

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06793

研究課題名(和文) THIKチャンネル遠位C末端領域によるゲート制御機構の分子基盤の解明

研究課題名(英文) The distal C-tail of THIK channel regulates the channel gating

研究代表者

立山 充博 (Tateyama, Michihiro)

生理学研究所・分子細胞生理研究領域・准教授

研究者番号：30276472

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)：本研究は、「THIKチャンネル遠位C末端領域によるゲート制御機構の分子基盤の解明」を目的とした研究である。我々は、非天然光クロスリンクアミノ酸 4-azido-phenylalanine (AzF) を利用することで、まず、遠位C末端のLeu398がチャンネル機能の制御に重要であることを見出した。また、ゲーティングに重要な膜貫通部位に位置するアミノ酸残基にAzFを導入したチャンネルの機能解析から、Leu398へのアラニン変異によりAzF導入チャンネルの紫外線応答が有意に変化することを見出した。以上により、遠位C末端領域が膜貫通部位の構造に影響を与え、その活性を制御することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、THIK-1チャンネルの遠位末端領域がゲーティングを担う膜貫通部位の構造に影響を与えることが明らかとなり、この成果はイオンチャンネル制御機構の解明に寄与するものと思われる。THIK-1チャンネルは、免疫細胞の機能に重要な役割を持つこと、アルツハイマー病において発現量が増加することが報告されている。Gタンパク質共役型受容体による機能制御に加え、C末端領域がゲーティングに影響を与えるという知見は、免疫細胞におけるTHIK-1の役割を理解するのに貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：A two-pore domain K<sup>+</sup> (K2P) channel, THIK-1, has been reported to play important roles in microglia and macrophage and the channel conductance is regulated by C-terminal tail. We investigated the effects of distal C-tail on the channel activity, by introducing an unnatural cross-linking amino acid, 4-amido-phenylalanine (AzF), into residues at the distal C-tail and found that L398AzF mutant was significantly potentiated upon the UV-exposure. As the inner helices of K2P are thought to serve as a regulatory domain, we further investigated the effect of the C-tail on the conformation of the inner helices. The incorporation of AzF into the residues located at the inner helices made the mutants to respond to the UV-exposure, while the additional L398A mutation changed the extent and/or direction of the responses. These results show that Leu398 at the distal C-tail of THIK-1 is involved in the regulatory mechanism of the channel activity.

研究分野：分子細胞生理学

キーワード：THIK channel Unnatural amino acid mechanism

## 1. 研究開始当初の背景

K<sup>+</sup> チャネルの開閉を担うゲートは K<sup>+</sup> イオン排出量を制御することで多様な細胞応答をもたらす。2つのポア領域と4つ膜貫通部位を有する2ポア型 K<sup>+</sup> チャネル (K2P) の一つである THIK チャネルは、機能修飾は受けないと考えられていた。しかしながら、研究当初に、THIK-1 のゲート制御が microglia の ATP 応答に重要な役割を持つことが報告された。また、Gi/o-R による THIK-1 活性化が microglia プロセスの生理機能に重要な役割を持つことが報告され (Madry et al, Neuron. 2018) caspase 8 による C 末端領域切断がチャネル機能を亢進しアポトーシスを招くという可能性が示唆された (Sakamaki et al, Biochim Biophys Acta. 2016)。これに加え、研究代表者は、Gq-R による THIK-1 および THIK-2 の活性化を見出していたが、その詳細な仕組みについては明らかになっていなかった。研究代表者は、予備実験により、caspase 8 による切断部位に終始コドン挿入した THIK-1 変異体は、基礎電流密度の上昇と Gq 応答の減弱を示すという結果を得ており、C 末端領域がチャネルゲーティングを制御するという可能性を見出していた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、「THIK チャネル遠位 C 末端領域によるゲート制御機構の分子基盤の解明」である。そのため、まず、THIK-1 チャネルの機能に影響を与える C 末端部位および重要なアミノ酸残基を同定し、重要な C 末端アミノ酸残基への変異導入より、その関与を確認する。次に、非天然クロスリンクアミノ酸をゲーティングに関わる膜貫通部位に導入し、クロスリンクによる電流量変化からゲーティングに関わる膜貫通部位を明らかにしたうえで、C 末端変異体が膜貫通部位に及ぼす影響を解析し、C 末端領域がゲート制御機構を有することを明らかにする。これに加え、C 末端領域と相互作用するチャネルドメインを明らかにすることも目的の一つであった。

