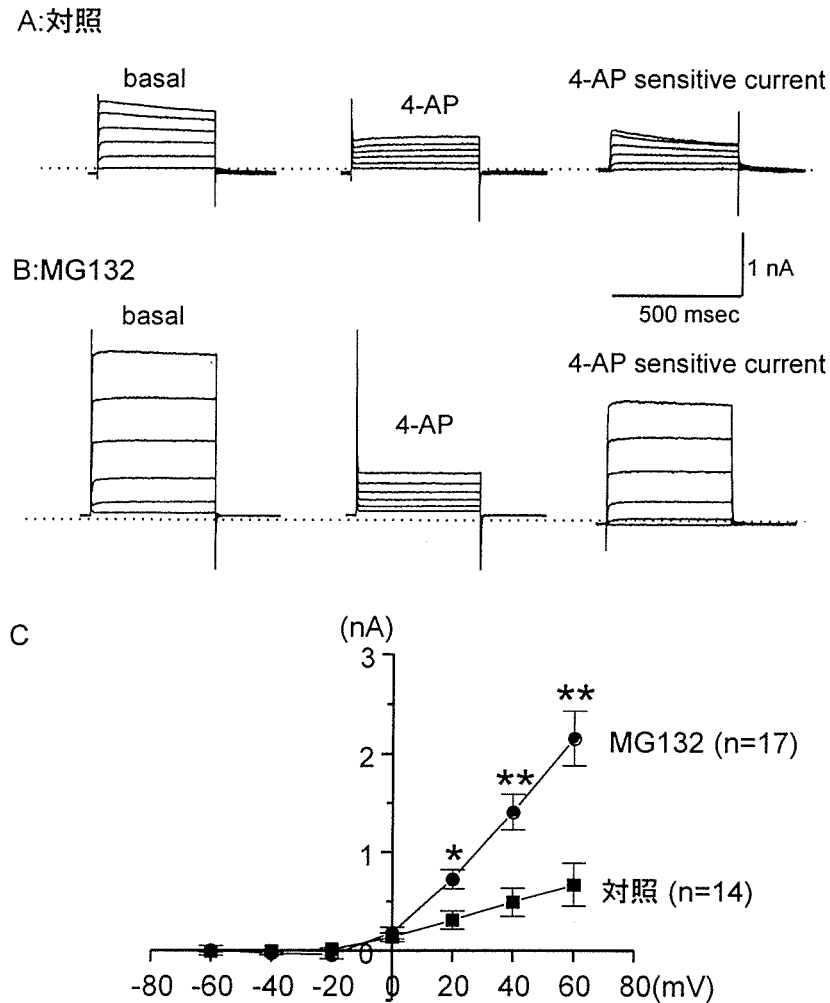


図4. ホールセルパッチクランプ法による発現Kv1.5チャネルの測定。
(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

究でのKv1.5チャネルの半減期は9.2時間でありKv1.5チャネルはshort-lived proteinに属し、時間単位でその発現量が制御されていると考えられた。しかし、この半減期は培養下垂体細胞を用いた報告⁶⁾の4時間よりも少し遅い速度で分解されている。この差はTakimotoら⁶⁾が培養下垂体細胞そのもののnative cellを用いてKv1.5チャネルの分解の半減期を測定しているのに対して、著者は培養COS 7細胞に遺伝子導入したKv1.5チャネルを用いて半減期を測定しており、用いた細胞、実験条件の違いによる可能性が考えられる。さらに、Takimotoら⁶⁾はKv1.5蛋白の半減期を、免疫沈降法を用いて測定しているのに対して、本実験ではパルス-チェイス法を用いている点が異なる。使用した細胞の差については、例えばConexin43ではCHO細胞やts20細胞を用いて半減期を測定した

