

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15033

研究課題名(和文) 電位依存性K<sup>+</sup>チャネルの立体構造解析によるゲート開閉メカニズムの解明研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of the membrane potential-dependent structural change of the voltage-gated K<sup>+</sup> channel

研究代表者

原田 彩佳 (Harada, Ayaka)

筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・助教

研究者番号：00800476

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：電位依存性K<sup>+</sup>チャネル(Kv)は、VSDの膜電位依存的な構造変化によって、PDのゲートを開閉する。KvAPを解析対象とし、VSDのヘリックスS1とS4にCys残基を1個ずつ導入し、これらが近接した際に形成する分子内ジスルフィド(SS)結合を検出するSS-locking解析を計25種類のDouble Cys変異体を用いて実施した。結果、得られた近接残基対は、単一の立体構造では同時に近接しえないことから、各変異体において異なるコンフォメーションがSS結合により安定化されたことを示しており、各変異体の構造はKvAPの閉状態と開状態の間の構造変化の過程を反映している可能性があることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

KvAPは、真核生物由来K<sup>+</sup>チャネルと類似した電気生理学的性質および立体構造を有することが明らかとなっているため、KvAPを用いてイオンチャネルに共通の機能構造を解明した上で、ヒトの痛覚や催不整脈性に関わるチャネルの機能・阻害機構を解明し、機能構造ごとにチャネル間を横断的に構造比較・特徴抽出することが可能となる。また、同じ機能構造・同じ部位に結合する阻害剤を同定できるため、これらのみで構造活性相関解析することにより、精度の高いファーマコフォアモデルを構築でき、各阻害機構を明らかにすることが出来る。

研究成果の概要(英文)：Voltage-gated K<sup>+</sup> channels (Kv) open and close the pore domain (PD) gate through membrane potential-dependent structural changes of the voltage sensing domain (VSD). We introduced combinations of one Cys residue each into helices S1 and S4 of the VSD of KvAP and performed SS-locking analysis, which detects intramolecular disulfide (SS) bond formation by these two Cys residues when they are in close proximity. We assessed a total of 25 double-Cys mutants. Because the residue pair interactions we obtained cannot all form if only a single protein conformation exists, our results indicate that multiple different conformations were stabilized by SS bond formation among the mutant proteins tested. We thus conclude that the structure of each mutant may reflect steps in the process of structural change between closed and open states of KvAP.

研究分野：構造生物学

キーワード：電位依存性K<sup>+</sup>チャネル 膜電位依存的構造変化 SS-locking

## 1. 研究開始当初の背景

電位依存性カリウムチャネル (Kv) は、神経伝達や心臓の拍動における活動電位の再分極過程を担う膜タンパク質であり、膜電位に応じて適量の  $K^+$  を適切なタイミングで膜透過することで膜電位を調節する。Kv は 6 回の膜貫通領域 (セグメント S1~S6) を持った  $\alpha$  サブユニットが 4 分子集まって 1 つのイオンチャネルを形成して機能する。S1~S4 が細胞内外の電位差を感知する電位センサードメイン (VSD) を、S5~S6 がイオン選択性フィルターおよびイオンゲートを備えるポアドメイン (PD) をそれぞれ構成する。VSD の S4 には、3-4 残基ごとに側鎖に正電荷を持つ Arg あるいは Lys が保存されている。膜電位存在下では、正電荷を帯びた S4 が負電荷を帯びた細胞内側に引き寄せられておりゲートが閉じた「静止構造」をとるが、細胞が脱分極すると S4 は細胞外側に移動することでゲートが開き「開構造」へと遷移する。この VSD の膜電位依存的な構造変化が、ゲートを構成する PD の構造変化を誘起することにより、イオン透過を制御すると考えられている。Kv チャネルについてはこれまでに複数の結晶構造やモデル構造が報告されており、Kv チャネルが様々な種間に高度に保存された立体構造を有することが明らかになっている。しかし、これまでに報告された Kv チャネルの構造は、いずれも「開構造」に相当する。一方、「静止構造」の Kv チャネルの立体構造は、膜電位存在下での構造解析が困難なこともあり明らかとなっていない。

古細菌 *Aeropyrum pernix* 由来の Kv チャネルである KvAP は、最初に結晶構造が明らかとなった Kv チャネルであり、大腸菌で大量発現が可能なることから、これまでに電気生理学あるいは構造生物学的解析が多数報告されている。その結果、真核生物由来 Kv チャネルと類似した電気生理学的性質および立体構造を有することが明らかとなっている。

KvAP の 4 量体形成は、VSD と PD が同じ分子内の対応する構造領域と S4-S5 リンカーで繋がる、ノンドメインスワップ配置をとる。一方で、ドメインスワップ配置をとる Kv もあり、ドメインスワップの Kv は、S4-S5 リンカーが S6 と接しており、S4 の動きが S6 のゲートに伝播する機構が予測されている。興味深いことに、KvAP などで見られるノンドメインスワップでは、S4-S5 リンカーが S6 と離れているため、S4 の構造変化がどのように PD に伝播しゲート開閉を行なっているかは不明なままである。

