

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590301

研究課題名(和文) カチオン-クロライド共輸送体のイオン輸送機能を支える分子基盤の解析

研究課題名(英文) Molecular basis for the cation-chloride co-transporter activity

研究代表者

稲野辺 厚 (Inanobe, Atsushi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00270851

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜を介したイオン輸送は全ての細胞の生存に働く。イオン輸送体が担うこの機能は、高血圧、糖尿病等の様々な疾病の治療薬の標的であり、その遺伝子変異は様々な疾病を引き起こす。関連分子であるカチオン-クロライド共輸送体は電気的中性な活性を示すため、機能や薬物との相互作用の解析は難しかった。本研究では同輸送体の機能の解析を容易にするプラットフォームとして、生細胞モデル実験系の構築に成功した。

研究成果の概要(英文)：The ion transport across cell membranes is essential for a survival of all types of cells. This cellular function is mediated by various ion channels and transporters. These molecular machineries are targets for many therapeutic drugs for hypertension and diabetes. Cation-chloride co-transporters transport  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  and  $\text{Cl}^-$ , but there is no net charge for one transport cycle across membranes. This manner of the activity is electroneutral, and makes it difficult to assess the activity, the drug-interaction and the effect of inherited mutations in detail. In this study, we tried to develop the reconstitution system for a prokaryotic CCC homologue to liposomes. However, although the homologue possesses properties suit for biochemical analyses, it was totally difficult to control its protein expression. Instead of this approach, we succeeded to develop a cell-based platform as the conventional method to analyze this transporter.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：膜イオン輸送体 再構成実験系 構造機能相関 疾患関連遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

細胞膜を介するイオン輸送は膜電位の調節や細胞内のイオン濃度調節を行い、イオンの吸収や分泌、膜興奮、シグナル伝達とリンクし、細胞応答、恒常性、増殖等の様々な生理現象に関与する。イオンチャネルやトランスポーター等のイオン輸送体が、この細胞膜を介したイオン輸送機構を担っている。カチオン-クロライド共輸送体(CCC)は殆ど全ての細胞に発現し、細胞膜を介した Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>の輸送を司る。CCCの活性は腎臓における塩の吸収、上皮細胞を介した Cl<sup>-</sup>の分泌等の組織機能と密接に関連すると共に、細胞内の Cl<sup>-</sup>の濃度調節を介した神経細胞の GABA 応答性を調節することが報告されている。

カチオン-クロライド共輸送体

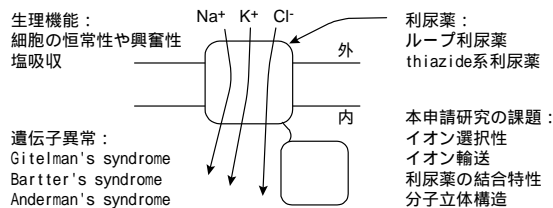


図1 カチオン クロライド共輸送体の機能、関連疾病、治療薬の概略

CCCはイオン選択性の異なる9つの遺伝子からコードされており、SLC12A1/NKCC2、SLC12A2/NKCC1がNa<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>を、SLC12A3/NCCがNa<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>を、SLC12A4-7/KCC1-4がK<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>を輸送し、SLC12A8、9はorphanであることが知られている。CCCは利尿薬の作用点であり、ループ利尿薬furosemideはSLC12A1、SLC12A2を、thiazide系利尿薬はSLC12A3を抑制することによって作用を発現することが知られている。さらに、CCCの遺伝子異常が様々な疾患の原因になることも知られている。例えば、SLC12A1は多尿、低カリウム血症、高カルシウム尿、代謝性アルカローシスであるBartter's syndrome (Type I)の、SLC12A3は低カリウム血症、低カルシウム尿、代謝性アルカローシスであるGitelman's syndromeの、SLC12A6は脳梁発育不全による神経疾患のAndermans's syndromeの原因遺伝子であり、結合蛋白質を含めたCCCの機能変異はGordon's syndromeや高血圧、癲癇、癌、骨粗鬆症にも関与することが報告されている。このようにCCCは生理的に極めて重要な役割を果たしているが、イオン選択性、イオン輸送、薬物結合特性、疾患発症等、CCCの分子機能について、不明な点が多く残されている。

