

ウ メイクイ 氏の学位論文審査の要旨

論文題目

Regulation of membrane KCNQ1/KCNE1 channel density by sphingomyelin synthase 1
(スフィンゴミエリン合成酵素 1 による KCNQ1/KCNE1 チャンネルの調節作用)

カリウムチャンネル KCNQ1/KCNE1 (Q1/E1) は多くの臓器に発現し、重要な生理機能を担っている。例えば、内耳において蝸牛内電位の生成に働き、聴覚の感度維持に不可欠である。スフィンゴミエリン合成酵素 1 (SMS1) 欠損マウスでは、蝸牛中央階の血管条を構成する上皮細胞の細胞膜における Q1 が低下していた。しかし、SMS1 がどのような機構で Q1 の細胞膜への局在を制御しているか不明である。そこで申請者は、電気生理学的手法を用いて、SMS1 による Q1/E1 チャンネルの局在および機能制御機構の解明を目指して以下の研究を実施した。

カリウムチャンネルの発現量が低い HEK293T 細胞に Q1/E1 チャンネルを強制発現させ、SMS1 の阻害剤、同遺伝子のノックダウンや強制発現が、Q1/E1 チャンネルの性質にどのような影響を及ぼすか検討した。チャンネル密度の解析はホールセル記録法、mRNA の解析は半定量的 PCR 法を用いた。

HEK293T 細胞に Q1 を単独で発現させても、カリウム電流密度に顕著な変化が見られなかったが、Q1/E1 を同時に発現させると、緩慢な活性化と脱活性化を示し、不活性化を示さないといった特徴的な Q1/E1 電流を記録できた。SMS1 阻害剤である D609 は、Q1/E1 の電流密度を著しく低下させ、チャンネルの電位依存性も低電圧側にシフトさせた。shRNA を用いて SMS1 をノックダウンすると、Q1/E1 の電流密度は顕著に低下したが、チャンネルの電位依存性に変化は認められなかった。一方、SMS1 を過剰発現させると、Q1/E1 電流密度が顕著に増加したが、チャンネルの電位依存性に変化は認められなかった。以上のことより、SMS1 が Q1/E1 の密度を正に調節し、チャンネルの性質を変えないことが示唆された。また、D609 による電位依存性変化は、非特異的な効果だと推察された。SMS1 がどのように Q1/E1 の密度を調節するかを調べるために、SMS1 による酵素反応の代謝産物であるジアシルグリセロール (DAG) に注目し、DAG 依存性キナーゼ Protein kinase D (PKD) の阻害効果を調べた。その結果、PKD の阻害剤は、Q1/E1 の密度のみを低下させた。また、PKD 阻害の効果と SMS1 ノックダウンの効果は非加算的であった。以上の結果から、SMS1 が、細胞膜上における Q1/E1 の密度を促進し、その制御機構は DAG 依存性 PKD を介することが示唆された。

審査では、SMS2 の機能と局在、細胞生物学的手法による検討の有無、用いた細胞の理由、静電容量の測定方法、KCNQ1/KCNE1 チャンネルのサブユニット構成、SMS1 阻害剤の薬理作用、細胞内 DAG 量測定などについての質疑がなされ、申請者より適切な回答がなされた。

本研究は、SMS1 が形質膜における Q1/E1 の密度を正に調節すること、そしてその調節は、DAG 依存性 PKD を介していることを示したものであり、医学の発展に貢献する有意義な研究であり、学位の授与に値すると評価された。

審査委員長 分子生理学担当教授

富澤 一 仁