## 2. 研究の目的

本研究では、全長 KvAP の VSD の 2 つのヘリックス S1 と S4 に 1 残基ずつシステイン変異を導入し、側鎖の SH 基間をジスルフィド結合 (SS 結合) で架橋することで、膜電位非存在下で「静止構造」を安定化させる (SS-locking 法)。変異導入部位による SS-locking の形成のしやすさを比較し、SS-locking 形成に成功した変異体の立体構造解析により、S4 の構造変化における S4 の膜電位依存的な構造変化の過程や、PD のゲート開閉メカニズムを明らかにし、Kv に普遍的な機能発現メカニズムを解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

これまでの研究から、膜電位非存在下でのみ分子内 SS 結合を形成した変異体として V42C/I130C 変異体が同定されている。さらに「静止構造」から「開構造」へ変化する際、S4 が 180 度回転しながら細胞内側へ 10 Å 程度下がるという構造変化が起こりうることが示唆されている。そこで、V42C/I130C 変異体を基本として、「回転度合い」を知るため S4 の I130 を含めた前後 2 残基の連続 5 残基を選択し、また、「高さ」を知るため S4 側を向いた

S1 の 5 残基を選択し、S1 と S4 の組み合わせ合計 25 種類の double Cys 変異体を作製する。

分子内 SS 結合は、CuP (Cu<sup>2+</sup> と o-Phenanthroline の錯体) を触媒とした酸化反応により形成させる。この酸化反応では、膜電位非存在下であっても溶液中での S4 の「揺らぎ」により、Cys 残基同士が一過的に近接するため、分子内 SS 結合を形成することができる。Double Cys 変異体の分子内 SS 結合形成の有無の確認は、Cys 残基の SH 基に結合する分子量 2 kDa の maleimide (Mal) -PEG を用いて検討する。分子内 SS 結合を形成した変異体は、Mal-PEG によって修飾されず Mal-PEG 処理前後で SDS-PAGE における移動度が変化しない。一方で、分子内 SS 結合を形成していない変異体は、遊離の SH 基が Mal-PEG によって修飾されるため、Mal-PEG 処理後に分子量が増大し SDS-PAGE における移動度が減少する。Mal-PEG を利用した SDS-PAGE 解析により、25 種類の double Cys 変異体を用いて、SS-locking 解析による SS 結合形成を指標とした S1 と S4 の近残基対の同定を行う。また、SS-locking 法を利用して安定化した KvAP を用いて結晶化スクリーニングを行い、結晶が得られ次第、放射光実験施設にて回折強度データの収集を行う。また、結晶化スクリーニングと平行してクライオ TEM を用いた単粒子解析を行う。

#### 4. 研究成果

全 25 種類の KvAP double Cys 変異体の作製を行い、各種変異体は大腸菌発現系を用いてタンパク質試料の調製を行った。各菌体 500 ml あたり濃度 5-10  $\mu$ M でタンパク質試料を精製することができ、SS-locking 実験に十分な濃度の試料を安定に得ることができた。

続いて、SS 結合形成を指標とした S1 と S4 の近残基対の同定を行うため、25 種類の変異体を用いて SS-locking 実験を行った。結果、合計 10 組の double Cys 変異体 (V42C/I130C, V39C/I130C, V39C/I131C, S38C/I131C, A35C/L129C, A35C/I130C, A35C/I131C, S32C/L128C, S32C/L129C) を、明確に SS 結合を形成した変異体として同定することが出来た。

これらの残基対は、単一の立体構造では同時に近接しえないことから、各変異体において異なるコンホメーションが SS 結合により安定化されたことを示しており、各変異体の構造は KvAP の閉状態と開状態の間の構造変化の過程を反映している可能性があると考えている。

また、double Cys 変異体の立体構造解析を行うため、Bicell 法、LCP 法および蒸気拡散法を用いて結晶化スクリーニングを行った。結果、多くは界面活性剤由来の回折や塩の回折を示す結晶が得られたが、LCP 法において低角域にタンパク質の回折を示す結晶化条件が見つかった。

今後は、回折強度データ収集を行うために、界面活性剤の検討を含む試料調製方法の改善やクライオ電子顕微鏡解析を用いた測定条件の検討などを併せて進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石川貴大, 原田彩佳, 横川真梨子, 前田知輝, 日向寺孝禎, 藤田浩平, 野崎智裕, 嶋田一夫, 大澤匡範
2. 発表標題 分子内ジスルフィド結合による電位依存性K <sup>+</sup> チャンネルの膜電位依存的構造変化機構の解明
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小島行人, 清水祐吾, 米澤朋起, 池田和由, 原田彩佳, 横川真梨子, 大澤匡範
2. 発表標題 NMRによるPPI 阻害化合物と標的タンパク質との相互作用の構造生物学的解析とドラッグデザイン
3. 学会等名 第19回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------