

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17795

研究課題名(和文) 構造生物学と電気生理学を駆使したナトリウムイオン選択的透過機構の解明

研究課題名(英文) Structural and functional analysis of sodium selective permeation of voltage dependent sodium channel

研究代表者

入江 克雅(Irie, Katsumasa)

名古屋大学・細胞生理学研究センター・助教

研究者番号：20415087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：神経情報伝達や筋収縮などに必須の役割を果たすタンパク質であるイオンチャンネルについて、通るイオンを決める透過経路を構成するアミノ酸の役割を明らかにしました。イオンの大きさを識別するアミノ酸の同定や、リチウムイオンの選択性を上昇させるアミノ酸の同定に成功しました。また、生命の共通祖先に比較的近い細菌から、世界で初めて細菌が持つカルシウムチャンネルを発見しました。このチャンネルは通すイオンを決める部分がヒトなどの高等生物のカルシウムチャンネルと類似点を持っており、その部分でよく保存されているグリシンと呼ばれるアミノ酸が通すイオンの決定に重要であることを確かめました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これらの成果は神経伝達の電気信号の電線、すなわち思考や記憶の基本素子ともいえるイオンチャンネルの信号を伝える方法について明らかにするものであり、イオン選択性の獲得過程であるイオンチャンネル進化においてミッシングリンクであった先祖型のカルシウムチャンネルについての知見を与えるものです。この結果をもとにした機能理解によって、これらのチャンネルに関わる高血圧・不整脈・疼痛などに効果的に作用する薬剤の開発の基礎となることも期待されます。また、産業利用に有用なイオンであるリチウムイオンの透過効率上がるチャンネルは、選択的な回収方法などのへの技術応用につながる成果になります。

研究成果の概要(英文)：Ion channels are important proteins that play essential roles in nerve signal transmission and muscle contraction. We have clarified the role of amino acids that compose the permeation pathway that determines which the species of ions can permeate the channel. We have succeeded in identifying amino acids that distinguish the size of ions, and single point mutation that increases the selectivity of lithium ions. In addition, we discovered the novel native bacterial calcium channel for the first time in the world. The channel was found in bacteria relatively close to common ancestors of life. This channel has similarities to the calcium channel in humans and other higher organisms, and it was confirmed that glycine, which is well conserved in ion pathway, is important in permeation of calcium ion.

研究分野：構造生理学

キーワード：イオンチャンネル X線結晶構造解析 イオン選択性 電気生理学

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1) 電位依存性ナトリウムチャンネル (Nav) は神経情報伝達において活動電位の伝播を担う。そのため、ナトリウムイオンの選択的な透過の分子メカニズムの解明は、神経伝達の根幹部分の理解につながる。近年、Nav の高分解能の立体構造が解かれ、特に原核生物由来の Nav

(BacNav) の構造解析 (図 1 A) から、Nav の選択性フィルター内部にはイオン透過のための三つ部位 Site_{HFS}、Site_{CEN} および Site_{IN} があることが明らかになっている (図 1 B)。一方で、各サイトの役割とこの三つのサイトをどのようにしてナトリウムイオンが通り抜けていくかについてはいまだ不確定であった。

2) イオンチャンネルの進化の過程において、Nav よりも先にカルシウムチャンネル (Cav) が出現したと考えられているが、細菌の Cav はまだ見つかっていなかった。細菌の Cav はイオンチャンネルの進化と起源すなわち、イオン選択性の成熟過程を知るうえで重要であり、その同定が熱望されていた (図 1 C)。

2. 研究の目的

1)-① BacNav のホモログである NavAb を用いた我々の研究で Site_{CEN}-Site_{IN} の境界となる Leu176 主鎖のカルボニル基がイオンの透過に重要な役割を持つことを示唆していた。そこで、この境界線に位置する Leu176 の変異体を作製し、これの構造変化と機能解析から透過イオンの Site_{CEN} から Site_{IN} に移行するメカニズムを明らかにする。

1)-② Site_{HFS} の入り口に位置する Ser178 のイオン透過に関わる役割を明らかにする。

2) 細菌の Cav を発見し、そのチャンネルが持つイオン選択性フィルターの変異体の機能解析からカルシウムイオンとナトリウムイオンの選択性メカニズムについての知見を得る。

