

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03424

研究課題名(和文) イオンチャネルの動的構造変化の蛍光非天然アミノ酸・遷移金属イオン間FRET解析

研究課題名(英文) tmFRET analysis of the dynamic structural rearrangements of ion channels

研究代表者

久保 義弘 (Kubo, Yoshihiro)

生理学研究所・分子細胞生理研究領域・教授

研究者番号：80211887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、イオンチャネルの作動メカニズムの理解に向けて、膜電位固定下蛍光測光法、および遷移金属イオンFRET法を用いた、イオンチャネル電流の電気生理学的記録と、動的構造変化の光生理学的記録との同時取得等による解析を行った。ATP受容体チャネルP2X2の非典型的膜電位依存性活性化の分子基盤、Two Pore Na⁺チャネルTPC3のPIP2と膜電位によって複合的に決定される活性化の分子メカニズム、Gタンパク質活性化型内向き整流性K⁺チャネルGIRK2の病態変異体におけるイオン選択性の異常の病態メカニズム等に関する知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イオンチャネルの作動メカニズムの理解には、Cryo電顕等が与える静的構造情報と共に、動的構造変化を光学的手法により得ることが重要である。本研究では、膜電位固定下蛍光測光法等を用いて、電気生理学的記録と光生理学的記録を同時に行い、両者を突き合わせて詳細な解析を行うこと等により、イオンチャネルの複雑な膜電位依存的活性化の分子メカニズム等を明らかにした。今後、同様の解析は、他の膜タンパク質の研究にも適用できると期待される。また、イオンチャネルの作動メカニズムの解明は、イオンチャネル病の病態メカニズムの理解や新しい治療法の開発につながる可能性を有している。

研究成果の概要(英文)：Towards the elucidation of functioning mechanisms of ion channels, we performed simultaneous acquisition of electrophysiological recording of ion channel current and opto-physiological recording of dynamic structural rearrangements, by voltage clamp fluorometry method or by transient metal ion FRET method. We clarified the molecular determinant of the non-canonical voltage-dependent gating of ATP receptor channel P2X2, the molecular mechanism of the complex gating of Two Pore Na⁺ channel TPC3 by membrane potential and the binding of PIP2, and the pathophysiological mechanism of abnormal ion selectivity in hereditary disease associated mutant of G protein coupled inward rectifier K⁺ channel GIRK2.

研究分野：分子生理学

キーワード：イオンチャネル 構造機能関連 動的構造変化 膜電位固定下蛍光測光 tmFRET

1. 研究開始当初の背景

近年、Cryo 電顕画像を用いた単粒子構造解析の空間解像度の劇的な向上により、結晶作成を行うことなしに多くの膜タンパク質の構造が解かれている。しかしながら、Cryo 電顕解析法は中間状態の構造を一挙に解くポテンシャルを有してはいるものの、その像はあくまで静止画像に過ぎず、機能時の姿とは一線を画す。機能時の姿の理解に向け、これまで、Förster Resonance Energy Transfer (FRET) 法、構造変化を蛍光の環境変化による蛍光強度の変化として捉える Voltage Clamp Fluorometry (VCF) 法等の様々な手法が開発・適用されてきた。

我々は、本研究開始時点において、ツメガエル卵母細胞を発現系とし、蛍光小分子ラベル、もしくは蛍光非天然アミノ酸 (fUAA) の導入による VCF 法によるイオンチャネルの動的構造解析の方法論を確立し、成果を挙げつつあった。そのため、この研究の完成および確立した VCF 法の他のイオンチャネルへの適用が望まれる状況であった。

また、開始当初、遷移金属イオン FRET (tmFRET) 法をイオンチャネル研究に適用した例が報告された。FRET の Donor として fUAA である Anap を用い、Acceptor として特異的に導入した Co^{2+} もしくは Cu^{2+} を用いる手法である (Dai et al (2019) Nature Struct & Molec Biol)。tmFRET 法は、多くの優位性を有しているが、イオンチャネルへの適用例は極めて限定的で、また、ツメガエル卵母細胞を発現系として 2 電極膜電位固定下で行った例 (TEV-tmFRET) は無いため、まずは方法論の確立を試みる必要がある状況であった。

