

177. 光操作を駆使したイオンチャネルの 1 分子動態解析

好岡 大輔

大阪大学 大学院医学系研究科 統合生理学教室

Key words : M チャネル (KCNQ2/3), PI (4,5) P₂, 1 分子イメージング, 軸索起始部 (AIS), てんかん

緒言

神経細胞において、M チャネル (KCNQ2/3) は活動電位の発生を制御する最も重要な電位依存性カリウムチャネルの一つである。病理学的には、M チャネルの機能障害はてんかんを含む様々な神経疾患の原因であることから、M チャネルはこれらの疾患の重要な創薬ターゲットとも考えられている。M チャネルの制御機構は、トラフィッキング機構と活性制御機構に大別される。前者については、M チャネルが主に軸索初期分節 (AIS) に局在すること、M チャネルの空間パターンの可塑的变化が神経細胞の興奮性に直結することなどがよく知られている。後者については、細胞膜内葉に存在するイノシトールリン脂質の一種である PI (4,5) P₂ (以下、PIP₂) が、M チャネルのいくつかの塩基性残基 (K, R, H) と静電的に相互作用し、活性化された開口状態を安定化することがすでに証明されている。PIP₂ は細胞内小胞の形成や輸送過程にも強く関与しているが、PIP₂ が神経細胞における M チャネルの活性だけでなく輸送をも制御しているかどうかは、まだ誰も十分に検証していない。本研究では、M チャネルのトラフィッキング制御における PIP₂ の役割を解明することを目的とする。そこでまず、1 分子イメージングとケージドリジンシステムという 2 つの光工学技術をそれぞれ確立して、M チャネルの時空間動態の可視化と M チャネル-PIP₂ 相互作用の光操作の実現を目指す。

方法

1. 1 分子イメージング

まず KCNQ2/3 によって構成される M チャネルを可視化するために、蛍光標識用タグ (HaloTag) を融合した KCNQ3 を作製した。ここで KCNQ2 ではなく KCNQ3 に着目したのは、KCNQ3 が M チャネルのトラフィッキング制御因子としての役割を持つことが既に判明しているからである [1]。本研究では、既報にならない [2]、IL2RA 由来の 1 回膜貫通領域を KCNQ3 の N 末端に付与した。HaloTag は人工的に付与した膜貫通領域の N 末端に融合させた (Halo-TAC-KCNQ3、図 1a)。共焦点イメージングを行う場合は、培養海馬神経に発現させた Halo-TAC-KCNQ3 を細胞膜非透過性、透過性の HaloTag 特異的蛍光リガンド (AF660, TMR) で順次染色した。これにより、細胞表面と細胞質に存在する分子を同時に識別できた。全反射照明蛍光顕微鏡 (TIRFM) による 1 分子イメージング (図 2a) を行う場合は、低濃度の TMR で Halo-TAC-KCNQ3 を標識した。既報にならない [3]、分子の 3 次元的空间動態を定量解析した。

2. ケージドリジンシステム

KCNQ3 の PIP₂ 親和性自体を光操作するために光感受性保護基を有するケージドリジン (hydroxycoumarin lysine : HCK) を用いた [4]。先行研究により [5]、KCNQ3 の PIP₂ 作用部位を構成することが既に知られているリジン残基 (K260) を HCK に置き換えた。本研究では同時に、A316T 変異を導入することで KCNQ3 がホモ 4 量体として機能するようにした [6]。以降、KCNQ3-A316T のことを KCNQ3T と表記する。HCK は PIP₂ と静電的に相互作用できないが、近紫外光 (365 nm) の照射により保護基を分解すると通常型のリジンが露出す

るため、KCNQ3 の PIP2 親和性は数秒以内に回復する。本研究では、まず実験系を確立することを目的として、アフリカツメガエル卵母細胞に KCNQ3T-K260HCK を発現させて、Two Electrode Voltage-Clamp (TEVC) 法により電流計測を行った。

