

令和元年6月24日現在

機関番号：33811

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07035

研究課題名(和文)新規光感受性イオンチャネルの創製による細胞機能の光制御

研究課題名(英文)Creating light-activated ion channels for regulating cell functions by light

研究代表者

平野 美奈子(Hirano, Minako)

光産業創成大学院大学・光産業創成研究科・講師

研究者番号：80585167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、イオン環境が鍵となる生命現象の基盤の解明のために、非侵襲な光で活性が制御される光感受性イオンチャネルを創製し、細胞機能を操作する系を確立することを目的とした。様々な長さのK⁺チャネル(KcsA)に、光感受性ドメインまたは様々な長さの光感受性蛋白質を付加した変異体の遺伝子ライブラリーを約100種類作製した。これらをK⁺輸送欠損酵母を用いて光刺激の有無で増殖能が異なる変異体をスクリーニングし、最終的に青色光照射下で増殖能が高い、つまりK⁺輸送能が高い変異体が6種類得られた。また、細胞の活性の光制御のため、作製した変異体をHEK細胞に導入し、パッチクランプ法で活性を測定する系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりカリウムチャネルの活性化機構を明らかにし、それを基盤に青色光感受性イオンチャネルの候補となる変異体を数種作製することができた。今後これらをさらに改変することにより、細胞内のイオン環境を光で制御することが可能になるであろう。光感受性イオンチャネルを用いれば組織や細胞にダメージを与えることなく細胞機能を制御できるので、様々な生命現象の基盤の解明や疾患の原因解明が進展することが期待でき、さらには疾患の治療法の開発にも貢献するであろう。

研究成果の概要(英文)：Here, we created chimera mutants which showed light sensitivity. We made about 100 chimera mutants in which a photosensitive domain or various lengths of a photosensitive protein were fused to various lengths of KcsA channel. Using K⁺ transport deficient yeast, chimera mutants that differ in growth with or without light stimulation were selected and finally six mutants which grew well under blue light, that is, which had a high K⁺ transport ability were obtained. Moreover, to establish a system for controlling cell functions by light using the chimera mutants, we introduced one of the chimera mutants into HEK cells and measure ionic currents by patch clamping method.

研究分野：生物物理学

キーワード：イオンチャネル 光感受性

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くの生体分子が複雑に関連し、時々刻々と変化する生命現象を理解するには、変化の起点からの分子の動的変化を経時的に追う必要がある。そのため、近年、非侵襲的な光刺激によって活性が制御される蛋白質を用いて、生命現象を制御する方法が開発されている。チャネルロドプシン2は、藻類から発見された膜蛋白質で、非侵襲的な光刺激で陽イオン(主に Na^+)の透過が制御される膜蛋白質である。神経細胞は陽イオンである Na^+ の細胞内への流入により興奮が引き起こされるため、チャネルロドプシン2は神経細胞の興奮を操作するツールとして近年急速に広まった。しかしながら、光刺激により細胞内から細胞外へ K^+ を流出させ、神経細胞の興奮を抑制させるツールについては未だ開発途上である。また、様々な細胞種で生命現象の制御にかかわっている Ca^{2+} を光刺激によって調節する蛋白質も最適なものは作られていない。チャネルロドプシン2を改変して特定のイオンの選択性を上げる試みはされているが、構造機能相関がほとんど明らかになっていないため、ランダムに変異を入れるという方法が主である。

本研究では、高い選択性とイオン透過率を有するイオンチャネルに光感受性を持たせることを計画している。申請者はこれまでに、 K^+ チャネル(KcsAチャネル)の構造機能相関の研究を行い、KcsAチャネルの細胞内領域が刺激感知と開閉制御に重要な部位であり、KcsAチャネルの細胞内領域を他の K^+ チャネルの膜貫通領域に付加したキメラ変異体は、KcsAチャネルと同様の刺激感受性を示すことを明らかにした(Hirano M et al., Biophys. J., 101(9), 2157-2162 (2011)、Hirano M et al., J.Biol.Chem., 285(6), 3777-3783 (2010))。また、他のグループは、KcsAチャネルの膜貫通領域にcAMP依存性チャネルの細胞内領域を付加すると、cAMP依存的に開閉することを報告した(Ohndorf UM and MacKinnon R, J.Mol.Biol., 350, 857-865 (2005))。これらのことから、KcsAチャネルの細胞内領域を変えれば、新たな刺激感受性をもつ K^+ チャネルを創製できることが示唆された。

