

---

細胞膜 PIP<sub>2</sub>による心筋緩徐活性型遅延整流性  
K<sup>+</sup>チャネルの調節の分子基盤

---

17590185

平成 17 年度～平成 18 年度科学研究費補助金  
(基盤研究(C)) 研究成果報告書

平成 19 年 5 月

研究代表者 松 浦 博  
滋賀医科大学医学部教授

緩徐活性型遅延整流性 $K^+$ チャンネル ( $I_{Ks}$ ) は活動電位プラトー相で活性化され活動電位持続時間を決定する重要なイオンチャンネルの一つであり、 $I_{Ks}$ の発現をコードする遺伝子の変異は、心臓のイオンチャンネル病として注目を集めている家族性QT延長症候群 (LQTS) の一因となることが明らかにされている。すなわち、 $I_{Ks}$ の $\alpha$ -サブユニット (KvLQT1) をコードする *KCNQ1* 遺伝子および $\beta$ -サブユニット (minK 蛋白) をコードする *KCNE1* 遺伝子の変異は、いずれもチャンネルの機能障害 (外向き $K^+$ チャンネル電流の減少) を引き起こし (loss of function), それが活動電位持続時間 (心電図上QT時間に相当) の著しい延長と特異な多形性心室頻拍 (torsadepointes), さらには、失神発作、突然死を惹起することが明らかにされている (*KCNQ1* 遺伝子の変異, LQT1 ; *KCNE1* 遺伝子の変異, LQT5) .

細胞膜構成リン脂質の一つであるホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸 ( $PIP_2$ ) は、ホスホリパーゼC (PLC) の作用による2種類のセカンドメッセンジャー (イノシトール1,4,5-三リン酸 ( $IP_3$ ) およびジアシルグリセロール(DAG)) 産生の前駆体としてはたらくのみならず、イオンチャンネルやトランスポータなどの膜輸送タンパクの直接的な制御因子としても作用することが明らかにされてきている。細胞膜内の $PIP_2$ 含量はさまざまな細胞刺激によって変動することが示されており、例えば、前述のPLC活性化に結びつく種々のGqタンパク質連関型受容体の刺激やさらには細胞膜伸展によっても $PIP_2$ 含量が減少することが報告されている。心筋細胞においては、 $\alpha_1$ -アドレナリン受容体 ( $\alpha_1$ -受容体) やP2Y-ATP受容体 (P2Y-受容体) などのGqタンパク質連関型受容体が発現した心臓の機能調節に重要な役割を担っていることが知られている。さらに、心房細動や虚血時にみられる心筋細胞の膨張など細胞膜の伸展が惹起される病態も存在する。我々はこれまで、モルモット心房筋細胞を用いた電気生理学的検討により細胞膜 $PIP_2$ は $I_{Ks}$ に対して抑制作用をもつこと、そこには $PIP_2$ のもつ負電荷が密接に関与していることを明らかにしてきた。本研究課題では、 $\alpha_1$ -受容体やP2Y-受容体の刺激、さらに細胞膜伸展による $I_{Ks}$ の増大反応において細胞膜 $PIP_2$ の変動 (減少) がどの程度関わっているかについて定量的に解析を行った。その結果、 $\alpha_1$ -受容体による $I_{Ks}$ の増大反応においては細胞膜 $PIP_2$ の減少は約4割程度関わっている (残りの約6割はプロテインキナーゼCの活性化による) のに対して、P2Y-受容体刺激による $I_{Ks}$ の増大反応はそのほとんどが $PIP_2$ の減少によることを示唆する実験データが得られた。さらに、細胞膜伸展による $I_{Ks}$ の増大反応もその4割程度が細胞膜 $PIP_2$ の減少によることが明らかとなった。細胞膜 $PIP_2$ によるイオンチャンネルの制御過程は、Gq-PLC連関型受容体刺激時のみならず、様々な細胞刺激においても発生する可能性が考えられる。さらに、Gq-PLC連関型受容体によるイオンチャンネルの制御機構において細胞膜 $PIP_2$ の定量的役割が異なっている可能性も考えられ、今後はその背景にある分子メカニズム (受容体とタンパク質の局在等) に関して、更なる検討が必要と考えられる。

