

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08552

研究課題名(和文) 心臓におけるKCNQ1チャネル修飾サブユニットの機能解明

研究課題名(英文) Functional analysis of auxiliary subunits of KCNQ1 channels in the heart

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：生体内でのKCNQ1チャネルの機能を明らかにする目的で、KCNQ1と修飾サブユニットKCNE遺伝子を同定、単離した。その中のKCNE3のオーソログと思われた遺伝子が、実はまったく新しいKCNE遺伝子であることが判明した。この新規遺伝子が実際にKCNQ1チャネルの修飾サブユニットとして機能していることを電気生理学的解析により確認した。この遺伝子を含むKCNQ1関連遺伝子にGFPをつなげたものを発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを現在作成中である。KCNE3がKCNQ1を常時開状態にするメカニズムについて、KCNE3とKCNQ1の相互作用に関わるいくつかの重要なアミノ酸を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

KCNQ1は心臓、内耳、腎臓、脾臓、胃腸、気管支の上皮細胞など、体中のあらゆる場所に発現する、生理学的に非常に重要なイオンチャネルである。実際、不整脈、難聴、糖尿病などの疾患との関連が知られている。KCNQ1は体の各部位で異なるKCNEサブユニットと複合体を作っていることが知られており、その発現部位、複合体構成を知ることは、KCNQ1チャネルをターゲットとした創薬研究などにおいて重要な意味を持つ。

研究成果の概要(英文)：To investigate the in vivo functions of KCNQ1 channels, we identified and isolated the KCNQ1 channel ortholog and its auxiliary subunit KCNE orthologs from the zebrafish cDNA library. It turned out that the KCNE3-like gene from zebrafish was a newly-identified KCNE gene. Furthermore, we confirmed that the new KCNE gene works as a KCNQ1 modulator using *Xenopus oocytes* as an expression system. We are now analyzing the expression and functions of the new KCNE gene in zebrafish. We are also making transgenic zebrafish that express GFP-tagged KCNQ1 and KCNE genes. It is still a work in progress. Another result we obtained in the project is that we found the mechanism of how KCNE3 modulates KCNQ1 channels. It has been known that KCNE3 makes the KCNQ1 channel constitutively open channel. By taking advantage of the newly-revealed KCNQ1-KCNE3 structure, we identified several critical amino acid residues in the KCNE3 and S1 segment of the KCNQ1 channel.

研究分野：分子生理学

キーワード：イオンチャネル KCNQ1チャネル 複合体 ゼブラフィッシュ 修飾サブユニット KCNEタンパク質 電気生理学 イメージング

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

心臓がポンプとして正しく機能するためには、その膜興奮性を制御する各種のイオンチャンネルが、それぞれのタイミングで正しく開閉することが必要である。それが破綻すると、心臓のリズムが乱れて不整脈が起こる。例えば不整脈の一種である QT 延長症候群は、カリウムチャンネルをはじめとするイオンチャンネル、あるいはその機能修飾タンパク質の異常により、心室筋の活動電位が延長した状態である。QT 延長症候群などの不整脈は、イオンチャンネルが原因で起こるチャンネル病(channelopathy)の代表的なものの一つである。

研究代表者は、QT 延長症候群の原因遺伝子の一つである KCNQ1 チャンネルを中心に研究をすすめ、KCNE1 をはじめとする修飾サブユニット KCNE が、KCNQ1 チャンネルのゲーティングを変化させるメカニズムを明らかにする目的で研究を行ってきた。そしてその中で、複数種類の KCNE タンパク質が同時に結合し、非常に多様な KCNQ1/KCNE タンパク質複合体が存在する可能性を提示していた。しかし、以前の研究は主にアフリカツメガエル卵母細胞等、発現系での研究であり、実際に生体内で KCNQ1 と KCNE タンパク質がどのような組み合わせの複合体で存在し、そして機能しているのかについて知ることが、KCNE タンパク質によっておこる各種の心臓疾患を理解するためにも重要であった。

