

機関番号：15401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20570071

研究課題名 (和文) ペプチド作動性ナトリウムチャネルの機能発現に関わる分子機構に関する研究

研究課題名 (英文) A study on the molecular mechanisms of the functions of a peptide-gated Na<sup>+</sup> channel

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

研究成果の概要 (和文)：本研究課題では、ペプチド作動性 Na<sup>+</sup>チャネルであるアメフラシの FMRFamide 作動性 Na<sup>+</sup>チャネルの機能発現に関わる分子機構に関する研究を行った。その結果、チャネルの一次構造における 552 位アミノ酸部位がチャネルポア外縁部に存在しておりチャネルの活性化や脱感作機構に関わることを明らかにした。また、この部位のアミノ酸側鎖の電荷がチャネル電流の整流性に影響を与えることを明らかにし、このチャネルが内向き整流性を示すのは、552 位アミノ酸がアスパラギン酸であることによることを示した。

研究成果の概要 (英文)：Molecular aspects of the functions of a peptide-gated Na<sup>+</sup> channel, FMRFamide-gated Na<sup>+</sup> channel (FaNaC), were examined in this study. We found that the position 552 of FaNaC is involved in the activation and the desensitization of the channel, and that the negative electric charge on this position (Asp<sup>552</sup>) is essential for the inward rectification of the channel current.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：神経生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

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

神経ペプチドは動物の神経系に存在する情報伝達分子の中で最も多種多様なものであり、その動作原理を明らかにすることは脳機能を分子レベルで理解するうえで必須である。知られている神経ペプチドの受容体のほとんどが G タンパク質共役型受容体である中で、FMRFamide 作動性 Na<sup>+</sup>チャネルは FMRFamide により活性化されるリガンド

作動性イオンチャネルであるという点でユニークなペプチド受容体であり、一次構造が知られている唯一のペプチド作動性イオンチャネルであった。しかしながら、このイオンチャネルの構造機能相関に関する研究は少なく、チャネルの活性化などの機能を発現する分子機構に関してはほとんど知られていなかった。そこで、FMRFamide 作動性 Na<sup>+</sup>チャネルの機能発現について分子レベル

で明らかにすることが、ペプチド性情報伝達を理解する上で重要であると考え、本研究課題を企画した。

## 2. 研究の目的

FMRFamide 作動性 Na<sup>+</sup>チャンネルは、一次構造上の特徴から、上皮性 Na<sup>+</sup>チャンネル族に分類されるチャンネルである。このチャンネル族に属するチャンネルに共通する構造上の特徴として、2つの膜貫通ドメインと巨大な細胞外ドメインがあげられる。2つの膜貫通ドメインは、チャンネルポアを形成する部分であり、チャンネルとしての機能発現に重要な部位である。本研究では、我々の先行研究によりその機能的な重要性が示唆された2番目の膜貫通ドメインの細胞外側に位置する552位のアミノ酸の役割に焦点を絞り、この部位のアミノ酸側鎖の機能を解析することを主な目的とした。一方、このチャンネルのキネティクスに関する情報は非常に少なく、このチャンネルのチャンネルとしての機能を電気生理学的手法で出来る限り明らかにすることが必要であると考えられるため、いくつかの手法を用いたチャンネルのキネティクス解析を行うことをもう一つの目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 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、FMRFamide 作動性 Na<sup>+</sup>チャンネルの機能を電気生理学的手法で解析した。チャンネルの発現チェック、および定常状態電流の測定は微小電極法による膜電位固定法により行った。細胞内イオン濃度を制御した条件下での実験が必要な場合は、カットオープンオオサイト法による膜電位固定実験により行った。カットオープンオオサイト法は、微小電極法よりもはるかに時間分解能がよい膜電位固定実験が可能であるので、本法により、膜電位ジャンプ時の緩和電流のキネティクス解析を行った。また、単一チャンネルレベルでのキネティクス解析を目指して、パッチクランプ法による単一チャンネル電流測定を行った。