滋賀医科大学附属図書館



2006014423

## 研究組織

研究代表者：松浦 博 (滋賀医科大学医学部教授)

研究分担者：林 維光 (滋賀医科大学医学部助手)

研究分担者：豊田 太 (滋賀医科大学医学部助手)

## 交付決定額 (配分額)

(金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 17 年度	2,200	0	2,200
平成 18 年度	1,400	0	1,400
総計	3,600	0	3,600

## 研究発表

### (1) 学会誌等

1. Omatsu-Kanbe M, Inoue K, Fujii Y, Yamamoto T, Isono T, Fujita N, Matsuura H (2006). Effect of ATP on preadipocyte migration and adipocyte differentiation by activating P2Y receptors in 3T3-L1 cells. *Biochem J* 393:171-180. (平成 18 年 1 月 1 日)
2. Abdelalim EM, Takada T, Toyoda F, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Tooyama I, Torii R (2006). In Vitro expression of natriuretic peptides in cardiomyocytes differentiated from monkey embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 340:689-695. (平成 18 年 2 月 10 日)
3. Zankov DP, Omatsu-Kanbe M, Isono T, Toyoda F, Ding WG, Matsuura H, Horie M (2006). Angiotensin II potentiates the slow component of delayed rectifier K<sup>+</sup> current via the AT<sub>1</sub> receptor in guinea pig atrial myocytes. *Circulation* 113:1278-1286. (平成 18 年 3 月 14 日)
4. Yamashita A, Takada T, Omatsu-Kanbe M, Nemoto K, Matsuura H, Yamamoto G, Torii R (2006). Monkey embryonic stem cells differentiate into adipocytes *in vitro*. *Cloning Stem Cells* 8:3-9. (平成 18 年 3 月)
5. Tahara M, Omatsu-Kanbe M, Sanada M, Maeda K, Koya D, Matsuura H, Kashiwagi A, Yasuda H (2006). Effect of PKC $\beta$  inhibitor on Ca<sup>2+</sup> homeostasis in diabetic sensory neurons. *Neuroreport* 17:683-688. (平成 18 年 4 月 24 日)
6. Toyoda F, Ueyama H, Ding WG, Matsuura H (2006). Modulation of functional properties of KCNQ1 channel by association of KCNE1 and KCNE2. *Biochem Biophys Res Commun* 344:814-820. (平成 18 年 6 月 9 日)
7. Zankov DP, Omatsu-Kanbe M, Toyoda F, Ding WG, Matsuura H, Isono T, Horie M (2006). Response to Letter Regarding Article, "Angiotensin II potentiates the slow component of delayed rectifier K<sup>+</sup> current via the AT<sub>1</sub> receptor in guinea pig atrial myocytes. *Circulation* 114: e566. (平成 18 年 10 月 31 日)

8. Hayase F, Matsuura H, Sanada M, Kitada-Hamada K, Omatsu-Kanbe M, Maeda K, Kashiwagi A, Yasuda H (2007). Inhibitory action of protein kinase C $\beta$  inhibitor on tetrodotoxin-resistant Na<sup>+</sup> current in small dorsal root ganglion neurons in diabetic rats. *Neurosci Lett* 417: 90–94. (平成 19 年 4 月 24 日)
9. Toda H, Ding WG, Yasuda Y, Toyoda F, Ito M, Matsuura H, Horie M (2007). Stimulatory action of protein kinase C $\epsilon$  isoform on the slow component of delayed rectifier K<sup>+</sup> current in guinea-pig atrial myocytes. *Br J Pharmacol* 150: 1011–1021. (平成 19 年 4 月)
10. 松浦 博, Dimitar P. Zankov, 尾松万里子, 磯野高敬, 豊田 太, 丁 維光, 堀江 稔 (2007). 心房筋細胞における AT<sub>1</sub> 受容体を介した緩徐活性型遅延整流性 K<sup>+</sup> 電流 ( $I_{Kr}$ ) の増大と活動電位の短縮 —心房細動治療における AT<sub>1</sub> 受容体遮断薬の有効性との関連—. *心電図* 27:145–153. (平成 19 年 3 月 25 日)

