

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06786

研究課題名（和文）生体中のイオンチャネル複合体の分子構成検出と生理機能解明

研究課題名（英文）Detection of molecular configuration of ion channel complexes in vivo and elucidation of their physiological functions

研究代表者

中條 浩一（NAKAJO, Koichi）

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：80390699

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）：生体内でKCNQ1チャネルはKCNEと呼ばれる修飾サブユニットと複合体を構成し、その機能を大きく変化させる。本研究では、腸管などの上皮細胞に発現するKCNE3と、心臓に主に発現するKCNE1のそれぞれについて、KCNQ1チャネルのS1セグメントと相互作用することがチャネル機能の修飾に重要であることを明らかにした。また新しく同定したKCNE6遺伝子について、真獣類をのぞく脊椎動物に広く存在し、KCNE1と同様に心臓に発現してい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

KCNQ1は心臓ではQT延長症候群や難聴の原因遺伝子であり、ヒトの生理学に非常に重要である。今回の成果により、KCNQ1がKCNE1やKCNE3の結合によりどのように機能修飾されるかを、構造情報を基に明らかにしたことで、KCNQ1の変異によりどのようにQT延長症候群などの疾患が引き起こされるかを理解する手がかりになりうる。またヒトでは機能していないKCNE6ではあるが、KCNE1、KCNE3の機能修飾メカニズムを明らかにする手がかりとなる可能性があるため、その学術的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：In vivo, KCNQ1 channels form complexes with auxiliary subunits called KCNEs that significantly alter their function. In this study, we found that KCNE3, which is expressed in some epithelial cells, and KCNE1, which is mainly expressed in the heart, interact with the S1 segment of the KCNQ1 channel, which is important for modifying channel function. We also found that the newly identified KCNE6 gene is widely distributed in non-eutherian vertebrates and, like KCNE1, is expressed in the heart.

研究分野：分子生理学

キーワード：イオンチャネル 複合体 修飾サブユニット カリウムチャネル QT延長症候群 電位センサー ゼブラフィッシュ 電気生理学

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

イオンチャネルは心臓や神経細胞など、いわゆる興奮性細胞において電気信号を形作る重要な膜タンパク質である。そのためイオンチャネルの異常により、てんかんや不整脈といった興奮性異常による疾患が引き起こされることがある。例えば **KCNQ1** は心臓に発現する電位依存性 **K⁺**チャネルであるが、**KCNQ1** 遺伝子の変異により **QT** 延長症候群などの先天性不整脈が引き起こされることがある。一方、**KCNQ1** チャネルには **KCNE** と呼ばれる一回膜貫通型の修飾サブユニットが存在し、**KCNQ1** チャネルは結合する **KCNE** の種類によってその機能が大きく変化する。例えば **KCNQ1** と **KCNE1** で構成される複合体は、心臓の主要な遅延整流性 **K⁺**電流のひとつである **I_{Ks}** を構成する。**KCNE1** も **QT** 延長症候群の原因遺伝子であることから、両者が心臓の正常な興奮に欠かせないことは明らかである。**KCNQ1** と **KCNE1** の複合体については、その生理学的重要性からこれまで多くの研究がなされてきた。**KCNQ1** と **KCNE1** のストイキオメトリー、すなわち 4 量体の **KCNQ1** チャネルに対し何分子の **KCNE1** が結合するかについては、長年 2 分子の **KCNE1** が結合するという“4:2 説”が有力であったが、研究代表者は 1 分子蛍光イメージングを利用したサブユニットカウンティング法により、最大 4 分子の **KCNE1** が結合しうることを示した(Nakajo et al. PNAS, 2010)。この“4:4 説”は、近年構造解析を含む他の手法によっても支持される結果が報告されている(Murray et al. eLife, 2016; Sun & MacKinnon, Cell, 2020)。つまり **KCNQ1** チャネルには 4 か所の **KCNE** 結合サイトが存在することになるが、だとすると複数種類の **KCNE** が結合する可能性が考えられる。実際、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた発現系では、**KCNQ1** と複数種の **KCNE** が共発現してイオンチャネルを構成していることを示唆する報告があるが(Morin & Kobertz, ACS Chem Biol, 2007)、実際に生体内でこのような複数種の **KCNE** を含む **KCNQ1** が存在するかどうかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究は生体内におけるイオンチャネル複合体構成の制御機構と生理機能を明らかにすることが目的であった。強制発現系などにおいて、イオンチャネルのサブユニット構成を明らかにした研究は多く存在するが、生体内で実際にどのようなサブユニット構成を持つかを示した論文は、構造生物学的手法によるものが少数存在するのみである。特に生きた状態でサブユニット構成を示した報告はほぼ皆無であり、本研究の学術的独自性であると考えられる。さらに透明で心臓を生きたままイメージングできるゼブラフィッシュ幼魚を使用することで、イオンチャネルのサブユニット構成と心臓機能を対比しながら研究をすすめることができ、これまでになく創造性のある成果が期待された。

