

上皮細胞の K⁺リサイクルを制御する K⁺チャネル複合体の機能解析

糟谷 豪

自治医科大学医学部生理学講座統合生理学部門

概要 小腸や肺の上皮細胞からの Cl⁻分泌は、体液の恒常性維持に重要な機能である。上皮細胞の頂端側に発現する CFTR チャネルが Cl⁻を適切に分泌するには、基底側の Na⁺/K⁺/Cl⁻共輸送体や Na⁺/K⁺ポンプが細胞内に取り込んだ K⁺を、細胞外に汲み出す“K⁺リサイクル”が必要となる。そのため、K⁺リサイクルの破綻は Cl⁻分泌障害を起し、分泌性の下痢や肺水腫、嚢胞性線維症を引き起こす。上皮細胞の基底側に発現する KCNQ1-KCNE3 複合体は、KCNQ1 と KCNE3 の 2 種類の膜タンパク質で構成される K⁺チャネルで、Cl⁻分泌を制御する K⁺リサイクルを担うことで Cl⁻分泌の制御や体液の恒常性維持に関与する。

KCNQ1 は膜電位に依存して開閉する電位依存性 K⁺チャネルで、KCNE3 はイオン透過能のない一回膜貫通型の機能調節タンパク質である (Wang, Y. et al, Gating and Regulation of KCNQ1 and KCNQ1 + KCNE1 Channel Complexes. *Front. Physiol.* 11, 1–21 (2020).)。KCNE3 は KCNQ1 の膜電位を感知する電位センサーに結合し、その位置や動きを調節することで KCNQ1 の電位依存性を失わせる。その結果、KCNQ1-KCNE3 複合体は生理条件下では常時開状態の K⁺チャネルに変化し、K⁺リサイクルを担うことが可能となる。

2020 年に、KCNQ1-KCNE3 複合体の立体構造情報が報告され、KCNQ1 の電位センサーと KCNE3 の相互作用に関与するアミノ酸領域が示唆された。しかしながら KCNQ1 と KCNE3 の相互作用がどのように電位センサーの位置を調節し、常時開状態のチャネルを形成するのかについては不明である。

そこで本研究では、立体構造上で KCNQ1 と KCNE3 の相互作用への関与が示唆されたアミノ酸を中心に変異体を作成し、電気生理解析を行った。その結果、KCNQ1 の電位センサーのうち 1 番目の膜貫通セグメント (S1 セグメント) と KCNE3 の膜貫通セグメントの間の相互作用がアミノ酸残基の側鎖の大きさをレベルで厳密に最適化されていることが明らかとなった。更に、電気生理・光生理の同時測定を用いた解析を行うことで、KCNQ1 の S1 セグメントと KCNE3 の膜貫通セグメントの相互作用は、膜電位に応じて上下に動くことでイオン透過孔の開閉に関与する KCNQ1 の 4 番目の膜貫通セグメント (S4 セグメント) の位置を中間状態に固定することでイオン透過孔を開状態に保持しており、これが生理条件下で常時開状態の K⁺チャネルを形成することを可能としていることが明らかとなった。

1. 研究目的

小腸や肺の上皮細胞からの Cl⁻分泌は、体液の恒常性維持に重要な機能である。上皮細胞の頂端側に発現する CFTR チャネルが Cl⁻を適切に分泌するには、基底側の Na⁺/K⁺/Cl⁻共輸送体や Na⁺/K⁺ポンプが細胞内に取り込んだ K⁺を、細胞外に汲み出す“K⁺リサイクル”が必要となる。そのため、K⁺リサイクルの破綻は Cl⁻分泌障害を起し、分

泌性の下痢や肺水腫、嚢胞性線維症を引き起こす。上皮細胞の基底側に発現する KCNQ1-KCNE3 複合体は、KCNQ1 と KCNE3 の 2 種類の膜タンパク質で構成される K⁺チャネルで、Cl⁻分泌を制御する K⁺リサイクルを担うことで Cl⁻分泌の制御や体液の恒常性維持に関与する⁽¹⁻⁴⁾。KCNQ1 は膜電位に依存して開閉する電位依存性 K⁺チャネルで、KCNE3 はイオン透過能のない一回膜貫通型の

機能調節タンパク質である⁽⁵⁾。KCNE3 は KCNQ1 の膜電位を感知する電位センサーに結合し、その位置や動きを調節することで KCNQ1 の電位依存性を失わせる⁽⁶⁻⁸⁾。その結果、KCNQ1-KCNE3 複合体は生理条件下では常時開状態の K⁺チャンネルに変化し、K⁺リサイクルを担うことが可能となる。2020 年に、KCNQ1-KCNE3 複合体の立体構造情報が報告され、KCNQ1 の電位センサーと KCNE3 の相互作用に関与するアミノ酸領域が示唆された⁽⁹⁾。しかしながら KCNQ1 と KCNE3 の相互作用がどのように電位センサーの位置を調節し、常時開状態のチャンネルを形成するのかについては不明である。そこで本研究では、立体構造上で KCNQ1 と KCNE3 の相互作用への関与が示唆されたアミノ酸を中心に変異体を作成し⁽⁹⁾、電気生理解析と電気生理・光生理の同時測定を用いた解析⁽¹⁰⁾を行い、KCNE3 が KCNQ1 を生理条件下では常時開状態にする仕組みの解明を目指した。

