

論文の内容の要旨

論文題目 G タンパク質によるカリウムチャンネル開閉機構の構造生物学的解析

氏名 横川 真梨子

【序】

イオンチャンネルは厳密に開閉制御されることにより、膜電位、浸透圧、イオン濃度などを調節する。したがって、イオンチャンネルの開閉機構を明らかにすることは生命機能の解明における重要な課題である。

G タンパク質共役型内向き整流性カリウムチャンネル(GIRK)は、3 量体 G タンパク質の $\beta\gamma$ サブユニット($G\beta\gamma$)により開閉制御される内向き整流性カリウムチャンネル(IRK)であり、心拍数の制御や中枢神経における神経伝達などを担う。GIRK は N、C 末端を細胞内に有する 2 回膜貫通型のサブユニットが 4 量体を形成することにより機能する。GIRK の開閉は、N、C 両末端からなる GIRK の細胞内領域に対して $G\beta\gamma$ が直接結合し、細胞内領域の構造変化を誘起することにより引き起こされると考えられている。

近年、主に X 線結晶構造解析の進展により、カリウムチャンネルをはじめとする複数のイオンチャンネルの立体構造が解析され、イオン透過機構の構造生物学的解明が進んだ。IRK についても、2002 年にマウス由来の GIRK1(mGIRK1)の細胞内領域、2003 年に原核生物由来の KirBac1.1 の全長構造、さらに 2007 年には mGIRK1 細胞内領域と KirBac1.3 の膜貫通領域からなるキメラ体の X 線結晶構造など、複数の立体構造が報告されている(Fig. 1)。しかし、これらはいずれも $G\beta\gamma$ 非存在下の構造であり、 $G\beta\gamma$ による GIRK 開閉機構に関する知見を与えるものではない。さらに、従来行われてきた分子生物学的研究も、 $G\beta\gamma$ による

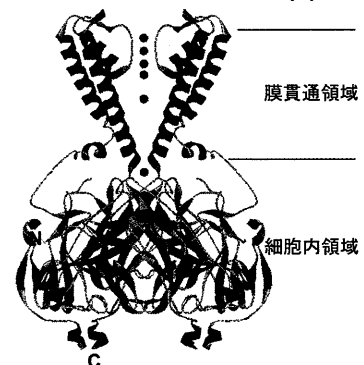


Fig. 1 GIRK キメラの X 線結晶構造 (PDB code: 2QKS) 細胞外を上にして横から見た図。膜貫通領域は 4 量体のうち 2 分子のみ示し、カリウムイオンを CPK にて表示した。

GIRK の活性化に関して数個の重要な残基を同定したものの、Gβγ結合界面の決定やチャネル開閉を担う構造変化の解析には至っていない。

そこで本研究は、GβγによるGIRK開閉機構の解明を目的とし、GIRK細胞内領域とGβγの相互作用について、NMR法を用いた構造生物学的研究を行った。

【方法・結果】

1. GIRK の調製

マウス脳の cDNA ライブラリーから PCR 法により GIRK1 をコードする cDNA をクローニングした。Gβγ による開閉制御に重要な細胞内領域として、細胞内 N 末端領域(アミノ酸残基番号 41-63)と C 末端領域(アミノ酸残基番号 190-371)を直接結合した一本鎖コンストラクト(GIRK-single)の大腸菌発現系を構築した(Fig. 2(a))。発現・精製の後、ゲルろ過解析を行った結果、GIRK-single はサブユニットあたり 5-300 μM の濃度域にて 4 量体を形成していることが明らかとなった(Fig. 2(b))。

GIRK-single の ²H, ¹⁵N, ¹³C 標識を行い、3 重共鳴測定等により主鎖 NMR シグナルの帰属を進めた。帰属可能な GIRK-single 由来の残基数 200 のうち、113 残基(57%)の帰属を終了している。

