

ペプチド作動性Na⁺チャネルの活性化と イオン透過性を制御する機能部位

小 谷 侑

広島大学大学院総合科学研究科

Functional sites controlling the activation and ion permeation of a peptide-gated Na⁺ channel

Yu KODANI

Graduate School of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University

Abstract: Peptides are ubiquitous signaling molecules in animals. Most of the peptide receptors identified so far are G protein-coupled receptors, but peptide-gated Na⁺ channels have also been cloned. This study investigated the structure-function relationship of a peptide(FMRFamide)-gated Na⁺ channel (FaNaC). We focused on three polar residues (Y548, D552, D556) around the outer end of the second transmembrane domain of FaNaC. Site-directed mutagenesis and cysteine modification experiments uncovered that D552 is a critical determinant for various functional aspects of FaNaC, such as activation and desensitization kinetics, apparent FMRFamide sensitivity, channel block by FMRFamide, and current rectification. Double-mutant cycle analysis demonstrated that the interaction between D552 and Y548 regulates both activation and desensitization processes. Although point mutants in D556 were nonfunctional, a double mutant D552N/D556N was functional and showed markedly slow current kinetics. External Ca²⁺ inhibited the activation and desensitization of FaNaC. These Ca²⁺ actions were diminished

by removal of the negative charge of D552, and notably, the Ca²⁺ action on desensitization was completely abolished in D552N/D556N, suggesting that D552 and D556 are involved in the Ca²⁺-binding site. In summary, Y548, D552, and D556 are important sites controlling the gating of FaNaC, and D552 also affects the ion permeation of the channel.

第1章 序論

ペプチドは動物の体内において細胞間情報伝達物質として機能している。これまでに知られているペプチド受容体のほとんどはGタンパク質共役型受容体であるが、ペプチド受容体として働くイオンチャネルとして、FMRFamide作動性Na⁺チャネル(FaNaC)と、ヒドラNa⁺チャネル(HyNaC)が知られている。FaNaCは軟体動物で発見されたNa⁺チャネルであり、神経ペプチドであるFMRFamideにより活性化される(Lingueglia et al., 1995)。HyNaCは腔腸動物であるヒドラにおいて同定されたNa⁺チャネルであり、FaNaCと同じくC末端にRFamide構造を持つ神経ペプチドにより活性化さ

れる(Golubovic et al., 2007).

これらのペプチド作動性Na⁺チャンネルは、脊椎動物の上皮性Na⁺チャンネル(ENaC)や酸感受性Na⁺チャンネル(ASIC)と相同な一次構造を有し、ともにENaC/DEGファミリーを構成する(Kellenberger & Schild, 2002). このファミリーに属するチャンネルのサブユニットは、2つの膜貫通ドメイン(TM1とTM2)を持ち、TM2がチャンネルポアを形成すると考えられている。本研究では、ペプチド作動性Na⁺チャンネルの構造機能相関を明らかにすることを目的として、FaNaCのTM2の細胞外近傍に焦点を当て、この領域に含まれる極性アミノ酸残基を置換した変異体の機能解析を行った。また、ホモロジーモデリング法を用いてFaNaCの三次元構造を推定した。

第2章 実験手法

アメフラシFaNaC (AkFaNaC; Furukawa et al., 2006)のcDNAを鋳型として、PCRあるいはQuikChange (Stratagene)を用いて変異体cDNAを作成した。次に、これらのcDNAを鋳型としてcRNAを合成し、そのcRNAをアフリカツメガエル卵母細胞に微量注入することでチャンネルを発現させた。チャンネルを発現させた卵母細胞から、2本のガラス微小電極を用いる膜電位固定法によりチャンネル電流を測定し、チャンネル機能の評価を行った。FMRFamideは細胞外液に溶かして灌流投与した。

AkFaNaCの三次元構造モデルは、ニワトリASIC1の結晶構造(PDBコード: 3HGC)をもとにして、MODELLER (Sali & Blundell, 1993)を用いて作成した。

第3章 D552変異体の機能解析

FaNaCのTM2の細胞外近傍には2つのアスパラギン酸残基が保存されている(AkFaNaCのD552およびD556)。アスパラギン酸は負電荷を持つため、細胞外液中の陽イオンと相互作用することで、チャンネルのイオン透過性や活性化に影響を及ぼすことが予測された。そこで、これらの部位の点変異体を作成したところ、D556変異体は非機能的な

チャンネルとなったが、D552変異体は機能的なチャンネルを形成した。

正電荷を持つリジンでD552を置換した変異体では、チャンネルの活性化と脱感作の速度が顕著に遅くなるとともに、FMRFamideのEC₅₀値が大きく減少した。一方、D552をグルタミン酸で置換した変異体では、負電荷を保存しているにもかかわらず、脱感作は遅くなりEC₅₀値は増加した。これらの結果は、552位アミノ酸の持つ静電荷に加えて、側鎖の立体的な性質がチャンネルの活性化に伴う構造変化に影響することを示唆している。また、細胞外Ca²⁺濃度を高めると、AkFaNaCのFMRFamide感受性と最大応答はともに低下したが、この効果は、D552の負電荷を中性化した場合や、正電荷を導入した場合に減弱化したことから、D552とCa²⁺の結合によりチャンネルの活性化が抑制される可能性が示唆された。さらに、いくつかのD552変異体では高濃度FMRFamideによる開チャンネルブロックが促進されたことから、552位のアミノ酸側鎖はチャンネルポア内腔に露出しているものと考えられる。この仮説はAkFaNaCの構造モデルからも支持された。

