

平成21年 5月20日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590208  
 研究課題名(和文) 過分極で活性化される陽イオンチャネルの電位センサーとイオン透過性に関する研究  
 研究課題名(英文) Studies of voltage sensor and ion permeability in HCN channels

研究代表者  
 石井 孝広 (ISHII TAKAHIRO)  
 京都大学・医学研究科・准教授  
 研究者番号：40303812

## 研究成果の概要：

通常の電位依存性イオンチャネルは脱分極で活性化するのに対し、過分極で活性化するという特異な性質をもつ HCN チャネルの活性化速度を決定する部位の検索と電位を感じる部位の構造解析を行った。その結果、活性化速度には第一膜貫通領域が重要で、電位を感じる部位を構成する第一膜貫通領域と第四膜貫通領域の相対位置が明らかとなった。これらの結果は、HCN チャネルの開閉メカニズムを理解する上で重要で、生理学的役割を理解する上で重要な知見を与える。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：分子生理学

## 1. 研究開始当初の背景

過分極で活性化される陽イオンチャネル(HCNチャネル)は、心臓のペースメーカー細胞で1980年に初めて記述された。中枢神経系をはじめ生体の様々な場所に発現し、ペースメーカーチャネルとしての役割や細胞の興奮性の調節など生理学的に重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。近年になって、HCNチャネルのcDNAのクローニングがなされ、哺乳類においては4つのサブタイプが同定された(HCN1-4)。研究代表

者は世界に先駆けHCN4のクローニングに成功し、サブタイプ間の活性化速度の違いの責任部位を明らかにした。

## 2. 研究の目的

HCNチャネルは、電位依存性カリウムチャネル(Kvチャネル)と共通の6回膜貫通領域をもつが、特徴的な性質がある。a) 過分極により活性化する。b) Kvチャネルに比べ活性化速度が極めて遅い。c) ナトリウムイオンをよく通す。これらの特徴は、HCNチャネルの

生理学的役割を理解する上できわめて重要である。本研究では、これらの特徴を引き起こす電位センサーとゲート機構とイオン透過性部位の分子レベルでの構造的基盤を解析し、そのメカニズムを解明することを目的とする。

具体的には、(1)サブタイプの活性化速度の違いを引き起こす第一膜貫通領域の構造の解析、(2)サブタイプの脱活性化速度の違いを引き起こす部位の特定、(3)電位センサーの可動部分である第四膜貫通領域と第一膜貫通領域との相互作用の解析、(4)イオン透過性部位の構造解析を目的とする。

### 3. 研究の方法

主にキメラあるいは変異体を作成し、アフリカツメガエル卵母細胞発現系あるいはCOS7 哺乳類細胞発現系を使用し、電位固定法を用いて電流応答を測定した。

#### (1)サブタイプの活性化速度の違いを引き起こす第一膜貫通領域の構造の解析

HCN1において、第一膜貫通領域のそれぞれのアミノ酸残基を大きな疎水性の側鎖を持つトリプトファン残基に置換した変異体を19種類作成し、それぞれの変異体の過分極による電流応答を記録し、その電気生理学的特性を解析し、野生型との違いを調べた。

#### (2)サブタイプの脱活性化速度の違いを引き起こす部位の特定

第一膜貫通領域が活性化速度の違いを引き起こす主要な部位であったが、脱活性化速度の違いをほとんど説明出来なかった。そのため、HCN1とHCN4との間でキメラタンパクを作成し、脱活性化速度の違いを詳細に検討した。

#### (3)電位センサーの可動部分である第四膜貫通領域と第一膜貫通領域との相互作用の解析

第四膜貫通領域と第一膜貫通領域との両方のアミノ酸残基にシステイン残基を一つずつ導入し、組合せによる電流応答の変化を解析した。

#### (4)イオン透過性部位の構造解析

イオン透過性部位に変異を導入し、イオン透過性の変化を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1)サブタイプの活性化速度の違いを引き起こす第一膜貫通領域の構造の解析

第一膜貫通領域のそれぞれのアミノ酸残基をトリプトファン残基に置換した変異体19種類の活性化速度や電位依存性のパラメーターを測定したところ、電位依存性カリウムチャンネルの場合に見られたような周期性は認められなかった。しかしながら、電流応答が認められなかった変異体が四種類存

