

心臓のリズムを刻むイオンチャネル複合体の“複雑な”制御

中條 浩一

1. はじめに

心臓は生まれてから死ぬまで一時も休むことなくリズムを刻み続ける。その活動は体内の隅々まで酸素や栄養素を送り、また各組織から二酸化炭素や老廃物を回収するために不可欠である。この心臓のリズムは、神経細胞などと同じく活動電位と呼ばれる電気信号によって生み出される。細胞膜上にはイオンチャネルと呼ばれる膜タンパク質が存在し、それぞれ特定の種類のイオンを細胞内外に出し入れすることで活動電位を生み出す。心室筋においては、まずナトリウムチャネルが開いてナトリウムイオン (Na^+) を細胞内に流入することで細胞内電位がマイナスから大きくプラス方向に変化する（生化学分野では“興奮”あるいは“脱分極”と呼ばれる）。続いてカルシウムチャネルが開いてカルシウムイオン (Ca^{2+}) を流入させ、心室筋を収縮させる。最後にカリウムチャネルによってカリウムイオン (K^+) が細胞内から流出することで細胞内電位はマイナスに戻り（再分極）、心室筋は弛緩する。心電図波形においてはQ波の開始からT波の終了までをQT間隔と呼び、心室筋が脱分極している期間に相当する。したがってたとえばカリウムチャネルの機能が失われると、再分極しにくくなるために脱分極している時間が長くなり、QT間隔が延長する（QT延長症候群）などの不整脈を引き起こす可能性がある。

KCNQ1チャネルは40種類存在する電位依存性カリウムチャネル (Kv) ファミリーの一つである。 Kv ファミリーに特徴的な6回膜貫通型のタンパク質であり、四つの分子 (α サブユニット) で一つのイオンチャネルを構成する、四量体の分子複合体である（図1A, B）。それぞれの α サブユニットは電位センサードメイン（voltage sensing do-

main: VSD）とポアドメイン（pore domain: PD）に分かれる。四量体を構成したとき、PDは4分子が組み合わさることで一つのイオン透過路を構成するが、四つのVSDは独立に存在し、それぞれが電位を感じて構造変化すると考えられている（図1B）。細胞が脱分極すると、VSD中のS4と呼ばれる4番目の膜貫通ヘリックスが上（細胞外）に向かってスライドする。四つすべてのS4が上に上がると、それが引き金となってPDが開き、イオンが流れる。

KCNQ1チャネルの基本的な構造、性質は他の Kv チャネルと共通であるが、一つ非常にユニークな特徴がある。それはKCNEと呼ばれる1回膜貫通型のタンパク質により、ゲーティング（開閉）の性質が大きく変化するということである。KCNE1は今からおよそ30年前、京都大学の内匠らによって初めてクローニングされた¹⁾。内匠らは、イオンチャネル研究でよく用いられるアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の卵母細胞に、このわずか130アミノ酸長の遺伝子を発現させることでゲーティングが非常に遅い電位依存性カリウム電流を生じることを発見した。当初はこれ自体が新規のイオンチャネルである可能性も議論されたが、発見から8年後、QT延長症候群の原因遺伝子として同定されていたKCNQ1チャネルに対する補助サブユニットであることが判明した^{2,3)}。KCNQ1とKCNE1をとともに発現させると、心臓でみられる「遅いカリウム電流」に相当する電流が測定される（図1C下）。ちなみに内匠らが最初に発見した電流は、外部から導入されたKCNE1がアフリカツメガエル卵母細胞の内在性KCNQ1チャネルの電流を増大させたことによって生じた電流であったと考えられている。以後KCNE1~5まで、合計5種類のKCNEが見つかり、すべてKCNQ1の機能を大幅に変化させることが知られている⁴⁾。そのなかでもKCNQ1-KCNE1複合体によって生み出される「遅いカリウム電流」は、QT延長症候群との関連からとりわけ注目を集めてきた。特にどのようにしてKCNE1がKCNQ1のゲーティングを遅くするのか、すなわち開きににくく閉じにくいチャネルに変化させるのかについて、その分子メカニズムを明らかにするために多くのグループが奮闘してきた。またKCNQ1-KCNE複合体の分子構成、すなわちストイキオメトリーについても、KCNE1の発見から長きにわたって議論が続いている。本稿では、これらについての最近の知見を中心にご紹介したい。

自治医科大学医学部生理学講座統合生理学部門（〒329-0498 栃木県下野市薬師寺3311-1）

Complex regulation of KCNQ1 channel complex

Koichi Nakajo (Division of Integrative Physiology, Department of Physiology, Jichi Medical University, 3311-1 Yakushiji, Shimotsuke, Tochigi 329-0498, Japan)

