入江　克雅　(Katsumasa Irie)

E-mail：kirie@cespi.nagoya-u.ac.jp

研究テーマ：膜電位感受性ナトリウムチャネルの構造解析

神経情報伝達において神経細胞内での情報の伝達は膜電位の脱分極によって行われる。膜電位は様々なイオンチャネルによって調節されるが、その中でも膜電位感受性ナトリウムチャネルは膜電位の速やかな脱分極をになう重要な膜蛋白質であり、変異による活性変化は様々な遺伝的疾患を引き起こす原因となる。よってこれらのチャネルの分子メカニズムを明らかにすることは神経情報伝達を分子レベルで理解するために非常に重要である。

高等生物のナトリウムチャネルは複雑で巨大な膜たんぱく質であり構造解析が困難な試料であるが、原核生物由来膜電位感受性ナトリウムチャネル（NaChBac）はホモ四量体構造で対称性が高く、精製試料の大量調整が可能であることから構造解析に適した試料である。

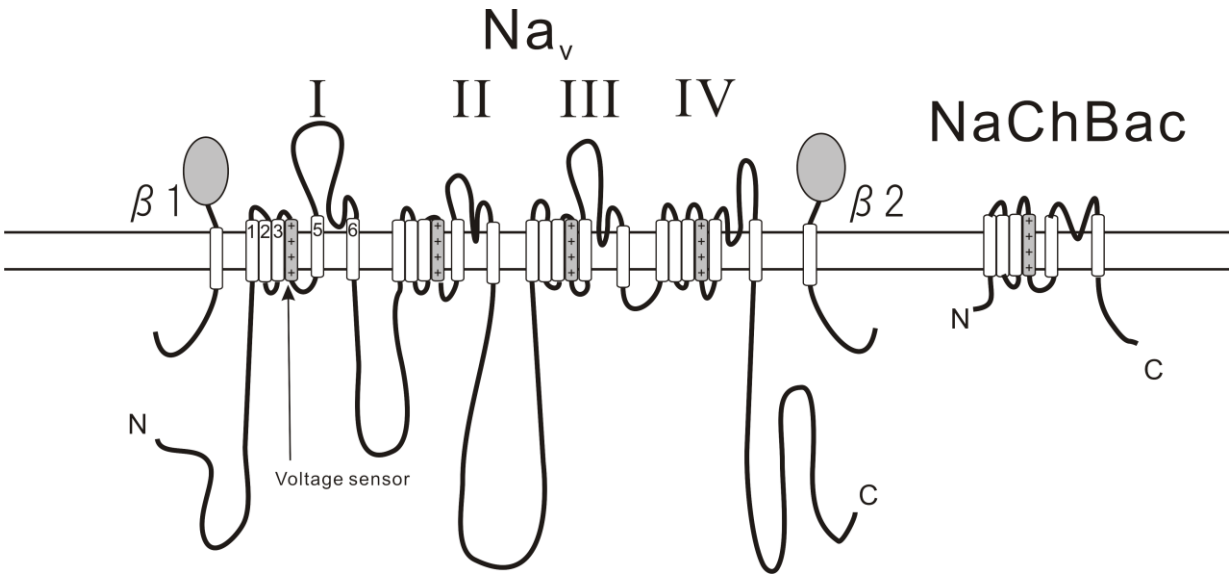

図１．高等生物由来 Nav と NaChBac の模式図

高等生物の Nav のチャネルドメインは相同な配列が 4 回繰り返された 3000 残基を超える巨大な一本のポリペプチド鎖からなり、さらに機能調節のための複数の補助サブユニットをもつ。一方で NaChBac は 300 残基ほどのポリペプチド鎖がホモ四量体を形成することでチャネルとして機能する。

我々は様々な細菌由来の NaChBac の電気生理実験を行い、それぞれが高い一次配列の相同性を持ちながら宿主細菌の育成環境に応じたチャネル活性を有していることを見出した（Irie *et al. J Biol.*

Chem., 2010）。以上のことから、結晶構造解析と電気生理学的手法を用いて NaChBac ホモログを機能解析することで、膜電位感受性ナトリウムチャネルが共通して持つイオン選択性や活性制御の分子機構の解明を目指して研究を進めている。

