

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

以異源表達方式探討人類 KCNQ4 管道蛋白受磷酸化作用其序列位點(C
端與 S4-5 段)與功能變化之研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 97-2320-B-040-002-MY3

執行期間：98年8月01日至100年07月31日

執行機構及系所：中山醫學大學生物醫學科學學系(所)

計畫主持人：林明忠

共同主持人：

計畫參與人員：陳敬哲，黃仁裕，蔡文盛

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本計畫除繳交成果報告外，另須繳交以下出國心得報告：

赴國外出差或研習心得報告

赴大陸地區出差或研習心得報告

出席國際學術會議心得報告

國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

中 華 民 國 100 年 10 月 30 日

目錄

目錄	1
英文摘要	2
中文摘要	3
Introduction	4
Materials and Methods	7
Results	11
Discussion	16
References	17
成果報告自評表 (附件二)	20

Abstract

In order to study the action sites of KCNQ4 by PMA, We constructed a series of KCNQ4 mutants, T223, S229, S235, S410A, S425A, S445A, S464A, S482A, S494A and A651del and analyses their functional properties by treated with phosphatase inhibitors or PKC activator (PMA). We expressed these mutants in both the *Xenopus* oocytes and mammalian HEK293t cell line. The response of A651del (truncated after the residue 651) by treated with PMA or phosphatase inhibitors is similar to wild type indicating that after the residue 651 are not necessary for the response to PMA or phosphatase inhibitors for KCNQ4. Other mutants S229, S235, S410A, S425A, S445A, S464A and S482A also showed the similar results with the wild-type, indicated that sequence before and after the A-domain (residue 546 to 650 and S4-S5) is not the necessary for the response induced by PMA or phosphatase inhibitors. These results showed that S229, S235, S410A, S425A, S445A, S464A, S482A, S494A and A651del are ruled out for the acting sites of KCNQ4 by PMA or phosphatase inhibitors. Interesting, the S494A failed to express the functional current of KCNQ4. The immunocytochemistry study showed that S494A mutant does not express in cell membrane. The mutant S494A may impairs the membrane traffic of KCNQ4. KCNQ4 current recording from T223A mutant, is insensitive to the treatment of PMA indicating that T223 (within S4-S5 segment) is a necessary for the effect of PMA on KCNQ4. This result indicated that T223 (in S4-S5 segment) is an import region for the response induced by PMA.

Keywords: KCNQ4 channel mutants; HEK293t; T223; PMA; Phosphatase inhibitor; Protein kinase C.

中文摘要:

我們已建構一系列的 KCNQ4 變異基因 T223, S229, S235, S410A, S425A, S445A, S464A, S482A, S494A and A651del, 並且分析這些變異對於 phosphatase inhibitors 或 PMA (PKC activator) 的反應。我們將這些變異分別表達於爪蟾卵母細胞和人類 HEK293t 細胞株。將 651 號氨基酸之後之序列切除 (A651del, 正位於 A-domain 之後) 發現它的功能與野生型比較對於 phosphatase inhibitors 或 PKC activator 的反應並無顯著差異。其它變異位於 A-domain 之前與 S4-S5 中如 S425A, S445A, S464A, S482A S229 和 S235 也顯示與 A651del 對於 PMA 的作用產生相似的反應模式, 顯示 A-domain 之前與 A-domain 之後似乎對於 phosphatase inhibitors 或 PKC activator 的反應是非必須的。以上結果顯示我們排除了 T223, S229, S410, S425, S445, S464, S482, S494 和 A651 之後序列皆不是 PMA or phosphatase inhibitors 產生作用所必須的。有趣的是 S494A 無法表達 KCNQ4 電流, 使用免疫螢光化學分析顯示 S494A 變異並不會正確表達於細胞膜上, S494A 突變可能會傷害 KCNQ4 運輸或組裝至細胞膜上。從 KCNQ4 T223A 所記錄到的電流發現, T223A 對於 PMA 處理產生不反應性顯示 T223(位於 S4-S5 序段)是 PMA 對於 KCNQ4 產生作用所必須的。這個結果顯示 T223 (in S4-S5 segment) 是 PMA(PKC 活化劑)作用於 KCNQ4 的重要作用位置。

關鍵詞: KCNQ4 管道變異蛋白; HEK293t; T223; PMA; 去磷酸化酶抑制劑; 蛋白激酶丙。

Introduction

Kv 鉀離子通道大家族 (superfamily) 大部份對於調節細胞膜興奮性上扮演重要角色 (Pongs. 1999), 並且由突觸 (synapse) 或神經調控物質 (neuromodulatory) 所引發的神經興奮現象, 也主要經由 Kv 鉀離子通道調節路徑來進行調控 (Jonas et al. 1996)。被歸類於 Kv 鉀離子通道超級家族的 KCNQ 家族 (KCNQ family), 在人類器官與組織中各類型細胞的細胞膜電位維持與功能表現的調節上扮演重要角色 (Robbins. 2001)。例如於心肌細胞 (cardiomyocytes) 上 KCNQ1 與調節性的 β -subunit, 如 KCNE1, 組合成異聚體 (heteromers) 產生延遲性調整型 (rectifier) 鉀離子電流用以調節心臟脈動 (Wang et al. 1996; Yang et al. 1997)。由 KCNQ2 與 KCNQ3 形成的異聚體鉀離子通道, 所產生的鉀離子電流與受到活化的 M1 muscarinic acetylcholine receptor (M1 receptor) 作用後所抑制的鉀離子電流相類似, 因而被稱為 M-current (Wang et al. 1998), 主要位於腦部與交感神經節細胞中負責調控神經元興奮性 (neuronal excitability) (Brown and Adams. 1980; Wang et al. 1998)。KCNQ4 主要表達於人類聽覺系統內耳外毛細胞中 (outer hair cell), 中樞聽覺路徑 (central auditory pathway) 與骨骼肌細胞。KCNQ5 則於老鼠的大腦皮層與海馬迴中被發現, 其產生的鉀離子電流會受 M-current 抑制劑 linopirdine 與 XE-991 所抑制, 推測其功能在部分神經元中應與會產生 M-current 的離子通道相似 (Schroeder et al. 2000; Jensen et al. 2005)。M-current 能使膜電位到達閾值最低需求等級之上幫助調節神經元興奮性, 因此對神經細胞而言非常重要。由 KCNQ2 與 KCNQ3 所組成的異聚體鉀離子通道, 因其所展現的生物物理 (biophysical) 與藥理 (pharmacological) 特性, 被認為是典型的 M-current (Wang et al. 1998)。而其他 KCNQ

成員也擁有部分類似 M-current 的特性, 例如皆能被 M-current 抑制劑 linopirdine 所抑制、離子通道活化曲線類似等特性, 但在磷酸化的狀態下及受活化的 M1 receptor 調節作用下等情況之反應卻不相同, 因而其他 KCNQ 鉀離子通道成員所產生的鉀離子電流被稱做 M-like current (Villarreal et al. 1989; Meves et al. 1999; Selyanko et al. 1999)。過去的研究已知 M-current 受活化後 M1 receptor 調控的大略路徑。M1 receptor 活化劑 (activator) 如 oxotremorine M (oxo-M) 與 M1 receptor 結合並活化 M1 receptor, M1 receptor 亦為 $G_{q/11}$ -couple receptor, 因此 M1 receptor 活化後將釋放活性化 (activating) 的 $G_{q/11}$ (Brown and Adams. 1980; Caulfield et al. 1994; Marrion. 1997; Haley et al. 1998), 接著活性被化的 $G_{q/11}$ 會活化 phospholipase C (PLC), PLC 將 phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP_2) 水解成 1,2-diacylglycerol (DAG) 與 inositol-1,4,5-triphosphate (IP_3)。有些文獻認為 PIP_2 的水解是整個反應的關鍵步驟 (Suh and Hille. 2002; Loussouarn et al. 2003; Zhang et al. 2003), 甚至認為帶負電的細胞膜磷脂類 (membrane phospholipid) PIP_2 應該會與 KCNQ 鉀離子通道位於細胞質內 C 端 (C-terminal) 上帶正電的胺基酸相互作用 (Zhang et al. 2003)。經由水解產生的 DAG 會活化 protein kinase C (PKC), 活化的 PKC 會磷酸化 KCNQ 鉀離子通道, 被磷酸化的 KCNQ 鉀離子通道其活化曲線會往去極化 (depolarization) 方向偏移, 使得 KCNQ 鉀離子通道不容易打開, 抑制鉀離子電流的產生。雖然活化 PKC 被認為參與 M-current 的抑制 (Higashida and Brown. 1986), 但在部分交感神經元中發現 M-current 的抑制過程中似乎不需要 PKC 的參與 (Bosma and Hille 1989; Marrion. 1994), 因此仍不清楚究竟 PKC 只是促進 PIP_2 引起的抑制反應, 亦