在した(図1)。それらは、3つおきあるいは4つおきに存在したので、これらの結果は第一膜貫通領域がアルファヘリックス構造をとっている事を示唆していると考えられた。

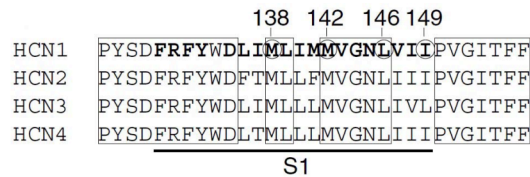


図1. マルで囲んだアミノ酸残基をトリプトファン残基に置換すると電流応答が消失した。

第一膜貫通領域の唯一のマイナス電荷を持つアミノ酸残基であるD135を電荷を無くしたり(D135N)、プラス電荷に置換すると(D135H、D135R)活性化速度が遅くなった(図2)。このことから、速い活性化速度にD135が必要である事が分かった。

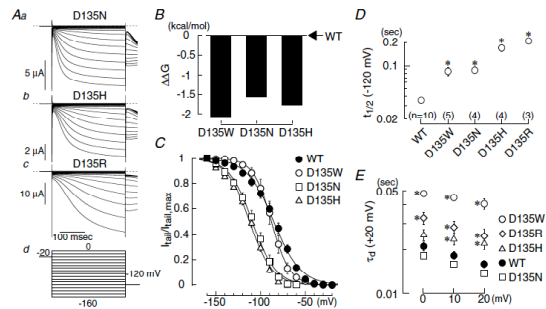


図2. D135を他のアミノ酸残基に置換すると活性化速度が遅くなった。

L139とV143をトリプトファン残基で置換すると、いくら脱分極させてもチャンネルが開じなくなった(図3)。このことより、L139とV143が電位センサーの可動部分である第四膜貫通領域と相互作用している事が示唆された。

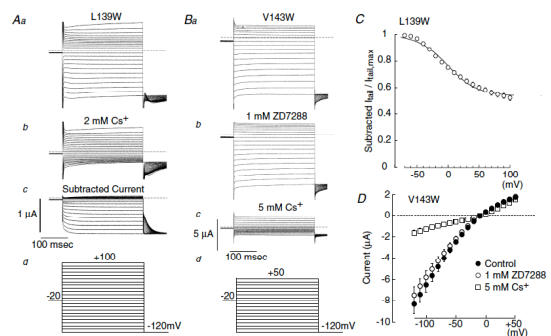


図3. L139WとV143Wでは、どの電位でもチャンネルが開きっぱなしである。

これらの結果より、第一膜貫通領域はアルファヘリックス構造をとっており、大まかに三つの部分に分けられ(図4)、一つは膜脂

質に向いている部分 (図4のI)、別の一つは別の膜貫通領域と相互作用する部分 (図4のII)、最後の一つは第四幕価通領域と相互作用する部分 (図4のIII) であることが示唆された。

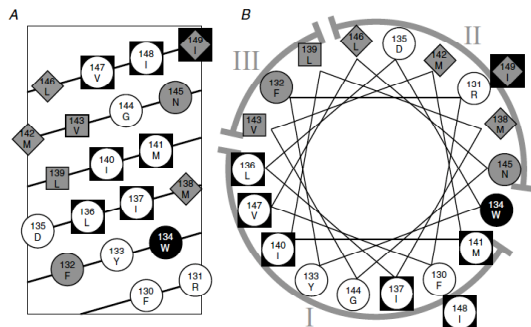


図4. 第一膜貫通領域がアルファヘリックス構造をとると仮定し、展開した図(A)と細胞外から見下ろした図(B)。

## (2) サブタイプの脱活性化速度の違いを引き起こす部位の特定

第一膜貫通領域を HCN1 と HCN4 との間で置換すると活性化速度には大きな影響を与えたが、脱活性化速度にはそれほど影響を与えなかったため (図5)、脱活性化速度に影響を与える部分を調べるために研究を行った。

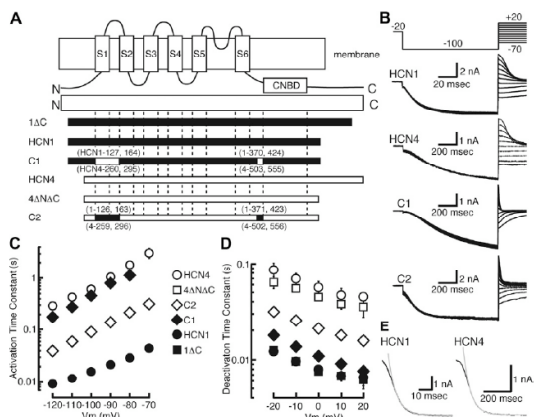


図5. 第一膜貫通領域の影響は脱活性化速度に関しては限定的であった。

HCN1 と HCN4 との間で様々なキメラタンパクを作成し、脱活性化速度の解析を行い、脱活性化速度に関係する部位を特定した (図6)。

N 末と C 末の脱活性化速度に対する影響をさらに詳細に検討した (図7)。

さらに、N 末と C 末の影響を検討するために、第3膜貫通領域から第6膜貫通領域までのチャンネルのコア部分にはショウジョウバエの HCN チャンネルを使い、N 末と C 末に

