

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：37122

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460300

研究課題名(和文)パッチフルオロメトリー法を用いた機械刺激によるパネキシン1の活性化機構の解析

研究課題名(英文)Activation mechanism of Pannexin 1 channel by using patch-fluorometry

研究代表者

野村 健(NOMURA, Takeshi)

九州栄養福祉大学・リハビリテーション学部・准教授

研究者番号：10706790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Pannexin 1は脱分極、機械刺激、酵素による切断、P2X7受容体との相互作用によって活性化し、アポトーシス時の"find-me"シグナルとしてのATP放出に関与することが知られている。Panx1活性は電位依存性を示すが、詳細な開閉機構については謎である。本研究では、パッチクランプ法を用いて、Panx1の電気生理学的特性について検討を行った。その結果、Panx1の開閉速度の膜電位依存性は逆転電位を境にして著しく異なることが示唆された。これらのことより、「charge carrierの移動方向及び単位時間当りの移動量がチャネル開閉速度の膜電位依存性を制御している」という可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Pannexin 1 (Panx1) is activated in response to membrane depolarization, mechanical stress, caspase-mediated cleavage of the C-terminus and interaction with activated P2X7 receptor. Panx1 contributes to release of ATP, and act as a 'find-me' signal that recruits macrophages to apoptic cells. Although the open probability of Panx1 channel increases by membrane depolarization, the detailed single-channel gating kinetics of Panx1 channel is still largely unknown. Here, we investigated the electrophysiological characteristics of mouse Panx1 channel by using patch-clamp technique. The voltage-dependency of single-channel opening and closing rates are dramatically different at hyperpolarized and depolarized potentials in the boundary of the reversal potential. These results suggest that the direction of movement and the quantity of movement per unit time of charge carrier control the voltage-dependent opening and closing rates of Panx1 channel.

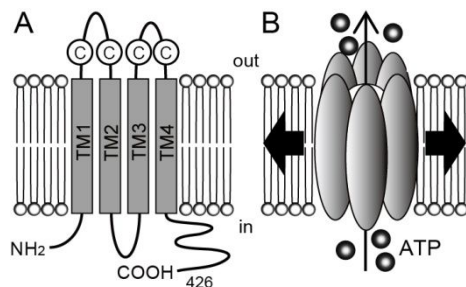
研究分野：機械受容チャネル

キーワード：パネキシン ゲーティングキネティクス 機械受容 膜電位 イオンチャネル

### 1. 研究開始当初の背景

近年、様々な機械受容 (MS: mechanosensitive) チャンルの遺伝子がクローニングされているが、細菌 MS チャンルは結晶構造が分かっており、ゲーティング機構の最も詳細な研究が進められている。我々は、2004 年に大腸菌 MS チャンルの一つである MscL (MS channel of large conductance) の張力感知部位を同定した (Yoshimura, Nomura et al., *Biophys J*, 2004)。また、2006 年にはもう一つの細菌 MS チャンルである MscS (MS channel of small conductance) の張力感知部位を明らかにする (Nomura et al., *Biophys J*, 2006) とともに、最近 MS チャンルを取り巻く脂質環境が MS チャンルの張力感受性に強く影響することを見出した (Nomura et al., *PNAS*, 2012)。このように細菌 MS チャンルにおいては、構造機能関連の最終解明に向けた研究が着々と進められている。

