

細胞外陽イオンによる内向き整流性 K⁺チャネル活性の調節機構とその分子基盤

久保義弘、村田喜理、藤原祐一郎

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・機能協関システム医学分野

内向き整流性 K⁺チャネルは、種々の細胞外陽イオンによりブロックを受けることが知られており、Na⁺、Ba²⁺、Cs⁺ などのチャネルポアのより深い部位に結合し、特徴的な膜電位依存性を示すタイプと、Mg²⁺、Ca²⁺ などのより浅い部位で作用する、膜電位依存性を示さないタイプのブロッカーに大別できる。

マウスの内向き整流性 K⁺チャネル Kir2.1 は、細胞外 Mg²⁺により顕著にブロックされるが、同じサブファミリーに属する Kir2.2, Kir2.3 は、細胞外 Mg²⁺によるブロックに対する感受性が低い。本研究において我々はこれら 3 種の内向き整流性 K⁺チャネルのポア外側入り口付近に位置するアミノ酸残基(Kir2.1:E125, Kir2.2:Q126, Kir2.3:H116) の違いが、細胞外の Mg²⁺によるブロックに対する感受性の差異に寄与している可能性を検討した。さらに、Kir2.1 における E125 が、より深い部位で作用する細胞外 Ba²⁺によるブロックに与える影響、K⁺イオンの透過に及ぼす作用についても解析を行い、以下の知見を得た。

(1) Kir2.1(E125Q)変異体において細胞外 Ba²⁺ブロックに対する感受性が変化したことから、Kir2.1 における E125 は、shallow blocker である Mg²⁺だけでなく、deep blocker である Ba²⁺によるブロックに対する感受性の決定にも関与していることが示唆された。さらに、Ba²⁺ブロックの速度が変化したことから、E125 が局所的な Ba²⁺濃度、または Ba²⁺の存在確率を上昇させる作用を持つと考えられる。

(2) 野生型 Kir2.1 において、細胞外 Mg²⁺濃度の増加に伴い Ba²⁺ブロックの速度が変化したことから、Mg²⁺と Ba²⁺がこのサイトを競合していることが示唆された。

(3) E125Q 変異の導入により、細胞外 Mg²⁺非存在下での単一チャネルコンダクタンスが変化したことから、E125 は Mg²⁺、Ba²⁺によるブロックのみならず、K⁺イオンの透過にも関与することが示唆された。また、野生型の Kir2.1 において細胞外 K⁺濃度の減少に伴い Mg²⁺ブロックに対する感受性が変化したことから、Mg²⁺と K⁺がこのサイトを競合していることが示唆された。

これらの知見を統合して、Kir2.1 における E125 は、Mg²⁺、Ba²⁺、および K⁺が競合的に作用する部位であることが示唆された。

5

助成番号 0236

細胞外陽イオンによる内向き整流性 K⁺チャネル活性の 調節機構とその分子基盤

久保義弘、村田喜理、藤原祐一郎

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・機能協関システム医学分野

① 序論

内向き整流性 K⁺チャネルは、種々の細胞外陽イオンによりブロックを受けることが知られており、Na⁺、Ba²⁺、Cs⁺ などのチャネルポアのより深い部位に結合し、特徴的な膜電位依存性を示すタイプと、Mg²⁺、Ca²⁺ などのより浅い部位で作用する、膜電位依存性を示さないタイプのブロッカーに大別できる。

マウスの内向き整流性 K⁺チャネル Kir2.1 は、細胞外 Mg²⁺により顕著にブロックされるが、同じサブファミリーに属する Kir2.2, Kir2.3 は、細胞外 Mg²⁺によるブロックに対する感受性が低い。本研究において我々はこれら 3 種の内向き整流性 K⁺チャネルの第 1 膜貫通部位 (M1) 直上のポア外側入り口付近に位置するアミノ酸残基 (Kir2.1:E125, Kir2.2:Q126, Kir2.3:H116) の違いが、細胞外の Mg²⁺によるブロックに対する感受性の差異に寄与している可能性について検討した。さらに、Kir2.1 における E125 が、より深い部位で作用する細胞外 Ba²⁺ブロックに与える影響についても検討した。

ところで、MacKinnonらによって、KcsA チャネルの細胞外領域に、水和した K⁺イオンと脱水和した K⁺イオンが高確率で存在する領域が、結晶解析により観察された。これは K⁺イオンの透過機構に重要な意味を持つと考えられるが、その構造基盤は分かっていない。

そこで我々は、Kir2.1 における E125 が、細胞外領域において K⁺イオンの透過に関与する部位であり、かつ、この部位において細胞外のブロッカーである Mg²⁺ や Ba²⁺ と、透過イオンである K⁺ が競合するという可能性についても検証した。

② 方法

(1) 点変異体の作成

変異を導入したオリゴヌクレオチドと、Stratagene 社の Quik Change Site-Directed Mutagenesis Kit を用いて点変異体を作成した。変異の導入は塩基配列の決定により確認した。

(2) 発現系

変異体の cRNA を in vitro で合成し、ツメガエル卵母細胞に注入して発現させ、以下の電

気生理学的な解析を行った。

(3) 2本刺し膜電位固定法

膜電位固定用アンプは、Warner社のOC725C-HV、AD/DAコンバーターは、Axon社のDigidata1200を用い、刺激、データの取り込みは、pCLAMP6 (Axon社)により行った。基本となる外液は、90 mM KCl、10 mM Hepes (pH 7.4)を用い、種々の濃度の Mg^{2+} 、 Ba^{2+} はこの溶液にそのまま添加した。また、 K^+ 濃度を変える実験では、KClをNMDGClで置換した。但し、0 mM Mg^{2+} 溶液においては0.1 mM EDTAを添加した。また、 Ca^{2+} -Cl $^-$ チャンネルの阻害剤としてniflumic acidを200 μ M添加した。

