心筋型 ATP 感受性 K^+ チャンネルはユビキチン/プロテアソーム系により機能的チャンネル蛋白量が規定される

田中宏明*¹ 二宮治明*² 加藤 克*¹ 三明淳一郎*¹
佐々木紀仁*³ 谷口晋一*¹ 井川 修*¹ 久留一郎*³

心筋の ATP 感受性 K^+ チャンネル (K_{ATP}) は虚血時再還流時の Ischemic Preconditioning に際して心筋保護に働くことが知られている。今回著者らは、Kir6.2 チャンネルの分解経路と細胞内輸送経路について、さらに Kir6.2 および SUR2A の共発現系および primary culture 心筋を用いてユビキチン/プロテアソーム系の阻害による FLAG-Kir6.2 チャンネル蛋白安定化が K_{ATP} 活性に与える効果を検討した。Kir6.2 チャンネルはユビキチン化された後プロテアソーム系により急速に分解され、この過程においてはリソソーム/エンドソーム系の関与はほとんどないことを明らかにした。さらに、ユビキチン/プロテアソーム系を阻害することにより FLAG-Kir6.2 チャンネル蛋白は小胞体からゴルジ体を経て細胞膜へと輸送される量が増加し、機能的 K_{ATP} 活性増加をもたらすことを示した。また、Ib 群抗不整脈薬のアプリンジンが 20S プロテアソーム阻害作用から Kir6.2 チャンネルを安定化させ、 K_{ATP} の活性を増強させることも明らかにした。

(心電図, 2004 ; 24 : 67 ~ 75)

Keywords

- イオンチャンネル
- K_{ATP}
- ユビキチン
- プロテアソーム
- 分解

*1 鳥取大学医学部医学科統合内科医学講座病態情報内科学分野
(〒683-8504 鳥取県米子市西町36-1)

*2 鳥取大学医学部生命科学科生体情報機能学講座神経生物学分野

*3 鳥取大学大学院医学系研究科機能再生医科学専攻遺伝子再生医療学講座再生医療学分野

I. はじめに

心筋細胞の ATP 感受性 K^+ チャンネル (K_{ATP}) は内向き整流性 K^+ チャンネルファミリーに属する BIR (Kir6.2) とスルホニル尿素受容体 (SUR2A) の2種類のサブユニットからなる複合体であり、 K_{ATP} は心筋細胞のほかに膵β細胞、平滑筋細胞、骨格筋、神経細胞などに存在していることが知られている。この K^+ チャンネルファミリーに共通する構造としては細胞膜を2回貫通するセグメントとポアを形成する領

A novel activity of a Na^+ channel blocker to inhibit proteasomal degradation of Kir 6.2 channel and increase cardiac ATP-sensitive K^+ channels by stabilizing the channel proteins

Hiroaki Tanaka, Haruaki Ninomiya, Masaru Kato, Jun-ichirou Miake, Norihito Sasaki, Shinichi Taniguchi, Osamu Igawa, Ichiro Hisatome

2003年10月15日 原稿受領 / 2003年12月8日 掲載承認

域の複合体からなっている点である。一般に K_{ATP} の活性化機序は、細胞内ATPの増減により制御され、 K_{ATP} 開口薬であるジアゾキシド(diazoxide)、レマカリム(lemakalim)、ピナシジル(pinacidil)、ニコランジルは K_{ATP} のATP感受性を変えることが知られている^{1)~7)}。一方、最近の研究でHERGチャネルなどの K^+ チャネルにおいてチャネル蛋白の安定化により、蛋白量が増加することにより細胞膜でのイオンチャネル活性が上昇することが報告され新しいイオンチャネル活性化機構として注目されている⁸⁾。蛋白の量は転写および翻訳による合成とリソソームおよびプロテアソームによる分解により規定されている。上皮 Na^+ チャネル、cystic fibrosis transmembrane conductance regulator(CFTR)と呼ばれる Cl^- チャネルやgap junctionを構成するConnexin43などは、チャネル蛋白の分解が著しく速いshort lived proteinであることが知られており⁹⁾、この速い分解にはユビキチン/プロテアソーム系が重要な役割を担うことが明らかになってきた。細胞膜蛋白のプロセッシングの過程では、まず核内で転写されたmRNAをもとに、細胞質のリボソームで翻訳された蛋白が小胞体へ輸送される。そこでシグナル配列の切断とコア糖鎖の転移が行われた後、分子シャペロンにより品質管理を受け、完全な糖鎖の修飾を受けた後、ゴルジ体を経て細胞膜へ輸送される^{10), 11)}。小胞体で品質管理を受けた不完全な蛋白の一部はユビキチン化され、プロテアソームにより分解される経路とゴルジ体または細胞膜からリソソーム/エンドソーム系により分解される経路があるといわれている。このユビキチン/プロテアソーム系による分解はまずubiquitin-activating enzyme(E_1)、ubiquitin-conjugating enzyme(E_2)、およびubiquitin-ligase(E_3)の働きで標的蛋白のリジン残基に複数のユビキチン分子が共有結合する^{12), 13)}。ユビキチン化された蛋白はスレオニンプロテアーゼである26Sプロテアソームにより分解される^{13), 14)}。最近の研究で、前述のイオンチャネル蛋白のほかに細胞周期関連蛋白、NF κ B¹⁵⁾、p53¹⁶⁾、c-Jun¹⁷⁾