一方、哺乳動物の MS チャンルにおいても世界中で盛んに研究が行われているが、細菌の MS チャンルに比べ大きく遅れをとっているのが実情である。イネキシンのホモログである Pannexin1 (Panx1) は 2003 年に同定され、中枢神経系や腎臓、肝臓など多くの器官で発現している。Panx1 は、陰イオン選択性イオンチャンネルであり<sup>1)</sup>、4 回膜貫通型を有するサブユニットのホモ 6 量体を形成している (図 1A)。アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた電気生理学的測定において、Panx1 は細胞膜の伸展刺激により活性化し ATP を放出することが報告されている<sup>2)</sup> (図 1B)。また、最近の研究では、Panx1 は炎症性腸疾患とも深く関わっていることが報告された<sup>3)</sup>。また、Panx1 は、細胞膜の脱分極、カスパーゼによる切断、活性化した P<sub>2</sub>X<sub>7</sub> 受容体との相互作用によって活性化し、気道上皮での粘液クリアランスやアポトーシス時の "find-me" シグナルとしての ATP 放出に関与することが知られている<sup>4)</sup>。



**図 1 Panx1 チャンルのトポロジーモデル (A) と機械刺激による Panx1 チャンルの活性化と ATP 放出のモデル (B)**

Panx1 チャンルは比較的最近同定されたにも関わらず非常に重要な生理的、病理的現象に関わっている可能性が高い。Panx1 の生理的・病態生理的役割を解明するためには、機械刺激に対する Panx1 の基本的性質 (チャンネルの活性化機構やイオン選択性など) の詳細な解析が必須である。

### 2. 研究の目的

本研究の主目的は、Panx1 の機械刺激に対する活性化機構の解明であるが、具体的には以下の二つの課題の解決を目的とした。

(1) Panx1 チャンルの機械刺激に対する応答を電気生理学的手法 (パッチクランプ法およびパッチクランプフルオロメトリー法) を用いて検証を行う。

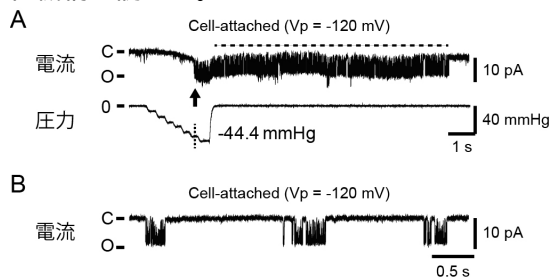
(2) Panx1 チャンルの測定を単一イオンチャンネル電流レベルで行い、電流-電圧曲線、電位依存性、単一イオンチャンネルコンダクタンスおよびイオン選択性などの電気生理学的特性の解析を行う。

### 3. 研究の方法

これまでに多くの Panx1 チャンルの電気生理学的特性の解析が報告されているが、発現系の違いにより解析結果が異なっていたり、単一イオンチャンネルレベルでの解析が殆ど行われていないなど、基本的性質の詳細が明らかではない。本研究では、HEK293 細胞にマウス Panx1 を強制発現させ、パッチクランプ法を用いて Panx1 チャンルの機械刺激に対する応答および機能特性を単一イオンチャンネルレベルで解析を行った。

(1) Panx1 チャンルの機械刺激に対する応答の解析

先行研究と同様にパッチ膜への伸展刺激で Panx1 チャンルの活性化が見られた (図 2A)。この結果から Panx1 は確かに機械刺激に対し応答し、チャンネルが活性化することを確認できた。しかし、先行研究では機械刺激に対する Panx1 チャンルの基本的性質の詳細は報告されていない。本実験では、パッチ膜への伸展刺激に対する Panx1 チャンルの活性化機構を調べた。



**図 2 Panx1 チャンルの単一イオンチャンネル電流。** パッチ電極に陰圧を与えると (下) チャンルの活性が見られる (上: 矢印) (A)。

陰圧をリリースしても、暫くの間チャンネルの開閉が続くヒステリシス現象が見られる (点線)。機械刺激がなくても膜電位の変化でチャンネルが開く (B)。

(2) Panx1 チャンルの機能特性

上述のように、Panx1 チャンルの電気生理学的特性 (単一イオンチャンネルコンダクタンスの値、サブコンダクタンスの有無) は、発現させる細胞の違いにより異なる。本実験では、Panx1 チャンルの単一イオンチャンネル電流の記録を行い、電流-電圧曲線を作成し、電