或者 PKC 調控 KCNQ 鉀離子通道的能力是獨立的而與 PIP₂ 無關(Koichi and Yoshihiro. 2005)。另一經由水解產生的 IP₃ 會與細胞內鈣離子儲存槽(calcium store)上的 IP₃ receptor (Delmas et al. 2002)結合，促使鈣離子釋放到細胞內環境增加細胞內鈣離子濃度，鈣離子會活化 PKC 或經由結合上 calmodulin (CaM)，使得 CaM 活化並能與 KCNQ 鉀離子通道 C 端胺基酸相互作用，進而抑制鉀離子電流的產生(Wen and Levitan. 2002; Yus-Najera et al. 2002; Gamper and Shapiro. 2003)。利用改變離子通道磷酸化狀態的方式來調節生理機能是調節機制中很常見的一種方法。為了瞭解 KCNQ 鉀離子通道磷酸化狀態之改變，會對鉀離子通道開關能系上有何影響，以及尋找鉀離子通道蛋白上可能的磷酸化胺基酸位點。我們選擇以 KCNQ4 為研究主題，因為 KCNQ4 除了表現於耳蝸的外毛細胞與腦幹的細胞核之外(Kharkovets et al. 2000)，以北方點墨法(Northern blot)分析也發現於心臟與骨骼肌中也有 KCNQ4 鉀離子通道蛋白的表現(Kubisch et al. 1999)，顯示 KCNQ4 在各種器官組織中負責一定程度的生理機制調節，加上已有文獻指出 KCNQ4 能受活化的 M1 receptor 所調節，以及受 PKC 作用而磷酸化(Koichi and Yoshihiro. 2005)，可見 KCNQ4 為一非常適合的研究目標。*Kcnq4* 基因位於人類染色體 1p34 處，轉譯出 695 個胺基酸，產生的蛋白質結構含有 6 個穿膜區域(transmembrane domain)、4 個細胞外環圈(extracellular loop)、2 個細胞內環圈(intracellular loop)且 N 端(Amino-terminal)與 C 端皆位於細胞內，特別是冗長的 C 端(約 350 個胺基酸)具有許多細胞內分子(如：PKC、CaM、N-ethylmaleimide 與 NEM 等)的作用區域(Roche et al. 2002; Koichi and Yoshihiro. 2005)，而第四個穿膜區域有一列帶正電的胺基酸序列，此段序列被認為是膜電位感測器

(voltage sensor)(Coucke et al. 1999)，在孔洞形成區也有一段 GYGD 序列作為鉀離子選擇過濾器(potassium selective filter)，這兩段序列在 KCNQ 家族中具高度的保留性(Hau et al. 2005)。一個 KCNQ4 鉀離子通道需由四個 KCNQ4 蛋白質組成四聚體(tetramers)，並且只形成一個鉀離子通道孔洞。若 KCNQ4 基因為異型合子時所組成的離子通道依照其結構，可分成由相同次單元(subunit)搭配組成的 homomeric，或與相異次單元搭配組成的 heteromeric 兩種型式。在離子通道表達的系統選擇上，常見的有 HEK293 cell、CHO cell 與 *Xenopus laevis* oocytes (Schroeder et al. 1998; Wang et al. 1998; Selyanko et al. 2000; Shapiro et al. 2000)，其中 HEK293 cell 與 CHO cell 在準備與維持等的操作上非常類似，大致上的流程有以病毒當載體或以脂質體(liposome)包覆基因並進行與細胞膜融合的作用，或是將基因包覆特殊物質已進行非專一性內吞作用(nonspecific endocytosis)等方式將基因送入細胞株中進行轉染(transfection)，使用這類細胞株的好處是轉染方便且容易，而且一次能得到大量可供進行全細胞電位箝定技術(whole cell voltage patch-clamp)記錄用的細胞數目，但由於細胞較小所以在技術的操作上相對較為困難。*Xenopus laevis* oocytes 在準備上需要取得卵細胞的步驟，也需以顯微注射的方式將基因送入卵細胞中，需要較多的時間，可供進行雙電極電位箝定(Two electrodes voltage clamp, TEVC)記錄的細胞數也較少但在實驗操作上較容易上手。雖然各種離子通道表達系統各有其優缺點，且位於不同基因背景(genetic background)下，所產生的生理反應也不盡相同(Durga and James. 2006)。由於我們想了解 KCNQ4 鉀離子通道與磷酸化之間的相關性為何，因此選擇使用 HEK293t cell 與 *Xenopus laevis* oocytes 兩種離子通道表達系統，分別使用全細胞電位箝

定技術與雙電極電位箝定技術記錄表達的 KCNQ4 鉀離子通道功能，並給予引發或抑制細胞內磷酸化之適當藥劑處理，以探討 KCNQ4 鉀離子通道與磷酸化的相關性，並藉由生物資訊學的磷酸化胺基酸位點預測軟體協助下，將 KCNQ4 鉀離子通道 C 端上可能

的磷酸化胺基酸位點，以位置導向點突變技術加以改變，嚐試尋找可能的磷酸化胺基酸位點，並比較 KCNQ4 鉀離子通道表達於 HEK293t cell 與 *Xenopus laevis* oocytes 兩種表達系統之差異。

Materials and Methods

KCNQ4-pTLN質體來源

KCNQ4-pTLN質體由 Prof. Thomas J Jentsch 慷慨提供，此質體包含人類的KCNQ4基因密碼子區域序列(coding region sequence)，位於KCNQ4基因密碼子序列兩端分別帶有非洲爪蟾卵細胞 β 球蛋白5'端與3'端非轉譯區(3' and 5' untranslated region, UTR)，並且於KCNQ4基因序列3'端設計有Poly A序列協助穩定轉錄後之mRNA穩定，此質體上帶有進行胞外轉錄(In vitro transcription)所需使用的SP6 啟動子(promotor)序列。

KCNQ4-pcDNA3.1質體建構 (Construction of plasmid KCNQ4-pcDNA3.1)

利用KCNQ4-pTLN質體上KCNQ4基因序列5'端之HindIII與3'端之XhoI限制酶辨識序列，進行次選殖(subcloned)至pcDNA3.1質體上，成為KCNQ4-pcDNA3.1質體。

DH5 α 大腸桿菌之轉型 (Transformation)

使用 Real Biotech Corporation HITTM Competent Cells 非熱休克轉型(Non Heat Shock Transformation)之DH5 α 菌株。

質體純化 (Plasmid purification)

將帶有欲純化質體的E. coli於4 ml LB培養液(10g NaCl, 10g Tryptone, 5 g Yeast extract, 1 L ddH₂O, 0.1 mg/ml Ampicillin)中37°C培養16小時，以 GeneMark Plasmid Miniprep Plus purification kit 進行質體純化。

DNA膠體電泳 (electrophoresis)

使用1X TAE buffer(50X TAE buffer : 40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0)配置1% Agarose凝膠。

cRNA的製備 (In vitro transcription)

將抽取出來的KCNQ4-pTLN質體利用Ambion mMESSEGE mMACHINE之SP6 transcription kit進行胞外轉錄反應(in vitro transcription)。由於此反應需要的模板(template)為線狀，因此事先需以Hpa I限制酶將質體KCNQ4-pTLN切

成線狀，之後利用膠體電泳確認Hpa I限制酶作用是否成功。接著使用 QIAquick Gel Extraction Kit 將已被切成線狀的KCNQ4-pTLN質體由凝膠中回收。最後利用SP6 polymerase (kubisch et. al. 1999)對線狀的KCNQ4-pTLN質體進行胞外轉錄反應，反應完成後再利用 LiCl將cRNA鹽析並沉澱下來。再以70%的酒精洗去雜質後，使用kit內附的RNase free water回溶乾燥的cRNA。回溶後的cRNA 利用分光光度儀測定cRNA的濃度與純度。當OD260 nm 測得的值為1時，表示cRNA的濃度約為40 μ g/ml。而純度良好的cRNA，其 OD 260nm/ OD 280nm 的比值介於1.8~2之間。測量完後，記錄所測之結果，再將cRNA 置於 -80°C 保存。

位置導向點突變技術 (Site directed point mutation)

利用建構好的KCNQ4-pcDNA3.1質體作為模板，再依據生物資訊方法預測出來的 Hot Spot，設計出中央具有突變點的primer (見附件)。再利用PCR，以此primer複製出有目標突變點的DNA。PCR反應時需要的溶液包含 1 μ l Template DNA (100ng)、1.25 μ l reverse primer (15 μ l)、5 μ l dNTP (2mM)、5 μ l 10X pfu reaction buffer、1 μ l PfuTurobo DNA polymerase (2.5 U/ μ l)、2 μ l DMSO (100%)、33.5 μ l sterile D₂H₂O，共50 μ l。PCR擴增18個循環。PCR結束後，加入 1 μ l Dpn I，在37°C下反應2小時，將不含突變點的 Template DNA切開，接下來進行轉型 (Transformation)的步驟。最後再利用定序方式來確定突變點的存在。

HEK293t細胞株培養 (HEK293t cell line culture)

HEK293t細胞株由國立中央大學 孫維欣老師善意提供，使用DMEM培養液(10% FBS)，於5% CO₂之37°C培養條件下培養，以5 X 10⁵

之細胞數培養於6 cm之細胞培養皿，約三至四天可進行一次繼代培養，HEK293t細胞株雖為黏附型細胞株，但離開37°C培養箱後放置於室溫下過久易造成細胞自培養皿脫落而懸浮，需特別注意。