3. 研究の方法

1) X 線結晶構造解析により、NavAb の選択性フィルター内の電子密度変化やチャンネルの構造変化を観察する。変異体は Site_{CEN} から Site_{IN} の境界に位置する Leu176 と Site_{HFS} への細胞外側からのイオンポアの入り口に位置する Ser178 について作製した。さらに、構造解析の結果をもとに昆虫細胞を用いた全細胞パッチクランプ実験による電気生理実験を行い、構造から示唆されたイオン透過機構を評価する。

2) 遺伝子データベースから細菌のナトリウムチャンネル (BacNav) に似ている遺伝子の探索と分子系統学的解析から候補遺伝子を同定する。同定した候補遺伝子群から選択性フィルター配列が既知の BacNav とは異なるアミノ酸配列を持つものを選出し昆虫細胞を用いた電気生理実験にて機能解析を行う。変異体実験から新しい選択性フィルター配列を構成するアミノ酸のイオン選択性に関わる残基を同定する。

4. 研究成果

1)-① Leu176 に単一変異を導入し、チャンネル活性を測定した。フェニルアラニンやトリプトファンといった嵩高い側鎖を持つ残基への変異によって活性が失われたが、小さな側鎖への変異体では活性が保持された。これらの変異体の結晶構造から、変異残基の主鎖のカルボニル基から対角サブユニットのカルボニル基までの距離が失活した変異体では野生型チャンネルよりも 1Å 以上短くなっていた (図 2 左上)。活性を保持する変異体ではこの距離に変化はなく、嵩高い残基への変異はイオンポアの半径を狭くすることが明らかになった。すなわち、これがチャンネルのイオン透過性を失わせた原因であると考えられた (図 2 右)。

また、このイオンポア半径の変化とイオン透過の関係を詳細に調べるために、NavAb の四つのサブユニットをタンデムに結合した四量体コンカテマーを作製し機能解析を行った。コンカ

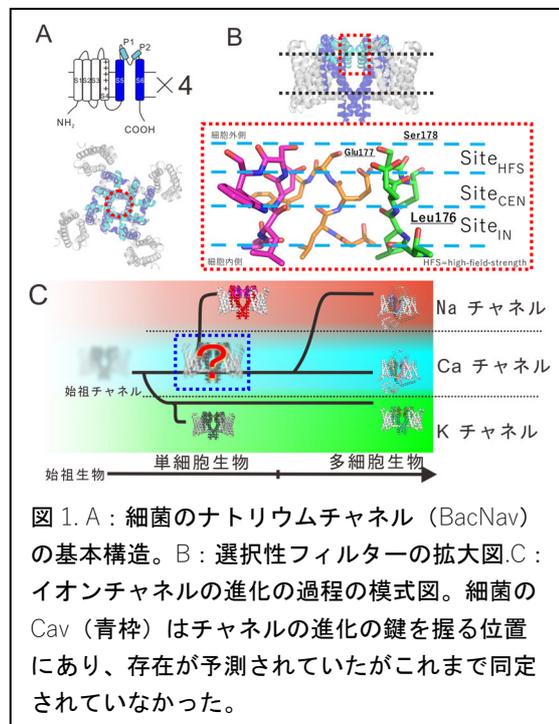
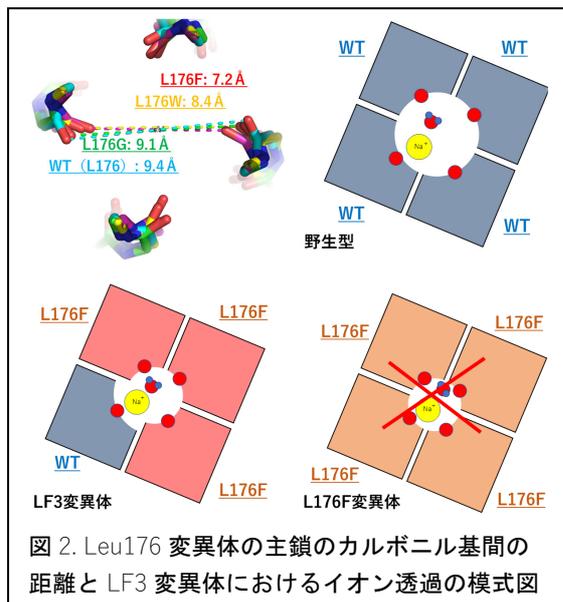