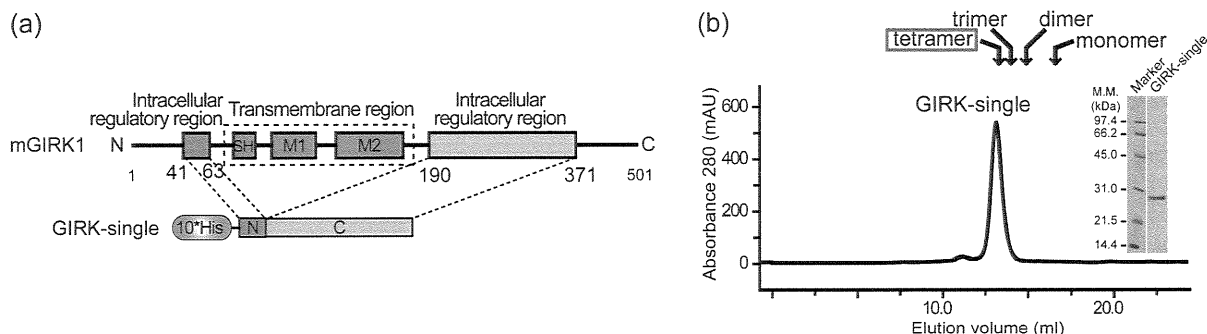


Fig. 2 (a) GIRK の一次構造と GIRK-single の模式図 (b) GIRK-single のゲルろ過プロファイル

2. Gβγの調製

Gβγは、バキュロウイルス-昆虫細胞発現系にてGβ₁とGγ₂を共発現させることにより調製した。Gβ₁γ₂は翻訳後修飾により、Gγ₂のC末端から4番目のCys残基が脂質修飾を受ける結果、膜近傍にて機能する脂質結合タンパク質である。本研究においては、脂質修飾を受けない変異体:Gγ₂(C68S)を用いることとし、また、NMR実験には、精製を容易にするためGγのN末端に6xヒスチジンタグを付加したコンストラクト:Gγ₂(His-C68S)を用いた。調製したGβ₁γ₂(His-C68S)はGβ₁とGγ₂(His-C68S)からなるヘテロダイマーを形成していること、およびGα結合活性を有することをゲルろ過解析により確認した。

3. GIRK / Gβγ間相互作用解析

まず、GIRK-single と Gβ₁γ₂(C68S)の結合親和性を表面プラズモン(SPR)法により解析した。GIRK-single を N 末端のヒスチジンタグを用いて NTA センサーチップ上に固定化し、Gβ₁γ₂(C68S)を 100 μM から 1.5 μM までの 2 倍希釈系列にてアプライした。その結果、速い結合・解離を示すボックス型のセンサーグラムが得られた。アフィニティー解析の結果、GIRK-single 4 量体に対する Gβ₁γ₂(C68S)の解離定数(Kd)は、100 μM 以上と算出された。

次に、GIRK-single 上における Gβγ結合部位を同定するため、転移交差飽和(TCS)実験を行った。²H, ¹⁵N により安定同位体標識を施した GIRK-single 4 量体 (300 μM)と非標識 Gβ₁γ₂(His-C68S) (300 μM)の

混合サンプルに対して、 $G\beta_1\gamma_2$ (His-C68S)のプロトン選択的にラジオ波を照射した。その結果、GIRK-singleの一部のNMRシグナルが強度減少した。顕著なシグナル強度減少が観測された残基を立体構造上にマッピングした結果、それらは主に、生体内において細胞内に露出していると考えられる分子表面に位置し、隣接するサブユニットの境界面を中心に分布した(Fig. 3)。したがって、 $G\beta\gamma$ はGIRK-single 4量体のサブユニット境界面に結合することが示された。

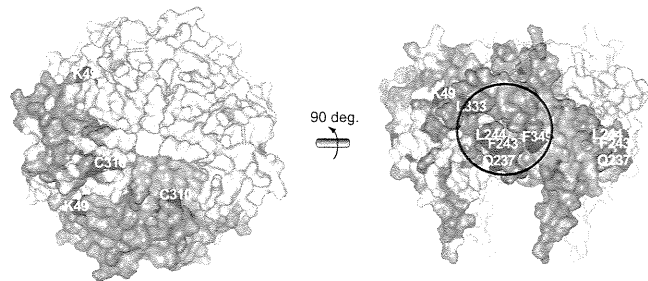


Fig.3 TCS 実験結果の立体構造上へのマッピング
細胞膜側から見た図を左、細胞膜を上にして横から見た図を右に示す。未帰属およびプロリン残基を灰色、シグナル強度が顕著に減少した残基を赤にて手前の2つのサブユニットに色付けた。赤の残基が集中した $G\beta\gamma$ 結合界面を丸で囲んで示す。

