

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06337

研究課題名(和文) ペプチド作動性チャネルの細胞外ドメインに存在する活性化を規定する構造の解析

研究課題名(英文) A study on the functional structures in the extracellular domain of a peptide-gated Na<sup>+</sup> channel

研究代表者

古川 康雄 (Furukawa, Yasuo)

広島大学・統合生命科学研究科(総)・教授

研究者番号：40209169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ペプチド作動性チャネルであるFMRFamide作動性Na<sup>+</sup>チャネル(FaNaC)の細胞外ドメイン構造とチャネルの活性化に焦点をあてた研究を展開した。FaNaCの細胞外ドメインには、構造の維持に関わる7対のSS結合が存在する。それらを個別に破壊した変異体を解析した結果、サム領域の維持がFaNaCのFMRFamide応答性に必須であることが明らかにされた。さらに、サム領域近傍のフィンガー領域に存在する芳香族アミノ酸の点変異体解析とFaNaC構造モデルを用いたドッキングシミュレーションにより、FMRFamide応答性に関わる部位の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、軟体動物で発見されたペプチド作動性チャネル(FaNaC)の細胞外ドメイン構造の働きに焦点をあて、これまで未解明であったFaNaCの活性化に必要な細胞外ドメイン構造の一端を明らかにした。ペプチド作動性チャネルは一部の無脊椎動物でしかみつかっていないが、チャネル構造からみると、ヒトの腎臓におけるNa<sup>+</sup>吸収を司る上皮性Na<sup>+</sup>チャネル(ENaC)の仲間である。従って、FaNaCのチャネル構造と機能の理解が進むことは、ヒトの血圧調節に関わる因子の一つであるENaCの機能を探る研究に、比較生物学的視点を提供するものにもなるはずである。

研究成果の概要(英文)：To understand the molecular mechanisms of the FMRFamide-gated Na<sup>+</sup> channel (FaNaC), we focused on the extracellular domain of the channel which must have peptide binding site (s) as well as the linking structure for the activation of the transmembrane pore. There are seven SS-bonds in the extracellular domain of FaNaC. We tested the function of each SS-bond one by one and found that the SS-bonds which are necessary to maintain the thumb domain of FaNaC are indispensable for the normal function of the channel. We next mutated several residues in the finger domain and found that several aromatic residues are important for the activation of the channel. We also made the 3D-model of FaNaC and carried out the docking simulation of FMRFamide. The results are consistent with the results of mutagenic experiments, suggesting that some of the aromatic residues are determinants of the FMRFamide binding site.

研究分野：神経生物学

キーワード：イオンチャネル ペプチド

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

中枢、及び末梢神経系における細胞間情報伝達において、最も重要な機能素子の一つはリガンド作動性イオンチャネルである。一般的に、古典的神経伝達物質とよばれるアミンやアミノ酸をリガンドとするリガンド作動性チャネルの構造は動物界全体でよく保存されており、チャネルの構造と機能に関して多くの研究蓄積がある。一方、神経ペプチドをリガンドとするリガンド作動性チャネルは、1980年代に軟体動物ニューロンにおける薬理実験により存在が示されたが、脊椎動物では現在でもみつかっておらず、その実体は長らく不明であった。近年、限られた無脊椎動物(軟体動物、環形動物、刺胞動物)からペプチド作動性チャネルのcDNAがクローニングされた結果、無脊椎動物のペプチド作動性チャネルは、脊椎動物の上皮性Na<sup>+</sup>チャネル族(DEG/ENaCチャネル族)の仲間であることがわかり、古典的神経伝達物質に対するリガンド作動性チャネルとは全く別系統のチャネルであることが明らかになった。我々は、進化的に特異な位置を占めるペプチド作動性チャネルの構造機能相関を解明することを目指し、軟体動物アメフラシから神経ペプチドであるFMRFamideにより活性化されるFMRFamide作動性Na<sup>+</sup>チャネル(FaNaC)をクローニングし、チャネル機能と構造に関する研究を行っている。これまでの研究では、主として、FaNaCの膜ドメイン(チャネルポアを含む領域)の構造と機能の関係に焦点をあてた研究を遂行しており、細胞外ドメイン構造については、ほぼ手付かずの状況であった。本研究では、チャネルの細胞外ドメイン構造に着目し、チャネルの活性化に必須である構造を明らかにすることを目指している。

