

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770195

研究課題名(和文)立体構造に基づくナトリウムチャンネル サブユニットの生理的・病的機能の解析

研究課題名(英文)Structural and functional analyses of voltage-gated sodium channel beta subunits

## 研究代表者

清水 英明(Shimizu, Hideaki)

独立行政法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・研究員

研究者番号：10360562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：電位依存性ナトリウムチャンネル サブユニットはチャンネル機能調節、細胞接着を担う多機能タンパクであり、特発性てんかん熱性けいれんプラス(GEFS+)の原因遺伝子として同定されている。本研究では サブユニットの構造的特徴と細胞接着機能との関連を明らかにした。またてんかん変異によって サブユニットの細胞接着機能が低下することを明らかにし、そのメカニズムを提唱した。

研究成果の概要(英文)：The voltage-gated sodium channel subunits (1-4, encoded by SCN1B-4B, respectively) reportedly function as cell adhesion molecules. A genetic epilepsy syndrome, generalized epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+), has been correlated directly with mutations in SCN1B, encoding 1, suggesting a potential causal relationship between cell-cell adhesion and GEFS+ pathogenesis. In this study, we identified the relationship between the structural feature and cell-cell adhesion of beta subunits. In addition, we found that the GEFS+ mutations could disrupt the trans-homophilic interaction in cell-cell adhesion.

研究分野：分子生物学、構造生物学

キーワード：電位依存性ナトリウムチャンネル サブユニット

1. 研究開始当初の背景

電位依存性 Na<sup>+</sup>チャネルは細胞内への Na<sup>+</sup>流入を促進し、神経、骨格筋、心筋などの興奮性細胞における活動電位の発生と伝播に不可欠な膜タンパク質である。このタンパク質はチャネル機能を担うαサブユニットとチャネル機能・発現・局在を調節するβサブユニット(β1-β4)から構成され、細胞膜上にα-β複合体として発現する。他のイオンチャネルの副次的サブユニットとは異なり、Na<sup>+</sup>チャネルβサブユニットはその細胞外ドメインに免疫グロブリン様(Ig)ドメインを有し、細胞接着分子として神経細胞間や神経細胞とグリア細胞間の接着、有髄神経軸索の起始部やランビエ絞輪へのNa<sup>+</sup>チャネルの局在化等を制御している。申請者はβサブユニットのX線結晶構造解析を試み、そのユニークな立体構造を解明した。βサブユニットはN末側のβストランドがダイマー間で交差する“parallel dimer”を形成し、さらにそのparallel dimerが互い違いに結合して高密度で平面的に配置する“zipper-like 構造”を形成することを明らかにした。興味深いことにparallel dimerの交差部位はαサブユニットの結合部位と完全に一致していることから、α-β複合体形成とparallel dimer形成は互いに競合関係にあると予想される。培養細胞やマウス脳を用いた解析ではこれらのことを示唆する結果が得られており、parallel dimer形成はNa<sup>+</sup>チャネル機能においても重要な役割を担っていると考えられる。

一方、てんかん、不整脈、突然死など発作性疾患の患者からはβサブユニットの遺伝子異常が見つかっている。その中でも特異性てんかん熱性けいれんプラス(GEFS+)の遺伝子変異はβ1のIgドメインに集中している。発症機序についてはβ1の発現抑制などが提唱されているが定説には至っていない。

2. 研究の目的

- βサブユニットのユニークな構造的特徴と機能との関連について検証する。βサブユニットが特異的に結合する細胞外マトリクス成分、タンパク質を特定する。
- GEFS+遺伝子変異は細胞接着活性を低下させるという仮説に基づき、GEFS+変異体の細胞接着性への影響を検証する。

3. 研究の方法

βサブユニットによる cell adhesion の解析

Flp-in/T-Rex システムを用いてβサブユニットの安定発現細胞を作製し、細胞同士の接着(細胞凝集塊)の経時変化を比較した。免疫染色、ウエスタンブロット解析で細胞表面への発現を確認した。

