

**【目的】** 電位依存性カリウムチャネルである M チャネル (KCNQ2/3) は神経細胞に発現し、軸索起始部 (Axon Initial Segment : AIS) に局在して活動電位の生成を制御する。M チャネルの制御機構はチャネルの活性制御とトラフィッキング制御に二分できる。前者については、イノシトールリン脂質である PI(4,5)P<sub>2</sub> (以下、PIP<sub>2</sub>) が直接的な制御因子として機能することが明らかとなっている。一方、後者についての PIP<sub>2</sub> の関与は未だに良く分かっていない。そこで本研究では、M チャネルの活性制御だけでなく、トラフィッキング制御における PIP<sub>2</sub> の役割を解明することを目指す。

**【方法】** 本研究では、次に挙げる 2 つの光工学技術を用いて、M チャネルを構成する KCNQ3 の時空間動態の可視化と KCNQ3-PIP<sub>2</sub> 相互作用の光操作を試みた。1. KCNQ3 時空間動態の 1 分子イメージング解析：全反射照明蛍光顕微鏡 (TIRFM) による 1 分子イメージング法を用いて、培養神経において蛍光標識した KCNQ3 の 3 次元の 1 分子動態を網羅的に定量解析した。2. KCNQ3-PIP<sub>2</sub> 相互作用の光工学的操作：KCNQ3 の PIP<sub>2</sub> 親和性自体を光操作するために、KCNQ3 の PIP<sub>2</sub> 作用部位を構成するリジン残基 (K260) を光感受性ケージドリジン (HCK) に置き換えた。近紫外光 (365 nm) の短時間照射により HCK をアンケージすることで KCNQ3 の PIP<sub>2</sub> 親和性を光操作した。

**【結果】** 本研究では、まず PIP<sub>2</sub> の結合能力を欠く変異型 KCNQ3 の細胞内局在を調査した。その結果、低 PIP<sub>2</sub> 親和性 KCNQ3 は野生型 KCNQ3 と同様に AIS へと優先的に輸送されるものの、AIS 領域での変異体の表面密度はチャネル活性依存的に有意に減少することが明らかとなった。また、1 分子イメージングを用いた詳細な解析により PIP<sub>2</sub> 結合部位の変異が KCNQ3 の側方拡散とエキソ・エンドサイトーシスの両方のプロセスに影響を与えることが判明した。以上の結果から、KCNQ3-PIP<sub>2</sub> 相互作用がチャネルの活性だけでなく、そのトラフィッキング制御においても直接的な役割を果たすことが示された。さらに本研究では、高い時空間分解能でイオンチャネルと PIP<sub>2</sub> の相互作用を光学的に制御するための「ケージドリジンシステム」を確立した。この手法では、KCNQ3 チャネルの既知の PIP<sub>2</sub> 結合サイトである K260 を HCK に置換した。近紫外光の照射により、実際に KCNQ3 が活性化されることを確認した。このチャネル活性の変化は HCK のアンケージにより、KCNQ3 の PIP<sub>2</sub> 親和性が回復したことに起因すると考えられる。以上の実験により、チャネルの PIP<sub>2</sub> 親和性操作におけるケージドリジンシステムの適用性を実証することに成功した。

AIS における PIP<sub>2</sub> 結合サイトを介した M チャネル空間動態制御の概略図