2. 研究の目的

我々は、イオンチャネルの作動時の姿、すなわち動的構造変化を知ることにより、様々な作動メカニズムを明らかにすることを目指している。それに向けて、これまでに確立してきたツメガエル卵母細胞を発現系とした電気生理学手法と VCF 法等を駆使してイオンチャネルの構造機能関連研究を推進することと、新たにツメガエル卵母細胞を発現系とした TEV-tmFRET 法の方法論の確立を試みることを目的とした。具体的には、ATP 受容体チャネル (P2X2) の非典型的膜電位依存的ゲーティングのメカニズム、Two Pore Na^{+} チャネル (TPC3) の PIP2 と膜電位による複合的なゲーティングのメカニズム、G タンパク質結合型内向き整流性 K^{+} チャネル (GIRK) 変異体におけるイオン透過の異常のメカニズム等を解析の主対象とした。

3. 研究の方法

VCF 法、tm-FRET 法とも、ツメガエル卵母細胞を発現系として用い、蛍光ラベルしたイオンチャネルを発現させ、2 電極膜電位固定法による電流と蛍光強度変化の同時記録を行う。

いずれの方法においても、fUAA である Anap の導入が鍵となる。Anap は、Anap UAG 用 tRNA と AnapRS を発現させるためのプラスミド DNA の注入と、Anap を取り込ませたい位置に UAG 変異を導入したイオンチャネルの cRNA および Anap の注入により行う (図 1)。

VCF 法においては、fUAA によるラベル法と並行して、蛍光を導入したい位置に Cys 残基を導入した変異体を発現させ、蛍光小分子 Alexa-Maleimide を Cys 残基に結合させることによる蛍光ラベル法も用いる。

tmFRET 法においては、Anap を FRET donor とし、遷移金属イオンである、 Co^{2+} もしくは Cu^{2+} を FRET acceptor として蛍光測光により FRET 解析を行う。遷移金属イオンの結合は、変異により導入した近接する 2 個の His 残基と Co^{2+} (Co^{2+} -HH)、もしくは、変異により導入した Cys 残基に結合させた TETAC と Cu^{2+} (Cu^{2+} -TETAC) を用いる (図 2)。Negative control として、 Co^{2+} や Cu^{2+} の投与前、および、His 残基や Cys 残基が導入されていないコンストラクトの Anap 蛍光の記録も行って tmFRET を評価する。

これらの解析を、イオンチャネル分子内の様々な位置に蛍光ラベルを導入し、かつ、膜電位固定下での電流と同時記録することにより、動的構造変化と作動メカニズムにアプローチする。