2. 研究方法

本研究では、アフリカツメガエル卵母細胞による二本差し膜電位固定法を用いた電気生理測定、および電気生理と光生理の同時測定を用いた解析を行うことで、KCNE3 が KCNQ1 の電位センサーを調節する仕組みの解明を目指した。なお、電気生理と光生理の同時測定は、KCNQ1 の電位センサーを蛍光標識し電位センサーの動きを蛍光強度変化により検出するため、K⁺電流の測定と同時に電位センサーの位置情報を決定することが可能となる⁽¹⁰⁾。具体的な研究プランとしては、最初に電気生理解析を各種変異体に対して網羅的に行い、KCNQ1 と KCNE3 の相互作用を可能とする仕組みの解明を目指した。その後、電気生理解析の結果から、KCNQ1 と KCNE3 の相互作用に特に顕著な影響を与えることが示唆されたアミノ酸残基の変異体について電気生理と光生理の同時測定を用いた解析を行うことで、KCNQ1 と KCNE3 の相互作用が KCNQ1 の膜電位を感知する電位センサーの位置や動きを修飾する仕組みの解明を目指した。

3. 研究結果

3.1 KCNQ1 の S1 セグメント上のアミノ酸残基の解析

KCNQ1-KCNE3 複合体の構造上において⁽⁹⁾、KCNQ1 の電位センサーのうち 1 番目の膜貫通セグメント(S1 セグメント)と KCNE3 の膜貫通セグメントが特に密接に相互作用していた(図 1A)。そのため、この S1 セグメントと KCNE3

の相互作用が KCNQ1-KCNE3 複合体は生理条件下で常時開状態になるために重要であると仮説を立てた。そこで、まず S1 セグメントのアミノ酸残基のうち、KCNE3 の方へ向いている 7 つのアミノ酸残基(F123, F127, F130, L134, I138, L142, I145) (図 1B)について各種変異体を作成し、KCNQ1 単独および KCNE3 の野生型と共発現のそれぞれの条件で測定を行った。測定した変異体のうち、F127 と I145 の結果について図 2A-2L に例示した。得られた電流波形(図 2A-2F, 2H-2K)から各電位における開口確率(G , コンダクタンス)を計算し、膜電位と開口確率の相関をプロットした(図 2G, 2L)。KCNE3 の KCNQ1 の機能に対する最も大きな影響の一つが、膜電位が過分極状態でもイオン透過孔を開状態に保持することであることから、結果の解釈の簡潔化のために-100 mV における開口確率($G_{-100\text{mV}}/G_{\text{max}}$)を指標として導入した。その結果、7 つのアミノ酸残基(F123, F127, F130, L134, I138, L142, I145)のうち、5 つのアミノ酸残基(F127, F130, I138, L142, I145)において、 $G_{-100\text{mV}}/G_{\text{max}}$ 値とアミノ酸残基の側鎖の大きさに相関、すなわち野生型のアミノ酸残基で最も $G_{-100\text{mV}}/G_{\text{max}}$ 値が大きくなり、変異導入したアミノ酸の側鎖の大きさが野生型のものから大きくまたは小さくなるほど $G_{-100\text{mV}}/G_{\text{max}}$ 値が小さくなるという傾向が見られた(図 2M-2S)。以上の結果から、S1 セグメントのアミノ酸残基のうち、KCNE3 の方へ向いているアミノ酸残基の側鎖の大きさは、KCNE3 依存的な KCNQ1 の機能修飾に不可欠であり、厳密に最適化されていることが示唆された。

3.2 KCNE3 の膜貫通セグメント上のアミノ酸残基の解析

次に、申請者は KCNQ1-KCNE3 複合体の構造上において⁽⁹⁾、KCNE3 の膜貫通セグメント上のアミノ酸残基のうち、KCNQ1 の S1 セグメントの方へ向いている 6 つのアミノ酸残基(S57, I61, M65, A69, G73, I76) (図 1C)について各種変異体を作成し、KCNQ1 と共発現する条件で測定を行った。その結果、3.1項の KCNQ1 の S1 セグメントの解析と同様に $G_{-100\text{mV}}/G_{\text{max}}$ 値とアミノ酸残基の側鎖の大きさに相関が見られた(図 3)。以上の結果から、KCNE3 の膜貫通セグメントのアミノ酸残基のうち、KCNQ1 の S1 セグメントの方へ向いているアミノ酸残基の側鎖の大きさは、KCNE3 依存的な KCNQ1 の機能修飾に不可欠であり、厳密に最適化されていることが示唆された。

