

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15567

研究課題名(和文) hERGチャネルの遅い脱活性化を制御する細胞内ドメイン間相互作用の解析

研究課題名(英文) The analyses of the interaction between the intracellular domains to control the slow deactivation of hERG channel

研究代表者

糸 慎一郎 (Kume, Shinichiro)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：90794579

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：電位作動性カリウムチャネルであるhERGチャネルのC末端細胞内領域には、異なるドメイン間で形成される静電相互作用が存在し、これを打ち消す変異の導入は、その特徴的な遅い脱活性化を著しく加速させる。本研究では、この構造機能連関を解明すべく解析を行い、この静電相互作用が、4量体の各サブユニット内で形成されること、また、遅い脱活性化の維持には全サブユニットで形成される必要があることを見出した。さらに、この静電相互作用の消失は、脱活性化の制御機構において中心的な役割をもつN末端-C末端ドメイン間相互作用を有意に減弱させることを突き止め、これが脱活性化の加速の原因であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

hERGチャネルは心筋の活動電位の調節に関与し、ヒト心臓の正常な生理機能において極めて重要な役割を担う。例えば、突然変異等により、その特徴的な遅い脱活性化に異常が生じると、致死性不整脈のリスクを伴うQT延長症候群のような疾患の原因となり得ることが知られている。したがって、本研究の成果として得られたhERGチャネルの遅い脱活性化に関する構造機能連関の新しい知見は、イオンチャネル研究の発展に役立つだけでなく、このようなヒト心臓の疾患に対する予防や治療への貢献も期待できる。

研究成果の概要(英文)：The hERG channel belonging to the voltage-gated potassium channel family has electrostatic interaction sites in the C-terminal cytoplasmic domains. When these electrostatic interaction sites of the hERG channel were disrupted by the mutagenesis, the slow deactivation characteristic were accelerated significantly. In this study, we analyzed these properties of electrostatic interactions to reveal its structure-function relationships. We found that these electrostatic interactions were within the intra-subunit, and that forming them in all subunits was necessary for the slow deactivation. Furthermore, we revealed that the disruption of the electrostatic interactions declined the interaction between the N-terminal- and the C-terminal-cytoplasmic domains, which plays the main role for the mechanisms of the deactivation, leading to an acceleration of the deactivation.

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 hERGチャネル 構造機能連関 分子生物学 電気生理学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

電位作動性カリウムチャンネル(Kv)ファミリーに属する human Ether-a-go-go Related Gene (hERG) チャンネルは、他の Kv と比較して、開状態から閉状態への遷移(脱活性化)が極めて遅いという特徴をもち、細胞内ドメインがその制御において重要な役割を担っている。このうち C 末端細胞内領域には、環状ヌクレオチド(CN)結合ドメインに相対的なドメイン(CNBHD)が存在し、C リンカードメイン(CLD)を介して活性化ゲートに繋がっている(図 1A)。hERG チャンネルの CNBHD は、他の Kv の CN 結合ドメインのような CN への感受性を欠き、代わりに、脱活性化を加速させる変異が多く報告されている。そのため、CNBHD は独自のメカニズムにより遅い脱活性化の制御に関与していると考えられるが、その詳細は未だ解明されていない。また、脱活性化の制御における CLD の関与については、これまでほとんど言及されてこなかった。

申請者のこれまでの研究からは、hERG チャンネルの CLD と CNBHD の間で独自に形成される 2 対の静電相互作用(正電荷アミノ酸と負電荷アミノ酸の間で形成される静電的な相互作用: 1 つ目は CLD のアスパラギン酸(Asp)727 と CNBHD のアルギニン(Arg)752、2 つ目は CLD の Arg696 と CNBHD の Asp767)の存在が示唆されていた。さらに、一方の電荷を逆転させる変異を導入し、これらの静電相互作用を打ち消した場合、脱活性化が顕著に加速すること、また、双方の電荷を逆転させ、再び静電相互作用が形成できる組み合わせにした際、脱活性化の速度が野生型(WT)と同程度まで回復することを見出してきた(図 1B、Asp727 と Arg752 の場合のみ記載)。この結果は、これらの CLD-CNBHD 間静電相互作用が遅い脱活性化の制御に関与しており、また、CLD が関与する hERG チャンネル独自の制御機構の存在を示唆する。そのため、これらの静電相互作用の消失による脱活性化の加速の原因を明らかにすることで、hERG チャンネルの構造機能連関に関する新しい知見が得られると考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、hERG チャンネルの CLD-CNBHD 間で形成される 2 対の静電相互作用に焦点を当て、その特徴的な遅い脱活性化の制御における役割を明らかにすることである。したがって、4 量体形成時の位置関係やサブユニット間での協調性、また、ゲーティングに伴う構造変化など、これらの静電相互作用の構造的特徴を理解し、脱活性化の制御に関する構造機能連関を明確にする必要がある。