研究と、ラット培養心筋細胞を用いて半減期を測定した研究では差を認めていないこと¹¹⁾から、今回の半減期の差は用いた細胞による差ではなく、測定法の違いによると思われる。理想的には心筋細胞のnative Kv1.5チャネル蛋白の半減期をパルス-チェイス法で追跡することが望ましいが、Kv1.5チャネルは胎児培養心筋細胞では発現が少なく、さらにKv1.5チャネルは心房筋に有意に発現していることから心筋細胞を用いてのnative Kv1.5チャネル蛋白の半減期を測定することが難しい。そのため、本研究では培養COS 7細胞にKv1.5チャネルを遺伝子導入した条件での半減期の検討を行った。

多くのshort-lived 細胞質蛋白質は複数のユビキチンが共有結合した後20Sプロテアソームを含んだ26Sプロテアソームによりすみやかに分解さ

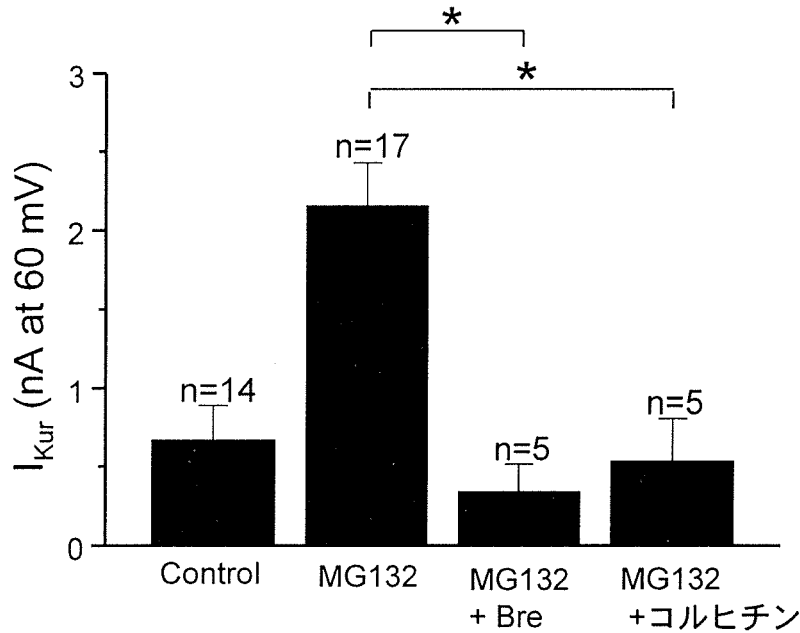


図5. MG132前処置時Kv1.5電流増加作用に対してのBrefeldineA (Bre) およびコルヒチンの作用. (* $P < 0.05$)

れる^{14, 27)}. 今回の実験系では, Kv1.5チャンネルはユビキチン化後速やかに分解された. この分解速度はプロテアソーム阻害剤であるMG132により半減期が2.8倍延長する事実から, Kv1.5チャンネルはユビキチン/プロテアソーム系で主に分解されることが判明した. 近年, チロシンキナーゼ受容体²⁰⁾や成長因子受容体²¹⁾などの膜蛋白質はユビキチン化された後, プロテアソーム系ではなく, リソソーム/エンドソーム系での分解が主であると報告されている. またENaC²³⁾やconnexin43¹¹⁾の半減期はプロテアソーム阻害およびライソゾーム阻害により共に延長することから, リソソーム/エンドソーム系のみならずプロテアソーム系により分解されると報告された. ENaCやconnexin43のように一つのチャンネル蛋白質に2つの分解系が作用する機序として小胞体で不完全に修飾された蛋白質はプロテアソーム系で, 完全に修飾された蛋白質はリソソーム/エンドソーム系で分解される場合が考えられ, 完全に修飾された蛋白質と不完全に修飾された蛋白質はそれぞれ独立した系で分解されているとしている²³⁾. 本研究では, リソソーム阻害剤であるクロロキンの前処置ではその半減期に差を認めなかったことから, Kv1.5チャンネルの分解はユビキチン/プロテアソーム系が主に担っていると考えられる. 前述したように, Kv1.5チャ