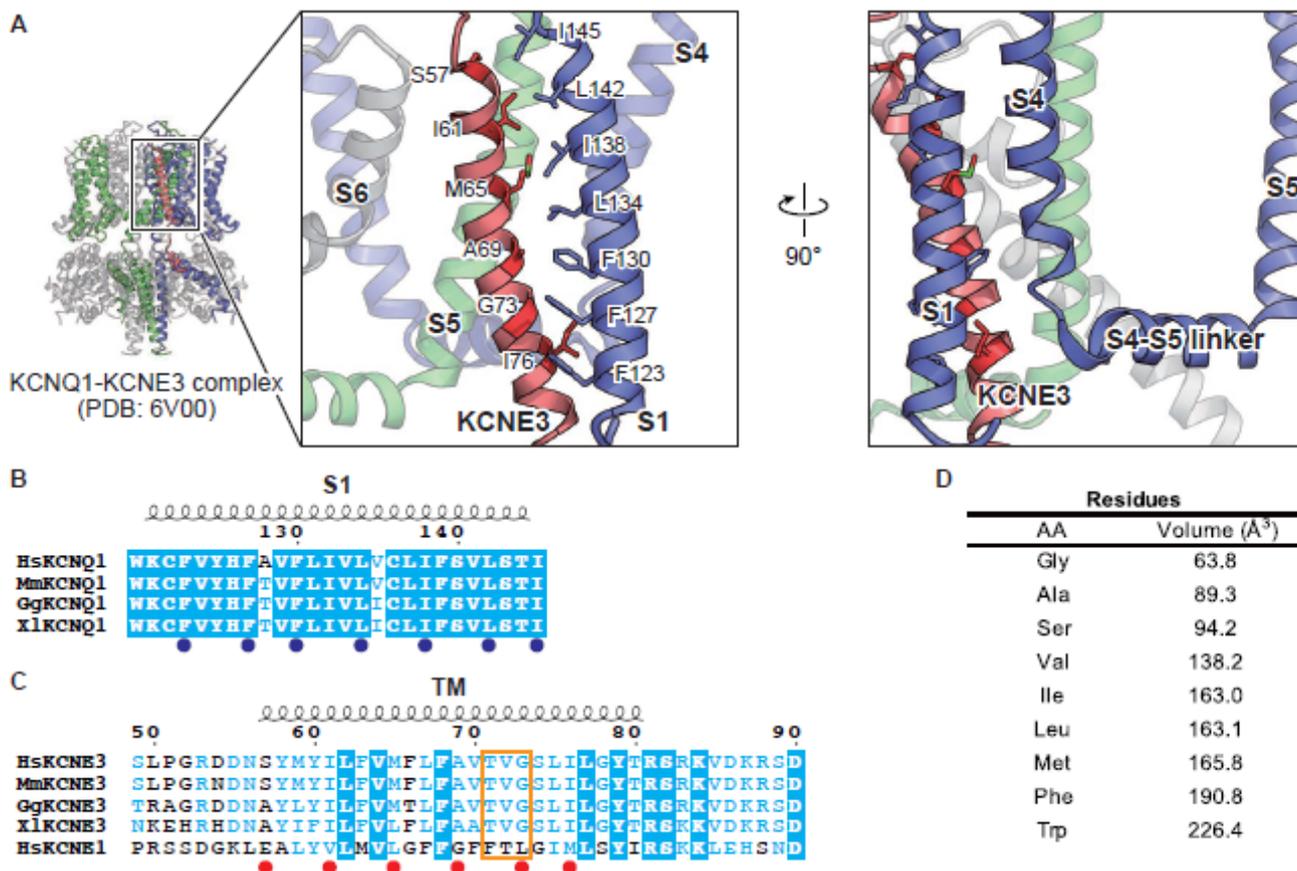


図 1 KCNQ1 と KCNE3 の相互作用に関与するアミノ酸残基

- (A) KCNQ1-KCNE3 複合体構造中の KCNQ1 と KCNE3 の相互作用部位。3 つの KCNQ1 サブユニットを青、緑、灰色で、1 つの KCNE3 サブユニットを赤色で表示している。図の作成には CueMol を使用した (<http://www.cuemol.org/>)。
- (B, C) KCNQ1 の S1 セグメント (B) と KCNE3 と KCNE1 の膜貫通セグメント (C) のアライメント。アライメントにはヒト KCNQ1 (HsKCNQ1, NCBI Accession Number: NP_000209), ネズミ KCNQ1 (MmKCNQ1, NP_032460), ニワトリ KCNQ1 (GgKCNQ1, XP_421022), カエル KCNQ1 (XlKCNQ1, XP_018111887), ヒト KCNE3 (HsKCNE3, NP_005463), ネズミ KCNE3 (MmKCNE3, NP_001177798), ニワトリ KCNE3 (GgKCNE3, XP_003640673), カエル KCNE3 (XlKCNE3, NP_001082346), ヒト KCNE1 (HsKCNE1, NP_000210) を利用した。
- (D) アミノ酸残基の大きさ。