図 1. A : 細菌のナトリウムチャンネル (BacNav) の基本構造。B : 選択性フィルターの拡大図。C : イオンチャンネルの進化の過程の模式図。細菌の Cav (青枠) はチャンネルの進化の鍵を握る位置にあり、存在が予測されていたがこれまで同定されていなかった。

テマーを用いることで四量体の任意のサブユニットに L176F 変異を導入することができる。これにより、イオンポアの Leu176 のカルボニル基による脱水和リングを段階的に狭くした。3 つのサブユニットに L176F 変異を導入した変異体 (LF3 変異体) でもチャンネル活性は保持されたことから、この変異体のイオンポア半径がイオン透過のために十分な広さであることが明らかになった(図2左下)。

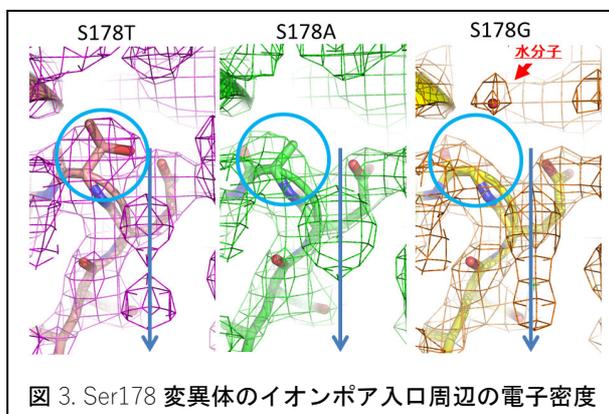


Glu177 の側鎖のカルボキシル基がイオン透過において重要な役割を持つことを示した。

1)-② Ser178 に変異を導入することでリチウムイオンの透過性を上昇させるものをいくつか同定した。これらの変異体の結晶構造解析を行ったところ、リチウムの選択性が上がる変異体ではチャンネルの開口部分が広くなることが明らかになった(図3)。さらに、野生型では見られなかった水分子がポア開口部に新たに観測された(図3右)。

リチウムイオンは原子番号が小さくイオン半径がナトリウムイオンよりも小さい。そのため、同じ一価のカチオンと比較しても強く水と結合する。すなわち、リチウムイオンは水和水との交換速度が他のイオンよりも遅い。イオンポアが広がりより水分子が入り込めることで水和水分子の交換回数が少なくなることで、効率の良い透過が可能になったと考えられる。

リチウムイオンは生体内で生理的な機能を持つイオンではないが、充電可能なバッテリーなど産業応用の観点から非常に有用な性質を持ったイオンである。そのため、選択的な回収方法などの技術の確立が熱望されている。この結果はリチウムイオンに高い選択性を持つ新たなチャンネルの創製につながる結果である。



2) 分子系統学的解析の結果、新たな選択性フィルター配列をもつ BacNav と相同性の高い遺伝子グループを発見した。このグループには生命の共通先祖に比較的近い細菌門であるデイノコックス・テルムス門に属する細菌から見つかった遺伝子も含まれていたことから、このグループを AnclNav (Ancestor-like BacNav) と名付けた (図 4A)。AnclNav の一群から、いくつかの遺伝子を単離し、チャンネル活性を測定したところ、*Meiothermus ruber* および *Plesiocystis pacifica* の 2 種の細菌から単離した遺伝子を導入した細胞でイオンチャンネル電流が確認された。特に、デイノコックス・テルムス門に属する *M. ruber* 由来のものは高いカルシウムイオン選択性を有しており、世界で初めて発見された細菌のカルシウムチャンネルとして CavMr と名付けた (図 4B 左)。