(4) 単一チャンネル記録

cell attached modeで記録した。ピペット内液、bath溶液として、140 mM KCl、10 mM Hepes (pH 7.4)を用いた。 Mg^{2+} の添加は、2本刺膜電位固定法の時と同様に行った。Axon社のAxopatch-1D、Digidata1200を用い、1 kHzのlow pass filterを通した後、5 kHzでデータを取得した。記録後200 Hzでdigital filterをかけたものを図に示した。

③ 結果

(1) Kirファミリーメンバーとその変異体の細胞外 Mg^{2+} によるブロックに対する感受性

Kir2.1は、細胞外 Mg^{2+} によるブロックに対して高い感受性を示したが、同じファミリーに属するKir2.2、Kir2.3は、感受性が低いことが観察された (Fig. 1)。

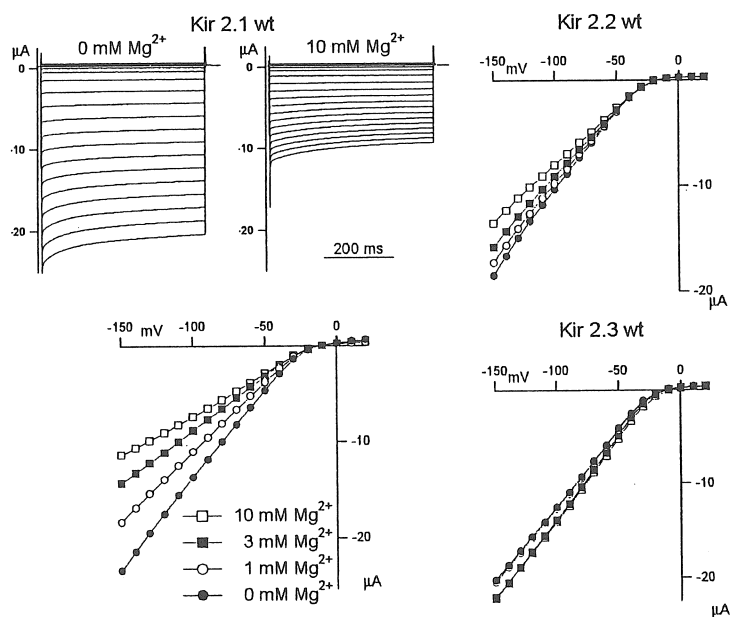


Fig. 1 Sensitivity of Kir2 family members expressed in *Xenopus* oocytes to the block by Mg^{2+} .

その感受性を決定している構造基盤を探る目的で、Kir2 ファミリーメンバーの細胞外領域のアミノ酸配列を比較した。陽イオンブロッカーの親和性が Kir2.1 では高く、Kir 2.2、Kir2.3 では低いということから、Kir2.1 のみに存在する陰電荷を持ったアミノ酸を探したところ、Glu (E) 125 がこの条件に合致していた (Fig. 2)。

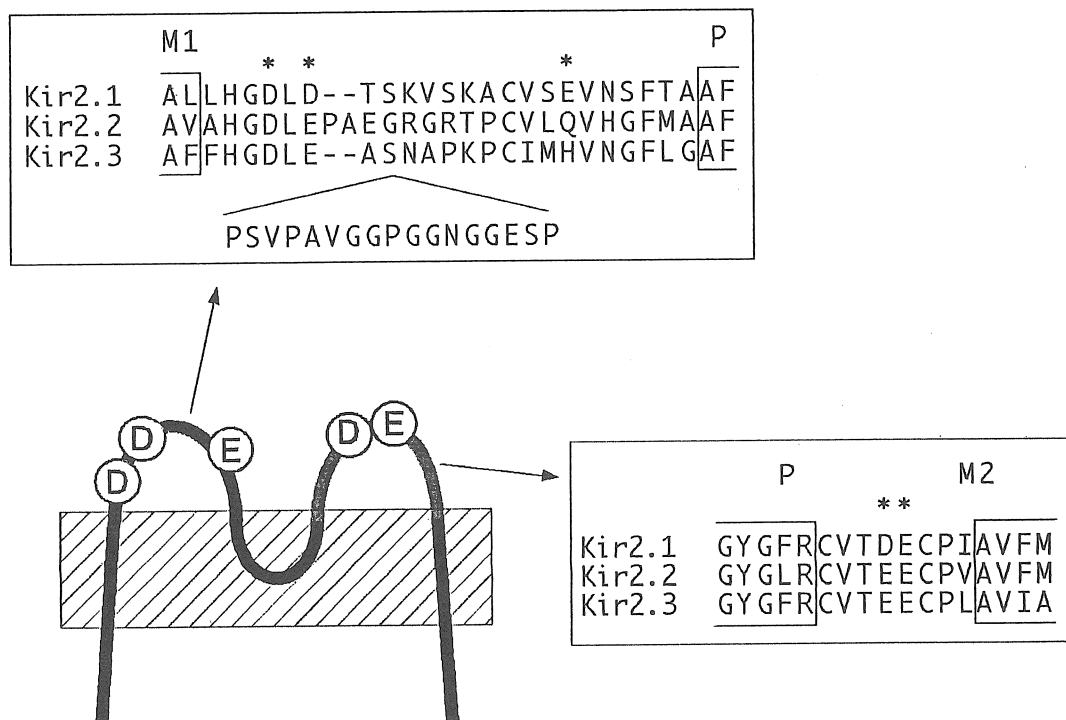


Fig. 2 Scheme of the position of negatively charged amino acids in the extracellular loop of Kir2.1 channel, and the comparison of the corresponding amino acid residues among the Kir2 family members.

