

# G 蛋白質によるカリウム・チャネルの開閉調節

## The Regulation of K<sup>+</sup> Channel Activity by G Proteins

(研究プロジェクト番号 : JSPS-RFTF 96L00302)

プロジェクトリーダー

倉智 嘉久 大阪大学大学院医学系研究科・教授

コアメンバー

堀尾 嘉幸 大阪大学大学院医学系研究科・助教授 (H8.04.01~H11.09.30)

山田 充彦 大阪大学大学院医学系研究科・助手 (H8.04.01~H10.03.31)

磯本正二郎 大阪大学大学院医学系研究科・助手 (H8.04.01~H9.03.31)

稲野辺 厚 大阪大学大学院医学系研究科・助手 (H9.04.01~H13.03.31)

種本 雅之 大阪大学大学院医学系研究科・助手 (H10.04.01~H13.03.31)

石井 優 大阪大学大学院医学系研究科・助手 (H12.04.01~H13.03.31)



### 1. 研究目的

三量体 G 蛋白質を介したシグナル伝達は、多くのホルモンや神経伝達物質による細胞機能制御の最も重要な機構である。イオンチャネルは G 蛋白質による制御の標的蛋白質の一つであり、G 蛋白質制御カリウムチャネル(K<sub>G</sub>)は神経・心筋・内分泌細胞において、それぞれ種々のリガンドによる抑制性シナプス後電位の形成、心臓徐脈、分泌抑制を担っている。

本研究プロジェクトの目的は、G 蛋白質制御カリウムチャネル(K<sub>G</sub>)の開閉調節とその生理的機能を(1)細胞内の局在制御と(2)チャネル活性制御、という2つの視点から明らかにすることである。

### 2. 研究成果概要

#### 2.1 K<sub>G</sub> の細胞内局在制御

甲状腺刺激ホルモン(TSH)産生細胞は、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン(TRH)刺激によりTSHを分泌する。この作用はドーパミン、ソマトスタチン等でK<sub>G</sub>の活性化を介して抑制される。K<sub>G</sub>はKir3.xのヘテロあるいはホモ4量体である。我々はラット下垂体におけるKir3.xの局在を免疫組織学的解析した。その結果、1) TSH産生細胞においては、Kir3.1とKir3.4が分泌顆粒上に局在しており、細胞膜上には殆ど存在しない。2) 分泌顆粒上のKir3.1とKir3.4はTRH刺激によりエキソサイトーシスで細胞膜へ移行する。3) TRH無刺激時では単離TSH産生細胞からドーパミンやソマトスタチン依存性のK<sub>G</sub>電流活性は殆ど測定できないが、TRH投与により、細胞膜の膜容量の著明な増加を伴ったK<sub>G</sub>活性の増加が

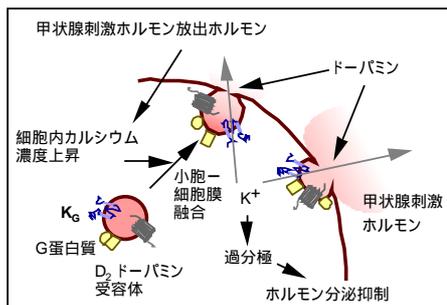


図 1. TSH 産生細胞での K<sub>G</sub> の動き

起こる。これらの知見から、分泌刺激によって起こるエキソサイトーシスにより分泌顆粒上のK<sub>G</sub>が細胞膜にリクルートされ、ドーパミンやソマトスタチンによる分泌抑制が有効に起こりうるようになるという機構が明らかとなった。これはホルモン分泌の全く新しいネガティブフィードバック調節機構である(図1)。さらに一部の神経終末においても分泌顆粒上にK<sub>G</sub>が局在していることを我々は見出し、神経伝達物質の放出に伴ってK<sub>G</sub>が神経終末膜上へと移行するシステムも存在することが推定される。