さらに、 $G\beta\gamma$ の結合に伴い GIRK-single に誘起される化学シフト変化を調べるため、40 μM のGIRK-single 4量体に対して $G\beta_1\gamma_2$ (His-C68S)を1等量ずつ8等量まで添加してNMR測定を行う化学シフト摂動(CSP)実験を行った。その結果、 $G\beta_1\gamma_2$ (His-C68S)の添加に伴い、ほぼ全てのGIRK-singleのNMRシグナルに強度減少が観測されたが、その強度減少の度合いはシグナルごとに異なっていた(Fig. 4)。本実験系において、シグナル強度減少の加速は化学シフト変化を反映すると考えられる。特に滴定初期において、化学シフト変化の大きさが強度減少として強く反映されることから、 $G\beta_1\gamma_2$ (His-C68S) 40 μM 添加条件における各シグナルの強度変化を調べた(Fig. 5 (a))。その結果、多くの残基においてシグナル強度比が0.8程度に低下したが、さらに強度減少が加速している残基が存在した。強度減少の加速した残基は、 $G\beta\gamma$ の結合に伴い化学シフトが変化した残基である。これらを立体構造上にマッピングした結果、サブユニット境界面に多く位置していた(Fig. 5 (b))。CSP 実験より同定されたこれらの残基は、 $G\beta_1\gamma_2$ (His-C68S)との直接の相互作用部位、もしくは相互作用に伴い局所的に構造変化を起こした部位であることが示唆される。

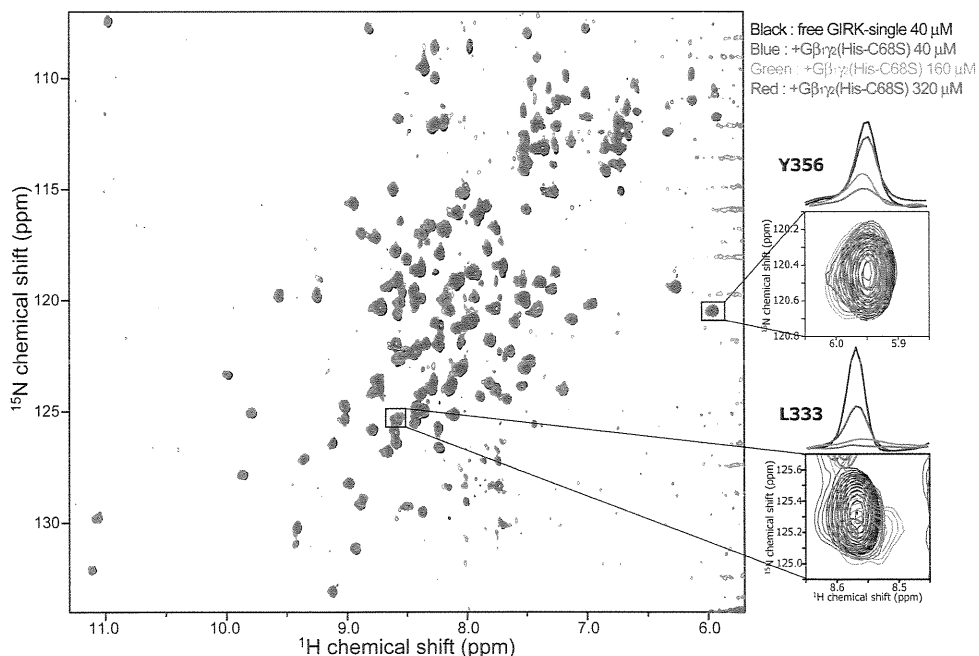


Fig. 4 CSP 実験における ^1H - ^{15}N TROSY スペクトルの重ね合わせ
GIRK-single に対して $G\beta_1\gamma_2$ (His-C68S)を1等量、4等量、8等量添加したスペクトルを示す。右には、枠で囲んだNMRシグナルの拡大図と1Dの切り出しを示す。

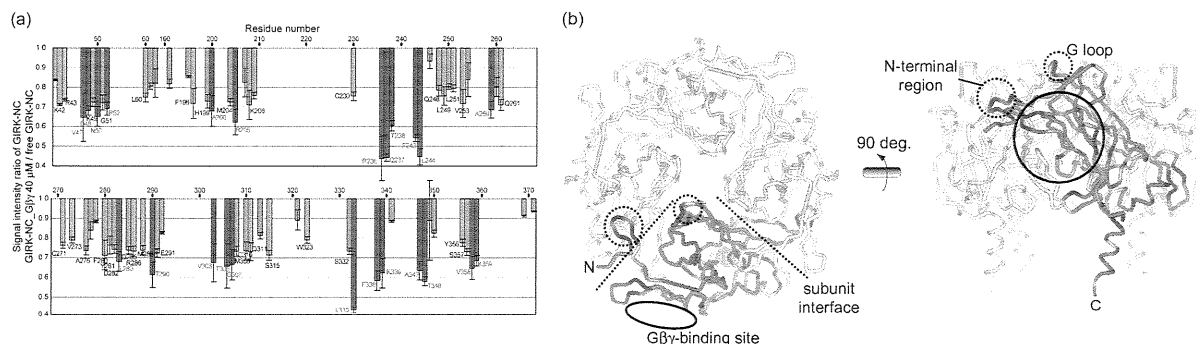


Fig. 5 CSP 実験結果

(a) GIRK-single : $G\beta_1\gamma_2$ (His-C68S) = 1 : 1 混合時におけるシグナル強度変化を各残基についてプロットした。
 (b) 立体構造(主鎖チューブモデル)上へのマッピング。細胞膜側から見た図を左、細胞膜を上にして横から見た図を右に示す。灰色は未帰属またはプロリン残基である。手前のサブユニットにのみ(a)の色付けにてマッピングした。TCS 実験より同定した $G\beta\gamma$ 結合界面を丸、サブユニット境界面を点線にて示す。

【考察】

SPR 解析より、GIRK-single と $G\beta_1\gamma_2$ (C68S) の K_d は $100 \mu\text{M}$ 以上と算出された。生体内において GIRK と $G\beta\gamma$ はともに細胞膜にて機能するが、細胞膜へのアンカーリングによりタンパク質間相互作用の結合親和性が 300 倍程度上昇するという報告がある。このような場合、細胞膜中における GIRK と $G\beta\gamma$ の K_d は $30 \mu\text{M}$ 程度と考えられる。 $G\beta\gamma$ により活性化された GIRK が、 $G\beta\gamma$ と nM オーダーの K_d を有する $G\alpha$ により速やかに不活性化されることも考慮し、 $100 \mu\text{M}$ という K_d は妥当であると判断した。

TCS 実験の結果、 $G\beta\gamma$ は Q237、F243、L244、L333、F349 を含む分子表面のサブユニット境界面に結合することが示された。L333 は変異実験より $G\beta\gamma$ による活性化に重要であることが明らかとなっている。Q237、F243 は GIRK サブファミリー間にて保存されている一方、 $G\beta\gamma$ に感受性のない他の IRK においては相同性が低く、 $G\beta\gamma$ の結合に寄与していることを支持する。

CSP 実験においては、TCS 実験より同定された $G\beta\gamma$ 結合界面に比べて広範囲にわたる残基が同定された。 $G\beta\gamma$ 結合部位から離れたサブユニット境界面における化学シフト変化は、 $G\beta\gamma$ の結合に伴いサブユニットの相対配置が変化したことを強く示唆する。特にシグナル強度減衰が加速した領域として、N 末端と分子上面に位置する G ループと呼ばれるループ部位が検出された。N 末端領域は隣接する C 末端サブユニットの境界面に位置するため、サブユニットの相対配置変化の影響を強く受けて構造変化を生じうる。全長構造中において、N 末端領域はペプチド結合にて膜貫通領域と連結しているため、N 末端領域の構造変化は膜貫通領域へ伝播し、チャネルの開口に寄与する可能性がある。一方、G ループは細胞膜近傍に存在し、膜貫通領域の残基と近接している。したがって、G ループにおける構造変化がこれらの膜貫通領域との相互作用を変化させ、チャネル開口の引き金を引くことが考えられる。

【総括】

本研究において、 $G\beta\gamma$ が GIRK 細胞内領域の隣接するサブユニットにわたって結合することを明らかとした。さらに、 $G\beta\gamma$ の結合は GIRK 細胞内領域のサブユニット間の相対配置を変化させることが示唆された。特に N 末端領域および G ループ近傍に構造変化が誘起される結果、膜貫通領域に構造変化が伝播し、チャネルの開口が起こると考えられる。

GIRK のようなリガンド依存性チャネルに対する NMR 法の適用は、リガンドの結合とチャネル開閉を誘

起する構造変化を区別して解析できる点において、独自の知見を与える。さらに、チャネル活性を検出する電気生理実験との組み合わせにより、チャネル開閉機構の解明に向けた有力な解析手法となることが期待できる。