

氏 名 (本籍)                    <sup>こん</sup>近            <sup>どう</sup>藤            <sup>しゅん</sup>俊            <sup>いち</sup>一

学 位 の 種 類                    博            士            ( 医            学 )

学 位 記 番 号                    医 博 第    1 3 8 1    号

学 位 授 与 年 月 日                平 成 9 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 条 件                学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当

研 究 科 専 攻                    東 北 大 学 大 学 院 医 学 系 研 究 科  
( 博 士 課 程 ) 外 科 学 系 専 攻

学 位 論 文 題 目                Structure of inactivation ball and the inactivation mechanisms of rat cardiac Kv1.4 expression in *Xenopus* oocytes.

(アフリカツメガエル卵母細胞に発現したラット心臓カリウムチャンネルKv1.4の不活性化ボールの構造及びその不活性化機構)

(主 査)

論 文 審 査 委 員                教 授 田 林 暁 一            教 授 渡 辺 建 彦

教 授 丸 山 芳 夫

## 論文内容要旨

哺乳動物の一過性外向型 K チャンネルである Kv1.4 の不活性化メカニズムに関してその不活性化“ボール”の局在やその構造と機能の関係について *Shaker* K チャンネルと比較検討しそれらを明らかにする事を目的に研究を行った。

本研究では、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて、一過性外向型電流型 K チャンネル Kv1.4 のアミノ末端領域（以下 N 末端）における種々の変異体を遺伝子工学的手法を用い、pBlueScript II SK plasmid vector を使用して作製した。作製した plasmid を制限酵素 EcoRI で切断し直鎖化し、T7 RNA polymerase を用いて in vitro transcription を行い mRNA を合成、その RNA をアフリカツメガエル卵母細胞に注入し 2～4 日 19℃ で培養した後、3M KCl で満たした微小ガラス電極による二電極膜電位固定法により卵母細胞を流れる電流を測定した。

Kv1.4 のアミノ末端（以下 N 末端）部分（1～185 アミノ酸）を遅延整流型 K チャンネル Kv1.2 の 1～41 アミノ酸の部分と入れ替えたキメラチャンネルを作製したところ、Kv1.4 の N 末端部分は Kv1.2 単一四量体に対して N 型不活性化を与え得ることが明らかになった。

*Shaker* K チャンネルでは、その速い不活性化は“ball and chain” model でよく説明され、広く受け入れられており、N 末端の約 20 個のアミノ酸が不活性化“ボール”として同定されており、それに続く 60 個ほどのアミノ酸が“チェーン”であろうと考えられている。そして、その不活性化“ボール”は 11 個の疎水性アミノ酸残基と、それに続く 9 個の荷電したアミノ酸残基（全体として陽性に荷電）からなっている。この不活性化“ボール”の構造をふまえて、Kv1.4 の 2-28 番目のアミノ酸を欠失させると（ $\Delta 2-28$ 、以下欠失しているアミノ酸残基を  $\Delta$  に続く番号で示す。）予想通り Kv1.4 の速い不活性化は消失した。しかし、驚くべき事に欠失部位をさらにのばした変異体（ $\Delta 2-39$ ）では、N 末端部分の不活性化“ボール”そのものか、少なくともその不可欠な構造であると考えられる部分を含んで欠失しているにも関わらず不活性化が認められた。さらに欠失部位をのばした変異体（ $\Delta 2-61$ ）では、再び不活性化が消失した。これらの結果から Kv1.4 の 40-60 のアミノ酸も不活性化“ボール”もしくはその一部として機能し得ることが示唆された。今まで、Kv1.4 では N 末端の約 40 個のアミノ酸が不活性化“ボール”と考えられていたが、この結果と *Shaker* K チャンネルにおける不活性化“ボール”の構造（疎水性アミノ酸残基—荷電したアミノ酸残基）から Kv1.4 の 40-68 のアミノ酸ももう一つの不活性化“ボール”として機能し得ると考え、40-68 のアミノ酸のみを N 末端に持つ変異体（ $\Delta 2-39$  &  $\Delta 69-162$ ）を作製したところ、速い不活性化が見られ、40-68 のアミノ酸も不活性化“ボール”として機能することが明らかとなった。

次に、不活性化“ボール”構造における陽性に荷電したアミノ酸の不活性化に対する影響を調べるため、各々の不活性化“ボール”の陽性に荷電したアミノ酸を減らした変異体 ( $\Delta 29-162$ ,  $\Delta 2-39$  &  $\Delta 61-162$ ) を作製したところ、N型不活性化において“ボール”構造の陽性に荷電したアミノ酸がその速度及び“ボール”とレセプター間の結合の安定性に関与していることが明らかとなった。また、 $\Delta 2-28$  と  $\Delta 2-39$  のから、陽性に荷電したアミノ酸を“ボール”構造のさらにN末端部分に配置するとそのN型不活性化は抑制されると考えられ、Kv1.4のN末端に26-39の陽性に荷電したアミノ酸群を加えるとやはりそのN型不活性化は抑制されることが明らかとなった。

