

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：63905

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19000

研究課題名(和文) 定説を覆す電位依存的制御メカニズムを有するNa⁺チャネルの光生理学的解析研究課題名(英文) Analysis of the unique voltage-dependent mechanism of a Na⁺ channel by voltage-clamp fluorometry

研究代表者

下村 拓史 (Shimomura, Takushi)

生理学研究所・分子細胞生理研究領域・助教

研究者番号：50635464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Xenopus tropicalis由来のTwo-pore Na⁺ channel 3 (XtTPC3) について、2つの電位センサードメインの果たす役割の違いについて電気生理学的手法を用いて解析を行った。XtTPC3においては2つの電位センサードメインのうち主にドメイン2がチャネル全体の電位依存性に寄与していることが解った。また、XtTPC3は長期の脱分極刺激によって電流量が増大するという特性を持つが、これがホスホイノシチドに依存していることを解明した。さらに、このホスホイノシチド依存性にはドメイン1のS4/S5リンカーおよびS6領域に存在する正電荷のクラスターが重要であることが解った。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the Two-pore Na⁺ channel 3 (XtTPC3) to reveal the different roles of two voltage sensor domains using the electrophysiological technique. We found that the domain-II contributes to the voltage-dependence more than domain-I in XtTPC3. In addition, the unique property of XtTPC3, in which long and high voltage stimulus gradually increases the current amplitudes of XtTPC3, was found to be dependent on a type of phosphoinositide. Furthermore, we revealed that the positively charged cluster in S4/S5 linker and helix S6 of domain-I is indispensable for the phosphoinositide dependence of XtTPC3.

研究分野：イオンチャネルの分子生理学

キーワード：イオンチャネル Na⁺チャネル Two-pore channel TPC Nav 膜電位依存性 光生理学

1. 研究開始当初の背景

Two-pore Na⁺ channel (TPC)は、膜電位依存性カチオンチャンネルファミリーに共通する基本単位を同一分子中に2つ持つという、特徴的な分子構造を有する。それゆえ、TPCはアミノ酸配列の異なる2つの電位センサードメイン(VSD)を持つ。同じファミリーに属する真核生物型の電位依存性Na⁺チャンネルは4リピート型であり、1リピート型の電位依存性K⁺チャンネルと比べて、Na⁺チャンネルは複数のVSDによる制御を受けるように進化してきたことが伺えるが、その意義は未だ明らかでない。

TPCの2リピート構造はNa⁺チャンネルのものより単純であり、複数のVSDによる制御メカニズムを探るのに最適であると考えられた。また、*Xenopus tropicalis* TPCファミリー3(XtTPC3)を用いた予備的な変異実験で、VSD-IIへの変異導入がVSDのみならずPDにも影響を与えるが、VSD-Iの相同な位置への変異は影響がないことを示唆する結果が得られており、TPCの2つのVSDの機能的役割の違いを明確にすることは重要であると考えられた。

2. 研究の目的

TPCの2つのVSDの役割を明らかにする。それぞれのVSDがチャンネル全体の制御において異なる役割を持つかどうか、また、持つのであればどのような機能的側面をそれぞれが制御しているのかをアミノ酸レベルの構造変化モデルとして記述することを目指した。また、研究の途上でXtTPC3がホスホイノシチド感受性を持つことが解ったため、この点についても研究を展開した。

3. 研究の方法

XtTPC3を主要な研究対象とし、ツメガエル卵母細胞を発現系として2電極膜電位固定法により電流を測定した。これと変異体の解析を組み合わせ、どのアミノ酸残基が機能に重要であるかを明らかにすることを狙った。さらに、2つのVSDを区別するために、膜電位固定化学蛍光測定法(Voltage-clamp fluorometry; VCF)を用いた。本手法は、蛍光により特定のアミノ酸残基をラベルし、そのラベル近傍の局所の構造変化を蛍光強度変化として検出できる。ラベルをVSD-IあるいはVSD-IIに導入することで1つのVSDのみの動的構造変化を検出し、通常の電流を基にした解析では混在してしまう、性質の異なる2つのVSDの特性を区別して解析すること