### 2. 研究の目的

ペプチド作動性チャネルは、比較的最近発見されたペプチドをリガンドとするリガンド作動性チャネルであり、上皮性Na<sup>+</sup>チャネル族(DEG/ENaCチャネル族)に分類される。DEG/ENaCチャネル族の基本構造は無脊椎動物から脊椎動物まで進化的に保存されており、多様な活性化因子により活性化される機能的に異なるチャネルを含むチャネル族である。我々は、リガンド作動性チャネルとしてのペプチド作動性チャネルの特異性に着目し、軟体動物アメフラシのFMRFamide作動性Na<sup>+</sup>チャネル(FaNaC)の構造機能相関に関する研究を進めており、FaNaCの膜ドメインに着目した研究を行うことで、膜ドメイン上部に位置する陰性リング構造にCa<sup>2+</sup>が配位することがFaNaCのイオン透過性を制御するゲート機構の一部であることを明らかにしている。

本研究課題では、チャネルの細胞外ドメイン構造に着目し、ペプチド結合によるチャネルの活性化をもたらす細胞外ドメイン構造を特定し、活性化の分子メカニズムを明らかにすることを主目的としている。DEG/ENaCチャネル族の細胞外ドメイン構造には多くの共通性があるので、本研究から得られた成果は、活性化因子を異にする他のDEG/ENaCチャネル族メンバーの活性化機構の理解にも資するものと考えている。

### 3. 研究の方法

本研究課題では、ペプチド結合からチャネル活性化に至る過程において、細胞外ドメインのどの部分が特に働くのかを明らかにする事を目的としている。そこで、FaNaCの細胞外ドメイン構造を攪乱する変異体チャネルを作製し、それらの機能解析を通して、細胞外ドメインの機能部位を特定する研究を計画した。

#### (1) 細胞外ドメインに存在するSS結合の切断

FaNaCの細胞外ドメインには7対のSS結合が存在する。これらのSS結合は、DEG/ENaCチャネル族において保存されており、本チャネル族の細胞外ドメインで識別されるサブドメイン構造を維持するために重要であると考えられる。そこで、部分的にSS結合を形成出来ない変異体チャネルを作製し、アフリカツメガエル卵母細胞をチャネルの発現系として、電気生理学的手法によりチャネル機能を解析し、SS結合の切断がチャネル機能に及ぼす影響を検討した。

#### (2) 細胞外ドメインの特徴的な構造に着目した点変異体の作製

現在までに、4種の軟体動物においてFaNaCのクローニングがなされている。これらのFaNaCのアミノ酸配列のアラインメントから、FaNaCに共通する部分と種特異的な部分を認めることができる。FaNaCの3次元構造は未だ明らかではないが、DEG/ENaCチャネル族に含まれる酸感受性チャネルの結晶構造を元に、ホモロジーモデリングによりFaNaCの構造モデルを作製し、FaNaC共通部分の位置を構造モデル上で特定した。その結果から、機能的な重要性が予想される部分に点変異を導入し、変異体チャネルの機能を電気生理学的手法で解析した。

#### (3) FaNaC構造モデルを用いたドッキングシミュレーション

リガンド作動性チャネルや受容体のリガンド結合部位を同定する上では、リガンド結合実験を行うのが古典的な方法である。しかしながら、1990年代に行われている合成ペプチドを用いたFaNaCにおける薬理実験の結果から、FMRFamide構造の一部を置き換えた合成ペプチドや、FMRFamideのアミノ末端にアミノ酸を付加した合成ペプチドはFaNaCを活性化できないことが分かっているので、ラベルしたリガンドを使ったリガンド結合実験は非常に困難である。そこで、FaNaCの3次元構造モデルを用いたドッキングシミュレーションを行い、FMRFamideが結合しう

る部位を絞り込むことを試みた。ドッキングシミュレーション結果と、FMRFamide 結合に関係することを想定して行った点変異体の機能解析実験の結果を比較検討することで、FMRFamide 結合部位の推定をおこなった。

