

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590292

研究課題名(和文) KCNQ1 - KCNE1 イオンチャネル複合体の結合状態と電流キネティクスの関係

研究課題名(英文) Stoichiometry and current kinetics of KCNQ1-KCNE1 ion channel complex

研究代表者

中條 浩一 (Nakajo, Koichi)

生理学研究所・分子生理研究系・助教

研究者番号：80390699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：心臓の電位依存性カリウムチャネルKCNQ1チャネルについて、その修飾サブユニットのKCNE1がKCNQ1電流へ与える影響について検討した。KCNE1の結合数が増えるほどチャネルが開きにくくなることが明らかとなり、またKCNE1をKCNQ1から遠ざけるほどKCNQ1電流の活性化が遅くなることもわかった。別の電位依存性カリウムチャネルであるKv4チャネルについても、KCNQ1と同様に、修飾サブユニットKChIPおよびDPP10の発現量依存的にKv4電流の性質が変化することを明らかにした。以上の結果により、心臓などにおいて、イオンチャネル修飾サブユニットの発現量が重要である可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：I investigated how the expression level of KCNE1 affected the slow current kinetics of a cardiac voltage-gated potassium channel KCNQ1. I found that the more binding of KCNE1 to KCNQ1, the less activity KCNQ1 showed. I also found that the longer the distance between the two subunits, the slower the activation kinetics became. In another cardiac voltage-gated potassium channel Kv4, the current kinetics was also dependent on the expression level of its auxiliary subunits KChIP4 and DPP10. The expression levels of auxiliary subunits for ion channels could be a key factor in cardiac excitability.

研究分野：イオンチャネルの分子生理学・生物物理学

キーワード：イオンチャネル カリウムチャネル 蛍光イメージング KCNQ1 KCNE1 全反射蛍光顕微鏡 Kv4

1. 研究開始当初の背景

(1) 心臓の電位依存性カリウムチャンネルである KCNQ1 は、不整脈の一種 QT 延長症候群の原因遺伝子であることから明らかのように、心臓の電氣的活動あるいはポンプ機能において重要な働きを担っている。KCNQ1 には KCNE1 と呼ばれる副サブユニットが存在し、心臓において両分子が膜機能複合体を形成して働いていると考えられている。研究代表者のこれまでの成果により、一つの KCNQ1-KCNE1 複合体には、4 分子の KCNQ1 と 0 ~ 4 分子の KCNE1 が含まれていることが明らかとなっていた。そして KCNE1 の結合数は、KCNE1 の KCNQ1 に対する相対的な発現密度に応じて変化することがわかっていたが、その生理的な意義とメカニズムについては不明であった。

(2) KCNQ1 以外のイオンチャンネル複合体において、相対発現レベル依存的なストイキオメトリーの変化が生じる例が存在するかどうか不明であった。

2. 研究の目的

(1) KCNQ1 と KCNE1 の発現比をコントロールすることにより、KCNQ1 と KCNE1 の結合状態がイオンチャンネルの性質に与える影響を検討することを目的とした。それにより、イオンチャンネル複合体が、従来考えられているような固定されたものではなく、細胞膜上でダイナミックに結合解離するのではないかという仮説を検証することを目的とした。

(2) KCNQ1 と同じく心臓などに発現する電位依存性カリウムチャンネル Kv4 を対象に、その副サブユニットとして知られている KChIP4 と DPP10 の 2 種類のタンパク質それぞれについて、Kv4 に対する相対発現密度依存的なストイキオメトリー変化を検討し、イオンチャンネル複合体の相対発現量依存的

なストイキオメトリーの変化が、KCNQ1 チャンネル以外にも起こっているか検証した。

3. 研究の方法

(1) KCNQ1 と KCNE1 をリンカーでつないだタンデムコンストラクトを作成し、電気生理学的解析により KCNQ1:KCNE1 の分子比が 4:4、4:2、4:1 となっているイオンチャンネル複合体の電流の性質を調べた。さらにリンカーの長さの異なるさまざまなコンストラクトを作成し、電流への影響を検討した。KCNQ1-KCNE1 間にダイナミックな相互作用が存在するのであれば、リンカーの長さによって電流の性質が変化するのではないかと予想した。

(2) GFP 等の蛍光タンパク質をつないだ KChIP4 あるいは DPP10 をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、全反射蛍光顕微鏡下で一分子レベルのイメージングを行い、直接蛍光分子の数を数えることで決定した。

4. 研究成果

(1) KCNQ1 および KCNE1 の cRNA をそれぞれアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させた。両遺伝子の cRNA 量比をさまざまに変えたとき、電流活性化のキネティクスにどのような変化が生じるかを、電気生理学的手法により解析、比較した。KCNQ1 に対して、KCNE1 の発現量が増えるほど、電流活性化のキネティクスは遅くなった。KCNE1 の結合数が増えることで KCNQ1 が活性化しにくくなっていることが示唆された。

