

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790184  
 研究課題名（和文） ホヤKCNQ1ホモログを用いたKCNEタンパク質による  
 チャンネル機能修飾機構の解明  
 研究課題名（英文） Mechanisms of KCNQ1 channel modulation by KCNE proteins revealed  
 by ascidian KCNQ1 homologue  
 研究代表者  
 中條 浩一（NAKAJO KOICHI）  
 生理学研究所・分子生理研究系・助教  
 研究者番号：80390699

研究成果の概要(和文):電位依存性カリウムチャンネルの一種であるKCNQ1チャンネルは、心臓や、内耳、腸など、体中のさまざまな場所で発現しており、不整脈や難聴の原因遺伝子として知られている。このイオンチャンネルの性質は修飾タンパク質であるKCNEファミリーの種類によって大きく変わることが知られている。本研究ではホヤのKCNQ1遺伝子を用い、ヒトのKCNQ1遺伝子と比較することでKCNEタンパク質による修飾機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）: KCNQ1, a voltage-gated potassium channel main subunit, is expressed in various tissues like heart, inner ear and intestine, and also known as a causative gene for cardiac arrhythmia and deafness. The property of this ion channel is largely dependent on its auxiliary subunit, KCNE proteins. In this study, we identified some important amino acid residues for KCNQ1 channel modulation by KCNE proteins by comparing human KCNQ1 gene to KCNQ1 homologue from ascidian *Ciona intestinalis*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子生理学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：イオンチャンネル、カリウムチャンネル、生物物理学、生理学、電位センサー

### 1. 研究開始当初の背景

KCNQ1 チャンネルの KCNE タンパク質による修飾は、膜タンパク質の複合体構成による機能修飾という分子生理学的に興味深い対象であるのみならず、不整脈や難聴に関わる重要な生理学的意義を持つが、どのようにして分子の会合が機能の修飾につながるのか、その分子メカニズムはよくわかっていなかった。また KCNE1 は KCNQ1 を開きにくいチャンネルに変化させるが、一方で KCNE3 は KCNQ1 を常時開状態にあるチャンネルに変化させることが知られていた。しかしながら同じような分子構造を持つ両者がどのようにしてここまで異なった作用を KCNQ1 チャンネルに及ぼすことができるのかほとんどわかっていなかった。

### 2. 研究の目的

KCNE タンパク質をそのゲノムに持たないホヤの KCNQ1 チャンネルであれば、KCNE タンパク質による修飾機能が損なわれていると予想し、それを利用して修飾機構に重要な部位を同定することを目的とした。また KCNE1 と KCNE3 の修飾機構の違い、を明らかにすることも目指した。

### 3. 研究の方法

ホヤの KCNQ1 チャンネルとヒト KCNQ1 チャンネルのキメラタンパク質を作成し、アフリカツメガエル卵母細胞を発現系として用いて、主に電気生理学的手法により解析した。ある程度領域を絞った後に、点変異体を作成し、機能修飾に重要なアミノ酸を同定した。

### 4. 研究成果

(1) 予想したとおりホヤ KCNQ1 は KCNE タンパク質によってほとんど修飾を受けなかった (図 1)。KCNE1 により、KCNQ1 チャンネルの電位依存性カーブはわずかながら過分極側にシフトしたが (図 1 の赤いグラフ)、野生型の KCNQ1 では大きく脱分極側にシフトすることが知られており、この点においてホヤの KCNQ1 では大きく性質が異なっていることがわかった。また KCNE3 はホヤ KCNQ1 の性質をまったく変えることがなかった。以上のことから、ホヤ KCNQ1 は KCNE タンパク質によって修飾を受けるための機能がもともとないか、損なわれている

ことがわかった。

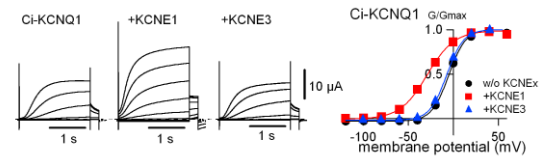


図 1

(2) (1)の結果を受け、ヒト KCNQ1 とホヤ KCNQ1 のキメラタンパク質を作成した。KCNE1 による電位依存性カーブの脱分極側へのシフトを指標にキメラタンパク質の評価を行ったところ、KCNE1 による機能修飾には S4-S6 セグメントの領域が重要であることが明らかとなった (図 2)。

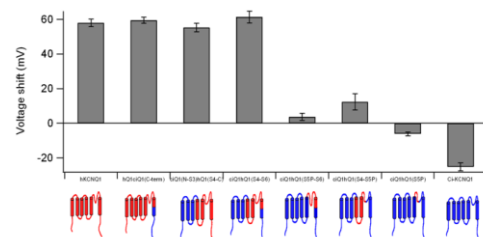


図 2

(3) S4-S6 セグメント中、ヒトとホヤの間で保存されていないアミノ酸をターゲットにして、点変異体のシリーズを作成した。それにより、ヒト KCNQ1 の 272 番目のグリシンと 334 番目のバリン及び S5-P リンカー領域が、KCNE1 による修飾に必須であることを同定することができた (図 3)。