細胞外基質成分に対する結合

細胞外マトリクス成分をコートしたプレートに対してβサブユニット安定発現細胞を

蒔き、プレートへの結合能を解析した。

α-β複合体形成の解析

α、βサブユニットを培養細胞で共発現させ、免疫沈降、ウエスタンブロット解析を行った。

GEFS+遺伝子変異体の解析

GEFS+遺伝子変異体の安定発現株を作成し、と同様のアッセイを実施した。

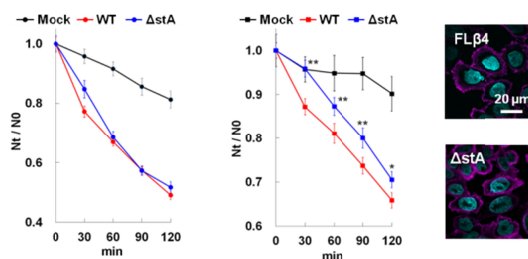
光クロスリンク法による解析

光クロスリンク能を持つ非天然型アミノ酸(pBpa)を部位特異的に導入し、このタンパク質を発現する培養細胞を作成した。そしてhomophilicに接着させた細胞に対してUVを照射し、ウエスタンブロットでクロスリンク産物を解析した。

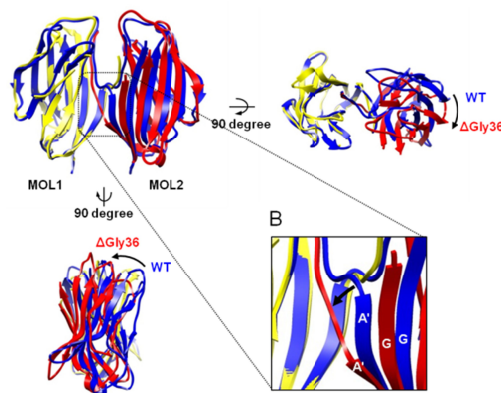
4. 研究成果

βサブユニットによる cell adhesion の解析

野生型β4と比べて、モノマーを示すβ4変異体(モノマー型変異体)では細胞接着活性の低下が認められ、parallel dimer形成(cis-homophilic interaction)と細胞接着(trans-homophilic interaction)との関連性が示された。



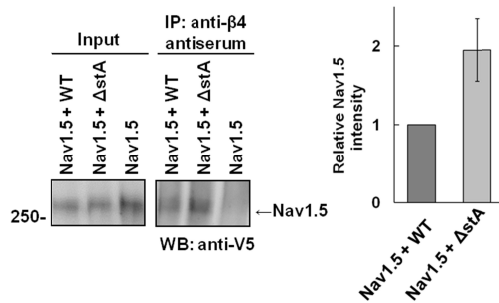
またparallel dimerは形成はするが、接着活性は低下するユニークな変異体(ΔGly36)を作成した。結晶構造解析の結果、この変異体はparallel dimerの会合角度にずれが生じていることが明らかになった。βサブユニットの細胞接着はparallel dimerの立体構造を正確に認識していると考えられる。



細胞外基質成分に対する結合  
 代表的な細胞外マトリクス成分に対する結合能を調べたところ、モノマー型変異体が特異的に結合するタンパク質を特定した。

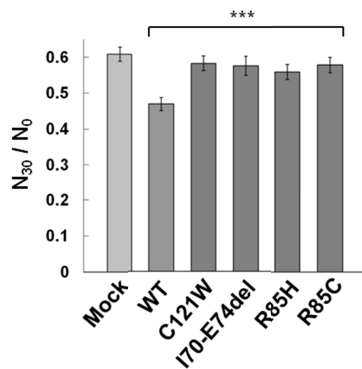
#### α-β 複合体形成の解析

Nav1.5 と β4 の共発現細胞による免疫沈降実験の結果から、モノマー型変異体は野生型と比べて Nav1.5 に対する結合能が高いことが明らかとなった。このことから parallel dimer 形成と α-β 複合体形成は競合的な関係にあると考えられる。