そこで、本研究では、KcsAチャネルの細胞内領域を光感受性蛋白質に置換し、KcsAチャネルに光感受性を付加することを目指した。光感受性蛋白質としてフォトロピンと光活性化アデニル酸シクラーゼ(PAC)を用い、これらの構造変化を利用してKcsAチャネルの開閉を制御する。これらの蛋白質は光刺激によって構造が変化することが知られている(Christie JM, Mol.Plant. 5(3), 533-544 (2012))。さらに、光感受性 K^+ チャネルを改変し、光感受性 Ca^{2+} チャネルを作製する。申請者は最近、KcsAチャネルの選択性フィルターへの数個の変異により、 Ca^{2+} 透過性への改変に成功した(右図、第52回日本生物物理学会で発表)。よって、光感受性 K^+ チャネルから光感受性 Ca^{2+} チャネルへの改変は、これらの変異の導入によって達成できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、イオン環境が鍵となる生命現象の基盤の解明のために、非侵襲的な光で活性が制御される光感受性イオンチャネルを創製し、細胞機能を光で操作する系を確立することを目的とした。

上記の目的のため、以下を達成することを目標とした。

- (1) 光感受性イオンチャネルの構成要素となるKcsAチャネルの活性制御機構を明らかにする。
- (2) KcsAチャネルと光感受性蛋白質を融合し、光感受性イオンチャネルを創製する。
- (3) 作製した光感受性チャネルで細胞内のイオン環境を制御する系を確立する。

3. 研究の方法

(1) 変異体の作製

KcsAチャネルの遺伝子を大腸菌用の発現ベクターでありヒスチジンタグを含むpQE30に導入し、QuikChange site-directed mutagenesis kit(アジレント・テクノロジー(株))を用いて点変異を導入した。キメラ変異体チャネルは、KcsAチャネルと光感受性蛋白質(光活性化アデニル酸シクラーゼ(PAC))またはドメイン(LOVドメイン)を遺伝子操作により様々な長さで融合して作製された。それらを、酵母用の発現ベクターであるpYES2ベクターまたは大腸菌用の発現ベクターであるpQE30ベクター、哺乳細胞用の発現ベクターであるpEBベクターに導入した。

(2) K^+ 輸送欠損酵母を用いた活性の評価

作製したコンストラクトを K^+ 輸送欠損酵母BY4844株に導入し、BY4844株のウラシル要求性を利用して遺伝子が導入された酵母を得た。得られた酵母を培養し、ガラクトースを用いて変異体の発現を誘導した。4時間の発現誘導後、低濃度のKClを含むプレート2枚に希釈した培養液をスポット状に滴下し、1枚は暗所で、もう1枚は青色光照射下で30、2-3日間培養した。酵母の増殖を確認し、 K^+ の透過能を評価した。

(3) KcsAまたはキメラチャネル変異体の精製

KcsAまたはキメラチャネル変異体遺伝子を大腸菌に形質転換し、IPTGによって変異体の発現を誘導した。発現した大腸菌を回収し、膜画分を界面活性剤n-decyl- β -D-maltosideで可溶化後、TALON affinity column(タカラバイオ(株))で変異体を単離・精製した。

(4) 脂質平面膜法によるチャネル活性評価

精製した KcsA または変異体をリポソームに再構成後、電気生理学的手法(脂質平面膜法)で透過するイオンを電流として測定し、活性を評価した。

(5) HEK 細胞でのキメラチャネル変異体の発現と活性測定

HEK 細胞にリポフェクション法を用いてキメラチャネル変異体の遺伝子を導入し、パッチクランプ法によりチャネル活性を測定した。

4. 研究成果

(1) KcsA チャネルの活性制御機構の解明

キメラチャネル変異体の構成要素の一つである KcsA チャネルの構造機能相関を調べ、KcsA チャネルの細胞内領域の構造状態が不活性化に大きな影響を与えていることがわかった。KcsA チャネルの細胞内領域のアミノ酸置換により、数個のアミノ酸の荷電状態を変化させることで構造状態を改変した変異体を作製した。それらの活性を測定した結果、細胞内領域が膜方向へ大きく構造変化した変異体は不活性化が起こらないことがわかった。このことから、KcsA チャネルの細胞内領域の状態を光で変化させればチャネルの開・閉状態を光で制御できることが示唆された。

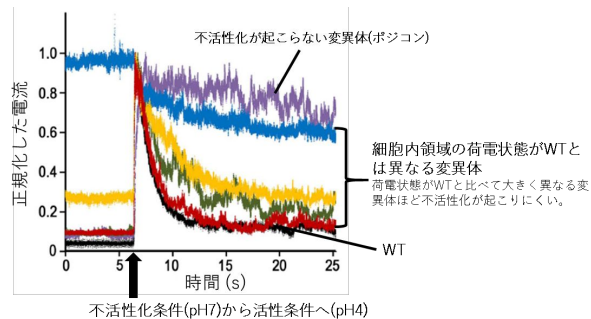


図1. KcsA チャネルの細胞内領域の不活性化への影響
細胞内領域の荷電状態が異なるいくつかの変異体の不活性化過程。細胞内領域の荷電状態がWTと異なる変異体ほど不活性化が起こりにくくなった。

