

## 心臓の酸化ストレスにおけるカリウムイオンの役割

黒川 洵子, 古川 哲史

東京医科歯科大学難治疾患研究所生体情報薬理学分野

**概要** 【目的】日本人の死因のトップ3は、心疾患・がん・脳卒中の全てにおいて加齢・生活習慣に伴う酸化ストレスが関与している可能性が示唆されている。本研究では、そのうち心疾患に注目し、酸化ストレスが及ぼす影響を理解することを目的とした。生命の根幹となる心臓のポンプ機能を統制するのは心臓の電気的活動であり、ひいてはイオンチャネルである。イオンチャネルの酸化ストレスによる制御の詳しい機序はまだ解明されていない。そこで、本研究では、酸化ストレスによるイオンチャネルの制御機構を解明することを研究目的とした。これまでの我々の研究から、一酸化窒素(NO)により制御されるカリウムチャネルに注目した。テストステロンとプロゲステロンは、非ゲノム経路を介した一酸化窒素(NO)産生により心筋カリウムチャネル( $I_{Ks}$ チャネル)を増大し、心電図 QT 間隔を短縮して心保護的に作用する。我々は女性で QT 延長型不整脈が起こりやすいメカニズムではないかと考えている。これまで、我々は、NO が cGMP に依らず、 $I_{Ks}$ チャネル  $\alpha$  サブユニット KCNQ1 上の 445 番目のシステインチオール基を直接 S-ニトロソ化するという蛋白修飾により、細胞外へのカリウム電流を増大することを明らかにしてきた。今回は、この NO 産生によるカリウムイオンの流れの調節のメカニズムをさらに詳しく探る為に以下の実験を行った。

【方法】ヒト KCNQ1 上の酸化修飾責任部位を同定する為に、システイン残基をアラニンに置換した KCNQ1 変異体を作成し、human KCNE1 ( $\beta$  サブユニット)、human calmodulin と共に CHO-K1 または HEK293 細胞に過剰発現させて、NO ドナーもしくは  $H_2O_2$  による応答の変化を調べた。Native のイオンチャネルを解析する際には、げっ歯類の中で心臓活動電位波形が最もヒトに近いモルモットの心室筋を標本とした。モルモットの標本で、ショ糖密度勾配遠心分離法により、細胞膜におけるシグナル・チャネル分子の局在を調べた。

【結果】培養細胞に  $I_{Ks}$ チャネル(KCNQ1+KCNE1)とカルモジュリンを発現させて  $I_{Ks}$ 電流を計測し、NO ドナーである SNAP、SIN1 や SOC7 の投与したところ、これまでの我々の結果と一致して増大した。0.1 mM  $H_2O_2$  を投与したところ有意に  $I_{Ks}$ 電流を抑制した。次に、Cys 残基を全て Ala に置換した KCNQ1 変異体を用いて、同様の実験を行ったところ、 $H_2O_2$  の作用が消失した。さらに、それぞれの Cys を置換した KCNQ1 変異体を用いて、 $H_2O_2$  の作用の責任部位を探索したところ、KCNQ1 C 末端の C445 と C642 まで絞ることができた。C445A 変異体は野生型の  $H_2O_2$  への反応と大差がなかったことから、C642 が  $H_2O_2$  の作用の責任部位である可能性が示唆された。さらに、モルモットの心室標本のショ糖密度勾配遠心分離法により、プロゲステロン受容体からの非ゲノムシグナル経路の分子群が膜ラフトに局在していることを見出した。 $I_{Ks}$ チャネルの酸化修飾機序への関連を解明することを次の目的とする。

### 1. 背景

日本人の死因のトップ3は、心疾患・がん・脳卒中であり、そのすべてにおいて加齢・生活習慣に伴う酸化ストレスが関与している可能性が示唆されている。本研究では、そのうち心疾患に注目し、酸化ストレスが及ぼす影響を調べた。

心臓は発生初期より死に至るまで一日 10 万回収縮と弛緩を繰り返し、全身に酸素と栄養を送り出すポンプという生命の根幹となる機能を担っている。このポンプは心筋の電気活動(活動電位)によるリズム機能で統制されており、蛋白レベルでは細胞膜に存在するイオンチャネルを透過す

るイオン電流がこのリズム機能を規定している。よって、酸化ストレスによる心筋イオンチャネルの制御機構を調べることで、酸化ストレスが心疾患に及ぼす影響の一端を紐解くことを本研究の長期的目標とする。