実際 KCNE タンパク質には KCNE1 から KCNE5 まで、5 種類の遺伝子が存在することが知られており、そのすべてが KCNQ1 に結合し、ゲーティングをはじめとするチャンネル機能を修飾することができる。例えば KCNQ1 と KCNE3 が複合体を構成すると、電位依存性が失われた常時開状態のカリウムチャンネルを構成する。この KCNQ1/KCNE3 チャンネルは、腸や気管の上皮細胞ではカリウムイオンのリサイクルを行うことで塩化物イオンの輸送に重要な役割を果たしている。心臓での機能ということでは KCNQ1/KCNE1 複合体チャンネルの理解が最も進んでいるが、一方ですべてのサブタイプが心臓で発現していることが知られていた。そして実際 KCNE3 は心室細動を生じるブルガダ症候群の原因遺伝子として同定されており、KCNE4 も最近心房細動との関連が指摘されている。これらのタンパク質がどのような機序で不整脈を引き起こすのか、そして心臓では本来どのような生理機能を担っているのかなど、不明な点は多く残されていた。

2. 研究の目的

(1) 心臓の電位依存性カリウムチャンネル KCNQ1 の機能(電流)は、KCNQ1 の修飾サブユニットである 1 回膜貫通型タンパク質 KCNE に依存して大きく変化する。したがって心臓において、どのタイプの KCNE タンパク質が KCNQ1 チャンネルに結合しているかを知ることが、不整脈をはじめとする心臓の病態を理解し、その解決策を考えるうえで大変重要である。しかしながら、生体中で KCNQ1 がどの KCNE タンパク質とどの程度の割合で複合体を構成しているかについては、あまり良く分かっていない。本研究は、ゼブラフィッシュをモデル動物として用い、心臓における各 KCNE タンパク質の生理機能における重要性を明らかにすることを目的とした。

(2) ゼブラフィッシュの KCNQ1 および KCNE タンパク質をアフリカツメガエルの卵母細胞に発現し、電気生理学的手法を用いて哺乳類の KCNQ1、各種 KCNE と比較することにより、KCNE による KCNQ1 チャンネルの機能調節機構を明らかにすることをもう一つの目的とした。

3. 研究の方法

(1) ゼブラフィッシュの cDNA ライブラリより、KCNQ1 遺伝子と、KCNQ1 チャンネルの修飾サブユニットである KCNE 遺伝子(3 種)を単離した。得られた KCNQ1 および KCNE 遺伝子をアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させ、二本刺し膜電位固定法により電流を測定した。ゼブラフィッシュのゲノムより、KCNQ1 と KCNE 遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、GFP をつなげたコンストラクトを作成した。これをゼブラフィッシュ胚にインジェクションすることで、生体における KCNQ1 と KCNE の可視化を試みた。さらに研究の過程で KCNE ファミリーの新規遺伝子が同定されたため、ゲノム編集によるノックアウトゼブラフィッシュの作成を行った。

(2) KCNE3 が KCNQ1 のゲーティングを修飾する機構を明らかにする目的で、KCNQ1-KCNE3 の立体構造情報(Sun and MacKinnon, *Cell* 2020)を基に、KCNQ1 の S1 セグメントと KCNE3 が相互作用する部位のアミノ酸に変異を入れた。各変異体はアフリカツメガエル卵母細胞に発現させたのち、電気生理学的手法で解析した。また、S4 セグメントを Alexa 488 で蛍光ラベルし、導入した変異による電位センサーの動きの変化を検出、解析した。

4. 研究成果

(1) ゼブラフィッシュの KCNQ1 と三種類の KCNE タンパク質について、まずアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させ、二本刺し膜電位固定法により測定を行った。KCNQ1 と KCNE1 の組み合わせの場合は、哺乳類と同様に非常に遅いキネティクスを持った遅延整流性の K⁺電流が測定された。KCNQ1 と KCNE4 の組み合わせの場合も哺乳類の場合と同様、電流がほぼ完全に抑制された。一方、KCNQ1 と KCNE3 に組み合わせに関しては、哺乳類の場合は常時開状態の電流が測定されるが、ゼブラフィッシュの KCNQ1 と KCNE3 の組み合わせの場合、電位に依存して開閉する電流が測定された (図 1)。

