

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月17日現在

機関番号：14301
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21590232
 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 cAMP 感受性に関する研究
 研究課題名（英文）Structure-function studies of voltage-sensors and cAMP-dependent activation in HCN channels
 研究代表者
 石井 孝広 (ISHII TAKAHIRO)
 京都大学・大学院医学研究科・研究員
 研究者番号：40303812

研究成果の概要（和文）： 過分極で活性化される陽イオンチャネル（HCN チャネル）は、心臓や中枢神経をはじめ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はたしていることが明らかとなってきた。

HCN チャネルは過分極によりゆっくりと活性化し、cAMP によって活性化を受けるという特徴的な性質がある。本研究では、この特徴を引き起こす分子レベルでの構造的基盤を明らかにした。

研究成果の概要（英文）： HCN channels are widely expressed in various tissues, and play important roles in pacemaker and cell excitability. HCN channels are slowly activated by hyperpolarization and by cAMP. This study elucidated the molecular basis of these characteristics in HCN channels.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
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：チャネル・過分極・cAMP

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 年に発見された。その後、中枢神経系をはじめ生体の様々な場所での発現が認められ、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すことが明らかとなってきた。近年、HCN チャネルの cDNA の

クローン化がなされ、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 のクローン化に成功し、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。

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回膜貫通領域を持ち四量体として機能的なチャネルを形成する。しかし、以下のような特徴的性質

を持つ。a) 過分極によりゆっくりと活性化
する。b) 細胞内の cAMP によって電位依
存性が調節を受ける。これらの特徴は、例
えば β アドレナージック刺激による cAMP
を介した心拍数の上昇などの重要な生理
学的役割を理解する上できわめて重要で
ある。本研究で、これらの特徴を引き起
こす分子レベルでの構造的基盤を解析し、
そのメカニズムを検討した。

2. 研究の目的

(1) 電位センサーの構造の解明: HCN チヤ
ネルが過分極によりゆっくり活性化する
性質は、電位センサーの可動部位とされ
る第 4 膜貫通領域(S4)に Kv チヤネルに
比べ疎水性アミノ酸残基が多いことに
起因し、S4 と他の膜貫通領域との密接
な相互作用を引き起こすことによると
推測される。本研究は電位センサーを
構成する膜貫通領域(S1-S4)の相互作
用を明らかにする目的で行った。

(2) 電位センサーとチャネルゲートとのカ
ップリング機構の解明: 通常 Kv チヤネル
は、4 つの電位センサーが全て開状態に
ならないと、第 6 膜貫通領域(S6)の C
末で形成されていると考えられている
チャネルゲートが開かないことが知ら
れている。しかしながら、活性化速度の
電位依存性の研究などから、HCN チヤ
ネルでは開状態の電位センサーの数が
増えるとチャネルゲートの開確率が上
昇すると考えられている。

①電位センサーの動きの可視化: 電位セ
ンサーの動きは電流応答から想像され
たものすぎず、詳細な電位センサーと
チャネルゲート機構の関係を調べるた
めには、電位センサーの動きの可視化
は必須である。本研究は、哺乳類の
HCN チヤネルにおいて蛍光標識し電位
センサーの動きを可視化する目的で行
った。

②チャネルゲートの開状態に必要な電位
センサーの数を測定: タンデムにチャ
ネルサブユニットをつないだ四量体
を作製し、閉状態にロックされる変異
を導入し、可動な電位センサーの数を
減少させ、電流を測定し、HCN チヤ
ネルの電位センサーとチャネルゲートの
カップリング機構を分子的に解明する
目的で行った。

③電位センサーとチャネルゲートとの相
互作用の解明: 電位センサーとチャ
ネルゲートとの相互作用が一つのサブ
ユニットの中で起こっているのか、あ
るいはサブユニット間の相互作用で
起こっているのかを解明する目的で行
った。