本研究では、これら 2 対の CLD-CNBHD 間静電相互作用について、4 量体形成時にサブユニット間または内のどちらで形成されるか、正常な機能の発現には 4 量体の全サブユニットで形成される必要があるか、また、チャンネルの開・閉状態に依存した構造変化に関与するかを解析することで、目的の遂行を目指した。

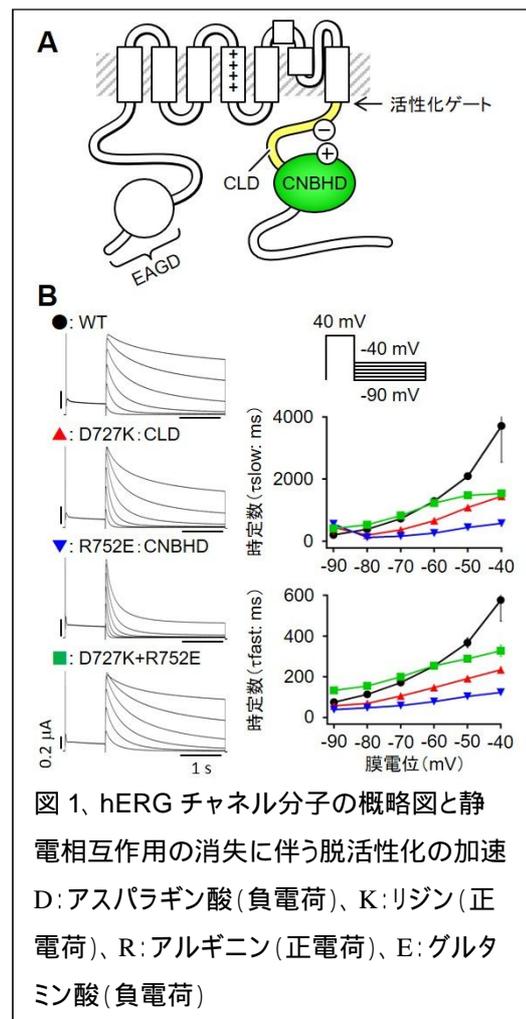


図 1、hERG チャンネル分子の概略図と静電相互作用の消失に伴う脱活性化の加速
D: アスパラギン酸(負電荷)、K: リジン(正電荷)、R: アルギニン(正電荷)、E: グルタミン酸(負電荷)

3. 研究の方法

本研究では、主に2種類の解析方法を使用した。

(1) アフリカツメガエルの卵母細胞を用いた二電極膜電位固定法

この方法では、合成したhERGチャンネルのmRNAをアフリカツメガエルの卵母細胞に微量注入し、細胞膜上に発現させた後、2本のガラス電極を用いて卵母細胞の膜電位を操作・記録することにより、hERGチャンネル由来の電流を測定することができる。本研究では、hERGチャンネルのWTと各変異体に対してこの手法を用い、変異の導入による表現型の違いを、電流の変化として電気生理学的に測定・解析した。

(2) 培養細胞を用いた Förster Resonance Energy Transfer (FRET) 解析

本研究では、蛍光タンパク質である Cyan fluorescence protein (CFP: ドナー) と Yellow fluorescence protein (YFP: アクセプター) を用いた実験を行った。この方法では、ドナーに対する励起光を照射した際、ドナーとアクセプターがごく近傍に位置する場合、ドナーからアクセプターへのエネルギーの移動 (FRET) が起こり、ドナーの蛍光強度の減少とアクセプターの蛍光強度の増加が観察される。この FRET の効率は、ドナーとアクセプターの距離等に依存するため、FRET 効率を測定することにより CFP と YFP の空間配置を間接的に測定することができる。本研究では、hERG チャンネルの N 末端細胞内ドメイン (EAGD) の下流に CFP を、CNBHD の下流に YFP を融合させ (図 4A)、培養細胞に発現させた際の FRET 効率を測定することで、静電相互作用の有無による EAGD と CNBHD の位置関係の変化を解析した。