これまでに我々は、テストステロンとプロゲステロンが、非ゲノム経路を介した一酸化窒素(NO)産生により心筋カリウムチャネル( $I_{Ks}$ チャネル)を増大し、心電図QT間隔を短縮して心保護的に作用することを見出した<sup>(1,2)</sup>。モルモット心室筋において、テストステロンやプロゲステロンなどの性ホルモンが性ホルモン受容体の非ゲノム経路を介してNOを産生することを示した。この作用機序として、NOがcGMPに依らず、 $I_{Ks}$ チャネル上のシステインチオール基を直接S-ニトロソ化するという蛋白修飾により、細胞外へのカリウム電流を増大することを見出した(図1)<sup>(3)</sup>。生理的血中濃度の性ホルモンが産生したNOにより心筋 $I_{Ks}$ チャネルの $\alpha$ サブユニットであるKCNQ1 Cys<sup>445</sup>の側鎖のチオール基がS-ニトロソ化され、Ca<sup>2+</sup>-カルモジュリン(CaM)と協同的に外向きカリウム電流が大きく増大し、活動電位幅が短縮することを見出した<sup>(3)</sup>。システインチオール基におけるS-ニトロソ化はNOによる酸化的修飾であるが、細胞内の酸化的状態が進むにつれて、グルタチオン化・スルホン酸化と段階的な変化をすることが知られている。過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)等のラジカル供与体も同様にシステイン残基を修飾するため、ROS/RNSに対するターゲット分子が類似していることが指摘されているので、今回は $I_{Ks}$ チャネルへのNOの作用からROS/RNSの作用に発展させた。そこで、本研究では、酸化的修飾に対するカリウムチャネルの制御機構を調べることで、病態時を含むカリウムイオンの細胞内外の流れに及ぼす影響を調べることを研究目的とし、実験を行った。

## 2. 方法

### 2.1 電気生理学的実験

CHO-K1細胞に、 $I_{Ks}$ チャネル $\alpha$ サブユニットであるKCNQ1の野生型とシステイン残基をアラニンに置換したKCNQ1変異体を作成し、human KCNE1( $\beta$ サブユニット)、human calmodulinと共にCHO-K1またはHEK293細胞に過剰発現させて、パッチクランプ法により電流を測定した<sup>(4)</sup>。パッチクランプ用増幅装置(Axopatch 200B, Axon Instruments)で増幅されたシグナルを、アナログーデジタ

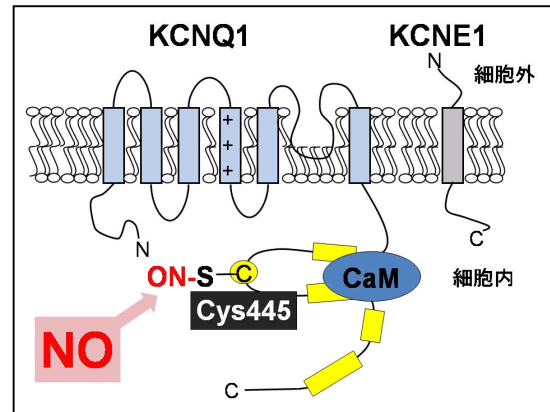


図1. 心筋 $I_{Ks}$ チャネルのS-ニトロソ化

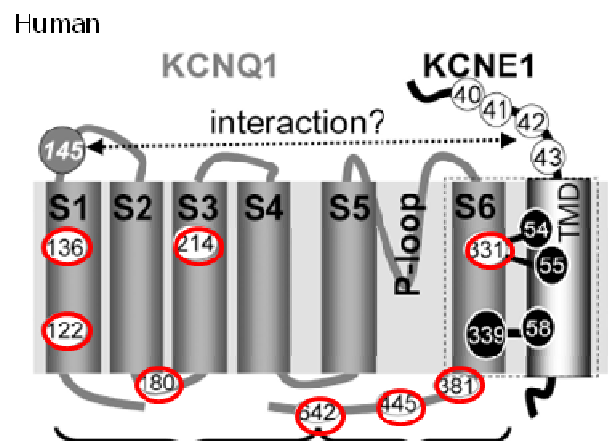


図2. KCNQ1とKCNE1模式図。赤マルで囲ってある番号のアミノ酸残基がシステイン。

ル変換装置(Digidata 1440A, Axon Instruments)でデジタルに変換してPCに取り込んだ。電位変化刺激、データの収集、解析はpClampソフトウェア(ver10.2, Axon Instruments)を用いて行った。ガラス電極は、プラー(MODEL P-97; SUTTER INSTRUMENT CO.)を用いてキャピラリーに4段階の熱をかけ作成した。電極内液(130 mM CaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM ATP<sub>2</sub>-Na, 10 mM HEPES, 20 mM TEA-Cl, 10 mM EGTA, pH 7.25)を入れたガラス電極の抵抗は1~2.5 M $\Omega$ であった。細胞内液には、アンフォテリシンBを加え、穿孔パッチ法で行った。

KCNQ1のシステイン残基アラニン置換変異体(図2; 赤マルで囲んだアミノ酸がシステイン)は、Dr. Gea-Ny Tseng (Virginia Commonwealth University)より、供与していただき、一つ一つの変異体はQuick changeかPCRで作成し

た。

## 2. 2 ショ糖密度勾配遠心分離法<sup>(2)</sup>

ランゲンドルフ灌流でカルシウムフリータイロード溶液を5分間灌流し、拍動が完全に止まったモルモット(メス、ハートレー種、250~280g)の心室組織を標本とした。作成したホモジネートを、遠心機で核と細胞の残骸を取り除いた後に、細胞膜分画と細胞質分画に分離した。沈殿している細胞膜分画を500mM炭酸ナトリウム溶液に溶解してから、Mes-buffered salineで調整した80%ショ糖溶液と混合し、さらに、5%ショ糖溶液と35%ショ糖溶液を加えて5%-40%のショ糖勾配を形成した。超遠心機で、45,000rpm、4°Cで~20時間、分離した。試験管中の溶液を上から0.43mLずつ取り分け、ショ糖密度に応じた11分画に分けた。