細胞株繼代培養：

HEK293t細胞株培養約3至4天後，細胞密度約達7至8成即可進行繼代培養。

細胞株液態氮冷凍保存：

HEK293t細胞株冷凍保存所使用之培養液為含有7% DMSO之DMEM培養液，且單一細胞冷凍管中之細胞數目需大於 10^6 cells/ml，並以緩慢降溫為細胞株冷凍保存之要點。

細胞株解凍復甦：

HEK293t細胞株解凍復甦應以快速解凍為要點，以37°C水浴於5分鐘內解凍完畢，並為減少作為抗凍劑所使用之DMSO影響細胞株存活率，解凍後以2倍冷凍體積之DMEM培養液稀釋之，並以1000 rpm離心5分鐘，抽除上層培養液後，以新鮮DMEM培養液懸浮細胞團塊後分盤培養之。

轉染 (Transfection)

本實驗所使用轉染法為使用脂小體(liposome)之暫時性轉染(transient transfection)。Invitrogen™ Lipofectamin™ 2000 與Fugene HD 為本實驗所使用之脂小體。本實驗使用FuGENE HD Transfection reagent的脂小體(liposome)之暫時性轉染法(transient transfection)。在transfection前一天準備好 2×10^5 個細胞放入3.5 cm的細胞培養皿中。將培養皿中的medium補足到2 ml。將2 μ g KCNQ4質體和3 μ g transfection reagent以及無血清補足至100 μ l。混合後，在室溫下等15分鐘。以滴狀方式加入3.5 cm的細胞培養皿中，並輕搖使其均勻。培養24~48小時後，細胞可進行全細胞電位鉗定測量。另同時轉染螢光蛋白基因EGFP做為marker。

免疫螢光染色

主要處理過程如下，將HEK293t 培養於蓋玻片上，以paraformaldehyde 4% 固定，以 PBS wash 三次，滴上Blocking reagent in incubation 30 mins，室溫下。PBS wash 三次，滴上Primary Ab (1:1000)，37度，1 hrs。滴上Secondary Ab (1:1000)，37度，2 hrs。以PBS wash 三次，封片。然後以螢光顯微鏡觀察之。

非洲爪蟾卵母細胞的製備 (Preparation of Africa Xenopus oocytes)

本實驗是使用開刀的方式，來取出非洲爪蟾的卵母細胞 (Gurdon et al. 1971)，首先為準備麻醉劑 Tricaine (將 0.15~0.2% ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonic acid salt 以 0.15 ~ 0.2%之NaHCO₃溶液泡製)。浸泡爪蟾入麻醉劑之中 10到20分鐘。將準備好之器具浸泡於 70 ~ 75%酒精中消毒殺菌。再準備培養皿，其中盛裝蛙卵液 (Barth's Solution，NaCl 88 mM，KCl 1 mM，Ca(NO₃)₂ · 4H₂O 0.33 mM，CaCl₂ 0.41 mM，MgSO₄ · 7H₂O 0.82 mM，Hepes 10 mM，D2H₂O 1.85 L，NaOH 1N 6 mL。滅菌後加入，NaHCO₃ 2.4 mM及Gentamicin 0.1g/2L，常溫18°C 保存) 後，放置於冰上。手術取出之卵巢團放置於冰上培養皿中，以五號鑷子拉扯成較小團塊。需小心盡量不要傷及卵母細胞。再來以 Ca²⁺-free 蛙卵液 (NaCl 100mM，KCl 2mM，Hepes 5mM，pH 7.4) 內含有 collagenase (type 1，Sigma)，濃度為每毫升 2 mg。將卵母細胞團移入內含 collagenase 溶液的 15 ml 試管，再使用震盪儀緩慢震盪 40分鐘到1小時，使大多數的卵母細胞分離。在卵母細胞大致分離後，以新鮮蛙卵液清洗10次，以完全去除 collagenase之作用。之後將卵母細胞移入內盛新鮮蛙卵液的培養皿之中，放入8 ~ 10°C的冰箱中放置30分鐘到1小時，這種低溫處理可以使原本健康狀態不佳的卵母細胞的情況惡

化，以方便之後的挑選。在低溫處理完畢後，以解剖顯微鏡將狀態不佳的卵母細胞移除丟棄（健康的卵母細胞黑色的動物極和淡黃或偏白的植物極分明，同時沒有特別的斑點出現，呈橢圓形偏圓形）。之後，將單離之卵母細胞保存在恆溫18°C中，供注射cRNA使用。

卵母細胞之 cRNA 顯微注射 (cRNA micro-injection)

利用拉針器 (PP-830; NARISHIGE)以適當條件（目前使用58.9儀器溫度單位）將注射器專用之玻璃管（glass capillary tubing，已進行過消毒高溫去除Rnase之處理）拉成針形。接下來以燒琢器 (Micro Forge, NARISHIGE)撞擊玻璃管之針端，使其形成一個截面積直徑約為10~15μm的斜切口。將處理好的玻璃管裝設於顯微注射器 (Nanoject II, Drummond)。之後將已稀釋為500 ng/μl的cRNA由玻璃管尖端抽吸進入管內。之後再將其注射入挑選過的卵母細胞，注射量約為50 nl。完成後，放置在18~20°C冰箱中保存，需每日更換蛙卵液。在注射入cRNA後，大約在18~48小時後，即可大量表達，即可進行電生理性質測量。

雙電極電位箝定技術 (Two Electrodes Voltage Clamp; TEVC)

首先利用拉針器以適當條件的溫度將玻璃管拉成針形，把拉好的玻璃管填充入3M KCl，需注意盡量不要產生氣泡。若有氣泡產生，可以以手指輕敲使氣泡從非針狀端排出。二支玻璃管分別為電位電極 (Voltage-electrode)，用於紀錄電位；另一隻為電流電極 (Current-electrode)，用於注入電流以固定膜電位。電位電極和HS-2A X1 LU headstage相接，而電流電極則和HS-2A X10 MGU headstage相接。電極內使用銀線 (silver wire) 做為固態和液態之間電流傳遞的中介物。銀線在使用前要先使用漂白水在其

表面鍍上AgCl，AgCl可以以 $\text{AgCl} \rightarrow \text{Ag}^+ + \text{Cl}^-$ 的方式在固態和液態之間傳遞電流變化。紀錄電流變化是使用雙電極電位箝定技術 (Two-electrode Voltage Clamp, 簡稱TEVC)，紀錄電流前先以AxoClamp-2B確認玻璃電極的電阻大小（因為玻璃電極是內裝鹽溶液的容器，所以本身也會有電容和電阻的性質存在），電流電極的電阻最好位於0.5到2.0MΩ，而電位電極則最好在0.5到1.0MΩ。在確認電極的情況良好後，取待測之卵母細胞放入測試槽 (Chamber)之內，測試槽內置約1 ml的ND-96溶液（成份如下：96 mM NaCl; 4 mM KCl; 1.8 mM CaCl₂; 1 mM MgCl₂; 5 mM HEPES）。測試槽會以鹽橋 (Agar Bridge) 和3M KCl池 (Pool) 相接，3M KCl池中會放置與VG-2A X100 (virtual-ground bath clamp) 相接之銀線，做為地線使用，以消除背景值電流的干擾。同時以鹽橋分隔地線可以避免在加入藥物於測試槽時，發生接合潛能 (Junctional Potential) 現象，即溶液組成發生意料外的變動。放入卵母細胞時，盡量讓植物極向上，因為動物極為細胞核之所在，所以電極盡量以植物極為刺入目標。卵母細胞放置完成後，利用解剖顯微鏡找到電極尖端之位置，再利用三向微調器 (NARISHIGE) 調整其位置，將電極尖端移動至接近卵母細胞植物極表面。打開AxoClamp-2B電流放大器，將二個電極的背景電位歸至零，再將二個電極的尖端輕巧又快捷地刺入植物極內。用力過猛或是過度拖拉，都會對卵母細胞造成不良影響。此時AxoClamp-2B會出現卵母細胞的膜電位，正常情況下卵母細胞的膜電位應該在-40 mV上下，但只要低於-20 mV就能有一定程度上的密合性，而可以測量。

紀錄時，會依設定的流程進行紀錄，本實驗使用的流程為，先將電位箝定在-60 mV，期間3秒，目的為使離子通道恢復穩定，減少前次電位改變刺激的影響，接著進入電

位改變區域，每次紀錄會有15次的連續刺激，依次測量的變動為提升10 mV，總共變動區間為由-80 mV至+60 mV，測量時間為2秒，最終箝定在-30 mV，期間1秒，此部份產生的電流稱為尾電流(tail current)，此流程亦稱為尾電流流程紀錄法 (Tail Current Protocol)。結尾的-30 mV會使KCNQ4進入關閉狀態，所以可以紀錄到KCNQ4在不同膜電位狀態下進入關閉狀態時，所釋放出來的電流。可以用來推算KCNQ4的離子通道開關頻率之變化。紀錄時的室溫保持在大約25 °C，低通濾波器 (low-pass filter)設定在 5 kHz，可以濾去背景干擾產生的低周波干擾。而產生的電流由 Digidata 1322A (Axon Instruments) 類比/數位轉換介面 (Digital/Analog interface)轉換為數位化資料，再以pClamp 9.2 (Axon Instruments) 軟體紀錄下來，以數位形式儲存在電腦之中。