を目指した。

4. 研究成果

(1) 2つのVSDのチャンネル全体の電位感受性への寄与の程度は異なる

ほぼすべての電位感受性カチオンチャンネルにおいて、S4ヘリックスには3残基ごとに正の荷電残基が現れるという特徴があり、これが電位センサーの実体であるとされる。TPC3の2つの4番目のヘリックス(S4)においてもこの特徴は見られ、異なるオルソログ間で比較するとそれぞれ3つのアルギニン残基が保存されていることがわかる(図1左)。これらのアルギニン残基がチャンネル全体の電位依存性にどの程度貢献しているかを調べるため、各アルギニン残基をグルタミンに変異させて中性化し、その影響を解析した。ドメイン-Iへの変異導入を行うと2つの変異体で電流を生じたが、そのいずれにおいても電位依存性にほとんど影響が見られなかった。一方で、ドメイン-IIへの変異導入の場合は顕著な電位依存性のシフトが見られた(図1右)。すなわち、XtTPC3においてはドメイン-IIがチャンネル全体の電位依存性により大きな貢献をしているものと考えられる。

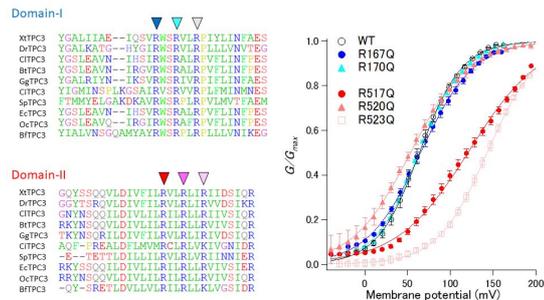


図1. 各VSDの電位依存性への寄与の違い

(2) VCFによるVSD-IIの電位依存的構造変化の検出

上記の結果から、VSD-IIがよりチャンネル全体の膜電位依存性に重要であることが解ったので、まずVSD-IIの電位依存的な構造変化をVCFで確認することを目指した。VSD-IIのS4ヘリックスの細胞外側に位置すると想定される残基をシステインに置換した変異体を作製し、Alexa Fluor 488 maleimideによってラベルし、電位依存的な蛍光強度変化の有無を確認した(図2上)。その結果、複数の変異体で膜電位依存的に蛍光強度の変化が観察された(図2下)。VSD-IのS4ヘリックスでも同様の実験を行ったが、現在までに蛍光強度の変化を示す変異体は確認され

ていない。この結果は、VSD-I が電位依存的に構造変化している可能性を完全には排除するものではないものの、VSD-II が電位依存性に主たる役割を果たすことを支持する結果と考えている。VSD-I におけるシステイン変異体のより詳細かつ網羅的な解析により、VSD-I の電位依存的構造変化の有無を明確化させることは重要であり、今後の課題である。

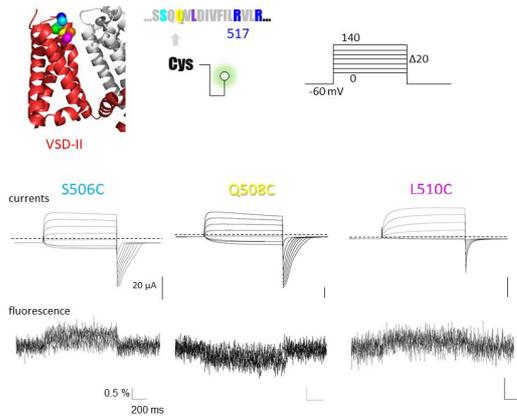


図 2. VSD-II 由来の蛍光強度変化

(3) induction は電位依存性の変化による

VSD-I が電位依存性にそれほど寄与していないという結果から、このドメインが別の役割を担っていることが想定された。XtTPC3 は数十秒程度の長い脱分極刺激を与えると電流量が緩やかに増大する、“induction”と呼ばれる特性を持つ(図 3A)。これは VSD-II の担う電位依存的活性化とは異なる時間スケールの現象であり、VSD-I がこの induction を実現する責任領域であることが想定された。まず、induction が生じるメカニズムを解析し、長期脱分極刺激前後における XtTPC3 の活性を比較したところ、 $V_{1/2}$ (半量活性化電位) が 60 mV 程度も負電位側にシフトし、チャンネルが開きやすくなっていた(図 3B, C)。

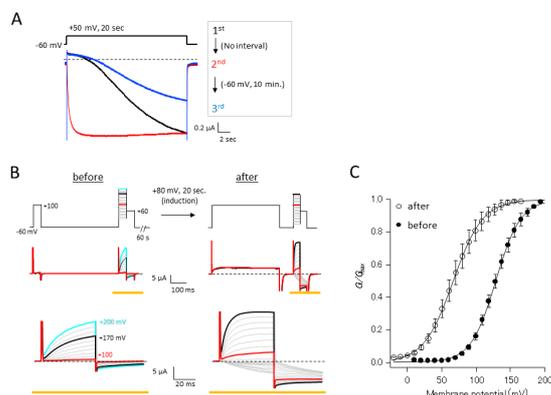


図 3. induction の概要

すなわち、長時間の脱分極刺激を維持していると電位依存性の変化が生じ、チャンネルの開口確率が上昇するために電流量が増大するということが解った。

(4) induction のホスホイノシチド依存性

上記の結果からは、長期脱分極刺激により誘導される何らかの因子が XtTPC3 の電位依存性を制御している可能性が考えられる。TPC1 および TPC2 はフォスファチジルイノシトール 3,5-ビスリン酸 ($PI(3,5)P_2$) により電流量が増大することが知られているが、TPC3 はこうしたホスホイノシチド種による制御は受けないとされていた。この点を再検証するため、*Ciona intestinalis* 由来の膜電位依存性ホスファターゼ (Ci-VSP) を用いた。Ci-VSP は膜電位依存的に膜上のホスホイノシチド構成を変化させる(図 4A)。XtTPC3 とともに Ci-VSP を共発現させ、induction 刺激を与えたところ、Ci-VSP がいない状態と比べて極めて速く活性化し、続いて速やかに減弱するというように、induction のカインेटクスが劇的に変化した(図 4B)。詳細な解析の結果、この電流量の増減は、活性化速度の加速とそれに続いて起こる減速によることが解った(図 4C, D)。Ci-VSP は膜電位依存的に産生するホスホイノシチド種を変化させることが知られており、強い脱分極刺激下ではフォスファチジルイノシトール 3,4,5-トリスリン酸 (PIP_3) からフォスファチジルイノシトールビスリン酸 (PIP_2) を経て最終的にフォスファチジルイノシトール 4-リン酸 (PI) を生じる。このことから、XtTPC3 は PIP_2 により活性化されること、それゆえ、持続的な膜電位刺激により一過的に PIP_2 濃度が増加することが一過的な XtTPC3 の活性化速度の上昇として現れると考えた。この仮説を基に、 PIP_3 から PIP_2 の産生は起こるが、PI への遷移は阻害される変異体 Ci-VSP (F161W/R232K) と XtTPC3 を共発現させて同様の実験を行ったところ、活性化速度の加速は起こったが減速は見られなかった。以上のことから、XtTPC3 は PIP_2 によってその電位依存性が制御されることが強く示唆された。前述のように TPC3 はホスホイノシチド依存性は持たないとされており、本研究の結果、TPCファミリーの 3 種すべてが PI 感受性を持つことが明らかになった。