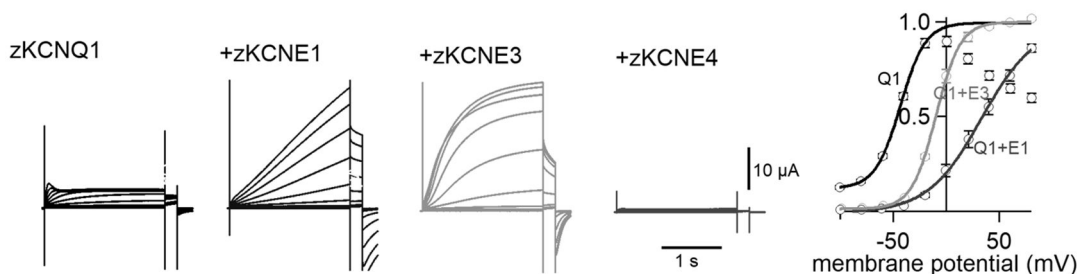


図 1

この“KCNE3”遺伝子についてさらに解析を進めたところ、実は KCNE3 ではなく、新規の KCNE 遺伝子であることが判明した。ヒトから魚類まで、脊椎動物に広く存在することをゲノム上で確認した。ヒトを含めた複数種の哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類の新規 KCNE 遺伝子を人工合成し、アフリカツメガエルの卵母細胞で発現させたところ、両生類～鳥類では KCNQ1 チャネルの修飾サブユニットとして機能することを確認できたが、一方で哺乳類では有袋類(コアラ)の遺伝子を除き、機能しなかった。したがってヒトも含めた多くの哺乳類では機能を失った偽遺伝子となっていると考えられた。ゼブラフィッシュの新規 KCNE 遺伝子について、その発現部位と生理機能を同定するため、プロモーター領域を同定し、ゼブラフィッシュゲノムよりクローニングした。プロモーター領域に GFP を結合したコンストラクトをゼブラフィッシュに発現させたところ心臓での発現が確認されたため、既存の KCNE1 と同様、心臓の興奮性制御に寄与していると予想された。さらにゲノム編集により、新規 KCNE 遺伝子を欠損したノックアウトゼブラフィッシュを作成しているところである。

(2) KCNE3 がどのようなメカニズムで KCNQ1 チャネルを常時開状態に固定することができるのかについては、まだ不明な点が多い。2020 年に発表されたクライオ電子顕微鏡による KCNQ1-KCNE3 の複合体構造 (Sun and MacKinnon, *Cell* 2020) により、KCNQ1 の S1 と KCNE3 が相互作用していることがわかった。この構造情報をもとに、S1 セグメントと KCNE3 のアミノ酸残基に変異を入れ、この 2 つの膜貫通部位の相互作用の重要性について検討した。これまでの我々の成果により、S1 セグメントの 127 番目と 130 番目のフェニルアラニン残基 (F127, F130) が重要であることがわかっていたが、今回さらに KCNE3 側の F68、V72、I76 がこれらのアミノ酸に相互作用し、この相互作用が KCNE3 の機能に重要であることを同定した。

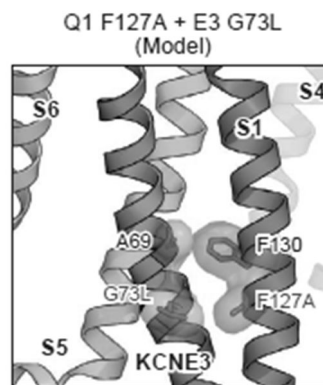


図 2

KCNQ1 S1 側の F127A 変異導入により、KCNQ1-KCNE3 チャネルの開状態は不安定になるが、KCNE3 側の G73L によって機能が回復することも見出した (図 2)。以上の結果から、KCNE3 は KCNQ1 の S1 セグメントにかなりタイトに相互作用する必要があることがわかった。また電位センサーである S4 セグメント上にある M238、V241 の各アミノ酸残基が S1 セグメントと KCNE3 の相互作用部位に向いており、この 3 者の相互作用が、電位センサーの動きに影響を与えていることが示唆された。

電位センサーの動きは、S4 セグメント上部を蛍光分子 Alexa488 でラベルし、その蛍光強度変化を用いる voltage-clamp fluorometry 法により解析した。この手法を用いることで、KCNE3 が KCNQ1 の S4 セグメントを中間状態に安定すること、さらに上記の重要なアミノ酸に変異を入れることにより中間状態が安定化しなくなることを見出した (図 3)。したがって、KCNE3 が KCNQ1 チャネルのゲートを常に開状態にするためには、上記のアミノ酸の相互作用により電位センサーの中間状態を安定化することが必要であることが明らかとなった。

