

## 論文内容の要旨

論文題目 HERG (human *ether-à-go-go* related gene product)

チャンネル不活性化ゲートを利用した

カリウムイオン選択フィルターについての研究

氏名 清水 啓史

カリウムチャンネルは、原核細胞、真核細胞を問わずあらゆる細胞に発現している。このチャンネルは、細胞内外のカリウムイオン濃度差を利用してカリウムイオンを受動的に輸送し、細胞膜の膜電位を制御する役割を担っている。G 蛋白質など、種々のリガンドによって開閉が制御されるリガンド依存性カリウムチャンネル、膜電位によって開閉が制御される膜電位依存性カリウムチャンネルなどがあり、様々な調節因子がカリウムチャンネルの開閉に関わっている。アミノ酸配列から予想される膜貫通ヘリックスの数も、1 分子あたり 2-8 本と多様である。しかし、ナトリウムに対して 1000 倍という高いカリウム選択性は多様なカリウムチャンネルに共通した特色である。カリウムチャンネルのイオン透過路を構成する要素も共通しており、いずれの場合も 2 本の膜貫通ヘリックスと P ループと呼ばれる領域が 4 量体を形成していると考えられている。特に、P ループ領域中に存在する、カリウムイオンを選択する部位は高度に保存されており、イオン選択フィルターと呼ばれている。

イオンチャンネルの機能研究には、細胞膜の膜電位を固定して、チャンネルを透過するイオン流を電流として記録する、電気生理学の手法が用いられてきた。分子生物学の手法と併せて用いることによって、カリウムチャンネルについては、イオン選択フィルターのアミノ酸配列上の位置、イオン選択特性、イオン結合部位の数などが明らかにされてきた。

最近、X 線結晶構造解析により、カリウムチャンネルのイオン選択フィルターを含むイオン透過部位の 3 次元立体構造が明らかになった。これにより、イオン透過路上に位置するイオン選択フィルターは、縦に並んだ 4 つのイオン結合部位からなることが明らかになった

(図1)。この構造がカリウムイオン選択性の実現に大きな役割を果たしていると考えられる。

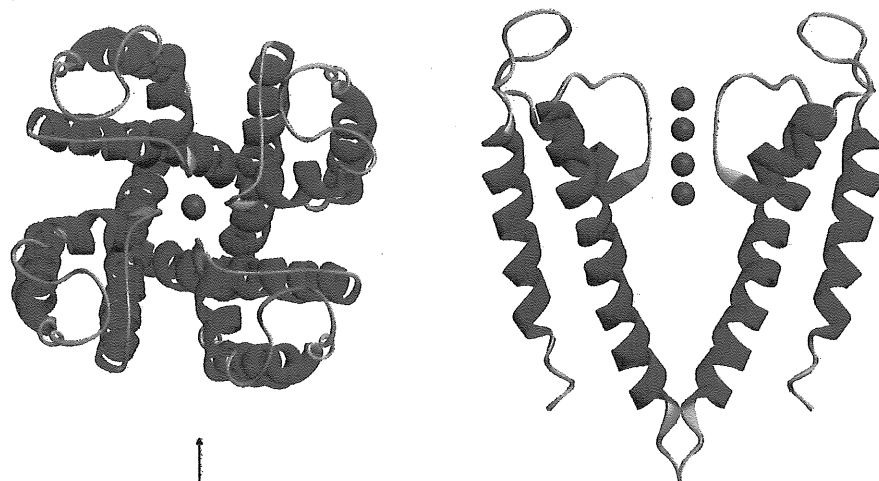


図1. カリウムチャンネル(Kcsa)の3次元立体構造(PDB 1BL8)

(左)カリウムチャンネルを細胞外から見た図。4量体の中央にイオン透過路があることがわかる。(右)カリウムチャンネルを細胞膜と平行に矢印の方向から見た図。見やすくするため前後の2分子をはずした。イオン透過路に4つのイオン結合部位がある。そのアミノ酸配列はカリウムチャンネル間で高度に保存されており、イオン選択フィルターとよばれる。紫色の球は透過イオンを示す