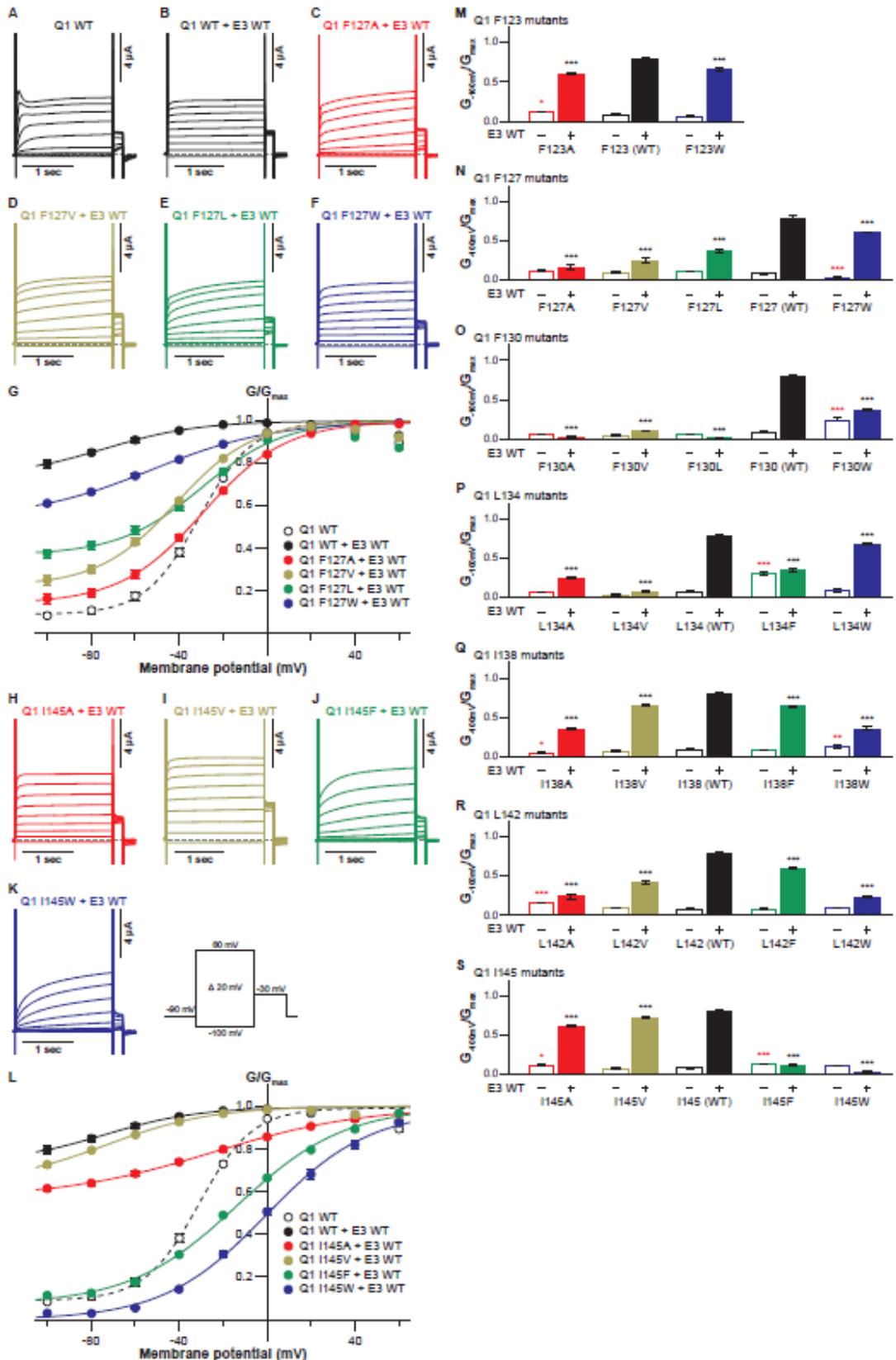


図2 KCNQ1 の S1 セグメント変異体の KCNE3 修飾能への影響

(A-G) KCNQ1 WT と KCNQ1 F127 変異体の KCNE3 WT 存在化/非存在化における電流波形 (A-F) と G-V 関係 (G)。
 (H-L) KCNQ1 I145 変異体の KCNE3 WT 存在化における電流波形 (H-K) と G-V 関係 (L)。(M-S) KCNQ1 F123 (M), F127 (N),
 F130 (O), L134 (P), I138 (Q), L142 (R), and I145 (S) 変異体の -100 mV における開口確率 (G_{-100mV}/G_{max})。