ネルはubiquitin-activating enzyme (E1), ubiquitin-conjugating enzyme (E2), ubiquitin-ligase (E3)の働きで標的蛋白質のリジン残基に一個または複数のユビキチンが共有結合し^{14, 15)}, ユビキチン化された蛋白質はスレオニンプロテアーゼである26Sプロテアソームにより分解される^{15, 16)}. 実際Kv1.5チャンネルにはリジン残基が複数個存在しており, そのリジン残基を標的にしてユビキチン化が起きると推定される. どのリジン残基がユビキチンの標的であるかについては, site-directed mutagenesisで作成した点変異のKv1.5チャンネルを使用した検討が今後必要である. 本研究はshort-lived膜蛋白質であるKv1.5チャンネルはユビキチン化され, その後小胞体において品質管理を受けた後にプロテアソーム系により細胞内分解を受けることを示している. この結果は, ENaCやconnexin43のようにプロテアソーム系とリソソーム/エンドソーム系の2つの系で, 不完全な蛋白質と完全な蛋白質とが独立した系で分解されるのに対して, Kv1.5チャンネルはユビキチン/プロテアソーム系のみで分解されていると考えられる.

Kv1.5チャンネル蛋白質の細胞内輸送についての報告はないため, 今回の共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内小器官のマーカーとKv1.5チャンネル

との位置関係を検討した今回の研究結果は、Kv1.5チャンネルはエンドソームには無く、小胞体とゴルジ体に存在することが明らかとなった。この結果は小胞体で種々の分子シャペロンにより品質管理を受けたKv1.5チャンネルは、小胞体からゴルジ体へと輸送されていることを示している^{12, 13)}。つまり、Kv1.5チャンネルは一般の蛋白質と同様、小胞体内でシグナル配列切断とコア糖鎖転移、さらに糖鎖のプロセッシングを受けた後、分子シャペロンにより折りたたまれ正常な構造をもつKv1.5チャンネル蛋白質がゴルジ体へと輸送されていると推測できる。この段階で、Kv1.5チャンネルは小胞体から細胞質へと送り出されユビキチン化の後にプロテアソームにより速やかに分解されると推定できる。実際、プロテアソーム阻害薬であるMG132の前処置によりKv1.5チャンネルの局在はゴルジ体と小胞体に増加していた。このことはKv1.5チャンネルが小胞体からゴルジ体へと輸送されているが、プロテアソームを阻害すると分解されないKv1.5蛋白質の量が増加し小胞体からゴルジ体へと輸送が増加することを示す。この事実はパッチクランプにより電気生理学的にも確認された。MG132は膜のKv1.5チャンネル活性を有意に上昇させ、このMG132の作用はbrefeldine A及びコルヒチンにより減弱された。MG132の作用によりKv1.5チャンネル活性が増加したことはプロテアソームで分解されている完全な糖鎖修飾を受けた蛋白質の分解が阻害され、結果的に正常な機能をもったKv1.5チャンネルの発現が増加することを意味し、Kv1.5チャンネルはユビキチン/プロテアソーム系のみで不完全な糖鎖修飾を受けた蛋白質と完全な蛋白質とが分解されているとする前述の仮説を支持するものである。brefeldine Aは新たに作られた蛋白質の小胞体からゴルジ体への輸送を阻害する²³⁾ことを考えると、brefeldine AがMG132の作用を減弱させたことは、プロテアソームを阻害すると小胞体からゴルジ体への輸送蛋白質量が増えて膜のKv1.5チャンネル活性が増加することを示唆する。さらにコルヒチンは微小管を破壊する²⁸⁾ので、コルヒチンがMG132の作用を減弱したことは、プロテアソームを阻害すると小胞体からゴルジ体を経て微小管を通して膜への輸送蛋白質量が増える結果、膜のKv1.5チャンネル活性が増加することを示している。しかし、コルヒチンもMG132のKv1.5チャンネル増加作用を完全には阻止していない。こ

の結果はユビキチン/プロテアソーム系が小胞体に関連しているのみならず、細胞膜に輸送されたKv1.5チャンネルがinternalizationした後にユビキチン/プロテアソーム系で分解されている可能性も否定できないことを示す。