黒質 - 線条体間の神経連関は運動調節機構の中心的役割を果たしている。Kir3.2の突然変異を有する $w^v$ マウスでは黒質ドーパミン神経細胞が選択的に消失し、振戦、痙攣、運動失調等の異常が起こる。我々は黒質ドーパミン神経細胞の生理活動に重要なチャネルであるKir3.2の解析を行った。その結果、1) 黒質ドーパミン細胞中でKir3.2は2つのスプライシング変異体(Kir3.2a, Kir3.2c)の複合体として存在すること、2) Kir3.2は樹状突起シナプス後膜に局在すること(図2)、3) チャネルの局在はKir3.2cのC末端と細胞膜裏打ち蛋白質の一つであるPDZドメインを有する蛋白質との相互作用に拠ると推定されること、4) 2つの変異体のヘテロ多量体は機能チャネルを構成するが、Kir3.2c単独では機能しないこと等が明らかとなった。これらより1) 神経型K<sub>G</sub>はKir3.1とKir3.2のヘテロ複合体であると考えられていたが、神経型K<sub>G</sub>チャネルのサブ

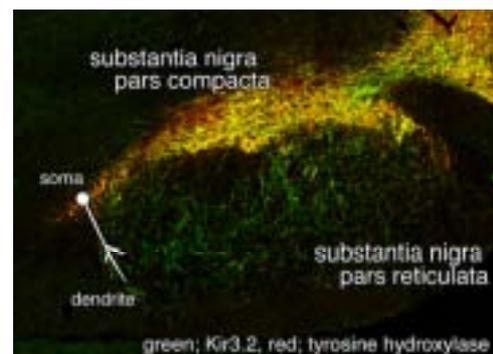


図 2. 黒質ドーパミン神経樹状突起上の K<sub>G</sub>

ユニット構成は多様であることが判った。2) 黒質ドーパミン神経の抑制性シナプス後膜電位を形成する Kir3.2-K<sub>G</sub> は Kir3.2a はチャネル活性、Kir3.2c はチャネル局在化という機能を分担していると推定された。

異所性発現系において Kir3.2c は細胞膜に輸送されるにも関わらず、G 蛋白質刺激に対して全く反応しない。我々は、Kir3.2c が PDZ 蛋白質に結合することに着目し、PDZ 蛋白質共存下での Kir3.2c チャネルに対する受容体刺激を検討し、Kir3.2c は PDZ 蛋白質共存下では G 蛋白質により活性化されることを見出した。この PDZ 蛋白質の Kir3.2c に対する作用には両者の直接結合と、PDZ 蛋白質の C 末端側に存在するグアニル酸シクラーゼ様の構造(GK ドメイン)が必須であった。この知見は、PDZ 蛋白質がチャネル分子の局在を規定するだけでなく、チャネル活性も修飾することを初めて示すものである(図 3)。

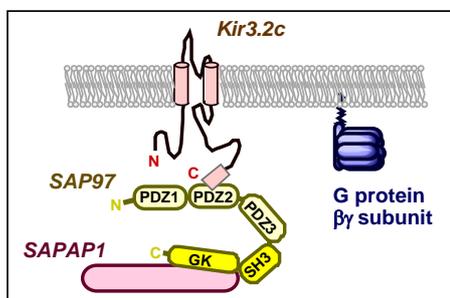


図 3. Kir3.2c-K<sub>G</sub> と PDZ 蛋白質の結合様式

## 2.2 チャネルの活性制御

K<sub>G</sub> 電流は過分極パルス中に緩徐な時間経過で増加する。これは relaxation と呼ばれ、K<sub>G</sub> の特徴的な電位依存性の特性である。我々は RGS 蛋白質 (Regulators of G protein signaling; GTPase 活性を促進しシグナルを負に調節) が K<sub>G</sub> の relaxation の形成に必須の分子であることを見出した。我々はさらに心房筋細胞を用いて、(1)細胞外 Ca<sup>2+</sup>イオン除去及び細胞内 BAPTA 投与で K<sub>G</sub> の relaxation が消失する、(2)カルモデュリン (CaM) の阻害剤及び CaM と結合するが GTPase 活性を促進しない RGS 蛋白質変異体も relaxation を抑制することを明らかにした。以上より、脱分極により細胞膜直下の Ca<sup>2+</sup>イオンが増加し、Ca<sup>2+</sup>/CaM 複合体が何らかの機構で RGS の機能を促進し活性型 G 蛋白質量を減少させ、K<sub>G</sub> の活性が抑制される。過分極では逆に Ca<sup>2+</sup>イオン濃度が低下し、K<sub>G</sub> が徐々に活性化されると解釈された。すなわち、K<sub>G</sub> の relaxation は、膜電位が Ca<sup>2+</sup>/CaM による RGS 蛋白質の制御を介して G 蛋白質サイクルを調節している過程であると考えられた。これにより膜興奮が G 蛋白質を介する細胞内シグナル伝達を制御するという全く新しい細胞機能調節系が明らかになった(図 4)。