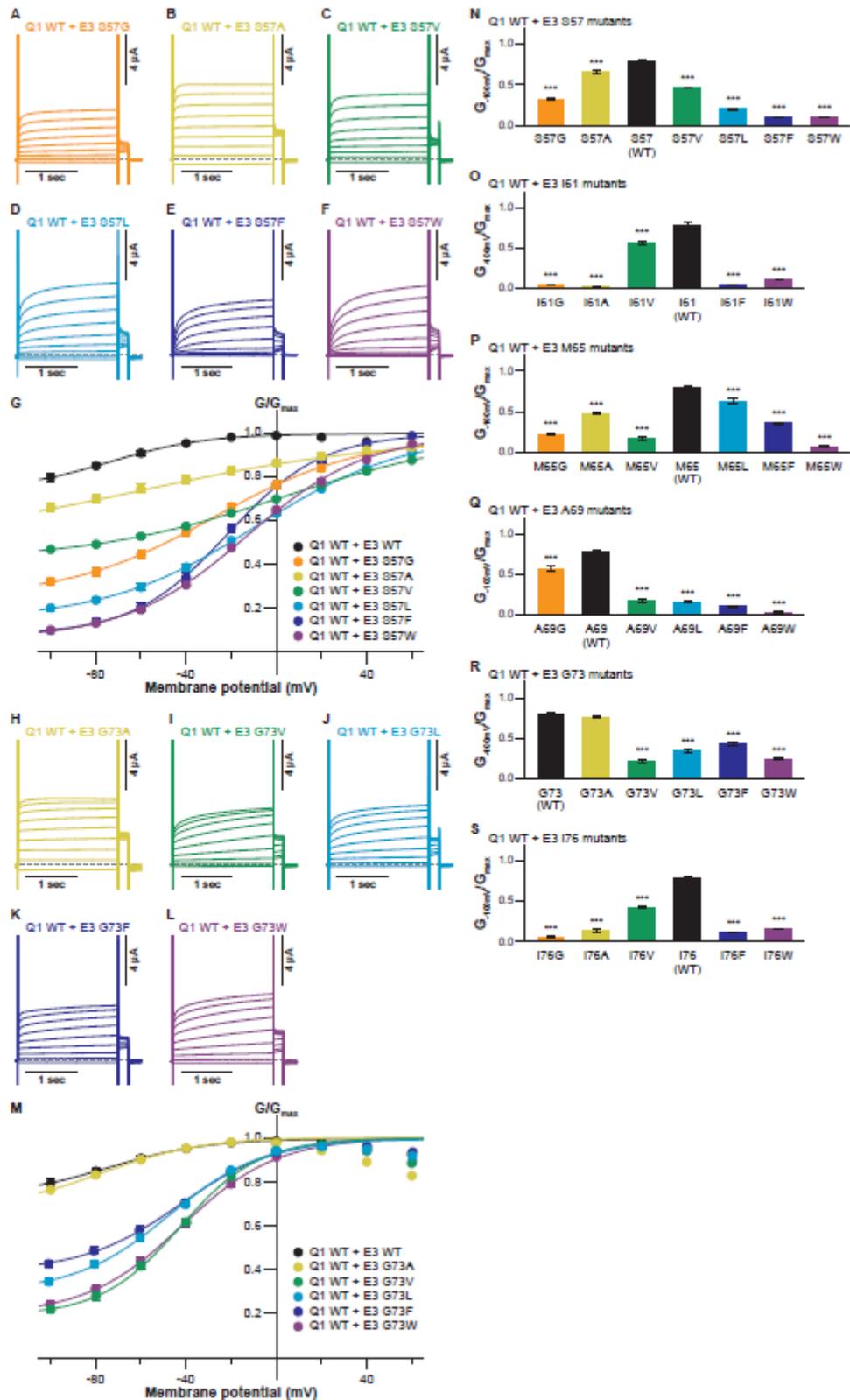


図3 KCNE3 の膜貫通セグメント変異体の KCNE3 修飾能への影響

(A-G) KCNQ1 WT と KCNE3 S57 変異体の電流波形 (A-F) と G-V 関係 (G)。

(H-M) KCNQ1 WT と KCNE3 G73 変異体の電流波形 (H-L) と G-V 関係 (M)。

(N-S) KCNQ1 WT と KCNE3 S57 変異体 (N), I61 変異体 (O), M65 変異体 (P), A69 変異体 (Q), G73 変異体 (R), I76 変異体 (S) mutants の共発現下での -100 mV における開口確率 (G_{-100mV}/G_{max})。

3. 3 S1 変異体と KCNE3 変異体の共発現による KCNQ1-KCNE3 複合体の機能回復

3. 1項と3. 2項の結果から KCNQ1 の S1 セグメントと KCNE3 の膜貫通セグメントの相互作用がアミノ酸残基の側鎖の大きさレベルで厳密に最適化されていることを踏まえ、申請者は S1 セグメントに導入した変異の結果低下した KCNQ1-KCNE3 複合体の常時開状態化能を、対となる KCNE3 の変異体で回復することができるのではと考えた。そこで、KCNQ1-KCNE3 複合体の構造上で同じ高さに位置する S1 と KCNE3 のアミノ酸の全てのペア⁽⁹⁾について、共発現し過分極時における開状態化能が回復するかを調べた。その結果、2 組のアミノ酸残基のペア (KCNQ1 F127 と KCNE3 G73, KCNQ1 I145 と KCNE3 S57) について機能回復が見られることを発見した(図 4)。例えば、KCNQ1 F127 と KCNE3 G73 は KCNQ1-KCNE3 複合体の構造上で同じ高さに位置している⁽⁹⁾。KCNQ1 F127A 変異体を KCNE3 の野生型と共発現すると KCNQ1-KCNE3 複合体の常時開状態化能は低下し、 G_{-100mV}/G_{max} 値は 0.17 ± 0.02 ($n = 10$) まで低下する(図 2C, 2G, 2N, 4F, 4G)。しかしながら、この KCNQ1 F127A 変異体を野生型の KCNE3 よりも同じ高さのアミノ酸残基 G73 の側鎖の大きさを大きくした KCNE3 G73L 変異体と共発現すると、KCNQ1-KCNE3 複合体の常時開状態化能は部分的に回復し G_{-100mV}/G_{max} 値は 0.67 ± 0.01 になる(図 4A-4G)。同様の傾向が、KCNQ1 I145F 変異体と KCNE3 S57A 変異体でも見られた(図 4H-4O)。これらの結果から、KCNQ1 の S1 セグメントと KCNE3 の膜貫通セグメントの特定の相互作用が、KCNQ1-KCNE3 複合体の常時開状態化には必要不可欠であることが示唆された。

3. 4 KCNQ1 の S1 セグメント変異体の S4 セグメントの動きに対する影響

最後に、KCNQ1 の S1 セグメントの変異や、S1 セグメントの変異の影響を低減する KCNE3 変異体との共発現が、電位を感じる膜貫通セグメントの S4 の動きにどのような影響を与えるかを調べるため、電気生理と光生理の同時測定⁽¹⁰⁾を行った。S4 セグメントの上部を蛍光試薬でラベルした KCNQ1 のコンストラクト (KCNQ1_{ver} WT とする)^(11, 12)を KCNE3 の野生型と共発現すると、過去の研究と同様に^(7, 8)、大きく過分極させた時には蛍光の増加が、大きく過分極させたときには蛍光の減少が見られた。その一方で、-100 mV から 0 mV 付近では蛍光の変化がほとんど見られなかった(図 5A, 5G)。このことから、KCNE3 と複合体を形成している時には、KCNQ1 の S4 セグメントは中間位置に保持されており、大きく過分極した際には下段位置に、大きく脱分極した際には上段位置に移動することがわかった。次に、KCNE3 の影響を低減する S1 セグメントの変異体 (F127A, I145F) について、同様に KCNE3 の野生型と共発現し蛍光変化を測定した。その結果、いずれの場合にも野生型の時と比較して-100 mV から 0 mV 付近での蛍光変化が増加した(図 5B, 5D, 5G, 5I)。このことから S1 セグメントに導入した変異は KCNQ1 の S4 セグメントを中間位置に保持することはできなくなることで、常時開状態化能を低下することが示唆された。最後に、S1 セグメントの変異体とその影響を低減する KCNE3 変異体のペア (KCNQ1_{ver} F127A-KCNE3 G73L, KCNQ1_{ver} I145F-KCNE3 S57A) を共発現し蛍光変化を測定した(図 5C, 5E, 5G, 5I)。その結果、いずれの場合にも野生型の時と比較して-100 mV から 0 mV 付近での蛍光変化が一部減少し、野生型のペア (KCNQ1_{ver} WT-KCNE3 WT) に近い傾向を示した。このことから、S1 セグメントの変異体とその影響を低減する KCNE3 変異体のペアにおいては、S4 セグメントを中間位置に保持する能力がやや回復することが示唆された。