#### 4. 研究成果

##### (1) SS 結合変異体チャネルの解析結果

FaNaC を含む DEG/ENaC チャネル族の細胞外ドメインには 7 個の SS 結合が存在する。これらの SS 結合は、DEG/ENaC チャネル族の細胞外ドメインに認められるサム、フィンガー、ナックル、バーム、ボールと命名されたサブドメイン構造の維持にかかわることが考えられる。そこで、各 SS 結合を作るシステインをアラニンに置換することで SS 結合を個別に破壊した 7 つの変異体チャネル (SS1, SS2, SS3, SS4, SS5, SS6, SS7 変異体) を作製し、膜電位固定法を用いてチャネル電流を解析した。各変異体チャネルにおいて、FMRFamide の濃度反応関係をヒルの式で近似することで EC50 値とヒル定数を求め、野性型チャネルの値と比較することで SS 結合破壊の影響を評価した。その結果、SS1, SS4, SS5, SS6 変異体チャネルでは、濃度反応関係の EC50 値、ヒル定数のどちらも野性型チャネルと概ね同様な値が得られたことから、この部位の SS 結合を個別に破壊してもチャネル機能に大きな影響を及ぼさないことがわかった。SS4 と SS5 はサム領域に存在する近接した SS 結合であるため、どちらか一方の SS 結合があれば近傍構造が維持される可能性も考えられ、SS4/SS5 二重変異体を作製して検討したところ、この二重変異体は FMRFamide により活性化しなかった。また、SS3 はサム領域の下端のループ構造を規定し、SS7 はサム領域上端にあるループ構造に関わるが、これらの SS 結合を破壊した場合も、FMRFamide による活性化がみられなくなった。これらの結果は、FaNaC の活性化にはサム領域の構造が維持されていることが必須であることを示唆している。また、ボール近傍の SS2 を破壊すると FMRFamide の EC50 値が野性型チャネルの 20-30 倍程度になったので、SS2 により維持されるボール近傍の構造は、FMRFamide の結合反応そのものか、結合反応に続く活性化反応に関与することが示唆された。

##### (2) FMRFamide 結合に関わるものが想像された部位の点変異体チャネル解析結果

FaNaC の FMRFamide 感受性に関して、異なる軟体動物からクローニングされた FaNaC における FMRFamide の濃度反応関係の違いに着目したキメラチャネルの解析から、FaNaC の FMRFamide 感受性に影響を与える部位が同定されている (Cottrell, 2005)。そこで、脊椎動物の酸感受性チャネルの結晶構造を元に作製した FaNaC のホモロジーモデルにおいて、FMRFamide 感受性に関わると推定された部位の位置を確認したところ、フィンガー領域の一部にあたるものが明らかになった。また、これまでにクローニングされている 4 種の FaNaC のフィンガー領域には、高度に保存されている複数の芳香族アミノ酸が存在することも明らかになった。一方で、FMRFamide のアナログペプチドの作用に関する過去の薬理学的研究から、FaNaC の活性化には FMRFamide の 1 位と 4 位のフェニルアラニンが必須であることが知られている (Cottrell, 1997)。これらを合わせて考えると、フィンガー領域に存在する芳香族アミノ酸が FMRFamide のフェニルアラニンと

相互作用することが FaNaC の FMRFamide 認識に関与している可能性が考えられた。

そこでそれらの芳香族アミノ酸に点変異を導入した変異体チャネルを作製し、膜電位固定法を用いて FMRFamide の濃度反応関係を解析した。その結果、フィンガー領域の上部に存在する 6 か所の芳香族アミノ酸の内 5 か所における点変異体では、FMRFamide の EC50 値が野生型チャネルの 10 倍程度の大きさになり FMRFamide 感受性が大きく低下することが示された。また、残りの 1 か所の点変異体では、0.3mM という高濃度の FMRFamide に対しても全く応答せず、FMRFamide 感受性を消失していることが示唆された。また、サム領域上部のループ構造の近傍に位置するフィンガー領域のループ構造に存在する 2 つの芳香族アミノ酸に変異導入したチャネルでも、FMRFamide 感受性が大きく損なわれていた。

##### (3) ドッキングシミュレーションによる FMRFamide 結合部位の絞り込み

これまでの変異体チャネルの機能解析実験から、FaNaC のサム領域下部および上部のループ構造、ならびにフィンガー領域に保存される芳香族アミノ酸が FMRFamide による FaNaC の活性化に重要であることが明らかになった。サム領域の下部のループ構造は、酸感受性チャネルにおいてもチャネル活性化に重要な部位であることが明らかにされているが、サム領域上部のループ構造に関しては注目されていない。また、我々が作製した FaNaC の構造モデルからみると、フィンガー領域のループ構造はサム領域上部のループ構造の近傍に存在する。そこで、これらの領域をターゲットとした FMRFamide のドッキングシミュレーションを行った。これまでに作製している FaNaC のモデルでは、鋳型とした酸感受性チャネルには存在しない FaNaC 固有配列の構造が特定できないことから、細胞外ドメインに不確かな構造が残っていた。ドッキングシミュレーションを行うにあたり、細胞外ドメイン構造をより特定するために、先行研究 (Niu et al, 2016) により、FaNaC 固有配列の内、FMRFamide の作用に必須ではないことが示された領域を削った FaNaC のモデルを構築した。この新たな FaNaC モデルをリセプターとし、FMRFamide をリガンドとしたドッキングシミュレーションを行った。ドッキングシミュレーションには、UCSF-Chimera と Autodock-Vina を用いた。野生型および各変異体チャネルの構造モデルにおいて、それぞれ 2000 回のドッキングシミュレーションを行い、得られたドッキング部位、ドッキング時の