(2) 口頭発表

〔国際学会発表〕

1. Dimitar P. Zankov, Futoshi Toyoda, Wei-Guang Ding, Mariko Omatsu-Kanbe, Takahiro Isono, Hiroshi Matsuura, Minoru Horie. Characterization of sodium-potassium pump in the mouse cardiomyocyte cell line, HL-1. (50th Annual Meeting of the Biophysical Society, February 18–22, 2006, Salt Lake City, Utah, USA)
2. Futoshi Toyoda, Hisao Ueyama, Dimitar Zankov, Wei-Guang Ding, Hiroshi Matsuura. Synergic effects of KCNE1 and KCNE2 on functional properties KCNQ1 K<sup>+</sup> channel. (50th Annual Meeting of the Biophysical Society, February 18–22, 2006, Salt Lake City, Utah, USA)
3. Futoshi Toyoda, Wei-Guang Ding, Mariko Omatsu-Kanbe, Hiroshi Matsuura. The rapidly activating delayed rectifier potassium current,  $I_{Kr}$ , in HL-1 mouse atrial myocytes. (51st Annual Meeting of the Biophysical Society, March 3–7, 2007, Baltimore, Maryland, USA)
4. Taeko Kubo, Wei-Guang Ding, Futoshi Toyoda, Yusuke Fujii, Mariko Omatsu-Kanbe, Yoshiki Miura, Terumasa Mino, Hiroshi Matsuura. Upregulation of HERG potassium channel function by phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. (ESC (European Society of Cardiology) Congress 2007, September 1–5, Vienna, Austria)

〔国内学会・研究会発表〕

1. 尾松万里子, 松浦 博. P2Y 受容体刺激による前駆脂肪細胞の adipogenic hormones に対する感受性増大. 2005 年度 (平成 17 年度) 生理学研究所研究会『生理機能制御および病態におけるプリン作動性シグナリングの役割とその分子機構』(平成 17 年 9 月 7 日～8 日).
2. 藤居祐介, 尾松万里子, 松浦 博. P2Y 受容体刺激による細胞膜 PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> の一過性の減少. 2005 年度 (平成 17 年度) 生理学研究所研究会『生理機能制御および病態におけるプリン作動性シグナリングの役割とその分子機構』(平成 17 年 9 月 7 日～8 日)