結果および考察

1. PIP2 結合サイトの変異は M チャネルの AIS 選択性を低下させる

まず M チャネル-PIP2 相互作用が M チャネルのトラフィッキングにおいてどのような役割を担うのか調べるために、PIP2 結合能を欠損した変異型 KCNQ3-H258N の空間パターンを共焦点イメージングにより可視化した (図 1b)。AIS と樹状突起における AF660 の輝度を定量し、その後、AIS と樹状突起間の AF660 輝度比を KCNQ3 の AIS 選択性として算出した。その結果、H258N 変異は、KCNQ3 の AIS 選択性を有意に抑制することが確認された。この傾向はその他の低 PIP2 親和性変異体 (R243A, K359A/R365A/K367A) でも観察され、興味深いことにそれらの AIS 選択性は M チャネルの活性 (最大電流密度) と正の相関を示した。重要なのは、全ての変異体において、細胞質における TMR の輝度が野生型と変わらなかったことである (図 1b)。このことは、AIS 表面における KCNQ3 分子密度の低下が細胞質における分子密度の低下に起因しているわけではないことを示している。

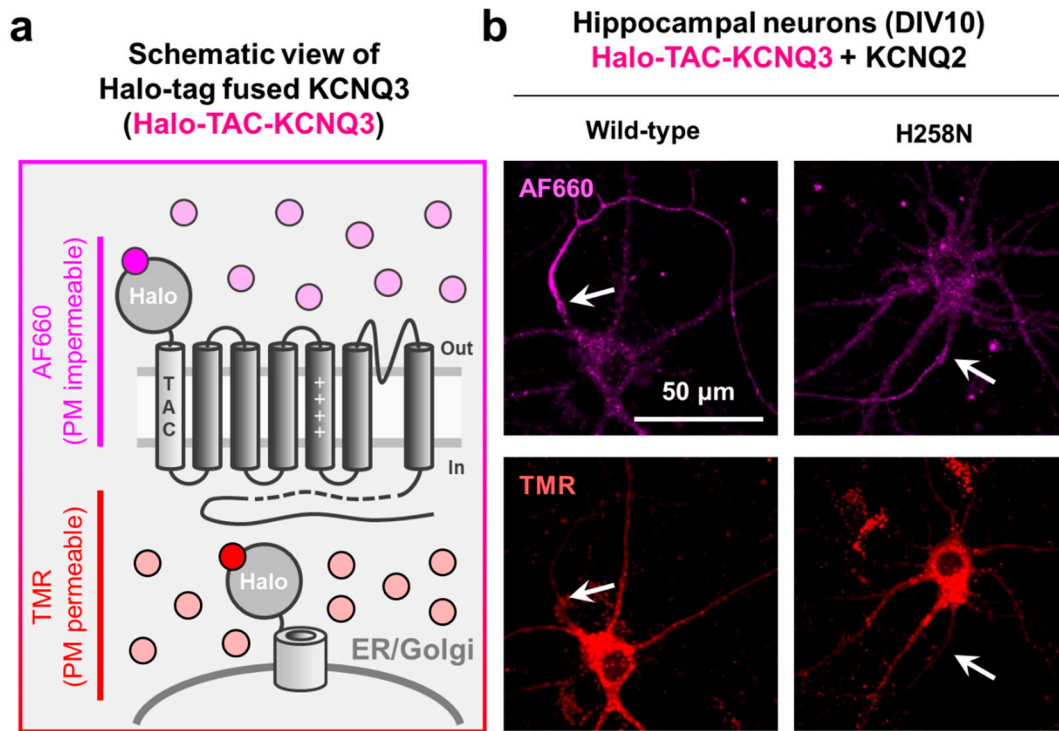


図 1. 神経における Halo-TAC-KCNQ3 の共焦点イメージング

- M チャネルの空間動態を可視化するために構築した Halo-TAC-KCNQ3 の概略図。
- Halo-TAC-KCNQ3 と KCNQ2 を初代培養海馬神経細胞 (DIV10) に共発現させた。その後、Halo-TAC-KCNQ3 (左: 野生型、右: H258N) を膜不透過性 (AF660、マゼンタ、上) と透過性 (TMR、赤、下) の HaloTag 蛍光リガンドで順次標識し、細胞表面と細胞質プールに存在する分子を識別した。矢印は AIS 領域の開始位置を示す。AIS 領域は AIS マーカー (EGFP-Nav1.2 II-III linker) を用いて同定した。スケールバーは 50 μ m。