FMRFamide 構造を解析し比較した。その結果、野生型チャンネルのフィンガー領域の上部には 3 か所の FMRFamide 結合可能領域があることが推定され、ドッキング状態での FMRFamide 構造に約 50 種のパターンを識別することができた。また、点変異体チャンネルにおける結合パターンには、野生型での結果とは大きく異なる点があることが明らかになった。

ドッキングシミュレーションで得られる計算上の FMRFamide 結合反応の自由エネルギー変化と、点変異体の機能解析実験により得られた EC50 値との相関関係をみたところ、いくつかの変異体では明瞭な相関関係が認められた。すなわち、野生型モデルでよく見られる FMRFamide のドッキング構造が、フィンガー領域上部の 6 つの点変異体では減少しており、その程度(それぞれのドッキングシミュレーションでえられた 2000 個のドッキング構造における自由エネルギーの総和)と EC50 値の変化との間に相関関係が認められた。また、生理実験で FMRFamide 感受性を消失していると判定した変異体では、計算による自由エネルギー変化から推定される EC50 が数十 mM にもなることがわかった。一方、生理実験では同様に FMRFamide 感受性が大きく低下することが示されたフィンガー領域上部のループ構造に存在する二つの芳香族アミノ酸の点変異体では、ドッキングシミュレーション結果がほぼ野生型モデルのそれと同様であった。これらの結果から、フィンガー領域上部の芳香族アミノ酸は FMRFamide 結合部位に関わる可能性が高いが、フィンガー領域のループ構造に存在する芳香族アミノ酸は FMRFamide 結合に直接かかわるというより、チャンネルの活性化反応に関わっている可能性の方が高いと判定された。

現在、以上の研究成果を元に論文を作製しているところである。また、本研究の成果から浮かび上がったフィンガー領域上部とサム領域上部のループ構造との相互作用がチャンネル活性化に関わる可能性を検証するために、二重変異体チャンネルの作製を進めているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>古川康雄、田頭伊織                                      |
| 2. 発表標題<br>FMRFamide作動性Na <sup>+</sup> チャネルのFMRFamide結合部位 |
| 3. 学会等名<br>第71回日本動物学会中国四国支部大会                             |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>岩室徳成、古川康雄   |
| 2. 発表標題<br>アメフラシshaker型K <sup>+</sup> チャネルのN末端点変異は速い不活性化と遅い不活性化を分離する |
| 3. 学会等名<br>第71回日本動物学会中国四国支部大会  |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|                                   |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名<br>亀川礼記、古川康雄              |
| 2. 発表標題<br>無腸動物からの酸感受性チャネルのクローニング |
| 3. 学会等名<br>第71回日本動物学会中国四国支部大会     |
| 4. 発表年<br>2019年                   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>古川康雄、田頭伊織  |
| 2. 発表標題<br>FMRFamide作動性ナトリウムチャネルの細胞外ドメインに存在するFMRFamide結合部位の探索 |
| 3. 学会等名<br>第90回日本動物学会大会                                       |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>古川康雄、田頭伊織   |
| 2. 発表標題<br>FMRFamide作動性Na <sup>+</sup> チャンネルの細胞外ループ構造に存在する二つの芳香族アミノ酸はチャンネルの活性化に必須である |
| 3. 学会等名<br>第97回日本生理学会大会  |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>田頭伊織、古川康雄  |
| 2. 発表標題<br>FMRFamide作動性ナトリウムチャンネルの細胞外ドメインに存在するSS結合により維持される構造と機能 |
| 3. 学会等名<br>第89回日本動物学会大会   |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Yasuo Furukawa, Iori Tagashira  |
| 2. 発表標題<br>Mapping the agonist binding site of the FMRFamide-gated Na <sup>+</sup> channel |
| 3. 学会等名<br>The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>古川康雄、田頭伊織   |
| 2. 発表標題<br>FMRFamide作動性Na <sup>+</sup> チャンネルの細胞外ループ構造に存在する二つの芳香族アミノ酸はチャンネルの活性化に必須である |
| 3. 学会等名<br>第97回日本生理学会大会  |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>古川康雄、田頭伊織                                      |
| 2. 発表標題<br>FMRamide作動性ナトリウムチャネルのフィンガードメインに保存される芳香族アミノ酸の機能 |
| 3. 学会等名<br>第91回日本動物学会大会                                   |
| 4. 発表年<br>2020年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|