細胞内蛋白質輸送障害が原因で発症する疾患は、イオンチャンネル病であるcystic fibrosis²⁹⁾、先天性QT延長症候群³⁰⁾、高血圧を発症するLiddle症候群²³⁾、low density lipoprotein receptorの異常で発症する家族性高コレステロール血症、Na⁺/glucose輸送体の異常で発症するglucose-galactose malabsorption³¹⁾、その他の先天性疾患などがある。今回、プロテアソーム阻害剤が細胞内チャンネル蛋白質の量を増加させ、細胞膜への輸送を促進して膜の機能的なKv1.5チャンネルの活性を上昇させることを明らかにした。この事実はcystic fibrosis²⁹⁾や遺伝性QT延長症候群(N470D HERG, G601S HERG, Y611H HERG, V822M HERG)^{30, 32, 33)}、Liddle症候群²³⁾などのチャンネル蛋白質の輸送障害により生じる遺伝病を薬理的に制御できる可能性を示唆する。Zhouら³⁰⁾はHERG型K⁺チャンネルが減少して致死性不整脈を発症する2型遺伝性QT延長症候群において、変異HERGチャンネル(N470D)がコア糖鎖転移のみ修飾された未熟チャンネルが増加し、一方で完全に糖鎖修飾された成熟チャンネルが出来ないためにHERGチャンネルが膜へ適正に輸送できないことを示した。さらに、HERGチャンネル遮断剤(E-4031, astemizole, cisapride)が分子シャペロンとして作用して完全に糖鎖修飾された成熟チャンネルを増加させることを示した。cystic fibrosisはcystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)の細胞膜上での減少が原因で生じる³⁴⁾。Satoら³⁵⁾はcystic fibrosisのcommon mutationであるΔF508CFTRは、wild typeと異なりpre-Golgiに蓄積し分解される結果CFTRが減少することを示し、さらにglycerolが完全に糖鎖修飾された成熟チャンネルを増加させることを示した。このように遺伝性膜蛋白質輸送異常症では、小胞体での蛋白質の品質管理を制御することがその治療に繋がると考えられる³⁶⁾。本研究でユビキチン/プロテアソーム系を制御することで機能的なKv1.5チャンネルを増加できた。心房のKv1.5チャンネルは心房細動においてその発現が減少するため、Kv1.5チャンネルが減少し薬剤不応性の心房細動とな

ってしまう。そこでユビキチン/プロテアソーム系を制御できる薬剤を探索できれば、薬剤の標的としてのKv1.5チャンネルを増加させることが、薬剤不応性の心房細動を治療できる新たな薬理学的治療となり得ることが期待される。

結 論

①Kv1.5チャンネルは速やかにユビキチン化され、プロテアソームにより分解されるshort-lived proteinであり、その分解にはリソソーム/エンドソーム系の関与は少ない。②プロテアソームを阻害するとKv1.5チャンネルの半減期が延長し、結果としてチャンネル蛋白質が増加する。③Kv1.5チャンネルの細胞内局在及び電気生理学的解析からKv1.5チャンネルは小胞体、ゴルジ体、微小管を経て細胞膜に輸送され、プロテアソームを阻害すると小胞体、ゴルジ体、微小管への輸送が増加し、細胞膜での機能的Kv1.5チャンネルが増加することが判明した。