3. 相庭武司, 豊田 太, 丁 維光, Zankov Dimitar P, 松浦 博, 堀江 稔, 野田 崇, 清水 渉, 稲垣正司, 杉町 勝. ネコ心室筋細胞における急速活性型遅延整流性  $K^+$ 電流 ( $I_{Kr}$ ) の機能解析. 第 22 回日本心電学会学術集会 (平成 17 年 10 月 6 日~7 日) .
4. 戸田裕之, 丁 維光, 安田 洋, 豊田 太, 伊藤 誠, 堀江 稔, 松浦 博. プロテインキナーゼ C (PKC)  $\epsilon$  による緩徐活性型遅延整流性  $K^+$ 電流 ( $I_{Kr}$ ) の増大. 第 22 回日本心電学会学術集会 (平成 17 年 10 月 6 日~7 日) .
5. 豊田 太, 丁 維光, 松浦 博. KCNE2 による KCNQ1 チャネルの機能調節. 第 22 回日本心電学会学術集会 (平成 17 年 10 月 6 日~7 日) .
6. 丁 維光, 豊田 太, 松浦 博. リゾホスファチジルコリン (LPC) によるムスカリン性  $K^+$ チャネル ( $I_{KACh}$ ) の抑制に関わる細胞内機構. 第 22 回日本心電学会学術集会 (平成 17 年 10 月 6 日~7 日) .
7. 豊田 太, 松浦 博. KCNE1 ならびに KCNE2 による KCNQ1 チャネルの相互的機能調節. 2005 年度 (平成 17 年度) 生理学研究所研究会『心臓血管系におけるイオンチャネル学の新たな展開』 (平成 18 年 1 月 24 日~25 日) .
8. 尾松万里子, 藤居祐介, 松浦 博. P2Y 受容体刺激による脂肪細胞分化誘導因子に対する感受性の増大. 第 83 回日本生理学会大会 (平成 18 年 3 月 28 日~30 日) .
9. 豊田 太, 上山 久雄, 丁 維光, ザンコフ ディミター, 松浦 博. KCNE1 ならびに KCNE2 による KCNQ1 チャネルの制御. 第 83 回日本生理学会大会 (平成 18 年 3 月 28 日~30 日)
10. 丁 維光, 豊田 太, ザンコフ ディミター, 呉 杰, 上山 久雄, 松浦 博. リゾホスファチジルコリンによるムスカリン性カリウムチャネルの抑制機構. 第 83 回日本生理学会大会 (平成 18 年 3 月 28 日~30 日) .
11. 早瀬史子, 松浦 博, 豊田 太, 北田可奈子, 真田 充, 尾松万里子, 安田 斎. 糖尿病ラットにおける脊髄後根神経節細胞のテトロドトキシン抵抗性ナトリウムチャネルの PKC 阻害薬 LY33351 に対する感受性の増強. 第 83 回日本生理学会大会 (平成 18 年 3 月 28 日~30 日) .
12. ザンコフ ディミター, 豊田 太, 丁 維光, 松浦 博, 堀江 稔. HL-1 細胞における  $\alpha_1$  受容体による  $I_{Kr}$  電流の調節. 第 83 回日本生理学会大会 (平成 18 年 3 月 28 日~30 日) .
13. 磯矢英士, 松浦 博, 豊田 太, 奥村法昭, 久保充彦, 今井晋二, 松末吉隆. ウサギ関節軟骨細胞における swelling-activated  $Cl^-$  電流のアラキドン酸による抑制機構. 第 83 回日本生理学会大会 (平成 18 年 3 月 28 日~30 日) .
14. 藤居祐介, 尾松万里子, 松浦 博. Gq/PLC 連関型受容体刺激による細胞膜ホスファチジルイノシトール-4,5-2 リン酸の一過性の減少. 第 83 回日本生理学会大会 (平成 18 年 3 月 28 日~30 日) .

15. 松浦 博, Dimitar P. Zankov, 尾松万里子, 豊田 太, 丁 維光, 堀江 稔, 磯野高敬. 心房筋細胞における  $AT_1$  受容体を介した緩徐活性型遅延整流性  $K^+$ 電流 ( $I_{Ks}$ ) の増大と活動電位の短縮 — 心房細動治療における  $AT_1$  受容体遮断薬の有効性との関連 —. 第 23 回日本心電学会学術集会 (平成 18 年 7 月 7 日～9 日) .
16. 丁 維光, 公 英子, Wu Jie, 堀江 稔, 松浦 博.  $Kv1.5$  電流におよぼす lipoygenase 阻害薬と phosphatidylinositol 3-kinase 阻害薬の抑制作用. 2006 年度 (平成 18 年度) 生理学研究所研究会『イオンチャネル・トランスポーターと心血管機能：最近の知見と今後の展開』 (平成 18 年 12 月 19 日～20 日) .
17. 藤居祐介, 尾松万里子, 磯野高敬, 松浦 博.  $P2Y$  受容体刺激によって変動するリン酸化タンパク質の前駆脂肪細胞分化に対する役割の検討. 第 84 回日本生理学会大会 (平成 19 年 3 月 20 日～22 日) .
18. 尾松万里子, 藤居祐介, 松浦 博. 細胞外 ATP によって引き起こされる未分化脂肪細胞の細胞運動：ケモタキシスおよびケモカイネシス. 第 84 回日本生理学会大会 (平成 19 年 3 月 20 日～22 日) .
19. 豊田 太, 丁 維光, 尾松万里子, 松浦 博. RNA 干渉法によるマウス培養心筋 HL-1 細胞における  $I_{Ks}$  チャネルの機能的ノックダウン. 第 84 回日本生理学会大会 (平成 19 年 3 月 20 日～22 日)
20. Jie Wu, 丁 維光, 辻 啓子, 豊田 太, 丁 維光, 松浦 博, 堀江 稔.  $PI3$  キナーゼ抑制剤である LY294002 の  $Kv1.5$  チャネルに対する抑制機構. 第 84 回日本生理学会大会 (平成 19 年 3 月 20 日～22 日) .
21. ザンコフ ディミター, 豊田 太, 丁 維光, 松浦 博, 堀江 稔. モルモット心房筋細胞におけるアンギオテンシン II 受容体と細胞容積増大にともなう緩徐活性型遅延整流性  $K^+$ 電流 ( $I_{Ks}$ ) の増大. 第 84 回日本生理学会大会 (平成 19 年 3 月 20 日～22 日) .