## 2. 研究の目的

CCCの活性は、同時に輸送される陽イオン、陰イオンの電荷が等価であるために、イオンチャネルと比して、電気的な測定ができない。そのため、活性測定には異所性に発

現させた細胞を準備し、放射性同位体の取り込み量の測定や、重金属と特異的蛍光プローブによる蛍光変化量の測定を行うことが、主要な活性測定法である。しかしながら、細胞には他のイオン輸送体分子が多く発現しているため、高いbackgroundと低い時間分解能が問題点であった。

この問題点の克服には、高感度に活性を測定できるシステムを構築する必要がある。そこで、本申請研究では、まず精製蛋白質を用いたリン脂質小胞への再構成系による機能解析法の確立を目指した。事前研究によって、古細菌メタノサルキナ属Methanosarcina acetivorans C2Aのゲノムから、原核生物由来のCCCホモログを見出し、これが大量調製可能であることが判っていた。これは技術的に困難な真核生物膜蛋白質の大量精製に対して、大きく有利な点である。そのため、原核生物CCCホモログの活性測定系の構築、そして変異体、薬物相互作用の検討を行う予定であった。この検討を通じて、CCCのイオンの選択性、イオンの輸送機構、利尿薬の作用機序の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

CCCの分子機能解明を目的に、バクテリア由来のCCCホモログC2Aをモデル分子として、機能、構造の両面から解析を行う。1)リン脂質-精製蛋白質の再構成系とイオン選択的プローブを組み合わせることによって、イオン輸送活性の定量システムを構築すると共に、2)C2A全長、またはC末端領域の結晶構造情報の取得を目指す。さらに、3)確立した測定系を用いて、種々の変異体のイオン、利尿薬結合特性についての解析を行うと共に、4)CCCを原因とする遺伝子変異の導入効果を検討する。5)そして構造、機能情報から利尿薬の結合特性について明らかにする。これら多面的なCCC機能情報を統合することによって、イオンの選択性、イオンの輸送機構、利尿薬の作用機序、疾患発症の分子機構等のCCCの分子機能を立体的に捉える。

## 4. 研究成果

CCCホモログが大腸菌で異所性に発現できるだけでなく、熱安定性に優れていることが判った。大量調製を試みると、膜蛋白質でありながら、培養液1リッター辺り最終精製標品が0.2mg程度回収された。そこで安定性など蛋白質性状の基礎データの入手を行うと共に、発現効率、精製効率、純度の向上を試みた。しかしながら、研究期間の初期の段階で発現が不安定になり、一切の発現が見られなくなった。遺伝子配列の確認、ベクターの乗せ替え(pET, pBAD, pQE, pGEX)、ホストの確認(Rosetta2, C41, C43)、発現培地(LB, Terrific, 2xYT)、発現誘導薬(IPTG, アラビノース)、誘導薬の濃度(0.001-1mM)、発現温度(20, 25, 30, 35度)、誘導時の細

胞濃度 (600 nm の濁度:0.1-1.2) 等、細かに条件検討を行ったが、明瞭に発現量を増加させる方策は見つからなかった。

そこで、2つのK<sup>+</sup>輸送体遺伝子を欠損した酵母株を入手した。この酵母株は低濃度のK<sup>+</sup>を含む培地では増殖できず、その維持には100 mM程度のK<sup>+</sup>が必要である。酵母は特徴的に膜電位が深いため(推定-200 mV)、本株に内向き整流性カリウム(Kir)チャネルを発現させると、細胞内にカリウムが流入する。その結果、チャネルを発現した酵母は、低カリウム培地での増殖が可能となる。