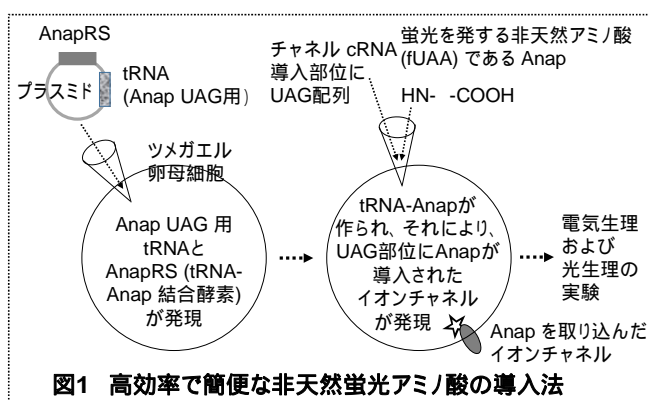


図1 高効率で簡便な非天然蛍光アミノ酸の導入法

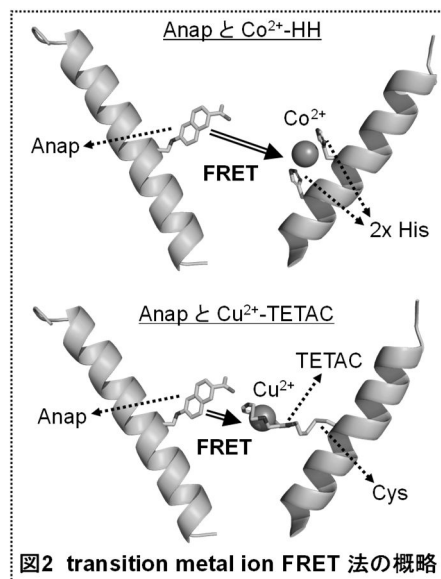


図2 transition metal ion FRET 法の概略

4. 研究成果

(1) VCF 等を用いたイオンチャネルの作動メカニズムに関する研究

ATP 受容体チャネル P2X2

基盤研究(B) (一般) (課題番号: 17H04021)により開始した膜電位センサーを持たないATP受容体チャネル P2X2 の動的構造変化と非典型的膜電位依存的ゲーティングの分子基盤に関する、fUAA を用いた VCF 法による研究を継続した。最終的に、第 2 膜貫通部位の Ala337 の位置に強い電場の集約があること、ATP 結合による活性化時に、第 1 膜貫通部位の Phe44 が Ala337 の近傍に動き入ること、強い電場内での Ala337 と Phe44 の相互作用が膜電位依存的活性化のオリジンであることを結論した。その成果を *eLife* 誌 (2021) に発表した。

Two Pore Na⁺ チャネル (TPC)

Two pore channel (TPC) の PIP₂ と膜電位による複合的なゲーティングのメカニズムに焦点をあて、以下の研究を行った。

TPC3 チャネルの第 2 リピートの膜電位センサー上の Q507 の位置に蛍光をラベルしたコンストラクトを用いた VCF 解析により、蛍光変化-膜電位関係のプロットにおいて 2 つの成分が存在すること、その第 2 相が第 1 リピートへの PIP₂ の結合により左側にシフトすること、すなわち膜電位依存的活性化を促進すること等を明らかにした(図 3)。その成果をとりまとめ、*J Biol Chem* 誌 (2021) に発表した。

TPC は、2 種類の異なる刺激(膜電位と化学物質 PIP₂)によりゲートを開閉する。TPC3 チャネルの場合は主として膜電位によって、TPC2 チャネルの場合は主として PIP₂ によって活性化が調節されるがその差異を生み出すメカニズムは未解明であった。

そこで、VCF 法を駆使し、この問題に焦点をあてた研究を行った。その結果、TPC3 チャネルにおいて、TPC2 チャネルのように PIP₂ 結合によって開閉を決定できる、膜電位センサーが中間状態にあるモードが存在することを新たに見出し、TPC のタイプ間の違いを生み出す機構を明らかにした(図 4)。その成果を *Proc Natl Acad Sci USA* 誌 (2023) に発表した。

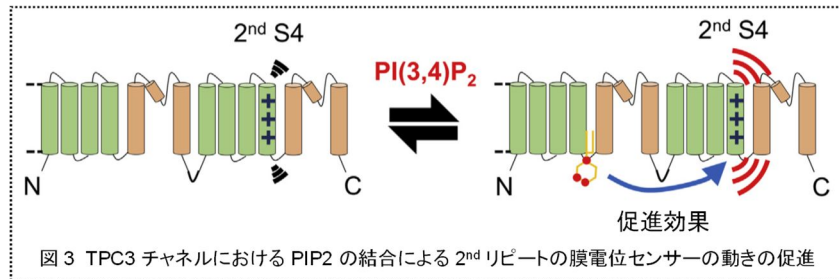


図 3 TPC3 チャネルにおける PIP₂ の結合による 2nd リピートの膜電位センサーの動きの促進

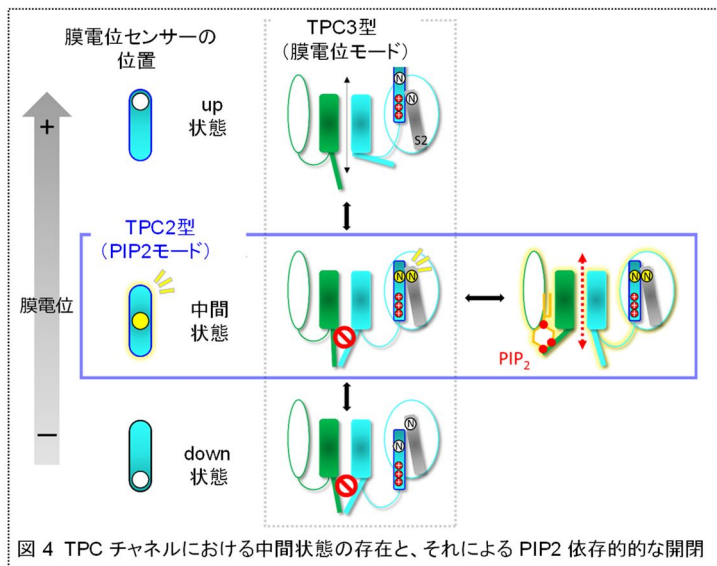


図 4 TPC チャネルにおける中間状態の存在と、それによる PIP₂ 依存的な開閉

G タンパク質結合型内向き整流性 K⁺チャネル (GIRK)

ヒトの GIRK2(Kir3.2)チャネルの遺伝子の点変異によりイオン選択性の異常を示す遺伝性疾患が知られている。イオン選択性フィルターの近傍に多々変異がみられることから、異常は、イオン選択性フィルターで構成されるイオン透過路がゆがむことによると、考えられてきた。しかし、明確な実験的根拠は乏しいため、我々は、この病態メカニズムを明らかにするために変異体のイオン透過に

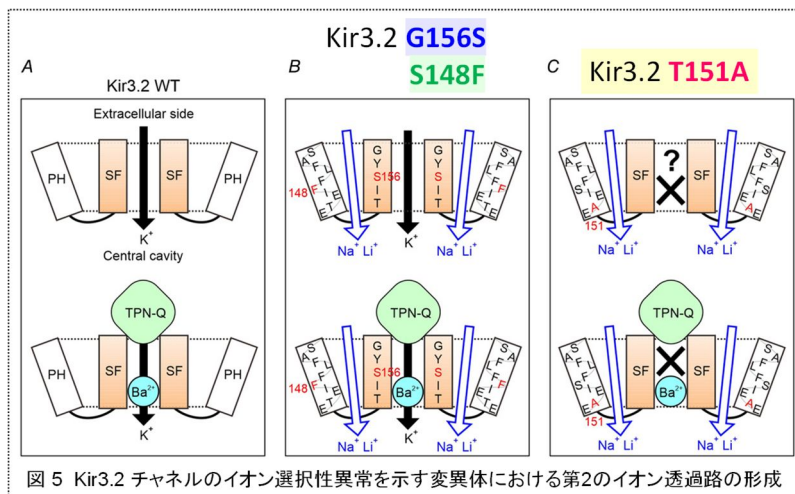


図 5 Kir3.2 チャネルのイオン選択性異常を示す変異体における第2のイオン透過路の形成

関する解析を行った。その結果、Gly156Ser 等の病態変異体において、チャンネル中央のイオン透過路と別に、Ba²⁺や TPN-Q によりブロックされず、Na⁺や Li⁺をよく透過する第 2 のイオン透過路が形成されていることを明らかにした (図 5)。その成果を *J Physiol 誌* (2022) に発表した。

膜電位依存性 Na⁺チャンネル

マギル大学 (カナダ) の Derek Bowie 教授研究グループと、心筋型膜電位依存性 Na⁺チャンネル Nav1.4 に関する国際共同研究を実施し、VCF 法による動的構造変化の解析を担当した。その結果、Nav1.4 の特徴的なふるまいが、他の Na⁺チャンネルよりも閉状態直結の不活性化状態に入りやすいことによることを明らかにした。その成果を *J Gen Physiol 誌* (2022) に発表した。