分画したサンプルをWestern blotにより解析した。用いた一次抗体は、抗Ca<sub>v</sub>1.2抗体(Alomone)、抗Flotillin-1抗体(BD Transduction Laboratories)、抗PKG抗体(Assay Designs)、抗PDE2A(N末端)抗体(Santa Cruz)、抗PDE2A(C末端)抗体(FabGennix)、抗PDE3A抗体(Santa Cruz)、抗PDE4B抗体(Santa Cruz)、抗PDE4D抗体(Santa Cruz)である。タンパク質の検出にはAmersham ECL Advance Western Blotting Detection Kit(GE Healthcare)を用いた。細胞膜分画の各分画の総タンパク質濃度はBCA protein assay kit(Thermo)を用いて測定した。

## 2. 3 免疫蛍光染色

モルモットの単離心室筋細胞を1% paraformaldehyde(PFA)で固定(5分間、室温)した。その後、0.1% Triton X-100で透過化した。一次抗体は、抗CNC1血清(東邦大学医学部赤羽准教授からの供与)、抗PDE2A(N末端)抗体、抗 $\alpha$ -アクチニン抗体(Sigma-Aldrich)を用いた。二次抗体にはAlexa Fluor 488標識抗ラットIgG、Alexa Fluor 488標識抗ヤギIgG、Alexa Fluor 647標識抗マウスIgG(1:200, Molecular Probes)、もしくはPLA抗ヤギ-PLUS probe、PLA抗ラット-MINUS probe(1:10, 37°C, 室温, Olink)を用いた。共焦点レーザー顕微鏡(LSM510, Zeiss)で観察した。PLA probeを二次抗体に用

いた場合は、Duolink Detection kit 563(Olink)を用いて検出した。PLA probeを用いた細胞の画像の解析は、LSM Image Browser(Zeiss)で画像面積を測定し、BlobFinderでドット状シグナルの数を数えた。

## 3. 結果

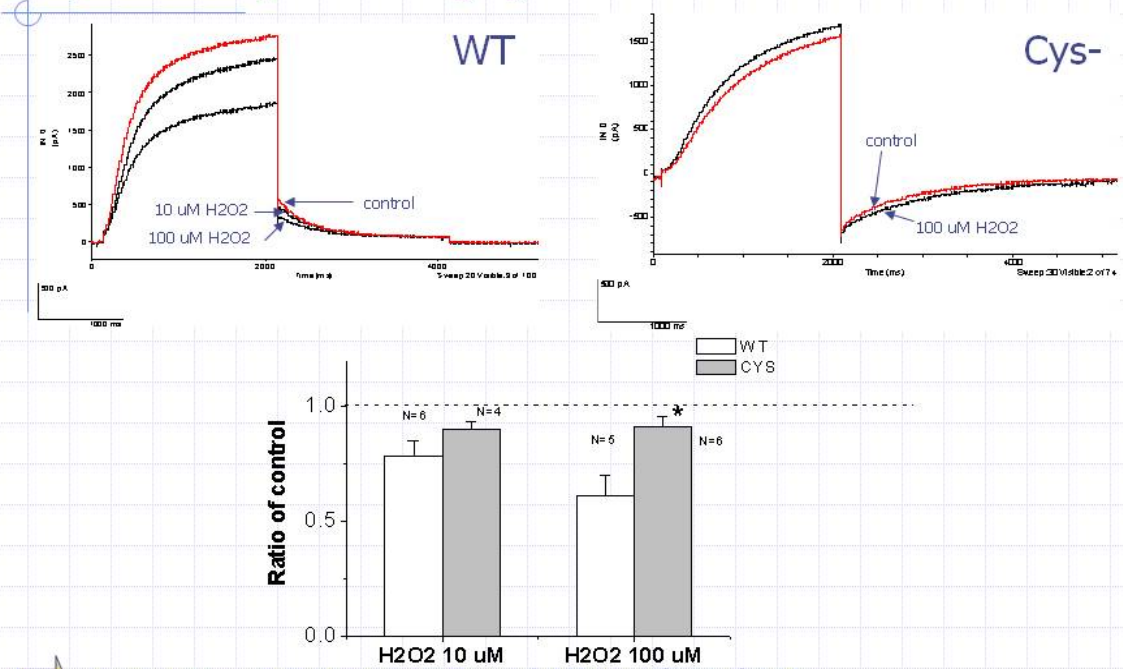
### 3. 1 電気生理学実験

KCNQ1野生型から得られるI<sub>Ks</sub>電流に対しH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の作用を調べたところ、100 $\mu$ Mで有意に抑制した。次に、KCNQ1の全てのシステインをアラニンに置換したCys-KCNQ1を野生型の代わりに過剰発現させて、同様の実験を行ったところ、電流抑制作用が完全に消失した(図3)。以上の結果から、I<sub>Ks</sub>電流に対するH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の抑制作用にはKCNQ1上のシステインが関与していることが強く示唆された。