位依存性、単一イオンチャンネルコンダクタンス、サブコンダクタンスやイオン選択性などの電気生理学的特性の解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) Panx1 チャンネルの機械刺激に対する活性化機構

HEK293 細胞にマウス Panx1 チャンネルを発現させ、セルアタッチモードからガラス電極に陰圧を加え、パッチ膜を伸展すると Panx1 チャンネルの活性が見られた(図 2A)。しかし、Panx1 チャンネルは膜貫通領域に電荷を持ったアミノ酸残基が存在しないにも関わらず膜電位の変化に対してもチャンネルの活性を示すため(図 2B)、Panx1 チャンネルの活性が機械刺激によるものなのか、または膜電位の変化によるものなのか明確に判別できない。そこで、本研究ではこれまでの研究で詳細な検討がなされていない膜電位変化による Panx1 チャンネルの単一イオンチャンネル電流レベルでのゲーティングキネティクスの解析に焦点を当てることにし、パッチクランプ法のみを用いて Panx1 チャンネルの電気生理学的特性を明らかにすることを目的とした。

##### (2) Panx1 チャンネルの単一イオンチャンネルゲーティングキネティクスの解析

##### Panx1 の単一イオンチャンネルコンダクタンス

セルアタッチモードで記録した Cl<sup>-</sup> コンダクタンスは内向き電流では  $17.8 \pm 1.8$  pS、外向き電流では  $78.4 \pm 3.8$  pS という外向き整流性を示した(図 3)。また、F<sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、Br<sup>-</sup>、SCN<sup>-</sup> および Gluconate<sup>-</sup> のそれぞれのコンダクタンスは内向き電流において  $21.7 \pm 2.3$  pS、 $17.7 \pm 2.9$  pS、 $19.9 \pm 2.6$  pS、 $22.6 \pm 2.8$  pS および  $19.8 \pm 3.9$  pS の値をそれぞれ示した。Cl<sup>-</sup> と他の種々の陰イオンとの間に有意な差は見られなかった。

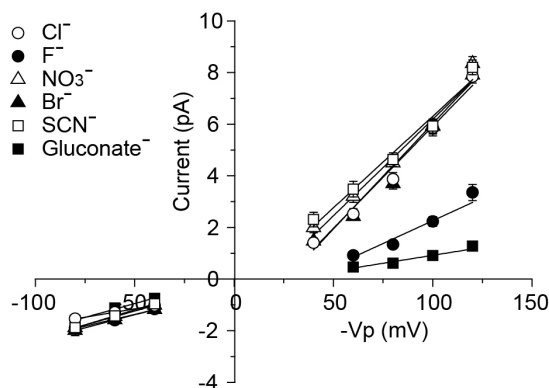


図3 種々の陰イオン (Cl<sup>-</sup>、F<sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、Br<sup>-</sup>、SCN<sup>-</sup> および Gluconate<sup>-</sup>) に対する Panx1 チャンネルの電流-電圧曲線。説明は本文参照。

一方、外向き電流においては、 $44.8 \pm 4.9$  pS、 $80.8 \pm 2.7$  pS、 $81.4 \pm 1.5$  pS、 $70.3 \pm 3.9$  pS および  $13.7 \pm 2.1$  pS の値をそれぞれ示した。F<sup>-</sup> と Gluconate<sup>-</sup> のコンダクタンスは Cl<sup>-</sup> より有意な低下を示した。これらの結果は、内向き電流のコンダクタンスは細胞内の Cl<sup>-</sup> の影響によるものと考えられ、一方、外向き電流のコンダクタンスはピペット溶液に存在する Cl<sup>-</sup>、F<sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、Br<sup>-</sup>、SCN<sup>-</sup> および Gluconate<sup>-</sup> の影響によるものと考えられる。