(3)cAMP による電位依存性の調節機
構の解明: cAMP による調節は、心拍
数調節等の生理学的に重要な役割を果
たしている。HCN チヤネルの細胞内
C 末領域に cAMP が結合する部位
(CNBD) が同定されており、CNBD

がチャネルゲートに作用することが知
られている。しかしながら、電位セン
サーを構成する S1 や S2 の変異で
cAMP による活性化速度の変化が抑
制されることから、電位センサーと
CNBD が相互作用をしていることも
示唆されている。cAMP による調
節機構を解明するために、サブユニ
ット間での調節機構の差異をもたら
す部位を特定する目的で行った。

3. 研究の方法

(1) 電位センサーの構造の解明: 電位
センサーの構造を明らかにするために、
哺乳類 HCN チヤネルのサブタイプ
である HCN1 を使い、第 1 膜貫通領
域(S1)と第 4 膜貫通領域(S4)の両
者にシステインを導入した電流応答
を測定し、電流応答の変化を測定し
た。S1 と S4 との間でジスルフィド
結合により架橋すれば変化が認めら
れるはずである。また、還元剤であ
る DTT によってジスルフィド結合に
よる架橋が切断されればさらに電流
応答の変化が期待される。

(2) 電位センサーとチャネルゲートとの
カップリング機構の解明:

①電位センサーの動きの可視化: 電位
センサーの動きの可視化を行うため
にウニの HCN チヤネルでゲート電
流と同様の動きをする S4 のアミノ
酸残基相同部位を、哺乳類 HCN チ
ヤネルにおいて蛍光標識する。具体
的には、HCN2 を用い、細胞外領域
に存在するシステイン残基を全て他
のアミノ酸残基に置換する。その
うえで S4 に存在するアルギニン 300
をシステインに置き換え、マレイミ
ド基のついた蛍光物質 (Alexa488)
を加えシステイン残基に結合させる。
電位固定法を適応し、過分極刺激
に対する蛍光強度の変化を測定し、
電位センサーの動きの変化を調べた。

②チャネルゲートの開状態に必要な電
位センサーの数を測定: チャネルゲ
ートの開状態に必要な電位センサー
の数を測定するために、閉状態にロ
ックされた電位センサー (318Q) と
野生型の電位センサーを持ったチ
ヤネルサブユニットをタンデムにつ
なぎ合わせ四量体を作製し、動くこ
とが可能な野生型の電位センサーの
数を 4 つから減少させたチャネル
として作製した。

③電位センサーとチャネルゲートとの
相互作用の解明: S4-5 の間と S6
直後のアミノ酸残基が相互作用を
して電位センサーの動きをチャ
ネルゲートに伝えていると考えられ
ている。その電位センサーとチャ
ネルゲートの相互作用がサブユニ
ット内かサブユニット間の相互作
用かを明らかにするために二つの
サブユニットをタンデムにつなぎ
一方の電位センサーに動かない変
異を導入しそれらの相互作用を
調べた。

(3) cAMP による電位依存性の調節機
構の解

明： cAMP による調節のサブユニット間での調節機構の差異をもたらす部位を特定するために、cAMP であまり活性化されない HCN1 と活性化される HCN2 との間でキメラを作製し、その差異を生む場所を特定し、さらに変異を導入してそのアミノ酸残基を特定した。

4. 研究成果

(1) 電位センサーの構造の解明：HCN1 の S1 と S4 にそれぞれランダムにシステイン残基を導入し、電流応答の変化を測定した。変異体 L139C+S253C では、過分極で活性化される HCN チャンネル特有の電流応答が認められなかった。しかし、DTT を投与すると HCN チャンネルに特徴的な過分極で活性化される電流応答が現れた。(図 1、2) このことより、139 番目と 253 番目のシステインが物理的に近い位置にあるためジスルフィド結合をつくりチャンネル機能が失われたが DTT によって還元されジスルフィド結合が分断されるとチャンネル機能が復活したと考えられる。これらのことから、S1 の 139 番目の残基と S4 の 253 番目の残基は非常に近い位置にあることが、想定されることが明らかとなった。この結果は HCN チャンネルの電位センサーの構造を考える上で大きな進歩である。