3. 研究の方法

(1) **KCNQ1** チャネルと **KCNE1**、**KCNE3** をそれぞれアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させ、それらが複合体を構成したときの、機能修飾メカニズムについて、電気生理学的手法と蛍光強度変化測定による構造変化解析を適用した。**KCNQ1-KCNE3** の複合体解析 (Sun & MacKinnon, Cell, 2020) を基に、特に **S1** セグメントに注目して、網羅的に **S1** セグメントの変異体を作成し、**KCNE3** および **KCNE1** の機能修飾メカニズムについて解析を行った。

(2) 新規の遺伝子 **KCNE6** をゼブラフィッシュより同定した。**KCNE6** をさまざまな動物種よりクローニングし、アフリカツメガエル卵母細胞を用いて電気生理学的解析を行った。また、その **KCNE6** と **KCNE1** について、その発現を解析する目的でゼブラフィッシュの各遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、それに **GFP** を繋いで、ゼブラフィッシュでの発現を解析した。

(3) **KCNE4** サブユニットの生理機能を明らかにする目的で、**KCNE4** による **KCNQ1** チャネルの抑制メカニズムについて検討した。**KCNQ1** の **S1** セグメントの各種変異体を、電気生理学的手法により解析した。また細胞内領域のみのタンパク質をアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させ、**KCNQ1** チャネルを抑制するかどうかを検討した。

4. 研究成果

(1) **KCNE3** が **KCNQ1** チャネルを常時開状態にするメカニズムを明らかにするため、構造上における相互作用部位である、一番目の膜貫通領域 **S1** セグメントの **KCNQ1** チャネル変異体を網羅的に作成した。その結果、**KCNE3** と直接相互作用しているすべての **S1** 上のアミノ酸残基について、少しでも側鎖の大きさを変えると、**KCNQ1-KCNE3** の開状態が減弱した。また同様に **KCNE3** の相互作用面に存在するアミノ酸残基を変異させると、やはり **KCNQ1-KCNE3** の開状態が減弱した。以上のことから、**KCNQ1** の **S1** セグメントと **KCNE3** は、非常にタイトに相互作用していることが明らかとなった。Voltage clamp fluorometry (VCF)法により **S4** セグメントの動きを解析すると、**KCNE3** が相互作用することで、**S4** セグメントの中間状態が安定化さ

れることがわかった。以上の成果は、**eLife** 誌に論文として掲載された(**Kasuya & Nakajo, eLife, 2022**)。

次に **KCNE1** についても同様の解析を行った。**KCNE1** も **KCNE3** と同様の形で相互作用すると仮定した(図 1)。**KCNQ1** チャネルを常時開状態にする **KCNE3** とは異なり、**KCNE1** は **KCNQ1** チャネルを開きにくい性質に変換する。**KCNQ1** チャネルの **S1** セグメント変異体を **KCNE1** とアフリカツメガエル卵母細胞に共発現し、その電流を二本刺し膜電位固定法、**VCF** 法により解析したところ、膜貫通領域の下側に変異を入れると **S4** の中間状態が安定化され、膜貫通領域の上側に変異を入れると **S4** の中間状態が不安定化されることがわかった。この成果は現在投稿中である。