そこで、このアミノ酸残基を変異させた変異体を作成し、その機能解析を行った。Kir2.1 の場合には陰電荷を奪う変異 E125Q を導入し、Kir2.2、Kir2.3 の場合は、陰電荷を加える Q126E、H116E の変異をそれぞれ導入した。野生型 (wt) と変異体の比較解析の結果、E125Q 変異により Kir2.1 は Mg^{2+} ブロックに対する感受性を失い、Q126E、H116E 変異により、Kir2.2、Kir2.3 は、 Mg^{2+} ブロックに対する感受性を獲得することが明らかになった (Fig. 3, 4)。

なお、Fig. 1 で記した、E125 以外の 4 つの陰電荷を持ったアミノ酸残基は、変異させても Mg^{2+} ブロックに対する感受性に变化はひきおこされなかった (data 省略)。以上より、Kir2.1 の E125 が細胞外 Mg^{2+} ブロックの感受性の決定に寄与する重要な残基であることが示された。

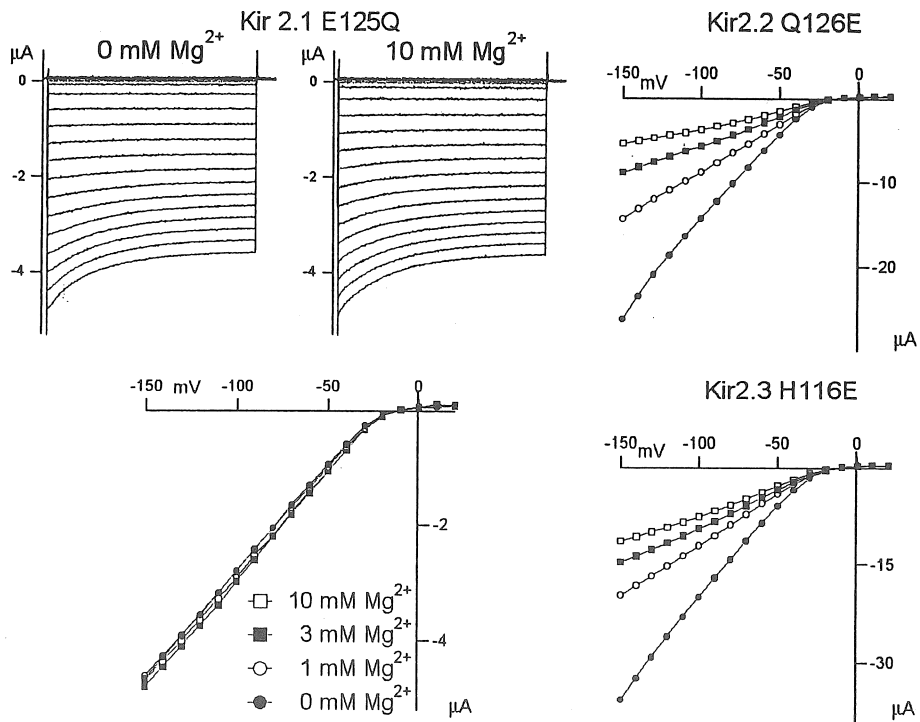


Fig. 3 Effects of mutations of Kir 2.1 E125 and corresponding sites of Kir2.2 and 2.3 on the sensitivity to the block by Mg^{2+} .

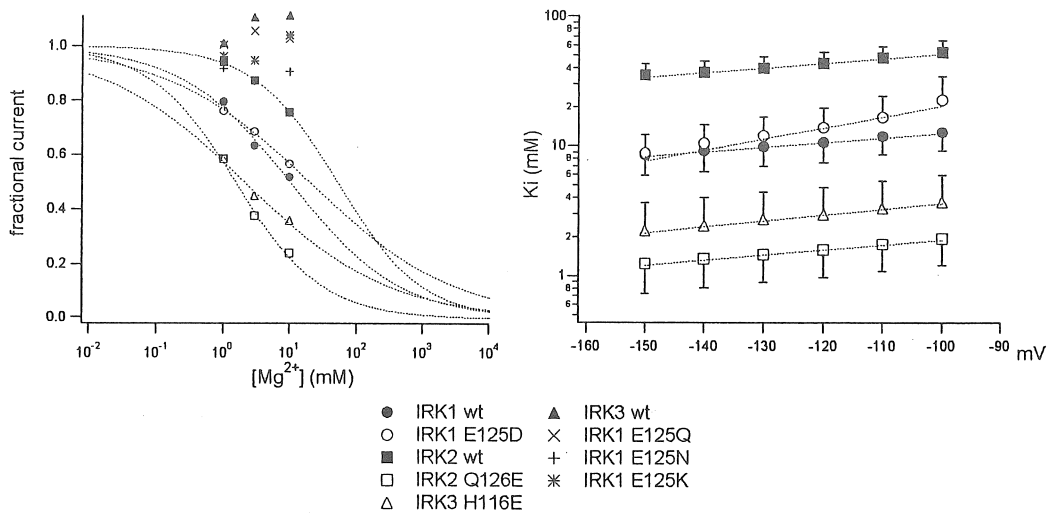


Fig. 4 Mg^{2+} dose-block relationship of wt and mutants of Kir 2 members, and the voltage-dependency of K_i values