(2) 1 つの KCNE1 遺伝子に対し、1 ~ 4 分子の KCNQ1 遺伝子をつなぎ、KCNQ1-KCNE1 複合体のストイキオメトリーがそれぞれ 4:4、4:2、4:1 となるようなタンデムコンストラクトを作成した。KCNE1 分子が結合するほど、KCNQ1 チャンネルが開く電位の閾値が脱分極側にシフトし、活性化しにくくなっていた(図 1)。活性化のキネテ

イクスも、4:4 チャンネルでは遅くなっていた。

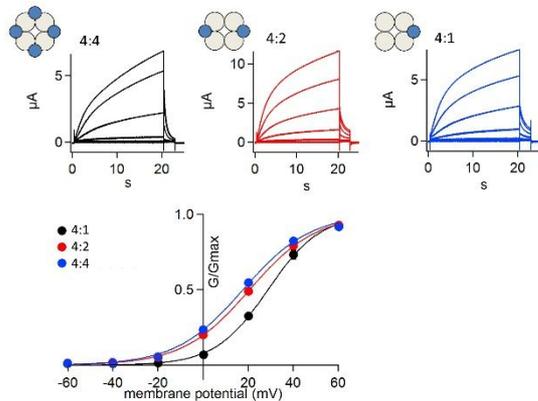


図1. タンデムコンストラクトの電流と活性化曲線

(3) タンデムコンストラクト中の KCNE1 と KCNQ1 をつないでいるリンカーの長さを変え、KCNQ1 電流のキネティクスにおける影響を検討した。リンカーの長さはそれぞれ 34、100、268 アミノ酸長のものを導入した。リンカーの長さが長くなるほど電流活性化のキネティクスが遅くなった(図2)。

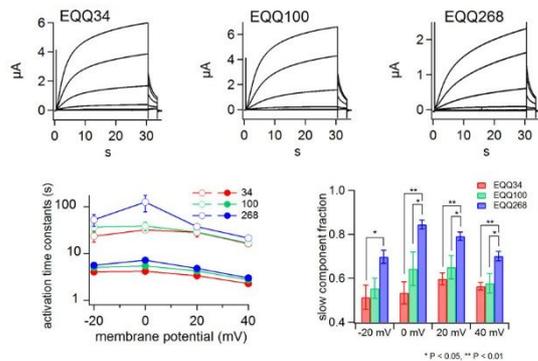


図2. リンカーの長さによる活性化キネティクスの変化
リンカーが長いということは、KCNE1 が KCNQ1 から遠く離れていることになるので、KCNE1 の結合する確率はさがると考えられる。したがって、リンカーが長くなるほど活性化のキネティクスが遅くなるというのは、直感的には(1)、(2)の結果と矛盾する。しかしながら、リンカーの長さに応じて電流の性質が変わるということは、KCNQ1 と KCNE1 の間にダイナミックな結合解離が生じていることを示唆する結果である。本当に細胞膜上で結合解離が起きているかどうかを検証することは今後の課題である。

(4) 電位依存性カリウムチャンネル Kv4.2 と、その細胞内ドメインに結合する副サブユニット KChIP4 とのストイキオメトリーを一分子蛍光イメージングにより検討した。KChIP4 は四量体の Kv4.2 に対し最大4分子結合すること、そしてその結合数は Kv4.2 と KChIP4 の相対発現密度依存的に変化するを見出した(図3)。KCNQ1-KCNE1 と同様、ストイキオメトリーが発現量に依存して変化することがわかった。

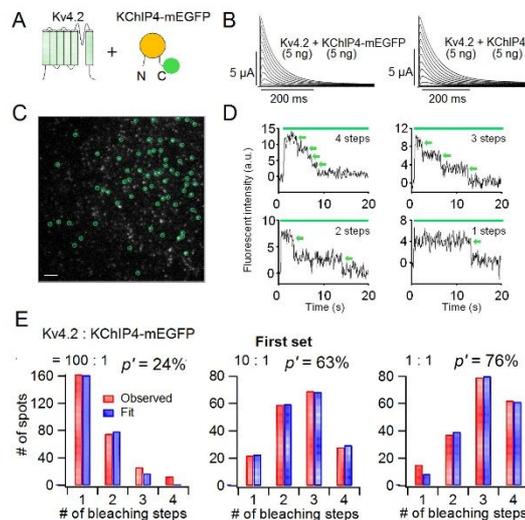


図3. 一分子イメージングによる Kv4.2 チャンネル複合体中の KChIP4 の分子数の決定

(5) Kv4 のもうひとつの副サブユニットである DPP10 について、KChIP4 と同様にストイキオメトリーを決定し、発現量依存的な変化を決定した。DPP10 は細胞膜タンパク質であり、細胞外に2量体化するための比較的大きなドメインを持つ。DPP10 のみでストイキオメトリーを決定したところ、少なくとも7割が細胞膜上で2量体として存在することが判明した。Kv4.2 とのイオンチャンネル複合体中においては、最大4分子の DPP10 が結合することがわかったが、KChIP4 の場合とは異なり、2分子結合している状態、すなわち 4:2 のストイキオメトリーがもっともよく観察された(図4)。細胞外ドメインが2量体化することで、3分子目、4分子目の DPP10 の結合を妨げていると結論した。