單電極全細胞箝定技術 (Whole cell patch-clamp)

本實驗以經由Invitrogen™ Lipofectamin™ 2000或Fugene HD轉染KCNQ4-pcDNA3.1與EGFP質體(10:1)之HEK293t細胞株進行全細胞電位箝定。將轉染後24至48小時後之HEK293t細胞株以 10^5 細胞數培養於24 X 32 mm SUPEØRIOR Micro Cover Glasses 蓋玻片上，置入37°C培養箱30分鐘待多數細胞貼附後將蓋玻片組裝至自製壓克力記錄盤(chamber)，並將DMEM培養液更換為記錄用細胞外溶液(extracellular solution)(140 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.4)，使用拉針器將玻璃管(Warner Instruments Inc., G85150T-3)以適當條件拉出1.6至3 MΩ阻抗的玻璃電極，並裝填細胞內溶液(110 mM KCl, 10 mM EGTA, 30 mM KOH, 5.1 mM CaCl₂, 2.8 mM MgCl₂, 1.6 mM ATP, 10 mM HEPES, pH 7.2) (Søgaard et al. 2001)，於ZIESS AXIOSKOP2 FS plus顯微鏡下以可見光與螢光模式進行實驗操作，本

實驗以AXON Instruments Digidata 1440A數位類比轉換器連接AXON Instruments Multi Clamp 2B箝定放大器與pClamp 9.2 (Axon Instruments)軟體，並將所記錄電流訊號以數位形式儲存於電腦中。本實驗使用的流程為，先將電位箝定在-60mV，目的為使離子通道恢復穩定，減少前次電位改變刺激的影響，接著進入電位改變區域，每次紀錄會有13次的連續刺激，依次測量的變動為提升10 mV，總共變動區間為由-80 mV至+40 mV，測量時間為2秒，最終箝定在-30 mV，期間200毫秒，此部份產生的電流稱為尾電流(tail current)。

人類 KCNQ4 磷酸化位點預測 (Phosphorylation site prediction of KCNQ4)

利用 KinasePhos 和 etPhos/NetPhos 線上軟體來推測人類 KCNQ4 胺基酸序列上可能被 protein kinase C (PKC) 磷酸化的 Serine 和 Threonine 位置。KinasePhos 是以 profile hidden Markov model，而 NetPhos/NetPhosK 則是以 sequence 為依據進行預測，並且綜合以上兩種軟體的預測結果來評估可能的磷酸化位點。

資料與數據分析

利用 pClamp 9.2 紀錄的電流資料，以 Clampfit 9.2 軟體進行分析。在尾電流流程之中，利用尾電流部份可以推導出不同膜電位之下的離子通道開關頻率和紀錄到之電流成正比，是故可以利用電流來推算不同膜電位之下時的離子通道開關頻率。最後再使用 Two-state Boltzman Function: $I_{tail}(V_m) = I_{tail(max)} / \{1 - \exp[(V_{1/2} - V_m)/K]\}$ 來推算出 $V_{1/2}$ (當離子通道開關頻率為0.5時之膜電位)。 V_m 為當時之膜電位， K 為曲線斜率， $I_{tail(max)}$ 為最大尾電流。結果會以平均值 標準差 (mean SEM) 格式來呈現。

Chemicals:

Dimethyl sulphoxide(DMSO)的購得由Sigma Chemical Co.(ST. Louis, MO, USA)。Phorbol

12-myristate 13-acetate(PMA)、cyclosporin A (Woburn, MA01801,USA)。並接先以DMSO溶解成濃縮液保存於-20℃。與 calyculin A 的購得由 LC Laboratories

結果(Results)

KCNQ4鉀離子通道於非洲爪蟾卵細胞異源性表達鉀離子通道電流的特徵

人類*Kcnq4*基因能在非洲爪蟾卵細胞(*Xenopus laevis* oocytes)異源性(heterologous)表達鉀離子通道電流，並呈現KCNQ家族離子通道電流低閾值(low threshold)、非不活化(non-inactivating)、延遲性(delayed)與電位依賴性(voltage-dependent)特性(Figure 1A. KCNQ4)。利用雙電極電位箝定技術(Two electrodes voltage-clamp, TEVC)將表達的鉀離子電流記錄下，其記錄鉀離子電流的方式為依照電位箝定流程(Figure 1B.)，一開始將卵細胞的膜電位箝定在-60 mV，一次記錄總共會有15次的連續刺激，每次刺激依序增加10 mV，變動區間由-80 mV至60 mV間變動，若KCNQ4鉀離子通道成功表達於爪蟾卵細胞，便會隨箝定電位的去極化產生緩慢活化的鉀離子電流，最後將卵細胞的膜電位箝定在-30 mV，此時會出現尾電流(tail current)(Figure 1A. KCNQ4箭號所示)，我們分析尾電流並以Clampfit 9.2 軟體歸納出其二分之一活化膜電位(half-activation voltage, $V_{1/2}$)，並將多次實驗結果作平均，得到平均二分之一活化膜電位為-12.41±0.39 mV (Figure 2. n=20)，在過去已經發表的文獻中所提出的平均二分之一活化膜電位為-15.8±2.3 mV (Koichi and Yoshihiro. 2005)與-10 mV的發表(Kubisch et al. 1999)，而其他KCNQ家族於爪蟾卵細胞異源性表達所得到的平均二分之一活化膜電位為：KCNQ1 -14 mV；KCNQ2 -37 mV；KCNQ2/KCNQ3 -40 mV (Sanguinetti et al. 1996; Biervert et al. 1998; Wang et al. 1998)，顯示我們所獲得的結果與過去已發表的結果非常相近。相對於注射KCNQ4 cRNA的爪蟾卵細胞，我們也利用雙電極電位箝定技術記錄無任何注射與注射無核酸水(Figure

1A. Non-injected; Nuclease free water)。結果顯示注射無核酸水與無任何注射皆無明顯的電位依賴型鉀離子電流產生，且注射核酸水與無任何注射所記錄之背景電流非常相似，相對於注射KCNQ4 cRNA的卵細胞則可記錄到最少約2000 nA，平均約在3000至6000 nA之間。

去磷酸化酶抑制劑Calyculin A與Cyclosporin A對KCNQ4鉀離子通道於爪蟾卵細胞異源性表達鉀離子電流的作用

去磷酸化酶可分成protein Ser/Thr phosphatase (PP1/PP2A)、calcium-dependent phosphatase calcineurin (PP2B) 與 magnesium-dependent phosphatase (PP2C)三種。我們對有表達KCNQ4鉀離子通道的爪蟾卵細胞前處理PP1/PP2A型去磷酸化酶抑制劑2 μ M Calyculin A，於作用10分鐘與15分鐘後記錄，並分析記錄所得到的離子通道電流與電位依賴性曲線(Figure 3A.)，結果發現前處理2 μ M Calyculin A於作用10分鐘已可達到完全作用，相較於未經處理的平均二分之一活化膜電位為-12.41±0.39 mV (n=20)，前處理Calyculin A 10分鐘後的平均二分之一活化膜電位為-1.85±0.42 mV 並且使得離子通道電流與電位依賴性曲線往去極化方向偏移。我們也使用PP2B去磷酸化酶抑制劑2 μ M Cyclosporin A，於作用10分鐘與15分鐘後進行紀錄，並分析記錄所得到的離子通道電流與電位依賴性曲線(Figure 3B.)，結果顯示前處理2 μ M Cyclosporin A於作用10分鐘後即可達到完全作用，並使得平均二分之一活化膜電位為-3.60±0.32 mV，同樣使得離子通道的電流與電位依賴性曲線往去極化偏移。顯示PP1/PP2A與PP2B去磷酸化酶可能參與調節爪蟾卵細胞異源性表達之KCNQ4鉀離子電流，由於去磷酸化酶所引發的去磷酸化反應