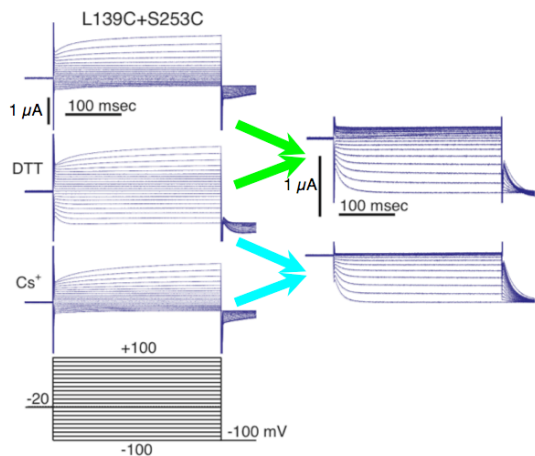


図 1. L139C+S253C:過分極で活性化される電流応答がなかったが、DTT を投与すると過分極で活性化される電流応答が現れた。

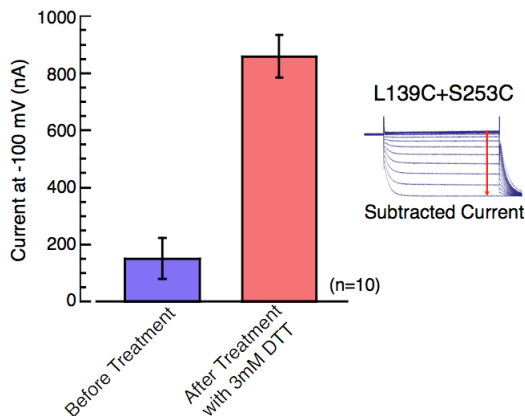


図 2. L139C+S253C:有意に DTT で電流応答が増加した。

(2) 電位センサーとチャネルゲートとのカップリング機構の解明：①電位センサーの動きの可視化：HCN2 の S4 のアルギニン 300 をシステイン残基に置換し蛍光物質をマレイミド基を使って蛍光物質 (Alexa488) を結合させ電位固定法で蛍光強度の変化と電流応答を同時に記録した。蛍光強度の変化は電流応答に先立って起こり、電流応答に相当する動きを示した。(図 3) これらのことから、電位センサーの動きを哺乳類の HCN チャンネルでも可視化することが出来たと考えられる。電位センサーの動きの可視化は、今後の電位センサーとゲート機構とカップリング機構を解明する上で大きな進歩である。

R300C in HCN2

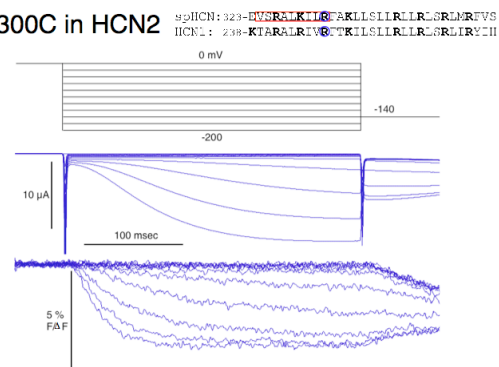


図 3. 過分極刺激(上段)によって電流応答(中段)に先立ち蛍光強度(下段)の変化が起こった。

②チャネルゲートの開状態に必要な電位センサーの数を測定：野生型の電位センサーの数を 4 つから減少させたサブユニットをつなぎ合わせたチャンネルを作製し、電流応答を測定した。少なくとも 2 つのサブユニットが開状態になることが出来れば、チャンネルが開くことが確認された。(図 4) 可動なサブユニットが少なくなるとの予想通り電流応答の速度が速くなることも確認できた。HCN チャンネルは、Kv チャンネルのホジキンハクスレーモデルではなく、少数の電位センサーの動きで開確率が上がることを確認できた。