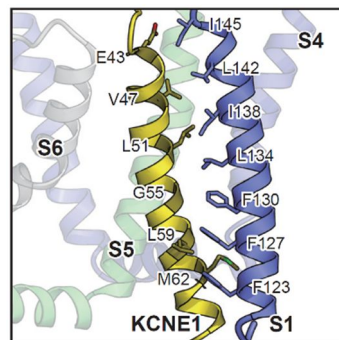


図 1

(2) ゼブラフィッシュより新規の **KCNE** 遺伝子であると考えられる **KCNE6** を同定した。**KCNE6** は **KCNE3** 様のアミノ酸配列を持つものの、**KCNQ1** チャネルと共発現させると、**KCNE1** と同様の遅い電位依存性カリウムチャネル電流を呈することがわかった。**VCF** 法により **S4** セグメントの動きを解析したところ、やはり **KCNE1** と同様に、**F-V** カーブ (**S4** セグメントの電位依存性を示す) が脱分極方向にシフトしていることがわかった。ゼブラフィッシュにおける発現部位を探索する目的で、**KCNE6** のプロモーター領域をゼブラフィッシュゲノムよりクローニングし、**GFP** をつないだコンストラクトを作成し、これを導入したトランスジェニックゼブラフィッシュ (**Tg(kcne6:eGFP)**) を作成した。このゼブラフィッシュにおける **GFP** の発現部位を解析したところ、心臓のみに発現することが明らかとなった(図 2 上)。一方、ヒトなどで心臓に発現する **KCNE1** の発現部位を同様の手法で解析したところ、心臓だけではなく、内耳、側線などに発現が認められた(図 2 下)。

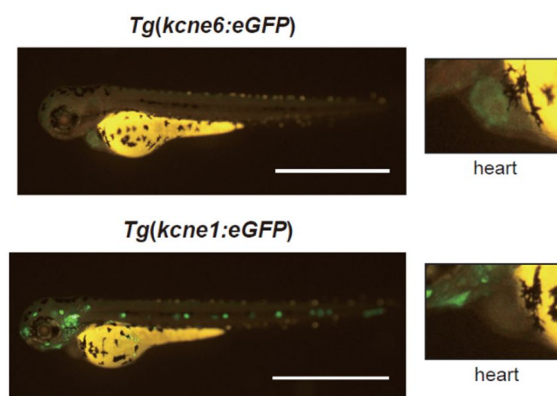


図 2

KCNE6 の遺伝子を様々な脊椎動物のゲノムで検索したところ、魚類から哺乳類まで遺伝子が存在することがわかった。これらのうち、いくつかの動物種の **KCNE6** 遺伝子を全合成し、ヒト **KCNQ1** チャネルの機能を修飾することが可能かどうか、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させて、確認を行った。すると、魚類(ゼブラフィッシュ)、両生類(ネッタイツメガエル)、爬虫類(グリーンアノール)、鳥類(ニワトリ)は機能したが、哺乳類は有袋類(コアラ)では機能したものの、ヒトを含むその他の哺乳類では機能せず、偽遺伝子となっていることが示唆された。したがって、魚類~有袋類では、**KCNE6** が **KCNE1** と心臓で共発現し、ともに心臓の興奮性に影響を与えていると考えられた。一方、胎盤を持つ哺乳類(真獣類)では、**KCNE6** は機能せず、心臓では主に **KCNE1** が **KCNQ1** の修飾サブユニットとして働いていると考えられた。以上の結果は、現在論文投稿準備中である。

(3) **KCNE4** は **KCNQ1** チャネルを抑制することが知られており、心臓などに多く発現しているが、その生理機能はよくわかっていない。その抑制メカニズムについては、15 年以上前に報告が 1 報あるのみであり、細胞内領域の 4 つのロイシン残基(テトラロイシンモチーフ)が重要であると言われているが、それ以降の報告はほとんどない。(1)の研究成果により、**KCNE1** と **KCNE3** においては、**KCNQ1** の **S1** セグメントとの相互作用が重要であることが示された。そこで **KCNE4** においても **S1** セグメントが何らかの役割を果たしていると予想し、**S1** セグメント変異体と **KCNE4** を共発現し、アフリカツメガエル卵母細胞で解析を行った。しかしすべての変異体において、**KCNE4** の抑制効果は減弱することがなかった。さらに膜貫通領域を欠失した細胞内領域のみの変異体を作成し、**KCNQ1** チャネルとともにアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させたところ、細胞内領域のみでもある程度 **KCNQ1** 電流を抑制することがわかった。したがって、**KCNE4** の膜貫通領域は、**KCNQ1** チャネルの抑制には重要ではないことがわかった。