さらに、もう一方の AnclNav である *P. pacifica* 由来のチャンネル (NavPp) はナトリウムイオン

さらに、Site_{CEN} は Glu177 の側鎖が作る負電荷の密集サイトである Site_{HFS} に接続している。Site_{HFS} は細胞外側に存在する陽イオンを吸い込む役割をもつと考えられている。そこで Site_{HFS} における Glu177 が作る負電荷の効果を評価するために、Site_{IN} への入り口を狭くした LF3 変異体を用いてさらなる変異実験を行った。すなわち、LF3 変異体の各サブユニットへの E177Q 変異導入による活性変化を調べた。Leu176 を維持したサブユニットへの E177Q 変異の導入は活性を消失させた。一方で、L176F 変異を持つサブユニットへの変異導入では単独サブユニットへの導入においては通常活性が示され、L176F 変異を三つのサブユニットすべてに導入した場合でも電流値の現象は見られるものの活性は保持された。以上のことから、イオンポアが最も広い部分である Leu176 のサブユニットの

ンをよく通すもののカルシウムイオンによって透過が阻害されるという、これもまた、これまでにない特徴を持つチャネルであった (図4 B 右)。

CavMr の選択性フィルターのアミノ酸配列は TLEGWVD であり、NavAb の選択性フィルターである TLESWSM に変異導入して TLDDWSD としてカルシウム選択性を獲得した人工カルシウムチャネルである CavAb とは大きく異なる選択性フィルター配列で CavMr はカルシウム選択性を実現することが明らかとなった (図4A)。CavMr と CavAb そしてヒトのカルシウムチャネルの一種である Cav3.1 の選択性フィルターのアミノ酸配列を比較したところ、CavMr の配列は Cav3.1 の配列と相同性が高かった (図4A)。Cav3.1 は四つの繰り返しリピートからなるチャネルであり、フィルター配列もそれぞれ異なるが、1番目のリピートと3番目のリピートの配列が CavMr に似ていた (図4C)。

CavMr のフィルター配列は、CavAb よりも酸性アミノ酸 (E や D) の数が少なく、ヒトの Cav のリピート1 とリピート3に見られるグリシン (G) が保存されていた。そこで、CavMr の選択性フィルターのグリシン残基の重要性を調べるべく CavMr と NavPp の注目するグリシンの位置にあるアミノ酸を他のアミノ酸に変換した変異体を作製し、機能解析を行った。

まず、CavMr の選択性フィルターの酸性アミノ酸を増減させてみたところ、減らした変異体である選択性フィルターの7番目のアスパラギン酸 (D) をメチオニン (M) に変異した変異体である CavMr-D7M では高いカルシウム選択性が保持された一方、増やした変異体である CavMr-G4D ではカルシウム選択性が著しく減少した。この結果は、選択性フィルターに多くの酸性アミノ酸を持つ NavPp が予想に反して Na⁺をよく透過することにも合致する。さらに、NavPp の選択性フィルターの配列を CavMr のものに置換した変異体 (NavPp-Mr) は酸性アミノ酸の数は減少するにもかかわらず高いカルシウム選択性を獲得した。これらの結果は、酸性アミノ酸の数がカルシウム選択性の高さと同様であるという人工チャネルを基にした従来のモデルとは明らかに合致せず、天然のカルシウムチャネルである CavMr や Cav3.1 などのヒト Cav のカルシウム選択性の分子機構は CavAb の構造から議論されたものと異なることを示唆するものであった。

以上の結果は、これまで見落とされてきた選択性フィルター内のグリシンによる、細菌からヒトにまでおよぶ高度に保存されたカルシウム選択性機構の存在を想起させる。CavMr の属する AncNav グループは、我々ヒトも含めた多細胞生物ナトリウムチャネルやカルシウムチャネルの祖先型の特徴を保持したチャネルである可能性が高く、イオンチャネルの進化についての理解を大きく進展させ、今後の新たな研究を促すことが期待される。