稿を終えるにあたり、懇切なる御指導と御校閲を賜りました鳥取大学医学部内科学第一教室重政千秋教授、また御校閲賜りました鳥取大学医学部解剖学第二教室井上貴央教授、同生化学教室山田一夫教授に深甚なる謝意を捧げます。直接御指導頂きました同神経生物学教室二宮治明助教授、同内科学第一教室久留一郎助教授、井川修講師、佐々木紀仁先生、谷口晋一先生、大田原顕先生をはじめ、御協力頂いた教室員各位に深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Nattel, S., Yue, L. and Wang, Z. (1999) Cardiac ultrarapid delayed rectifiers: a novel potassium current family of functional similarity and molecular diversity. *Cell Physiol Biochem* 9, 217-226.
- 2) Yu, Y., Platoshyn, O., Zhang, J., Krick, S., Zhao, Y., Rubin, L.J., Rothman, A. and Yuan, JX. (2001) c-Jun decreases voltage-gated K(+) channel activity in pulmonary artery smooth muscle cells. *Circulation* 104, 1557-1563.
- 3) Chung, YH., Shin, C., Kim, MJ., Lee, BK. and Cha, CI. (2001) Immunohistochemical study on the distribution of six members of the Kv1 channel subunits in the rat cerebellum. *Brain Res* 895, 173-177.
- 4) Swanson, R., Marshall, J., Smith, JS., Williams, JB., Boyle, MB., Folander, K., Luneau, CJ., Antanavage, J., Oliva, C. and Buhrow, SA. (1990) Cloning and expression of cDNA and genomic clones encoding three delayed rectifier potassium channels in rat brain. *Neuron* 4, 929-939.
- 5) Matsubara, H., Liman, ER., Hess, P. and Koren, G. (1991) Pretranslational mechanisms determine the type of potassium channels expressed in the ratskeletal and cardiac muscles. *J Biol Chem* 266, 13324-13328.
- 6) Takimoto, K., Fomina, AF., Gealy, R., Trimmer, JS. and Levitan, ES. (1993) Dexamethasone rapidly induces Kv1.5 K+ channel gene transcription and expression in clonal pituitary cells. *Neuron* 11, 359-369.
- 7) Levitan, ES., Gealy, R., Trimmer, JS. and Takimoto, K. (1995) Membrane depolarization inhibits Kv1.5 voltage-gated K+ channel gene transcription and protein expression in pituitary cells. *J Biol Chem* 270, 6036-6041.
- 8) Mays, DJ., Foose, JM., Philipson, LH. and Tamkun, MM. (1995) Localization of the Kv1.5 K+ channel protein in explanted cardiac tissue. *J Clin Invest* 96, 282-292.
- 9) Van, Wagoner, DR., Pond, AL., McCarthy, PM., Trimmer, JS. and Nerbonne, JM. (1997) Outward K+ current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation. *Circ Res* 80, 772-781.
- 10) Brundel, BJ., Van, Gelder, IC., Henning, RH., Tuinenburg, AE., Wietses, M., Grandjean, JG., Wilde, AA., Van, Gilst, WH. and Crijns, HJ. (2001) Alterations in potassium channel gene expression in atria of patients with persistent and paroxysmal atrial fibrillation: differential regulation of protein and mRNA levels for K+ channels. *J Am Coll Cardiol* 37, 926-932.
- 11) Saffitz, JE., Laing, JG. and Yamada, KA. (2000) Connexin expression and turnover :

