

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03200

研究課題名(和文) 神経興奮調節やてんかんに関わる電位依存性K⁺チャネルKCNQ2の作動機構の解明研究課題名(英文) Elucidating the molecular mechanism of voltage-gated K⁺ channel KCNQ2 involved in the neuronal excitability and epilepsy

研究代表者

糟谷 豪 (KASUYA, Go)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：80845115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：電位依存性K⁺チャネルが修飾サブユニットと結合し、電位依存性や活性化不活性化のキネティクスを変化する構造生物学的および生物物理学的な基盤を明らかにした。KCNQ2については現在も構造決定および電気生理学・光生理学を用いた解析を継続している。KCND2に関しては、その修飾サブユニットのKChIP1とDPP6Sが結合した構造の決定と作動する仕組みの解明に至った。またKCNQ1に関しては、その修飾サブユニットのKCNE3が作動する仕組みの解明に至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

電位依存性K⁺チャネルは、興奮性細胞における神経伝達や活動電位の形成、非興奮性細胞におけるK⁺リサイクルや恒常性維持など様々な機能に関わる重要な膜タンパク質である。電位依存性K⁺チャネルの多くはリガンドや修飾サブユニットなど多くの因子の調節を受け機能するが、その仕組みの多くは未だ不明である。本研究では、神経細胞間の情報伝達に關与するKCND2、上皮細胞のK⁺リサイクルに關与するKCNQ1について、それぞれ構造情報をもとに修飾サブユニットが機能を調節する仕組みを明らかにした。これらの情報は、立体構造や作動機構をもとにした薬剤開発などにつながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated how voltage-gated K⁺ channels are modulated by their ligands or auxiliary subunits. In the case of KCNQ2, we are still determining its structure. In the case of KCND2, we determined the structure of KCND2 in complex with its auxiliary subunits KChIP1 and DPP6S and conducted structure-based electrophysiological analyses. In the case of KCNQ1, we revealed the mechanism of how KCNQ1 is modulated by its auxiliary subunit KCNE3 using voltage-clamp fluorometry.

研究分野：生理学

キーワード：電位依存性K⁺チャネル KCND KCNQ 修飾サブユニット

1. 研究開始当初の背景

イオンチャネルは特定のイオンを濃度勾配に従って輸送する膜タンパク質で、活動電位の発生や筋収縮、感覚など様々な生理機能に参与する。生体内におけるイオンチャネルには、リガンドや、自身はイオン透過能を持たない修飾サブユニットなど様々な外因的な因子の影響を受けその機能が変化する例が多数知られている。これらの因子はイオンチャネルに直接結合し、イオンチャネルの発現量や局在、機能(電流量、活性化/不活性化の速度)などに影響を与えることで、イオンチャネル単独とは異なる機能の獲得をもたらす(O'Malley & Isom, *Annu Rev Physiol.*, 77, 481-504, 2015; Barrese *et al.*, *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 58, 625-648, 2018)。イオンチャネルと修飾サブユニットの複合体形成について、生理学および医学的な重要性から研究が進んでいる例として、電位依存性 K⁺チャネルの Kv7/KCNQ ファミリー(KCNQ1-KCNQ5)と Kv4/KCND ファミリー(KCND1-KCND3)がある。

このうち、KCNQ2 は中枢神経系で発現し、静止膜電位の安定化や活動電位の発生頻度の調節に参与する(Wang & Li, *Acta Pharmacol Sin.*, 37, 25-33, 2016)。KCNQ2 を含む Kv7 ファミリーの活性化には、細胞内領域への PIP₂ の結合が必須であり、PIP₂ の結合がもたらす構造変化がチャネル開閉を可能にすると考えられているが、KCNQ2 に PIP₂ が結合しチャネル活性を制御とする仕組みは不明である。

また、KCNQ1 は心臓、肺、小腸などさまざまな器官で発現し、拍動の制御や K⁺イオンのリサイクルに参与する(Abbott, *Gene*, 593, 249-260, 2016)。KCNQ1 は修飾サブユニットの KCNE (KCNE1-KCNE5) と結合することでその機能が大きく変化するが、KCNQ1 が KCNE によって機能修飾を受ける仕組みの多くは未だ不明である。