(2) 我々の行った先行研究により、552位のアミノ酸側鎖の性質とチャンネル機能との関連が推定されていたので、552位のアスパラギン酸残基を他のアミノ酸に変更した点変異体を多数作製した。膜電位固定法を用いて、それら点変異体チャンネルの機能解析を行うことで、この部位のアミノ酸側鎖の物理化学的性質とチャンネル機能の関連を調べた。

(3) 552位アミノ酸をシステインに変えたD552C変異体において、システイン側鎖とジ

スルフィド結合を作る試薬(SH修飾剤)を用いることで、この部位の側鎖の限られた性質のみを変更した場合にチャンネル機能にどのような影響をおよぼすかを検討した。

(4) ペプチドによる活性化速度を解析するために、外液瞬間交換法を用いた実験系の確立を目指し、FMRFamide 作動性 Na<sup>+</sup>チャンネルを安定発現する哺乳類培養細胞株の確立に取り組んだ。

## 4. 研究成果

(1) FMRFamide 作動性 Na<sup>+</sup>チャンネルに対する二価イオン作用の定量的解析

カットオープンオオサイト法を用いた膜電位ジャンプ法により、FMRFamide 作動性 Na<sup>+</sup>チャンネル電流を解析し、細胞内外のチャンネル透過性および非透過性イオンの作用を検討した。カットオープンオオサイト法は、微小電極法に比べはるかに時間分解能よくチャンネル電流を記録できる方法であり、FMRFamide 作動性 Na<sup>+</sup>チャンネルが電圧センサー部位を持たないにもかかわらず、チャンネル電流が電位依存性を示し、過分極性膜電位ジャンプにより活性化されるチャンネル電流が増大することを始めて示すことが出来た。また、膜電位ジャンプ時に見られるチャンネル電流の緩和過程が、細胞外のCa<sup>2+</sup>濃度やNa<sup>+</sup>濃度の影響を受けて変化することを明らかにした。この成果については、国内外の学会で発表し([学会発表]の2, 5, 8, 9, 11)、現在、投稿論文を作成中である。

(2) チャンネルポア外縁部の変異体チャンネル作成と機能解析

先行研究により、FMRFamide 作動性 Na<sup>+</sup>チャンネルの552位のアスパラギン酸がチャンネルに対する二価イオン作用に関わっていることを示唆する結果を得ていたため、この部位の点変異体を作成し、変異体チャンネルの機能を電気生理学的手法で解析した。その結果、この部位のアミノ酸残基の側鎖の物理化学的性質により、チャンネルの活性化、脱感作、FMRFamide 感受性が変化することが明らかになった。この成果については、国内外の学会で発表し([学会発表]の4, 6, 7, 8, 10, 11)、その一部は論文として公表した([雑誌論文]の1)。

(3) 552位にシステインを導入した変異体チャンネル(D552C)におけるSH修飾剤の作用解析

552位にシステインを導入したD552C変異体チャンネルにおいて、陽イオン性、および

陰イオン性のSH修飾剤を作用させることでこの部位の電荷を変化させ、その事がチャンネル機能にどのような影響をおよぼすかを検討した。その結果、陽イオン性の側鎖を付加するとFMRFamideのEC50値が小さくなり、チャンネルの最大応答が増大した。一方、陰イオン性の側鎖を付加すると、EC50には変化がみられなかったが、最大応答が低下した。側鎖の大きさ自体にはほとんど差がないことから、これらの作用は電荷の違いによるものと推定された。この成果については、国内外の学会で発表し〔学会発表〕の1,3)、現在、投稿論文を作成中である。

#### (4) FMRFamide作動性Na<sup>+</sup>チャンネルの単一チャンネル電流解析

チャンネル機能の詳細な解析を目指すうえで、ホールセル電流記録による巨視的なイオンチャンネル電流のキネティクス解析に加え、パッチクランプ法を用いた単一チャンネル電流記録による解析が加えられることが望ましい。この視点から、本研究課題でも、アフリカツメガエル卵母細胞におけるFMRFamide作動性Na<sup>+</sup>チャンネルの単一チャンネル電流の解析に取り組んだ。残念ながら、本イオンチャンネルの単一チャンネルコンダクタンスが小さいことに加え、そのゲート機構がバーストを示すこともあり、本研究課題の期間中に定量的な解析に耐えうる単一チャンネル電流データを得ることは出来なかった。しかしながら、いくつか改良可能な点も浮かび上がっているため、今後の研究に生かしたいと考えている。