4. 研究成果

(1) 2 対の静電相互作用は、いずれも同一サブユニット内で形成される。

hERG チャンネルの細胞内ドメインは、膜貫通領域と同様に 4 量体を形成して機能することが予想されている。そのため、「研究の目的」の に関して、2 対の CLD-CNBHD 間静電相互作用が別のサブユニット間で形成されているのか、または同一サブユニット内で形成されているのかを検証した。

この解析では、電荷の逆転により静電相互作用を打ち消す変異を導入する際に、その組み合わせを変えた 2 パターンのタンデムコンストラクトを作製し、解析に使用した (図 2A)。もし、静電相互作用がサブユニット間で形成される場合、一方のタンデムコンストラクト (A---B) では野生型と回復後を合わせて 4 つの静電相互作用が形成されるが、もう一方 (A&B---WT) では全ての静電相互作用が打ち消される。反対に、静電相互作用がサブユニット内で形成される場合、A---B では全ての静電相互作用が打ち消されるが、A&B---WT では野生型・回復後の計 4 つの静電相互作用が形成される。いずれの場合も、4 つの静電相互作用が形成された際は WT---WT と似た表現型を示し、全てが打ち消された際は脱活性化の加速が観察されると予想できる。

解析の結果、2 対の静電相互作用はいずれ

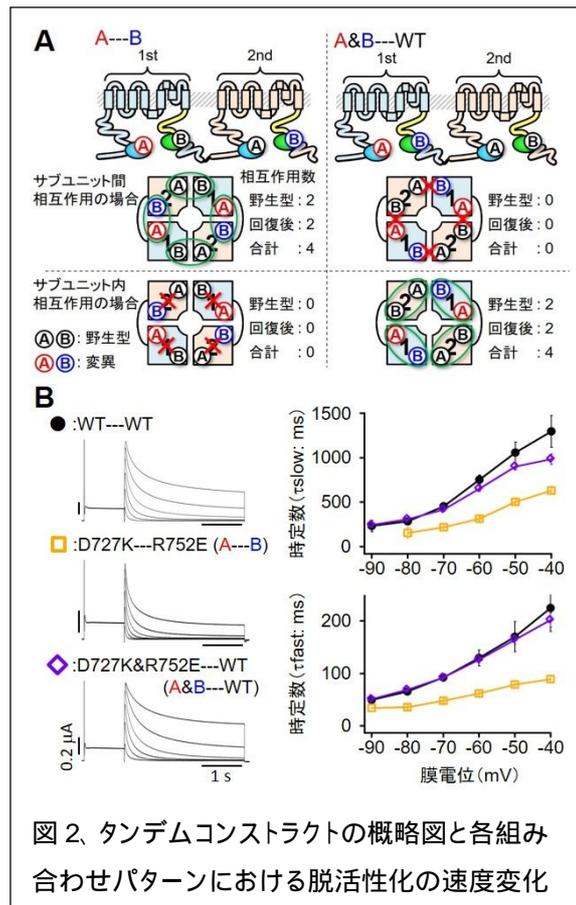


図 2. タンデムコンストラクトの概略図と各組み合わせパターンにおける脱活性化の速度変化

も、A---B のパターンで脱活性化が加速し、A&B---WT のパターンで WT---WT と似た表現型を示した (図 2B)。このことから、CLD と CNBH D 間で形成される 2 対の静電相互作用は、いずれも同一のサブユニット内で形成されることが分かった。

他の K_v においては、CN 結合ドメインが別のサブユニットの CLD と相互作用し、4 量体の各サブユニット間で協調して機能していることが報告されている。しかし今回の結果は、hERG チャンネルの CLD と CNBH D が他の K_v のようなサブユニット間の相互作用による協調的な制御機構をもたず、各サブユニットが独立して機能するという独自の制御機構を有している可能性を示唆する。

(2) 正常な機能の発現には、静電相互作用が 4 量体の全サブユニットで形成される必要がある。

次に、「研究の目的」の に関して、上述のタンデムコンストラクトを用いた実験を応用し、導入する変異の組み合わせを変えることにより、形成される静電相互作用の個数を 4、2、0 個とした際の脱活性化への影響を検証した。