(2) Kir2.1 と E125Q 変異体の Mg^{2+} 以外の陽イオンによるブロックに対する感受性

次のステップとして、他の細胞外の多価陽イオンによるブロックに対する感受性も、E125Q 変異で変わるかどうかを解析した。細胞外 Ca^{2+} 、 La^{3+} は、いずれも Mg^{2+} と同様に、膜電位依存性の非常に弱いブロックを示す。いかにすればその結合部位は、いずれも電場の非常に浅いところに位置している (Fig. 5)。E125Q 変異により、 Ca^{2+} や La^{3+} によるブロックに対する感受性も著明に減弱した (Fig. 5)。この結果から、E125 が Mg^{2+} に特異的な結合部位であるというよりは、陽電荷を持ったイオンが相互作用する部位であろうと考えられた (Fig. 5)。

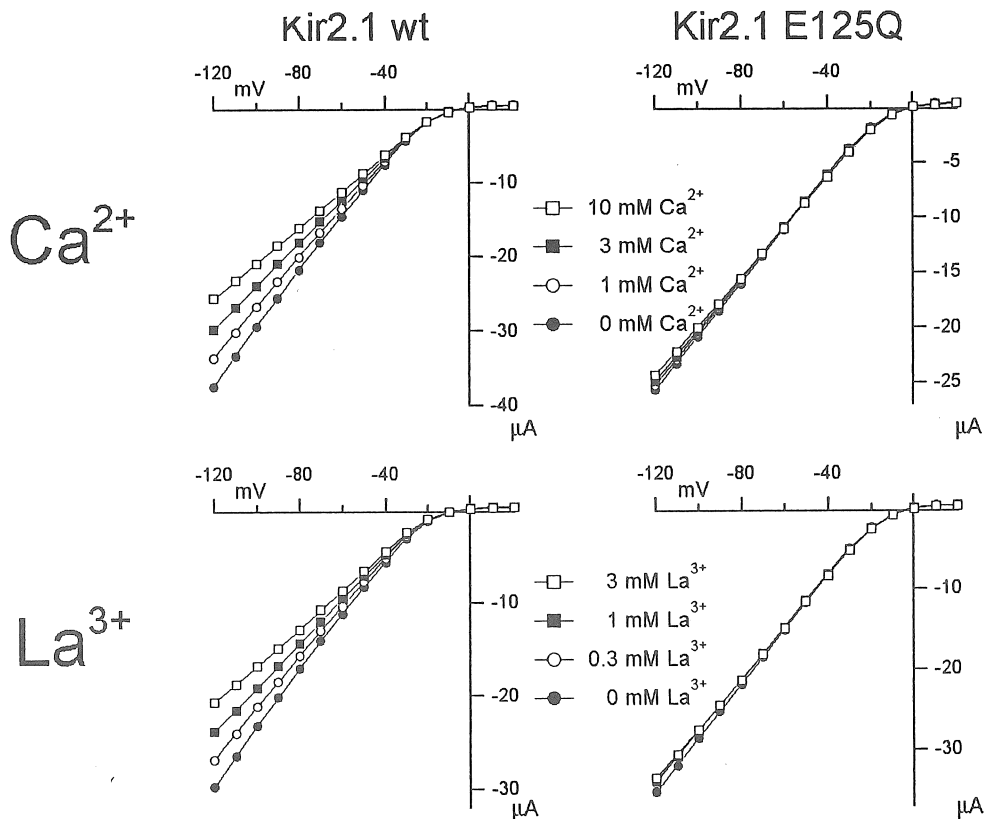


Fig. 5 Comparison of the sensitivities to the block by Ca^{2+} and La^{3+} of Kir2.1 wt and E125Q mutant.

(3) Kir2.1 と E125Q 変異体の細胞外 Ba^{2+} によるブロックに対する感受性

細胞外の Ba^{2+} は、膜電位依存性の強いブロックを示す。すなわち、その結合部位は、細胞膜上の電場の深い位置、すなわちチャネルポアの奥深くに位置する。この点で、上記の Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等によるブロックとは明確な違いを示し、E125 が結合部位であるとは考えられない。しかし、E125 が、 Ba^{2+} が深い結合部位に到達する前の中継地点として機能し

ている可能性はあると考えられる。そこで、定常状態における Ba^{2+} によるブロックに対する E125Q 変異の効果を解析した。その結果、 Ba^{2+} による膜電位依存性の強いブロックも E125Q 変異により感受性が下がること became 明らかになった (Fig. 6)。

