

氏 名 北沢 和寛

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1775 号

学位授与の日付 平成27年3月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻  
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 The stoichiometry and function of the Kv4 channel complex  
vary depending on the relative expression level of each  
subunit

論文審査委員 主 査 教授 富永 真琴  
教授 久保 義弘  
教授 鍋倉 淳一  
教授 老木 成稔 福井大学

論文内容の要旨  
Summary of thesis contents

Function of membrane proteins such as ion channels is often regulated by the accessory subunits. Therefore, the stoichiometry change can give rise to the wide variety of the biophysical properties of the complex and thus affect the cell excitability. Kv4, a member of voltage-gated K<sup>+</sup> channel family, is expressed in neurons and ventricular myocytes, and regulates the cell excitability. It is known that the function of Kv4 changes with various subunits in physiological condition. K<sup>+</sup> channel interacting protein (KChIP) and dipeptidyl aminopeptidase-like protein (DPP) are well-known auxiliary subunits for Kv4. KChIP increases the current amplitude of Kv4, decelerates the inactivation and accelerates the recovery from inactivation of Kv4. DPP is known to increase the current amplitude of Kv4 and accelerate the inactivation and the recovery from inactivation of Kv4.

The stoichiometries of Kv4/KChIP and Kv4/DPP complex have been partially revealed by the crystal structure analysis. However, it remains unknown whether the stoichiometries of Kv4/KChIP and Kv4/DPP complexes are fixed or variable. For DPP, even the number of DPPs binding to one Kv4 channel has not yet been determined. In this thesis, I addressed these questions using two methods; two-electrode voltage clamp (TEVC) and subunit counting by single-molecule imaging.

To examine how the expression level of KChIP affects the biophysical properties of Kv4, I expressed human Kv4.2 and rat KChIP4 in *Xenopus* oocytes with different ratios and analyzed the currents under two-electrode voltage clamp. The recovery from inactivation of Kv4.2 was accelerated with the increase in the amount of co-expressed KChIP4. This raised the possibility that the binding number of KChIP4 could affect the properties of Kv4.2. To examine the effect of the number of KChIP4 on the biophysical properties of Kv4.2, I made two tandem repeat constructs (KChIP4-Kv4.2, KChIP4-Kv4.2-Kv4.2) in which the stoichiometry was strictly controlled. I expressed these constructs in *Xenopus* oocytes and analyzed the currents. Because Kv4.2 is a tetramer, KChIP4-Kv4.2 was expected to form a 4:4 channel (Kv4.2:KChIP4). Similarly, KChIP4-Kv4.2-Kv4.2 was expected to form a 4:2 channel. The 4:4 channel showed faster recovery from inactivation than the 4:2 channel, suggesting that the number of bound KChIP4 affects the biophysical property of Kv4.2. To directly examine whether the stoichiometry of Kv4.2/KChIP4 complex actually changes or not, the number of bound KChIP4 to a single Kv4.2 channel was evaluated using the subunit counting method by single-molecule imaging of monomeric enhanced GFP (mEGFP) fused to KChIP4. The number of bound KChIP4 was increased with the increase in the co-expressed KChIP4, indicating that the

(別紙様式 2)  
(Separate Form 2)

stoichiometry of Kv4.2/KChIP4 complex is not fixed but changes depending on the relative expression level of each subunit.

Next, I analyzed the stoichiometry of Kv4.2/DPP10 complex. As in the case of Kv4.2/KChIP4 complex, to examine whether the expression level of DPP10 can change the biophysical properties of Kv4.2 or not, I injected human Kv4.2 and human DPP10 cRNA with different ratios and controlled the expression level of each subunit in *Xenopus* oocytes. The biophysical properties of Kv4.2 such as time-to-peak or the recovery from inactivation changed depending on the co-expression level of DPP10. Because the previous crystal structure analysis showed that DPP6 forms a dimer on the plasma membrane, I first analyzed the stoichiometry of DPP10 alone expressed in *Xenopus* oocytes. Approximately 70% of DPP10 on the membrane existed as dimers, whereas the rest existed as monomers. To determine the stoichiometry of Kv4.2/DPP10 complex, Kv4.2 and DPP10 were co-expressed with different ratios (100:1, 10:1, 1:1) and the stoichiometry was estimated using the subunit counting method. To confirm the co-assembly of Kv4.2 and DPP10, monomeric Cherry (mCherry) and mEGFP were tagged to Kv4.2 and DPP10, respectively. In the subunit counting experiments, two bleaching steps were mainly observed in all three ratios, suggesting that the stoichiometry of Kv4.2/DPP10 complex is flexible, but has a tendency to form the 4:2 channel complex.