- implications for cardiac excitability. *Circ Res* **86**, 723-728.
- 12) Hurlley, SM., Bole, DG., Hoover-Litty, H., Helenius, A. and Copeland, CS. (1989) Interactions of misfolded influenza virus hemagglutinin with binding protein (BiP). *J Cell Biol* **108**, 2117-2126.
 - 13) Hammond, C. and Helenius, A. (1995) Quality control in the secretory pathway. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 523-529.
 - 14) Ciechanover A. (1994) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* **79**, 13-21.
 - 15) Jentsch, S. and Schlenker, S. (1995) Selective protein degradation: a journey's end within the proteasome. *Cell* **82**, 881-884.
 - 16) Hilt, W. and Wolf, DH. (1996) Proteasomes: destruction as a programme. *Trends Biochem Sci* **21**, 96-102.
 - 17) Palombella, VJ., Rando, OJ., Goldberg, AL. and Maniatis, T. (1994) The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- κ B precursor protein and the activation of NF- κ B. *Cell* **78**, 773-785.
 - 18) Scheffner, M., Huijbregtse, JM., Vierstra, RD. and Howley, PM. (1993) The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* **75**, 495-505.
 - 19) Treier, M., Staszewski, LM. and Bohmann, D. (1994) Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain. *Cell* **78**, 787-798.
 - 20) Cenciarelli, C., Hou, D., Hsu, KC., Rellahan, BL., Wiest, DL., Smith, HT., Fried, VA. and Weissman, AM. (1992) Activation-induced ubiquitination of the T cell antigen receptor. *Science* **257**, 795-797.
 - 21) Strous, GJ., van Kerkhof, P., Govers, R., Ciechanover, A. and Schwartz, AL. (1996) The ubiquitin conjugation system is required for ligand-induced endocytosis and degradation of the growth hormone receptor. *Embo J* **15**, 3806-3812.
 - 22) Hochstrasser, M. (1996) Protein degradation or regulation: Ub the judge. *Cell* **84**, 813-815.
 - 23) Staub, O., Gautschi, I., Ishikawa, T., Breitschopf, K., Ciechanover, A., Schild, L. and Rotin, D. (1997) Regulation of stability and function of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) by ubiquitination. *Embo J* **16**, 6325-6336.
 - 24) Waechter, CJ., Schmidt, JW. and Catterall, WA. (1983) Glycosylation is required for maintenance of functional sodium channels in neuroblastoma cells. *J Biol Chem* **258**, 5117-5123.
 - 25) Stollberg, J. and Berg, DK. (1987) Neuronal acetylcholine receptors: fate of surface and internal pools in cell culture. *J Neurosci* **7**, 1809-1815.
 - 26) Passafaro, M., Clementi, F. and Sher, E. (1992) Metabolism of omega-conotoxin-sensitive voltage-operated calcium channels in human neuroblastoma cells: modulation by cell differentiation and anti-channel antibodies. *J Neurosci* **12**, 3372-3379.
 - 27) Goldberg, AL. and Rock, KL. (1992) Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature* **357**, 375-379.
 - 28) Rossi, M., Gorbunoff, MJ., Caruso, F., Wing, B., Perez-Ramirez, B. and Timasheff, SN. (1996) Structural analysis of the substoichiometric and stoichiometric microtubule-inhibiting biphenyl analogues of colchicine. *Biochemistry* **35**, 3286-3289.
 - 29) Ward, CL., Omura, S. and Kopito, RR. (1995) Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* **83**, 121-127.
 - 30) Zhou, Z., Gong, Q., Epstein, ML. and January, CT. (1998) HERG channel dysfunction in human long QT syndrome. Intracellular transport and functional defects. *J Biol Chem* **273**, 21061-21066.
 - 31) Martin, MG., Lostao, MP., Turk, E., Lam, J., Kreman, M. and Wright, EM. (1997) Compound missense mutations in the sodium/D-glucose cotransporter result in

- trafficking defects. *Gastroenterology* 112, 1206-1212.
- 32) Zhou, Z., Gong, Q. and January, CT. (1999) Correction of defective protein trafficking of a mutant HERG potassium channel in human long QT syndrome. Pharmacological and temperature effects. *J Biol Chem* 274, 31123-31126.
- 33) Furutani, M., Trudeau, MC., Hagiwara, N., Seki, A., Gong, Q., Zhou, Z., Imamura, S., Nagashima, H., Kasanuki, H., Takao, A., Momma, K., January, CT., Robertson, GA. and Matsuoka, R. (1999) Novel mechanism associated with an inherited cardiac arrhythmia: defective protein trafficking by the mutant HERG (G601S) potassium channel. *Circulation* 99, 2290-2294.
- 34) Welsh, MJ. and Smith, AE. (1993) Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 73, 1251-1254.
- 35) Sato, S., Ward, CL., Krouse, ME., Wine, JJ. and Kopito, RR. (1996) Glycerol reverses the misfolding phenotype of the most common cystic fibrosis mutation. *J Biol Chem* 271, 635-638.
- 36) Cheng, SH., Gregory, RJ., Marshall, J., Paul, S., Souza, DW., White, GA., O'Riordan, CR. and Smith, AE. (1990) Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* 63, 827-834.