などの核蛋白もこの系により分解制御を受けていることが明らかにされている。一方、最近チロシンキナーゼ受容体¹⁸⁾や成長因子受容体¹⁹⁾、膜輸送体などの膜蛋白はユビキチン化された後プロテアソーム系ではなくリソソーム/エンドソーム系により分解されることが示されており、イオンチャネルを含めた膜蛋白がユビキチン化された後にどのような系で分解され、また、プロテアソーム系がいかに関与しているかは不明である²⁰⁾。

今回、我々はKir6.2チャネルの分解経路とユビキチン/プロテアソーム系の阻害によるFLAG-Kir6.2チャネル蛋白安定化の K_{ATP} 活性に与える効果を検討した。

II. 方 法

1. 薬剤と抗体

LipofectamineキットはGibco社より、ProteinG agarose beads, ECLキットはAmersham社より、MG132, proteasome inhibitor 1, Lactacystin, ALLNはSigma社より、抗FLAG抗体、抗マウスIgG抗体、抗ユビキチン抗体はUpstate Biotechnology社より、Fluorescent conjugate抗マウスIgG抗体はMolecular probe社より購入した。

2. プラスミドの作製と遺伝子導入

rat-Kir6.2 cDNAのN末端にFLAGのepitope-tag(5'-GACTACAAGGACGATGACGACAAG-3'; N末-DYKDDDDK-C末)をつけCMV promoterを有する真核細胞発現ベクター(pRC/CMV)に組み込んだベクター(FLAG-Kir6.2)をCOS7細胞に遺伝子導入し発現させた。遺伝子導入はlipofectamineキットを用いて行った。その遺伝子導入効率は5~10%であった。

3. パルス-チェイス法による蛋白分解速度の測定

培養したCOS7細胞にFLAG-Kir6.2を遺伝子導入(約3時間)し、その後DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)と、プロテアソーム阻害薬であるMG132(50 μ M/L), proteasome inhibitor 1, Lactacystin, ALLNまたはリソソーム/エンドソーム

阻害薬であるクロロキン(0.4mM/L)を含むDMEMにて培養した(37℃, 5%CO₂, 24時間). 培養した細胞をphosphate-buffered saline(PBS)で2回洗浄後, メチオニン(Met)を含まないDMEMとMG132(50 μM/L)またはクロロキン(0.4mM/L)含有, Met不含DMEMで4時間培養した. PBSで2回洗浄後³⁵S-Metで細胞内蛋白を1時間標識(37℃, 5%CO₂)した. その後, PBSで2回洗浄後, 溶解液を加えて, 0, 1, 3, 6, 12, 18, 24時間ごとにCOS7細胞を回収した(³⁵S-labeled methionine/FLAG tagged protein). Protein G agarose beadsに抗FLAG抗体を加え, 室温で1時間転倒混和し, 特異的FLAG抗体を結合させた. その後, この抗FLAG抗体結合Protein G agarose beadsを³⁵S-Metで標識した試料に加え, 転倒混和し結合させた(4℃, 24時間). 免疫沈降後の試料を採取して, 電気泳動後, そのシグナルをフルオログラムで検出した.

