

ATP 受容体チャネル P2X2 三量体の活性化時の活性化シグナルの分子内の流れ

生理学研究所神経機能素子研究部門 Batu Keceli (久保義弘)

我々は、これまでに、ATP 受容体チャネル P2X2 が、細胞外 ATP の結合と膜電位の変化を複合的に感知し活性化する受容体チャネルであることを明らかにしてきた。その活性化の機構、特に、二つの情報が分子内をどのように流れ、どのように集約されるのかは、未解決である。また、P2X2 は 3 量体であるが、2 分子の ATP の結合によって活性化されることが知られている。そのため、2 分子の ATP の結合による活性化シグナルが 3 量体中をどのように流れるかは興味ある課題である。

この問題にアプローチするためには、3 量体中に、数と位置を規定して変異を導入することが必要である。そこで、Uracil Specific Excision Reagent を用いる USER 法により、ATP 結合部位の K308A 変異、リンカー領域の D315A 変異、膜貫通部位の T339S 変異を、数をコントロールして導入した tandem trimeric construct (TTC) を高効率に作成し、電気生理学的解析を行った。(1) ATP 結合能を失う変異 K308A を、1, 2, 3 個導入した TTC を用いた実験により、ATP による活性化にも膜電位依存的活性化にも、2 個の ATP 結合部位が必要かつ十分であることが明らかになった。(2) ATP 結合部位とチャネルポアの存在する膜貫通部位をつなぐリンカー領域に位置する D315 に D315A 変異を導入すると、[ATP] 一応答関係に膜電位依存性の異なる 2 コンポーネントが出現することを見出した。この D315A 変異を、1, 2, 3 個導入した TTC を用いた実験においても、K308A の場合と同様、1 個の変異では際だった変化がみられず、2 個の変異により著しい変化が見られた。(3) 膜貫通部位のポア最狭部に位置する

T339 に T339S 変異を導入すると、膜電位依存性を失ってどの電位でも活性化するようになる。この T339S を、1, 2, 3 個導入した TTC を用いた実験においては、K308A, D315A の場合と異なり、膜電位依存的活性化が、導入した変異の数により段階的に変化することが明らかになった。これらの結果は、ATP 結合部位、リンカー部位では、2 個の正常なサブユニットの存在が必要十分であるのに対し、膜貫通部位では、3 個のサブユニットが同等にかつ段階的に寄与することを示す。

ATP 結合による活性化シグナルの分子内の流れにさらにアプローチするために、同一サブユニット (cis)、もしくは隣接サブユニット (trans) の 2 つのレベルに、それぞれの変異を 1 つずつ導入した TTC コンストラクトを作成し、性質の比較解析を行った。その結果、(4) K308A と D315A の場合は、cis 位置に導入したものと trans 位置に導入したもので機能が異なること、cis 位置に導入したものの性質は野生型に類似していること、また、(5) K308A と T339S の場合、および、D315A と T339S の場合は、cis 位置に導入したものと trans 位置に導入したもので機能が類似していることを見いだした。

以上の結果から、3 量体に対する 2 分子の ATP の結合情報が、リンカー部位までは ATP が結合した 2 個のサブユニット上をそのまま流れ、膜貫通部位において 3 つのサブユニットに均等に拡散することが示された。

Batu Keceli and Yoshihiro Kubo, Signal transmission within the P2X2 trimeric receptor. *Journal of General Physiology*, (2014) **143** : 761-782
[図は学会ホームページ <http://physiology.jp/> を参照]

電位依存性ホスファターゼ VSP の酵素活性は電位センサーの動いた大きさに従って段階的に発揮される

¹大阪大学大学院医学系研究科統合生理学, ²大阪大学未来戦略機構 坂田宗平^{1,2} (岡村康司¹)