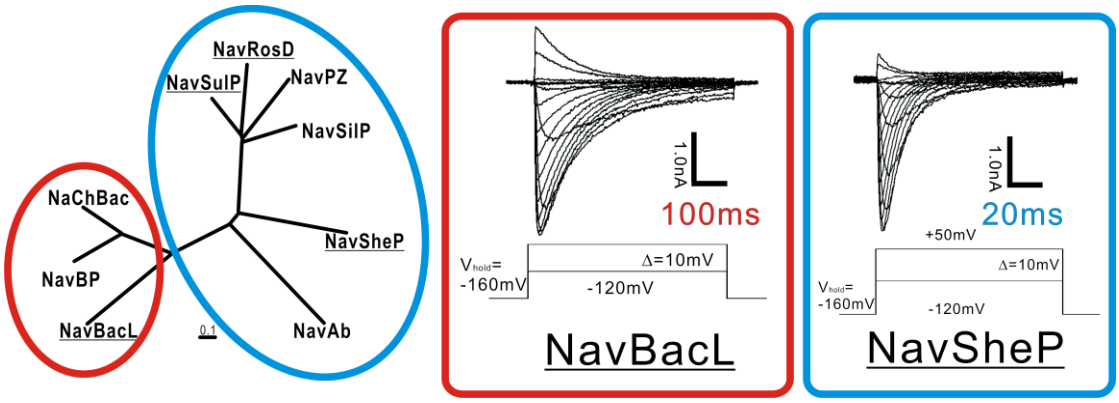

図２．活性が確認された NaChBac の系統樹と活性の比較

赤枠および青枠はそれぞれ土壌性細菌および海洋性細菌からクローニングされた NaChBac のホモログ。海洋性細菌由来の NaChBac（NavSheP）は海水からの過剰なナトリウムイオンの流入を防ぐために早い不活性化を示す。

活性制御機構については、*Sulfitobacter pontiacus* 由来のホモログである NavSulP の細胞内 C 末端領域が不活性化を促進することを電気生理実験で明らかにした。さらに、NavSulP の C 末端領域を融合したキメラチャネルの構造解析から、C 末端領域は 4-helix bundle を形成することを示し、bundle 形成にかかわる残基の変異体は不活性化速度が遅くなることを示した。

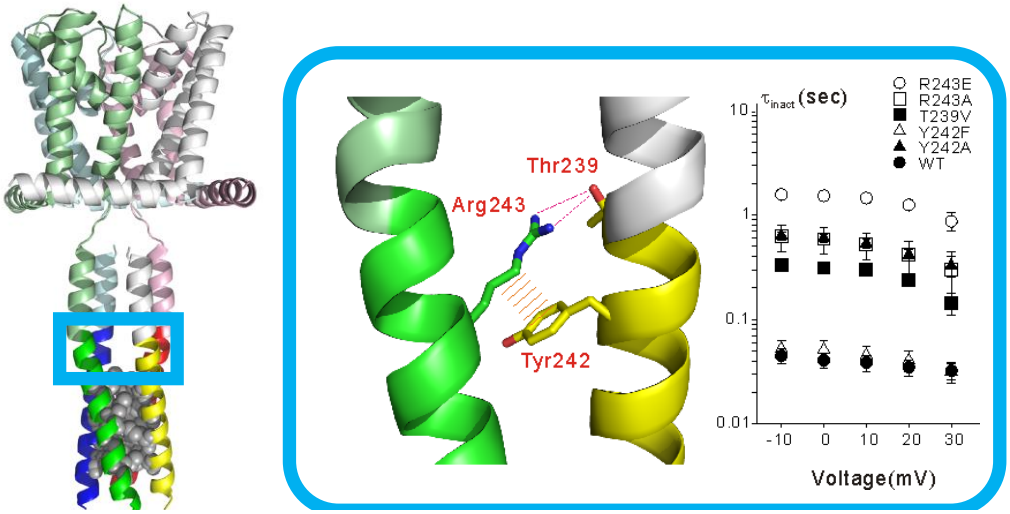

図３．NavSulP の C 末端領域のキメラチャネルの構造

NavSulP の C 末端領域（濃い色の部分）を構造が安定な NaK チャネル（淡い色の部分）の C 末端に繋げることで 3.2 Å 分解能で立体構造を決定した。青枠が 4-helix bundle 形成に重要な相互作用部位の拡大図。この相互作用に関わる残基の変異 4-helix bundle が不安定化し不活性化速度が遅くなる（Irie *et al. Nat Commun.*, 2012）。

さらに、チャネルポアを形成するヘリックスの剛直性を増す変異体は不活性化速度が遅くなることから、細胞内 C 末端領域のバンドル構造よる不活性化促進の分子機構を提示した。