さらに、KCND2 は神経細胞で発現し、活動電位の樹状突起への逆伝搬の抑制に参与する(Zemel *et al.*, *Front Mol Neurosci.*, 11, 253, 2018)。KCND2 は修飾サブユニットの KChIP(KChIP1-KChIP4) および DPP(DPP6, DPP10) と結合することでその機能が大きく変化するが、KCND2 が KChIP および DPP によって機能修飾を受ける仕組みの多くは未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究では、Kv7/KCNQ ファミリー(KCNQ1-KCNQ5)と Kv4/KCND ファミリー(KCND1-KCND3)のうち以下の3種類のチャネルが外因的な因子の影響を受けることでその機能を変化、発揮することの解明を目的として、クライオ電子顕微鏡法を用いた立体構造解析や、立体構造情報を用いた電気生理学的解析および光生理学的解析を行った。

(1) KCNQ2 の立体構造解析と機能解析

KCNQ2 は中枢神経系に発現する電位依存性 K⁺チャネルで、静止膜電位の安定化や活動電位の発生頻度の調節に参与する。ヒトの KCNQ2 遺伝子には、チャネル活性に影響を及ぼす変異が多数報告されており、良性～難治性まで様々な病態のてんかんの原因として知られている。KCNQ2 の活性化には、膜リン脂質の一種である PIP₂ の結合が必須であり、PIP₂ の結合がもたらす構造変化がチャネル開閉を可能にする。他方で、てんかんの原因となる KCNQ2 の変異は、PIP₂ の結合やチャネル開閉に必要な構造変化を阻害すると考えられている。しかしながら、PIP₂ の結合がチャネル活性を制御する仕組み、KCNQ2 の変異が PIP₂ の結合やチャネル活性に影響を与える仕組みは不明であった。そこで、クライオ電子顕微鏡法を用い、ヒト由来 KCNQ2 の構造を PIP₂ 非結合状態・PIP₂ 結合状態それぞれで決定し、構造情報に基づき電気生理と光生理による変異体解析を行うことで、KCNQ2 の作動機構を解明する。

(2) KCNQ1-KCNE3 複合体の立体構造情報に基づいた機能解析

KCNQ1-KCNE3 複合体は、電位依存性 K⁺チャネルの KCNQ1 と一回膜貫通型の機能調節タンパク質の KCNE3 の2種類の膜タンパク質で構成される、生理条件下では常時開状態の K⁺チャネルである。KCNQ1-KCNE3 複合体は小腸や肺の上皮細胞に発現し、上皮細胞からの Cl⁻分泌に伴って、細胞内に取り込まれた K⁺を、細胞外に汲み出す“K⁺リサイクル”に参与する。そのため、KCNQ1-KCNE3 複合体の機能破綻は Cl⁻分泌障害を起こし、分泌性の下痢や肺水腫、嚢胞性線維症の原因として知られている。これまでの研究から、KCNE3 は KCNQ1 の膜電位を感知する電位センサーに結合し、その位置や動きを調節することで KCNQ1 の電位依存性を失わせることで、KCNQ1-KCNE3 複合体が生理条件下では常時開状態の K⁺チャネルに変化することがわかっている。しかしながら、KCNQ1 と KCNE3 の相互作用がどのように電位センサーの位置を調節し、常時開状態のチャネルを形成するのかについては不明であった。そこで、2020 年に報告された KCNQ1-KCNE3 複合体の立体構造情報を用い、立体構造上で KCNQ1 と KCNE3 の相互作用への関与が示唆されたアミノ酸を中心に変異体を作成し電気生理と光生理の同時測定を用いた解析を行うことで、KCNE3 が KCNQ1 の電位センサーを調節する仕組みを解明する。

(3) KCND2-KChIP1-DPP6 複合体の立体構造解析と機能解析

KCND2-KChIP1-DPP6 複合体は、電位依存性 K⁺チャネルの KCND2、細胞内に発現する機能調節タンパク質の KChIP1、一回膜貫通型の機能調節タンパク質の DPP6 の3種類の膜タンパク質で構成される、電位依存性 K⁺チャネルである。KCND2-KChIP1-DPP6 複合体は神経細胞で発現

し、活動電位の樹状突起への逆伝搬の抑制に寄与する。そのため、KCND2-KChIP1-DPP6 複合体の破綻はてんかんの原因として知られている。KCND2-KChIP1-DPP6 複合体は早く活性化しかつ早く不活性化する性質を有しているものの、その特性の発揮には KCND2 だけでなく、KChIP1 と DPP6 の 2 種類の修飾サブユニットによる調節が必要である。しかしながら、KChIP1 や DPP6 が KCND2 と相互作用し KCND2 のチャネル特性を制御する仕組みは不明であった。そこで、クライオ電子顕微鏡法を用い、ヒト由来 KCND2 の構造を単独・KChIP1 結合状態・DPP6 結合状態・KChIP1/DPP6 結合状態それぞれで決定し、構造情報に基づき電気生理による変異体解析を行うことで、KChIP1 と DPP6 が KCND2 の機能を調節する仕組みを解明する。