解析の結果、脱活性化の速度は形成される各静電相互作用の個数に依存して変化し、正常な機能を発現するためには、4 つのサブユニット全てに 2 対の静電相互作用が形成される必要があることが分かった (図 3、Asp727 と Arg752 の場合のみ記載)。この結果は、hERG チャンネルの CLD と CNBH D がサブユニット毎に独立して脱活性化の制御に関与するという上述の考察を裏付ける。

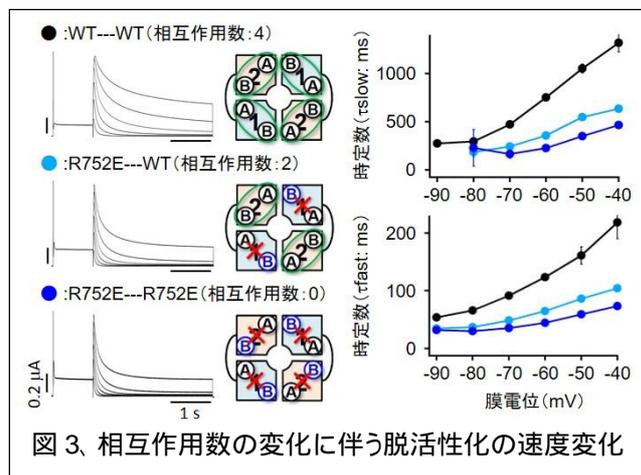


図 3、相互作用数の変化に伴う脱活性化の速度変化

(3) CLD-CNBH D 間静電相互作用の消失による脱活性化の加速は、N 末端-C 末端細胞内ドメイン間の相互作用の減弱に起因する。

「研究の目的」にて上述した に関して、申請時の計画では、CLD と CNBH D との間で生じる、チャンネルの開・閉状態に依存した構造変化の有無を検証するため、CLD-CNBH D 間システイン架橋形成実験を予定していたが、十分な成果を得ることができなかった。そのため、本研究は、CLD-CNBH D 間静電相互作用の消失により生じる hERG チャンネルの構造変化の解析に移行することにした。

hERG チャンネルの N 末端細胞内領域に存在する EAGD は、CNBH D と相互作用することが知られている。また、この EAGD-CNBH D 間相互作用は、その消失により脱活性化が著しく加速することから、遅い脱活性化の制御機構において中心的な役割を担うことが報告されている。そこで、CLD-CNBH D 間静電相互作用の消失が、この EAGD-CNBH D 間相互作用の消失に繋がるとして脱活性化の加速が生じるという仮説を立て、その検証のために EAGD-CNBH D 間の FRET 解析を試みた。

本研究では、「研究の方法」の (2) にて上述したように、hERG チャンネルの EAGD の下流に CFP を、CNBH D の下流に YFP を

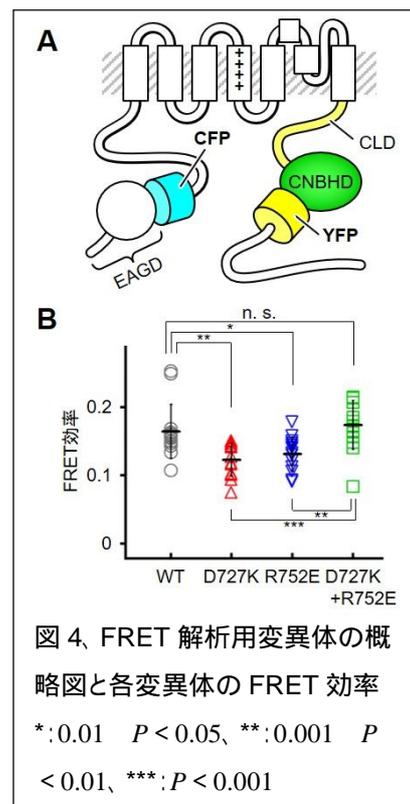


図 4、FRET 解析用変異体の概略図と各変異体の FRET 効率

*: 0.01 $P < 0.05$, **: 0.001 $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$

