

平成20年12月

# 廣田 裕 学位論文審査要旨

主 査 重 政 千 秋  
副主査 久 留 一 郎  
同 難 波 栄 二

## 主論文

Functional stabilization of Kv1.5 protein by Hsp70 in mammalian cell lines

(ほ乳類培養細胞株におけるHsp70によるKv1.5蛋白の機能的安定化)

(著者：廣田裕、倉田康孝、加藤克、野津智美、越田俊也、井上俊昭、河田康志、  
三明淳一郎、Udin Bahrudin、Peili Li、星川淑子、山本康孝、井川修、  
白吉安昭、中井彰、二宮治明、檜垣克美、平岡昌和、久留一郎)

平成20年 Biochemical and Biophysical Research Communications 372巻 469頁～474頁

# 学位論文要旨

## Functional stabilization of Kv1.5 protein by Hsp70 in mammalian cell lines

### (ほ乳類培養細胞株におけるHsp70によるKv1.5蛋白の機能的安定化)

Kv1.5チャネルは心筋のultrarapid遅延整流K<sup>+</sup>電流にあずかり、活動電位の再分極に重要な役割を演じている。Kv1.5チャネルは比較的半減期が短く、ユビキチン-プロテアソーム系で分解される。分子シャペロンである熱ショック蛋白(Hsp)は蛋白の折りたたみに必要であり、HERGなどのチャネル蛋白の安定化への関与が示唆されている。Kv1.5はHERGと同様の電位依存性K<sup>+</sup>チャネルスーパーファミリーに属しており、Hspにより安定化される可能性がある。本研究はHsp70がKv1.5蛋白に及ぼす効果を検討し、Hsp70がKv1.5蛋白を安定化し、そのチャネル密度を増加させることを明らかにした

## 方法

培養細胞にKv1.5-FLAG、Hsp70、Hsp90、mock vectorを遺伝子導入後、細胞を回収し、ウエスタンブロット法によりKv1.5-FLAG蛋白を検出した。また、Kv1.5蛋白の分解速度を測定するため、遺伝子導入した細胞を<sup>35</sup>S-Metで1時間標識(37°C、5%CO<sub>2</sub>)し各時間ごとに細胞を回収、抗Flag抗体結合Protein G agarose beadsにて免疫沈降させ、そのシグナルをフルオログラムで検出するパルスチェイス法で蛋白半減期を測定した。また、共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫蛍光抗体染色によりKv1.5-FLAG、Hsp70、ER-EYFP、Golgi-EYFP、AcGFP-Mem、Endosome-EGFPの細胞内局在を観察し、定量的画像解析を行った。Kv1.5-FLAG、Hsp70、mock vectorおよびgreen fluorescent protein (GFP)を遺伝子導入し、パッチクランプ法により全膜電流を記録し、発現したKv1.5チャネルによるI<sub>Kur</sub>電流を測定した。

## 結果

ウエスタンブロット法で測定した結果、Kv1.5-FLAG蛋白レベルは他のHspに比してHSF-1及びHsp70を安定に発現する細胞で有意に高かった。Hsp70はユビキチン化Kv1.5-FLAGレベルを変化させなかった。発現したKv1.5-FLAG蛋白の半減期を測定した結果、Kv1.5-FLAGの半減期はコントロールでは6.7±1.8時間であったが、Hsp70を同時導入すると14.1±2.2時間に有意に延長した。またKv1.5-FLAGとHsp70は共に免疫沈降され、両者は相互作用することが示唆された。次にHsp70を遺伝子導入したCOS7細胞を免疫蛍光抗体染色により検討したと

ころ、Kv1.5-FLAGは主に小胞体とゴルジ装置に分布し、Hsp70とKv1.5-FLAGとは共局在した。Hsp70過剰発現は小胞体、ゴルジ装置、および細胞表面においてKv1.5-FLAGシグナルを著明に増強した。この結果は膜分画を抽出する方法でも確認できた。パッチクランプ法により、Hsp70の発現は、+20から+80 mVの範囲で閾膜電位に影響することなく発現Kv1.5電流を有意に増加させた。さらに蛋白輸送阻害物質であるbrefeldin A、およびcolchicineはHsp70誘導によるKv1.5電流の増加を消失させた。

## 考 察

本研究によりHsp70過剰発現が蛋白可溶性を変化させることなく、半減期延長によってKv1.5-FLAG蛋白を増加させることが判明した。Kv1.5-FLAGとHsp70の免疫沈降の結果はHsp70がKv1.5と相互作用しこれを安定化させることを示し、他のHspでは作用がないことから、この安定化はHsp70に特異的であった。Hsp70はKv1.5-FLAGと共に免疫沈降され、免疫染色法において小胞体およびゴルジ装置に共局在したことは、Hsp70は小胞体、ゴルジ装置でKv1.5チャンネルに結合し、これを安定化させることが明らかとなった。Brefeldine Aおよびcolchicineは、小胞体、ゴルジ装置から細胞表面への成熟Kv1.5の細胞内輸送を阻害したことにより、Kv1.5に対するHsp70の作用を消失させたと考えられ、Hsp70依存性チャンネル活性増加は、小胞体、ゴルジ装置におけるHsp70の安定化作用によるKv1.5蛋白の膜での発現増加によるものであることが明らかとなった。

## 結 論

Hspは折りたたみ不良な蛋白の修復、分解による質的コントロールに関して中心的役割を果たしているが、本研究でHspはチャンネル蛋白の量的コントロールを行うことで機能性Kv1.5チャンネル活性増加にも重要な役割を演じることが明らかとなった。