従来のカリウムチャンネルに関する研究では、チャンネルのイオン透過特性が主に調べられた。この場合、その特性はイオン選択フィルター全体をイオンが透過する際の性質を反映している。しかしながら、透過イオンはイオン選択フィルター中の複数のイオン結合部位を通過していくため、カリウムチャンネルのイオン透過・選択メカニズムを理解するためには、イオン透過中のイオン選択フィルター内のイオン存在状態を捉えることが不可欠であると考えられる。本研究では、イオン透過・選択メカニズムの全容を解明する第一歩として、HERG (human *ether-à-go-go* related gene product) カリウムチャンネルのイオン選択フィルター内の特定のイオン結合部位に焦点をあてた。

HERG チャンネルは心筋の活動電位の持続時間の決定に関与する分子のひとつである。心筋の収縮を促す活動電位を、再分極させる役割を担っており、膜電位によって開閉が制御される電位依存性カリウムチャンネルである。その特徴は、イオンが透過している最中にイオン選択フィルターの構造変化がおき、イオン流が遮断されるC型不活性化である。透過イオンがイオン選択フィルター中に存在するとこの構造変化は抑制され、その結果不活性化が遅くなることが知られている(図2)。また、イオン選択フィルターの細胞外開口部近傍

のアミノ酸残基の点変異によって不活性化が大きく影響をうけること、細胞外開口部に結合して電流を抑制する TEA(tetraethylammonium)を細胞外溶液に加えると不活性化が抑制されることから、C型不活性化はイオン選択フィルターの細胞外に近い領域の局所的な構造変化によって引き起こされると予想されている。速いC型不活性化という HERG チャンネルの特徴を利用すれば、イオン選択フィルター内の特定の位置のイオン占有状態を捉えられる可能性がある。これができれば、多くの素過程からなるイオン透過過程の中から特定の素過程を抽出したことになる、イオン透過・選択機構の理解を深めることができる。

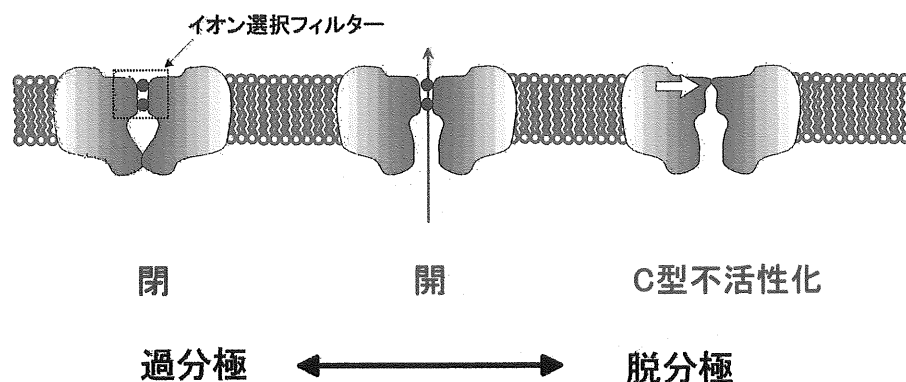


図 2. C 型不活性化と透過イオンの競合モデル

HERG は電位依存性カリウムチャンネルであり、細胞膜電位が脱分極すると（閉状態→開状態→不活性化状態）と状態遷移する。C型不活性化はイオン選択フィルター部の構造変化（白色矢印）によって起こると考えられており、透過イオンが存在すると、C型不活性化状態への遷移が遅くなる。開状態のみイオンが透過する（紫矢印）。

アフリカツメガエル卵母細胞に HERG チャンネルを発現させ、膜電位を固定し透過イオンによる巨視的な電流を測定することによって、不活性化状態への遷移に対するイオンの影響を調べた。不活性化状態のチャンネルはイオンが透過しないため、チャンネルが開いた状態から、不活性化状態への遷移は、電流の減衰として観測される。この不活性化過程に対する各種イオンの影響を、電流減衰の時定数で評価した。細胞内外のイオン組成を変えると、不活性化は  $K^+$ 、 $Rb^+$ 、 $Cs^+$  といった透過イオンによって遅延することが分かった。また、細胞内液中のイオンの影響は細胞外液中のイオンに比べて小さかった。この結果は、不活性化を抑制するイオン結合部位が、細胞外に近い領域にあることを示唆する。

