

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07284

研究課題名(和文) 非天然アミノ酸を利用した、イオンチャネルの特定状態を指向した解析

研究課題名(英文) Unnatural amino acid-based state-specific analysis of ion channels

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、光架橋性非天然アミノ酸 (pcUAA) をイオンチャネルに導入し、特定の状態を“狙って”解析する手法を開発・実証することを目指した。電位依存性カリウムチャネルであるKv1.2の電位センサードメインのうち、S4ヘリックスにpcUAAを導入した変異体を複数作成し、電流測定と同時に紫外光を照射し、チャネル活性の変化を観察した。いくつかのpcUAA導入体では、S4ヘリックスが静止状態のときにより架橋形成が生じやすいことがわかり、この結果を利用することでチャネルの活性化について新たな知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Kv1.2を含む電位依存性イオンチャネルは、われわれの脳や末梢神経における電気信号を生み出す基本単位であり、その分子機能・構造についての理解は生理学的に重要である。本研究の結果、Kv1.2のS4ヘリックスの構造変化についての知見が得られた。構造解析技術の発展にもかかわらず、高分解能のKv1.2の静止状態の構造は明確に得られておらず、電位依存的な活性化メカニズムは完全には理解されていない。pcUAAを利用した本研究の結果は、その活性化メカニズムについての新しい知見を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop and demonstrate a method to "target" a specific state by introducing a photocrosslinking unnatural amino acid (pcUAA) into an ion channel. Several pcUAA-introduced mutants of the S4 helix in the voltage sensor domain of Kv1.2, a voltage-gated potassium channel, were irradiated with UV light simultaneously with current measurements to observe changes in channel activity. Some of the pcUAA-introduced mutants were found to be more sensitive to cross-link formation when the S4 helix was in a resting state. This result provided a new insight into the mechanism of channel activation in voltage-gated ion channel.

研究分野：生物物理学

キーワード：イオンチャネル 電位依存性 非天然アミノ酸

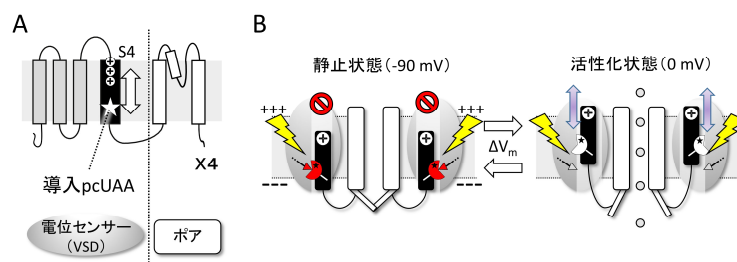
1. 研究開始当初の背景

電位依存性イオンチャネルは、神経の興奮性を制御する重要な一群の膜タンパク質である。そのうち、K⁺チャネルであるショウジョウバエ由来の *Shaker* K⁺チャネル、およびそのオルソログである Kv1.2 チャネルは、このファミリーのモデルとして数多くの機能・構造解析がなされてきた。特に、2005年に報告されたラット由来の Kv1.2 の活性化状態の結晶構造は、この種のチャネルの理解を大きく進展させた。一方で、電位依存性のより詳細な理解には、静止状態についての知見と、活性化・静止の両状態の比較研究が欠かせない。Kv1.2 は 0mV で活性化状態となるため、精製して脂質二重膜より取り出した場合は原理的に静止状態は取りえない。このため、Kv1.2 の静止状態の構造は未解明であり、それゆえ静止状態の知見については構造的な裏打ちがなされておらず、電位依存性の理解を妨げている。