CCCの中でも、NKCC-, NCC-typeのCCCは細胞内へイオンを輸送し、KCC-typeは細胞外へ流出すると考えられている。しかしながら、KCC-type CCCに対する阻害薬は、細胞内に流入する重金属イオンを指標にスクリーニングされている。つまり、CCCのイオン輸送の方向性、そしてその調節機構ですら、現時点で明らかになってはいない。これまで、本K<sup>+</sup>輸送体欠損酵母株を用いたK<sup>+</sup>輸送体の発現実験はカリウムチャネルの導入例しか報告が無かった。そこで、今回8種類のヒトCCCを収集し、発現を検討した。すると、チャネルに比べて、倍以上大きな分子量サイズでありながら、3種のCCCが本株の生育を促した。これは本酵母株においてCCCが機能的に発現していることを示している。現在、これらのCCCの活性を修飾する薬物との相互作用を検討している。

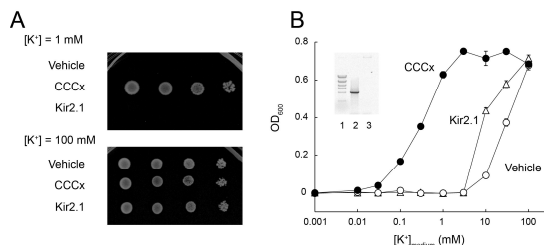


図2 生細胞を用いたCCC機能解析プラットフォームの概略(左:2つのK<sup>+</sup>培地を用いたdrop test、右:増殖のカリウム濃度依存性)

膜イオン輸送体であるKirチャネルは4量体構造をとる。機能分子は膜貫通領域、細胞質領域の2つのドメインから構成され、様々なリガンドが細胞質領域に結合することから、Kirチャネルはリガンド作動性イオンチャネルであると考えられる。さらに、4つのサブユニットはそれぞれのドメインの形成に寄与し、その集合中心軸にはイオン透過経路が存在する。そのため、Kirチャネルは既知のK<sup>+</sup>チャネルよりも分子内のイオン透過経路が長い。本申請研究期間内に、Kirチャネルファミリーに属するKir3.2のリガンド結合を担う細胞質領域における構造変化と分子機能の連関を検討した。その結果、陽イオンと細胞質領域のイオン透過系路との相互作用から、細胞質領域のポア表面は強い負の静電場を形成しており、価数依存的に陽

イオンがポアと結合することを明らかにした。さらに結晶構造中に観察されたイオンの結合状態が、チャネルが閉状態のとき、電気生理学的に観察された。これらのことから、既知の分子立体構造は閉状態であり、Mg<sup>2+</sup>存在下では一価の陽イオンであるK<sup>+</sup>がポア内を移動しづらいことを意味した。静電相互作用は距離の二乗に反比例する。そのため、イオン透過には細胞質領域ポアの内径の拡張が必須であると推定された。一般的に、膜貫通領域のポアにおける物理的な障壁がイオン輸送活性の調節であると考えられている。そのため、Kirチャネルでは、特徴的に2つのドメインがそれぞれイオン透過に対して障壁として機能し、構造を変化させることでイオン透過を支えていると考えられた。

さらに、細胞質領域ポアの拡張を支える構造変化と、その分子作動と機能発現との連関を検討した。その結果、細胞質領域のポア上部はシートから構成されるが、このシートが構造的に柔軟であることが判った。さらに、そのシートを構成するストランドがチャネル活性化因子との相互作用に依存して動くストランド、膜貫通領域と共に動くストランドから構成されており、ダイナミックに構造を変化させながら、ポアの拡張を支えている可能性が考えられた。

Kir3.2はCd<sup>2+</sup>によって活性が抑制される。この分子機構を検討すると、Cd<sup>2+</sup>はチャネルの開閉に伴って構造を変化するストランドと近接する領域と隣接する領域の間に結合し、細胞質領域を閉状態に固定することが、抑制の分子基盤であることが明らかとなった。

以上のことから、Kirチャネルの細胞質領域はリガンドを受容し、膜貫通領域のactivation gateの開閉を調節するハブとしての役割だけでなく、自身も動的に構造を変化させ、チャネル機能を支えていることが強く示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8件)

A Inanobe, T Matsuura, A Nakagawa, Y Kurachi. Inverse agonist-like action of cadmium on G-protein-gated inward-rectifier K<sup>+</sup> channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 査読有, 407, 2011, 366-371.