4. 免疫沈降法によるユビキチン化FLAG-Kir6.2の検出

培養したCOS7細胞にFLAG-Kir6.2を遺伝子導入(約3時間)し, その後MG132(50 μM/L)添加24時間後, 試料に溶解液を加え, ピペットで攪拌後遠心分離し, 上清を採取した. その後, Protein G agarose beads結合抗FLAG抗体を加え1時間免疫沈降させ, 沈殿には電気泳動用sample bufferを加えた. 10%SDS-PAGEゲルを用い, 電気泳動(200mV, 180mA, 40分)後, ニトロセルロース膜(Inmobilon P)に転写した後(180mA, 2時間), 膜をPBSで2回洗浄後, 0.5% glutaraldehyde/0.1M potassium phosphate buffer (pH7.0)に20分浸し, PBSで2回洗浄後, 5%ミルクにてblocking(4℃, 24時間)した. 膜をTris-buffered saline(TBS)で1回洗浄後, 1,000倍希釈した一次抗体(抗ユビキチン抗体)を含む0.5%ミルク+0.1%Tween20で45分間反応させた. TBST(1×TBS+0.05%Tween20)で2回洗浄, TBSで1回洗浄後, 3,000倍希釈した二次抗体(抗マウスIgG抗体)を含むTBSTで30分間反応させた. その後TBSTで3回洗浄, TBSで1回洗浄後, ECL

キットを用いてそのシグナルを検出した.

5. ウェスタンブロット法によるFLAG-Kir6.2チャネル蛋白の検出

培養したCOS7細胞にFLAG-Kir6.2を遺伝子導入(約3時間)し, その後MG132(50 μM/L)を加え24時間後, 試料に溶解液を加え, ピペットで攪拌後遠心分離し, 上清を採取した. 10%SDS-PAGEゲルを用い, 電気泳動(200mV, 180mA, 40分)し, 膜に転写(180mA, 2時間)した後, 膜をPBSで2回洗浄後, 5%ミルク+0.1%Tween20を加えblocking(4℃, 24時間)を行った. 膜をTBSで1回洗浄後, 5%ミルクで1,000倍希釈した一次抗体(抗FLAG抗体)を45分間反応させた. TBSTで2回洗浄, TBSで1回洗浄後, 5%ミルクで4,000倍希釈した二次抗体(抗マウスIgG抗体)で30分間反応させた. TBSTで3回洗浄, TBSで1回洗浄後, ECLキットを用いてそのシグナルを検出した.

6. ホールセルパッチクランプ法による発現K_{ATP}チャネルの測定

FLAG-Kir6.2+SUR2Aおよびgreen fluorescent protein(GFP)を組み込んだプラスミドをCOS7細胞に遺伝子導入し, 培養48~72時間後にホールセルパッチクランプ法を用いて全膜電流を記録した. 保持電位を-40mVとして0mVへの300msの脱分極パルスを10秒ごとに与えた. 1mMのニコランジルにより誘発された電流の0mVでの値を計測し, 機能的K_{ATP}チャネルの指標とした. 実験には, 細胞外液としてTyrode's液(mM/L): NaCl, 140; KCl, 5.4; CaCl₂, 1.8; MgCl₂, 0.5; N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid(HEPES), 5.0(pH=7.4, NaOHで滴定), 細胞内液として電極内液: K-Aspartate, 140.0; MgCl₂, 5.0; K₂-ATP, 5.0; EGTA, 5.0; HEPES, 5.0(pH=7.2, KOHで滴定)を用いた. 一方, 武田らの方法²²⁾で単離したラットneonatal心筋細胞を用いてnative K_{ATP}を測定した.

7. 共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫蛍光抗体染色による検討

カバーガラス上にCOS7細胞を培養し, FLAG-

Kir6.2を遺伝子導入(約3時間)し, MG132 (50 μ M/L)存在下, 非存在下で24時間培養後, 4%パラホルムアルデヒドで固定した. 一次抗FLAG抗体で1時間, 二次Fluorescent conjugate抗マウスIgG抗体でさらに1時間反応させた後, 共焦点レーザー顕微鏡を用いてそのシグナルを観察し, FLAG-Kir6.2の細胞内局在を観察した.

8. 20Sプロテアソーム活性の測定

20Sプロテアソーム活性の測定は, 20Sプロテアソーム分析キットを用いて検討した.