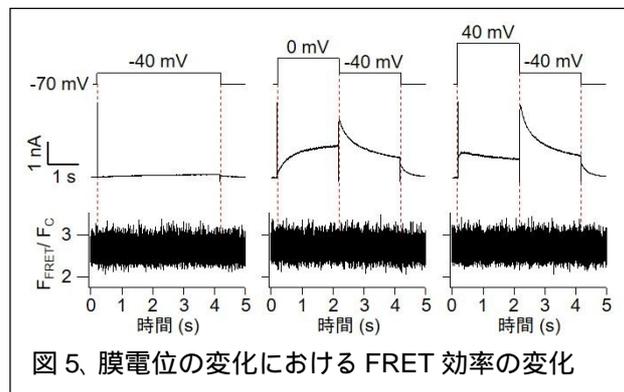
融合した変異体を用意した(図 4A)。この FRET 解析用の変異体に対し、CLD-CNBHD 間静電相互作用を打ち消す変異を導入した際、もし FRET 効率に影響があった場合は、EAGD-CNBHD 間相互作用の位置関係に変化が生じたことを意味する。なお、本研究では、CLD-CNBHD 間で形成される 2 対の静電相互作用のうち、CLD の Asp727 と CNBHD の Arg752 の間で形成される静電相互作用についてのみ解析を行った。

解析の結果、変異の導入により CLD-CNBHD 間(Asp727-Arg752 間)静電相互作用を打ち消した際、WT と比較して、FRET 効率が有意に減少することを見出した(図 4B)。これは、変異の導入により EAGD と CNBHD の距離が遠くなったことを意味する。したがって、この結果は、CLD-CNBHD 間(Asp727-Arg752 間)静電相互作用の消失が、EAGD-CNBHD 間相互作用の減弱を伴う hERG チャンネルの構造変化を引き起こし、それにより脱活性化が加速するという仮説を支持すると考えられる。

(4)EAGD-CNBHD 間相互作用は、膜電位依存的な構造変化を示さない。

これまで、hERG チャンネルの EAGD-CNBHD 間相互作用に関しては、膜電位の変化による開・閉状態の遷移に伴う構造変化の報告はなく、その詳細は不明であった。上述の FRET 解析用の変異体は、この開・閉状態依存的な EAGD-CNBHD 間相互作用の構造変化の解析に応用できることから、本研究ではその検証を行った。

ここでは、パッチクランプ法により膜電位を変化させ、その際の FRET 効率の変化を測定・解析した。解析の結果、hERG チャンネルの EAGD-CNBHD 間相互作用は、膜電位に依存した明確な構造変化を示さないことが明らかになった(図 5)。また、溶液組成の切り替えにより膜電位を変化させた際も、同様の結果を得ることができた。



(5)総括

本研究計画を通じて得られた結果は、CLD-CNBHD 間に存在する 2 対の静電相互作用が、N 末端細胞内ドメインと C 末端細胞内ドメインとの間で形成される EAGD-CNBHD 間相互作用の安定化のために重要であることを明らかにした。また、これらの細胞内ドメイン間で形成される相互作用のネットワークが、膜電位に依存して構造変化しない可能性も示した。このことから、これらの細胞内ドメインは、膜電位依存的に構造を変化させる電位センサードメインやポアドメインなどのために強固な「足場」を提供し、CLD-CNBHD 間静電相互作用は、この「足場」の安定化に寄与することで、hERG チャンネルの遅い脱活性化の制御機構において重要な役割をもつことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shinichiro Kume, Takushi Shimomura, Michihiro Tateyama, Yoshihiro Kubo	4. 巻 596
2. 論文標題 Two mutations at different positions in the CNBH domain of the hERG channel accelerate deactivation and impair the interaction with the EAG domain	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 4629-4650
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 桑 慎一郎、久保 義弘
2. 発表標題 hERG チャネルの環状ヌクレオチド結合相同ドメインに存在する Phe860 の役割の解析
3. 学会等名 第28回日本病態生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shinichiro Kume, Yoshihiro Kubo
2. 発表標題 FRET Analyses of the Mechanisms of Accelerated Deactivation by Phe860 Mutations in hERG Channel
3. 学会等名 第65回日本不整脈心電学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 桑 慎一郎
2. 発表標題 FRET analyses of the effect of Phe860Glu mutation on the interaction between the N- and C- terminal cytoplasmic domains in hERG channel
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----