## 3. 研究の方法

Gq-R 刺激によるゲート構造の変化を捉えるために、紫外線照射により N=N=N 基が活性化し数以内の官能基と不可逆的に反応する光クロスリンクアミノ酸 4-azido-phenylalanine (AzF) を THIK チャネルに導入した。具体的には、ゲートを構成すると考えられるポアドメインや膜貫通部位、あるいは遠位 C 末端に位置する任意のアミノ酸残基のコドンアンバーコドン (TAG) と置き換えた construct と市販の AzF 用 tRNA 合成酵素の cDNA を CHO 細胞へ導入し、AzF 導入 THIK チャネル (THIK-AzF) を発現させた。パッチクランプ法により、THIK-AzF の電流記録を行い、基礎電流密度、Gq 応答および紫外線照射による電流量変化について解析した。また、遠位 C 末端領域による直接的・間接的なゲート制御について検討するために、膜貫通部位に AzF を導入したチャネルの C 末端領域に変異を導入し、その効果を調べた。

THIK-AzF チャネルの C 末端領域に FLAG タグを付加し、紫外線照射によるクロスリンク反応がサブユニット間で起こるのか、サブユニット内で起こるのかについても、Western blot 法により検討した。

## 4. 研究成果

### (1) ゲーティング制御に関わる C 末端領域アミノ酸残基の同定

C 末端領域に存在する各アミノ酸残基に AzF を導入した THIK-1 チャネル (THIK-1-C-tail-AzF, 図 1 上部) の電流記録を行い、紫外線照射によるクロスリンク反応の効果を調べたところ L398AzF および E400AzF チャネルに有意な電流量増加が見られた (図 1)。この結果は、これらの残基近傍に存在する相手とのクロスリンク反応により電流量が増加したことを意味する。そこで、これらの部位に変異を導入し、その影響を調べた。変異としては、Leu398 にサイズの小さい Ala を、Glu400 に荷電のない Gln を導入した。その結果、C 末端を削除した時に見られた、基礎電流密度の増加と Gq 応答の減弱が L398A 変異チャネルにて確認された。以上の結果から、Leu398 残基が、チャネルの細胞内ドメイン、あるいは、他のタンパク質と相互して、THIK-1 チャネルのゲーティングを制御することが示唆された。

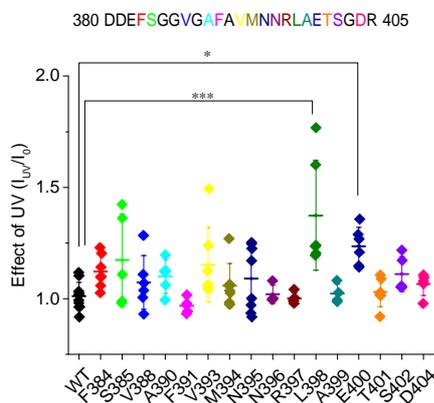


図 1. 紫外線照射による電流量変化

THIK-1 チャンネルと相動性が高く、同じグループに属する THIK-2 チャンネルにおいても、遠位 C 末端領域の 10 アミノ酸残基の消失による基礎電流密度を増加と Gq 応答の減弱が確認されていた。そこで、C 末端領域に位置する各アミノ酸残基に AzF を導入し、THIK-1 と同様な実験を行った。その結果、紫外線照射により V419AzF チャンネルの電流量が優位に増加するという結果を得た。しかしながら、Val419 は、C 末端から 21 残基離れており、C 末端領域を削除したコンストラクトの結果との対応に問題を生じさせた。以降、THIK-1 チャンネルを中心に研究を展開した。

### (2) ゲーティングに関わる膜貫通部位領域に位置するアミノ酸残基への AzF の導入

ゲーティングに関わる第 2 および第 4 膜貫通部位 (M2 および M4) の細胞内に近い各アミノ酸残基に AzF を導入した THIK-1 チャンネル (THIK-1-TM-AzF) を作成し、チャンネルとしての機能を調べ、また、紫外線照射によるクロスリンク反応の効果を調べた。作成した、すべてのコンストラクトが、Gq 刺激による電流増加、もしくは、紫外線照射による電流量の変化を示し、チャンネルとして機能することが確認された (図 2: 各コンストラクトの 0 mV における電流量変化)。一方、L146AzF および V278AzF チャンネルは、大きな基礎電流密度と紫外線照射による電流量変化を示したが、Gq 応答は示さなかった。この結果は、これらのアミノ酸残基が Gq 応答において重要な働

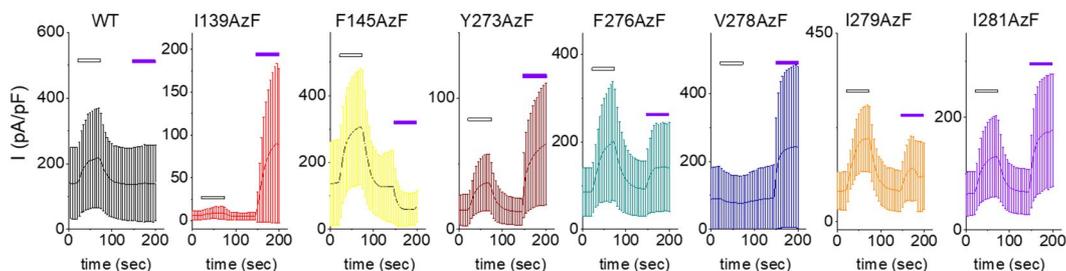


図 2. 電流量の経時変化 (white bar: Gq agonist, violet bar; UV exposure)