9. 各種薬剤の検討

MG132, アプリンジン, および各種薬剤の効果は急性および慢性投与で検討した. 薬剤の慢性作用はovernightで前処置したCOS7細胞を用いて上述のそれぞれのアッセイ法により検討した.

III. 結 果

1. プロテアソーム阻害によるFLAG-Kir6.2チャンネル蛋白の安定化作用

プロテアソーム阻害剤のMG132存在下・非存在下で, ウェスタンブロット法により検出されたFLAG-Kir6.2チャンネル蛋白を図1Aに示す. 対照では40KDaのFLAG-Kir6.2チャンネル蛋白のバンドが認められる. さらに, MG132前処置下でバンドの増強が認められ, プロテアソームを阻害するとKir6.2チャンネルの分解が止まり, FLAG-Kir6.2チャンネル蛋白が増加することを示している. 一方, リソソーム/エンドソーム阻害薬であるクロロキンの前処置では, FLAG-Kir6.2の半減期の有意な延長は認めなかった(データ未提示). プロテアソーム阻害剤のMG132存在下・非存在下でのパルス-チェイス法により検出されたFLAG-Kir6.2チャンネル蛋白の時間に伴う減少を図1Bに示す. 対照では3時間後にはFLAG-Kir6.2チャンネル蛋白を示すバンドの輝度が著明に減少しているが, MG132存在下3時間後でもバンドの輝度の明らかな減少を認めなかった. デンシトメトリーを用いてグラフ化し, FLAG-Kir6.2の半減期を算出したところ, 対照の半減期は1.89時間で, MG132の前

図1 MG132によるFLAG-Kir6.2チャンネル蛋白の安定化作用

ウェスタンブロット法によるMG132前処置, 非前処置時のFLAG-Kir6.2チャンネル蛋白の検出(A)パルス-チェイス法によるMG132前処置, 非前処置時のFLAG-Kir6.2チャンネル蛋白分解速度測定(B), 免疫沈降法によるMG132前処置, 非前処置時のユビキチン化FLAG-Kir6.2チャンネル蛋白定量(C), パルス-チェイス法によるプロテアソーム阻害剤(ALLN, Proteasome Inhibitor I, Lactacystin)前処置, 非前処置時の蛋白分解速度測定(6時間後)(D), 共焦点レーザー顕微鏡によるMG132前処置, 非前処置時のFLAG-Kir6.2チャンネル蛋白の局在(E).

処置での半減期は3.19時間と1.68倍に延長した. 同様な実験4例を行った結果, MG132はFLAG-Kir6.2の半減期を有意に延長した($p < 0.05$). 図1Cは免疫沈降法によりユビキチン化されたFLAG-Kir6.2チャンネル蛋白量を示したものである. FLAG-Kir6.2を組み込んだプラスミドを遺伝子導入したCOS7細胞

(vehicle)では、ユビキチン化されたFLAG-Kir6.2スメラを認め、さらにMG132を前処置することによりスメラの増強が認められた。この結果はFLAG-Kir6.2チャンネルがユビキチン化を受けて、さらにプロテアソームを阻害するとその分解が止まり、ユビキチン化したFLAG-Kir6.2チャンネルが蓄積することを示す。またMG132以外のプロテアソーム阻害剤であるproteasome inhibitor 1, Lactacystin, ALLNも同様にFLAG-Kir6.2チャンネル蛋白を安定化した(図1D)。次に共焦点レーザー顕微鏡によりCOS7細胞でのFLAG-Kir6.2の局在を調べた。図1EはKir6.2の細胞内局在を示すが、核の周囲と細胞質に網目状に存在するという2種類の分布を示す。核周囲に存在するKir6.2は、ゴルジ体への局在を、また網目状のKir6.2は小胞体に存在する。以上の形態学的所見は、Kir6.2が小胞体で翻訳された後ゴルジ体へと輸送されてプロセッシングを受けると考えられる。一方、MG132で前処置した時のKir6.2の局在は、小胞体とゴルジ体のどちらでも増加している。以上の結果はユビキチン/プロテアソームの抑制はFLAG-Kir6.2チャンネル蛋白を安定化し小胞体からゴルジ体へFLAG-Kir6.2チャンネル蛋白の輸送を促進することを示す。