2. PIP2 結合部位の変異は M チャネルの 3 次元的な空間動態の全てに影響する

一般に、細胞における膜タンパク質の空間パターンは、エキソサイトーシス、側方拡散、エンドサイトーシスという 3 方向のトラフィッキング経路によって形成される。したがって、低 PIP2 親和性 KCNQ3 で観察された AIS 選択性の低下は、KCNQ3 の 3 次元的な空間動態を制御するいずれかの経路に生じた変化に起因しているはずである。そこで、PIP2 結合部位の変異が KCNQ3 のトラフィッキング経路のどこに影響を与えるかを明らかにするために、KCNQ3 の 1 分子イメージングを行った。これにより、細胞底面近傍に存在する蛍光 1 分子のシグナルのみを検出できた (図 2b)。

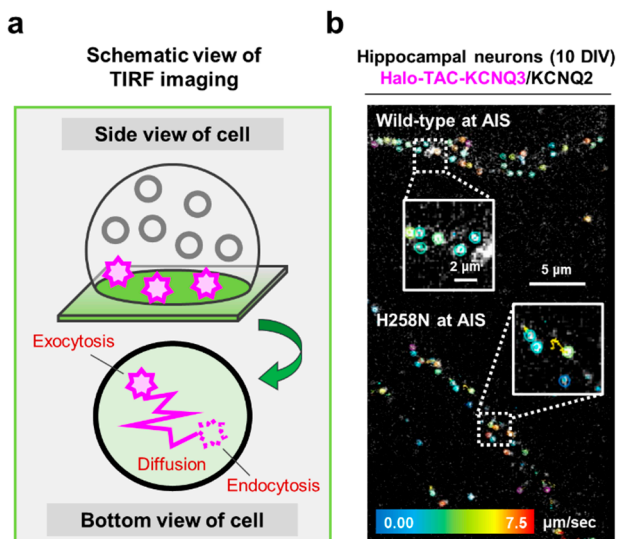


図 2. AIS における Halo-TAC-KCNQ3 の 1 分子イメージング

- TIRFM を用いた 1 分子イメージングの概略図。
- 培養海馬神経 (DIV10) の AIS における Halo-TAC-KCNQ3 (上、野生型; 下、H258N) の代表的な 1 分子イメージング画像 (スケールバーは 5 μm) およびその拡大図 (スケールバーは 2 μm)。

まず、KCNQ3 の側方拡散を解析した。KCNQ3 の拡散動態は、隠れマルコフモデル (Hidden Markov Model : HMM) を用いたパターン認識によって拡散係数の異なる 3 つの状態に分類できた (図 3a)。得られた拡散係数に基づいて、この 3 つの状態を不動状態、低速拡散状態、高速拡散状態と呼んだ。解析の結果、PIP2 結合部位の変異 (H258N) により、KCNQ3 の不動状態、高速拡散状態の占有率が各々約 10% 有意に減少、増加することが明らかとなった。次に、KCNQ3 のエキソ・エンドサイトーシス過程も解析した。細胞表面における輝点の出現と消失は、それぞれエキソサイトーシスとエンドサイトーシスが生じたことを示している。したがって、輝点の出現頻度と寿命から、見かけの k_{on} と k_{off} 速度定数を計算することができる (図 3b)。解析の結果、興味深いことに、KCNQ3 の k_{off} 速度定数は、各分子の拡散性と正の相関を示すことが分かった。しかし、野生型および変異体 KCNQ3 の間に有意差は認められなかった。一方、H258N 変異は、不動かつ長寿命分子の k_{on} 速度定数を選択的に低下させることが明らかとなった。

以上のように、本研究では一分子イメージングを用いてイオンチャネルの 3 次元動態の全てを解析することに成功した。その結果、PIP2 結合部位の変異により、KCNQ3 の側方拡散性が増大し、不動かつ長寿命分子の出現頻度 (エキソサイトーシス過程) が選択的に抑制されることが分かった。この 1 分子レベルでのダイナミクスの違いは、多分子レベルで観察された低 PIP2 親和性 KCNQ3 の AIS 選択性の低さをよく説明している。重要なことは、M チャネルの PIP2 結合部位に、てんかんに関連する遺伝子変異 (R242Q/W、H257Y、R364H/C) が数多く同定されていることである。今回の発見はてんかんを含む神経・精神疾患の発症機序や治療戦略を理解するための深い洞察も提供している。