HCN1 と HCN4 を使って解析を行った (図8)。

これらの結果より、N 末と C 末領域が HCN チャンネルの脱活性化速度のサブタイプによる違いを引き起こすことが明らかとなった。

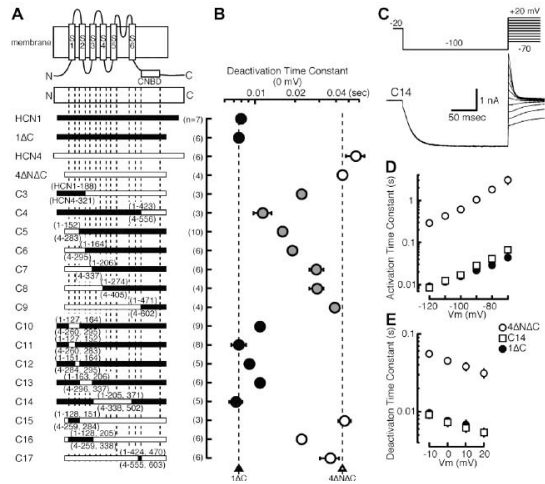


図6. N 末と C 末が脱活性化速度に大きな影響を及ぼす事が明らかとなった。

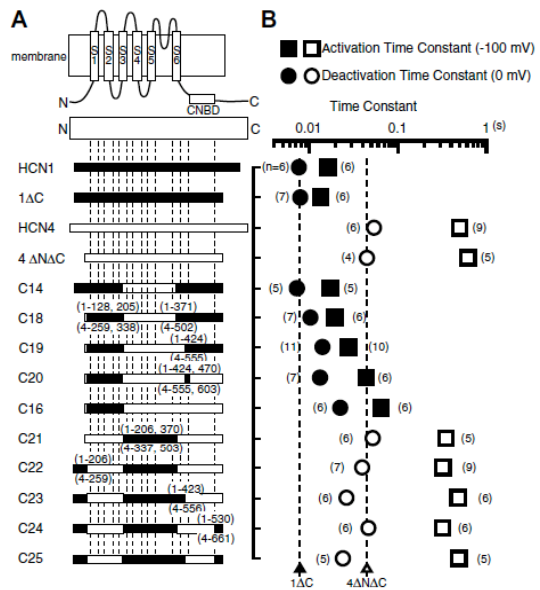


図7. N 末と C 末全体が脱活性化速度に影響を及ぼす。

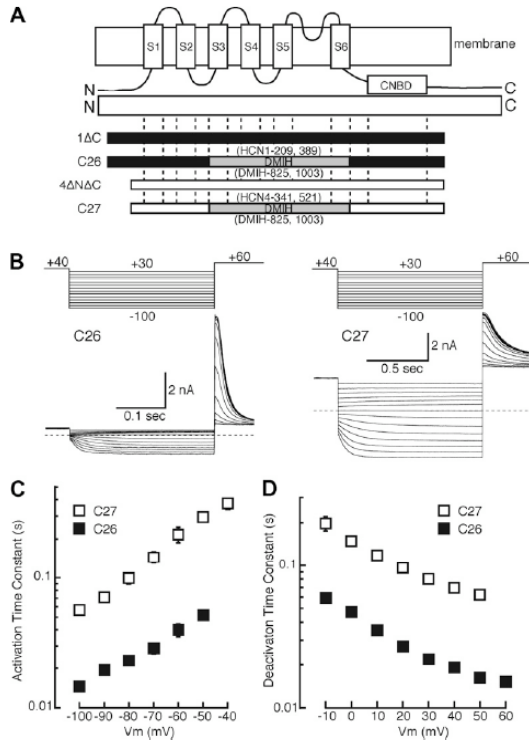


図 8. 哺乳類の HCN チャンネルの N 末と C 末でもショウジョウバエの HCN チャンネルの活性化速度に同様に影響を及ぼす事を明らかにした。

### (3) 電位センサーの可動部分である第四膜貫通領域と第一膜貫通領域との相互作用の解析

第一膜貫通領域の L139 をシステインに置換し、さらに第四膜貫通領域にシステイン変異を導入した変異体を作成し、第一膜貫通領域と第四膜貫通領域とのあいだでシステイン残基同士がジスルフィド結合を作り、チャンネル機能に影響を及ぼすか否かを解析した。