Taken together, I conclude that the stoichiometry of Kv4.2/KChIP4 complex changes with no preferred stoichiometry while that of Kv4.2/DPP10 complex has a clear preference to 4:2, and that the stoichiometry of both Kv4.2/KChIP4 and Kv4.2/DPP10 complex changes depending on the relative expression level. As the stoichiometry difference affects the biophysical properties of Kv4.2, the stoichiometry change of the Kv4.2 complex is thought to have a significant impact on the physiological function such as cardiac excitability.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

本論文は、電位作動性 Kv4 チャンネル複合体の量体数比（ストイキオメトリー）が、複合体を構成するサブユニットの相対的発現量に依存して変化することを明らかにしたものである。

イオンチャネル等の膜機能タンパク質は、副サブユニットと複合体を形成することで機能が大きく変化する。各サブユニットの結合のストイキオメトリーが膜機能タンパク質複合体の性質を変化させ、細胞の興奮性に影響を及ぼしうる。K<sup>+</sup> channel interacting protein (KChIP) や dipeptidyl aminopeptidase-like protein (DPP) は Kv4 の副サブユニットで、KChIP は Kv4 の電流を大きくし、不活性化を遅くし、不活性化からの回復を速くすることが知られている。また、DPP は Kv4 の電流を大きくし、不活性化を促進し、不活性化からの回復を速くすることが知られている。これまで、Kv4/KChIP 複合体のストイキオメトリーに関しては、結晶構造解析によって 4:4 (Kv4:KChIP) で複合体を形成することが明らかにされたが、4:4 以外のストイキオメトリーが存在するのかわについては不明であった。また、Kv4/DPP 複合体に関しては、複合体の結晶構造が明らかでないことから、ストイキオメトリーは不明であった。そこで、北沢和寛君は *Xenopus* 卵母細胞を用いた二電極膜電位固定法と一分子蛍光イメージング法を用いて、Kv4/KChIP 及び Kv4/DPP 複合体のストイキオメトリーと機能を明らかにすることを目的として実験した。

北沢君はまず、Kv4.2 と KChIP4 を相対的な発現量を変えて *Xenopus* 卵母細胞に発現させ、KChIP4 の発現量の違いが Kv4.2 の性質に与える影響を検討した。Kv4.2 の不活性化からの回復が KChIP4 の発現量依存的に速くなることが明らかとなり、Kv4.2 に結合する KChIP4 の数によって Kv4.2 の性質が調節される可能性が示唆された。そこで、Kv4.2/KChIP4 複合体のストイキオメトリーを 4:4 及び 4:2 に固定するコンストラクトを作成して両イオンチャネルの電気生理学的性質を解析した結果、4:4 チャンネルの不活性化からの回復が 4:2 チャンネルのものに比べて速いことが明らかとなった。Kv4.2/KChIP4 複合体のストイキオメトリー変化を直接観察する目的で、mEGFP を KChIP4 に付加し、Kv4.2 と共発現させて一分子蛍光イメージング法によってサブユニット数の測定を行ったところ、KChIP4 の共発現量が増えるに従って一つの Kv4.2 に結合する KChIP4 の数が増加した。この結果から、Kv4.2/KChIP4 複合体のストイキオメトリーは各サブユニットの相対的な発現量に依存して変化することがわかった。

北沢君は続いて、Kv4.2/DPP10 複合体のストイキオメトリー変化について検討した。Kv4.2 と DPP10 の相対的発現量を変化させ、Kv4.2 の電気生理学的性質を比較した結果、活性化までにかかる時間と不活性化からの回復速度が DPP10 の発現量依存的に変化することが明らかとなった。結晶構造解析から DPP6 の細胞外ドメインが二量体を形成することが明らかとなっていたため、まず、DPP10 に mEGFP を付加し、DPP10 の細胞膜上でのストイキオメトリーを検討した。細胞膜上に存在する DPP10 は約 70% が二量体で存在し、残りの 30% は単量体で存在することがわかった。Kv4.2/DPP10 複合体のストイキオメトリーを決定するために、Kv4.2 に mCherry を、DPP10 に mEGFP を付加した。各サブユニットの発現量比を

(別紙様式 3)  
(Separate Form 3)

100:1、10:1、1:1 (Kv4.2-mCherry:DPP10-mEGFP) と変化させてサブユニット数の計測を行った結果、DPP10の発現量に依存したストイキオメトリー変化が観察された。また、100:1、10:1、1:1のいずれの場合においても4:2 (Kv4.2:DPP10) チャンネルを形成しやすいことが明らかとなった。

これらの結果から、Kv4.2/KChIP4 及び Kv4.2/DPP10 複合体のいずれにおいても各サブユニットの発現量依存的なストイキオメトリー変化が起きること、Kv4.2/KChIP4 複合体においては KChIP4 が独立に Kv4.2 の結合サイトに結合する一方で、Kv4.2/DPP10 複合体においては 4:2 (Kv4.2:DPP10) チャンネルを形成しやすいことが明らかとなった。また、ストイキオメトリーの違いが、Kv4.2 の性質に影響を与えることから、ストイキオメトリー変化が細胞興奮性の調節に関わっている可能性が考えられる。

以上のように、本研究は、二電極膜電位固定法と一分子蛍光イメージング法を用いて電位作動性 Kv4 チャンネル複合体の量体数比 (ストイキオメトリー) がサブユニット発現量依存的にダイナミックに変化することを明らかにした非常に優れた研究であり、今後の当該分野の発展に資するものと考えられる。従って、本論文は学位論文として十分な内容を有しているものと審査委員会において全会一致で判定された。