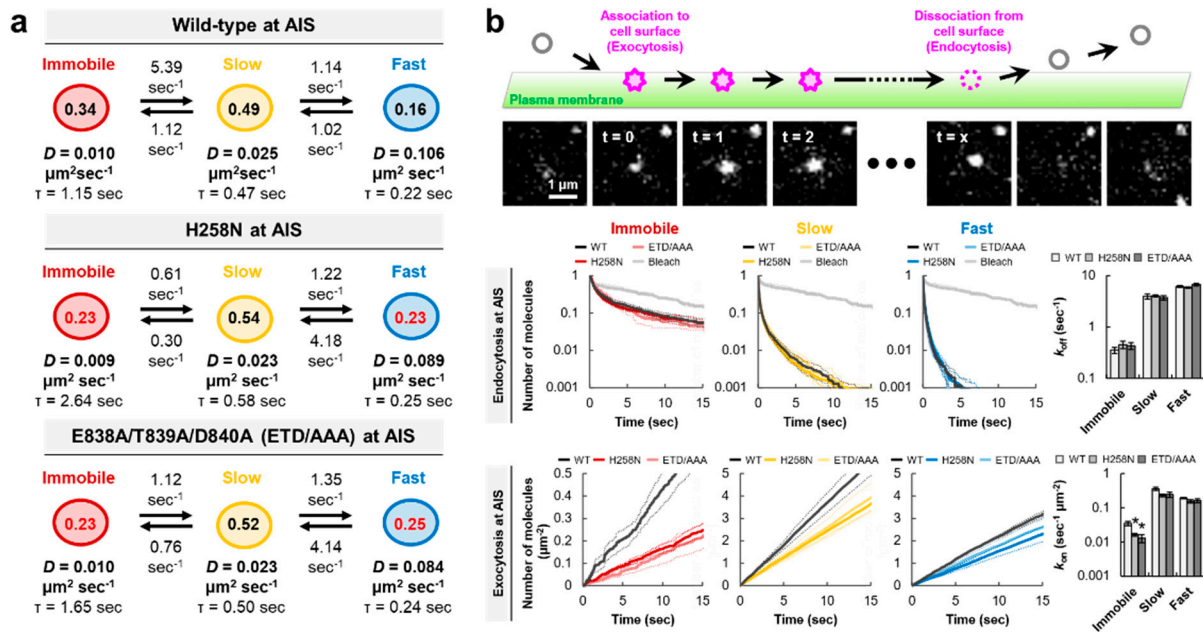


図3. 野生型および低PIP2親和性KCNQ3の時空間動態解析

- a) 隠れマルコフモデル (HMM) に基づき、Halo-TAC-KCNQ3 (上: 野生型、中: H258N、下: ETD/AAA) の拡散ダイナミクスを拡散係数 (D) の異なる3つの状態に分類した。Negative control として、AIS 構造を裏打ちする足場タンパク質である ankyrin-G との結合親和性を欠いた変異型 KCNQ3-E838A/T839A/D840A (ETD/AAA) の結果を併記している。M チャンネルの正常な AIS 局在のためには ankyrin-G との相互作用が必要であり、ETD/AAA 変異により KCNQ3 の AIS 選択性が著しく低下することが既に報告されている [1]。円の中と矢印の横の数値はそれぞれ各状態の占有率と状態間の遷移速度定数を示す。赤で示したパラメータは野生型 KCNQ3 (上) と比較して有意差があったことを示す。* $P < 0.05$ (Steel-Dwass test、“Wild-type at AIS”との比較結果のみ示す)。
- b) 代表的な1分子輝点のタイムラプス画像を示す (上)。エンドサイトーシスの動態は細胞表面上の輝点の寿命から解析した (中)。野生型および変異型 KCNQ3 の間に有意差はないものの、 k_{off} 速度定数は分子の拡散性と関連していた。一方、エキソサイトーシスの動態は細胞表面における輝点の出現頻度から解析した (下)。H258N および ETD/AAA 変異は KCNQ3 の k_{on} 速度定数を有意に減少させた。* $P < 0.05$ (Steel-Dwass test、“WT”との比較結果のみ示す)。Mean ± SE。スケールバーは $1 \mu\text{m}$ 。