電位依存性ホスファターゼ (VSP) は N 末端側の膜貫通領域である電位センサードメインと C 末端側の細胞内ドメインであるホスファターゼ領域により構成されています。VSP の酵素活性は電位センサーの動きにより制御され、細胞膜が脱分極すると電位センサーが動作してイノシトールリン脂質を脱リン酸化する酵素活性が駆動します。我々は以前、様々な膜電位で酵素活性を定量することで、電位センサーが酵素活性と強く共役することを見出しました (Sakata et al., *J. Physiol.*, 2011)。この結果は、単一分子で考えると電位センサーが酵素を活性化する仕組みについて 2 つの可能性を示唆します。一つは電位センサーが完全に活性化された状態 (fully-activated state) のときのみ酵素活性を発揮し、電位依存的な酵素活性は

完全に活性化された VSP 分子の割合を示している可能性、もう一つは電位センサーが動いた大きさに対応して、酵素活性の強さが段階的に制御されている可能性です。この 2 つの可能性を調べるために、我々は電位センサーが resting state と完全に活性化された状態の間に安定な中間状態をとる電位センサーの変異体を作成しました。そして酵素活性を計測したところ、VSP は電位センサーが中間状態にある時にも酵素活性を発揮することが分かりました。このことは VSP の酵素活性は電位センサーが完全に活性化しなくても発揮され、酵素活性の強さは電位センサーが動いた大きさによって段階的に制御されている可能性を示しています。 (*J. Physiol.* **592**: 899-914, 2014)。

[図は学会ホームページ <http://physiology.jp/>を参照]

KCNQ1/KCNE1 チャネルを開きにくくしている分子メカニズム

生理学研究所神経機能素子研究部門 中條浩一 (久保義弘)

心臓には I_{Ks} と呼ばれる非常に遅い遅延整流性カリウム電流が存在しており、そのユニークな性質が心臓の興奮性制御に重要な役割を果たしています。この I_{Ks} 電流は KCNQ1 と呼ばれるカリウムチャンネル α サブユニットと、それを修飾する KCNE1 と呼ばれるサブユニットのイオンチャンネル複合体によって担われていると考えられています。KCNQ1 単独でもカリウム電流を構成することはできますが、KCNE1 を共発現させると、電流の増大に加え、著しい活性化・不活性化速度の低下と脱分極側への大きな電位依存性のシフト (約 40mV) が起きます。すなわち、KCNE1 存在下では KCNQ1 チャネルが開きにくくなるのですが、その分子メカニズムはまだよくわかっていません

でした。

今回の研究で我々は、KCNE1 の存在下において、KCNQ1 チャネルの電位センサーである S4 セグメント上に存在する 232 番目のフェニルアラニン (Phe232) と、隣接するポアドメイン S5 セグメント上にある 279 番目のフェニルアラニン (Phe279) が非常に近い位置関係にあり、電位センサーが細胞の外側に向かって動く際 (チャンネル活性化時)、両者がぶつかることで KCNQ1 チャネルを開きにくくしていることを見出しました。さらに、Voltage-clamp fluorometry 法を適用することで電位センサーの動きとカリウムイオン電流を同時に測定したところ、電位センサーが上がったのちチャンネルが開状態に入るステップが、この 2 つ

のフェニルアラニンの衝突により遅くなっているという結果を得ました。

以上の結果は、KCNE1 の存在が、KCNQ1 の電位センサーとポアのドメイン間相互作用を変化させることで開きにくいチャンネルに変化させていることを示しています。比較的大きなアミノ酸であるフェニルアラニン残基による“出っ張り”が、

このドメイン間相互作用に重要な役割を果たしていると考えられます。

Nakajo, K. & Kubo, Y. Steric hindrance between S4 and S5 of the KCNQ1/KCNE1 channel hampers pore opening. *Nature Communications* 5 : 4100, doi : 10.1038/ncomms5100 (2014).

[図は学会ホームページ <http://physiology.jp/>を参照]

生理学および関連諸分野における、会員各位の研究成果について、学会ホームページ「サイエンストピックス」の欄に判りやすい解説を紹介し、広く社会に発信しています。会員の皆様の奮ってのご投稿、ならびに、候補著者のご推薦をお願いいたします。「サイエンストピックス」への投稿は学会事務局にて随時受け付けております。