きを持つことを意味している。これは、本研究の過程で得られた重要な知見である。

### (3) THIK-1-AzF チャンネルのクロスリンク反応相手の検索

THIK-1-AzF チャンネルの多くは、紫外線照射による電流量変化を示した。これは、光クロスリンク反応によるものと考えられるが、そのためには反応相手が存在することになる。特に、遠位 C 末端領域と相互作用する部位の解明は、そのゲーティング制御機構の詳細を解明するのに重要であった。そこで、C 末端に FLAG タグを挿入したコンストラクトを野生型 THIK-1 チャンネルおよび THIK-1-AzF チャンネルについて作成し、FLAG 抗体を用いたウェスタンブロットを行った。野生型に FLAG タグを付加したものでは、単量体のサイズに強いバンドが確認されたが、L398AzF や E400AzF に FLAG タグを付加したコンストラクトでは、非常に弱いバンドが確認されるとともに、高分子量的位置にもバンドが確認された。これは、チャンネルの凝集によるものか、AzF の取り込み効率が悪く L398stop や E400stop コンストラクトが作成されたと結果ととらえることができる。一方、THIK-1-TM-AzF チャンネルに FLAG タグを付加したものでは、単量体および 2 量体サイズの強いバンドが確認された。これは、AzF の取り込みシステム自体には問題がないことを示すとともに、AzF 導入部位と FLAG 付加部位が近接していることが問題となっている可能性も示唆した。これらの問題点については、解決するための十分な時間が得られなかったため、下記の実験を優先的に進めた。

### (4) THIK-1-TM-AzF チャンネルへの L398A 変異の影響

各 THIK-1-TM-AzF チャンネルに L398A を導入し、その影響を調べた。特に、光クロスリンク反応による電流量の変化に着目した。

これは、電流量変化をもたらす光クロスリンク反応の効率が AzF と反応相手の距離に大きく依存するためであり、電流量変化の増減を距離の変化ととらえることができるためである。

図 3 に示すように、Leu398 を維持したコンストラクトの紫外線照射に対する反応 (open symbols) が、L398A 変異により変化するものが確認された (filled symbols)。光クロスリンク反応は、AzF と反応相手の距離が 3 以内でないことと起こらないことから、反応性の減弱は、その距離が大きくなったことを意味する。また、

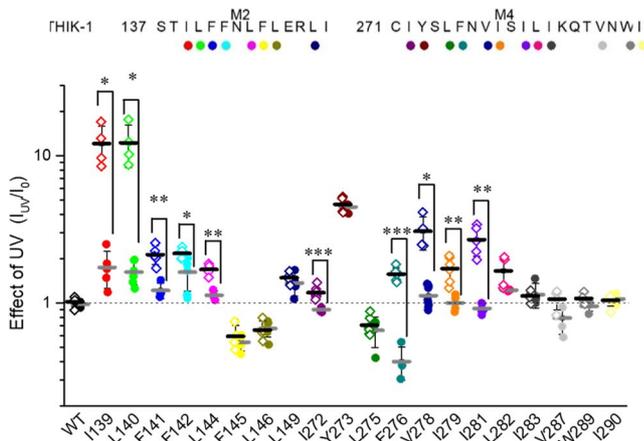


図 3. 紫外線照射依存性電流量変化に対する L398A の影響

反応性が反転した理由として、反応相手の変化、もしくは、反応前後における全体構造の変化が挙げられる。いずれの場合も、遠位 C 末端領域に位置する Leu398 の変異が細胞膜貫通領域の M2 および M4 の配置を変化させることを意味している。

以上の結果から、遠位 C 末端領域が THIK-1 チャネルの膜貫通部位の配置を制御することでゲーティングを制御することが明らかとなった。また、遠位 C 末端領域と相互作用するタンパク質あるいは THIK-1 チャネルのドメインについては、今後の研究にて明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2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
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 Tateyama Michihiro, Kubo Yoshihiro	4. 巻 18
2. 論文標題 Regulation of the two-pore domain potassium channel, THIK-1 and THIK-2, by G protein coupled receptors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0284962
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0284962	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 立山充博、久保義弘
2. 発表標題 THIK-1 チャネル活性化における膜貫通部位の役割
3. 学会等名 日本生理学会100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Michihiro Tateyama, Yoshihiro Kubo
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 立山充博、久保義弘
2. 発表標題 遠位C末端領域によるTHIK-1チャネルの活性制御
3. 学会等名 第101回日本生理学会大会
4. 発表年 2024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