

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31日現在

機関番号：63905

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790223

研究課題名（和文） 一分子蛍光観察によるKCNQ1-KCNE複合体構成の状況依存的変化の検出

研究課題名（英文） Detection of state-dependent change of the stoichiometry of KCNQ1-KCNE1 complex by single molecule imaging

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）：不整脈の原因遺伝子でもある電位依存性カリウムチャネル KCNQ1 は、修飾サブユニットである KCNE1 とイオンチャネル複合体を構成し、心拍の調節に重要な役割を担う。この複合体の分子構成を知る目的で、KCNQ1 と KCNE1 にそれぞれ蛍光タンパク質のタグを付け、全反射蛍光顕微鏡下で一複合体中のそれぞれの分子数を決定することに成功した。一複合体中に含まれる KCNE1 分子数は 1~4 であり、KCNQ1 と KCNE1 の細胞膜上での相対発現密度に依存していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：KCNQ1, which is known as a causative gene of cardiac arrhythmia, is an alpha subunit of voltage-gated K⁺ channel. KCNQ1 and its auxiliary subunit KCNE1 form an ion channel complex, which regulates the heartbeat. To determine the stoichiometry of this complex, I attached fluorescent tags on these subunits, and counted the number of each subunit in a single KCNQ1-KCNE1 complex by using total internal reflection microscope. One complex contained 1~4 KCNE1 subunits, and the number of KCNE1 was dependent on the relative expression densities of KCNQ1 and KCNE1 subunits.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：イオンチャネル、カリウムチャネル、不整脈、複合体、一分子イメージング、全反射蛍光顕微鏡、修飾サブユニット、ストイキオメトリー

1. 研究開始当初の背景

(1) 心臓のカリウムチャネル KCNQ1 とその修飾サブユニット KCNE1 が構成するイオンチャネル複合体のストイキオメトリーは 20 年以上にわたって議論されており、4 分子の KCNQ1 に対して 2 分子の KCNE1 が結合す

るとされていたが、決定的な証拠にかけていた。

(2) ストイキオメトリーはしばしば固定されたものであると考えられがちであるが、発現状況などに依存して変化する可能性があるのではないかと考え、検討することとした。

2. 研究の目的

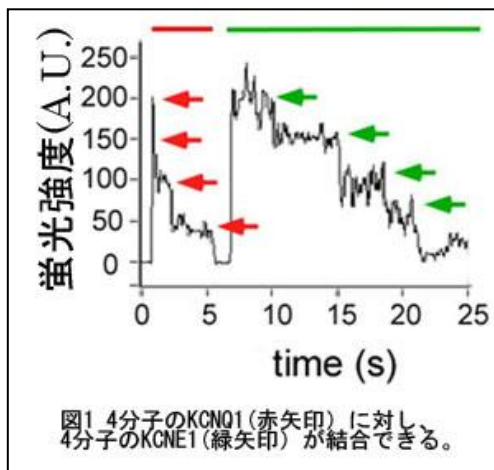
- (1) ストイキオメトリー決定のために、一分子イメージングの手法を導入し、各蛍光スポット(一つのイオンチャネル複合体)中のそれぞれのサブユニットの分子数を検討する。
- (2) それぞれのサブユニットの発現量を変化させ、ストイキオメトリー構成に与える影響を検討する。

3. 研究の方法

- (1) GFP などの蛍光性タンパク質をタグとして KCNQ1 あるいは KCNE1 に導入し、全反射蛍光顕微鏡を用いて、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させたこれら分子の蛍光を一分子レベルで観察した。蛍光の褪色イベントを一分子レベルで観測することで、一つの蛍光スポット(一つのイオンチャネル複合体)中に含まれるそれぞれのサブユニットの分子数を決定した。
- (2) 両サブユニットの細胞膜上での発現量を卵母細胞に注入する RNA の量を変えることで調節し、相対発現密度に対するストイキオメトリーの依存性を検討した。
- (3) KCNE1 の RNA 量を変化させたときの、KCNQ1 チャネルの電位依存性の変化を、二本刺し膜電位固定法を用いた電気生理学的手法により解析した。

