

平成21年2月

# 越田俊也 学位論文審査要旨

主 査 重 政 千 秋  
副主査 難 波 栄 二  
同 久 留 一 郎

## 主論文

Stabilizing effects of eicosapentaenoic acid on Kv1.5 channel protein expressed in mammalian cells

(ほ乳類培養細胞株における不飽和脂肪酸エイコサペンタエン酸のKv1.5チャンネル蛋白安定化作用に関する研究)

(著者:越田俊也、倉田康孝、野津智美、廣田裕、Ting Y Kuang、Peili Li、Udin Bahrudin、原田真吾、三明淳一郎、山本康孝、星川淑子、井川修、檜垣克美、相馬雅明、吉田明雄、二宮治明、汐田剛史、白吉安昭、久留一郎)

平成21年 European Journal of Pharmacology 掲載予定

# 学 位 論 文 要 旨

## Stabilizing effect of eicosapentaenoic acid on Kv1.5 channel protein expressed in mammalian cells

### (ほ乳類培養細胞における不飽和脂肪酸エイコサペンタエン酸のKv1.5チャンネル蛋白安定化作用に関する研究)

n-3多価不飽和脂肪酸 (EPA及びDHA) の抗不整脈作用は心筋イオンチャンネルの修飾で説明される。電位依存性Kチャンネルファミリーに属するKv1.5チャンネルは心筋細胞の $I_{Kur}$ 電流を形成して活動電位再分極に重要な役割を演じる。EPA及びDHAの慢性投与はKv1.5チャンネルの生合成や細胞内輸送に影響する可能性が示唆されているが、それらのチャンネル蛋白の安定性への影響は知られていない。本研究ではEPA及びDHAの急性および慢性投与がKv1.5チャンネル蛋白の発現と活性に及ぼす効果を検討した。

## 方 法

培養COS7細胞にKv1.5-FLAG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サイクロフォスファミドで処理し、各時間ごとに回収した細胞についてウエスタンブロット法によりそのシグナルを検出し蛋白半減期を測定した。また、免疫蛍光抗体染色によりKv1.5-FLAG、ER-EYFP、Golgi-EYFP、AcGFP-Mem、Endosome-EGFPの細胞内局在を観察した。Kv1.5-FLAGまたは 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チャンネル電流を測定した。さらに心臓でのKv1.5の発現はラットにEPAを摂取させて評価した。

## 結 果

EPAおよびDHAのKv1.5電流に及ぼす急性用量依存性効果を検討した。50  $\mu$ Mの両薬剤は、脱分極パルス中 (0 mV~60 mV) に電流減衰を伴ってKv1.5電流のピーク値を有意に抑制した。次にEPAとDHAのKv1.5チャンネルの発現と活性におよぼす慢性用量依存性効果を検討した。10  $\mu$ MのEPAの慢性投与は有意にKv1.5-FLAG蛋白を増加させたが、100  $\mu$ MのEPAはそれを有意に減少させた。一方で、DHAは10 ~100  $\mu$ Mの範囲で用量依存性にKv1.5-FLAG蛋白を減少

させた。0.1~10  $\mu\text{M}$ の範囲での両薬剤の慢性効果の検討では、EPAは用量依存性にKv1.5-FLAG蛋白を有意に増加させたが、一方、同じ濃度のDHAはKv1.5-FLAG蛋白量の変化を起さなかった。ラットにEPAを内服させることで心房筋細胞の内因性Kv1.5蛋白は有意に増加した。さらに1  $\mu\text{M}$ のEPAを12時間作用させると細胞に発現させたKv1.5電流は脱分極パルス0 mV~60 mVの領域で有意に増加した。次にKv1.5チャネル蛋白の安定性ならびに細胞内局在におよぼすEPAの慢性効果を検討した。コントロールではKv1.5-FLAG蛋白の半減期は $6.7 \pm 1.8$ 時間 (n=4) であるが、EPA 1  $\mu\text{M}$ 処理下では $14.1 \pm 2.2$ 時間へ有意に延長した。コントロールでのKv1.5-FLAG蛋白のCOS7細胞内局在を比較した。Kv1.5-FLAG蛋白はER-EYFPおよびGolgi-EYFPと共局在することから小胞体およびGolgi体に存在する。一方Endosome-EGFPとは共局在しないことに加えてリソソーム阻害薬であるクロロキン (2  $\mu\text{M}$ ) がKv1.5-FLAG蛋白の安定性に影響をおよぼさないことからKv1.5-FLAG蛋白はエンドゾームには局在しない。1  $\mu\text{M}$ のEPA慢性投与下では小胞体とゴルジ体でのKv1.5-FLAG蛋白が著明に蓄積した。またコントロールではKv1.5-FLAG蛋白は細胞表面マーカーであるAcGFP-Memとは共局在しないが、1  $\mu\text{M}$ のEPA存在下ではAcGFP-Memに共局在する。細胞分画法を用いた検討でも10  $\mu\text{M}$ のEPAの投与は有意に小胞体および細胞膜でのKv1.5-FLAG蛋白の局在を増加させた。一方で蛋白輸送阻害薬であるbrefeldine Aおよびcolchicineは5  $\mu\text{M}$ で、またKv1.5電流阻害薬4-aminopyridine (4-AP) は1 mM で12時間処置するとEPAによるKv1.5電流の増加作用が消失した。

## 考 察

本研究では低用量のEPAの慢性投与がKv1.5チャネル蛋白を増加させることが判明した。低用量EPAのKv1.5チャネル蛋白増加の作用機序は、小胞体とゴルジ体でEPAがKv1.5チャネル蛋白の4-AP結合部位に結合し、蛋白構造の変化を介して蛋白の安定を促進することであり、細胞膜での発現の増加はその二次的作用であると考えられる。Kv1.5チャネル蛋白の脂肪酸アシル化の違いがEPAとDHAの作用の違いを説明し得るが今後の検討が必要である。心房筋はKv1.5チャネル蛋白を多く発現しているが、慢性心房細動や後天的心疾患の一部ではそれが減少している。低用量EPAの投与がこれらの病態に影響する可能性がある。

## 結 語

低用量EPAは慢性効果としてKv1.5チャネル蛋白を安定化しKv1.5電流を増加させることが明らかとなった。