(2) ツメガエル卵母細胞での tmFRET 法の方法論の確立の試み

(1) で記した、ATP 受容体 P2X2 が示す非典型的膜電位依存的ゲーティングの分子基盤に関する研究において、fUAA である Anap を用いた VCF 法により、第 2 膜貫通部位の Ala337 と、ATP 結合時にその近傍に動き入る第 1 膜貫通部位の Phe44 との相互作用が、膜電位の関知を担っていることを明らかにした。Phe44 およびその近傍の膜電位依存的構造変化のさらなる詳細を捉えるために VC-tmFRET 法の確立を目指して研究を行った。Anap を Ala337 に導入した上で、TETAC-Cu²⁺結合のための Cys 残基の導入位置の最適化を試みた。Phe44 の近傍に位置する Gln37 に Cys 残基を導入した変異体 Q37C は正常なチャンネル機能を示した。CuSO₄ と TETAC を前もって反応させて TETAC-Cu²⁺を作成し、それを変異体に投与して Cys 残基に結合させることを試みた。各変異体に対し、TETAC-Cu²⁺ 濃度 10 uM, 1 mM 等を用い、1 分, 10 分等の時間、反応させた。しかし、いずれの条件においても、acceptor である Cu²⁺の導入により tmFRET が起きていることを示す Anap の蛍光強度の明確な減少は観察されなかった。TETAC-Cu²⁺のラベリングが成功していない可能性が想定されるため、今後、さらに条件検討を行う。

さらに、(1) で記した、TPC3 チャンネルの第 2 リピートの膜電位センサーの動きの 2 つの相の詳細等を明らかにするために、TEV-tmFRET 法の適用に取り組んだ。まず、donor となる Anap を第 2 リピートの膜電位センサーの細胞外側寄りの各アミノ酸残基に一か所ずつ導入し、最適位置として Ser506 もしくは Gln508 を選択した。次に acceptor となる TETAC-Cu²⁺を結合させるために Cys 残基を導入する位置の候補を、構造のホモロジーモデル上で上記 Anap の近傍にあることを条件に検討し、第 1 リピートの第 5 膜貫通部位の細胞外側寄り、第 2 リピートの第 3 膜貫通部位の細胞外側寄りとする事とした。作成したコンストラクトを用いて解析を行ったが明確な tmFRET は確認されなかった。今後、他の位置に acceptor を結合するためのコンストラクトをさらに作成し探索を行う。

これまでに、P2X2 チャンネルにおいても、TPC3 チャンネルにおいても、明確な tmFRET が観察できなかったため、明確な膜電位依存的構造変化が起きることが知られているプロトンチャンネル Hv1 を対象として更なる解析を行った。さらに、アンバーコドン UAG に Anap を取り込ませるコンストラクトのタンパク質発現を高めることを目的として、UAG が本来のストップコドンと認識されて翻訳が止まることを抑える eRF1 の E55D 変異体を共発現する実験を行い、効果があることを観察した。今後、eRF1 の E55D 変異体を共発現した状態での、tmFRET の検出を目指し、さらに条件検討を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shimomura T, Hirazawa K, Kubo Y.	4. 巻 120
2. 論文標題 Conformational rearrangements in the second voltage sensor domain switch PIP2- and voltage-gating modes in two-pore channels	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci USA	6. 最初と最後の頁 e2209569120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2209569120.	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 -
1. 著者名 Brake N, Mancino AS, Yan Y, Shimomura T, Kubo Y, Khadra A, Bowie D	4. 巻 154(7)
2. 論文標題 Closed-state inactivation of cardiac, skeletal, and neuronal sodium channels is isoform specific	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Gen Physiol	6. 最初と最後の頁 e202112921
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1085/jgp.202112921.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Chen IS, Eldstrom J, Fedida D, Kubo Y.	4. 巻 600
2. 論文標題 A novel ion conducting route besides the central pore in an inherited mutant of G-protein-gated inwardly rectifying K ⁺ channel	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 603-622
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1113/JP282430.	査読の有無 無
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 該当する
1. 著者名 Hirazawa K, Tateyama M, Kubo Y, Shimomura T.	4. 巻 297
2. 論文標題 Phosphoinositide regulates dynamic movement of the S4 voltage sensor in the 2 nd repeat in Two-pore channel 3	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101425
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2021.101425.	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 -

1. 著者名 Andriani R, Kubo Y.	4. 巻 10
2. 論文標題 Voltage-clamp fluorometry analysis of structural rearrangements of ATP-gated channel P2X2 upon hyperpolarization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Elife	6. 最初と最後の頁 e65822
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.65822.	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 -

1. 著者名 Matsumura K, Shimomura T, Kubo Y, Oka T, Kobayashi N, Imai S, Yanase N, Akimoto M, Fukuda M, Yokogawa M, Ikeda K, Kurita J, Nishimura Y, Shimada I, Osawa M.	4. 巻 22
2. 論文標題 Mechanism of hERG inhibition by gating-modifier toxin, APETx1, deduced by functional characterization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Mol Cell Biol	6. 最初と最後の頁 3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12860-020-00337-3	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19件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Shimomura T, Hirazawa K, Kubo Y
2. 発表標題 A switching mechanism of PIP2- and voltage- gating modes depending on the conformations of the second S4 helix in two pore channels
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tateyama M, Kubo Y
2. 発表標題 The transmembrane domains of THIK-1 channel play critical roles in the regulation of channel activity
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hirazawa K, Shimomura T, Kubo Y
2. 発表標題 Analysis of the dynamic structure of voltage-gated cation channels using transition metal ion forster resonance energy transfer
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Liu C, Murrell-Lagnado R, Kubo Y
2. 発表標題 Structural determinants of the inhibition of M2R by Sigma-1 receptor
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kubo Y
2. 発表標題 A novel ion conducting route besides the central pore in an inherited mutant of G-protein-gated inwardly rectifying K ⁺ channel
3. 学会等名 The 37th International Union of Physiological Sciences(IUPS) Congress (Beijing, China) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Andriani RT, Kubo Y
2. 発表標題 Voltage-clamp fluorometry analysis of the hyperpolarized-induced structural rearrangements of ATP-gated channel P2X ₂
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Chen IS, Kubo Y
2. 発表標題 Identification of mechanisms underlying the abnormal ion selectivity induced by gene mutations of GIRK2 channel
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hirazawa K, Tateyama M, Shimomura T, Kubo Y
2. 発表標題 Phosphoinositide-dependent modulation of the structural rearrangements of Two-pore channel 3 evoked by depolarization
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shimomura T, Hirazawa K, Kubo Y
2. 発表標題 Analysis of the relationship between channel opening and position of the second S4 helix in two-pore Na ⁺ channel 3
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tateyama M, Kubo Y
2. 発表標題 The 4th transmembrane domain of THIK-1 channel plays critical roles in the regulation of the channel activity
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Liu C, Chen IS, Murrell-Lagnado R, Kubo Y
2. 発表標題 Regulation of muscarinic acetylcholine receptor M2 by Sigma-1 receptor
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kubo Y
2. 発表標題 VCF analysis of structural rearrangements of ATP-gated channel P2X2 upon hyperpolarization
3. 学会等名 The 95th Annual Conference of Chinese Association for Physiological Sciences (Tianjin, China) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kubo Y
2. 発表標題 VCF analysis of structural rearrangements of ATP-gated channel P2X2 upon hyperpolarization
3. 学会等名 The 8th Ion Channel Conference (Tianjin, China) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Chen IS, Kubo Y
2. 発表標題 Novel mechanisms underlying the abnormal ion selectivity of inherent GIRK mutants
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shimomura T, Hirazawa K, Kubo Y
2. 発表標題 Cysteine scanning analysis of the 2nd S4 in two-pore Na ⁺ channel 3
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Liu C, Chen IS, Murrell-Lagnado R, Kubo Y
2. 発表標題 Regulation of the function of Kv channels by Sigma-1 receptor
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tateyama M, Kubo Y
2. 発表標題 The distal C-terminal region of the THIK channels plays critical roles in the regulation of the channel activity
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hirazawa K, Shimomura T, Kubo Y
2. 発表標題 Analysis of the activation mechanism of Two-pore channel 3 by membrane voltage and phosphoinositide
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Andriani RT, Kubo Y
2. 発表標題 Optical monitoring of voltage-dependent gating of ATP-gated channel P2X2 by utilizing fluorescent unnatural amino acid (fUAA)
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021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
研究協力者	アンドリアニ リズキ サリ (Andriani Rizki Tsari)		
研究協力者	下村 拓史 (Shimomura Takushi)		
研究協力者	平澤 輝一 (Hirazawa Kiichi)		
研究協力者	チェン イシャン (Chen I-Shan)		
研究協力者	立山 充博 (Tateyama Michihiro)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	リウ チャン (Liu Chang)		
研究協力者	山本 友美 (Yamamoto Tomomi)		

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			
イスラエル	Weizmann Institute of Science			
英国	University of Sussex			
カナダ	University of British Columbia	McGill University		