本論文の図版はモノクロ（冊子版）およびカラー（電子版）で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910228

© 2019 公益社団法人日本生化学会

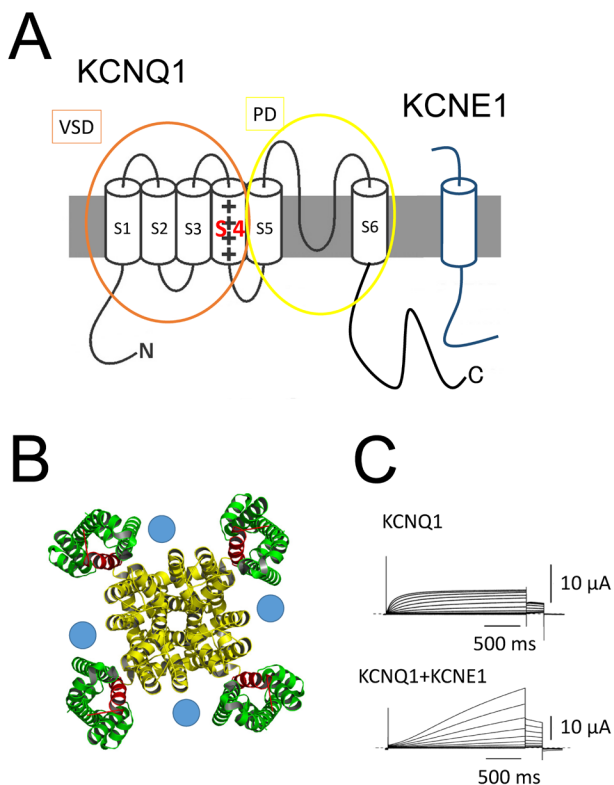


図1 KCNQ1とKCNE1の構造と電流

(A) KCNQ1とKCNE1の模式図。KCNQ1は6回膜貫通型のタンパク質であり、4番目までの膜貫通領域(S1~S4)が電位センサードメイン(VSD)を、5番目と6番目の膜貫通領域がポアドメイン(PD)を構成する。S4は“+”で表現されるように複数の正電荷を持つアミノ酸(主にアルギニン)を持っており、細胞内電位に依存して上下に動く。KCNE1は1回膜貫通型のタンパク質である。(B)細胞外からみた四量体のKCNQ1チャンネル(PDB ID: 5VMS)¹⁴⁾。S1~S3が緑、S4が赤、S5~S6が黄色。青い円はKCNE1が結合すると考えられているスペース(4か所)を表す。(C)アフリカツメガエル卵母細胞に発現させたときのKCNQ1単独の電流と、KCNQ1とKCNE1を共発現させたときの電流。

2. KCNEによるイオンチャンネル電位センサードメインの制御

なぜKCNE1が共発現するとKCNQ1チャンネルは開きにくくなるのであろうか。その非常にゆっくりとしたゲーティングから、我々は電位センサーとして働くS4の脱分極時の構造変化が、KCNE1によって遅くなるという仮説を立てた。そこでS4の上部に点変異としてシステインを導入し、その構造変化の速度をMTSETなどのシステイン修飾剤の化学修飾速度で間接的に見積もり、KCNE1の存在によりS4がなかなか上に上がってこないことを示した⁵⁾。