被抑制，因此使得爪蟾卵細胞內的磷酸化程度提升，也暗示了KCNQ4鉀離子通道上可能的磷酸化位點存在。

KCNQ4經轉染於HEK293t cell上表達之鉀離子通道電流特徵

我們使用KCNQ4-pcDNA3.1與EGFP質體以10:1的比例經由Lipofectamin™ 2000轉染於HEK293t cell上，並利用轉染成功之細胞發出EGFP螢光訊號於螢光顯微鏡下進行篩選(Figure 4A.)，挑選適當並轉染成功之細胞於光學顯微鏡下進行全細胞電位箝定技術的記錄(Figure 4B.)。人類 *Kcnq4* 基因經由Lipofectamin™ 2000轉染於HEK293t cell上表達之鉀離子通道電流同樣具有KCNQ家族離子通道的特性(Figure 5A. KCNQ4/EGFP)。利用全細胞電位箝定技術(whole cell voltage patch-clamp)，將表達的KCNQ4離子通道電流記錄下，其記錄鉀離子電流的方式為依照電位箝定流程(Figure 5B.)，一開始將HEK293t細胞的膜電位箝定在-80 mV，一次記錄總共會有13次的連續刺激，每次刺激依序增加10 mV，變動區間由-80 mV至40 mV間變動，若KCNQ4鉀離子通道成功表達於HEK293t細胞，便會隨箝定電位的去極化產生緩慢活性的鉀離子電流，最後將HEK293t細胞的膜電位箝定在-30 mV，並分析尾電流(Figure 5A. KCNQ4/EGFP 箭號所示)以Clampfit 9.2軟體歸納出其二分之一活化膜電位(half-activation voltage, $V_{1/2}$)，並將多次實驗結果作平均，得到平均二分之一活化膜電位為 -25.23 ± 0.55 mV (Figure 6B. n=20)，與KCNQ4於非洲爪蟾卵細胞異源性表達鉀離子通道電流平均二分之一活化膜電位 -12.41 ± 0.39 mV (n=20)相比較，顯示KCNQ4表達於HEK293t細胞上之鉀離子電流與電位依賴性曲線呈現較去極化的趨勢，也意味著KCNQ4表達於爪蟾卵細胞與HEK293t細胞上內生性磷酸化程度的差異。相較於KCNQ4與EGFP共同表達於HEK293t

細胞所記錄的KCNQ4鉀離子電流，我們也以全細胞電位箝定技術記錄了無轉染(Figure 5A. non-transfected)與僅轉染EGFP(Figure 5A. EGFP)。結果顯示僅轉染EGFP與無轉染的HEK293t細胞皆無明顯的電位依賴型鉀離子電流產生，且僅轉染EGFP與無轉染的HEK293t細胞所記錄之背景電流非常相似，分析其尾電流大小(Figure 6A.)可見僅轉染EGFP與無轉染的HEK293t細胞均無尾電流的產生，顯示EGFP用以作為轉染成功與否的篩選訊號，並不影響KCNQ4轉染於HEK293t細胞上表達的鉀離子通道電流。

PKC活化劑PMA對表達於HEK293t細胞上KCNQ4鉀離子電流之影響

過去已有文獻提出protein kinase C(PKC)可能參與由 $G_{q/11}$ -coupled receptor所引起的訊息路徑，並且與M1 receptor有關(Higashida and Brown. 1986; Hoshi et al. 2003)，且藉由活化PKC的路徑可以使得表達於爪蟾卵細胞上KCNQ4鉀離子通道電流二分之一活化電位與電流與電位依賴曲線趨向更正的去極化(depolarized)方向偏移(Koichi N. and Yoshihiro K. 2005)，因此我們以PKC活化劑PMA 1 uM前處理表達KCNQ4鉀離子通道之HEK293t細胞，作用10分鐘後以全細胞電位箝定技術記錄並分析尾電流(Figure 7. n=4)，結果顯示 1 uM PMA前處理10分鐘可以顯著的抑制電流大小但並未造成表達於HEK293t細胞上KCNQ4鉀離子電流二分之一活化膜電位的改變。

去磷酸化酶抑制劑Okadaic acid、Calyculin A與Cyclosporin A對表達於HEK293t細胞上KCNQ4鉀離子電流之影響

由於PKC活化劑PMA對表達於HEK293t細胞上KCNQ4鉀離子電流未產生明顯的影響，因此我們選擇以PP1/PP2A去磷酸化酶抑制劑Okadaic acid (OA)與 Calyculin A以及PP2B去磷酸化酶抑制劑Cyclosporin A進行前處理。

以 1 μ M Okadaic acid (Figure 8A.)、100 nM Calyculin A (Figure 8B.)與 1 μ M Cyclosporin A (Figure 8C.)進行前處理，並且於作用時間10分鐘後進行記錄分析其尾電流，結果顯示 Okadaic acid, Calyculin A與Cyclosporin A作用下並均會造成表達於HEK293t細胞上KCNQ4鉀離子電流產生顯著的抑制作用。

KCNQ4蛋白質C端磷酸化胺基酸位點預測與位置導向點突變結果

利用生物資訊學方式以 KinasePhos 和 etPhos/NetPhosk線上軟體預測KCNQ4鉀離子通道上可能的磷酸化胺基酸位點(Figure 9A.)，並藉由位置導向點突變技術(site directed point mutation)將可能的Ser/Thr位點突變為Aln。結果顯示S494A與EGFP以10:1方式進行轉染HEK293t細胞，以全細胞電位箝定技術進行記錄無鉀離子電流產生(Fig. 9B)，進一步以S494A/KCNQ4 Wt/EGFP (5:5:1)方式進行轉染則可記錄到KCNQ4鉀離子電流，但二分之一活化膜電位與離子通道電流與電位依賴性曲線與KCNQ4/EGFP(10:1)無明顯差異($P>0.05$)。A651del為無意突變(nonsense mutation)造成KCNQ4蛋白結構在第651個胺基酸至695個胺基酸共45個胺基酸的缺失，初步結果顯示A651del/EGFP(10:1)轉染HEK293t

以全細胞電位箝定技術可記錄到鉀離子通道電流，電流大小與二分之一活化膜電位與KCNQ4/EGFP(10:1)無明顯差異。

S494A 免疫螢光染色分析

由於表現S494A於HEK293t上與wild-type 相比較只測量到極小量的電流，因此我們進一步的使用免疫螢光染色分析的方法觀察S494A是否會表現於細胞膜上，結果顯示S494A並未正確表達於細胞膜上 (Fig.10)，推測S494可能是蛋白輸送過程所必須的。

KCNQ4蛋白質S4-S5端磷酸化胺基酸位點預測與位置導向點突變結果

T223A與EGFP以10:1方式進行轉染HEK293t細胞，以全細胞電位箝定技術進行記錄無鉀離子電流產生，發現T223A對於PMA活化劑所產生的二分之一活化電位與通道電流大小並無明顯差異 (Fig. 11)，證實S4-S5 segment的T223 對於PMA在KCNQ4的作用是必須的。

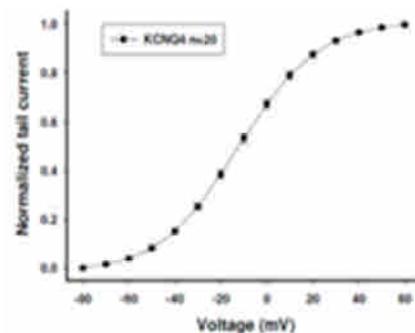
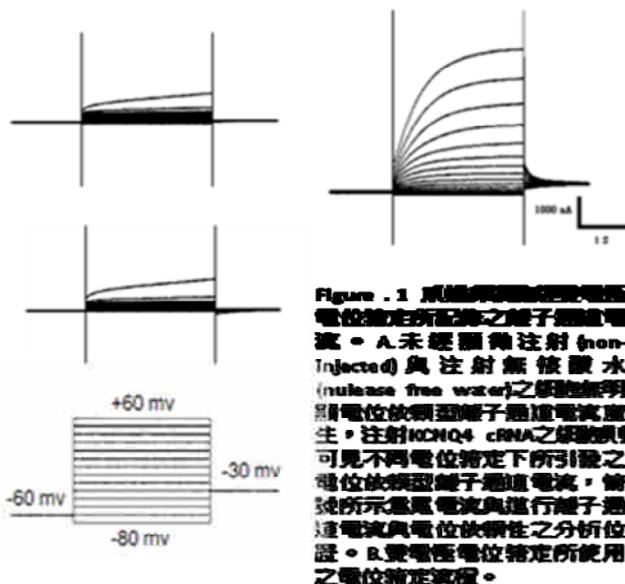


Figure 2. KCNQ4鉀離子通道表達於非洲爪哇卵細胞之電位功能性分析。非洲爪哇卵細胞經顯微注射KCNQ4 cRNA後，分析其尾電流所得之鉀離子通道電流與電位依賴性曲線圖。

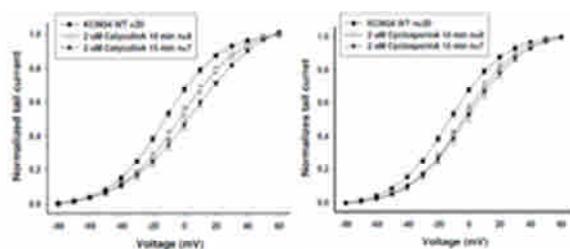


Figure 3. KCNQ4 鉀離子通道於原核細胞具異源表達並以夫明地化劑抑制處理之電流與電位依賴性曲線圖。A. 以 2 uM Calyculin A 前處理，作用 10 分鐘與 15 分鐘時所得電流與電位依賴性曲線圖。B. 以 2 uM Cyclosporin A 前處理，作用 10 分鐘與 15 分鐘時所得電流與電位依賴性曲線圖。