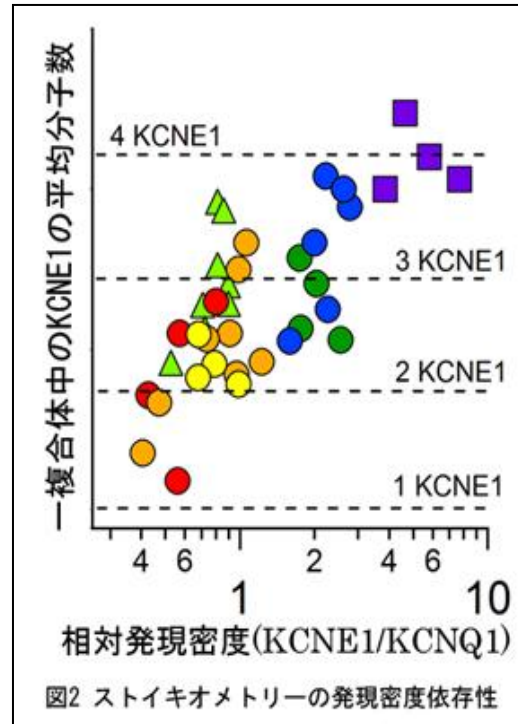
4. 研究成果

- (1) 4 分子の KCNQ1 に対し、何分子の KCNE1 が結合しているかを、KCNE1 に付けた GFP の褪色イベントの数で直接数えた。いくつかの複合体からは4回の褪色イベントが観察され、複合体中に最大 4 分子の KCNE1 が結合することが確認された(図 1)。この結果は、これまでの主流の考えであった、KCNQ1 と KCNE1 が 4:2 のストイキオメトリーを取るという考えとは全く異なるものであった。しかし、ストイキオメトリーが 4:4 で固定されているというわけでもなく、さまざまなストイキオメトリーが混在しているという興味深い結果を得た。これは各イオン



チャネル複合体のサブユニット構成を直接数えることができる、一分子イメージングの手法ならではの成果である。

- (2) KCNQ1 と KCNE1 の相対発現密度を変化させ、混在するさまざまなストイキオメトリーの割合が変化するかを検討した。KCNE1 の相対発現密度を高めるほど、一複合体中の KCNE1 の結合分子数が増えることがわかった(図 2)。KCNQ1-KCNE1 のストイキオメトリーは両分子の発現密度に依存して柔軟に変化することがわかった。



- (3) 異なるストイキオメトリー(4:2, 4:4)のそれぞれの膜電位依存性を電気生理学的手法により検討した。KCNE1 の結合数が増えるほど、より開きにくくなり、活性化のためには強い脱分極が必要になることが判明した。ストイキオメトリーが変わると機能も変化するから、(2)で見出した発現密度依存的なストイキオメトリーの変化が、心臓の膜興奮性に影響を与えることが示唆される。

- (4) 今後の展望として、今回明らかになったストイキオメトリーの変化が、細胞膜上でダイナミックに起こるのかどうか、また膜電位依存性があるかどうかなどを検討する必要がある。今回の成果はすべてアフリカツメガエル卵母細胞を発現系として用いた実験によるものであるため、実際の心筋細胞でのストイキオメトリーを知ることも今後の課題である。

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 6 件)