さらに、透過イオンによる不活性化の抑制部位を限定するために、TEA による不活性化に対する影響を調べた。面白いことに、不活性化抑制の度合いを指標にした TEA のチャンネルに対する親和性は透過イオンの共存によって、低くなることがわかった。仮にひとつの部位で、透過イオンと TEA が不活性化と競合する場合には、透過イオンの共存によって TEA の親和性が変化することはない。すなわち、この実験結果は、TEA と透過イオンは異なる

部位で不活性化と競合することを示している。このことは、イオン選択フィルター内の透過イオンの存在状態が、TEA の親和性に影響を与える可能性があるとする分子動力学計算の結果に、初めて実験的根拠を与えるものでもある。また、不活性化競合部位に結合している透過イオン種 ( $K^+$ ,  $Rb^+$ ,  $Cs^+$ ) によって、TEA の親和性に大きな差が生じることも分かった。このことは、イオン半径のわずかな違い ( $K^+$ : 1.33 Å,  $Rb^+$ : 1.48 Å,  $Cs^+$ : 1.69 Å) を TEA がイオン選択フィルターの外から感受できることを示しており、イオンによる不活性化抑制部位は、TEA の結合部位に最も近い、イオン選択フィルターの最外イオン結合部位であると考えられる (図 3)。また、この結合部位への透過イオンの親和性は  $Rb^+ > Cs^+ > K^+$  の順であった。従って、この結合部位はイオン透過の選択性 (イオン選択フィルター全体のイオン選択性:  $K^+ > Rb^+ > Cs^+$ ) とは異なったイオン選択性を有し、カリウムに対するイオン選択性が弱いことが分かる。

溶液中からイオン選択フィルター最外部にイオンが結合するためには、脱水和される必要があり、脱水和エネルギーは、イオン半径が大きいイオンほど小さい。そのため、結合部位の性質が脱水和だけで決まっている場合には、そのイオン選択性は  $Cs^+ > Rb^+ > K^+$  となるはずである。本研究で得られた、最外部のイオン結合部位のイオン選択性 ( $Rb^+ > Cs^+ > K^+$ ) は、イオン種間の脱水和の差のみによるものではなく、脱水和されたイオンが、その結合部位と弱い静電的相互作用による結合をしていることによるものであると考えられる。

本研究では HERG カリウムチャネルの C 型不活性化という特徴を利用して、イオン選択フィルターの、最外イオン結合部位の性質を抽出することができた。これにより、細胞外から細胞内へイオンがカリウムチャネルを透過する際の第一ステップを明らかにすることができた。

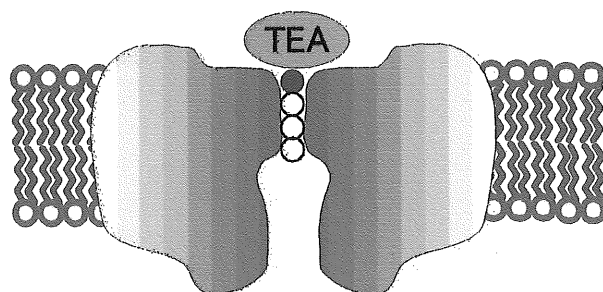


図 3. 不活性化ゲートにおける TEA と透過イオンの相互作用モデル

カリウムチャネルにはイオン選択フィルターに 4 つの透過イオン結合部位がある (紫色の円、白色の円)。このうちいずれの部位が不活性化と競合しているかについての知見はこれまでなかったが、細胞外溶液に含まれる透過イオン種によって TEA の親和性が変化することから、最外のイオン結合部位 (紫) が有力であることが示唆された。