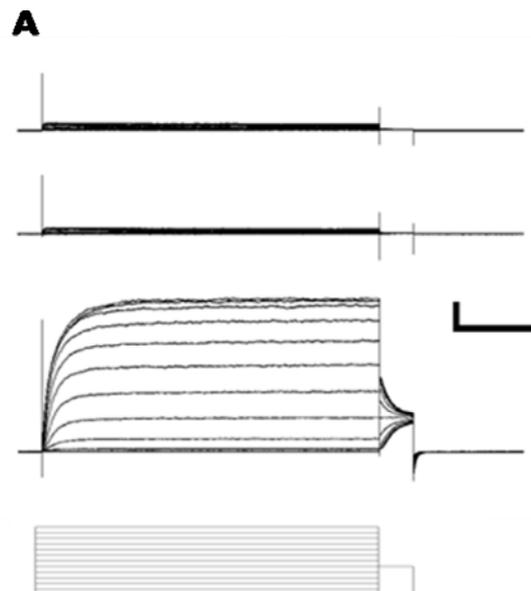


Figure 5. HEK293t 細胞經全細胞電位指定技術所記錄之離子通道電流。A. 未經轉染 (non-transfected) 與轉染螢光蛋白 (EGFP) 之細胞，無明顯電位依賴型離子通道電流產生，轉染 KCNQ4/EGFP 之細胞則可見不再電位指定下所引起之電位依賴型離子通道電流，箭號所示為進行離子通道電流與電位依賴性之分析位置。B. 全細胞電位指定技術所使用之電位指定流程。

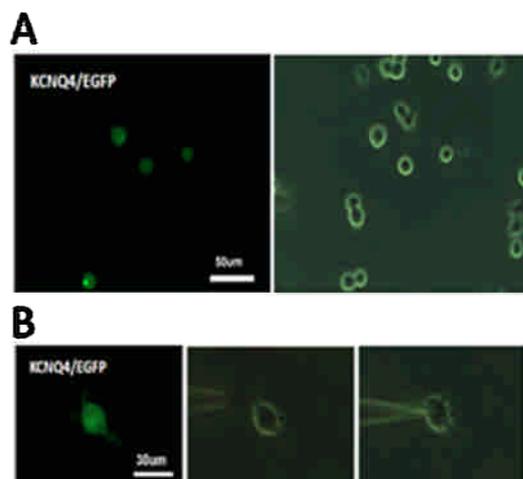


Figure 4. HEK293t 細胞經 Lipofectamin 2000 轉染 KCNQ4/EGFP。A. HEK293t 細胞株轉染 KCNQ4/EGFP 質體後，於螢光顯微鏡下可見表達 EGFP 螢光蛋白所產生之螢光訊號 (左圖)。以螢光訊號篩選後之細胞 (箭號標示) 於可見光下進行全細胞電位指定技術 (右圖)。B. 經螢光訊號篩選之 HEK293t 細胞 (左圖)，於可見光底下以玻璃電極 (箭號標示) 緩慢接近 (中圖)，至玻璃電極接觸 HEK293t 細胞膜表面 (右圖)。

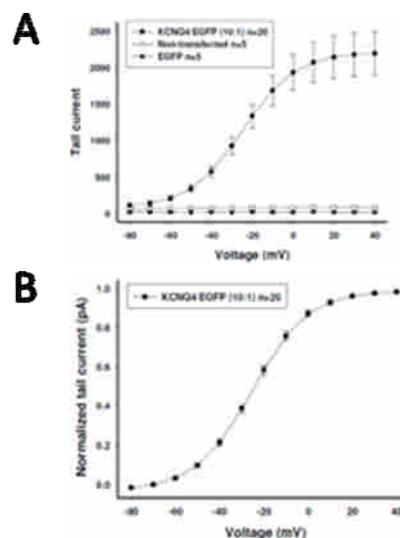


Figure 6. KCNQ4 鉀離子通道表達於 HEK293t 細胞株之電位功能性分析。A. 離子通道尾電流 (tail current) 與電位曲線圖，未經轉染與轉染 EGFP 螢光蛋白之 HEK293t 細胞無尾電流產生；轉染 KCNQ4/EGFP 之 HEK293t 細胞可見不再程度電位變化所引起之尾電流變化。B. KCNQ4 鉀離子通道表達於 HEK293t 細胞上之電流與電位依賴性曲線。

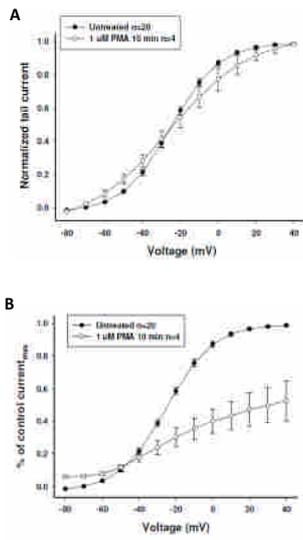


Figure 7. PKC活化劑PMA作用下對KCNQ4鉀離子通道之影響。A. 1 μ M PMA作用10分鐘下不使得KCNQ4鉀離子通道的電流與電位依賴性曲線產生明顯偏移現象。B. 然而使得KCNQ4鉀離子通道電流產生明顯抑制現象，抑制約50%的KCNQ4鉀離子電流大小。

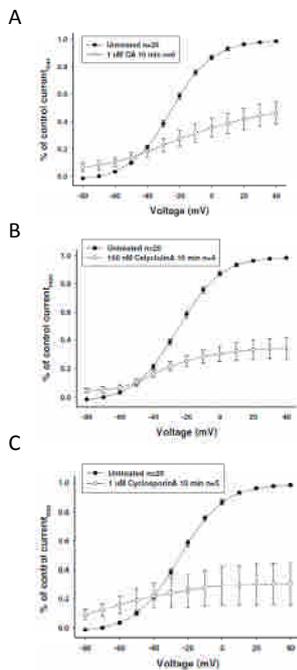


Figure 8. 去磷酸化酶抑制劑作用下對HEK293t細胞表達KCNQ4鉀離子通道電流影響。分別以A. 1 μ M Okadaic acid(OA) (10 min n=6) B. 100 nM Calyculin A (10 min n=4) C. 1 μ M Cyclosporin A (10 min n=5) 前處理，並於作用10分鐘後以全細胞電位箝定記錄其尾電流，以未處理(untreated)之尾電流大小作為正規化(normalized)之標準，所得之KCNQ4鉀離子通道電流大小均受到明顯抑制。

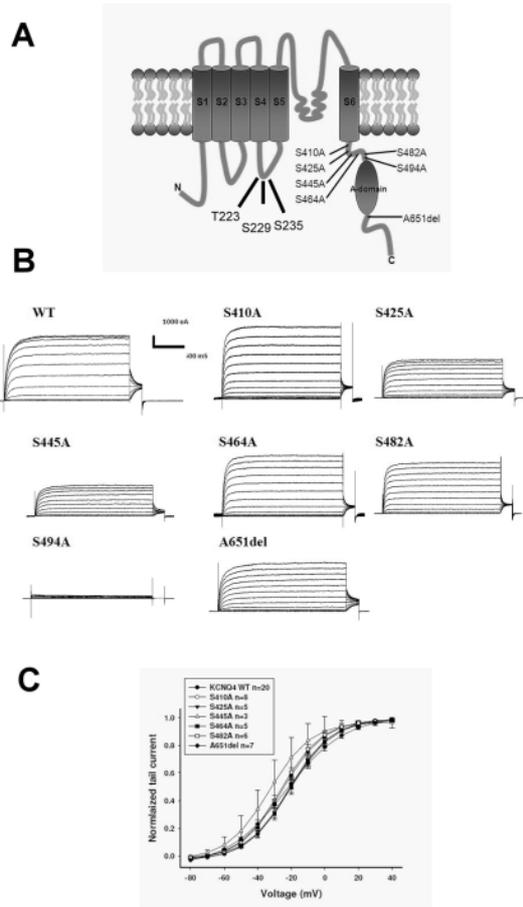


Figure 9. KCNQ4 C-端可能磷酸化位點突變的功能性分析。A. KCNQ4蛋白可能的磷酸化位點一級結構圖。B. KCNQ4 C-端突變 S410A, S425A, S445A, S464A, S482A, S494A 和 A651del 電流記錄圖。C. Voltage-dependent activation curve analysis.

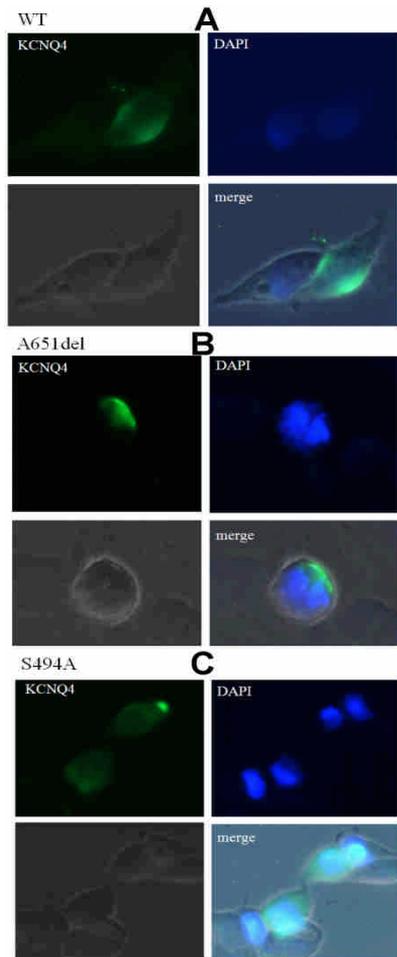


Figure.10. KCNQ4 WT, A651del 和 S494A表達於HEK293t之免疫螢光分析. A. KCNQ4 wild-type B. A651del C. S494A. KCNQ4 antibody: green; DAPI: blue.