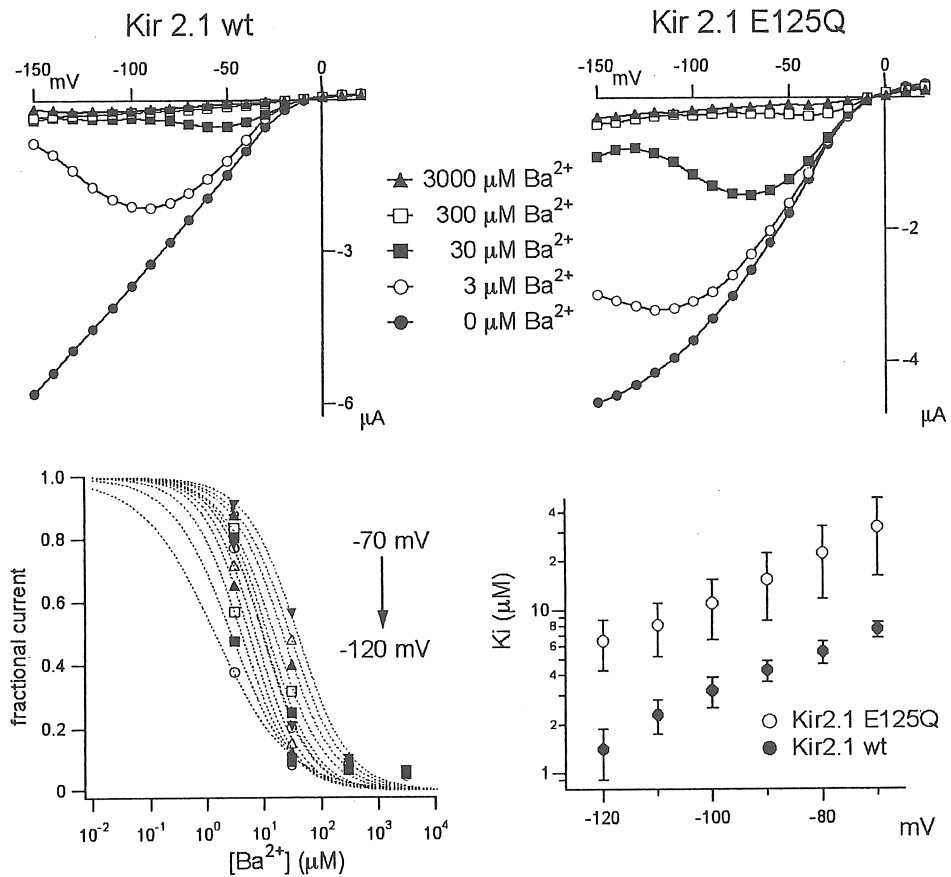


Fig. 6 Comparisons of the sensitivities to the Ba^{2+} block of Kir2.1 wt and E125Q mutant.

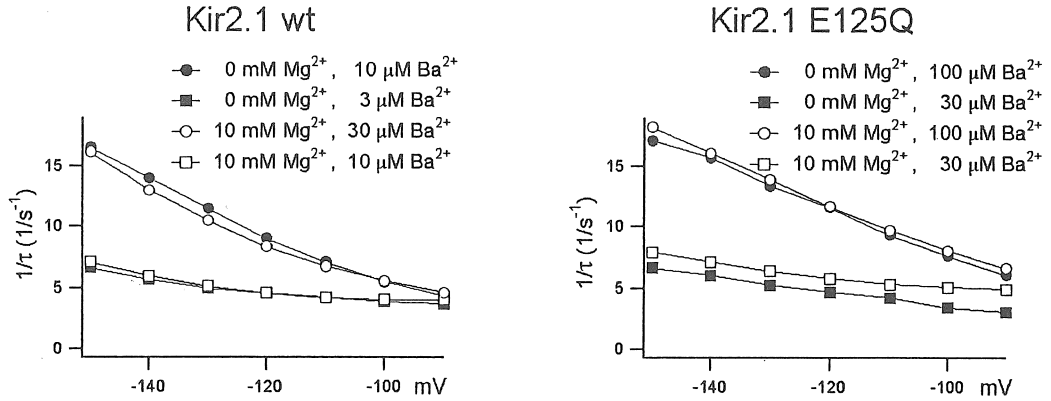


Fig. 7 Voltage - $1/\tau_{\text{block}}$ relationships of the block by Ba^{2+} in Kir2.1 wt and E125Q mutant --- effect of Mg^{2+} .

さらに、ステップパルス中における Ba^{2+} によるブロックの進行の時間定数 τ_{block} を種々の Ba^{2+} 濃度下で測定した。このデータを細胞外 Mg^{2+} 0 mM と 10 mM 下で収集し、膜電位との関係をプロットした (Fig. 7)。このデータから、各膜電位における Ba^{2+} 濃度と $1/\tau_{\text{block}}$ の関係を求め、再プロットしたのが Fig. 8 である。