A Inanobe, A Nakagawa, Y Kurachi. Interactions of cations with the cytoplasmic pores of inward rectifier K<sup>+</sup> channels in the closed state. *Journal of Biological Chemistry*. 査読有, 286, 2011, 41801-41811.

Y Yamakawa, K Furutani, A Inanobe, Y Ohno, Y Kurachi. Pharmacophore modeling for hERG channel facilitation.

Biochemical and Biophysical Research Communications. 査読有, 418, 2012, 161-166.

K Furutani, Y Yamakawa, A Inanobe, M Iwata, Y Ohno, Y Kurachi. A mechanism underlying compound-induced voltage shift in the current activation of hERG by antiarrhythmic agents. Biochemical and Biophysical Research Communications. 査読有, 415, 2011, 141-146.

Inanobe A\*, Kurachi Y\*. Membrane channels as integrators of G-protein-mediated signaling. Biochimica et Biophysica Acta, 査読有, 1838, 2014, 521-531.

Chen IS, Furutani K, Inanobe A, Kurachi Y. RGS4 regulates partial agonism of the M2 muscarinic receptor-activated K<sup>+</sup> currents. Journal of Physiology, 査読有, 592, 2014, 1237-1248.

Inanobe A\*, Nakagawa A, Kurachi Y\*. Conformational changes underlying pore dilation in the cytoplasmic domain of mammalian inward rectifier K<sup>+</sup> channels. PLOS ONE, 査読有, 8, 2013, e79844.

Murakami S, Inanobe A, Kurachi Y. Short-term desensitization of muscarinic K<sup>+</sup> current in the heart. Biophysical Journal. 査読有, 105, 2013, 1515-1525.

[学会発表](計20件)

稲野辺厚. PIP<sub>2</sub>-dependent regulation of K<sup>+</sup> channel gating. 第87回日本薬理学会年会シンポジウム“PIP<sub>2</sub>によるイオンチャネルの調節機構 最近の話題” 2014年3月21日, 仙台

稲野辺厚, 都築千鶴, 倉智嘉久. Ca<sup>2+</sup>センサー蛋白質によるKCNQ1チャネルのPIP<sub>2</sub>感受性の調節. 第91回日本生理学会大会, 2014年3月16日, 鹿児島

Inanobe A, Tsuzuki C, Kurachi Y. SELECTIVE INTERACTION OF CA<sup>2+</sup>-SENSOR PROTEINS AND KCNQ1 CHANNELS. Biophysical Society 58th Annual Meeting, 2014/2/19, San Francisco, USA

稲野辺厚. Ligand-induced conformational changes in the cytoplasmic domain of inward rectifier potassium channels. 第51回生物物理学学会年会シンポジウム“最新イオンチャネル1分子科学:素過程から疾患克服まで” 2013年10月29日, 京都

稲野辺厚, 中川敦史, 倉智嘉久. G蛋白質制御内向き整流性K<sup>+</sup>チャネルKir3.2の恒常活性型変異の構造的基盤. 第86回日本生化学会大会, 2013年9月11日,

横浜

稲野辺厚. リガンド作動性カリウムチャネルの開閉調節機構:分子内ドメイン間のallosteric couplingを支えるリガンド受容ドメイン内の構造変化. 情報計算化学生物学会シンポジウム「イオンチャネルとAllosteric modulators」, 2013年8月2日, 東京

Inanobe A, Nakagawa T, Kurachi Y. Conformational Changes Underlying Pore Dilation in the Cytoplasmic Domain of Mammalian Inward Rectifier K<sup>+</sup> Channels. International Congress of Physiological Sciences, 2013/07/25, Birmingham, UK