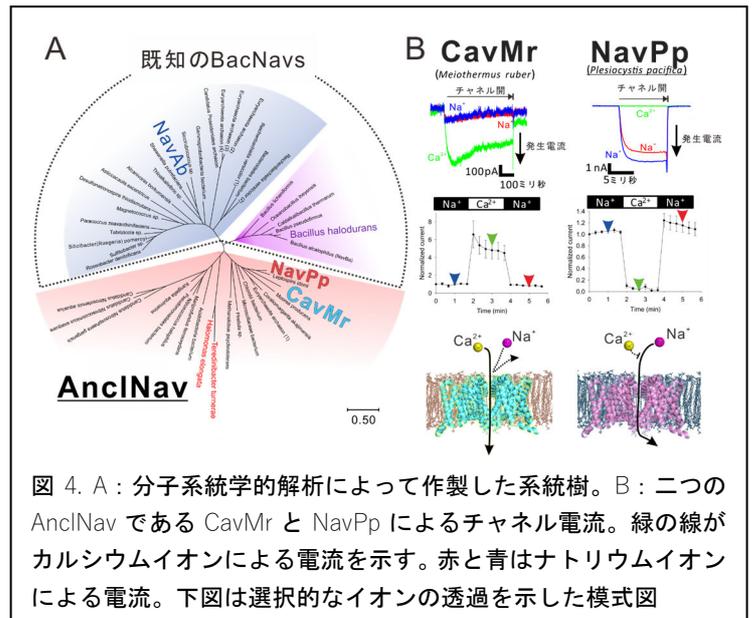


図4. A: 分子系統学的解析によって作製した系統樹。B: 二つの AncNav である CavMr と NavPp によるチャネル電流。緑の線がカルシウムイオンによる電流を示す。赤と青はナトリウムイオンによる電流。下図は選択的なイオンの透過を示した模式図

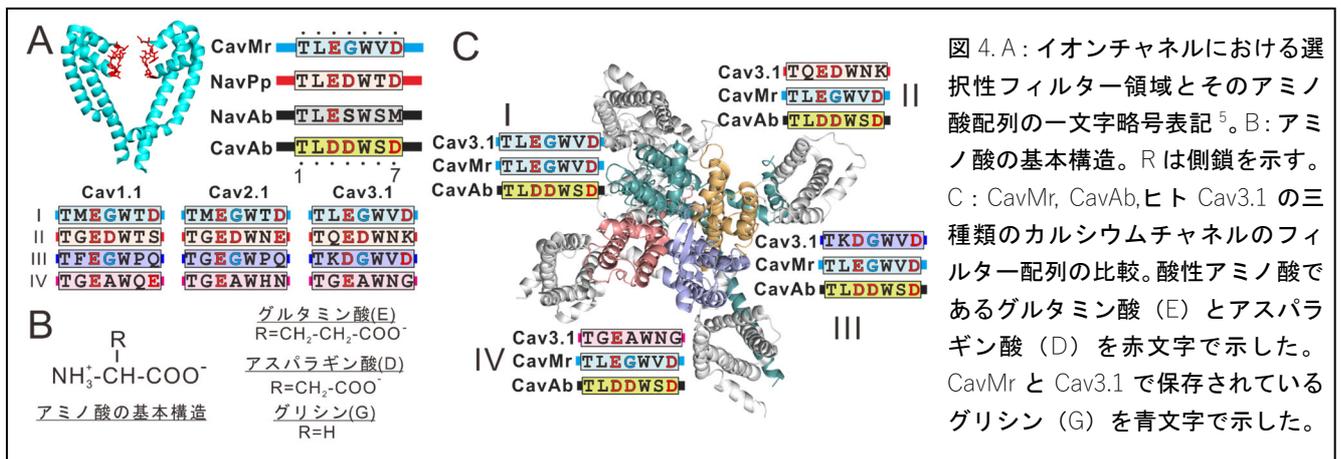


図4. A: イオンチャネルにおける選択性フィルター領域とそのアミノ酸配列の一文字略号表記⁵。B: アミノ酸の基本構造。Rは側鎖を示す。C: CavMr, CavAb, ヒト Cav3.1 の三種のカルシウムチャネルのフィルター配列の比較。酸性アミノ酸であるグルタミン酸 (E) とアスパラギン酸 (D) を赤文字で示した。CavMr と Cav3.1 で保存されているグリシン (G) を青文字で示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nakamura Shun, Irie Katsumasa, Tanaka Hiroo, Nishikawa Kouki, Suzuki Hiroshi, Saitoh Yasunori, Tamura Atsushi, Tsukita Sachiko, Fujiyoshi Yoshinori	4. 巻 10
2. 論文標題 Morphologic determinant of tight junctions revealed by claudin-3 structures	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 816
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-08760-7	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 Abe Kazuhiro, Irie Katsumasa, Nakanishi Hanayo, Suzuki Hiroshi, Fujiyoshi Yoshinori	4. 巻 556
2. 論文標題 Crystal structures of the gastric proton pump	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 214-218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-018-0003-8	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 Irie Katsumasa, Haga Yukari, Shimomura Takushi, Fujiyoshi Yoshinori	4. 巻 592
2. 論文標題 Optimized expression and purification of NavAb provide the structural insight into the voltage dependence	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 274 ~ 283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.12955	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 Shimomura Takushi, Yonekawa Yoshiki, Nagura Hitoshi, Tateyama Michihiro, Fujiyoshi Yoshinori, Irie Katsumasa	4. 巻 9
2. 論文標題 A native prokaryotic voltage-dependent calcium channel with a novel selectivity filter sequence	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e52828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.7554/eLife.52828	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 Yamamoto Kenta, Dubey Vikas, Irie Katsumasa, Nakanishi Hanayo, Khandelia Himanshu, Fujiyoshi Yoshinori, Abe Kazuhiro	4. 巻 8
2. 論文標題 A single K ⁺ -binding site in the crystal structure of the gastric proton pump	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e47701
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.7554/eLife.47701	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 該当する