(2) キメラチャネルライブラリーからの光感受性 K⁺チャネルのスクリーニング

KcsA チャネルの構造機能相関を踏まえ、KcsA チャネルと光感受性ドメイン(LOV)または光感受性蛋白質(PAC)のキメラチャネルライブラリーを作製した。ライブラリーは、様々な長さの KcsA チャネルの N 末端または C 末端に、LOV ドメインまたは様々な長さの PAC 蛋白質を付加した約 70 種類の変異体のコンストラクトであった。

キメラチャネルライブラリーから、K⁺輸送欠損酵母を用いて光感受性 K⁺チャネルの候補となるコンストラクトを選び出した。K⁺輸送欠損酵母は、主な K⁺輸送に関わる蛋白質が欠損しているため、低濃度の K⁺の環境下では生存することができない。K⁺輸送欠損酵母に作製した約 70 種類のコンストラクトを導入し、キメラチャネルによって K⁺輸送能が変化、つまり増殖能が変化した酵母をスクリーニングした。その結果、約 3 分の 2 の変異体が野生型 KcsA チャネルとは異なる増殖能を示した。この情報を基に、再設計した変異体のコンストラクトを約 40 種類作製し、同様にスクリーニング実験を行ったところ、青色光照射下で増殖能が高い光感受性チャネルの候補となる変異体が 6 種類得られた。これらのうち 1 種類の変異体を精製し、脂質平面膜法で電気生理学的に活性を調べたが、今回検討した光照射条件では光依存的なチャネル電流の変化は見られなかった。青色光の強度や照射時間などを検討し、再度光依存的な活性変化を調べる必要がある。さらに、残りの 5 種類についても電気生理学的手法による詳細な活性測定を行い、光依存的な活性の変化を調べる予定である。

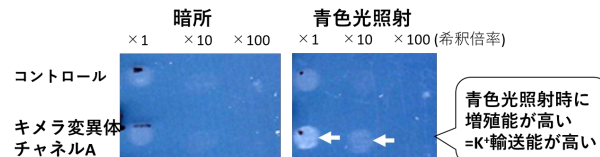


図2. 得られた青色光感受性 K⁺チャネルの候補変異体
キメラ変異体を発現させた K⁺輸送欠損酵母をスポット状に播き、低濃度の KCl 存在下で暗所または青色光照射下で培養した。青色照射下で暗所より増殖能が高い変異体得られた。

また、第 2 スクリーニング実験により、KcsA チャネル全長と PAC 蛋白質の光感受性ドメインである BLUF ドメインから成る変異体は常に高いチャネル活性を示す一方、BLUF ドメインや KcsA の長さがそれぞれ数 10 アミノ酸短い変異体は高い活性を示さないという結果が得られた。このことにより、これらの削った部位での相互作用が活性に影響していると考えられ、光の有無でこの相互作用が変化するような長さを同定することができれば、光感受性チャネルが作製できる可能性が示唆された。

(3) 細胞でのキメラチャネル変異体の発現とイオン電流測定

HEK 細胞に候補となる光感受性キメラチャネル変異体を発現させ、光照射に依存した細胞内のイオン環境の変化を捉えるための系を立ち上げた。変異体遺伝子を HEK 細胞へリポフェクション法で導入し、変異体のタグとして付加した蛍光タンパク質の蛍光でキメラチャネル変異体の発現を確認した。キメラチャネル変異体を発現した HEK 細胞を用いて電気生理学の実験を行い、パッチクランプ法で HEK 細胞のイオン電流を測定することができた。これら一連の方法を用いることで、細胞内の光依存的なイオン環境の変化を捉えることが可能である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

M. Hirano, T. Ide、Electrostatic state of the cytoplasmic domain influences inactivation at the selectivity filter of the KcsA potassium channel、査読有、Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1861, 220-227 (2019)、DOI: 10.1016/j.bbamem.2018.07.011.

〔学会発表〕(計3件)

Tomoya Ishido, Toru Ide, Minako Hirano、Modifications of K⁺ channel property、第56回日本生物物理学会、岡山(岡山大学)(2018)

Minako Hirano, Toru Ide、Effects of the electrostatic state of the cytoplasmic domain in the KcsA channel on its gating、第54回日本生物物理学会、つくば(つくば国際会議場)(2016)

Minako Hirano, Daichi Okuno, Yukiko Onishi, Toru Ide、The cytoplasmic domain regulates inactivation in the KcsA channel、第53回日本生物物理学会、金沢(金沢大学)(2015)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.gpi.ac.jp/research/bio/professor-16/>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。