3. ケージドリジンシステムを用いた KCNQ3 の PIP2 親和性操作法の確立

ここまで (結果および考察 1、2) の計測・解析結果は全て異なる細胞に発現させた野生型および低 PIP2 親和性 KCNQ3 の空間動態を比較したものである。これに加えてさらに、同じ細胞の中で KCNQ3 の PIP2 親和性を時空間的に操作することを目指し、ケージドリジンシステムの確立に取り組んだ。まず、標的とする KCNQ3 の K260 残基の PIP2 結合サイトとしての機能を検証した。まず、アフリカツメガエル卵母細胞を用いて野生型および K260A 変異型 KCNQ3T 電流の TEVC 計測を行った結果、この変異は KCNQ3T の電流量と電位依存性を有意に抑制することを確認した。ただしその内、電流量の低下は細胞表面における分子密度の低下に起因していることが、共焦点イメージングにより判明した。さらに電位依存性ホスファターゼ (VSP) を用いて細胞膜の PIP2 量を操作し、KCNQ3 の PIP2 感受性を評価した [7]。その結果、K260A 変異により KCNQ3T の PIP2 感受性が低下することが分かった。以上により、K260 残基が KCNQ3 の PIP2 親和性制御のため重要であることが確かめられた。そこで次に、K260 残基をケージドリジン (HCK) に置き換えて同様の TEVC 計測を行った (図 4)。その結果、光照射により、KCNQ3T-K260HCK の電圧依存性が有意に増加した。この時、電流量は変化しなかったが、これは細胞表面における KCNQ3T-K260A 分子密度の結果と一致している。この結果はケージ

ドリジンシステムでは同じ細胞内で分子機能を比較できるため、遺伝子発現量やトラフィック効率などの影響を排除できるという利点を支持する。以上のように、本研究ではイオンチャネルの PIP2 親和性を光操作するための基盤を確立できた。現在、この技術をさらに神経細胞におけるイオンチャネルの 1 分子イメージングと融合させ、M チャネルの動態制御における PIP2 の役割をより詳細に解析する試みを続けている。