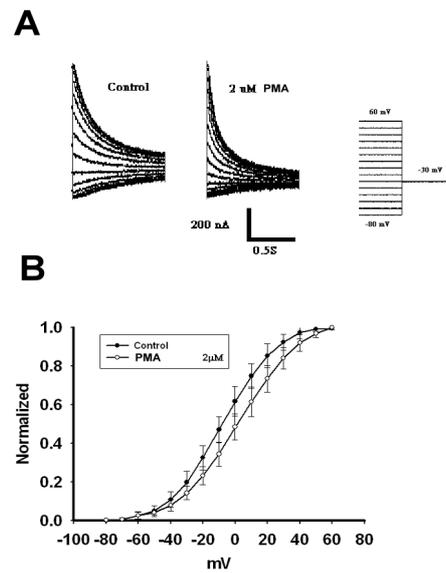


Figure. 11 KCNQ4 S4-S5序段可能磷酸化位點突變的功能性分析. A. KCNQ4蛋白S4-S5序段磷酸化位點突變 T223A 尾電流記錄圖 . B. Voltage-dependent activation tail-curve analysis.

討論(Discussion)

離子通道表達系統之差異

在離子通道表達的系統選擇上，常見的有HEK293 cell、CHO cell與*Xenopus laevis* oocytes，我們選擇使用Lipofectamin™ 2000轉染HEK293t細胞與顯微注射cRNA於非洲爪蟾卵細胞兩種表達系統，其基因背景(genetic background)有明顯的差異，由於我們所使用的爪蟾卵細胞為非受精卵細胞，因此擁有單套染色體，HEK293t細胞則為雙套染色體，爪蟾卵細胞與HEK293t細胞雖都來自脊椎動物，然而單就以物種而言爪蟾卵細胞來自兩棲類脊椎動物，HEK293t細胞則來自哺乳類脊椎動物，且以本實驗所使用為人類KCNQ4鉀離子通道，因此若以基因背景而言HEK293t細胞似乎最為恰當。

然而以研究M current受活化後M1 receptor的調控路徑，過去以研究KCNQ磷酸化調控機制的文獻(Koichi N. and Yoshihiro K. 2005)指出，KCNQ表達於HEK293t細胞中可能由於細胞本身的內生性磷酸化程度較高，使得M1 receptor調控路徑最終調控KCNQ離子通道電流的效果並不明顯，因此HEK293t細胞於KCNQ鉀離子通道相關磷酸化研究較為不易，而相對的爪蟾卵細胞內生性磷酸化程度較低反而較適合用以研究KCNQ磷酸化相關路徑。

S494A胺基酸點突變導致KCNQ4失去功能

S494A與EGFP以10:1方式進行轉染HEK293t細胞，以全細胞電位箝定技術進行記錄無鉀離子電流產生，進一步以S494A/KCNQ4 Wt/EGFP (5:5:1)方式進行轉染則可記錄到正常的KCNQ4鉀離子電流。由於多數的遺傳性

離子通道變異常會導致dominant negative effect的發生，於S494A/KCNQ4 Wt/EGFP (5:5:1)轉染HEK293t細胞實驗結果顯示所測得KCNQ4鉀離子通道電流大小約3000至6000 pA，與KCNQ4/EGFP(10:1)實驗中所測得電流大小無異，因此初步推論S494A單一胺基酸突變所導致的KCNQ4鉀離子通道失去功能並不俱dominant negative effect，然而導致KCNQ4鉀離子通道失能的原因仍需進一步以西方點墨法等細胞與細胞膜蛋白表面分析實驗進行探討。

S4-S5 segment T223A 胺基酸點突變導致KCNQ4失去對PMA(PKC活化劑)的敏感性

T223A與EGFP以10:1方式進行轉染HEK293t細胞，以全細胞電位箝定技術進行記錄無鉀離子電流產生，發現T223A對於PMA活化劑所產生的二分之一活化電位與通道電流大小並無明顯差異，證實S4-S5 segment的T223對於PMA在KCNQ4的作用是必須的。

參考文獻(References)

- Biververt C., Schroeder B. C., Kubisch C., Berkovic S. F., Porpping P., Jentsch T. J. and Steinlein O. K. **A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy.** *Science* 1998, 279: 403-406.
- Bosma M. M. and Hille B. **Protein kinase C is not necessary for peptide-induced suppression of M current or for desensitization of the peptide receptors.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86: 2943-2947.
- Brown D. A. and Adams P. R. **Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K⁺ current in a vertebrate neurone.** *Nature* 1980, 283: 673-676.
- Caulfield M. P., Jones S., Vallis Y., Buckley N. J., Kim G. D., Milligan G. and Brown D. A. **Muscarinic M-current inhibition via G_{αq/11} and α-adrenoceptor inhibition of Ca²⁺ current via G_{α0} in rat sympathetic neurons.** *J Physiol* 1994, 477:415-422.
- Coucke P.J., Van Hauwe P., Kelley P. M., Kunst H., Schatteman I., Van Velzen D., Meyers L., Ensink R. J., Verstreken M., Declau F., Marres H., Kastury K., Bhasin S., McGuirt W. T., Smith R. J., Cremers C. W., Van de Heyning P., Willwms P. J., Smith A. D. and Van Camp G. **Mutations in the KCNQ4 gene are responsible for autosomal dominant deafness in four DFNA2 families.** *Hum Mol Gene* 1999, 8: 1321-1328.
- Delmas P., Wanaverbecq N., Abogadie F. C., Mistry M. and Brown D. A. **Signaling microdomains define the specificity of receptor-mediated InsP(3) pathways in neurons.** *Neuron* 2002, 34: 209-220.
- Durga P. M. and James S. T. **The Kv2.1 C terminals can autonomously transfer Kv2.1 like phosphorylation-dependent location, voltage-dependent gating and muscarinic modulation to diverse Kv channels.** *The Journal of Neuroscience* 2006, 26: 685-695.
- Gamper N. and Shapiro M. S. **Calmodulin mediates Ca²⁺-dependent modulation of M-type K⁺ channels.** *J Gen Physiol* 2003, 122: 17-31.
- Gurdon J. B., Lane C. D., Woodland H. R. and Marbaix G. **Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cell.** *Nature* 1971, 233:177-182.
- Haley J. E., Abogadie F. C., Delmas P., Dayrell M., Vallis Y., Milligan G., Caulfield M. P., Brown D. A. and Buckley N. J. **The alpha subunit of Gq contributes to muscarinic inhibition of the M-type potassium current in sympathetic neurons.** *J Neurosci* 1998, 18:4521-4531.
- Higashida H. and Brown D. A. **Two polyphosphatidylinositide metabolites control two K⁺ currents in a neuronal cell.** *Nature* 1986,323: 333-335.
- Hua W., Thomas M. W., Tanya S. F., Mohammad S., Samae S. S. and Irwin B. L. **A Drosophila KCNQ channel essential for early embryonic development.** *The Journal of Neuroscience* 2005, 25: 10147-10156.
- Jonas, E. A. and Kaczmarek, L. K. **Regulation of potassium channels by protein kinase.** *Curr Opin Neurobiol* 1996, 6: 318-323.
- Jensen H. S., Callo K., Jespersen T., Jensen B. S. and Olesen S. P. **The KCNQ5 potassium channel from mouse: a broadly expressed M-current like potassium channel modulated by zinc, pH and volume changes.** *Brain Res Mol Brain Res* 2005, 139: 52-62.
- Kharkovets T., Hardelin J. P. Safieddine S., Schweizer M., El-Amraoui A., Petit C. and Jentsch T. J. **KCNQ4, a K⁺ channel mutated in a form of dominant deafness, is expressed in the inner ear and the central auditory pathway.** *Proc Natl Acad*

Sci USA 2000, 97: 4333-4338.

Koichi N. and Yoshihiro K. **Protein kinase C shift the voltage dependence of KCNQ/M channels expressed in *Xenopus* oocytes.** *J Physiol* 2005, 569.1:59-74.

Kubisch C., Schroeder B. C., Friedrich T., Lutjohann B. **KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness.** *Cell* 1999, 96:437-446.

Loussouarn G., Park K. H., Bellocq C., Baro I., Charpentier F. and Escande D. **Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP₂, controls KCNQ1/KCNE1 voltage-gated and inward rectifier K⁺ channels.** *EMBO J* 2003, 22: 5412-5421.

Marrion N. V. **M-current suppression by agonist and phorbol ester in bullfrog sympathetic neurons.** *Pflugers Arch* 1994, 426:296-303.

Marrion N.V. **Control of M-current.** *Annu Rev Physiol* 1997, 59:483-504.