#### (5) 細胞外液瞬間交換法によるチャンネル活性化のキネティクス解析

本方法を適用する細胞系である哺乳類培養細胞にFMRFamide作動性Na<sup>+</sup>チャンネルを発現させるためのベクターを構築した。このベクターを用いて、チャンネル活性化、脱感作のキネティクス解析をより長時間分解能で解析するために、恒常的にFMRFamide作動性Na<sup>+</sup>チャンネルを発現する哺乳類培養細胞株の構築を試み、安定してFMRFamide作動性Na<sup>+</sup>チャンネルを発現する細胞株の確立に成功した。本研究課題の期間中にキネティクス解析を行うまでには至らなかったが、今後、この細胞株を利用して、細胞外液瞬間交換法によるチャンネル活性化キネティクス解析を行う予定である。

#### 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. Y. Kodani, Y. Furukawa, Position 552 in a FMRFamide-gated Na<sup>+</sup> channel

affects the gating properties and the potency of FMRFamide, *Zoological Science*, 27, 440-448, 2010, 査読有  
2. F. Morishita, Y. Furukawa, O. Matsushima, H. Minakata, Regulatory actions of neuropeptides and peptide hormones on the reproduction of molluscs, *Can. J. Zool.*, 88, 825-845, 2010, 査読有

〔学会発表〕(計11件)

1. 古川康雄, 小谷 侑, FMRFamide 作動性 Na<sup>+</sup>チャンネルのイオン透過性について, 第81回日本動物学会大会, 2010年9月25日, 東京

2. 小谷 侑, 古川康雄, FMRFamide 作動性 Na<sup>+</sup>チャンネルの D552C 変異体に対するシステイン修飾剤の作用, 第81回日本動物学会大会, 2010年9月25日, 東京

3. 古川康雄, 小谷 侑, FMRFamide 作動性 Na<sup>+</sup>チャンネルに対するシステイン修飾剤の作用, 第32回日本比較生理生化学会大会, 2010年7月19日, 福岡

4. 小谷 侑, 古川康雄, FMRFamideによる FMRFamide 作動性 Na<sup>+</sup>チャンネルのポアブロック, 第80回日本動物学会大会, 2009年9月17日, 静岡

5. 古川康雄, 小谷 侑, FMRFamide 作動性 Na<sup>+</sup>チャンネルの D552 変異体における電位依存性, 第80回日本動物学会大会, 2009年9月17日, 静岡

6. Y. Kodani, Y. Furukawa, An aspartate in TM2 of the FMRFamide-gated Na<sup>+</sup> channel affects the effectiveness of FMRFamide as well as the kinetic properties, 36th International Congress of Physiological Sciences, 2009年7月29日, 京都

7. 小谷 侑, 古川康雄, FMRFamide 作動性 Na<sup>+</sup>チャンネルの TM2 領域に位置するアスパラギン酸残基の役割, 第61回日本動物学会中国四国支部大会, 2009年5月17日, 高知

8. Y. Furukawa, Y. Kodani, An aspartate residue in the second transmembrane domain is critical for the function of FMRFamide-gated Na<sup>+</sup> channel, 38th Annual meeting of the society for neuroscience, 2008年11月15日, Washington DC, USA

9. 古川康雄, 小谷 侑, FMRFamide 作動性 Na<sup>+</sup>チャンネルの電位依存性, 第79回日本動物学会大会, 2008年9月5日, 福岡

10. 小谷 侑, 古川康雄, FMRFamide 作動性 Na<sup>+</sup>チャンネルにおける 552 位アスパラギン酸残基の役割, 第79回日本動物学会大会, 2008年9月5日, 福岡

11. 小谷 侑, 古川康雄, Mg<sup>2+</sup>による FMRFamide

作動性Na<sup>+</sup>チャネル電流の増強とその分子機構, 第60回日本動物学会中国四国支部大会,  
2008年5月18日, 広島

[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：