3. 研究の方法

本研究では、立体構造解析のためにクライオ電子顕微鏡法を用いた単粒子解析 (cryo-EM) を利用した。それぞれの電位依存性 K^+ チャネルを、培養細胞系において単独で発現および修飾サブユニットと共発現し精製を行った。PIP₂ などのリガンドを加える場合は、精製過程で適宜添加した。電気生理解析についてはアフリカツメガエル卵母細胞に cRNA を注入することでそれぞれの電位依存性 K^+ チャネルを発現し、膜電位固定下での電流応答を測定した。光生理解析については、電気生理解析と同様にアフリカツメガエル卵母細胞でそれぞれの電位依存性 K^+ チャネルを発現した。その際、それぞれの電位依存性 K^+ チャネルの特定の領域にシステイン残基を変異導入し、蛍光試薬を用いて架橋した。そして、膜電位固定下で測定した蛍光強度変化を解析した。

4. 研究成果

(1) KCNQ2 の立体構造解析と機能解析

ヒト由来の KCNQ2 について、微小孔のあいたカーボン膜上で急速凍結し低温電子顕微鏡で撮影を行ったところ、予備的な二次元平均像を得ることに成功した。その後、撮影を継続し粒子数を増やすとともに、クラスタリング、アライメントの精密化を行うことで、立体構造の決定を試みた。その際、バッファやタンパク質の濃度などの条件を検討した。しかしながら、現時点では立体構造の決定には至っていない。なお、本研究実施期間中に他グループよりヒト由来 KCNQ2 について 2 種類の activator (ziz240 と retigabine) がそれぞれ結合した立体構造が報告された (Li *et al.*, *Cell Res.*, 31, 52-61, 2021)。これらの立体構造上では PIP₂ は確認されていないため、PIP₂ 依存的な構造変化については不明のままであるため、本研究は今年度で終了するが、今後はこの立体構造解析に利用されたコンストラクトを参考に構造解析を継続する。

また、電気生理・光生理解析については、ヒト由来 KCNQ2 について電位センサーの動きを可視化するためにシステイン残基架橋により蛍光試薬でラベルすることを試みたが、安定的にシグナルを得ることができる条件を見出すことができていない。他方で、本研究実施期間中に他グループよりヒト由来 KCNQ2 の光生理解析に関する報告がなされた (Edmond *et al.*, *Elife*, 11, e77030, 2022)。本報告では、KCNQ2 の電位依存的な蛍光変化が小さく解析が困難であった事が示唆されており、このことがこれまで申請者が KCNQ2 の光生理解析の解析基盤を立ち上げられなかった要因であることが推測される。本研究は今年度で終了するが、今後は KCNQ2 の電位依存的な蛍光変化が小さい要因の 1 つとして、発現量が少ないことが考えられるため、本報告で用いている KCNQ2 のコンストラクトに申請者が発見した発現量が増加する変異を導入したものを作成し、電位依存的な蛍光変化が大きくなるかどうかを確認する。そして、解析に十分な蛍光変化が確認された場合には、KCNQ2 の PIP₂ 依存的な構造変化について電気生理・光生理解析の両面から検討する。