次に、どのシステインがI<sub>Ks</sub>電流に対するH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の抑制作用の作用点であるかを調べた。次に、KCNQ1カルボキシル末端のC445とC642のみを残し他はアラニンに置換した変異体では、I<sub>Ks</sub>電流に対するH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の抑制作用は見られたことから、C445とC642が責任部位である可能性が高い(図4:赤波形がコントロール)。ところが、NOの作用とは異なり、C445A KCNQ1でもI<sub>Ks</sub>電流に対するH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の抑制作用は見られたことから、C445のS-ニトロソ化とは異なりC642が責任部位であり、過酸化水素による酸化的修飾のターゲットである可能性が示唆された(図5:赤波形がコントロール)。現在、C642A変異体を作成中である。

なおヒト心室筋活動電位波形に近い活動電位を持つモルモット心室筋から細胞を単離して、I<sub>Ks</sub>電流に対するH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の作用を検討したところ、電流値に変化がなかったが、PKA阻害剤存在下ではH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>はI<sub>Ks</sub>電流を増大した。一方、I<sub>Ks</sub>電流に対するNOの作用はPKA活性化により見えにくくなることから、I<sub>Ks</sub>チャンネルの酸化的修飾にcAMPのシグナルがクロストークする可能性が示唆された。よって、以下の実験で、これまでI<sub>Ks</sub>チャンネルの酸化的修飾として我々が解析してきた心臓の性ホルモン非ゲノム経路とcAMP/PKAシグナル経路のクロストークを蛋白レベルで解析することとした。

Cys- KCNQ1では、 $H_2O_2$ はIKs電流を抑制しない



➡ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によるI<sub>ks</sub>チャンネル制御の責任部位