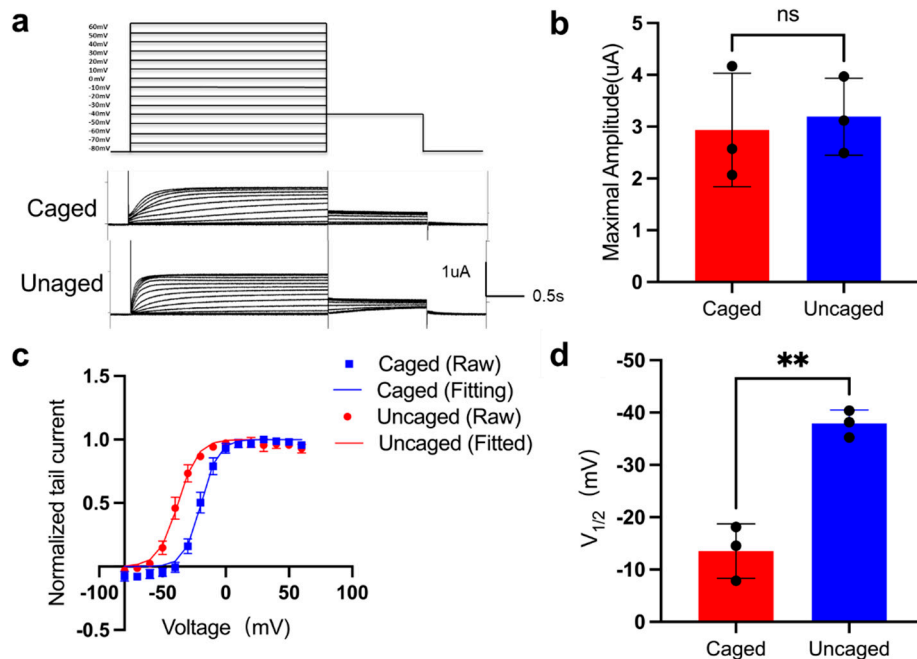


図 4. ケージドリジンシステムを用いた KCNQ3-PIP2 相互作用の光操作

- KCNQ3T-K260HCK を発現させた卵母細胞から TEVC によって得られた代表的なカリウム電流のトレース。-80 mV から +60 mV まで、10 mV ずつ電位を変化させた。その後、-40 mV においてテール電流を計測した。近紫外光 (365 nm) を 2 分間照射する前 (Caged) と後 (Uncaged) の結果を示す。
- 光照射前後 +60 mV における KCNQ3T-K260HCK の最大電流振幅。
- c、d) 光照射前後 (Caged、Uncaged) の G-V 曲線 (c) と定量化した $V_{1/2}$ (d)。G-V 曲線をボルツマン関数で近似することにより $V_{1/2}$ を定量化した。Ns : 有意差なし。** $P < 0.01$ (Welch's t-test)。Mean \pm SD。

共同研究者・謝辞

本研究は大阪大学大学院、医学系研究科、統合生理学教室にて実施した。ケージドリジンシステムに必要な各種プラスミドと HCK は開発者である Prof. Alexander Deiters (University of Pittsburgh, US) より供与を受けた。

文献

- Rasmussen HB, Frøkjær-Jensen C, Jensen CS, Jensen HS, Jørgensen NK, Misonou H, Trimmer JS, Olesen SP, Schmitt N. Requirement of subunit co-assembly and ankyrin-G for M-channel localization at the axon initial segment. *J Cell Sci.* 2007 Mar 15;120(Pt 6):953-63. doi: 10.1242/jcs.03396. Epub 2007 Feb 20. PMID: 17311847.

- 2) Benned-Jensen T, Christensen RK, Denti F, Perrier JF, Rasmussen HB, Olesen SP. Live Imaging of Kv7.2/7.3 Cell Surface Dynamics at the Axon Initial Segment: High Steady-State Stability and Calpain-Dependent Excitotoxic Downregulation Revealed. *J Neurosci*. 2016 Feb 17;36(7):2261-6. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2631-15.2016. PMID: 26888935; PMCID: PMC6602044.
- 3) Yoshioka D, Fukushima S, Koteishi H, Okuno D, Ide T, Matsuoka S, Ueda M. Single-molecule imaging of PI(4,5)P2 and PTEN in vitro reveals a positive feedback mechanism for PTEN membrane binding. *Commun Biol*. 2020 Feb 28;3(1):92. doi: 10.1038/s42003-020-0818-3. PMID: 32111929; PMCID: PMC7048775.
- 4) Luo J, Uprety R, Naro Y, Chou C, Nguyen DP, Chin JW, Deiters A. Genetically encoded optochemical probes for simultaneous fluorescence reporting and light activation of protein function with two-photon excitation. *J Am Chem Soc*. 2014 Nov 5;136(44):15551-8. doi: 10.1021/ja5055862. Epub 2014 Oct 23. PMID: 25341086; PMCID: PMC4333581.
- 5) Zhou P, Yu H, Gu M, Nan FJ, Gao Z, Li M. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate alters pharmacological selectivity for epilepsy-causing KCNQ potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 May 21;110(21):8726-31. doi: 10.1073/pnas.1302167110. Epub 2013 May 6. PMID: 23650395; PMCID: PMC3666695.
- 6) Etxeberria A, Santana-Castro I, Regalado MP, Aivar P, Villarroel A. Three mechanisms underlie KCNQ2/3 heteromeric potassium M-channel potentiation. *J Neurosci*. 2004 Oct 13;24(41):9146-52. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3194-04.2004. PMID: 15483133; PMCID: PMC6730048.
- 7) Murata Y, Iwasaki H, Sasaki M, Inaba K, Okamura Y. Phosphoinositide phosphatase activity coupled to an intrinsic voltage sensor. *Nature*. 2005 Jun 30;435(7046):1239-43. doi: 10.1038/nature03650. Epub 2005 May 18. PMID: 15902207.