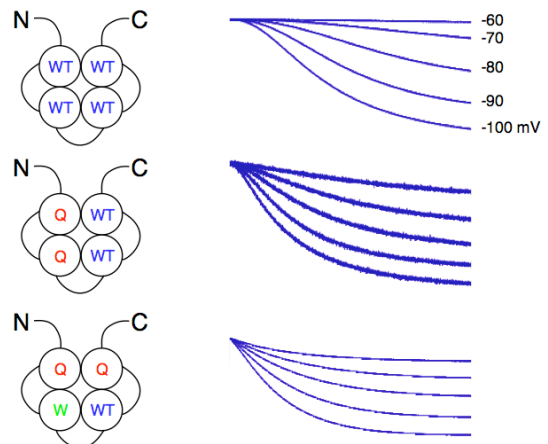


図4. 野生型の電位センサーの数と電流応答の速度の比較

WT:野生型の電位センサー、Q:閉状態で固定、W:開状態で固定

③電位センサーとチャネルゲートとの相互作用の解明:電位センサーとチャネルゲートの相互作用を調べるために、二つのサブユニットをつなぎ合わせ、変異を二カ所導入し、その電流応答を測定した。その結果、サブユニット間の相互作用が示唆される結果が得られた。(図5)つまり、電位センサーの動きが別のサブユニットのゲート機構と相互作用を行っていることが示唆された。このような、研究は今まで行われておらず、きわめて独創的で新たな知見をもたらすことが期待される。

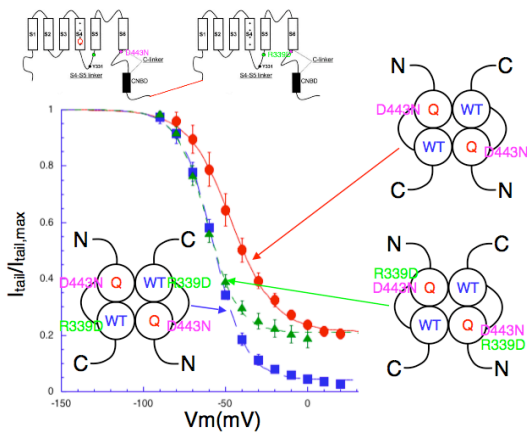


図5. D443Nをレスキューできる変異(R339D)は、別のサブユニットに導入したときに効果があった。

(3) cAMPによる電位依存性の調節機構の解明:cAMPによる活性化のサブタイプ間の違いを引き起こしている部位を特定するためHCN1とHCN2とのキメラを作製し電流応答を測定したところ、予想通りCNBDの領域が重要であることが明らかとなった。(図6) また、その領域のどのアミノ酸が重要かを調べるため点変異を導入しcAMPによる活性化を調べたところHCN1において475と496番目に相当するアミノ酸残基がサブユニット間の感受性の違いに寄与していることが明らかとなった。(図7)

