

平成23年2月

丁亞光 学位論文審査要旨

主 査 重 政 千 秋

副主査 谷 口 晋 一

同 久 留 一 郎

主論文

Transcriptional activation of the anchoring protein SAP97 by heat shock factor (HSF)
-1 stabilizes Kv1.5 channels in HL-1 cells

(HSF-1によるSAP97の転写活性化はHL-1細胞のKv1.5を安定化する)

(著者：丁亞光、森川久未、倉田康孝、李佩俐、Udin Bahrudin、水田栄之助、加藤克、
三明淳一郎、山本康孝、吉田明雄、村田光延、井上敏昭、中井彰、汐田剛史、
檜垣克美、難波栄二、二宮治明、白吉安昭、久留一郎)

平成23年 British Journal of Pharmacology 掲載予定

学 位 論 文 要 旨

Transcriptional activation of the anchoring protein SAP97 by heat shock factor (HSF)-1 stabilizes Kv1.5 channels in HL-1 cells

(HSF-1によるSAP97の転写活性化はHL-1細胞のKv1.5を安定化する)

電位依存性K⁺チャネル (Kv1.5) は熱ショック蛋白ファミリーにより制御される。著者らは熱ショック蛋白ファミリーの転写因子であるheat shock factor 1 (HSF-1) とその誘導剤であるgeranylgeranylacetone (GGA) がKv1.5とそのアンカー蛋白であるsynapse associated protein 97 (SAP97)の発現に影響するか否かを検討した。

方 法

マウス培養心房筋細胞であるHL-1細胞に熱ショック、HSF-1の遺伝子導入またはGGA処理を行い、細胞を回収後、ウエスタンブロット法によりHSF-1、SAP97、Hsp70、Kv1.5を検出した。また、そのmRNAレベルをreal time RT-PCR法で検討した。SAP97の転写制御領域を検討するためにdeletion constructを作成しluciferase reporter gene assayを行った。Kv1.5-FLAGまたは mock vectorおよびgreen fluorescent protein (GFP) をサル培養腎上皮細胞であるCOS7細胞に遺伝子導入し、パッチクランプ法によりGGA処理による全膜電流を記録し、発現したKv1.5チャネル電流を測定した。

結 果

熱ショック (42 °C、1時間) をHL-1細胞に与えるとHSF-1、SAP97、Hsp70、Kv1.5の蛋白レベルの上昇が誘導される。この現象はHSF-1の遺伝子導入により再現されるが、HSF-1の変異体でheat shock elementに結合できないR71G mutantの遺伝子導入では再現されない。熱ショック処理とHSF-1遺伝子導入はSAP97のmRNAの増加を引き起こしたが、R71G mutantの遺伝子導入はSAP97のmRNAには影響しない。SAP97に対するsiRNA処理はHSF-1によるKv1.5ならびにSAP97の蛋白発現誘導を完全に阻害したことから、HSF-1はSAP97の転写制御領域に結合することでSAP97の転写を促進し、誘導されたSAP97がKv1.5を直接安定化することが推測された。Luciferase reporter gene assayから、SAP97のプロモーター領域にheat shock elementが存在し、このelementを欠失させると熱ショックならびにHSF-1遺伝子導入によるプロモーター活性上昇が消失した。Sirtuin 1 (SIRT1)はdeacetylase活性を有し、HSF-1

のheat shock elementへの結合効率を増加させることが知られている。SIRT1に対するsiRNAならびにSIRT1抑制薬であるnicotinamideはHSF-1によるSAP97mRNA上昇を抑制し、SIRT1活性薬であるresveratrolはこれを上昇させた。HSF-1の誘導剤であるGGAは用量依存性にHSF-1蛋白の発現を増加させそのEC₅₀は27nMである。GGA (100nM) はSAP97のmRNAおよび蛋白の増加ならびにKv1.5蛋白の増加を引き起こす。Luciferase reporter gene assayから、このGGAの作用はSAP97のプロモーター領域にheat shock elementが存在するとプロモーター活性上昇が発揮され、このelementを欠失させるとプロモーター活性上昇が消失した。SIRT1活性薬であるresveratrolはGGAのSAP97 mRNAへの効果を増強し、SIRT1抑制薬であるnicotinamideはGGAの効果を減弱させた。GGA (100nM) はKv1.5によりコードされるI_{Kur}電流を+20から+80 mVの範囲で有意に増加させた。この効果はタンパク輸送阻害物質であるbrefeldin A、および colchicineの前処置により消失することから、GGAによるI_{Kur}電流の増加はSAP97増加を介してのKv1.5蛋白の安定化によると考えられた。

考 察

本研究ではHSF-1がKv1.5のアンカー蛋白であるSAP97のプロモーター領域にあるheat shock elementに結合することで、SAP97の転写活性を上昇させ、Kv1.5チャンネルを安定化させることを示し、SAP97がHSF-1の新しい標的分子であることを示した。HSF-1によるSAP97の転写活性上昇がSIRT1により制御されることは、SIRT1によるSAP97発現調節が可能であることを示す。さらにHSF-1の誘導薬であるGGAがSAP97の転写活性を増加させ、Kv1.5チャンネルの蛋白ならびに機能を増幅することが明らかとなった。GGAはこれまでに多くの臓器保護作用が報告されてきたが、近年、心房細動の慢性化を抑制することが示されているが、その機序としてGGAのHSF-1の誘導によるSAP97増加を介するKv1.5安定化作用がその一部に関与している可能性がある。さらにGGAによる本作用もSIRT1により制御されており、GGAの効果増強を目的としたSIRT1の活性化薬の開発が期待される。

結 論

HSF-1はSAP97のheat shock elementとSIRT1依存的に結合し、SAP97を増加させることでKv1.5を安定化させた。これらの効果はGGAにより再現できることが明らかとなった。