2. ユビキチン/プロテアソーム系の阻害が細胞膜の K_{ATP} に及ぼす効果

図2A, BはFLAG-Kir6.2 + SUR2Aを共発現させたCOS7細胞のMG132非前処置・前処置での K_{ATP} 電流を記録したものである。保持電位 -40mV より 0mV への 300ms の脱分極パルスで 10秒 ごとに与え、 1mM の K_{ATP} 開口薬であるニコランジルにより誘発された電流を記録した。対照に比べMG132前処置ではニコランジルにより誘発された K_{ATP} 電流が有意に増大していることがわかる。この事実はユビキチン/プロテアソーム系を抑制することにより、細胞膜の機能的 K_{ATP} が増加することを示す。さらに図2C, Dに示すようにラット neonatal 心筋細胞を用いてMG132前処置・非前処置での native K_{ATP} 電流を記録した。COS7細胞を用いた共発現系での実験

図2 MG132による K_{ATP} 増加作用

MG132前処置(MG132)、非前処置(vehicle)のホールセルパッチクランプ法による発現 K_{ATP} 電流のトレース(A)(白丸:ニコランジル投与前、黒丸:ニコランジル投与後)および多数例における検討(B)。MG132前処置(MG132)、非前処置(vehicle)のホールセルパッチクランプ法によるラット neonatal 心筋細胞を用いた native な K_{ATP} 電流のトレース(C)(白丸:ニコランジル投与前、黒丸:ニコランジル投与後)および多数例における検討(D)。

と同様に対照に比べMG132前処置ではニコランジルにより誘発される K_{ATP} 電流が有意に増大していることがわかる。この事実は心筋細胞においてもプロテアソームを阻害することにより、細胞膜の機能的 K_{ATP} が増加することを示す。

図3 各種薬剤の20S プロテアソーム阻害作用
各種薬剤 (MG132, アプリンジン, ベラパミル, E-4031) 処置時における20S プロテアソーム活性の測定。

3. 各種抗不整脈薬における20S プロテアソーム阻害作用についての検討

虚血再灌流時に抗不整脈薬のなかには心筋保護的に働くものがあるという報告があることから、各種抗不整脈薬におけるプロテアソーム阻害作用を検討するため、26Sプロテアソーム複合体の触媒作用の中核をなす20Sプロテアソーム活性を測定したものを図3に示す。その結果MG132はプロテアソームを完全に阻害し、その IC_{50} は4.1nMであった。アプリンジンにおいてもプロテアソーム活性はほぼ抑制され、アプリンジンの最大効果は10 μ M以上の濃度で得られ、MG132の最大効果の50%程度であった。アプリンジンの IC_{50} は4.0 μ Mであった。E-4031およびL-ベラパミルではプロテアソーム阻害作用は認めなかった。

4. アプリンジンのFLAG-Kir6.2チャンネル蛋白安定化作用

前述の20Sプロテアソーム阻害作用の実験にてプロテアソーム阻害剤のMG132と同様にI b群抗不整脈薬であるアプリンジンも20Sプロテアソーム阻害作用を有することが判明したため、次にアプリンジンがFLAG-Kir6.2チャンネル蛋白を安定化し、細胞膜での機能的 K_{ATP} 活性を増加するか否かを検討した。アプリンジン存在下・非存在下で、ウエスタンブ

図4 アプリンジンのFLAG-Kir6.2チャンネル蛋白安定化と K_{ATP} 増加作用

ウエスタンブロット法によるアプリンジン前処置 (アプリンジン), 非前処置 (vehicle) のFLAG-Kir6.2チャンネル蛋白の検出 (A), パルス-チェイス法によるアプリンジン前処置 (アプリンジン), 非前処置 (vehicle) のFLAG-Kir6.2チャンネル蛋白分解速度測定 (B), 免疫沈降法によるアプリンジン前処置 (アプリンジン), 非前処置 (vehicle) のユビキチン化FLAG-Kir6.2チャンネル蛋白定量 (C), 共焦点レーザー顕微鏡によるアプリンジン前処置アプリンジンのFLAG-Kir6.2チャンネル蛋白の局在 (D), アプリンジン前処置 (アプリンジン), 非前処置 (vehicle) のホールセルパッチクランプ法による発現 K_{ATP} 電流のトレース (E) (白丸: ニコランジル投与前, 黒丸: ニコランジル投与後) および多数例における検討 (F)。