さらに、40-68番目のアミノ酸配列を逆転させ、全体としての疎水性ならびに電荷の状態は変えずにN末端側に陽性荷電したアミノ酸、カルボキシル末端側(以下C末端)に疎水性領域が位置するようにした変異体では、N型不活性化は消失した。このことから、不活性化“ボール”の基本的な構造としてN末端側から疎水性領域-陽性電荷という構造が非常に重要であることが明らかとなった。

Kv1.4のN末端部分は *Shaker* Kチャンネルに比べ約二倍長く、“チェーン”に相当する部分には陽性荷電したアミノ酸残基の集合や陰性荷電したアミノ酸残基の集合などの特徴的な構造が見られる。各々の荷電したアミノ酸群に着目しながら“チェーン”部分の長さを変化させた変異体を作製したところ“チェーン”に相当する部分と不活性化の速さの関係は、Kv1.4では *Shaker* Kチャンネルの場合のように、“チェーン”が短くなるにつれて不活性化が速くなるといった単純な関係は当てはまらないことが明らかとなった。

## 審査結果の要旨

哺乳動物の一過性外向型 K チャンネルである Kv1.4 の不活性化に関してその不活性化“ボール”の局在やその構造と機能の関係についてアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて、Kv1.4 のアミノ末端領域（以下 N 末端）における種々の変異体を遺伝子工学的手法を用い作製し検討した。

Kv1.4 の N 末端部分（1～185 アミノ酸）を遅延整流型 K チャンネル Kv1.2 の 1～41 アミノ酸の部分と入れ替えたキメラチャンネルを作製した。Kv1.4 の N 末端部分は Kv1.2 単一四量体に対して N 型不活性化を与え得ることが明らかになった。

*Shaker* K チャンネルでは、N 末端の約 20 個のアミノ酸が不活性化“ボール”として同定されており、11 個の疎水性アミノ酸残基と、それに続く 9 個の荷電したアミノ酸残基（全体として陽性に荷電）からなっている。そこで、Kv1.4 の N 末端部分を欠失させると（ $\Delta 2-28$ ）速い不活性化は消失した。さらに欠失部位をのぼすと（ $\Delta 2-39$ ）、N 末端部分の不活性化“ボール”または、その不可欠な部分を欠失しているにも関わらず不活性化が認められた。さらに欠失範囲をのぼすと（ $\Delta 2-61$ ）、再び不活性化が消失した。これらの結果から Kv1.4 の 40-60 のアミノ酸も不活性化“ボール”として機能し得ることが示唆された。

*Shaker* K チャンネルにおける不活性化“ボール”の構造から Kv1.4 の 40-68 のアミノ酸のみを N 末端に持つ変異体（ $\Delta 2-39$  &  $\Delta 69-162$ ）を作製したところ、40-68 のアミノ酸がもう一つの不活性化“ボール”として機能することが明らかとなった。

次に、不活性化“ボール”構造における陽性に荷電したアミノ酸の不活性化に対する影響をみると、各々の不活性化“ボール”の陽性に荷電したアミノ酸を減らした変異体（ $\Delta 29-162$ 、 $\Delta 2-39$  &  $\Delta 61-162$ ）では、N 型不活性化において“ボール”構造の陽性に荷電したアミノ酸を減らすとその速度が遅くなり、“ボール”とそのレセプター間の結合の安定性を減弱することが明らかとなった。また、 $\Delta 2-28$  と  $\Delta 2-39$  から、陽性に荷電したアミノ酸を“ボール”構造のさらに N 末端部分に配置するとその N 型不活性化は抑制されると考えられ、Kv1.4 の N 末端に 26-39 の陽性荷電したアミノ酸群を加えるとその N 型不活性化は抑制されることが明らかとなった。

さらに、40-68 番目のアミノ酸配列を逆転させ、疎水性ならびに電荷の状態は変えずに N 末端側に陽性荷電したアミノ酸群、カルボキシル末端側に疎水性領域が位置するようにした変異体では、速い不活性化は消失した。

本論文は、Kv1.4 の N 末端は N 型不活性化に深く関与し、そこには不活性化“ボール”として機能し得る部分が二つ存在すること、不活性化“ボール”基本的な構造として疎水性領域-陽性電荷という構造が非常に重要であることを明らかにしたものであり、学位論文として価値あるものと判断する。