L139C と S253C の二つのシステイン変異を導入すると、過分極による内向き電流は見られなかったが、還元剤である DTT を投与しジスルフィド結合を切断すると過分極による電流応答が見られるようになった (図 9)。

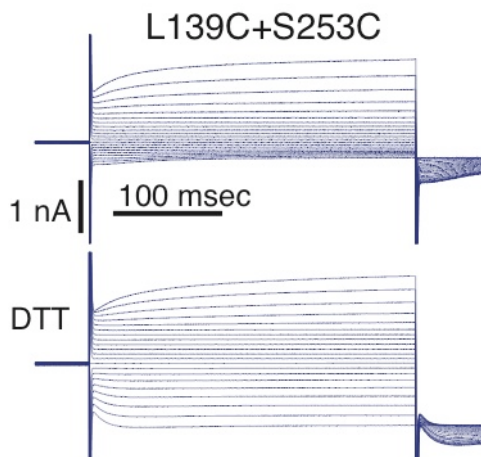


図 9. 還元剤の投与の後、過分極による電流応答が観察されるようになった。

これらの結果により、第一膜貫通領域に存在する L139 と第四膜貫通領域に存在する S253 が物理的に近い位置をとっていることが示唆された。

### (4) イオン透過性部位の構造解析

イオン透過性部位は、電位依存性カリウムチャンネルの配列が TVGYG であるのに対し、HCN チャンネルでは CIGYG である。このことが、特徴的なナトリウムイオンをよく通すという HCN チャンネルの性質を作り出している可能性が示唆されていた。そこで HCN チャンネルにおいて TVGYG に変異させたチャンネルを作成し、そのイオン透過性を測定した。しかしながら、TVGYG を持つ変異体も HCN チャンネルと同様のナトリウムの透過性を示し、他の部位がナトリウム透過性を決めている事が明らかとなった。

### 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 6 件)

1. Kentoku Yanagi, Makoto Takano, Genta Narazaki, Hideki Uosaki, Takuhiro Hoshino, Takahiro Ishii, Takuro Misaki, and Jun K. Yamashita "HCN and Cav3 ion Channels Confer Automaticity of Embryonic Stem Cell-derived Cardiomyocytes" (2007) *Stem Cells*, 25, 2712-9(査読 有)
2. Takahiro M. Ishii, Noriyuki Nakashima, Kenji Takatsuka, and Harunori Ohmori "Peripheral N- and C-terminal domains determine deactivation kinetics of HCN channels" (2007) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 359, 592-598(査読 有)
3. Keiko Tsuji, Masaharu Akao, Takahiro M. Ishii, Seiko Ohno, Takeru Makiyama, Kotoe Takenaka, Takahiro Doi, Yoshisumi Haruna, Hidetada Yoshida, Toshihiro Nakashima, Toru Kita, and Minoru Horie "Mechanistic basis for the pathogenesis of long QT syndrome associated with a common splicing mutation in KCNQ1 gene" (2007) *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 42, 662-669(査読 有)
4. Haruhiko Akiyama, H. Scott Stadler, James F. Martin, Takahiro M. Ishii, Philip A. Beachy, Takashi Nakamura, and Benoit de Crombruggh "Misexpression of Sox9 in mouse limb bud mesenchyme induces polydactyly and rescues hypodactyly mice" (2007) *Matrix Biology*, 26, 224-33(査読 有)

5. Takahiro M. Ishii, Noriyuki Nakashima, and Harunori Ohmori "Tryptophan scanning mutagenesis in the S1 domain of mammalian HCN channel reveals residues critical for voltage-gated activation" (2007) *J. Physiology*, 579.2, 291-301(査読 有)

6. Shinobu Kuratomi, Akiko Kuratomi, Koichiro Kuwahara, Takahiro M. Ishii, Kazuwa Nakao, Yoshihiko Saito, and Makoto Takano "NRSF regulates the developmental and hypertrophic changes of HCN4 transcription in rat cardiac myocytes" (2007) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 353, 67-73(査読 有)

〔学会発表〕(計 2件)

1. Takahiro Ishii, Noriyuki Nakashima, and Harunori Ohmori "Structure-function relationship of voltage sensor in HCN channels" (第85回日本生理学会大会、2008年3月、東京)

2. 石井孝広、中島則行、大森治紀 "HCNチャンネルの電位センサー領域の構造と機能に関する研究" (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会、2008年12月、神戸)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nbiol.med.kyoto-u.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石井 孝広 (ISHII TAKAHIRO)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：40303812