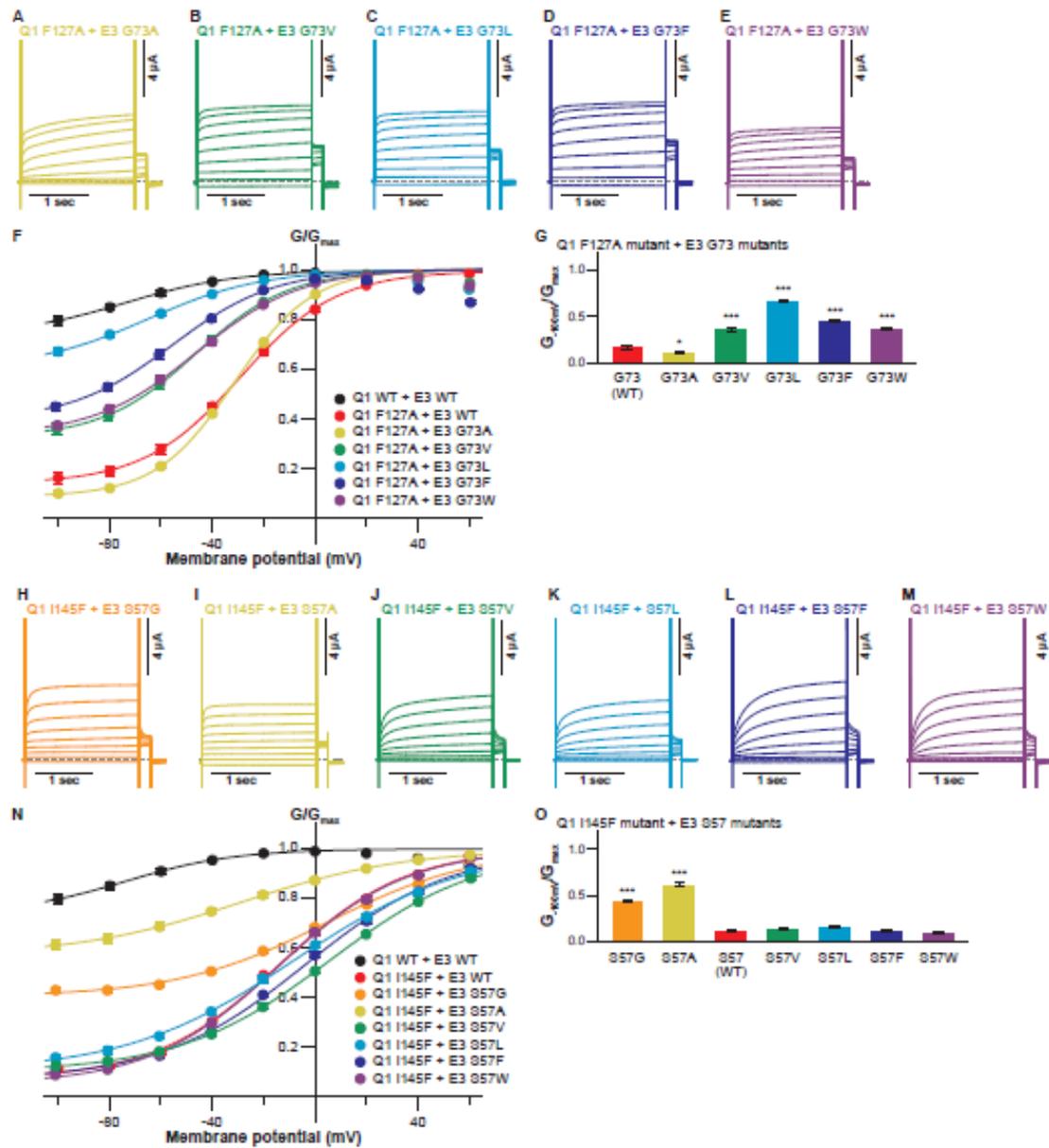


図 4 KCNQ1 変異体と KCNE3 変異体の共発現による機能回復

(A-G) KCNQ1 F127A 変異体と KCNE3 G73 変異体の共発現下の電流波形 (A-E), G-V 関係 (F), -100 mV における開口確率 (G_{-100mV}/G_{max}) (G)。

(H-O) KCNQ1 I145F 変異体と KCNE3 S57 変異体の共発現下の電流波形 (H-M), G-V 関係 (N), -100 mV における開口確率 (G_{-100mV}/G_{max}) (O)。