図 3

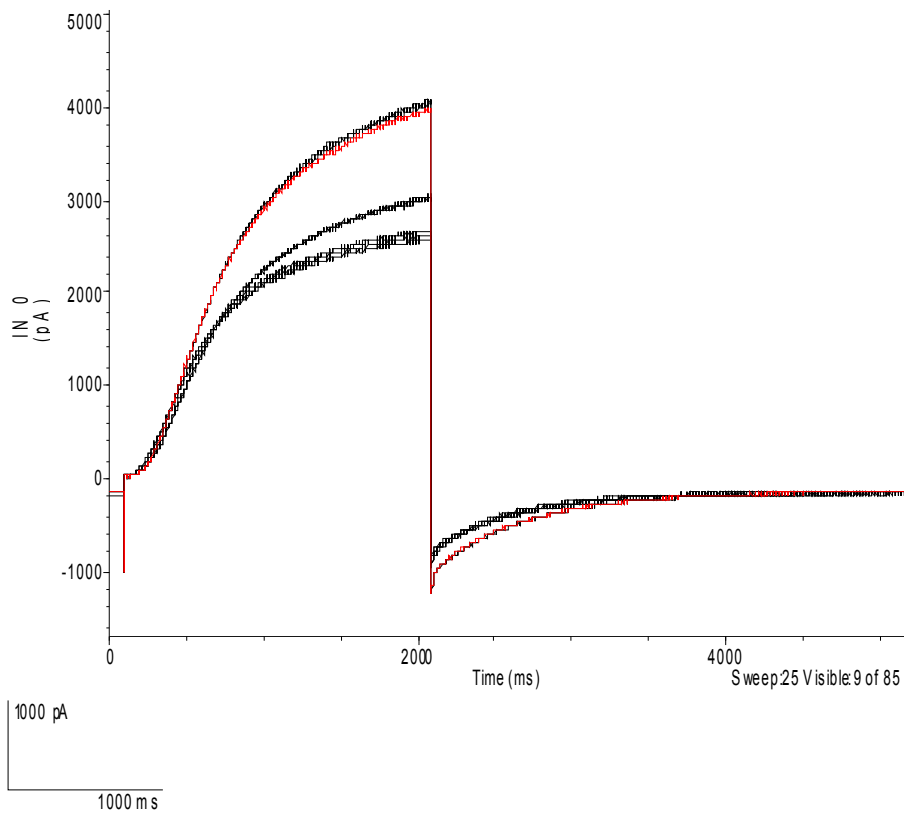


図 4

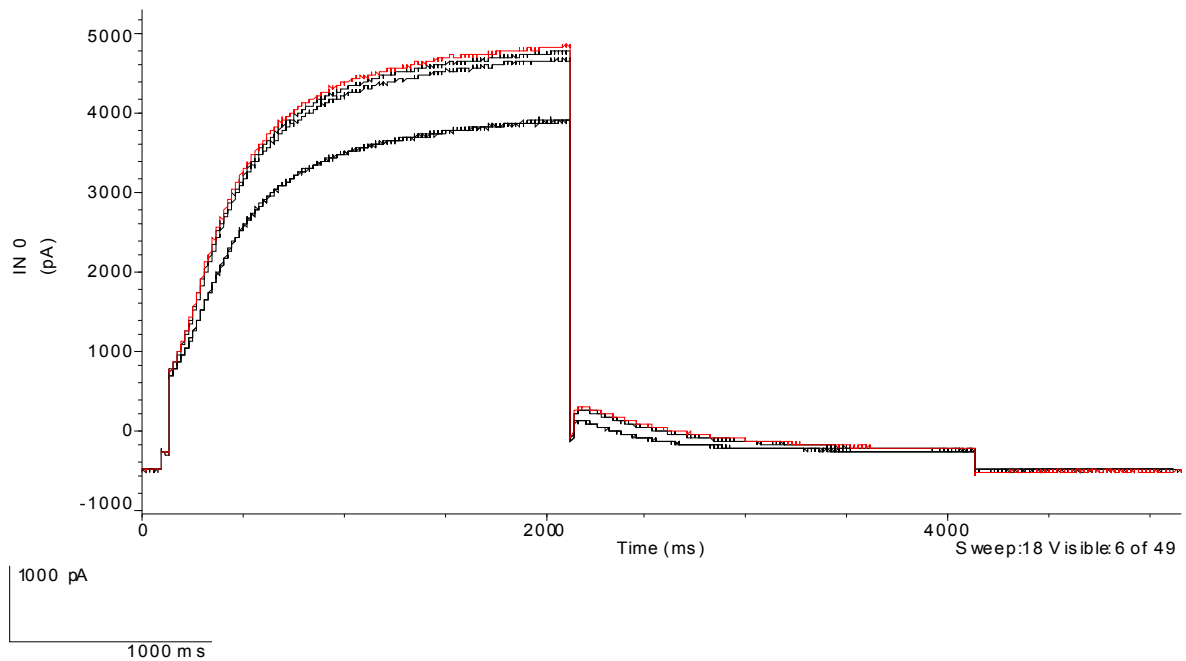


図 5

### 3. 2 ショ糖密度勾配遠心分離法

モルモット心室組織のショ糖密度勾配遠心分離の各分画のバンド濃度を、細胞膜分画のバンド濃度の合計で除した値を図 6 にプロットした (n=3)。以前の論文 (Nakamura *et al.*, 2007) で KCNQ1 が Flotillin-1 と同じ分画に存在することは既に確認した。Lipidraft/caveola 分画マーカーである Flotillin-1 は fraction 4, 5 に多いことから、本研究で用いた実験条件では fraction 4, 5 が lipidraft/caveola 分画であった。L 型カルシウムチャネルの  $\alpha$  サブユニットである Ca<sub>v</sub>1.2、PDE2A は fraction 4~8 に広く局在しており、lipidraft/caveola 分画である fraction 4, 5 にも多く局在していた。

### 3. 3 免疫蛍光染色

KCNQ1 は T-tubule への局在があることが既に報告されている。cAMP と NO のクロストークのカギとなる分子として、PDE2 が注目されている<sup>(5)</sup>。そこで、PDE2A、 $\alpha$ -actinin の共染色を行ったところ、PDE2A は T-tubule への局在が確認できた (図 7)。KCNQ1 と PDE2A を共染色した細胞を PLA probe で検出した典型的な画像を図 8, A に示した。ドット状シグナルの個数を画像面積で除した値をまとめた結果は図 8, B に示した。ネガティブコントロールと比べて、共染色した細胞では 1  $\mu\text{m}^2$  あたりのドット数が有意に多かった (まとめ図 8, C)。

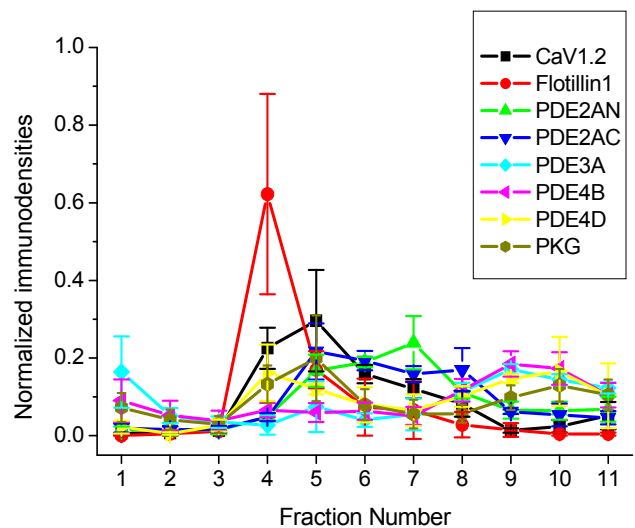


図 6. タンパク質の、各分画におけるバンド濃度の比較 (mean $\pm$ SEM, n=3)