##### Panx1 チャンネルの単一イオンチャンネルゲーティングキネティクス

Opening rate は過分極時 ( $-V_p = -80$  to  $-40$  mV) および脱分極時 ( $-V_p = +40$  to  $+120$  mV) において増加した(図 4A, B)。Opening rate における過分極時および脱分極時の傾きは過分極時の方が脱分極時よりも大きい傾向を示した。

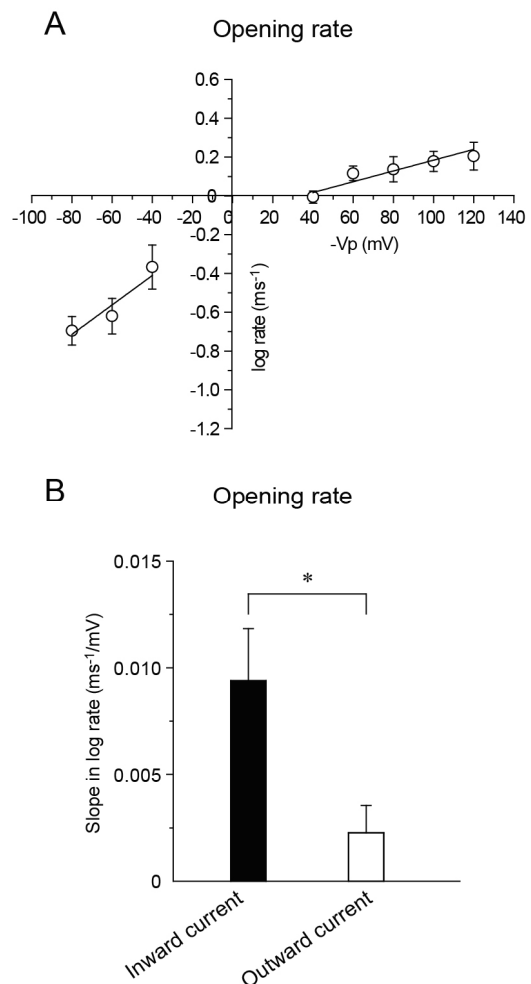
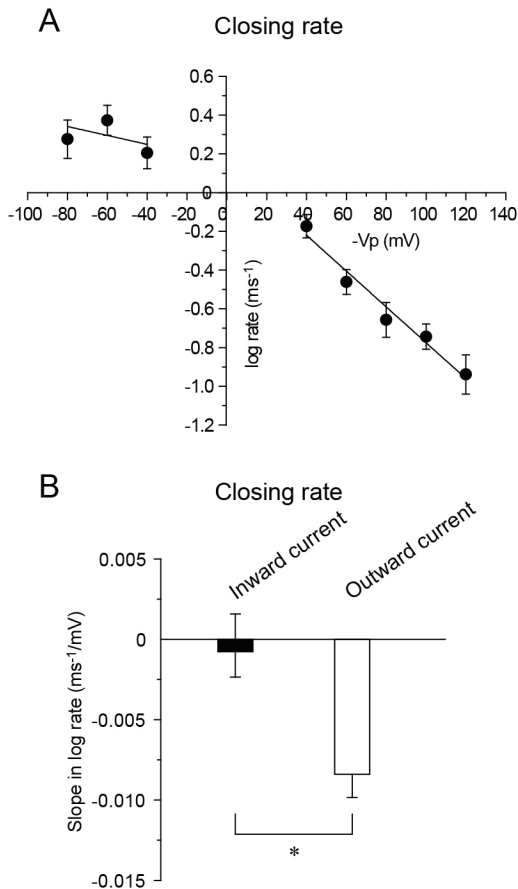