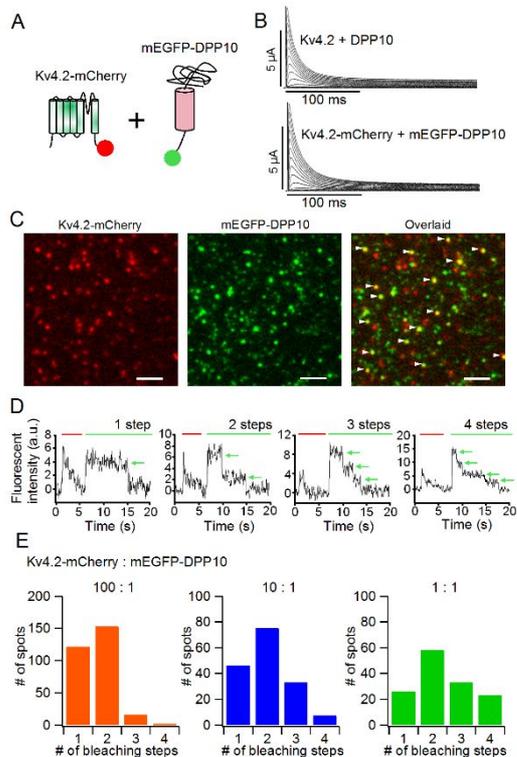


図 4. 一分子イメージングによる Kv4.2 チャンネル複合体中の DPP10 の分子数の決定

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Nakajo K, Kubo Y. KCNQ1 channel modulation by KCNE proteins via the voltage-sensing domain. *J Physiol*, 査読有, in press

doi:10.1113/jphysiol.2014.287672

Nakajo K, Kubo Y. Steric hindrance between S4 and S5 of the KCNQ1/KCNE1 channel hampers pore opening. *Nat Commun*, 査読有, 2014, 5:4100

doi:10.1038/ncomms5100

Kitazawa K, Kubo Y, Nakajo K. The Stoichiometry and Biophysical Properties of the Kv4 Potassium Channel Complex with KChIP Subunits are Variable Depending on the Relative Expression Level. *J Biol Chem*, 2014, 査読有, 289, 17597-17609

doi: 10.1074/jbc.M114.563452

中條 浩一、久保 義弘、電位依存性カリウムチャンネルKCNQ1の複合体ストイキオメトリーと機能制御機構、*生物物理、査読有*, Vol.53、2013、313-316

http://www.biophys.jp/journal/journal_volli.st.php

[学会発表](計 7 件)

中條浩一、QT 短縮症候群を起こす変異を持った KCNQ1 チャンネルの電位センサーの動きの変化、第 92 回日本生理学会大会、2015 年 3 月 21 日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

中條浩一、KCNQ1/KCNE1 チャンネルを開きにくくしている分子メカニズム、第 61 回中部日本生理学会、2014 年 11 月 8 日、名古屋市立大学病院(愛知県名古屋市)

中條浩一、S4 および S5 セグメントのフェニルアラニン残基がつくる電位センサードメインに対する物理的な障壁が KCNQ1/KCNE1 チャンネルのゲーティングを遅くする、第 91 回日本生理学会大会、2014 年 3 月 16 日、鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)

Koichi Nakajo, A pair of phenylalanine residues on the S4 and S5 segments create a physical and energy barrier for the voltage sensor in KCNQ1/KCNE1 channel, Biophysical Society 57th annual meeting, 2014 年 2 月 16 日、Moscone Center (San Francisco, USA)

Koichi Nakajo, Dynamic aspects of the subunit stoichiometry of the KCNQ/KCNE channel complex. IUPS2013 Symposium "Potassium channel complexes: Dynamic aspects of the assembly and regulation towards their physiological roles", 2013 年 7 月 23 日、International Convention Centre (Birmingham, UK)

Koichi Nakajo, Gating modulation of

KCNQ channels via the voltage-sensing domains. シンポジウム「New functions and regulatory mechanisms of a voltage sensor domain」,第 90 回日本生理学会大会、2013 年 3 月 27 日、タワーホール船堀(東京都江戸川区)

中條浩一、イオンチャネル修飾サブユニットの追加による生理機能進化. ワークショップ「実験的アプローチによる生理機能進化の統合的な研究」第 14 回日本進化学会、2012 年 8 月 21 日、首都大学東京南大沢キャンパス(東京都八王子市)

〔その他〕(計 2 件)

日本生理学会ホームページ サイエンストピックス

<http://physiology.jp/science-topic/10510/>

生理学研究所ホームページ プレスリリース

<http://www.nips.ac.jp/release/2014/06/kcnq1kcn1.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中條 浩一 (Nakajo, Koichi)
生理学研究所・分子生理研究系・助教
研究者番号：80390699