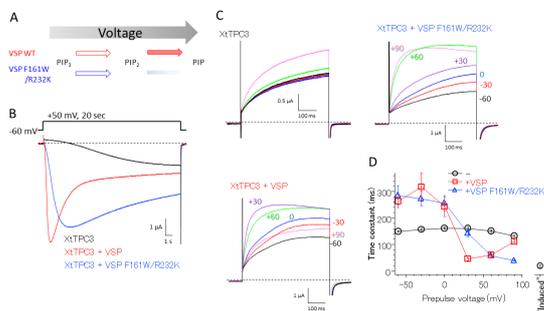


図4. Ci-VSP 共発現の影響の解析

(5) ホスホイノシチド依存性の決定残基

ホスホイノシチドは一般的にアルギニンやリジンなどの正電荷のクラスター領域に結合するとされる。TPC3 のオルソログ間で比較したところ、ドメイン I の S4/S5 リンカーおよび S6 ヘリックスにおいて保存された正電荷クラスターが存在することが解った (図 5A)。この領域の正電荷をそれぞれ中性化した変異体を解析したところ、induction が起こらなくなる変異体を複数見出した (図 5B, C) さらに、それらのうちの 1 つである R187Q 変異体と Ci-VSP を共発現したところ、野生型 XtTPC3 で見られたようなホスホイノシチドに依存した活性化速度の変化が消失した。この結果より、Arg187 を含むドメイン-I の S4/S5 リンカーおよび S6 領域は PIP₂ の結合領域であり、この結合が induction に必須であることが強く示唆された。

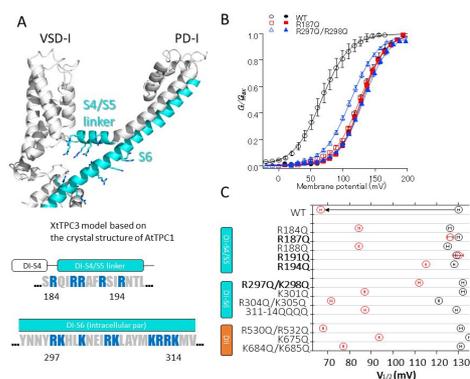


図5. induction を起こさない変異体の探索

以上の結果からは、XtTPC3 の 2 つの VSD が“分業”してチャンネル全体の電位依存性を制御していることが伺える。すなわち、VSD-II は主たる電位センサーとして膜電位変化を感知し、ポア領域の活性化ゲートの開口を促す。一方、VSD-I はそれほど電位感受性には寄与しないが、S4/S5 リンカーと S6 領域が PIP₂ 結合サイトを構成しており、PIP₂ の結合により活性化ゲート付近の構造変化が

起こり、より低い電位であっても活性化ゲートを開きやすくするものと考えられる。ツメガエル卵母細胞には長時間の脱分極刺激により膜上の PIP₂ 濃度を上昇させるシステムが内在的に存在することが知られており、これが長時間の脱分極依存的な XtTPC3 の電流増大として観察されるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 5 件)

(1) Shimomura T, Kubo Y.
Modulation of the voltage dependence by phosphoinositides in Two-Pore Na⁺ Channel 3 (TPC3)
第 95 回日本生理学会大会
2018 年 3 月 28 日
サンポートホール高松 (香川県高松市)

(2) 下村拓史、久保義弘
Two-pore Na⁺ channel 3 の特徴的な電位依存性制御メカニズムについての解析
第 7 回 新潟脳研 霊長研 生理研合同シンポジウム
2018 年 3 月 6 日
生理学研究所 (愛知県岡崎市)

(3) 下村拓史、久保義弘
Characterization of the unique function and structure of voltage sensor domain-II of Two-pore Na⁺ channel 3 (TPC3)
第 94 回日本生理学会大会
2017 年 3 月 28 日
アクトシティ浜松 (静岡県浜松市)

(4) 下村拓史、久保義弘
Two-pore Na⁺ channel 3 (TPC3) の電位依存的活性化メカニズム
生理学研究所プロジェクト「細胞・システム作動機構の理解に向けた、生体タンパク質分子の構造と機能のダイナミクス研究の拠点形成」平成 28 年度末シンポジウム
2017 年 3 月 13 日
生理学研究所 (愛知県岡崎市)

(5) 下村拓史、久保義弘
Two-pore Na⁺ channel 3 (TPC3) の 2 つの S4

ヘリックス上の正電荷は、電位依存性に異なる貢献をする

第 63 回中部日本生理学会

2016 年 11 月 4 日

自然科学研究機構 岡崎コンファレンスセンター（愛知県岡崎市）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

下村 拓史 (Shimomura, Takushi)

生理学研究所・分子細胞生理研究領域・助教

研究者番号：50635464