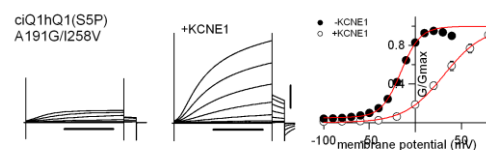


図 3

(4) 一方 KCNE3 による機能修飾は、KCNE1 の場合とはまったくことなり、S1 セグメントに存在する 127 番目のバリンが重要であることがわかった (図 4)。

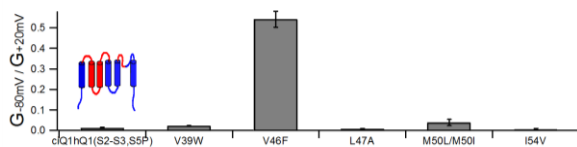


図 4

(5) 以上をまとめると、KCNE タンパク質による KCNQ1 チャンネルの修飾機構に関して、重要な部位を一アミノ酸のレベルまで同定することができ、当初の期待通りの結果を得ることができた。さらに同じタンパク質ファミリーである KCNE1 と KCNE3 で、KCNQ1 チャンネルの修飾機構、おそらく結合部位が異なっていることがわかり、このことが両者の KCNQ1 に対する修飾機能の違いを決めている可能性があることを示すことができた (図 5)。本研究の成果は、今後 KCNQ1 の修飾メカニズムを理解する上で、非常に重要な知見となると期待できる。

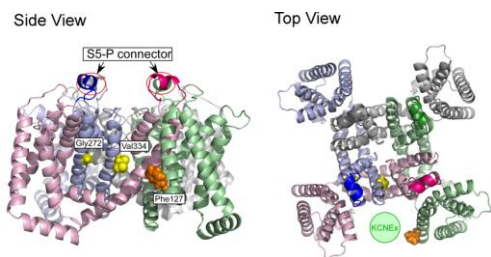


図 5

## 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 5 件)

① Ishii H, Nakajo K, Yanagawa Y, Kubo Y. Identification and characterization of Cs<sup>+</sup>-permeable K<sup>+</sup> channel current in mouse cerebellar Purkinje cells in lobules 9 and 10 evoked by molecular layer stimulation  
Eur J Neurosci. 2010, in press  
査読有

② Fujiwara Y, Keceli B, Nakajo K, Kubo Y. Voltage- and [ATP]-dependent gating of the P2X<sub>2</sub>ATP receptor channel  
J Gen Physiol. 2009 Jan;133(1):93-109  
査読有

③ Kubo Y, Fujiwara Y, Keceli B, Nakajo K.

Dynamic aspects of functional regulation of the ATP receptor channel P2X<sub>2</sub>  
J Physiol. 2009 ;587(Pt 22):5317-24  
査読有

④ Hill AS, Nishino A, Nakajo K, Zhang G, Fineman JR, Selzer ME, Okamura Y, Cooper EC

Ion channel clustering at the axon initial segment and node of Ranvier evolved sequentially in early chordates  
PLoS Genet. 2008; 4(12):e1000317  
査読有

⑤ Nakajo K, Kubo Y

Second coiled-coil domain of KCNQ channel controls current expression and subfamily specific heteromultimerization by salt bridge networks  
J Physiol. 2008, 586:2827-40  
査読有

[学会発表] (計 4 件)

① Koichi Nakajo, Maximilian Ulbrich, Yoshihiro Kubo, Ehud Isacoff  
Stoichiometry of KCNQ1-KCNE1 ion channel complex is flexible and density dependent  
Biophysical Society 54th Annual Meeting, 2010年2月21日、モスコーンセンター(サンフランシスコ、米国)

② Koichi Nakajo, Maximilian Ulbrich, Yoshihiro Kubo, Ehud Isacoff  
KCNQ1 チャンネル複合体ストイキオメトリの発現依存的変化  
日本生物物理学会第 47 回年会、2009年10月31日、アスティ徳島(徳島)

③ Koichi Nakajo, Atsuo Nishino, Yasushi Okamura, Yoshihiro Kubo  
KCNE1 modulates KCNQ1 through specific amino acid residues in the pore region  
国際生理学会 IUPS2009、2009年7月29日、京都国際会議場(京都)

④ 中條浩一、久保義弘  
KCNQ カリウムチャンネル電位センサードメインのダイナミクスとその制御機構  
日本生物物理学会第 46 回年会、2008年12月3日、福岡国際会議場(福岡)

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.nips.ac.jp/contents/release/entry/2008/07/kcnq.html>

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
中條 浩一 (NAKAJO KOICHI)  
生理学研究所・分子生理研究系・助教  
研究者番号：80390699