図1 pcUAA による状態を志向した架橋形成

2. 研究の目的

本研究では、光架橋性非天然アミノ酸 (photo-crosslinking unnatural amino acid; pcUAA) を用い、Kv1.2 の静止の機能構造に関する知見を得ることを目的とした。pcUAA は、紫外光に依存してごく近傍のアミノ酸残基と共有結合性の架橋を形成する。電位依存性を担う電位センサードメイン (VSD) に pcUAA を導入し、膜電位を変化させて静止状態あるいは活性化状態に VSD を保つと同時に光照射を行うことで、各状態における pcUAA 導入位置の周囲の環境についての知見を得ることができる(図1)。また、pcUAA 導入を網羅的に行うスクリーニングを通じて、究極的には立体構造解析に資するような pcUAA 導入体を同定することを目的とした。



(A) Kv1.2 単量体の分子構造。S4 ヘリックスは複数の荷電残基を持ち、膜電位に依存して構造変化する。S4 ヘリックスの構造変化は、S4-S5 リンカーを通じてポアドメインと連関しており、これにより電位依存的なポアの開閉が可能になる。(B) Kv1.2 の状態とそれに依存した架橋形成の模式図。静止状態において周辺ごく近傍に架橋形成しうる原子が存在するように、S4 ヘリックス状の適切な位置に pcUAA を導入することで、状態特異的に VSD を固定することが期待される。

3. 研究の方法

pcUAA である、para-Benzoyl phenylalanine (pBpa) および azido-phenylalanine (AzF) を Kv1.2 に導入し、紫外光照射と電位刺激を組み合わせ、チャネル電流の変化の有無を確認した。Kv1.2 の発現には卵母細胞発現系を用い、電流記録は二電極膜電位固定法により行った。pBpa および AzF を特異的に結合するアミノアシル tRNA 合成酵素とサプレッサー tRNA をコードするプラスミドを、Kv1.2 の tag 変異体 DNA とともにツメガエル卵母細胞の核に注入する。pBpa と AzF は、卵母細胞の保持液に加えることで取り込ませた。これにより、変異させた tag コドンに対応する位置のアミノ酸を pBpa あるいは AzF に置換することができる。VSD 上の複数の位置に導入した一連の変異体を作成し、365 nm の光を照射するファイバー型照射装置により卵母細胞に直接光を照射し、その際の電流変化を記録した。

4. 研究成果

まず導入系を確立するために、pBpa の導入が哺乳類培養細胞系において報告されている KCNQ1-KCNE1 複合体 (Murray CI et al., eLife (2016)) を対象として、卵母細胞発現系における pBpa の導入を行った。KCNQ1 とともに、KCNE1 F57tag/M62W 変異体の cRNA を注入するとともに、pBpa 特異的なアミノアシル合成酵素とサプレッサー tRNA を発現させるためのプラスミドを核に注入した。KCNE1 が KCNQ1 と複合体を形成すると、チャネルの活性化により高い膜電位が必要になることが知られており、これを指標にして全長 KCNE1 の発現の有無を検証した。Q1 に対して、E1 変異体のみを共発現した場合、または E1 変異体を共発現させて保持液に pBpa を加えた場合は、Q1 のみの場合と同様の KCNQ1 電流が計測された。一方、E1 に加えてアミノアシル合成酵素とサプレッサー tRNA を共発現させ pBpa を供与した場合には、Q1 と野生型 E1 を共発現させた場合と同様により活性化により高い電位が必要になったことがわかった。これは、KCNE1 の 57 番目の tag 終始コドンが pBpa に対応するコドンへと再定義されて全長の E1 が発現された結

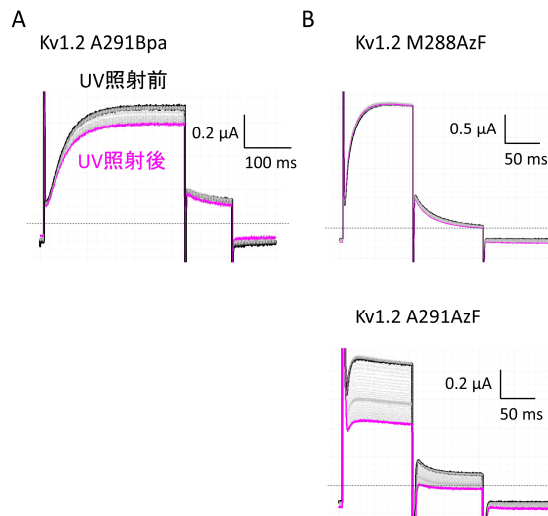
果、KCNQ1-KCNE1 複合体が形成されたものと考えられる。以上の結果より、目的の系を確立できたことがわかった。