(2) KCNQ1-KCNE3 複合体の立体構造情報に基づいた機能解析

2020 年に報告された KCNQ1-KCNE3-カルモジュリン (CaM) 複合体の構造上において (Sun & MacKinnon, *Cell*, 180, 340-347, 2020) KCNQ1 の電位センサーのうち 1 番目の膜貫通セグメント (S1 セグメント) と KCNE3 の膜貫通セグメントが特に密接に相互作用していることがわかってきた。そこで、この S1 セグメントと KCNE3 の相互作用が KCNQ1-KCNE3 複合体は生理条件下で電位依存性を大きく過分極側にシフトし常時開状態になるために重要であると仮説を立て、まず S1 セグメントのアミノ酸残基のうち、KCNE3 の方へ向いている 7 つのアミノ酸残基 (F123、F127、F130、L134、I138、L142、I145) について各種変異体を作成し、KCNQ1 単独および KCNE3 の野生型と共発現のそれぞれの条件で測定を行った。その結果、7 つのアミノ酸残基 (F123、F127、F130、L134、I138、L142、I145) のうち、5 つのアミノ酸残基 (F127、F130、I138、L142、I145) において、KCNE3 依存的な KCNQ1 の機能修飾とアミノ酸残基の側鎖の大きさに相関、すなわち野生型のアミノ酸残基で最も電位依存性が過分極側にシフトし、変異導入したアミノ酸の側鎖の大きさが野生型のものから大きくまたは小さくなるほど過分極側へのシフトが減弱する傾向が見られた。更に、KCNE3 の膜貫通セグメント上のアミノ酸残基のうち、KCNQ1 の S1 セグメントの方へ向いている 6 つのアミノ酸残基 (S57、I61、M65、A69、G73、I76) についても各種変異体を作成し、KCNQ1 と共発現する条件で測定を行った。その結果、S1 セグメントの解析と同様に KCNE3 依存的な KCNQ1 の機能修飾と KCNE3 のアミノ酸残基の側鎖の大きさに相関

が見られた。以上の結果から、KCNQ1 の S1 セグメントと KCNE3 の膜貫通セグメントの相互作用に関わるアミノ酸残基の側鎖の大きさは、KCNE3 依存的な KCNQ1 の機能修飾に不可欠であり、厳密に最適化されていることが示唆された。

次に、KCNQ1 の S1 セグメントと KCNE3 の膜貫通セグメントの相互作用がアミノ酸残基の側鎖の大きさレベルで厳密に最適化されていることを踏まえ、S1 セグメントに導入した変異の結果低下した KCNQ1-KCNE3 複合体の常時開状態化能を、対となる KCNE3 の変異体で回復することができるのではと考えた。そこで、KCNQ1-KCNE3 複合体の構造上で同じ高さに位置する S1 と KCNE3 のアミノ酸の全てのペアについて、共発現し過分極時における開状態化能が回復するかを調べた。その結果、2 組のアミノ酸残基のペア (KCNQ1 F127 と KCNE3 G73、KCNQ1 I145 と KCNE3 S57) についてそれぞれの変異体 (KCNQ1 F127A と KCNE3 G73L、KCNQ1 I145F と KCNE3 S57A) を共発現することで機能回復が見られることを発見した。この結果から、KCNQ1 の S1 セグメントと KCNE3 の膜貫通セグメントの特定の相互作用が、KCNQ1-KCNE3 複合体の常時開状態化には必要不可欠であることが示唆された。

更に、電位センサーを蛍光標識することで膜電位変化に応じた蛍光変化を示す KCNQ1 改変体 (Nakajo & Kubo, *Nat Commun.*, 5, 4100, 2014) を用いて KCNQ1 の S1 セグメントの変異や、S1 セグメントの変異の影響を低減する KCNE3 変異体との共発現が、電位を感じる膜貫通セグメントの S4 の動きにどのような影響を与えるかを調べるため、電気生理と光生理の同時測定を行った。S4 セグメントの上部を蛍光試薬でラベルした KCNQ1 のコンストラクトを KCNE3 の野生型と共発現すると、過去の報告と同様に大きく脱分極させた時には蛍光の増加が、大きく過分極させたときには蛍光の減少が見られたが、-100 mV から 0 mV 付近では蛍光の変化がほとんど見られなかった (Taylor *et al.*, *Elife*, 9, e53901, 2020)。このことから、KCNE3 と複合体を形成している時には、KCNQ1 の S4 セグメントは中間位置に保持されており、大きく過分極した際には下段位置に、大きく脱分極した際には上段位置に移動することがわかった。次に、KCNE3 の影響を低減する S1 セグメントの変異体 (F127A、I145F) について、同様に KCNE3 の野生型と共発現し蛍光変化を測定した。その結果、いずれの場合にも野生型の時と比較して -100 mV から 0 mV 付近での蛍光変化が増加した。このことから S1 セグメントに導入した変異は KCNQ1 の S4 セグメントを中間位置に保持することはできなくなることで、常時開状態化能を低下することが示唆された。最後に、S1 セグメントの変異体とその影響を低減する KCNE3 変異体のペア (KCNQ1 F127A-KCNE3 G73L と KCNQ1 I145F-KCNE3 S57A) を共発現し蛍光変化を測定した。その結果、いずれの場合にも野生型の時と比較して -100 mV から 0 mV 付近での蛍光変化が一部減少し、野生型のペア (KCNQ1^{vcf}WT-KCNE3 WT) に近い傾向を示した。このことから、S1 セグメントの変異体とその影響を低減する KCNE3 変異体のペアにおいては、S4 セグメントを中間位置に保持する能力がやや回復することが示唆された。