一般的に、電位依存性カリウムチャンネルは少なくとも三つの状態をとると考えられている(チャンネルの四量体構造を考慮すると実際はもっと複雑であるが、ここではシン

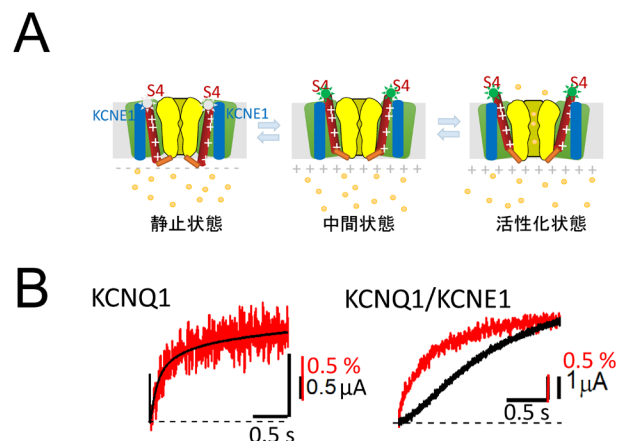


図2 voltage-clamp fluorometry (VCF) による電位センサーの構造変化と電流の同時測定

(A) KCNQ1/KCNE1チャンネルのゲーティングモデル。チャンネルは四量体であるが、図では二つの α サブユニットのみ表示。細胞内電位がマイナスのときはS4が下がっており、S4につけた蛍光分子の蛍光は弱い(静止状態)。細胞内電位が脱分極するとS4は細胞外に向かって上がり、蛍光分子の蛍光強度があがるが、まだゲートは閉じている(中間状態)。その状態がさらに続くとゲートが開き、カリウムイオンが流れる(活性化状態)。(B) KCNQ1では蛍光強度変化(赤)と電流(黒)のキネティクスがほぼ同じであるため、電位センサーが上がるとほぼ同時にゲートが開く。KCNQ1/KCNE1チャンネルでは、電位センサーが上がってもなかなか電流が流れないため、KCNE1は中間状態から活性化状態への遷移を阻害していると考えられる。文献8のデータの一部を改変して使用。

ルに三つの状態で考える)。一つ目はS4が完全に下がった状態で、静止状態(resting state)と呼ばれる。二つ目はS4が上がっているがチャンネルのゲートはまだ閉じている中間状態(intermediate state)、そしてS4が完全に上がりゲートも開いた活性化状態(activated state)である(図2A)。細胞内が静止状態、すなわち負の電位(おおむね-60mV以下)を持つとき、大半のVSDは静止状態にある。細胞内が脱分極する(細胞内電位が+の方向に向かう)とき、VSDは中間状態を経て活性化状態に入る。前述したとおり、四つのVSDすべてが活性化状態に入るとイオンチャンネルは開くと考えられている。

KCNE1の存在によりS4がなかなか上に上がってこないことはわかったが、「静止状態から中間状態」または「中間状態から活性化状態」のどちらのステップが阻害されるのであろうか。この問いに答えるためには、S4の構造変化をより直接的に調べることが必要である。そこでS4の上部に導入したシステイン残基に今度は蛍光分子(Alexa-488)を導入し、膜電位をコントロールした状況で、電流と蛍光強度変化を同時に測定するvoltage-clamp fluorometry (VCF) という方法を導入した^{6,7)}。KCNE1が入ったときに、蛍光強度変化と電流がどちらも遅くなれば、静止

状態から中間状態のステップが、蛍光強度変化は変わらず電流だけが遅くなれば「中間状態から活性化状態」のステップが遅くなっていると結論できる。図2Bにあるように、結果は後者であった。つまり KCNE1 が存在しても電位センサーは中間状態まで問題なく上がることができるのであるが、チャンネルが開く活性化状態へ入るステップが阻害されている。さらに S4 と S5 にそれぞれ存在するフェニルアラニン残基が、S4 が上がる際に立体障害となって「中間状態から活性化状態」のステップを遅くしていることもわかった⁸⁾。

同じ時期にマイアミ大学のグループが、VCF を適用することで蛍光強度変化の電位依存性を詳細に解析し、KCNE1 が VSD の中間状態を安定化することを示した⁹⁾。つまり、KCNE1 は単に VSD を上がりにくくしているのではなく、VSD が下がらないようにする効果も併せ持っていることになる。静止状態でも中間状態でもゲートは閉じており、電流は流れないので、静止状態に戻りにくくなることにどのような生理的意義があるのかは不明である。しかし、KCNE1 によるゲーティング調節機構を理解する上で重要な発見であった。さらにその後、同じグループが KCNQ1 を常時開状態にする KCNE3 についても同様の実験を行い、KCNE3 が VSD を活性化状態に安定化していることを示した¹⁰⁾。このように、VSD の“状態 (state)”の安定化という観点から、KCNE による多様なゲーティング調節機構を理解することができるようになりつつある。

3. KCNQ1-KCNE1 複合体のストイキオメトリー

冒頭で紹介したとおり、KCNQ1 チャンネルは四量体の構造を持つ。KCNE1 がどのように KCNQ1 に結合するのかについては、まだはっきりとしたことはわかっていないが、おそらく二つの VSD の間に入り込んでいるのではないかと予想されている。したがって KCNQ1 チャンネルには最大 4 か所の KCNE1 結合部位が存在することになる (図 1B の円)。しかし、実際何分子の KCNE1 が結合しているかに関しては議論が続いていた。

そこで我々は、KCNQ1 のストイキオメトリーを決定する目的で、1 分子蛍光イメージングを使った「サブユニットカウンティング法」を適用した¹¹⁾。この方法では、まず数えたいイオンチャンネルのサブユニットに GFP などの蛍光タンパク質を融合させ、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させる。それを全反射蛍光顕微鏡下で細胞膜近傍のみに励起光を当て、1 分子レベルでのイメージングを行う (図 3A)。すると、一つ一つのイオンチャンネルは、1 個の蛍光スポットとして観察される。そしてその一つにみえる蛍光スポットには、イオンチャンネルサブユニットの数だけ蛍光タンパク質が存在していることになる。たとえばカリウ

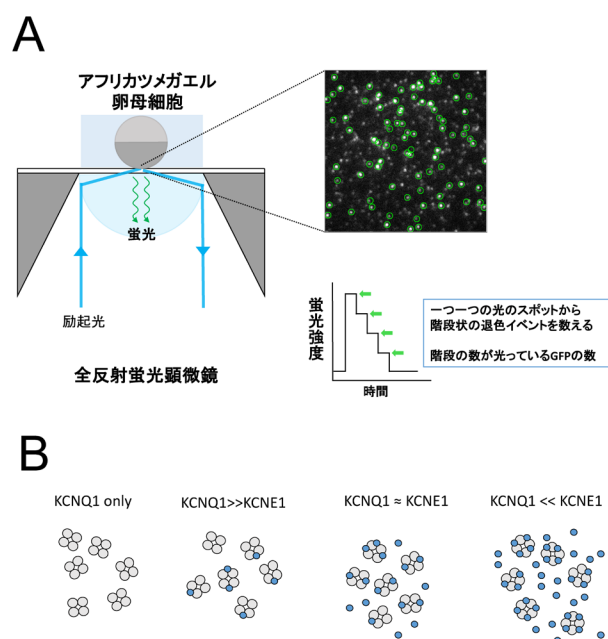


図3 1分子蛍光イメージングによるストイキオメトリーの決定

(A)全反射蛍光顕微鏡下での1分子蛍光イメージング。○で囲われた一つ一つに1個のイオンチャンネルが存在する。それぞれの光のスポットからの退色イベント回数を数えることで、そのイオンチャンネルに含まれるサブユニット数を決めることができる。(B)KCNE1の発現密度があがるほど、KCNQ1四量体に結合するKCNE1の数が増加する(最大4分子)。

ムチャンネルのように四量体であれば、サブユニットは4分子含まれていることになるので、蛍光タンパク質も4分子含まれていることになる。一方蛍光タンパク質には退色するという性質がある。蛍光を出していた分子が突然蛍光を発しない状態になってしまう現象で、不可逆過程である。細胞などで蛍光観察をしたことがある人ならば、励起光の強度・時間に応じて蛍光画像が徐々に暗くなってしまうという厄介な経験があるだろう。これを逆に利用し、1分子レベルでの退色イベントを数えることで一つのイオンチャンネル複合体中に含まれるサブユニット数を数えることができる。この手法を用いることで、KCNQ1 (四量体) に対し最大4分子の KCNE1 が結合することを示した¹²⁾。また KCNQ1 と KCNE1 の相対的な発現密度に依存して、結合数が柔軟に変化するということがわかった (図 3B)。

仮に KCNE1 の結合数が発現密度に応じて柔軟に変化するとすれば、KCNE1 の発現を調節することで KCNQ1 チャンネルの開閉のしやすさを制御している可能性がある。そしてさらに KCNE2~5 といった他の KCNE タンパク質も同様に結合することができるため、複数種類の KCNE タンパク質が同時に KCNQ1 に結合することも可能ということになる。また結合した KCNE の種類と数によって KCNQ1 のゲーティングの性質が変わるので、実に多様な組み合わ

せ・性質を持ったKCNQ1-KCNE複合体が生じることになる。複合体は英語では“complex”であるが、この単語には“複雑”なという意味もある。KCNQ1チャネル複合体は実に複雑な制御を受けているといえよう¹³⁾。

4. おわりに

2017年に、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析によるKCNQ1チャネルの立体構造が発表された¹⁴⁾。現在最も待ち望まれるのはKCNQ1-KCNE複合体の構造である。それが明らかになったときには、KCNEがどのようにKCNQ1のVSDと相互作用しているのか、そしてその結果VSDがどのような構造をとっているのかが詳細に明らかにされるだろう。

また別の課題として、前節で述べたような多様な複合体のストイキオメトリーが、生体内（心臓）で実際に起きているかどうかを明らかにする必要がある。本稿では詳しくふれなかったが、心臓にはKCNQ1以外にもhERG、Kv4など複数種類の電位依存性カリウムチャネルが存在し、それぞれが複数種類の補助サブユニットで制御されることが知られている。しかもKCNE2やKCNE3などは、KCNQ1だけではなくhERGやKv4とも結合し、制御することも知られている。したがって、これらのイオンチャネルサブユニットの発現や複合体構成を制御する機構が存在するのではないかと予想される。以上のことから、生体内におけるイオンチャネル複合体のありのままの姿を捉えることが複合体構成の制御メカニズムを明らかにするために必要であり、今後の課題である。

謝辞

本稿で紹介した研究成果は、生理学研究所の久保義弘研究室で行ったものです。久保教授をはじめ、多くの共同研究者の方々に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Takumi, T., Ohkubo, H., & Nakanishi, S. (1988) Cloning of a

membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current. *Science*, **242**, 1042–1045.

- 2) Barhanin, J., Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Lazdunski, M., & Romey, G. (1996) K_v LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I_{Ks} cardiac potassium current. *Nature*, **384**, 78–80.
- 3) Sanguinetti, M.C., Curran, M.E., Zou, A., Shen, J., Spector, P.S., Atkinson, D.L., & Keating, M.T. (1996) Coassembly of K_v LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I_{Ks} potassium channel. *Nature*, **384**, 80–83.
- 4) Bendahhou, S., Marionneau, C., Haurogne, K., Larroque, M.M., Derand, R., Szuts, V., Escande, D., Demolombe, S., & Barhanin, J. (2005) In vitro molecular interactions and distribution of KCNE family with KCNQ1 in the human heart. *Cardiovasc. Res.*, **67**, 529–538.
- 5) Nakajo, K. & Kubo, Y. (2007) KCNE1 and KCNE3 stabilize and/or slow voltage sensing S4 segment of KCNQ1 channel. *J. Gen. Physiol.*, **130**, 269–281.
- 6) Mannuzzu, L.M., Moronne, M.M., & Isacoff, E.Y. (1996) Direct physical measure of conformational rearrangement underlying potassium channel gating. *Science*, **271**, 213–216.
- 7) Osteen, J.D., Gonzalez, C., Sampson, K.J., Iyer, V., Rebolledo, S., Larsson, H.P., & Kass, R.S. (2010) KCNE1 alters the voltage sensor movements necessary to open the KCNQ1 channel gate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 22710–22715.
- 8) Nakajo, K. & Kubo, Y. (2014) Steric hindrance between S4 and S5 of the KCNQ1/KCNE1 channel hampers pore opening. *Nat. Commun.*, **5**, 4100.
- 9) Barro-Soria, R., Rebolledo, S., Liin, S.I., Perez, M.E., Sampson, K.J., Kass, R.S., & Larsson, H.P. (2014) KCNE1 divides the voltage sensor movement in KCNQ1/KCNE1 channels into two steps. *Nat. Commun.*, **5**, 3750.
- 10) Barro-Soria, R., Perez, M.E., & Larsson, H.P. (2015) KCNE3 acts by promoting voltage sensor activation in KCNQ1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, E7286–E7292.
- 11) Ulbrich, M.H. & Isacoff, E.Y. (2007) Subunit counting in membrane-bound proteins. *Nat. Methods*, **4**, 319–321.
- 12) Nakajo, K., Ulbrich, M.H., Kubo, Y., & Isacoff, E.Y. (2010) Stoichiometry of the KCNQ1-KCNE1 ion channel complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 18862–18867.
- 13) Osteen, J.D., Sampson, K.J., & Kass, R.S. (2010) The cardiac I_{Ks} channel, complex indeed. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 18751–18752.
- 14) Sun, J. & MacKinnon, R. (2017) Cryo-EM Structure of a KCNQ1/CaM Complex Reveals Insights into Congenital Long QT Syndrome. *Cell*, **169**, 1042–1050.

著者寸描

●中條 浩一（なかじょう こういち）



自治医科大学医学部生理学講座統合生理学部門教授。博士（学術）。

■略歴 1973年京都府生まれ。97年東京大学教養学部基礎科学科第一卒業。2002年同大学院総合文化研究科博士課程修了。05年生理学研究所助手（のち助教）。15年大阪医科大学医学部准教授。18年より現職。

■研究テーマと抱負 イオンチャネルの構造機能連関。特に補助サブユニットによる電位依存性カリウ

ムチャネルの機能調節メカニズム。イオンチャネルの性質や機能が、生体内での生理機能にどのように役立つかを明らかにしたい。

■趣味 スポーツ観戦。