1. 著者名 Kamiya Atsunori, Hayama Yohsuke, Kato Shigeki, Shimomura Akihiko, Shimomura Takushi, Irie Katsumasa, Kaneko Ryosuke, Yanagawa Yuchio, Kobayashi Kazuto, Ochiya Takahiro	4. 巻 22
2. 論文標題 Genetic manipulation of autonomic nerve fiber innervation and activity and its effect on breast cancer progression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1289 ~ 1305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1038/s41593-019-0430-3	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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Katsumasa Irie
2. 発表標題 Tutorial for physiologists: "Practical Approaches to Protein Structural Information"
3. 学会等名 9th FAOPS congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Katsumasa Irie, Takushi Shimomura, Toshiki Yonekawa, Hitoshi Nagura, and Yoshinori Fujiyoshi
2. 発表標題 Unexpected primary sequence of the selectivity filter of endogenous prokaryotic voltage-gated calcium channel
3. 学会等名 The 49th NIPS International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 入江 克雅
2. 発表標題 Asymmetric interaction of permeating cation and local anesthetic with homo-tetrameric sodium channel
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 入江 克雅
2. 発表標題 構造生理学的アプローチによるナトリウムチャネルのイオン透過機構の解析
3. 学会等名 蛋白研セミナー：構造情報に基づいた膜イオン輸送タンパク質の 生理機能の解明に向けて（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 入江克雅
2. 発表標題 「四量体型ナトリウムチャネルの構造機能研究とその応用」
3. 学会等名 第2回 医薬系3部局交流シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 入江克雅
2. 発表標題 ナトリウムイオン選択的透過機構の解明を目指したNavAb変異体の構造解析
3. 学会等名 第2回 イオンチャネル研究会 ~チャンネル七夕~
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 入江克雅
2. 発表標題 四量体型ナトリウムチャンネルにみられる 透過イオンや阻害剤との 非対称な相互作用
3. 学会等名 平成29年度生理学研究所研究会 「膜システムの機能的・構造的統合」
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Katsumasa Irie, Takushi Shimomura, Toshiki Yonekawa & Yoshinori Fujiyoshi
2. 発表標題 Characterization of prokaryotic voltage-gated calcium channel
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 入江克雅、中村駿、藤吉好則
2. 発表標題 複数の変異体を用いた原核生物由来ナトリウムチャンネルの選択性フィルターの構造解析
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 下村拓史、米川佳樹、名倉仁、立山充博、藤吉好則、入江克雅
2. 発表標題 新しい選択性フィルター配列を有する原核生物由来膜電位感受性カルシウムチャンネルの同定と機能解析
3. 学会等名 "生理学研究所 研究会 「イオンチャンネルと生体膜のダイナミズム： 構造生物学の先にあるもの」"
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

細胞と細胞を張り合わせるジッパーの形の違いを生み出す仕組みの解明
http://www.nagoya-u.ac.jp/about-nu/public-relations/researchinfo/upload_images/20190227_ps.pdf
世界初！胃酸分泌を担う胃プロトンポンプの構造を解明
http://www.nagoya-u.ac.jp/about-nu/public-relations/researchinfo/upload_images/20180405_ps_1.pdf

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