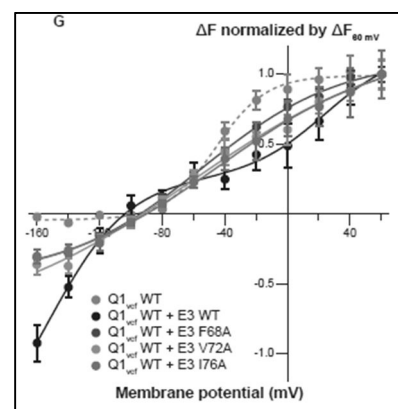


図 3

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6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 4件）

1. 著者名 Nakajo Koichi	4. 巻 16
2. 論文標題 Gating modulation of the KCNQ1 channel by KCNE proteins studied by voltage-clamp fluorometry	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 121 ~ 126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.16.0_121	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 Fujii Kensuke, Nakajo Koichi, Egashira Yoshihiro, Yamamoto Yasuhiro, Kitada Kazuya, Taniguchi Kohei, Kawai Masaru, Tomiyama Hideki, Kawakami Koichi, Uchiyama Kazuhisa, Ono Fumihito	4. 巻 30
2. 論文標題 Gastrointestinal Neurons Expressing HCN4 Regulate Retrograde Peristalsis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 2879 ~ 2888.e3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.02.024	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	4. 巻 58
2. 論文標題 Analysis of Voltage Sensor Movement in KCNQ1-KCNE1 Channels by Voltage Clamp Fluorometry	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Seibutsu Butsuri	6. 最初と最後の頁 144 ~ 148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.58.144	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 Taruno A, Sun H, Nakajo K, Murakami T, Ohsaki Y, Kido MA, Ono F, Marunaka Y.	4. 巻 595
2. 論文標題 Post-translational palmitoylation controls the voltage gating and lipid raft association of the CALHM1 channel.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 6121-6145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/JP274164	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsukamoto H, Higashi M, Motoki H, Watanabe H, Ganser C, Nakajo K, Kubo Y, Uchihashi T, Furutani Y.	4. 巻 293
2. 論文標題 Structural properties determining low K ⁺ affinity of the selectivity filter in the TWIK1 K ⁺ channel.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 6969-6984
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.001817	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kasuya Go, Nakajo Koichi	4. 巻 NA
2. 論文標題 Triad interaction stabilizes the voltage sensor domains in a constitutively open KCNQ1-KCNE3 channel	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2021.04.05.438515	査読の有無 無
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7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 中條 浩一
2. 発表標題 KCNEサブユニットによるKCNQ1電位センサードメインの制御機構
3. 学会等名 第97回日本生理学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 武田悠莉子、小野富三人、中條浩一
2. 発表標題 ゼブラフィッシュの3つのROMKチャネルはそれぞれ異なる薬理学的性質を持つ
3. 学会等名 第97回日本生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuriko Takeda, Fumihito Ono, Koichi Nakajo
2. 発表標題 Determinants of Ba ²⁺ sensitivity in zebrafish ROMK channels
3. 学会等名 9th FAOPS congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fujii Kensuke, Koichi Nakajo, Koichi Kawakami, Yoshihiro Egashira, Yasuhiro Yamamoto, Kohei Tanigushi, Masaru Kawai, Hideki Tomiyama, Kazuhisa Uchiyama, Fumihito Ono
2. 発表標題 The role of HCN4-positive cells in the gastrointestinal development and motility of zebrafish
3. 学会等名 9th FAOPS congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koichi Nakajo
2. 発表標題 Structural basis for the modulation of voltage sensor movement by auxiliary subunits in voltage-gated KCNQ1 channels
3. 学会等名 第95会日本生理学会 (高松)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuriko Takeda, Fumihito Ono, Koichi Nakajo
2. 発表標題 Zebrafish possesses three functional ROMK channels with different sensitivities to Ba ²⁺
3. 学会等名 第95会日本生理学会 (高松)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 劉嘉瑩、中條浩一
2. 発表標題 ゼブラフィッシュが持つ2つのHCN4チャンネルの生物物理学的・薬理的性質
3. 学会等名 第126回日本解剖学会第98回日本生理学会大会合同大会（名古屋；Web開催）
4. 発表年 2021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
研究協力者	東島 眞一 (HIGASHIJIMA Shin-ichi) (80270479)	大学共同利用機関法人自然科学研究機構（岡崎共通研究施設）・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授 (82648)	

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