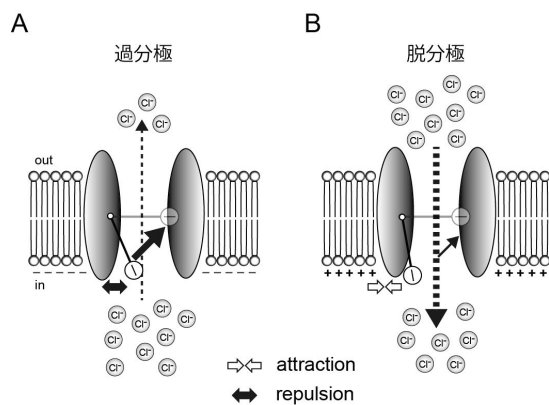
図4 Panx1 チャンネルの単一イオンチャンネル電流の解析(Opening rate)。説明は本文参照。

一方、Closing rate は脱分極時において減少の傾向を示したが、過分極時では変化が見られなかった(図 5A, B)。これらの結果より、Pannx1 チャンネルの単一イオンチャンネルゲーティングキネティクスは逆転電位を境にして変化し、チャンネルを通るイオンの流れる方向に依存していることを示唆している。



**図 5** Pannx1 チャンネルの単一イオンチャンネル電流の解析(Closing rate)。説明は本文参照。

Pannx1 チャンネルは膜貫通領域に電荷を持ったアミノ酸残基が存在しないにも関わらず、単一イオンチャンネル開閉速度が膜電位依存性を示した。我々の仮説としては、Pannx1 チャンネルのゲート付近には負の電荷を持ったアミノ酸残基が存在し、ゲートは細胞質側に開くものと推測している。過分極時には陰イオンの移動(流出)が Pannx1 チャンネルのゲートが閉まる方向と同じであるため、チャンネルのゲートは閉じやすいものと考えられる(図 6A)。一方、脱分極時には陰イオンの移動(流入)が Pannx1 チャンネルのゲートが開く方向と同じであり、イオンが流入することでゲートを開いた状態に保つことができるものと考えられる(図 6B)。このようなことから、Pannx1 チャンネルの開時間の長さは陰イオンの流入の大きさに依存している可能性が示唆される。一方、閉時間は”gating charge”と膜電位との相互作用によって調節されているものと予想される。



**図 6** 過分極時(A)および脱分極時(B)における Pannx1 チャンネルのゲーティングモデル。説明は本文参照。

本研究では、Pannx1 チャンネルの機械刺激による活性化機構を明らかにすることはできなかったが、膜電位の変化に対する単一イオンチャンネル電流レベルでのゲーティングキネティクスの解析により以下のことが明らかになった。

単一イオンチャンネル開閉速度の膜電位依存性は、逆転電位を境にして過分極側および脱分極側で著しく異なることが示唆された。これらのことより、「charge carrier の移動方向および単位時間あたりの移動量が単一イオンチャンネル開閉速度の膜電位依存性を制御している」という可能性を見出した。

<引用文献>

- 1) Ma W, Compan V, Zheng W, Martin E, North RA, Verkhratsky A, Surprenant A. Pannexin 1 forms an anion-selective channel. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 463: 585-592, 2012.
- 2) Bao L., Locovei, S. & Dahl, G. Pannexin membrane channels are mechanosensitive 6 conduits for ATP. *FEBS Lett* 572: 65-68, 2004.
- 3) Gulbransen BD, Bashashati M, Hirota SA, Gui X, Roberts JA, MacDonald JA, Muruve DA, McKay DM, Beck PL, Mawe GM, Thompson RJ, Sharkey KA. Activation of neuronal P2X7 receptor-pannexin-1 mediates death of enteric neurons during colitis. *Nat Med* 18(4):600-604, 2012.
- 4) Chekeni FB *et al.* Pannexin 1 channels mediate ‘find-me’ signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature* 467(7317):863-867, 2010.

