

学位論文要約

M3 muscarinic receptor signaling stabilizes a novel mutant human ether-a-go-go-related gene channel protein via phosphorylation of heat shock factor 1 in transfected cells

(M3ムスカリン受容体シグナルは遺伝子導入した細胞における熱ショック因子1のリン酸化を介して新規変異ヒト遅延整流性カリウムイオンチャネル (hERG) 遺伝子蛋白質を安定化させる)

(著者：Endang Mahati、Peili Li、倉田康孝、Nani Maharani、池田信人、坂田晋史、小倉一能、三明淳一郎、相庭武司、清水渉、仲宗根眞恵、二宮治明、檜垣克美、山本一博、中井彰、白吉安昭、久留一郎)

平成28年 Circulation Journal 80巻 2443頁～2452頁

hERGチャネルは心筋の再分極過程を担うが、その変異はQT延長症候群(LQT)2型の原因である。ほとんどのhERGチャネルの変異は未熟蛋白質を生成し、細胞内輸送障害を起こす。副交感神経はムスカリン(M)受容体を介して心臓に作用するが、M3受容体は心臓に発現し、心筋活動電位を短縮させる。最近ではM3受容体にカップルしたGq蛋白を介してPKCとDAGが活性化し、hERGチャネルの成熟化が促進し心筋活動電位が短縮すると報告された。本研究ではM3受容体シグナルがPKCを介して熱ショック因子(HSF)1がリン酸化され熱ショック蛋白質が活性化され、野生型(WT)-hERGのみならず、今回著者らが見出した新規二重変異を有するhERG蛋白質(DM-hERG)の成熟化を促進することを見出した。

方法

LQT2患者のゲノムDNAをダイレクトシーケンス法により精査し、本患者の変異はhERG遺伝子の1714番目の塩基がグアニンからアデニンに置換され(G572S)、また、3112と3113塩基の間にGCGACG配列を挿入されることにより新規二重変異(DM-hERG)であることが明らかとなった。WT-hERGおよびDM-hERG遺伝子をそれぞれHEK293細胞に導入し、stable cell lineを樹立した。そのstable cell lineにmuscarinic receptor agonist、carbachol (50 μ M、2時間)の添加の有無で、hERG蛋白特性をウェスタンブロット法、免疫蛍光抗体染色、チェイス実験、パッチクランプ法などにより解析した。HSF1-Hsp pathwayを検討するためにReporter gene assayを行った。コンピュータシミュレーション

ン法により増加する変異hERG電流による心筋細胞の活動電位期間への影響を示した。

結 果

LQT2の患者に見出されたDM-hERGは135KDaの未熟蛋白質のみを有し、WT-hERGに対してドミナントネガティブ効果を発揮した。図2に示すように、CarbacholによるM3受容体刺激は濃度ならびに時間依存性にDM-hERG蛋白質の成熟化を促進した。小胞体に主に局在していたDM-hERG蛋白質はCarbachol処理によりゴルジ体ならびに細胞膜に局在した。DM-hERG蛋白質によるIKr電流はほとんど記録されないが、Carbachol処理によりIKr電流は有意に増加した。BrefeldinAにより小胞体からゴルジ体へのDM-hERG蛋白質の輸送を阻害した条件下でCarbachol処理はDM-hERG蛋白質の小胞体関連分解(ERAD)を阻害した。このCarbacholによるDM-hERGの成熟化促進作用はM3受容体拮抗薬ならびにPKC阻害薬で抑制された。CarbacholはHSF-1のリン酸化を促進し、hsp70/90の活性を促進し、HSF-1を共発現させるとCarbacholのDM-hERG成熟化作用が促進した。またM3受容体拮抗薬ならびにPKC阻害薬はCarbacholのHSF-1のリン酸化、hsp70/90の誘導を阻害した。シミュレーション上CarbacholによるDM-hERGのIKr電流の増加は、活動電位持続時間を短縮し早期後脱分極を抑制できた。

考 察

LQT2患者由来の新規のDM-hERG蛋白質は成熟化過程が障害されたドミナントネガティブ効果を有する変異蛋白質である。本研究ではCarbachol処理はM3受容体を介してDM-hERGの成熟化を促進することでその細胞膜での発現と機能を促進することが判明した。その機序としてM3受容体にカップルしたGqを介してPKCが活性化し、PKCはHSF-1のリン酸化を促進し、HSF-1に誘導されるhsp70/90が発現することが重要である。これまでにM3受容体の活性化はPKCを介してNedd4-2をリン酸化することでWT-hERG蛋白質の内化が抑制され、細胞膜上に成熟したWT-hERGが増加すると考えられてきた。本研究ではM3受容体-PKC-HSF-1のリン酸化経路によるhsp familyの発現増加がERADを阻害することで、野生型のみならず変異hERGの成熟化を促進できることを明らかにし、本経路はLQT2の原因である変異hERG蛋白質の成熟化を介してLQT2の不整脈に対しての新たな治療に繋がる可能性がある。

結 論

M3受容体刺激はHSF-1のリン酸化によるhsp familyの活性化を介してERADを抑制する

という新規経路で変異hERGの成熟化を促進して、LQT2の不整脈発生を抑制できる。