ロット法により検出したFLAG-Kir6.2チャンネル蛋白を図4Aに示す。対照でも40kDaのFLAG-Kir6.2チャンネル蛋白のバンドが認められるが、アプリンジンを前処置することによりバンドの増強が認められ、プロテアソームを阻害すると、FLAG-Kir6.2チャンネル蛋白が安定化することを示している。図4Bにアプリンジン存在下・非存在下でのパルス-チェイス法により検出されたFLAG-Kir6.2チャンネル蛋白の

経時的な減少を示す。対照では3時間後にはFLAG-Kir6.2チャンネル蛋白を示すバンドの輝度が著明に減少しているが、アプリンジン存在下では3時間後でもバンドの輝度の明らかな減少を認めなかった。図4Cは免疫沈降法により検出されたユビキチン化FLAG-Kir6.2チャンネル蛋白量を示したものである。FLAG-Kir6.2を組み込んだプラスミドを遺伝子導入したCOS7細胞(vehicle)ではユビキチン化されたFLAG-Kir6.2のスミアを認めるが、さらにアプリンジンを前処置することによりスミアの増強が認められた。この結果はアプリンジンによりユビキチン/プロテアソーム系が阻害されFLAG-Kir6.2の分解が止まり、ユビキチン化したFLAG-Kir6.2チャンネル蛋白が蓄積することを示す。次にアプリンジンで前処置したときのKir6.2の局在を図4Dに示すが、小胞体とゴルジ体のどちらも増加している。FLAG-Kir6.2 + SUR2Aを共発現させたCOS7細胞のアプリンジン前処置・非前処置での K_{ATP} 電流記録を図4E, Fに示す。保持電位-40mVより0mVへの300msの脱分極パルスを与え、1mMのニコランジルにより誘発された K_{ATP} 電流を記録した。対照に比べ、アプリンジン前処置では電流が有意に増大していることがわかる。以上よりIb群抗不整脈薬であるアプリンジンもMG132と同様にプロテアソーム阻害作用を有し、プロテアソームを阻害することによりFLAG-Kir6.2チャンネル蛋白を安定化させ機能的 K_{ATP} 活性を増加させると考えられた。

IV. 考 察

今回の実験系では、Kir6.2チャンネルはユビキチン化後速やかに分解された。この分解速度はプロテアソーム阻害剤であるMG132により半減期が1.68倍延長する事実から、Kir6.2チャンネルはユビキチン/プロテアソーム系で主に分解されるshort-lived蛋白であることが判明した。近年、イオンチャンネルであるENaC²¹⁾やconnexin43⁹⁾の半減期はプロテアソーム阻害およびリソソーム阻害によりともに延長することから、これらのチャンネルはリソソーム/エ

ンドソーム系のみならずプロテアソーム系によっても分解されると報告された。すなわち、小胞体で不完全に糖鎖修飾されたチャンネル蛋白はプロテアソーム系で、完全に糖鎖修飾された蛋白はリソソーム/エンドソーム系で分解されると考えられ、チャンネル蛋白はそれぞれ独立した系で分解されているとしている²⁴⁾。一方で本研究では、リソソーム阻害剤であるクロロキンの前処置ではその半減期に差を認めなかったことから、Kir6.2チャンネルの分解はユビキチン/プロテアソーム系が主に担っていると考えられ、各チャンネルごとに分解系が異なっている可能性が示唆された。一般に E_1 , E_2 , E_3 の働きで標的蛋白のリジン残基に一個または複数のユビキチンが標的蛋白に共有結合し^{12), 13)}、ユビキチン化された蛋白はスレオニンプロテアーゼである26Sプロテアソームにより分解される^{13), 14)}。実際Kir6.2チャンネルにはリジン残基が複数個存在しており、そのリジン残基を標的にしてユビキチン化が起きると推定されるが、どのリジン残基がユビキチンの標的であるかについては、今後検討が必要である。