その後の検討により、リン脂質 PIP<sub>3</sub> が RGS 蛋白質の機能を抑制すること、この抑制は Ca<sup>2+</sup>/CaM が RGS 蛋白質に直接結合することで解除されることを見出し、この過程が

relaxation 形成に生理的に働いていることを明確にした。この知見は、リン脂質 - 蛋白質相互作用が K<sub>G</sub> の生理的な制御に重要な働きをしていることを示すものである。

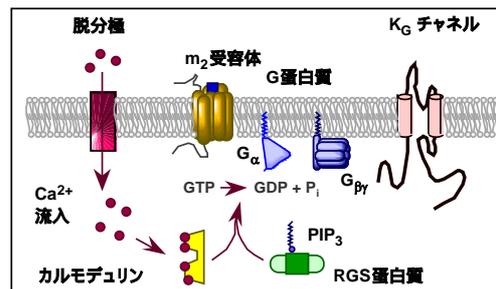


図 4. 膜電位依存性の G 蛋白質サイクル調節機構

## 3. 結論

G 蛋白質制御カリウムチャネルの生理的機能発現機構に関して、1)K<sub>G</sub> の分子多様性と位置制御に注目し、Kir3.1/3.4 の細胞内分泌顆粒への分布とその意義、PDZ ドメインを持ったアンカー蛋白質による K<sub>G</sub> の Kir3.2 サブタイプ特異的な位置およびチャネル活性の制御を明らかにした。2)G 蛋白質αサブユニットの GTP 水解活性を促進する RGS 蛋白質による K<sub>G</sub> のゲート機構の生理的修飾作用を明らかにし、細胞膜電位が G 蛋白質サイクルの重要な制御因子であることを示した。

## 主な発表論文

- 1) Morishige, K-I., Inanobe, A., Yoshimoto, Y., Kurachi, H., Murata, Y., Tokunaga, Y., Maeda, T., Maruyama, Y., and Kurachi, Y. Secretagogue-induced exocytosis recruits G protein-gated K<sup>+</sup> channels to plasma membrane in endocrine cells. *J. Biol. Chem.*, 274, 7969-7974, 1999.
- 2) Hibino, H., Inanobe, A., Tanemoto, M., Fujita, A., Doi, K., Kubo, T., Hata, Y., Takai, Y., and Kurachi, Y. Anchoring proteins confer G protein sensitivity to an inward-rectifier K<sup>+</sup> channel through the GK domain. *EMBO J.*, 19, 78-83, 2000.
- 3) Inanobe, A., Yoshimoto, Y., Horio, Y., Morishige, K., Hibino, H., Matsumoto, S., Tokunaga, Y., Maeda, T., Hata, Y., Takai, Y., and Kurachi, Y. Characterization of G-protein-gated K<sup>+</sup> channels composed of Kir3.2 subunits in dopaminergic neurons of the substantia nigra. *J. Neurosci.*, 19 (3), 1006-1017, 1999.
- 4) Fujita, S., Inanobe, A., Chachin, M., Aizawa, Y., and Kurachi, Y. A regulator of G protein signalling (RGS) protein confers agonist-dependent relaxation gating to a G protein-gated K<sup>+</sup> channel. *J. Physiol.*, 526.2, 341-347, 2000.
- 5) Inanobe, A., Fujita, S., Makino, Y., Matsushita, K., Ishii, M., Chachin, M., and Kurachi, Y. Interaction between the RGS domain of RGS4 with G protein a subunits mediates the voltage-dependent relaxation of the G protein-gated potassium channel. *J. Physiol.*, 535.1, 133-143, 2001.
- 6) Ishii, M., Inanobe, A., Fujita, S., Makino, Y., Hosoya, Y., and Kurachi, Y. Ca<sup>2+</sup> elevation evoked by membrane depolarization regulates G protein cycle via RGS proteins in heart. *Circ. Res.*, 89, 1045-1050, 2001.
- 7) Ishii, M., Inanobe, A., and Kurachi, Y. PIP<sub>3</sub> inhibition of RGS protein and its reversal by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin mediate voltage-dependent control of G protein cycle in a cardiac K<sup>+</sup> channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002 (in press).