続いて、Kv1.2 を対象として pBpa の導入を行った。先ほど KCNQ1-KCNE1 において確立した導入手法を用い、電位依存的な構造変化を担う 4 番目のヘリックス (S4) 上の複数の位置に pBpa を導入することを狙った。保持液における pBpa 濃度、核に注入するプラスミド量などの条件を最適化した結果、いくつかの導入体において Kv1.2 に典型的なチャンネル電流を測定することができた (図 2A)。しかしながら、pBpa 導入体の場合では光照射に依存して大きく活性変化を示すものを見出すことはできなかった。そこで、pBpa のほかによく利用されている pcUAA である AzF の導入を検討した。pBpa 導入の条件をもとにして AzF 導入を行ったところ、いくつかの導入体で Kv1.2 電流を確認することができた。A291AzF 導入体に 365 nm の紫外光照射を行ったところ、光照射依存的な電流の減少が確認された (図 2B)。これは、光照射により AzF 側鎖が周囲と分子架橋を形成することで S4 ヘリックスの電位依存的な動きが抑えられたためと考えられる。その他、S4 ヘリックスへの導入に加えて、S2 ヘリックスの保存されたフェニルアラニンなどの、S4 ヘリックスの動きにかかわるとされる残基などにも AzF を導入して光照射を行ったが、A291AzF ほどの明確な光依存性を示すものは得られなかった。

A291AzF 変異体については、光による電流減衰の状態依存性について解析を行った。-90 mV の過分極時、あるいは 0 mV の脱分極時にあわせて光照射を行い、その電流変化を観察したところ、過分極時に光照射を行った場合でより速い電流の減衰がみられた (図 3)。このことは、この A291AzF は 2 つの状態間で異なる周辺環境に存在しており、静止状態でより架橋を形成しやすいことを示している。Kv1.2 の結晶構造を見ると、活性化状態では A291 近傍には架橋形成の相手となりうるようなものは見受けられず、したがって A291AzF は静止状態でのみ架橋形成を起こしている可能性が考えられる。

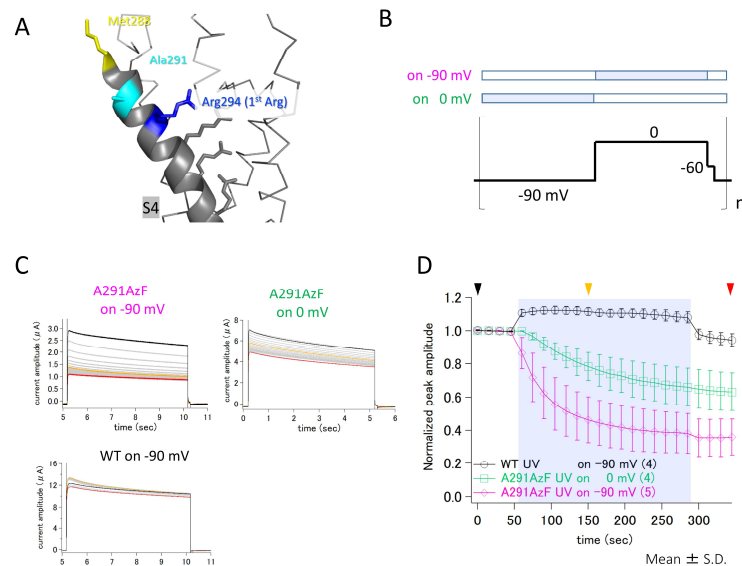
また、より高分解能での構造解析がなされている、Kv1.2/2.1 のキメラチャンネルに対して、同様に S4 ヘリックス上への AzF 導入実験を行った。興味深いことに、Kv1.2 と Kv1.2/2.1 キメラでは、対応する AzF 導入箇所であっても光反応性に違いがあることがわかった。これは、2 種

図 2 AzF および Bpa 導入体 Kv1.2 電流



(A) Kv1.2 A291Bpa の電流の典型例。電位変化は、保持電位 -60 mV より、+50 mV、-30 mV のうち -60 mV に戻している。(B) Kv1.2 M288AzF (上) および A291AzF (下) の電流の典型例。電位変化は (A) と同様。

図 3 A291AzF における状態依存的な架橋形成



(A) Kv1.2 の VSD の結晶構造。3 残基ごとにあらわれる正の荷電残基と、さらに細胞外側の 3 残基ごとのアミノ酸側鎖をスティックモデルで示す。(B) 電位変化と光照射のプロトコル。(C) A291AzF 電流について、(B) のプロトコルにより光照射を与えた際の典型例。(D) 異なるプロトコルでの電流の時間変化。矢頭の色は、(C) におけるトレースの色に対応する。

での構造解析がなされている、Kv1.2/2.1 のキメラチャンネルに対して、同様に S4 ヘリックス上への AzF 導入実験を行った。興味深いことに、Kv1.2 と Kv1.2/2.1 キメラでは、対応する AzF 導入箇所であっても光反応性に違いがあることがわかった。これは、2 種

のチャンネル間で異なる領域である、S3 ヘリックスから S4 ヘリックスの構造・機能の違いを反映しているものと考えられる。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Hirazawa Kiichi, Tateyama Michihiro, Kubo Yoshihiro, Shimomura Takushi	4. 巻 297
2. 論文標題 Phosphoinositide regulates dynamic movement of the S4 voltage sensor in the second 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 ~ 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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Matsumura Kazuki, Shimomura Takushi, Kubo Yoshihiro, Oka Takayuki, Kobayashi Naohiro, Imai Shunsuke, Yanase Naomi, Akimoto Madoka, Fukuda Masahiro, Yokogawa Mariko, Ikeda Kazuyoshi, Kurita Jun-ichi, Nishimura Yoshifumi, Shimada Ichio, Osawa Masanori	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 Molecular and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 1-16
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tsuboi Daisuke, Otsuka Takeshi, Shimomura Takushi, Faruk Md Omar, Yamahashi Yukie, Amano Mutsuki, Funahashi Yasuhiro, Kuroda Keisuke, Nishioka Tomoki, Kobayashi Kenta, Sano Hiromi, Nagai Taku, Yamada Kiyofumi, Tzingounis Anastasios V., Nambu Atsushi, Kubo Yoshihiro, Kawaguchi Yasuo, Kaibuchi Kozo	4. 巻 40
2. 論文標題 Dopamine drives neuronal excitability via KCNQ channel phosphorylation for reward behavior	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 111309 ~ 111309
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.111309	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 -
1. 著者名 Brake Niklas, Mancino Adamo S., Yan Yuhao, Shimomura Takushi, Kubo Yoshihiro, Khadra Anmar, Bowie Derek	4. 巻 154
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 Journal of General Physiology	6. 最初と最後の頁 -
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 Shimomura Takushi、Hirazawa Kiichi、Kubo Yoshihiro	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 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 下村拓史、平澤輝一、久保義弘
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 下村拓史、平澤輝一、久保義弘
2. 発表標題 Cysteine scanning analysis of the 2nd S4 in two-pore Na ⁺ channel 3
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会・第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 下村拓史、平澤輝一、久保義弘
2. 発表標題 Two-pore channelにおける2番目のS4ヘリックスの状態に依存したPIP2および電位依存性ゲーティングの切り替え機構
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 下村拓史
2. 発表標題 膜電位下蛍光電流同時測定法により明らかになった、Two-pore Channelにおけるリガンド依存性と電位依存性ゲーティングの切り替え・統合の分子基盤
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------