稲野辺厚, 中川敦史, 倉智嘉久. G蛋白質制御内向き整流性K<sup>+</sup>チャネルKir3.2の恒常活性型変異の構造的基盤. 第123回日本薬理学会近畿部会, 2013年7月12日, 名古屋

Inanobe A, Nakagawa A, Kurachi Y. Structural gating elements in cytoplasmic domain of inward rectifier K<sup>+</sup> channels. : The 86th annual meeting of Japanese Pharmacological Society, 2013/3/22, Fukuoka

Inanobe A, Tsuzuki C, Kurachi Y. Classification of long-QT syndrome type-1 mutations by the ability to bind calmodulin. :第90回日本生理学会大会, 2013年3月27日(東京)

Inanobe A, Nakagawa T, Kurachi Y. Structural Elements in the Cytoplasmic Domain of Mammalian Inward Rectifier K<sup>+</sup> Channels Responsible for Gating. : Biophysical Society 57th Annual Meeting 2013/2/6 (Philadelphia, USA)

稲野辺厚. 内向き整流性カリウムチャネルにおけるG蛋白質結合とゲート開閉の共役. 生理学研究所研究会「作動中の膜機能分子の姿を捉える--静止画から動画へ--」, 2012年10月2日, 自然科学研究機構岡崎コンファレンスセンター, 岡崎

稲野辺厚, 中川敦史, 倉智嘉久. 内向き整流性カリウムチャネルにおけるG蛋白質結合とゲート開閉の共役 :第105回近畿生理学談話会, 2012年9月29日(大阪)

Inanobe A, Matsuura T, Nakagawa A, Kurachi Y. Inverse agonist-like action of cadmium on G-protein-gated inward-rectifier K<sup>+</sup> channels. :第85回日本薬理学会, 2012年3月15日(京都)

稲野辺厚, 中川敦史, 倉智嘉久. 内向き整流性カリウムチャネルにおけるG蛋白質の結合とチャネルの開閉の共役機構 :第89回日本生理学会大会, 2012年3月29日(松本)

Inanobe A, Nakagawa A, M Takanori, Y Kurachi. Inverse agonist-like action

of cadmium on G-protein-gated inward-rectifier K<sup>+</sup> channels. 第56回米国生物物理学会年会, 2012年2月28日, San Diego Convention Center, San Diego

A Inanobe, Y Kurachi. Coupling of G protein binding to channel gating in inward rectifier K<sup>+</sup> channels. The 1st HD Physiology International Symposium: Integrative multi-level systems biology for in silico cardiology and pharmacokinetics. 2012年1月21日, 東京大学武田ホール, 東京  
A Inanobe, A Nakagawa, M Takanori, Y Kurachi. Inverse agonist-like action of cadmium on G-protein-gated inward-rectifier K<sup>+</sup> channels. The 7th Congress of the Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies. 2011年9月13日, NTUH International Convention Center, Taipei

稲野辺厚、倉智嘉久. 神経型G蛋白質制御内向き整流性K<sup>+</sup>チャネルのサブユニット集合の多様性:細胞内局在の調節, 第84回日本生化学会大会, 2011年9月23日, 国立京都国際会館

稲野辺厚. 内向き整流性カリウムチャネルの開閉を支える構造的要因. 生理学研究所研究会「作動中の膜機能分子の姿を捉える--静止画から動画へ--」, 2011年9月9日, 自然科学研究機構岡崎コンファレンスセンター、岡崎

〔図書〕(計 3件)

A Inanobe, Y Kurachi. Academic Press. Cell Physiology Sourcebook, 4th Edition (Direct regulation of ion channels by G proteins. pp. 445-452.) 2012, 8

稲野辺厚、倉智嘉久. 朝倉書店. 血管生物医学事典: 日本血管生物医学会編 (Cl<sup>-</sup>チャネル, pp.286-287), 2011, 2

稲野辺厚、倉智嘉久. 朝倉書店. 血管生物医学事典: 日本血管生物医学会編 (TRPチャネル, pp.297-298), 2011, 2

〔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

稲野辺 厚 (INANOBE ATSUSHI)  
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号: 00270851

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: