

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07149

研究課題名(和文) ペプチド作動性チャネルの細胞外ドメイン内空間がチャネル機能に及ぼす影響

研究課題名(英文) A study on the functional importance of the inner space of the extracellular domain in a peptide-gated Na<sup>+</sup> channel

研究代表者

古川 康雄 (FURUKAWA, YASUO)

広島大学・総合科学研究科・教授

研究者番号：40209169

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)：本研究では、軟体動物アメフラシのFMRamide作動性Na<sup>+</sup>チャネル(AkFaNaC)の細胞外ドメイン内空間の底部に存在する陰性リング構造がチャネル機能におよぼす影響を解析した。その結果、552、556位のアスパラギン酸にCa<sup>2+</sup>が配位することでチャネル機能が制御されており、これまでの実験結果の多くはCa<sup>2+</sup>結合状態を加えたアロステリックモデルにより説明出来ることが明らかになった。また、FaNaCの細胞外ドメイン構造に存在する7ヶ所のSS結合の機能的意味合いを検証する研究、並びにラットの酸感受性チャネルにおけるAkFaNaCの552、556位に相当する部位の機能解析実験に着手した。

研究成果の概要(英文)：To understand the function of negative-ring structures by D552 and D556 of the Aplysia FMRamide-gated Na<sup>+</sup> channel (AkFaNaC), the mutant channels (D552N, D556N, D552ND556N) were made and examined in *Xenopus* oocytes. We found that the Ca<sup>2+</sup> coordination to D552 and D556 inhibits the activation of FaNaC. We constructed an allosteric model in which the channels are in either Ca<sup>2+</sup>-unbound or Ca<sup>2+</sup>-bound states. The model explains many aspects of the activation of AkFaNaC. To extend the research, we examined seven SS bonds in the external domain of FaNaC which must be important for maintaining the inner space of the external domain of FaNaC. We also started to analyze the functional impact of the negative-rings of the rat acid-sensing ion channel which are structurally similar to the negative-rings of FaNaC.

研究分野：神経生物学

キーワード：イオンチャネル ペプチド 構造機能相関

### 1. 研究開始当初の背景

リガンド作動性チャンネルは、神経系における細胞間情報伝達を担う重要な機能素子であり、古典的神経伝達物質であるアセチルコリンや GABA をリガンドとするリガンド作動性チャンネルのゲート機構や構造機能相関は非常によく研究されている。一方、比較的最近発見されたペプチドをリガンドとするペプチド作動性 Na<sup>+</sup>チャンネルや H<sup>+</sup>をリガンドとする酸感受性チャンネルは、チャンネル構造の特徴から上皮性 Na<sup>+</sup>チャンネル族に分類される別種のリガンド作動性チャンネルであり、そのゲート機構や構造機能相関には不明な点が多い。特に、ペプチド作動性チャンネルは、現在のところ軟体動物と刺胞動物でのみ報告されており、神経系におけるペプチド性情報伝達の進化を考える上でも非常に興味深いリガンド作動性チャンネルである。本研究課題は、神経系に発現するリガンド作動性チャンネルの中で、進化的に特異な位置を占めるペプチド作動性チャンネルの構造と機能を解明する研究の一環として企画したものである。

### 2. 研究の目的

本研究課題は、我々が継続して行っているペプチド作動性チャンネルの構造と機能の解明を目指した研究の一環として企画したものであり、軟体動物アメフラシの中樞神経系に発現する FMRFamide 作動性 Na<sup>+</sup>チャンネル (AkFaNaC) をペプチド作動性チャンネルのプロトタイプの一つととらえ、その細胞外ドメイン内空間に露出するアミノ酸がチャンネルのゲート機構やイオン透過性に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。AkFaNaC の 3 次元構造は未だ明らかにされていないが、上皮性 Na<sup>+</sup>チャンネル族に属する酸感受性チャンネルは X 線結晶構造解析により 3 次元構造が示されている。我々は、先行研究において、酸感受性チャンネルの結晶構造を元にしたホモロジーモデリングにより、AkFaNaC の 3 次元構造モデルを作製しており、AkFaNaC の細胞外ドメイン内空間の底部には、アスパラギン酸残基 (D552, D556) により構築される二重の陰性リング構造があることを示唆している。そこで本研究課題では、特に、この二重の陰性リング構造とチャンネル活性化の関係を明らかにすることを主目的とした。