第4章 D552C変異体に対するシステイン修飾剤の効果

552位アミノ酸側鎖の静電荷と立体的な性質がAkFaNaCの活性化に影響を及ぼすことが見出されたので、この部位の静電荷の効果に焦点を当てるために、D552をシステインで置換した変異体(D552C)に対して、サイズはほぼ同じであるが反対の電荷を持つシステイン修飾剤であるMTSETとMTSES (Karlín & Akabas, 1998)の作用を検討した。

D552Cの電流は、正電荷を持つMTSETにより増強され、負電荷を持つMTSESにより抑制された。MTSETによる増強効果はEC₅₀値の減少により、MTSESによる抑制効果は最大応答の低下によるものであった。また、チャンネルの電流電圧関係に対する552位アミノ酸の静電荷の影響を調べた結果、この部位の負電荷がAkFaNaCに内向き整流性をもたらす主要因であることを見出した。AkFaNaC

の構造モデルにおいて、チャネルポアの細胞外開口部はD552とD556の負電荷により陰性の静電ポテンシャルを示すことから、D552はNa⁺をポア開口部に誘引し、細胞内への透過を促進する可能性が示唆された。以上の結果から、552位アミノ酸の静電荷は、チャネルの活性化とイオン透過性を制御する重要な因子であると考えられる。

第5章 D552と相互作用する部位の探索

AkFaNaCのモデル上で、D552は、隣接するサブユニットのTM2直前に位置するチロシン残基(Y548)と近接することから、これらの相互作用がチャネルの構造変化に影響を及ぼす可能性が考えられた。そこでY548FおよびD552N点変異体と、Y548F/D552N二重変異体を作成し、機能比較を行った。

Ca²⁺を除いた外液中において、WTとY548Fは同様の脱感作を示したが、D552Nでは脱感作の速度が遅くなり、Y548F/D552NではWTとD552Nの中間にあたる速度の脱感作を示した。脱感作の速度に対してdouble-mutant cycle解析を適用した結果、Y548とD552の相互作用が脱感作に影響を及ぼすことが示唆された。さらに、EC₅₀値に対してdouble-mutant cycle解析を行った結果、両アミノ酸部位の相互作用が活性化にも影響することが示唆された。また、Ca²⁺を含む外液中においてWTの脱感作は顕著に抑制されたが、この効果はY548FあるいはD552N変異によって大きく減少することを見出した。

次に、構造モデル上で近接するD552とD556の二重変異の効果を検討した。前述のようにD556の点変異体は非機能的なチャネルを生じたが、D552N/D556N二重変異体ではチャネル機能を回復できることが分かった。この二重変異体では、活性化と脱感作が著しく遅く、細胞外Ca²⁺による脱感作の抑制効果も消失していた。これらの結果から、556位のアミノ酸はAkFaNaCの活性化キネティックスに関与すること、D552とD556がCa²⁺結合部位を形成しており、Y548がそのCa²⁺結合に影響を与えることが考えられる。

第6章 総合考察

AkFaNaCにおいて、D552はチャネルの活性化、Na⁺の透過性、FMRFamideによる開チャネルブロックに影響を与え、またD552とD556は細胞外Ca²⁺の結合部位を構成することが示唆された。構造モデリングの結果からも、これらのアスパラギン酸側鎖はチャネルポアの細胞外開口部に面しているものと考えられる。また、隣接するサブユニットのY548とD552の相互作用によりチャネルの活性化と脱感作が制御されることが示唆されたので、チャネルポアの細胞外開口部で生じるコンホメーション変化がチャネルの開閉に影響を及ぼすものと考えられる。D552あるいはD556に対するCa²⁺の結合は上記のコンホメーション変化を阻害することで、活性化と脱感作を抑制し、生理的なチャネル応答の決定に寄与していると思われる。

参考文献

- Furukawa, Y., Miyawaki, Y., & Abe, G. (2006). Molecular cloning and functional characterization of the *Aplysia* FMRFamide-gated Na⁺ channel. *Pflügers Archives*, **451**, 646-656.
- Golubovic, A., Kuhn, A., Williamson, M., Kalbacher, H., Holstein, T. W., Grimmelikhuijzen, C. J. P., & Gründer, S. (2007). A peptide-gated ion channel from the freshwater polyp *Hydra*. *Journal of Biological Chemistry*, **282**, 35098-35103.
- Karlin, A., & Akabas, M.H. (1998). Substituted-cysteine accessibility method. *Methods in Enzymology*, **293**, 123-145.
- Kellenberger, S., & Schild, L. (2002). Epithelial sodium channel/degnerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiological Reviews*, **82**, 735-767.
- Lingueglia, E., Champigny, G., Lazdunski, M., & Barbry, P. (1995). Cloning of the amiloride-sensitive FMRFamide peptide-gated sodium channel. *Nature*, **378**, 730-733.
- Säli, A., & Blundell, T. L. (1993). Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of Molecular Biology*, **234**, 779-815.