- ① Nakajo K, Nishino A, Okamura Y, Kubo Y. KCNQ1 subdomains involved in KCNE modulation revealed by an invertebrate KCNQ1 ortholog. *J. Gen. Physiol.* 査読有 138 (2011) 521-535
- ② Nakajo K, Kubo Y. Nano-environmental changes by KCNE proteins modify KCNQ channel function. *Channels* 査読有 5 (2011) 397-401
- ③ Nakajo K, Ulbrich MH, Kubo Y, Isacoff EY. Stoichiometry of the KCNQ1-KCNE1 ion channel complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 査読有 107 (2010) 18862-18867
- ④ Nagatomo K, Ishii H, Yamamoto T, Nakajo K, Kubo Y. The Met268P mutation of mouse TRPA1 changes the effect of caffeine from activation to suppression. *Biophys. J.* 査読有 99 (2010) 3609-3618
- ⑤ Ishii H, Nakajo K, Yanagawa Y, Kubo Y. Identification and characterization of Cs⁺-permeable K⁺ channel current in mouse cerebellar Purkinje cells in lobules 9 and 10 evoked by molecular layer stimulation. *Eur. J. Neurosci.* 査読有 32 (2010) 736-748
- ⑥ 久保義弘、藤原祐一郎、Keceli Batu、中條浩一、ATP 受容体チャネル P2X₂ の構造と機能の状況依存的変化, *Brain and nerve* 査読無 62 (2010) 1323-1329

[学会発表] (計 5 件)

- ① 中條浩一、西野敦雄、岡村康司、久保義弘 KCNE3 によるゲーティング修飾における KCNQ1 チャネル S1 セグメントの機能的役割 S 1 segment of KCNQ1 channel plays a critical role in gating modulation by KCNE3、第 89 回日本生理学会大会、(2012.3.29) 長野県松本文化会館(長野県)
- ② Koichi Nakajo, Atsuo Nishino, Yasushi Okamura and Yoshihiro Kubo Ci-KCNQ1, an ortholog of vertebrate KCNQ1 from *Ciona intestinalis*, has revealed that KCNE1 and KCNE3

utilize different domains of KCNQ1 for the modulation of gating. *Biophysical Society 56th Annual Meeting*, (2012.2.26) San Diego Convention Center, San Diego, USA

- ③ 中條浩一、Maximilian H. Ulbrich、久保義弘、Ehud Y. Isacoff サブユニットカウンティング法による KCNQ1-KCNE1 イオンチャネル複合体ストイキオメトリーの発現依存的変化の解析 Density-dependent changes of the stoichiometry of KCNQ1-KCNE1 ion channel complex revealed by direct subunit counting using single molecule imaging 第 34 回 日本神経科学大会、(2011.9.15) パシフィコ横浜(神奈川県)
- ④ 中條浩一、Maximilian H Ulbrich、久保義弘、Ehud Y Isacoff KCNQ1-KCNE1 イオンチャネル複合体の相対発現密度に依存するストイキオメトリーと機能のダイナミクス 第 88 回日本生理学会大会 第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会(2011.3.29) (震災の影響で中止) パシフィコ横浜(神奈川県)
- ⑤ 中條浩一、久保義弘 KCNE サブユニットによる KCNQ1 チャネルのゲーティング修飾における電位センサードメインの役割 第 87 回日本生理学会大会 (2010.5.29) 盛岡市民文化ホール、いわて情報県民センター(岩手県)

[その他]

- ③の PNAS 誌論文関連の報道
日経産業新聞 2010 年 10 月 20 日掲載
科学新聞 2010 年 11 月 5 日掲載

ホームページ等

生理学会ホームページ上での紹介

「サイエンストピックス 70」

<http://physiology.jp/exec/page/stopics70/>

生理研プレスリリース

「不整脈の原因となるイオンチャネルは構成する二つの分子の数のバランスが重要 - 最先端の一分子蛍光イメージング法で分子の数を"数える"ことに成功 -」

<http://www.nips.ac.jp/contents/release/entry/2010/10/post-137.html>

PNAS 誌による紹介記事

"COMMENTARY"

Osteen JD, Sampson, KJ, Kass, RS. The

cardiac I_{Ks} channel, complex indeed. Proc.
Nat. Acad. Sci. U.S.A. 107 (2010)
18751-18752

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