また、研究課題の企画時には予定していなかったが、本研究課題との関連性から、ペプチド作動性 Na<sup>+</sup>チャンネルと相同性が高い酸感受性チャンネル 3 に存在する同様な二重の陰性リング構造の機能を明らかにするための変異体作製実験と、AkFaNaC の細胞外ドメイン構造維持に関わることが予測される 7 個の SS 結合の破壊実験にも着手した。

### 3. 研究の方法

(1) AkFaNaC において二重の陰性リング構造を形成すると思われる 552 位、および 556

位のアスパラギン酸を電荷を持たないアスパラギンに置換した点変異体、および二重変異体を作製し、アフリカツメガエル卵母細胞をチャンネルの発現系として、AkFaNaC 変異体チャンネルの機能的特性を電気生理学的手法で解析し、野生型 AkFaNaC と比較した。電気生理学的手法としては、微小電極法による膜電位固定法を基本とし、必要に応じてより時間分解能がよいカットオープンオオサイト法を用いた。

(2) 電気生理学的手法により得られた AkFaNaC の定常状態活性化の特徴を説明できる状態モデルの作製を行い、モデルの妥当性をコンピューターシミュレーション実験により検証した。

(3) AkFaNaC と構造が類似するラットの酸感受性チャンネル 3 (rASIC3) をクローニングし、AkFaNaC の D552, D556 に相当する E435, D439 の点変異体チャンネル、および二重変異体チャンネルの作製を行った。これらのチャンネルの機能については、アフリカツメガエル卵母細胞を発現系として、膜電位固定法による予備的な解析を行った。

(4) 上皮性 Na<sup>+</sup>チャンネル族に属するチャンネルでは、細胞外ドメイン部分に高度に保存された 14 個のシステイン残基が存在しており、これらが 7 個の SS 結合を作ると考えられている。これらの SS 結合はチャンネルの 3 次元構造の維持に必須であると思われるので、細胞外ドメイン内空間の維持にも重要であるはずである。そこで、ホモロジーモデリングから予想される AkFaNaC の 7 個の SS 結合を個別に破壊する変異体チャンネルの作製を行った。作製したチャンネルの機能的発現は、アフリカツメガエル卵母細胞を発現系として、膜電位固定法を用いて調べた。

### 4. 研究成果

(1) 細胞外ドメイン内空間底部に存在する二重の陰性リング構造の機能について

膜電位固定法により、野生型 AkFaNaC、D552N 変異体チャンネル、D556N 変異体チャンネル、D552ND556N 二重変異体チャンネルの定常状態濃度反応関係を解析した結果、以下のことが明らかになった。通常のイオン環境下 (この場合は、発現系であるアフリカツメガエル卵における生理的なイオン環境をさす) においては、濃度反応関係を特定するパラメータである EC<sub>50</sub>、ヒル定数のどちらもわずかな違いしか認められなかった。細胞外の Ca<sup>2+</sup>濃度を標準である 1.8mM から 10mM に増加させると、多少の違いはあるものの、いずれのチャンネルもチャンネル電流が減少した。一方、外液の Ca<sup>2+</sup>を除去しても変異体チャンネルの濃度反応関係には特に変化が認められなかったが、野生型チャンネルでは最大電流が著しく大きくなった。そこで、外

液の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度感受性を各チャンネルにおいてより詳細に検討したところ、野生型チャンネルのみが mM 以下の  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性を持つことが明らかになった。これらの結果を説明可能な複数の状態モデルを作製し、コンピュータシミュレーション実験によるモデルの妥当性の検証を行った結果、10 状態のアロステリックモデルにより、野生型チャンネルのみで観察された高  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性、および変異体チャンネルでも同様にみられた mM オーダーの  $\text{Ca}^{2+}$ によるチャンネル電流の阻害の両方の特性を概ね再現することが出来た。これらの研究成果を一連の論文にまとめ、Pflugers Archiv 誌に掲載した。

#### (2) 酸感受性チャンネル3における二重の陰性リング構造の機能解析

ラットの酸感受性チャンネル3に存在する AkFaNaC の D552, D556 に相当するアミノ酸残基である E435, D439 をアスパラギンに変えた点変異体、両者をアスパラギンに変えた二重変異体、さらに E435 をアスパラギン酸に変えた点変異体チャンネルの作製を行い、それらのチャンネルの機能解析実験に着手した。まだ予備的段階であるが、酸感受性チャンネル3においても、これらの二重陰性リング構造がチャンネルのゲート機構に影響を及ぼすことを示唆するデータを得ることが出来た。