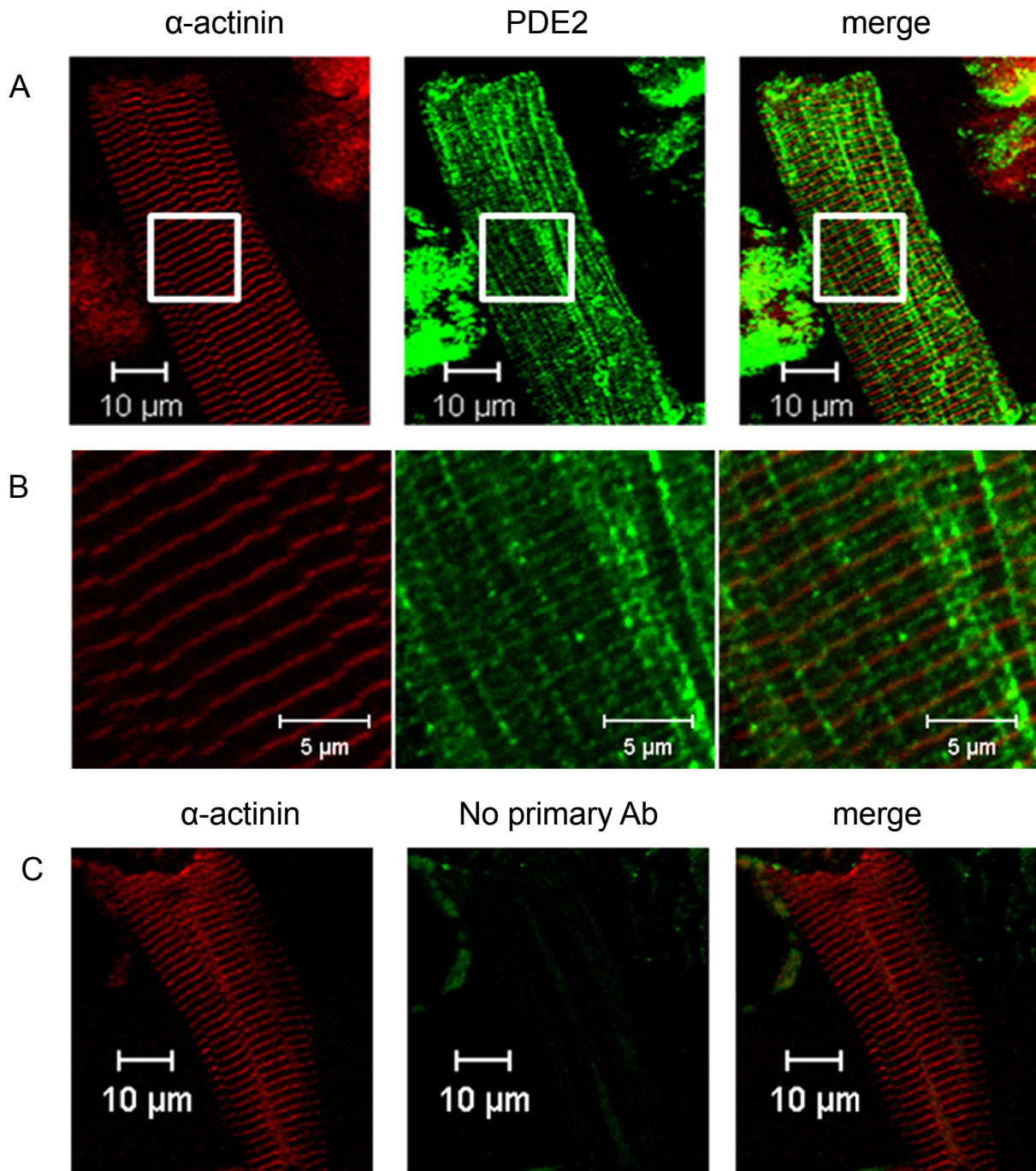


図 7.  $\alpha$ -アクチニンと PDE2 の共局在。A, Alexa Fluor dye を用いた、 $\alpha$ -アクチニンと PDE2 の共染色。B, A の囲み部分を 5 倍に拡大した図。C, PDE2 のネガティブコントロール。

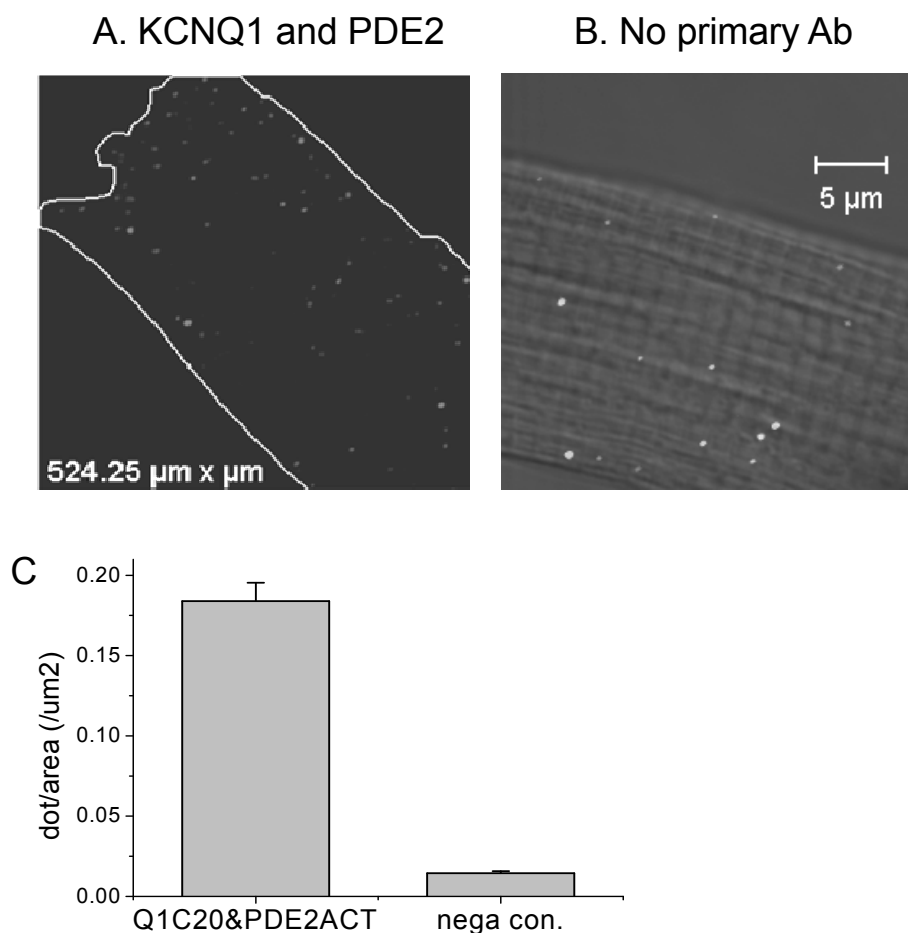


図8. KCNQ1 チャンネルとPDE2 の共局在。A, PLA probe を用いた、KCNQ1 とPDE2 の共染色。B, 一次抗体を用いずに、PLA probe だけで染色した図。C, PLA probe を用いた、KCNQ1 とPDE2 の共染色のまとめ(mean±SEM)。右;KCNQ1 チャンネルとPDE2 の共染色(n=24)。左;KCNQ1 チャンネルとPDE2 のネガティブコントロール(n=51)。

#### 4. 考 察

$I_{Ks}$  チャンネルは一酸化窒素 NO により  $\alpha$  サブユニットである KCNQ1 のカルボキシル末端 C445 が S-ニトロ化されて、電流が増大する。今回、我々は  $I_{Ks}$  チャンネルは過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) により NO の時とは逆に電流が抑制され、 $\alpha$  サブユニットである KCNQ1 のカルボキシル末端 C642 が関与している可能性が示唆された。このように、生理的なシグナル伝達に関わる酸化修飾と、病態的な酸化ストレスによる酸化修飾が一つの同一分子に対して、全く正反対の機能修飾をもたらす事が示唆された。このことは、酸化修飾の段階が進んでいくときに、病態シグナルとなるスイッチとしての意味を持つことが予測される。すなわち、生理的な状態では、ニトロ化により  $I_{Ks}$  は増大して膜を早く再分極させ、心電図 QT 間隔は短縮する。このことは、生理的な状態において  $I_{Ks}$  チャンネルが心筋細胞内へ過剰なカ

ルシウムが取り込まれるのを防ぐ役割を果たすこととよく一致する。一方で、病態的な状態では、 $I_{Ks}$  チャンネルは逆に膜の再分極遅らせ、心電図 QT 間隔は延長する。このことは、病態的な状態でカルシウムが細胞内にさらに流入することとなり、細胞障害を増悪させる。すなわち、生理的な状態と病態的な状態それぞれをより強調する役割があると考えられる。

今回、新たな発見として、 $I_{Ks}$  チャンネルの酸化修飾にも cAMP とのクロストークがあることを見出した。今回は、鍵となる分子として PDE2 を検討したが、他の分子も関連している可能性は十分にあるので、今後の検討課題である。

シヨ糖密度勾配遠心分離の結果より、lipidraft/caveola 分画での cAMP と性ホルモンのシグナル分子が PDE2 と局在している可能性が示唆された。また、PLA probe を用

いた検討において、KCNQ1 チャンネルとPDE2の共局在が確認された。性ホルモン非ゲノム経路に関与している分子とL型カルシウムチャンネルがlipidraft/caveola分画に共局在している<sup>(2)</sup>、 $\beta$  アドレナリン性シグナル経路に関与している分子とL型カルシウムチャンネルがcaveola分画に共局在している<sup>(6)</sup>という報告があることから、性ホルモン非ゲノム経路分子の近傍にPDE2のプールがあり、性ホルモンからのシグナルが入るとKCNQ1チャンネル周辺のcAMPを分解することで、PKAによって活性化しているチャンネルを調節していると考えられる。