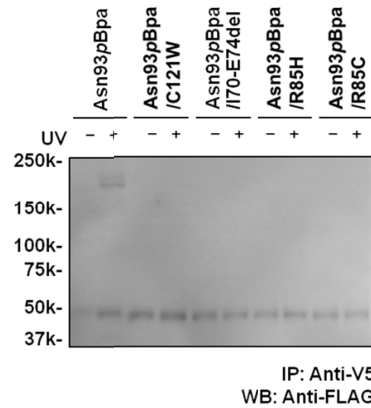
#### ④ GEFS+遺伝子変異体の解析

野生型 β1 と GEFS+変異体 4 種類の安定発現株を作成して同様のアッセイを実施した。GEFS+変異はいずれも接着活性の低下が認められ、GEFS+発症と細胞接着機能との関連を示す重要な結果が得られた。



#### 光クロスリンク法による解析

結晶構造で同定された β サブユニットの逆平行インターフェースに対して pBpa を導入し、このタンパクを発現する動物細胞を作成した。そして homophilic な接着状態の細胞に対して UV 照射したところ、クロスリンク産物として β4 のオリゴマーを検出し、β1 においても同様の結果を得ることができた。検出されたオリゴマーは結晶構造で確認された zipper-like 構造に由来するものと考えられる。また 4 種類の GEFS+変異体からは、いずれもオリゴマーは検出されなかった。これらの結果から、β サブユニットにおける逆平行インターフェースの機能的な重要性と GEFS+発症との関連を示す結果が得られた。



#### 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)

H. Miyazaki, F. Oyama, R. Inoue, T. Aosaki, T. Abe, H. Kiyonari, Y. Kino, M. Kurosawa, J. Shimizu, I. Ogiwara, K. Yamakawa, Y. Koshimizu, F. Fujiyama, T. Kaneko, H. Shimizu, K. Nagatomo, K. Yamada, T. Shimogori, N. Hattori, M. Miura, and N. Nukina. Unique localization of sodium channel β4 subunit in unmyelinated fibers and its role in striatum. *Nat Commun.* (2014)

Doi: 10.1038/ncomms6525. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

Hideaki Shimizu, Mikako Shirouzu, Nobuyuki Nukina, Shun-ichi Sekine, Shigeyuki Yokoyama. Structural basis for the trans- and cis-interactions of the voltage-gated sodium channel β subunits 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 25 日パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Hideaki Shimizu, Mikako Shirouzu, Nobuyuki Nukina, Shun-ichi Sekine, Shigeyuki Yokoyama. Structural basis for the trans- and cis-interactions of the voltage-gated sodium channel β subunits 第 37 回日本神経科学大会 2014 年 9 月 13 日パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Hideaki Shimizu, Haruko Miyazaki, Mikako Shirouzu, Nobuyuki Nukina and Shigeyuki Yokoyama

The Structure of Voltage-Gated Sodium Channel β Subunit Reveals Interfaces for Extracellular Interactions

5th Biennale RIKEN JOINT RETREAT (招待講演) 2013 年 2 月 4 日 ヤマハリゾート 嬌恋 (静岡県掛川市)

Hideaki Shimizu, Haruko Miyazaki, Mikako Shirouzu, Nobuyuki Nukina, Shigeyuki Yokoyama

Structural basis of the functional interaction in voltage-gated sodium channel beta subunit and implications for pathogenic mechanism of epilepsy.

第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 14 日福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

(福岡県福岡市)

Hideaki Shimizu, Haruko Miyazaki, Shisako Shoji, Mikako Shirouzu, Nobuyuki Nukina, Shigeyuki Yokoyama

Structural and functional analysis of voltage-gated sodium channel beta-subunit and epilepsyc causing mutation.

第35回日本神経科学大会 2012年9月21日  
名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

清水 英明 (SHIMIZU Hideaki)

独立行政法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・研究員

研究者番号: 10360562