KCNE4 の細胞内領域のうち、**KCNQ1** チャネルの抑制に重要なところを、デリーション変異体のシリーズを作成して解析したところ、これまでに報告されているテトラロイシンモチーフの他に、重要だと考えられる、約 10 アミノ酸からなる領域を同定した。この領域にはセリン残基が多く含まれており、**KCNQ1** チャネルと相互作用することでチャネル機能を抑制すると予想される。現在その抑制メカニズムの詳細を明らかにするために、研究を継続している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Liu Jiaying, Kasuya Go, Zempo Buntaro, Nakajo Koichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Two HCN4 Channels Play Functional Roles in the Zebrafish Heart	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2022.901571	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 Kasuya Go, Nakajo Koichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Optimized tight binding between the S1 segment and KCNE3 is required for the constitutively open nature of the KCNQ1-KCNE3 channel complex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.81683	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 Nakajo Koichi, Kasuya Go	4. 巻 12
2. 論文標題 Modulation of potassium channels by transmembrane auxiliary subunits via voltage sensing domains	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e15980
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14814/phy2.15980	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15件（うち招待講演 5件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 中條浩一、糟谷豪
2. 発表標題 構造情報を基盤とした電位依存性イオンチャネル複合体の研究手法
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

1. 発表者名 Koichi Nakajo, Go Kasuya
2. 発表標題 Functional impact of the interaction between S1 segment and KCNE subunit in the modulation of KCNQ1 channels
3. 学会等名 Biophysical 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Koichi Nakajo
2. 発表標題 Gating modulation of voltage-gated K ⁺ channels by auxiliary subunits via voltage-sensing domains
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Go Kasuya, Koichi Nakajo
2. 発表標題 Proper interaction between the S1 segment of KCNQ1 and KCNE3 is required for the constitutively open nature of the KCNQ1-KCNE3 K ⁺ channel complex
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 Koichi Nakajo
2. 発表標題 Gating modulation by macromolecular complex formation in voltage-gated K ⁺ channels
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Go Kasuya, Koich Nakajo
2. 発表標題 The proper distance between the S1 segment and KCNE3 is crucial for the constitutively open nature of the KCNQ1-KCNE3 K ⁺ channel
3. 学会等名 第99回日本生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Jiaying Liu, Go Kasuya, Buntaro Zempo, Koichi Nakajo
2. 発表標題 Pharmacological properties and physiological roles of two zebrafish HCN4 channels
3. 学会等名 第99回日本生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Koichi Nakajo, Go Kasuya
2. 発表標題 A role of the S1 segment in KCNQ1 modulation by KCNE
3. 学会等名 Kv7 Channels Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Koichi Nakajo, Go Kasuya
2. 発表標題 Gating Modulation of KCNQ1 Channels by KCNE Subunits: A Structure-guided Approach
3. 学会等名 The 9th International Ion Channel Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Jiaying Liu, Go Kasuya, Buntaro Zempo & Koichi Nakajo
2. 発表標題 The distinct biophysical properties and physiological roles of two zebrafish HCN4 pacemaker channels
3. 学会等名 The 10th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Koichi Nakajo, Go Kasuya
2. 発表標題 Structure-guided approach to elucidate modulation of voltage-gated potassium channels through voltage-sensing domain by auxiliary subunits
3. 学会等名 日本生理学会 第101回大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Minami Nakamura, Go Kasuya, Koichi Nakajo
2. 発表標題 Interaction sites required for the KCNQ1 channel inhibition by KCNE4
3. 学会等名 日本生理学会 第101回大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Jiaying Liu, Go Kasuya, Koichi Nakajo
2. 発表標題 A unique extracellular S4-S5 coupling in HCN channels regulates the voltage-dependent gating
3. 学会等名 日本生理学会 第101回大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

上皮細胞でのK⁺リサイクルに関わるイオンチャネル複合体が生理条件下で常に開状態になる仕組みを解明
<https://www.jichi.ac.jp/news/research/2022111402/>
上皮細胞でのカリウムイオンリサイクルに関わるイオンチャネル複合体が生理条件下で常に開状態になる仕組み
<http://physiology.jp/science-topic/25887/>

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	善方 文太郎 (ZEMPO Buntaro)		
研究協力者	糟谷 豪 (KASUYA Go)		
研究協力者	劉 嘉瑩 (RYU Kaei)		
研究協力者	大熊 清子 (OHKUMA Seiko)		

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			
イタリア	ミラノ大学			