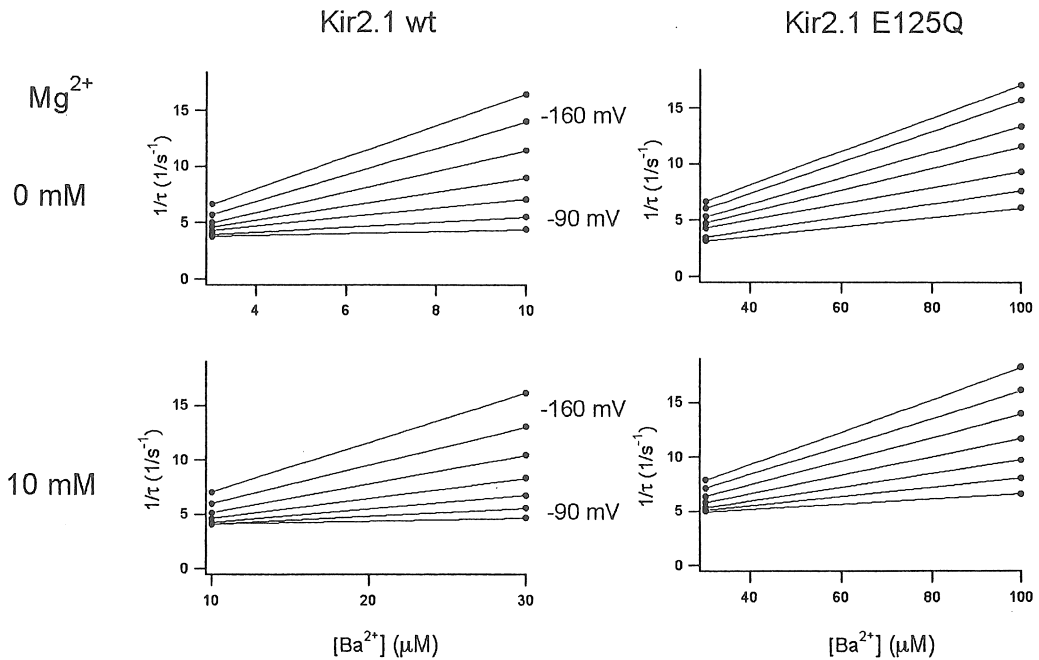


Fig. 8 $[\text{Ba}^{2+}]_o$ - $1/\tau_{\text{block}}$ relationships at various membrane potentials of the block by Ba^{2+} in Kir2.1 wt and E125Q mutant --- effect of Mg^{2+} .

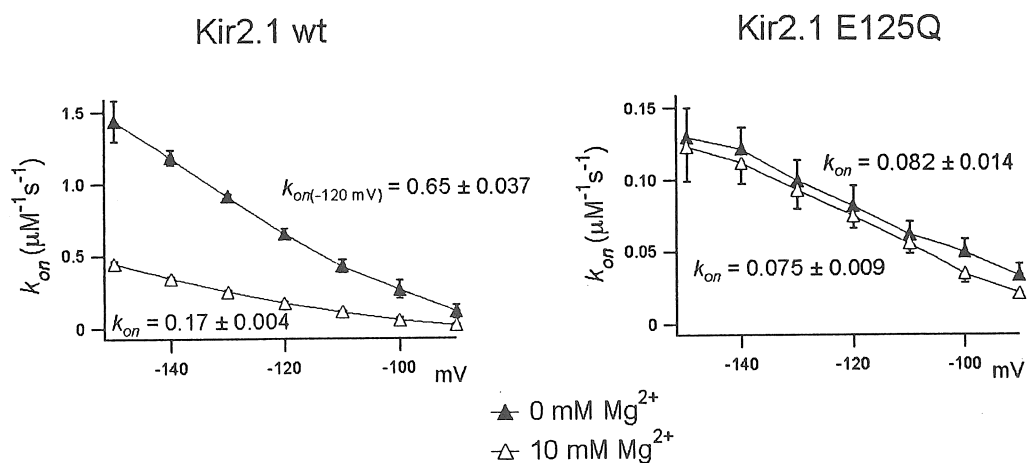


Fig. 9 Voltage - k_{on} relationships at various membrane potentials of the block by Ba^{2+} in Kir2.1 wt and E125Q mutant --- effect of Mg^{2+} .

さらにこのプロットから、 $1/\tau_{block} = k_{on} [Ba^{2+}]_o + k_{off}$ に従い、ブロックの進行する過分極電位においては k_{off} は無視できると仮定して k_{on} を算出し、各膜電位における k_{on} をプロットした (Fig. 9)。この解析の終着点である Fig. 9 を見ると、各膜電位における Ba^{2+} ブロックの k_{on} の値が Kir2.1 wt においては、細胞外 Mg^{2+} の存在により小さくなること、E125Q 変異体では、この Mg^{2+} の効果が失われることが明らかになった。

(4) Kir2.1 における細胞外 Mg^{2+} によるブロックの感受性に対する細胞外 K^+ の効果

次に、細胞外 Mg^{2+} によるブロックの感受性に、細胞外 K^+ が影響を与えるかどうかを検討した (Fig. 10)。その結果、 K^+ 濃度が低いと Mg^{2+} ブロックの K_i 値が小さくなる、すなわち、 Mg^{2+} ブロックに対する感受性が高まるということが観察された。