PDE2は毛細血管や血管内皮細胞に多く存在している<sup>(7)</sup>。また、血管内皮細胞の細胞株を使った検討では、腫瘍壊死因子- $\alpha$ の刺激によってmRNA量とタンパク質発現量が増えて酵素活性が増大することが知られている<sup>(8,9)</sup>。トロンビンの血管透過性亢進作用がPDE2選択的阻害剤によって阻害されるという報告や<sup>(8,9)</sup>、近年開発された、PDE2選択性と作用強度が向上したPDE2阻害剤は、マウスの肺においてトロンビン誘発性の浮腫形成を阻害するという報告より<sup>(8)</sup>、敗血症や局所的な炎症反応の治療にPDE2阻害剤を使用できる可能性がある。また、ラットを用いた他の新規PDE2阻害剤の検討では、脳におけるnNOSの活性化を介した物体認識能と記憶能の改善や<sup>(10)</sup>、酸化ストレスによる不安行動の改善が報告されている<sup>(11)</sup>。今回、PDE2が心筋 $I_{Kr}$ チャンネルの酸化的修飾による機能制御に関連していることが示唆され、シグナル伝達をもたらす酸化的修飾と病態につながる酸化的ストレスとの違いを説明できる端緒となることが期待される。

#### 参考文献

1. Bai CX, Kurokawa J, Tamagawa M, Nakaya H, Furukawa T. Nontranscriptional regulation of cardiac repolarization currents by testosterone. *Circulation*. 2005; 112: 1701-1710
2. Nakamura H, Kurokawa J, Bai CX, Asada K, Xu J, Oren RV, Zhu ZI, Clancy CE, Isobe M, Furukawa T. Progesterone regulates cardiac repolarization through a nongenomic pathway. *Circulation*. 2007; 116: 2913-2922
3. Asada K, Kurokawa J, Furukawa T. (2009) Redox- and calmodulin-dependent S-nitrosylation of the KCNQ1 channel. *J Biol Chem*, 284, 6014-6020.
4. Kurokawa J, Tamagawa M, Harada N, Honda S, Bai CX, Nakaya H, Furukawa T. (2008) Acute effects of estrogen on the guinea pig and human  $I_{Kr}$  channels and drug-induced prolongation of cardiac repolarization. *J Physiol (Lond.)*, 586, 2961-2973.
5. Mongillo M, Tocchetti CG, Terrin A, Lissandron V, Cheung Y-F, Dostmann WR, Pozzan T, Kass DA, Paolocci N, Houslay MD, Zaccolo M. Compartmentalized phosphodiesterase-2 activity blunts beta-adrenergic cardiac inotropy via an NO/cGMP-dependent pathway. *Circ Res*. 2006; 98: 226-234
6. Balijepalli RC, Foell JD, Hall DD, Hell JW, Kamp TJ. From the cover: localization of cardiac L-type  $Ca^{2+}$  channels to a caveolar macromolecular signaling complex is required for beta2-adrenergic regulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103: 7500-7505
7. Sadhu K, Hensley K, Florio VA, Wolda SD. Differential expression of the cyclic GMP-stimulated phosphodiesterase PDE2A in human venous and capillary endothelial cells. *J Histochem Cytochem*. 1999; 47: 895-905
8. Seybold J, Thomas D, Witzernath M, Boral S, Hocke AC, Burger A, Hatzelmann A, Tenor H, Schudt C, Krull M, *et al*. Tumor necrosis factor-alpha-dependent expression of phosphodiesterase 2: role in endothelial hypermeability. *Blood*. 2005; 105: 3569-3576
9. Surapisitchat J, Jeon K-I, Yan C, Beavo JA. Differential regulation of endothelial cell permeability by cGMP via phosphodiesterases 2 and 3. *Circ Res*. 2007; 101: 811-818
10. Domek-Lopacinska K, Strosznajder JB. The effect of selective inhibition of cyclic GMP hydrolyzing phosphodiesterases 2 and 5 on learning and memory processes and nitric oxide synthase activity in brain during aging. *Brain Res*. 2008; 1216: 68-77
11. Masood A, Nadeem A, Mustafa SJ, O'Donnell JM. Reversal of oxidative stress-induced anxiety by inhibition of phosphodiesterase-2 in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008; 326: 369-379



## Role of Potassium Ion in Oxidative Stress at the Heart

Junko Kurokawa, Tetsushi Furukawa

Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University

### Summary

We have demonstrated that progesterone ( $P_4$ ) or testosterone (DHT) suppress a cAMP-stimulated L-type  $Ca^{2+}$  currents ( $I_{Ca,L}$ ) cGMP-dependently, whereas  $P_4$  or DHT enhance  $I_{Ks}$  channel currents ( $I_{Ks}$ ) cGMP-independently without cAMP-stimulation. Upon the enhancement of  $I_{Ks}$ , cysteine at 445 in the C-terminus of KCNQ1 ( $\alpha$  subunit of the  $I_{Ks}$  channel) is *S*-nitrosylated by NO production stimulated by  $P_4$  or DHT. Here, we found that oxidative stress by  $H_2O_2$  suppressed  $I_{Ks}$ . Mutagenesis analysis (Cys-scanning) revealed that the suppression of  $I_{Ks}$  is controlled by Cys 642 in the C-terminus of KCNQ1. Actually, patch-clamp assay in native cardiomyocyte suggested that the suppression involves cAMP/NO signaling crosstalk. Therefore, we investigated substantial fraction of sex hormonal signaling molecules and cAMP signaling molecules clustered in the caveolae (lipid/raft) fraction where KCNQ1 exists. These results suggest that KCNQ1 localizes around PDE2 in caveolae. The impact on the function would be a future study.