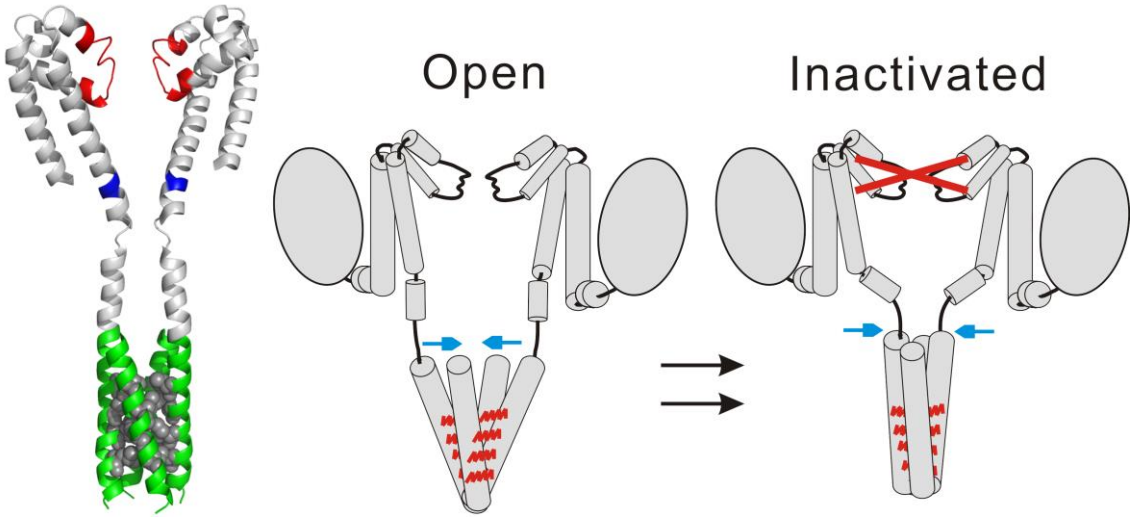

図 4．NavSulP の C 末端領域と NavAb チャネルポアドメインの重ね合わせ図と C 末端バンドル構造による不活性化促進のモデル図

NaChBac のポアドメインには保存性の高いグリシン残基（左図・青）が存在し、この残基のアラニン残基への変異によるヘリックス構造の安定化は不活性化速度を遅くする。

このことから、チャネルが開くことによりバンドル構造も開き、バンドルの再形成に伴いポアドメインのヘリックスが構造変化することで、チャネルの不活性化を促進する。

（Irie *et al*. *Nat Commun*., 2012）

この NavSulP にみられる C 末端 4-helix bundle のチャネル不活性化への影響は、カリウムチャネルのものとは反対の効果であり NaChBac もカリウムチャネルもともにホモ四量体構造であるが不活性化に至るメカニズムはそれぞれ異なることが示唆された。

現在もナトリウムイオンのイオン選択性機構はいまだ明らかになっておらず、NaChBac の構造解析を通じてナトリウムイオン選択性の分子機構の解明を目指している。

Publication list (Researcher ID: D-7332-2013)

1. "The C-terminal helical bundle of the tetrameric prokaryotic sodium channel accelerates the inactivation rate."
   Irie K, Shimomura T, Fujiyoshi Y
   Nat. Commun. **3**:793, 2012

2. "Arrangement and mobility of the voltage sensor domain in prokaryotic voltage-gated sodium channels."
   Shimomura T, Irie K, Nagura H, Imai T, Fujiyoshi Y.
   ***J. Biol. Chem.* 286**:7409-7417, 2011

3. "Evidence for lateral mobility o voltage sensors in prokaryotic voltage-gated sodium channels."
   Nagura H, Irie K, Imai T, Shimomura T, Hige T, Fujiyoshi Y
   ***Biochem. Biophys. Res. Commun*. 399**:341-346, 2010

4. "Comparative study of the gating motif and C-type inactivation in prokaryotic voltage-gated sodium channels."
   Irie K, Kitagawa K, Nagura H, Imai T, Shimomura T, Fujiyoshi Y
   ***J. Biol. Chem.* 285**:3685-3694, 2010

5. "Crystal structure of the Homer 1 family conserved region reveals the interaction between the EVH1 domain and own proline-rich motif."
   Irie K, Nakatsu T, Mitsuoka K, Miyazawa A, Sobue K, Hiroaki Y, Doi T, Fujiyoshi Y, Kato H
   ***J. Mol. Biol*. 318**:1117-1126, 2002