(3) KCND2-KChIP1-DPP6 複合体の立体構造解析と機能解析

ヒト由来の KCND2、細胞内に発現する機能調節タンパク質の KChIP1、一回膜貫通型の機能調節タンパク質の DPP6S について、KCND2 単体、KCND2-KChIP1 複合体、KCND2-DPP6S 複合体、KCND2-KChIP1-DPP6S 複合体の 4 種類の条件で精製しクライオ電子顕微鏡法を用いた単粒子解析を利用して立体構造解析を行った。その結果、KCND2 単体 (4 量体)、KCND2-KChIP1 複合体 (8 量体)、KCND2-DPP6S 複合体 (8 量体)、KCND2-KChIP1-DPP6S 複合体 (12 量体) の計 4 種類の立体構造を得ることに成功した。各構造を比較したところ、KChIP1 については、KCND2 のイオン透過孔を形成する 6 番目の膜貫通セグメント (S6 セグメント) と相互作用することでイオン透過孔を安定化することと、KChIP1 が隣り合った 2 分子の KCND2 と相互作用することで 1 つのチャネルあたり 4 分子ある KCND2 が連動して機能することを可能にすることが示唆された。他方で、DPP6S については、KCND2 の電位センサーのうち 1 番目と 2 番目の膜貫通セグメント (S1 と S2 セグメント) と直接相互作用することで、電位センサーの動きを調節することが示唆された。

立体構造から示唆された KChIP1 と DPP6S の KCND2 に対する修飾作用を検証するために、相互作用を阻害する変異体を各種作成し、電気生理解析を行ったところ、KChIP1 と DPP6S の KCND2 に対する修飾能に変化が起り、正常に機能調節を行えなくなることが分かった。

<本研究成果に関連する主な発表論文>

1. Kise *et al.*, Structural basis of gating modulation of Kv4 channel complexes, *Nature*. 599, 158-164 (2021)
2. Kasuya & Nakajo, Optimized tight binding between the S1 Segment and KCNE3 is required for the constitutively open nature of the KCNQ1-KCNE3 channel complex, *eLife*. 11, e81683 (2022)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5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 Hagino Tatsuya, Kato Takafumi, Kasuya Go, Kobayashi Kan, Kusakizako Tsukasa, Hamamoto Shin, Sobajima Tomoaki, Fujiwara Yuichiro, Yamashita Keitaro, Kawasaki Hisashi, Maturana Andr?s D., Nishizawa Tomohiro, Nureki Osamu	4. 巻 13
2. 論文標題 Cryo-EM structures of thylakoid-located voltage-dependent chloride channel VCCN1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-30292-w	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 Kasuya Go, Nakajo Koichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Optimized tight binding between the S1 segment and KCNE3 is required for the constitutively open nature of the KCNQ1-KCNE3 channel complex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.81683	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 Kasuya Go, Nureki Osamu	4. 巻 13
2. 論文標題 Recent Advances in the Structural Biology of the Volume-Regulated Anion Channel LRRC8	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2022.896532	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 Kise Yoshiaki, Kasuya Go, Okamoto Hiroyuki H., Yamanouchi Daichi, Kobayashi Kan, Kusakizako Tsukasa, Nishizawa Tomohiro, Nakajo Koichi, Nureki Osamu	4. 巻 599
2. 論文標題 Structural basis of gating modulation of Kv4 channel complexes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 158 ~ 164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-021-03935-z	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 Oda Kazumasa, Nomura Takashi, Nakane Takanori, Yamashita Keitaro, . . . Kasuya Go (48人中17番 目)、 . . . Kubo Minoru, Nishizawa Tomohiro, Nureki Osamu	4. 巻 10
2. 論文標題 Time-resolved serial femtosecond crystallography reveals early structural changes in channelrhodopsin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e62389
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.62389	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

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 糟谷豪、中條浩一
2. 発表標題 S1セグメントとKCNE3の適切な距離関係がKCNQ1-KCNE3 K+チャネルの常時開状態化に重要である
3. 学会等名 第99回 日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 糟谷豪
2. 発表標題 Proper interaction between the S1 segment of KCNQ1 and KCNE3 is required for the constitutively open nature of the KCNQ1-KCNE3 K+ channel complex.
3. 学会等名 第100回 日本生理学会大会
4. 発表年 2023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

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