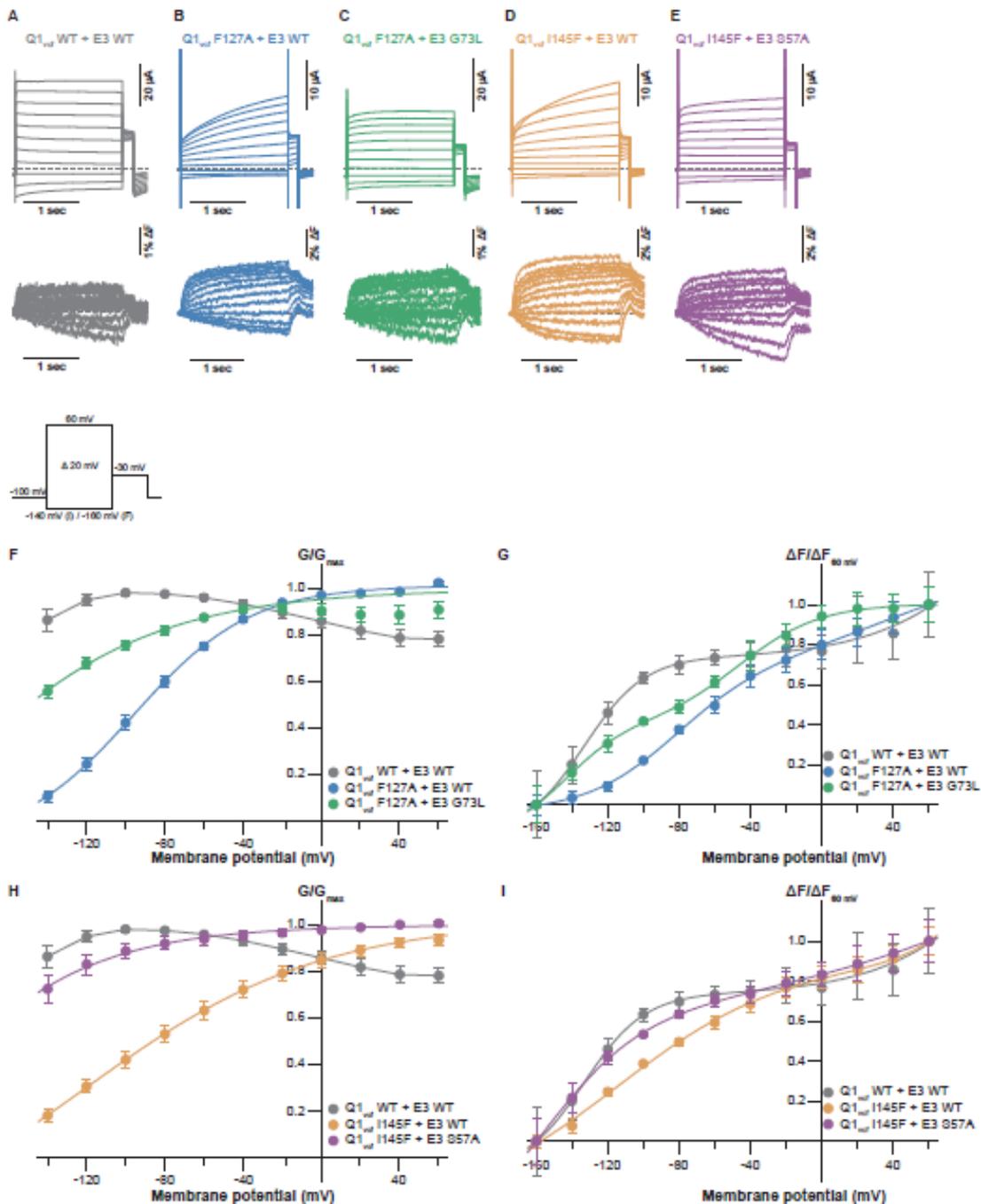


図5 KCNQ1 変異体と KCNE3 変異体の共発現下の G-V 関係と F-V 関係

(A-E) KCNQ1_{ver} WT-KCNE3 WT (A), KCNQ1_{ver} F127A-KCNE3 WT (B), KCNQ1_{ver} F127A-KCNE3 G73L (C), KCNQ1_{ver} I145F-KCNE3 WT (D), KCNQ1_{ver} I145F-KCNE3 S57A (E) の電流波形と蛍光変化。

(F-I) KCNQ1_{ver} WT-KCNE3 WT, KCNQ1_{ver} F127A-KCNE3 WT, KCNQ1_{ver} F127A-KCNE3 G73L, KCNQ1_{ver} I145F-KCNE3 WT, KCNQ1_{ver} I145F-KCNE3 S57A の G-V 関係と F-V 関係。

4. 考察

本研究では、KCNQ1-KCNE3 複合体の構造情報をもとに⁽⁹⁾、構造上で KCNQ1 と KCNE3 が相互作用するアミノ酸残基の側鎖を様々な大きさのものに変えた変異体を作成し、電気生理解析と電気生理・光生理の同時測定を用

いた解析⁽¹⁰⁾を行うことで、KCNQ1 と KCNE3 の相互作用がどのように電位センサーの位置を調節し、常時開状態のチャンネルを形成するのかを解明することを目指した。その結果、KCNQ1 の S1 セグメントと KCNE3 の膜貫通セグメントの間に形成される疎水性界面が、KCNE3 による

KCNQ1 のチャネル活性調節に重要な要素であり、静止膜電位において KCNQ1 の電位感受を担う S4 セグメントを中間位置に、イオン透過孔を開状態にそれぞれ保持することに重要であることを発見した。これまでの研究から、KCNE タンパク質ファミリーの膜貫通セグメントの中央にある 3 つのアミノ酸残基(KCNE1 では「FTL」、KCNE3 では「TVG」)が、KCNE タンパク質による KCNQ1 の機能調節に重要であることは示唆されてきた^(7, 13, 14)。今回の研究は、この 3 つのアミノ酸残基だけでなく、より広い範囲の膜貫通セグメントにあるアミノ酸残基(S57, I61, M65, A69, G73, I76)が KCNE3 と S1 セグメントの相互作用に関わっていることが示唆された。

5. 今後の課題

KCNE タンパク質ファミリーには KCNE3 に加え、KCNE1-5 まで合計で 5 つのアイソフォームが存在し、それぞれ KCNQ1 と相互作用することで KCNQ1 の電位依存性を変化することが示されている⁽¹⁵⁾。また、KCNE タンパク質ファミリーは KCNQ1 の局在や発現量に影響を与えることで、KCNQ1 が特定の器官で機能することに貢献している。このうち、今回解析を行った KCNQ1-KCNE3 複合体以外でよく研究が進められているものに、KCNQ1-KCNE1 複合体が存在する。KCNQ1-KCNE1 複合体は心臓で発現し心室筋の弛緩を担っており、その変異は不整脈の QT 延長症候群を引き起こすことが知られており、医学及び薬学的な観点からも大きく注目されている⁽¹⁾。KCNE1 は KCNQ1 に結合すると、電位依存性を大きく脱分極側にシフトし、生理条件下では開きにくい K⁺チャネルを形成する。これは、今回解析を行った KCNE3 が生理条件下では常時開状態の K⁺チャネルを形成するのとはほぼ逆の変化である。そのため、今回の研究で見つかった KCNQ1 と KCNE3 の膜貫通セグメントの間に形成される疎水性界面のような構造が、KCNQ1 と KCNE1 の間でも形成されるのか、またもし形成される場合にはどのようなメカニズムで KCNQ1 の電位依存性を大きく脱分極側にシフトすることが可能となるのか、といったことの解明が KCNE タンパク質ファミリーによる KCNQ1 の機能修飾能を理解するためには非常に重要であり、今後まず取り組むべき課題と考えている。