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7件)

- Nomura T, Sokabe M, and Yoshimura K: Voltage-dependent inactivation of MscS occurs independently of the positively charged residues in the transmembranedomain. *Biomed Res Int*. 2016:2401657, 2016. (査読有)
- Nomura T, Cox CD, Bavi N, Sokabe M, and Martinac B. Unidirectional incorporation of a bacterial mechanosensitive channel into liposomal membranes. *FASEB J*. 29(10):4334-4345, 2015. (査読有)
- Almanjahie IM, Khan RN, Nomura T, and Martinac B. Hidden Markov analysis of improved bandwidth mechanosensitive ion channel data. *Eur Biophys J*. 44(7):545-556, 2015. (査読有)
- Cox CD, Nakayama Y, Nomura T, and Martinac B. The evolutionary 'tinkering' of MscS-like channels: generation of structural and functional diversity. *Pflugers Arch*. 467(1):3-13, 2015. (査読有)
- Slavchov RI, Nomura T, Martinac B, Sokabe M, and Sachs F. Gigaseal mechanics: creep of the gigaseal under the action of pressure, adhesion, and voltage. *J Phys Chem B*. 118(44):12660-12672, 2014. (査読有)
- Wang Y, Liu Y, Deberg HA, Nomura T, Hoffman MT, Rohde PR, Schulten K, Martinac B, and Selvin PR. Single molecule FRET reveals pore size and opening mechanism of a mechano-sensitive ion channel. *Elife*. 3:e01834, 2014. (査読有)
- Shaikh S, Cox CD, Nomura T, and Martinac B. Energetics of gating MscS by membrane tension in azolectin liposomes and giant spheroplasts. *Channels*. 8(4):321-326, 2014. (査読有)

[学会発表](計8件)

- 白石真土、野村健、樽野陽幸、丸中良典：Pannexin 1 チャネルゲーティングは自らの単一チャネル電流の向き・大きさに依存する 第94回日本生理学会大会 2017年3月28日 アクトシティ浜松(浜松市)
- Martinac AD, Bavi N, Cortes MD, Bavi O, Nomura T, Martinac B, and Perozo E. Structural Dynamics of the MscL C-terminal domain. Biophysical Society 61th Annual Meeting. 2017年2月11日 New Orleans, USA
- Sawada Y, Nomura T, and Sokabe M. Molecular Dynamics Analysis on the Force Transmission Pathway via Inter-Subunit Pathway for Mechano-Gating of Bacterial

- Mechanosensitive Channel MscL. Biophysical Society 61th Annual Meeting. 2017年2月11日 New Orleans, USA
- Nomura T, Shiraishi M, Taruno A, Sokabe M, and Marunaka Y. Current-direction/amplitude-dependent single channel gating kinetics of Pannexin 1 channel. International Symposium on Ion Channels, Transporters and Signal Transduction. 2016年5月21日 京都ホテルオークラ(京都市)
- Nomura T, Taruno A, Nakahari T, Sokabe M, and Marunaka Y. Voltage-dependent single-channel gating kinetics of mouse pannexin 1 channel. 第92回日本生理学会大会 2015年3月21日 神戸コンベンションセンター(神戸市)
- Nomura T, Taruno A, Nakahari T, Sokabe M, and Marunaka Y. Single-channel gating kinetic analysis of mouse pannexin 1 channel. 上皮バリア・輸送に関するシンポジウム 2014年11月1日 立命館大学(草津市)
- 野村健、樽野陽幸、中張隆司、曾我部正博、丸中良典：Pannexin 1の単一イオンチャネルゲーティングキネティクス解析 生理研研究会『粘膜免疫学と膜輸送生理学の融合』 2014年10月28日 岡崎生理学研究所(岡崎市)
- 野村健、樽野陽幸、中張隆司、曾我部正博、丸中良典：Pannexin 1の単一イオンチャネルゲーティングキネティクスの膜電位依存性 第107回近畿生理学談話会 2014年10月25日 兵庫医科大学(神戸市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

野村 健 (NOMURA Takeshi)  
九州栄養福祉大学・  
リハビリテーション学部・准教授  
研究者番号：10706790

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者 なし