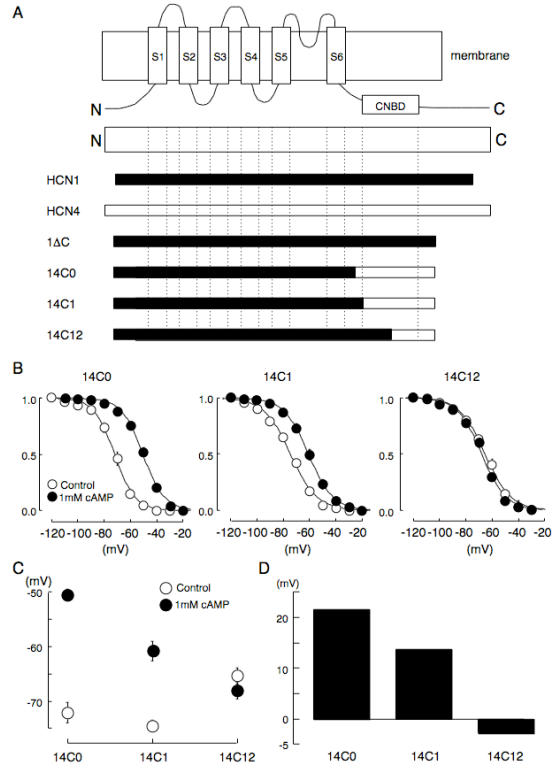


図6. CNBDの前半部がcAMPの活性化に重要であった。

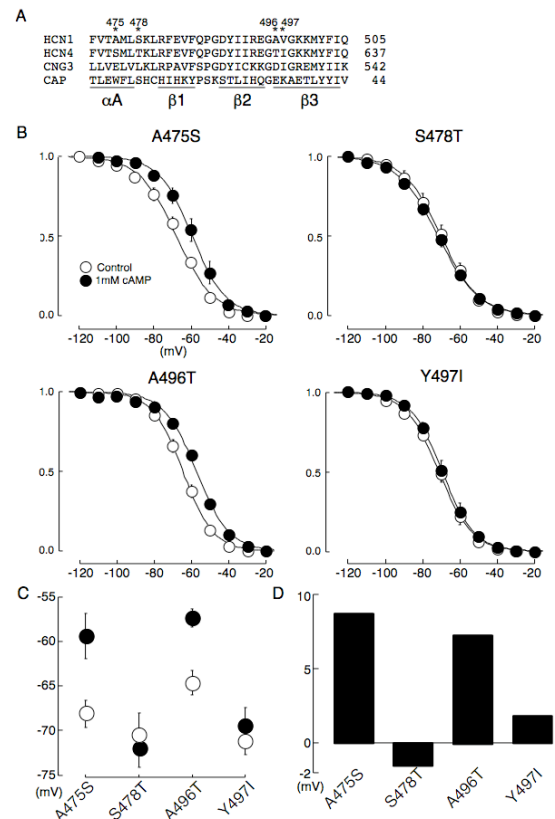


図7. HCN1のS478TとY497IでcAMPの感受性に有意な差があった。

以上の本研究の結果はHCNチャネルの構造と機能の関係を明らかにしたのみならず、同様の構造をもつ電位依存性カリウムチャネル等の構造と機能の関係にも大きなヒントを与えるものと期待される。

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1件)

Xue Lin, Hikari Jo, Takahiro M Ishii, Masatoshi Fujita, Michael Fu, Keiichi Tambara, Masaya Yamamoto, Yasuhiko Tabata, Masashi Komeda, and Satoshi Matsuoka "Controlled Release of Matrix Metalloproteinase-1 Plasmid DNA Prevents Left Ventricular Remodeling in Chronic Myocardial Infarction of Rats" (2009) *Circulation Journal*, 73, 2315-2321 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.07.011>)(査読 有)

[学会発表] (計5件)

1. 中島 則行、石井 孝広、大森 治紀 "アドレナリン β 2受容体の基底活性は、HCNチャネルを介してマウス嗅細胞の自発発火活動を維持する" (第89回日本生理学会大会、2012年3月、松本)
2. 庫本 高志、大野 行弘、今奥 琢士、笹 征史、石井 孝広、芹川 忠夫 "ラットモデルを用いた本態性振戦の遺伝要因の解明" (第34回神経科学大会、2011年9月、横浜)
3. 中島 則行、石井 孝広、大森 治紀 "HCNチャネルは、マウス嗅細胞の自発発火活動を維持する" (第34回神経科学大会、2011年9月、横浜)
4. 中島 則行、石井 孝広、大森 治紀 "マウス嗅神経の自発発火におけるHCNチャネルの役割" (第87回日本生理学会、2010年5月、盛岡)
5. Takahiro Ishii, Noriyuki Nakashima, and Harunori Ohmori "INTERACTION BETWEEN S1 AND S4 IN THE VOLTAGE SENSOR OF HCN CHANNELS" (The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences、2009年7月、京都)

[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・研究員
研究者番号：40303812

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし