

【総説】

膜電位依存性イオンチャネルの分子構造, 多様性と神経機能調節

The voltage-gated ionic channel: molecular structure,
diversity and regulatory roles in neural functions金沢大学大学院医学系研究科
脳細胞遺伝子学講座

横 山 茂

I. はじめに

神経機能や筋収縮に関する生体情報は, 電気信号として伝達される。細胞膜にそって伝達される電氣的興奮の実体は活動電位であり, その発生, 伝播はナトリウムイオン (Na^+) あるいはカルシウムイオン (Ca^{2+}) の細胞内流入とカリウムイオン (K^+) の細胞外流出によって説明される。細胞膜には各々のイオンに選択的な通過路, すなわちイオンチャネルが存在し, 膜電位の変化を感知して開口し, 毎秒 10^6 – 10^8 個のイオンを透過させる。このような性質をもつイオンチャネルは, 膜電位依存性イオンチャネルと呼ばれ, その実体は細胞膜の脂質二重層に埋め込まれたタンパク分子である^{1,2)}。膜電位依存性イオンチャネルは, 活動電位の発生, 伝播, 神経伝達物質放出の調節という生理機能を担うとともに, 最近ではてんかん, 不整脈をはじめとする細胞膜の電氣的興奮の異常を伴う疾患の原因遺伝子としても重要視されている³⁾。本稿では, 我々がこれまでに関わってきた膜電位依存性 K^+ チャネル (以下 K^+ チャネル) および膜電位依存性 Na^+ チャネル (以下 Na^+ チャネル) の構造と機能を中心に述べる。

II. チャネル構成タンパクの基本的な分子構造

膜電位依存性イオンチャネルは, イオン通過路を形成するサブユニット (α サブユニット) とこれに付随するサブユニット (accessory subunit) からなる分子複合体である。 α サブユニットは, Na^+ , Ca^{2+} および K^+ チャネルの間で共通した一次構造上の特徴を持ち, 膜電位の感知とイオンの選択的透過という2つの重要な機能を実現するのに適した構造を備えている^{1,2)}。

K^+ チャネルの α サブユニットは, 6つの細胞膜貫通領域 (S1–S6: Segments 1–6) に加えて, S5とS6の間に存在するPH (pore helix) と称される中等度に疎水性の高い部分を持つ領域を基本単位として持っている (図1)。 Na^+ チャネルの α サブユニットと Ca^{2+} チャネルの α_1 サブユニットは, このような基本単位が一本の長いペプチド内で4回繰り返す構造 (リピート I–IV) をとり, 中央のイオン通過路 (孔あるいはポア) を囲む。一方, K^+ チャネルの場合には, この基本単位を1つだけ含むペプチドが4つ会合してチャネルを形成する^{1,2)}。

上述したチャネルタンパクの基本単位は, 機能的な観点から, S1–S4で構成される膜電位感知領域と, S5, PH, およびS6から構成されるポア領域に二分される。膜電位感知領域のS4は, 正電荷を帯びたアルギニン, リジン残基が3つおきに並ぶ特徴的な配列をもち, 膜電位の変化を感知する。一方, ポア領域の各セグメントはイオン通過路の壁を形成する。特に, PH周辺の

アミノ酸配列がイオン選択性を決定すると考えられている。脱分極刺激による膜電位感知領域の構造変化は, S4–S5リンカーとS6のC末端側部分との相互作用を通じてポア領域に伝わり, チャネルを開口させると考えられている。このようなチャネルの活性化モデルは最近の K^+ チャネルKv1.2の結晶構造解析に基づくものであるが, 類似する他の膜電位依存性イオンチャネルでも同様な機構が働いていることが推測される。

III. 膜電位依存性イオンチャネルの分子多様性

活動電位の頻度, 持続時間, 閾値等は神経細胞によって異なり, 多様性に富んでいる。この要因は, (i) 類似する膜電位依存性イオンチャネルを構成するタンパクの遺伝子座が多数存在し, それぞれが神経組織の発達の時期, 部位によって異なる発現様式をとること, (ii) 選択的スプライシング (alternative splicing) によって部分的に異なるタンパクができること, (iii) 異なるサブユニットによって様々な組み合わせの四量体がつくられることなどである^{1,2)}。

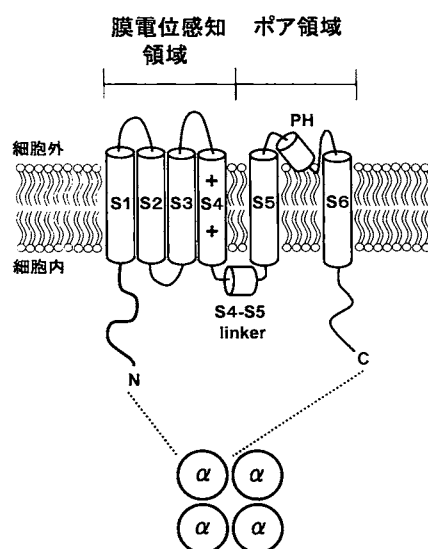


図1. 膜電位依存性 K^+ チャネルの α サブユニットの基本構造。
 K^+ チャネルは4量体の中央がイオンの通過路になる。 Na^+ チャネルの α サブユニットと Ca^{2+} チャネルの α_1 サブユニットでは, この基本単位が一本の長いペプチド内で4回繰り返してあり, これがイオンの通過路を囲む。

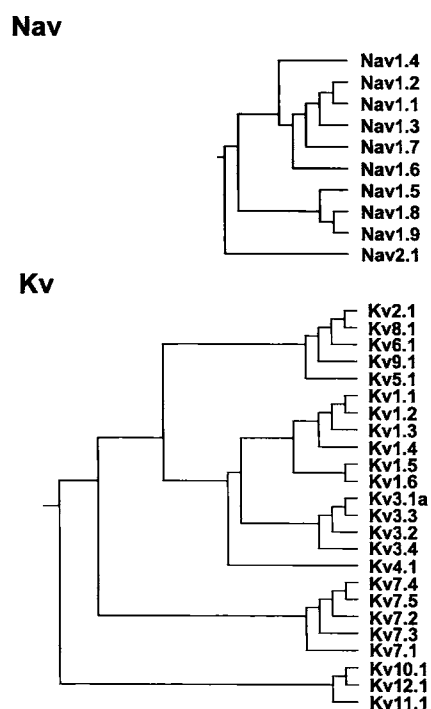


図2. 膜電位依存性Na⁺チャネル(Nav)とK⁺チャネル(Kv)のポアを形成する α サブユニットの分子進化系統樹。近隣接合法(Neighbour-joining method)による。K⁺チャネルの系統樹は、代表的なものに限って作成してある。

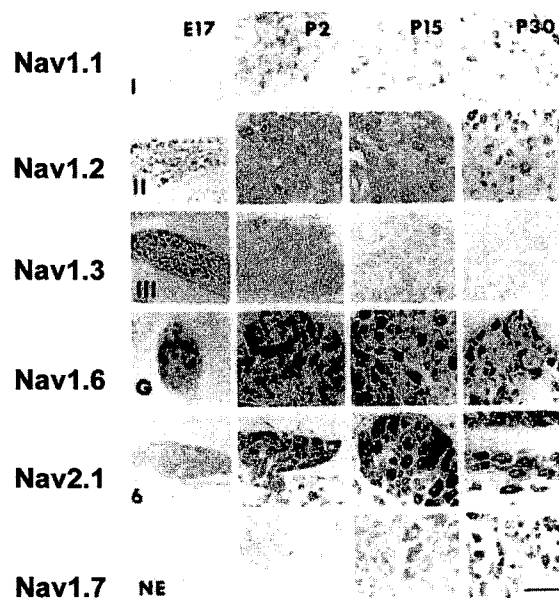


図3. 膜電位依存性Na⁺チャネル α サブユニットの発達に伴う発現変化。ラット脊髄後根神経節に発現するNa⁺チャネルの α サブユニットのmRNAを*in situ*ハイブリダイゼーション法にて検出。胎生17日(E17), 生後2, 15, 30日(P2, P15, P30)の組織を使用。文献4より改変。

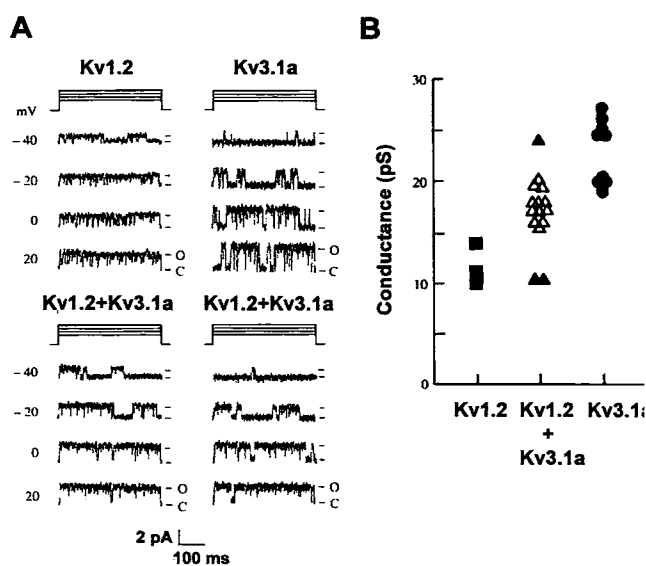


図4. 膜電位依存性K⁺チャネルKv1.2とKv3.1aの異種多量体形成。説明は本文参照。A. 単一チャネルの活動記録の代表例。開いた状態(O: open)と閉じた状態(C: closed)を示してある。B. 記録されるチャネルのコンダクタンスの分布。文献5より改変。

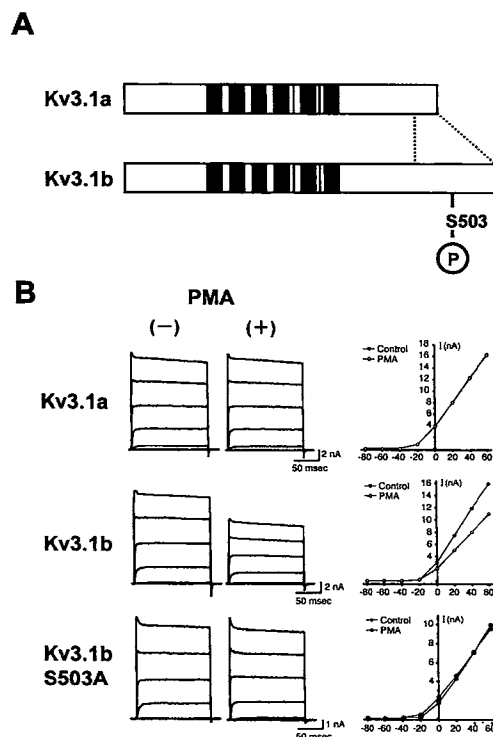


図5. 膜電位依存性K⁺チャネルKv3.1のC-キナーゼによる活動調節。A. 選択的スプライシングによって、C末端の異なるタンパク(Kv3.1aとKv3.1b)がつけられる。B. Kv3.1bの503番目のセリン残基(S503)をアラニン残基に置換すると、C-キナーゼの活性化剤であるホルボール12-ミリスチン酸13-酢酸(PMA)による電流抑制が観られなくなる。文献6より改変。

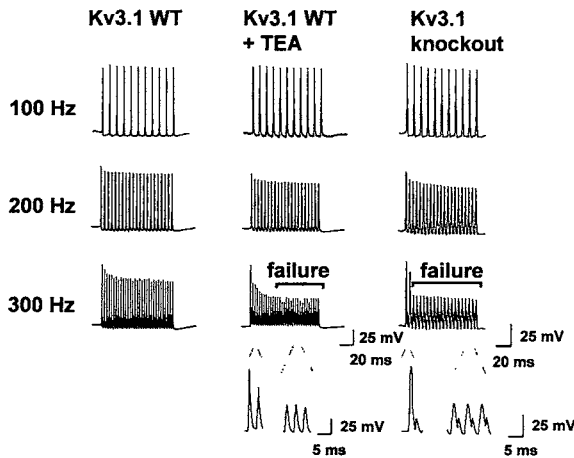


図6. 膜電位依存性 K^+ チャンネル $Kv3.1$ による聴神経核ニューロンの興奮調節. 電気刺激の頻度を増加してゆくと, $Kv3.1$ 遺伝子をノックアウト (knockout) したマウス由来の内側台形体核 (MNTB) ニューロンの活動電位の振幅は, 野生型 (WT) マウス由来のMNTBニューロンに比べて著明に低下する (failure). K^+ チャンネル阻害薬のテトラエチルアンモニウム (TEA) の存在下の野生型MNTBニューロンでも同様である. 文献6より改変.

膜電位依存性イオンチャンネルが巨大な多重遺伝子ファミリーをなすことは, 遺伝子クローニング技術の導入によって明らかになった. 研究者間の混乱を避けるため, チャンネル遺伝子の名称を統一することが図られている. まずイオン名にvoltage-gated (あるいはvoltage-dependent) の頭文字のvを付けて, Nav, Kv, Cavとする. これにサブファミリーの番号, サブファミリー内での番号を加えて, Nav1.1のように表記する. これまでに α (あるいは α_1) サブユニットとし同定されてきたタンパクの数は, Na^+ チャンネルではNav1.1–Nav1.9とNav2.1の10種, Ca^{2+} チャンネルではCav1.1–Cav1.4, Cav2.1–Cav2.3, Cav3.1–Cav3.3の10種, K^+ チャンネルではKv1–Kv12のサブファミリーに属する40種以上にのぼる. 一般的に, 膜電位依存性イオンチャンネルの遺伝子の数は, 高等動物になるほど多くなる. これに関しては, 原型ともいえるチャンネル先祖遺伝子が存在し, 進化の過程で遺伝子重複が繰り返されて数が増えてきたためと考えられている (図2). また, 付随するサブユニットはそれ自体がイオンの通過路を形成するものではないが, チャンネルの活性化・不活性化の速度, 細胞膜への輸送等を調節している.

上述したサブユニットは, それぞれに異なる組織内分布, 細胞内局在, 発達に伴う発現量変化を示す^{1,3,4}. 図3は Na^+ チャンネルの例であるが, Nav1.3のように胎児期, 新生児期に高発現していて成長とともに減少するものもあれば, Nav1.1のように胎児期, 新生児期には低発現で成体になるまで増加するものもある^{3,4}.

さらに, K^+ チャンネルでは α サブユニットの組み合わせによっても, イオンチャンネルの多様性が作り出される. 例えば, Kv1.2とKv3.1aのメッセンジャーRNA (mRNA) をアフリカツメガエルの卵母細胞に混合注入して K^+ チャンネルを再構成すると, 各々のmRNAを単独に注入したときと異なるコンダクタンスを持つチャンネルが観察される (図4). これは, 同一の α サブユニッ

トが集合する同種4量体以外にも, 異なる α サブユニットの集合による異種4量体が形成されることを示唆している⁹.

IV. 受容体・細胞内情報伝達系によるチャンネルの活動調節

神経細胞の電気的興奮性は, イオンチャンネルの性質, 分布密度等の因子以外に, シナプスなどを通じた外部からの入力によっても巧妙に調節されている. 神経伝達物質やホルモンが細胞膜の受容体を刺激すると, 活動電位の発生閾値, 頻度, 持続時間が変化する. 受容体刺激が細胞内情報伝達経路を活性化して, 最終的にイオンチャンネルの活動を变化させるためであり, このような細胞応答は一般に神経変調 (neuromodulation) と呼ばれている. 主要な細胞内情報伝達経路として, サイクリックAMP (cAMP)とcAMP依存性タンパク質リン酸化酵素 (A-キナーゼ) の関与する経路と, イノシトール三リン酸とジアシルグリセロールをセカンドメッセンジャーとするタンパク質リン酸化酵素 (C-キナーゼ) の関与するものがよく知られている.

図5は, C-キナーゼによる $Kv3.1$ チャンネルの活動抑制を示す実験例である⁹. $Kv3.1$ チャンネルでは, 選択的スプライシングによってカルボキシ (C) 末端が異なる $Kv3.1a$ と $Kv3.1b$ という2種類のタンパクが産生される. $Kv3.1b$ のC末端のセリン残基をアラニン残基へと人工的に置換すると, C-キナーゼの活性化剤であるホルボール12-ミスチン酸13-酢酸 (PMA) による電流抑制が観られなくなる. また我々は, Mチャンネル ($Kv7.2/Kv7.3$ チャンネル) の抑制機構の研究から, C-キナーゼがAKAP (A-kinase anchoring protein) という足場タンパクとの複合体を形成して作用することも発見している⁷.

上記の細胞内情報伝達経路以外に, 我々はムスカリン性アセチルコリン受容体, 代謝型グルタミン酸受容体等の刺激がサイクリックADPリボース産生と共役することを見出している^{8,9}. この経路については今後も多くの検証が必要であり, 現在Mチャンネル ($Kv7.2/Kv7.3$ チャンネル) の調節に果たす役割を検討中である.

V. 神経機能調節

個々のチャンネル分子がどのような脳機能に関与しているのかという疑問に答えることは, 多くの場合困難である. 発生工学の技法を用いて特定のチャンネル遺伝子をノックアウトしても, 有意な変化が観察されることは少ない. これは, 実際の生体内では同一の神経細胞に性質の似通った他のチャンネルが発現しているために, 機能が代償されるためと考えられる. このような状況下でも多くの実験が試みられている. 以下に, 我々の K^+ チャンネル $Kv3.1$ の研究を紹介する.

$Kv3.1$ は神経芽細胞腫培養細胞株NG108-15から当初クローン化され¹⁰, 小脳顆粒細胞と聴神経核に豊富に発現していることが分かっていた. また, チャンネルをアフリカツメガエル卵母細胞, 線維芽細胞に異所性に再構成すると脱分極刺激による活性化の閾値が $-10 \sim 0$ mV付近と比較的高く, 迅速な活性化を示す¹¹. しかしながら, このような高閾値 K^+ チャンネルが実際の神経系で果たす生理的役割は不明のままであった. $Kv3.1$ 遺伝子のノックアウトマウスを作成し, 取り出したニューロンを解析したところ, 求心性聴覚路の中継核に存在する内側台形体核 (MNTB: medial nucleus of trapezoid body) ニューロンで有意な興奮活動性の変化が観察された (図6). すなわち, MNTBニューロンを電気刺激する周波数を増加してゆくと, $Kv3.1$ 遺伝子のノックアウトマウス由来のMNTBニューロンの活動電位の振

幅は、野生型マウス由来のMNTBニューロンに比べて著明に低下した。聴覚刺激に伴う高頻度シナプス入力を忠実に中枢へ伝導するためには、Kv3.1のような高閾値K⁺チャンネルが必要であることを示す例である。

VI. おわりに

かつては存在自体が不確かであった膜電位依存性イオンチャンネルも、その分子の高次構造が詳細に解析される時代になった。強い疎水性のため、チャンネルタンパクの結晶化は長らく絶望視されていた。1998年、Rockefeller大学のMacKinnonはこの問題を克服し、K⁺チャンネルの結晶化とそのX線構造解析の功績によって、2003年度のノーベル化学賞を授与されている。この研究以降、イオンチャンネルの活性化・不活性化、イオン選択性のメカニズムの分子理論は、強い説得力を持つようになった。また、近年ヒトをはじめとする多くの生物のゲノム解読が終了し、チャンネルを構成するタンパクをコードする遺伝子群の全貌もほぼ明らかになった。チャンネル遺伝子が際限なく存在するかのよう感じられたことも、過去のことになりつつある。

今後重要な課題の一つは、個々のチャンネル分子及びその調節機構が高次脳機能に果たす生理的役割を明らかにすることであろう。このことは、神経・精神疾患の発症機序の究明と表裏一体の関係にあると思われる。既にイオンチャンネルの異常に起因する疾患は60以上報告されており、その約半数で膜電位依存性イオンチャンネルが原因遺伝子となっている²⁾。今のところ、単一の遺伝子変異や抗チャンネル自己抗体が原因となる末梢神経・筋疾患が主なものであるが、将来的には学習・記憶障害をはじめとする高次脳機能障害との関連性の解明も期待される。今後の発展に、我々も微力ながら貢献できるように努めたい。

謝 辞

本稿で紹介した研究は、金沢大学医学系研究科脳細胞遺伝子学教室だけではなく、同脳神経外科学教室、同内科学第二教室、同法医学教室、東北大学医学部医化学第一教室、京都大学医学部医化学第二教室、Yale大学医学部神経学教室、同薬理学教室の多くの共同研究者の方々を行ったものです。ここにお礼申し上げます。

文 献

1) Lai HC, Jan LY: The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels. *Nature Rev. Neurosci.* 7: 548-562, 2006

2) Ashcroft FM: From molecules to malady. *Nature* 440: 440-447, 2006

3) Black JA, Yokoyama S, Higashida H, Ransom BR, Waxman SG: Sodium channel mRNA I, II and III in the CNS: Cell-specific expression. *Mol. Brain Res.* 22: 275-289, 1994

4) Felts PA, Yokoyama S, Dib-Hajj S, Black JA, Waxman SG: (1997). Sodium channel α -subunit mRNAs I, II, III, NaG, Na6 and hNE (PN1): Different expression pattern in developing rat nervous system. *Mol. Brain Res.* 45: 71-82, 1997

5) Shahidullah M, Hoshi N, Yokoyama S, Higashida H: Microheterogeneity in heteromultimeric assemblies formed by Shaker (Kv1) and Shaw (Kv3) subfamilies of voltage-gated K⁺ channels. *Proc. R. Soc. Lond. B* 261: 309-317, 1995

6) Macica CM, von Hehn CAA, Yang-Wang L, Ho CS, Yokoyama S, Joho RH, Kaczmarek LK: Modulation of the Kv3.1b potassium channel isoform adjusts the fidelity of the firing pattern of auditory neurons. *J. Neurosci.* 23: 1133-1141, 2003

7) Hoshi N, Zhang J-S, Omaki M, Takeuchi T, Yokoyama S, Wanaverbecq N, Langeberg L, Yoneda Y, Scott JD, Brown DA, Higashida H: AKAP150 signaling complex promotes suppression of the M-current by muscarinic agonists. *Nature Neurosci.* 6: 1-7, 2003

9) Higashida H, Yokoyama S, Hashii M, Taketo M, Higashida M, Takayasu T, Ohshima T, Takasawa S, Okamoto H, Noda M: Muscarinic receptor-mediated dual regulation of ADP-ribosyl cyclase in NG108-15 neuronal cell membranes. *J. Biol. Chem.* 272: 31272-31277, 1997

8) Higashida H, Mochida S, Chen X-L, Shin Y, Zhang J-S, Noda M, Hossain K.Z, Hoshi N, Hashii M, Shigemoto R, Nakanishi S, Fukuda Y, Yokoyama S: Subtype-specific coupling with ADP-ribosyl cyclase of metabotropic glutamate receptors in retina, cervical ganglion and NG108-15 cells. *J. Neurochem.* 85: 1148-1158, 2003

10) Yokoyama S, Imoto K, Kawamura T, Higashida H, Iwabe N, Miyata T, Numa S: Potassium channels from NG108-15 neuroblastoma-glioma hybrid cells: Primary structure and functional expression from cDNAs. *FEBS Lett.* 259: 37-42, 1989

11) Yokoyama S, Kawamura T, Ito Y, Hoshi N, Enomoto K-I, Higashida H: Potassium channels cloned from NG108-15 neuroblastoma x glioma hybrid cells: Functional expression in *Xenopus* oocytes and mammalian fibroblast cells. *Ann. NY. Acad. Sci.* 707: 60-73, 1993