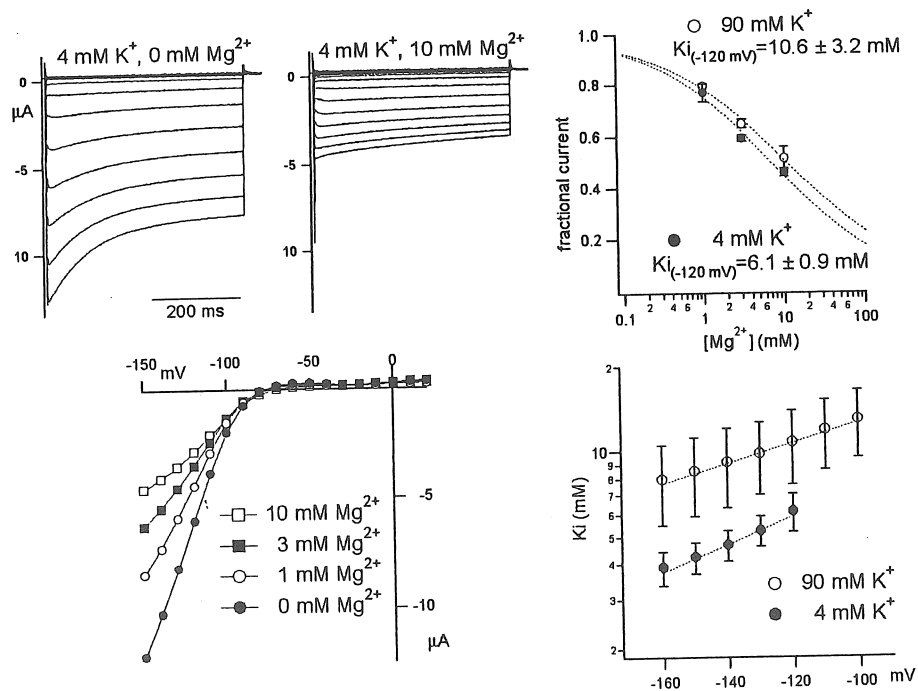


Fig. 10 Effect of K^+ to the block by Mg^{2+} .

(5) Kir 2.1 および E125Q 変異体の単一チャネルコンダクタンス、および細胞外 Mg^{2+} および Ca^{2+} の作用

次に、単一チャネルコンダクタンスに対する細胞外 Mg^{2+} や Ca^{2+} の変化を解析した (Fig. 11)。その結果、細胞外 Mg^{2+} や Ca^{2+} の濃度が上がると、Kir2.1 においては単一チャネルコンダクタンスが下がること、E125Q 変異体においてはその変化がより minor であることが明らかになった。さらに、 Mg^{2+} 非存在下における E125Q の単一チャネルコンダクタンスは Kir2.1 wt より小さかったことから、E125 は、ブロックのみならず K^+ 透過にも寄与していることが示唆された。

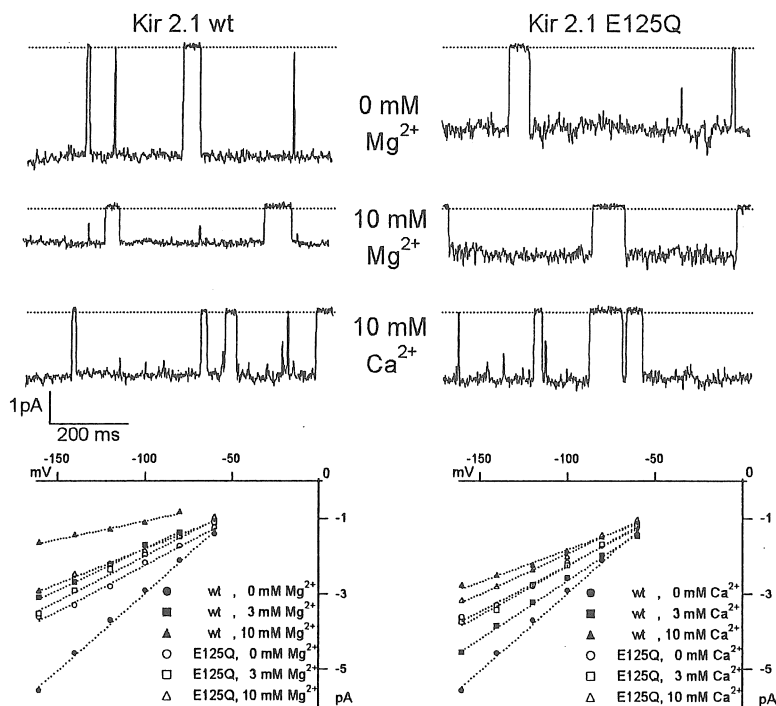


Fig. 11 Analysis of single channel properties

④ 考察

以上の結果を整理すると、下記のように要約できる。

(1) Kir2.1(E125Q)変異体の解析により以下の結果を得た。(1-a) Kir2.1(E125Q)変異体は、野生型 Kir2.1 に比べて細胞外 Ba^{2+} ブロックに対する感受性が顕著に減少していた。(1-b) Kir2.1(E125Q)変異体は、野生型 Kir2.1 に比べて細胞外 Ba^{2+} ブロックの進行速度、回復速度ともに低下していた。(1-c) 細胞外の Mg^{2+} を枯渇させた時の単一チャネルコンダクタンスは、野生型 Kir2.1 に比べて変異の導入により減少していた。

(2) 野生型 Kir2.1 において、以下の性質が示された。(2-a) 野生型 Kir2.1 において、細胞外 Mg^{2+} 濃度の増加に伴い Ba^{2+} ブロックの進行、回復が遅延することを観察した。(2-b) 野生型の Kir2.1 では、細胞外 K^+ 濃度の減少に伴い Mg^{2+} ブロックに対する感受性が増加していた。(2-c) 野生型 Kir2.1 の単一チャネルコンダクタンスは、細胞外 Mg^{2+} 濃度の増加に伴い顕著に減少したが、これらの変化は、Kir2.1(E125Q)変異体では見られなかった。

これらの結果から、Fig. 12 に図示した、以下の点が推察された。

(1) Kir2.1(E125Q)変異体において細胞外 Ba^{2+} ブロックに対する感受性が変化したことから、Kir2.1 における E125 は、shallow blocker である Mg^{2+} だけでなく、deep blocker である Ba^{2+} によるブロックに対する感受性の決定にも関与していることが示唆された。さらに、 Ba^{2+} ブロックの速度が変化したことから、E125 が局所的な Ba^{2+} 濃度、または Ba^{2+} の存在確率を