6. 文献

1. Abbott, G. W. KCNE1 and KCNE3: The yin and yang of voltage-gated K(+) channel regulation. *Gene* 576, 1–13 (2016).
2. Grammer, F. et al. The cardiac K⁺ channel KCNQ1 is essential for gastric acid secretion. *Gastroenterology* 120, 1363–1371 (2001).
3. Preston, P. et al. Disruption of the K⁺ channel β -subunit KCNE3 reveals an important role in intestinal and tracheal Cl⁻ transport. *J. Biol. Chem.* 285, 7165–7175 (2010).
4. Schroeder, B. C. et al. A constitutively open potassium channel formed by KCNQ1 and KCNE3. *Nature* 403, 196–199 (2000).
5. Wang, Y., Eldstrom, J. & Fedida, D. Gating and Regulation of KCNQ1 and KCNQ1 + KCNE1 Channel Complexes. *Front. Physiol.* 11, 1–21 (2020).
6. Barro-Soria, R., Perez, M. E. & Larsson, H. P. KCNE3 acts by promoting voltage sensor activation in KCNQ1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E7286–E7292 (2015).
7. Barro-Soria, R. et al. KCNE1 and KCNE3 modulate KCNQ1 channels by affecting different gating transitions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E7367–E7376 (2017).
8. Taylor, K. C. et al. Structure and physiological function of the human KCNQ1 channel voltage sensor intermediate state. *Elife* 9, 1–31 (2020).
9. Sun, J. & MacKinnon, R. Structural Basis of Human KCNQ1 Modulation and Gating. *Cell* 180, 340–347 (2020).
10. Nakajo, K. Gating modulation of the KCNQ1 channel by KCNE proteins studied by voltage-clamp fluorometry. *Biophysics and physicochemistry* 16, 121–126 (2019).
11. Osteen, J. D. et al. Allosteric gating mechanism underlies the flexible gating of KCNQ1 potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 7103–7108 (2012).
12. Osteen, J. D. et al. KCNE1 alters the voltage sensor movements necessary to open the KCNQ1 channel gate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 22710–22715 (2010).

13. Melman, Y. F., Krumerman, A. & McDonald, T. V. A single transmembrane site in the KCNE-encoded proteins controls the specificity of KvLQT1 channel gating. *J. Biol. Chem.* 277, 25187–25194 (2002).
14. Melman, Y. F., Domènech, A., De la Luna, S. & McDonald, T. V. Structural Determinants of KvLQT1 Control by the KCNE Family of Proteins. *J. Biol. Chem.* 276, 6439–6444 (2001).
15. Abbott, G. W. Kv Channel Ancillary Subunits: Where Do We Go from Here? *Physiology* 37, 225–241 (2022).

Functional Analysis of the K⁺ Channel Complex that Regulates K⁺ Recycling in Epithelia

Go Kasuya

Division of Integrative Physiology, Department of Physiology, Jichi Medical University

Summary

Cl⁻ secretion from epithelial cells in the intestine and lung is important for fluid homeostasis. For the proper Cl⁻ secretion by CFTR channels expressed on the apical side of epithelial cells, excess intracellular K⁺, which is imported by Na⁺/K⁺/Cl⁻ cotransporters and Na⁺/K⁺ pumps on the basolateral side of epithelial cells, needs to be properly exported. This process is called "K⁺ recycling". Malfunction of K⁺ recycling leads to impaired Cl⁻ secretion, resulting in secretory diarrhea, pulmonary edema, and cystic fibrosis. The KCNQ1-KCNE3 channel complex expressed on the basolateral side of epithelial cells is a K⁺ channel responsible for K⁺ recycling. The KCNQ1-KCNE3 channel complex is composed of two membrane proteins, KCNQ1 and KCNE3. KCNQ1 is a voltage-gated K⁺ channel and KCNE3 is a single transmembrane protein. KCNE3 binds to the voltage sensor domain (VSD) of KCNQ1 and modulates VSD position and movement to change KCNQ1 to a constitutive open K⁺ channel at physiological voltages. The cryo-EM structure of the KCNQ1-KCNE3-calmodulin (CaM) complex reported in 2020 revealed the amino acid residues involved in the interaction between KCNQ1 and KCNE3. However, it is unclear how the interaction between KCNQ1 and KCNE3 modulates the VSD position to form a constitutive open channel at physiological voltages.

In this study, based on the KCNQ1-KCNE3 structure, we created a series of KCNQ1 and KCNE3 mutants to investigate the functional role of the interaction between KCNQ1 and KCNE3 and conducted electrophysiological experiments using two-electrode voltage clamp (TEVC) method. The results revealed that the interaction between the first transmembrane segment (S1 segment) of KCNQ1 and the transmembrane segment of KCNE3 is optimized at the size level of the side chains of amino acid residues.

Furthermore, from the voltage-clamp fluorometry (VCF) analysis, we found that the interaction between the S1 segment of KCNQ1 and the transmembrane segment of KCNE3 keeps the position of the fourth transmembrane segment of KCNQ1 (S4 segment), which moves up and down depending on the membrane voltage change and is involved in opening and closing the ion permeability pore, in an intermediate state and thus allows the formation of a constitutive open K⁺ channel at physiological voltages.