Meves H., Schwarz J. R. and Wulfsen I. **Separation of M-like current and ERG current in NG108-15 cells.** *Br J Pharmacol* 1999, 127:1213-1223.

Pongs, O. **Voltage-gated potassium channels: from hyperexcitability to excitement.** *FEBS Lett* 1999, 452, 31-35.

Robbins, J. **KCNQ potassium channels: pathophysiology, and pharmacology.** *Pharmacol Ther* 2001, 90: 1-19.

Roche J. P., Westenbroek R., Sorom A. J., Hille B., Mackie K. and Shapiro M. S. **Antibodies and a cysteine-modifying reagent show correspondence of M current in neurons to KCNQ2 and KCNQ3 K⁺ channels.** *Br J Pharmacol* 2002, 137: 1173-1186.

Sanguinetti M. C., Curran M. E., Zou A., Shen J., Spector P. S., Atkinson D. L. and Keating M.T.

Coassembly of KvLQT1 and IsK (minK) proteins to form cardiac IKs potassium channel. *Nature* 1996,384: 80-83.

Schroeder B. C., Kubisch C., Stein V. and Jentsch T. J. **Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels cause epilepsy.** *Nature* 1998, 396: 687-690.

Schroeder B. C., Hechenberger M., Weinreich F., Kubisch C. and Jentsch T. J. **KCNQ5, a novel potassium channel broadly expressed in brain, mediates M-type currents.** *J Biol Chem* 2000, 275: 24089-24095.

Selyanko A. A., Hadley J. K., Wood I. C., Abogadie F. C., Delmas P., Buckley N. J., London B. and Brown D. A. **Two types of K1 channel subunit, Erg1 and KCNQ2/3, contribute to the M-like current in a mammalian neuronal cell.** *J Neurosci* 1999, 19:7742-7756.

Shapiro M.S., Roche J.P., Kaftan E. J., Cruzblanca H., Mackie K. and Hille B. **Reconstitution of muscarinic modulation of the KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels that underlie the neuronal M current.** *J Neurosci* 2000, 20: 1710-1721.

Suh B. C. and Hille B. **Recovery from muscarinic modulation of M current channels requires phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis.** *Neuron* 2002, 35: 507-520.

Villarreal A., Marrion N. V., Lopez H. and Adams P. R. **Bradykinin inhibits a potassium M-like current in rat pheochromocytoma PC12 cells.** *FEBS Lett* 1989, 255:42-46.

Wang Q., Curran M. E., Splawski I., Burn T. C., Millholland J. M., VanRaay T. J., Shen J., Timothy K. W., Vincent G.M., de Jager T., Schwartz P. J., Toubin J.A., Moss A. J., Atkinson D. L., Landes G. M., Connors T. D. and Keating M. T. **Positional cloning of a novel potassium channel gene:**

KvLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet* 1996, 12: 17-23.

Wang H. S., Pan Z., Shi W., Brown B. S., Wymore R. S., Cohen I. S., Dixon J. E. and McKinnon D. **KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel.** *Science* 1998, 282:1890-1893.

Wen H. and Levitan I. B. **Calmodulin is an auxiliary subunit of KCNQ2/3 potassium channels.** *J Neurosci* 2002, 22: 7991-8001.

Yang W. P., Levesque P. C., Little W. A., Conder M. L., Shalaby F. Y. and Blannar M. A. **KvLQT1, a voltage-gated potassium channel responsible for**

human cardiac arrhythmias. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94: 4017-4021.

Yus-Najera E., Santana-Castro I. and Villarroel A. **The identification and characterization of a noncontinuous calmodulin-binding site in noninactivating voltage-dependent KCNQ potassium channels.** *J Biol Chem* 2002, 277:28545-28553.

Zhang H., Crraciun L. C., Mirshahi T., Lopes C. M., Jin T. and Logothetis D. E. **PIP2 activates KCNQ channels, and its hydrolysis underlies receptor-mediated inhibition of M currents.** *Neuron* 2003,37: 963-975.

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

■ 達成目標

- 未達成目標（請說明，以 100 字為限）
- 實驗失敗
- 因故實驗中斷
- 其他原因

此研究內容與與原計畫完全相符並達成目標。此計畫主要是利用功能分析探討 KCNQ4 受 PMA (PKC activator) 作用可能的磷酸化位點。此計畫建構了 KCNQ4 mutants, S4-S5 序段的 T223A, S229A 和 S235A 與 C-端序列的 S410A, S425A, S445A, S464A, S482A, S494A, A651del 等來探討這個問題。前兩年完成了 KCNQ4 C-端的研究，後一年完成了 KCNQ4 S4-S5 序列的探討，發現 T223 為 PMA 發揮其作用所必須，因此 T223 位為 PMA 作用點，已完成此計畫的主要目標，此外我們也意外發現 S494A 無法表達出電流有可能是蛋白的 assembly 所必需。綜合而之此計畫已達成目標找到了 T223 為 PMA 功能性的重要位點並符合計畫的相關性。此計畫的研究成果有助於瞭解 KCNQ4 調控的機制及藥物作用的開發。

P.S. KCNQ4 plasmid (質體是由德國籍 Prof. Dr.Thomas J. Jentsch,現服務於德國 Max-Delbrück-Centrum for Molecular Medicine, Berlin,Germany)慷慨提供。

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文：已發表未發表之文稿 撰寫中 無

專利：已獲得 申請中 無

技轉：已技轉 洽談中 無

其他：(以 100 字為限)

已發表與投稿中的如下：功能性的必要位置 探討KCNQ4 T223 論文 已投稿，KCNQ 開啓劑的應用 (revised中)，磷酸化酶抑制劑對 KCNQ4的作用已接受，基因的調控論文已接受。
Tzu-Rong Su, Jing-Jer Chen, Ching-Chyuan, Su , **Min-Jon Lin***. The functional essential sites of KCNQ4 for the effect of phorbol 12-myristate 13-acetate . SUBMITTED 2011.

Tzu-Rong Su, Wen-Shan Zei, Ching-Chyuan, Su , George Hsiao, **Min-Jon Lin***. The effects of KCNQ openers, retigabine and flupirtine, on the myotonia of mammalian skeletal muscle induced by chloride channel blocker. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, revised 2011 (IF= 2.9)

Ren-Jun Hsu, Kuang-Ming Hsiao, **Min-Jon Lin**, Chui-Yen Li, Li-Chun Wang, Luen-Kui, Chen, Huichin Pan. Long Tract of Untranslated CAG Repeats is Deleterious in Transgenic Mice. PLoS ONE 6 (1), e16417: 1-10. (IF = 4.35)

Tzu-rong SU, Cay-huyen CHEN, Shih-jen HUANG, Chun-yi LEE, Mao-chang SU, Gwan-hong CHEN, Shuan-yow LI, Jiannjou YANG, **Min-jon LIN*** (2009) Functional study of the effect of phosphatase inhibitors on **KCNQ4** channels expressed in *Xenopus* oocytes. Acta Phamacologica sinica. 30: 1220-1226. (IF =1.9)

Kuang-Ming Hsiao, Ren-Yu Huang, Pei-Hua Tang, **Min-Jon Lin***. Functional study of CLC-1 mutants expressed in *Xenopus* oocytes reveals that a C-terminal region Thr891-Ser892-Thr893 is responsible for the effects of protein kinase C activator. Cellular Physiology and Biochemistry, 2010 25:687-694. (IF = 3.56)

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

我們的過去成果指出 KCNQ4 蛋白調控的受到鈣離子的影響(Su et al.,2006),而有關於蛋白質磷酸化酶抑制劑對於 KCNQ4 蛋白的調控也已發表(Su et al.,2008),也發現了的幾個突變點與 KCNQ4 受到磷酸化酶活化劑的作用有關。另外我們與其它實驗室合作的研究也揭開了在台灣遺傳性肌強直病其 CLCN1 蛋白突變 (CLCN1 與 KCNQ4 皆是同屬電位依賴型離子管道)影響其功能性的相關性 (Lin et al., 2006; Lin et al., 2008)。最近我們利用基因變異分析找到了此蛋白可能被蛋白質激酶作用的磷酸化位置(作用序列為 Thr890-Thr891-Ser892-Thr893) (Hsaio et al., 2010), 並且已被收錄在 <http://www.pkclab.org/>。使用基因轉殖鼠的實驗發現 DNA 上 CAG 重複序列與調控基因造成肌無力的相關性(Chen et al., 2007; Hsu et al., 2011)。我們在此計畫中探討 KCNQ4(Kv7.4) 蛋白分子的功能調控位得到了關鍵性的結果,在一系列的 KCNQ4 突變中發現 T223 對於 PMA 產生的作用具有關鍵性,在學術上具有創新性。由於 KCNQ4 會顯著表達在骨骼肌細胞膜上,因此除了中樞神經外也可應用於骨骼肌相關疾病治療進一步的發展例如肌強直症骨骼肌細胞內的蛋白激酶是否活性過高而影響了骨骼肌之功能。關於應用方面例如這 1-2 年來的文獻發現 KCNQ4 也顯著的表達在骨骼肌中,我們的持續研究也發現 KCNQ 的開啓劑可以對於 myotonia (肌強直)有顯著的緩解作用。