上昇させる作用を持つと考えられる。

(2) 野生型 Kir2.1 において、細胞外 Mg^{2+} 濃度の増加に伴い Ba^{2+} ブロックの速度が変化したことから、 Mg^{2+} と Ba^{2+} がこのサイトを競合していることが示唆された。

(3) E125Q 変異の導入により、細胞外 Mg^{2+} 非存在下での単一チャンネルコンダクタンスが変化したことから、E125 は Mg^{2+} 、 Ba^{2+} によるブロックのみならず、 K^+ イオンの透過にも関与することが示唆された。また、野生型の Kir2.1 において細胞外 K^+ 濃度の減少に伴い Mg^{2+} ブロックに対する感受性が変化したことから、 Mg^{2+} と K^+ がこのサイトを競合していることが示唆された。

以上のことから、Kir2.1 における E125 は、 Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 、および K^+ が競合的に作用する部位であると推察された。

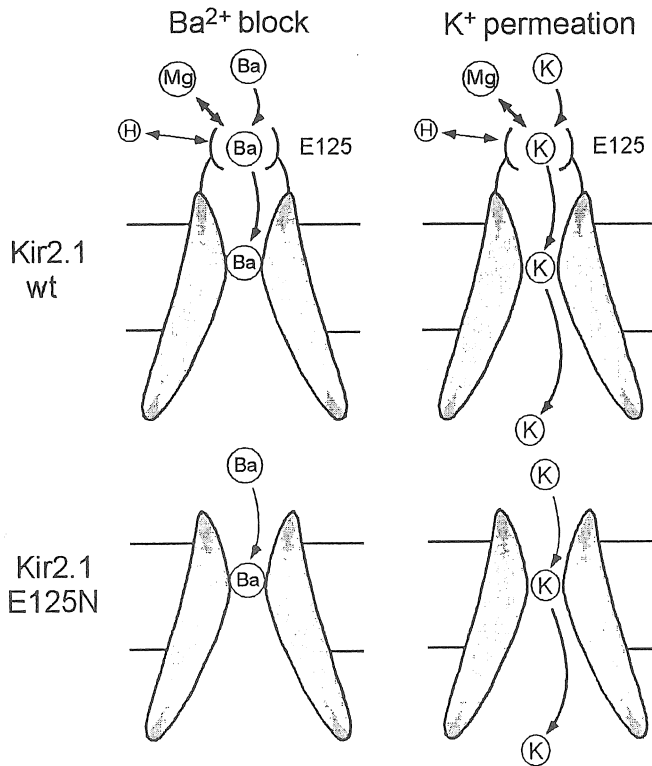


Fig. 13 Significance of E125 in the Kir2.1 channel

⑤ 文献

Murata, Y., Fujiwara, Y. and Kubo, Y. Identification of a site involved in the block by extracellular Mg^{2+} and Ba^{2+} as well as permeation of K^+ in Kir2.1 K^+ channel. *J. Physiol.* 544, 665-677 (2002)

Fujiwara, Y. and Kubo, Y. Ser165 in the second transmembrane region of the Kir2.1 channel determines its susceptibility to block by intracellular Mg^{2+} . *J. Gen. Physiol.* 120, 677-692 (2002)

Identification of a site involved in the block by extracellular Mg^{2+} and Ba^{2+} as well as permeation of K^+ in Kir2.1 K^+ channel

Yoshihiro Kubo, Yoshimichi Murata, Fujiwara Yuichiro

Department of Physiology and Cell Biology
Tokyo Medical and Dental University Graduate School and Faculty of Medicine

Summary

The inward rectifier potassium channel Kir2.1 is more sensitive to the weakly voltage-dependent block by extracellular Mg^{2+} (Mg^{2+}_o) than Kir2.2 and Kir2.3. We identified Glu125 at an extracellular loop before the pore region of Kir2.1 as a responsible site for its sensitivity to Mg^{2+}_o block, since Glu125Gln (E125Q) mutation strongly decreased the sensitivity while a mutation to Glu at corresponding sites of Kir2.2 and 2.3 increased it. The negative charge was proved to be crucial because Glu125Asp (E125D) mutant showed properties similar to the wild type (wt). The sensitivity to the block by extracellular Ba^{2+} (Ba^{2+}_o) was also decreased in E125Q mutant although the depth of the block was not changed, as reported previously. We additionally observed that the speed of Ba^{2+}_o block and recovery was decelerated by the presence of Mg^{2+}_o in wt but not in E125Q mutant. The sensitivity to the block by Mg^{2+}_o was increased by lowering extracellular K^+ (K^+_o), suggesting a competitive interaction of Mg^{2+}_o and K^+_o . The single channel conductance of wt in 140 mM K^+ was 39.6 pS (0 mM Mg^{2+}_o) and 11.5 pS (10 mM), while that of E125Q mutant was 26.0 pS (0 mM) and 19.6 pS (10 mM). These results demonstrate that Mg^{2+} competes with K^+ permeation in wt and that E125 is requisite for efficient K^+ permeation in the absence of Mg^{2+}_o . Taken together with these results, we conclude that E125 at an extracellular loop of Kir2.1 is an intermediate binding site which facilitates K^+ permeation and entry of Ba^{2+} toward a deeper plugging site, and that Mg^{2+}_o competes with K^+_o and Ba^{2+}_o at this site.