## 研究成果

本研究課題では、細胞膜 PIP<sub>2</sub> (ホスファチジルイノシトール-4,5-2 リン酸) による心筋緩徐活性型遅延整流性 K<sup>+</sup>チャネル (I<sub>Ks</sub>) の調節の分子基盤を検討・解明する目的で、モルモット単離心房筋細胞や I<sub>Ks</sub> の発現をコードする *KCNQ1*, *KCNE1* 遺伝子を導入した培養細胞 (COS7 細胞, CHO 細胞) にパッチクランプ法を適用して実験を行った。以下にその結果の概要をまとめ、詳細は添付した論文に記載する。

1.  $\alpha_1$ -アドレナリン受容体 ( $\alpha_1$ -受容体) 刺激剤である phenylephrine (30  $\mu$ M) による I<sub>Ks</sub> の増大作用はプロテインキナーゼ C (PKC) 阻害薬である bisindolylmaleimide I (200 nM) によって約 60%抑制され、さらに細胞内に PIP<sub>2</sub> (100  $\mu$ M) を負荷することによりほぼ完全に抑制された。
2. ATP (30  $\mu$ M) による P2Y-ATP 受容体 (P2Y-受容体) 刺激も I<sub>Ks</sub> を増大させたが、その反応は bisindolylmaleimide I (200 nM) によってほとんど影響を受けなかったが、細胞内に PIP<sub>2</sub> (100  $\mu$ M) を負荷することによりほとんど消失した。
3. 細胞を 70%低浸透圧溶液 (約 200 mOsm) で灌流すると I<sub>Ks</sub> は著明に増大したが、パッチ電極を介して抗 PIP<sub>2</sub> 抗体を負荷した条件下では低浸透圧溶液による I<sub>Ks</sub> の増加率はコントロール時の 40%に減少した。
4. *KCNQ1*, *KCNE1* と共に Gq タンパク質-PLC 連関型受容体である M<sub>1</sub>-ムスカリン性受容体を導入した COS7 細胞において、低濃度 (1 および 10 nM) のアセチルコリンによって、*KCNQ1*/*KCNE1* 電流は増加した。

これらの実験結果は、 $\alpha_1$ -受容体や P2Y-受容体の刺激ならびに細胞膜伸展による I<sub>Ks</sub> の増大反応に、細胞膜 PIP<sub>2</sub> の減少が関わっていることを示唆しており、細胞膜 PIP<sub>2</sub> は I<sub>Ks</sub> の調節を介して心筋電気活動 (特に活動電位再分極過程) に大きな影響を与えている可能性を示唆する。また、I<sub>Ks</sub> の調節における細胞膜 PIP<sub>2</sub> の定量的役割は受容体間や細胞刺激の種類によって大きく異なると考えられた。