Kir6.2チャンネルの細胞内の分布について検討した今回の研究結果からは、Kir6.2チャンネルはエンドソームにはなく、小胞体とゴルジ体に存在することが明らかとなり、この結果は小胞体で種々の分子シャペロンにより品質管理を受けたKir6.2チャンネルは、小胞体からゴルジ体へと輸送されていることを示している^{13, 14)}。一方、プロテアソーム阻害薬であるMG132の前処置によりKir6.2チャンネルの局在はゴルジ体と小胞体に増加し、さらに、パッチクランプ法を用いた結果から細胞膜上に機能する K_{ATP} が増加していた。このことはプロテアソームを阻害するとKir6.2蛋白の分解が止まり、Kir6.2蛋白が安定化し小胞体からゴルジ体への輸送が増加し、特にプロテアソームで分解されている完全な糖鎖修飾を受けた蛋白が安定化し、結果的に正常な機能をもったKir6.2チャンネルの発現が細胞膜で増加することを意味する。これらの結果はKir6.2チャンネルはユビキチン/プロテアソーム系のみにより、不完全な糖鎖修

飾を受けた蛋白と完全な糖鎖修飾を受けた蛋白とがともに分解されるとする前述の仮説を支持するものである。

プロテアソーム阻害により FLAG-Kir6.2 チャンネル蛋白安定化を介しての K_{ATP} 活性増加作用は心筋保護的に働くと考えられる。すなわち、心筋細胞の K_{ATP} は活性化されることにより、活動電位を短縮し心筋の収縮力を弱め心筋保護に役立つと考えられている。先行する一過性の虚血があると、次に起こった心筋虚血による障害が軽減されるという現象は、ischemic preconditioning と呼ばれているが、この preconditioning 現象には最近ではミトコンドリア ATP 感受性 K^+ チャンネルが注目されているが、細胞膜での ATP 感受性 K^+ チャンネルの関与も重要であることがわかっている。最近 Kir6.2 の knockout mouse では preconditioning 現象が消失するために wild type に比較して心筋障害が増大することが報告されている²³⁾ ことから、FLAG-Kir6.2 チャンネル蛋白の増加による細胞膜での K_{ATP} 活性増加は心筋保護的に働くことが明らかである。本研究で見出されたユビキチン/プロテアソーム系の阻害による FLAG-Kir6.2 チャンネル蛋白安定化と K_{ATP} 活性増加作用は preconditioning を介して心筋保護に寄与すると推定できる。

今回アプリンジンが臨床濃度でプロテアソームを阻害することにより FLAG-Kir6.2 チャンネル蛋白を安定化させ機能的 K_{ATP} を増加させることがわかった。この新規に明らかとなったアプリンジンの K_{ATP} 活性増加作用は、虚血再灌流時に抗不整脈薬であるアプリンジンが心筋保護的に働くという報告²⁴⁾を裏づけると考えられた。今後アプリンジンの FLAG-Kir6.2 チャンネル蛋白安定化作用が preconditioning という観点から臨床的意義があると考えられる。さらに最近 Makielski²⁵⁾らは SCN5A 変異(M1766L)の著しい Na^+ チャンネル活性の減少がメキシレチンにより rescue されることを報告した。今回の我々の研究から考えると、 Na^+ チャンネル遮断薬が変異 Na^+ チャンネルの分解を抑制し、 Na^+ チャンネルを安定化した可能性もある。

今後輸送異常によるイオンチャネル病の rescue として Na^+ チャンネル遮断薬のチャネル安定化作用が重要となるかもしれない。

謝辞

稿を終えるにあたり、懇切なる御指導と御校閲を賜りました鳥取大学医学部医学科統合内科医学講座病態情報内科学分野重政千秋教授、病態解析医学講座統合分子医科学分野山田一夫教授、機能形態統合医学講座適応生理学分野河合康明教授に深甚なる謝意を捧げます。また、御協力頂いた教室員各位に深く御礼申し上げます。

本研究を施行するにあたり、Kir6.2 および SUR2A の cDNA を快く供与いただいた秋田大学医学部機能制御医学講座稲垣暢也教授に感謝致します。

〔文 献〕

- 1) Noma A : ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. *Nature*, 1983 ; 305 : 147 ~ 148
- 2) Inagaki N, Tsuura Y, Namba N, Masuda K, Gono T, Horie M, Seino Y, Mizuta M, Seino S : Cloning and functional characterization of a novel ATP-sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including pancreatic islets, pituitary, skeletal muscle, and heart. *J Biol Chem*, 1995 ; 270 : 5691 ~ 5694
- 3) Inagaki N, Gono T, Clement JP IV, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S, Bryan J : Reconstitution of IKATP : an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science*, 1995 ; 270 : 1166 ~ 1170
- 4) Inagaki N, Gono T, Clement JP IV, Wang CZ, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Seino S : A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K^+ channels. *Neuron*, 1996 ; 16 : 1011 ~ 1017
- 5) Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JP IV, Boyd AE III, Gonzalez G, Herrera-Sosa H, Nguy K, Bryan J, Nelson DA : Cloning of the β cell high-affinity sulfonylurea receptor : a regulator of insulin secretion. *Science*, 1995 ; 268 : 423 ~ 426
- 6) Seino S : ATP-sensitive potassium channels : a model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies. *Annu Rev Physiol*, 1999 ; 61 : 337 ~ 362
- 7) Gross GJ, Auchampach JA : Blockade of ATP-sensitive

- potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res*, 1992 ; 70 : 223 ~ 233
- 8) Rajamani S, Anderson CL, Anson BD January CT : Pharmacological rescue of human K⁺ channel long-QT2 mutations : human ether-a-go-go-related gene rescue without block. *Circulation*, 2002 ; 105 : 2830 ~ 2835
 - 9) Saffitz JE, Laing JG, Yamada KA : Connexin expression and turnover : implications for cardiac excitability. *Circ Res*, 2000 ; 86 : 723 ~ 728
 - 10) Hurtley SM, Bole DG, Hoover-Litty H, Helenius A, Copeland CS : Interactions of misfolded influenza virus hemagglutinin with binding protein (BiP). *J Cell Biol*, 1989 ; 108 : 2117 ~ 2126
 - 11) Hammond C, Helenius A : Quality control in the secretory pathway. *Curr Opin Cell Biol*, 1995 ; 7 : 523 ~ 529
 - 12) Ciechanover A : The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*, 1994 ; 79 : 13 ~ 21
 - 13) Jentsch S, Schlenker S : Selective protein degradation : a journey's end within the proteasome. *Cell*, 1995 ; 82 : 881 ~ 884
 - 14) Hilt W, Wolf DH : Proteasomes : destruction as a programme. *Trends Biochem Sci*, 1996 ; 21 : 96 ~ 102
 - 15) Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T : The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell*, 1994 ; 78 : 773 ~ 785
 - 16) Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM : The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*, 1993 ; 75 : 495 ~ 505
 - 17) Treier M, Staszewski LM, Bohmann D : Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain. *Cell*, 1994 ; 78 : 787 ~ 798
 - 18) Cenciarelli C, Hou D, Hsu KC, Rellahan BL, Wiest DL, Smith HT, Fried VA, Weissman AM : Activation-induced ubiquitination of the T cell antigen receptor. *Science*, 1992 ; 257 : 795 ~ 797
 - 19) Strous GJ, van Kerkhof P, Govers R, Ciechanover A, Schwartz AL : The ubiquitin conjugation system is required for ligand-induced endocytosis and degradation of the growth hormone receptor. *Embo J*, 1996 ; 15 : 3806 ~ 3812
 - 20) Hochstrasser M : Protein degradation or regulation : Ub the judge. *Cell*, 1996 ; 84 : 813 ~ 815
 - 21) Staub O, Gautschi I, Ishikawa T, Breitschopf K, Ciechanover A, Schild L, Rotin, D : Regulation of stability and function of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) by ubiquitination. *Embo J*, 1997 ; 16 : 6325 ~ 6336
 - 22) 武田真一, 久留一郎 : 核内因子CARPは心肥大を抑制する. *米子医誌*, 2001 ; 52 : 144 ~ 152
 - 23) Gumia RJ, Pucar D, Bast P, Hodgson DM, Kurtz CE, Dzeja PP, Miki T, Seino S, Terzic A : Knockout of Kir6.2 negates ischemic preconditioning-induced protection of myocardial energetics. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003 ; 284 : H2106 ~ 2113
 - 24) Kamiyama T, Tanonaka K, Hayashi J, Takeo S : Effects of Aprindine on Ischemia/Reperfusion-Induced Cardiac Contractile Dysfunction of Perfused Rat Heart. *Jpn J Pharmacol*, 1996 ; 70 : 227 ~ 234
 - 25) Valdivia CR, Ackerman MJ, Tester DJ, Wada T, McCormack J, Ye B, Makielski JC : A novel SCN5A arrhythmia mutation, M1766L, with expression defect rescued by mexiletine. *Cardiovasc Res*, 2002 ; 55 : 279 ~ 289