#### (3) 細胞外ドメインに存在する7個のSS結合の個別破壊実験

AkFaNaC のホモロジーモデルから予想される SS 結合を形成する7対のシステイン残基において、片方のシステインをアラニンに置換した変異体を作製し、機能解析実験を行った。予備的検討の結果、破壊した SS 結合の位置により、特に目立った機能変化が認められないケース、濃度反応関係が変化する傾向が見られるケース、機能的なチャンネル発現が見られないケースの3つのパターンが得られた。しかしながら、上記の点変異導入の場合、SS 結合を作れなかったシステインが空間的に近い他のシステインと誤った SS 結合を形成する可能性も考えられるため、現在、SS 結合を形成することが予想されるシステインペアの両方をアラニンに変えた二重変異体の作製と解析を進めているところである。

#### 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 2件)

1. Fujimoto A, Kodani Y, Furukawa Y, Modulation of the FMRFamide-gated  $\text{Na}^{+}$  channel by external  $\text{Ca}^{2+}$ , Pflugers Archiv, 469, 1335-1347, 2017, 査読有, DOI:

10.1007/s00424-017-2021-z

2. Nozaki K, Furukawa Y, Serotonin modulates the excitatory synaptic transmission in the dentate granule cells, Journal of Neurophysiology, 115, 2997-3007, 2016, 査読有, DOI: 10.1152/jn.00064.2016

[学会発表](計 9件)

1. Furukawa Y, Tagashira I, Effects of the disruption of the disulfide bonds in the extracellular domain of the FMRFamide-gated  $\text{Na}^{+}$  channel, 第95回日本生理学会大会, 2018年3月29日, 高松

2. 田頭伊織, 古川康雄, 細胞外ドメインに存在する SS 結合除去が FMRFamide 作動性ナトリウムチャンネルの機能に及ぼす影響, 第69回日本動物学会中四国支部大会, 2017年5月13日, 高知

3. Furukawa Y, Kodani Y, Fujimoto A, External  $\text{Ca}^{2+}$  affects the efficacy and the desensitization of the FMRFamide-gated  $\text{Na}^{+}$  channel by binding to the two negative rings at the bottom of outer vestibule of the channel pore, 第94回日本生理学会大会, 2017年3月28日, 浜松

4. Furukawa Y, Kodani Y, Fujimoto A, Tandem negative rings at the bottom of outer vestibule are involved in the efficacy as well as the desensitization of the FMRFamide-gated  $\text{Na}^{+}$  channel, 22<sup>nd</sup> International Congress of Zoology, 87<sup>th</sup> Meeting of Zoological Society of Japan, Joint Events, 2016年11月17日, 沖縄

5. Nozaki K, Kubo R, Furukawa Y, Serotonin depresses the excitatory postsynaptic potentials in the dentate granule cells, 46<sup>th</sup> Annual Meeting of Society of Neuroscience, 2016年11月13日, San Diego, USA

6. 野崎香菜子, 古川康雄, 歯状回顆粒細胞における興奮性シナプス伝達のセロトニン性調節は海馬の背腹軸で異なる, 第39回日本神経科学大会, 2016年7月22日, 横浜

7. 野崎香菜子, 古川康雄, Serotonergic direct modulation of the excitatory synaptic afferent inputs to the granule cell in the hippocampal dentate gyrus, 第37回日本比較生理生化学会大会, 2015年12月12日, 広島

8. 野崎香菜子, 久保怜香, 古川康雄, セロトニンによる海馬歯状回の貫通線維顆粒

細胞間シナプス伝達に対する直接的な抑制作用 第 67 回日本生理学会中国四国地方会，  
2015 年 10 月 24 日，米子

9. 野崎香菜子，古川康雄，海馬歯状回顆粒細胞の異なる興奮性入力に対するセロトニンの修飾作用，第 86 回日本動物学会大会，  
2015 年 9 月 17 日，新潟

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

古川 康雄 (FURUKAWA YASUO)  
広島大学・大学院総合科学研究科・教授  
研究者番号：40209169

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )