

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370067

研究課題名(和文) KcsAカリウムチャンネルpH依存性ゲーティングダイナミクスの一分子構造機能解析

研究課題名(英文) Single-molecule structure-function analysis of the pH-dependent gating of the KcsA potassium channel

研究代表者

老木 成稔(Oiki, Shigetoshi)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：10185176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,900,000円、(間接経費) 4,770,000円

研究成果の概要(和文)：pH依存性カリウムチャンネルであるKcsAのゲーティング構造変化を捉えるために回折X線追跡法のハードウェアの面からを改良し、毎秒5000フレームの高速記録が可能になった。従来の定常状態でのDXT測定では観察されるねじれの向きとゲーティングの関係が分からなかった。pHジャンプすることにより、たとえば酸性ジャンプであれば開遷移だけが捉えられる。このようなアイデアで実験を行うためのpHジャンプ系を確立し、ゲーティングの過渡的応答を高解像度で捉えることに成功した。またpH依存性のゲーティング開口過程に際し、膜に埋め込まれた状態のチャンネルが長軸方向の長さを短縮することを原子間力顕微鏡により明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The pH-dependent gating of the KcsA potassium channel was examined by enhancing the spatial and temporal resolutions of the diffracted X-ray tracking method. Unlike previous steady-state measurements, the solution pH was jumped by using the caged compound, and transient behavior of the gating conformational change was recorded with the high-speed image sampling (5000 frame/sec). We found that the clockwise twisting was initiated upon acidic pH change. By using the atomic force microscopy (AFM), we revealed the substantial shortening of the longitudinal length of the KcsA channel in the membrane embedded condition. These results indicate that channel shows a spring-like motion, involving simultaneous twisting and shortening, upon opening of the channel.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：イオンチャンネル ゲーティング 構造変化 膜内構造 集合・離散

1. 研究開始当初の背景

蛋白質構造変化ダイナミクスの分子機構の解明は蛋白質科学の重要課題である。構造変化ダイナミクスを研究する上でチャンネル蛋白質を対象とすることのメリットは1分子レベルでの構造・機能測定が可能なことである。特に脂質平面膜法では高精度の実験が可能であり、さらに一方では私達が確立した回折X線追跡法でリアルタイムの構造変化を1分子レベルで捉えられる。これらの方法で蛋白質の協動的なダイナミック像を得ることを目指す。

本研究で対象とするKcsAカリウムチャンネルは生体分子研究の典型蛋白質としての地位を得るにいたった。このチャンネルは放線菌由来の蛋白質であるが、ヒトを含むあらゆる生物種のあらゆる細胞に存在するカリウムチャンネルと同様の基本構造を備えている。機能の上でも高いK⁺イオン透過性と選択性という基本要件を備えており、加えて、蛋白質として安定で大量に発現できるというメリットを持つ。特に可溶化状態でもゲーティングの機能を保持していることが分光学など様々な実験系に適用できるゆえんである。1998年に初めて結晶構造が得られて以来、イオンチャンネル研究を分子レベルで研究するための絶好のターゲットとして世界中で研究が進められ、チャンネル蛋白質の中でも最も理解が進んでいるだけでなく、あらゆる蛋白質の中でもその研究が最先端に至る旗艦蛋白質と呼んでもよい。

イオンチャンネルの細胞での機能的役割は特定のイオンを効率よく透過させ、イオン電流により細胞膜の膜電位を変化させ、電気的情報伝達系を構築することである。この機能を実現するためにイオンチャンネルはイオン透過路(ポア)を透過・非透過状態にするゲートを備えている。KcsAチャンネルの場合、ゲートを制御するのは細胞質側のpH変化であり、荷電残基が集積したpHセンサードメインが細胞質ドメイン上に存在する。細胞質側が酸性pHになるとセンサードメインはどのような構造変化を起こすのか、またこの構造変化がどのようにして膜貫通ドメインに伝わるのか。この問題は蛋白質の構造変化ダイナミクスの本質的課題である。

2. 研究の目的

本研究の目的はKcsAカリウムチャンネルが示すpH依存性ゲーティング(イオン透過路の開閉)を構造と機能の両面から一分子測定し、pHセンサーからゲートに至る構造変化の分子内経路(構造変化波の軌跡)を具体的な動画として表現することである。すでに私達はゲートの開閉はチャンネル分子回転対称軸周りのねじれ運動であることを明らかにしており(Shimizu et al. Cell 2008)、pHセンサーの立体構造も最近報告されている(Uysal et al. PNAS

2009)。pH感受からゲーティングに至る構造変化をpHジャンプによって引き起こし、高時間分解能の回折X線追跡法により過渡的構造変化を追跡する。またゲーティングにおける分子内の協動的経路をアミノ酸変異したチャンネルの機能測定から明らかにし、ゲーティングのエネルギー地形と力学モデルを時系列に描画する。

3. 研究の方法

回折X線追跡法を高時間分解能に改善し、ケージド化合物を使ったpHジャンプ(酸性)によってKcsAチャンネルのpH依存性ゲートの過渡的応答を1分子レベルで構造と機能の面から追跡する。この方法により、中性pHでの定常状態での閉構造からゲートの開閉に至る過程を時系列で詳細にたどることができる。また酸性pHでの定常的測定では可逆的に開・閉両過程を観察してきたが、今回の方法ではpH変化を受容してからゲートが開くまでの全過程を捉えられる。pHジャンプに関してはケージド化合物を紫外線レーザーで励起し、短時間でpH変化を引き起こす。これと並行して、単一チャンネル電流のpHジャンプによる過渡的応答を測定する。構造・機能の両面からゲーティングのメカニカルな特性と自由エネルギー地形に関する情報が得られる。

4. 研究成果

(1) DXT法の高速・高解像度達成のための改良

白色X線の集光

SPring-8のビームラインBL28B2はDXT法のために不可欠な白色ビームを提供してくれるが、本来材料系に使用するためのものであるためビームの集光が不可能であった。そこで集光ミラーを設計し、ビームラインに設置した。同時にビームのスペクトルを測定し、DXT法のために最適な周波数特性を持ったX線を発生させた。これらの改良の結果、毎秒5000フレームの高速記録が可能になった。

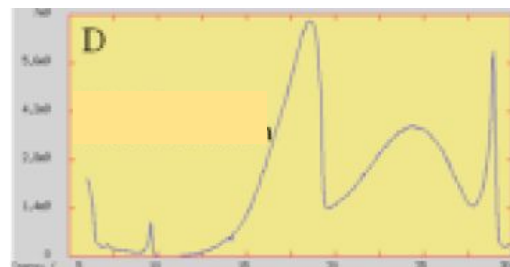


図. “白色” X線の周波数特性

ケージド化合物によるpHジャンプ
従来のDXT測定では溶液pHを一定にした定常状態での測定であったため開遷移・閉遷移が起こり、観察されるねじれの向きとゲーティングの関係が分からなかった。pHジャンプ

ンプすることにより、たとえば酸性ジャンプであれば開遷移だけが捉えられるはずである。このようなアイデアで実験を行うためのpHジャンプ系を確立し、ゲーティングの過渡的応答を捉えることに成功した。

(2) ゲーティング機構

KcsA チャンネルのリン脂質依存性

KcsA チャンネルはその結晶構造中にリン脂質 (PG) が存在することから、リン脂質のチャンネル機能に対する役割が想定されてきた。私達は脂質平面膜法により非対称組成の膜を形成し、膜内葉のPGがチャンネルを開状態に保持するために不可欠であることを明らかにした。PGは実験条件では負電荷を帯びており、また負電荷を帯びるリン脂質ならどれでもゲーティングに対して同様の効果を示すことが明らかになった。

リン脂質センサーの発見

膜内葉の負電荷をもつリン脂質が共通してゲートを開状態に保つので、チャンネル蛋白質側の正電荷と静電的相互作用を行っている可能性が高い。KcsA チャンネルに存在するすべての正電荷アミノ酸残基を一個ずつ中性残基と置換し、ゲーティングに対する効果を脂質平面膜法で観察した。その結果、N末端にある両親媒性ヘリックス(M0ヘリックス)上にある正電荷が相互作用部位であることが明らかになった。この部位を蛍光色素により標識しゲーティングに伴う変化を測定したところ、ゲート開閉に従ってM0ヘリックスが膜界面上で回転することが明らかになった。この新しい機構を roll-and-stabilize モデルと命名した。

KcsA チャンネルの膜内構造

KcsA の結晶構造は可溶化したものしか得られていない。膜に埋め込まれた状態での構造を明らかにするために原子間力顕微鏡 (AFM) を適用し、ゲートの開閉構造を捉えることに成功した。ゲート開口に伴って膜貫通領域の長さが短縮することを捉えることに成功した。

(3) KcsA チャンネルの膜内ダイナミクス

AFM 測定によって KcsA チャンネルが膜上で集合・離散することを発見した。さらに、この集合・離散がチャンネルのゲート開閉と連動するという新しい現象を見出した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 17 件)

1. Sumino, A., Yamamoto, D., Iwamoto, M., Dewa, T., and Oiki, S.: Gating-associated clustering-dispersion dynamics of the KcsA potassium channel in a lipid membrane. *J.*

Phys. Chem. Lett. 5: 578-584, 2014. DOI:10.1016/j.molliq.2014.03.050

2. Phongphanphanee, S., Yoshida, N., Oiki, S. and Hirata, F.: The “ambivalent” snug-fit sites in the KcsA potassium channel probed by “3D-RISM microscopy”. *Pure and Applied Chemistry*, 86: 97-104, 2014. DOI:10.1515/pac-2014-5018
3. Iwamoto, M., Matsunaga, S. and Oiki, S.: Paradoxical one-ion pore behavior of a long β -helical peptide of marine cytotoxic polytheonamide B. *Sci. Rep.* 4: 3636 (1-7), 2014.
4. Ryu, S., Imai, Y.N., S. Oiki: The synergic modeling for the binding of fluoroquinolone antibiotics to the hERG potassium channel. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23: 3848-3851, 2013. DOI:prii: S0960-894X(13)00564-7. 10.1016/j.bmcl.2013.04.074
5. Yamakata, A., Shimizu, H., Osawa, M. and Oiki, S.: Structural changes of the KcsA potassium channel upon application of the electrode potential studied by surface-enhanced IR absorption spectroscopy. *Chemical Physics* 419: 224-228, 2013. DOI:なし
6. Watanabe, R., Tabata, K.V., Iino, R., Ueno, H., Iwamoto, M., Oiki, S. and Noji, H.: Biased Brownian Stepping Rotation of F_0F_1 -ATP Synthase Driven by Proton Motive Force. *Nature Commun.* 4: 1631, 2013. DOI:10.1038/ncomms2631
7. Sumino, A., Sumikama, T., Iwamoto, M., Dewa, T., and Oiki, S.: The Open Gate Structure of the Membrane-Embedded KcsA Potassium Channel Viewed From the Cytoplasmic Side. *Sci. Rep.* 3: 1063 (1-7), 2013. 注目の論文. DOI:10.1038/srep01063
8. Iwamoto, M. and S. Oiki: The amphipathic antenna of an inward rectifier K^+ channel responds to changes in the inner membrane leaflet. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 749-754, 2013. DOI:10.1073/pnas.1217323110
9. Furutani, Y., Shimizu, H., Asai, Y., Fukuda, T., Oiki, S. and Kandori, H.: ATR-FTIR Spectroscopy Revealed the Different Vibrational Modes of the Selectivity Filter Interacting with K^+ and Na^+ in the Open and Collapsed Conformations of the KcsA Potassium Channel. *J. Phys. Chem. Lett.* 3: 3806-3810, 2012. DOI:10.1021/jz301721f
10. Imai, S., Osawa, M., Mita, K., Toyonaga, S., Machiyama, A., Ueda, T., Takeuchi, K., Oiki, S. and Shimada, I.: Functional Equilibrium of the KcsA Structure Revealed by NMR. *J. Biol. Chem.* 287: 39634-39641, 2012. DOI:10.1074/jbc.M112.401265.
11. 老木成稔: イオンチャンネルタンパク質の構造変化を追う。パリティ 26 (2): 52-56,

- 2011.
12. Oiki, S., H. Shimizu, M. Iwamoto and T. Konno: Single-Molecular Gating Dynamics for The KcsA Potassium Channel. Editors: T. Komatsuzaki, M. Kawakami, S. Takahashi, H. Yang, R. J. Silbey, “*Single-Molecule Biophysics: Experiment and Theory*”, Series editors: S. A. Rice & A.R. Dinner, *Adv. Chem. Phys.* 146: 147-193, 2011. DOI: 10.1002/9781118131374.ch7
 13. Mori, T., Kokubo, H., Oiki, S. and Okamoto Y.: Dynamic structure of the polytheonamide B channel studied by normal mode analysis. *Molec. Sim.* 37: 975-985, 2011. DOI:10.1080/08927022.2011.561433.
 14. Iwamoto, M. and S. Oiki: Counting Ion and Water Molecules in A Streaming File through the Open-Filter Structure of A K Channel. *J. Neuroscience* 31: 12180-12188, 2011. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1377-11.2011.
 15. Yanagisawa, M., M. Iwamoto, A. Kato, K. Yoshikawa, and S. Oiki: Oriented reconstitution of a membrane protein in vesicles with asymmetric lipid compositions: Experimental verification with the potassium channel KcsA. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 11774-11779, 2011. DOI: 10.1021/ja2040859.
 16. Oiki, S., M. Iwamoto, T. Sumikama: Cycle Flux Algebra for Ion and Water Flux through the KcsA Channel Single-file Pore Links Microscopic Trajectories and Macroscopic Observables. *PLoS ONE* 6: e16578 (1-13), 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0016578.
- [学会発表](計 38 件)
1. 老木成稔、チャネル機能の再構成と再生：ポスト結晶時代の単一チャネル研究 第91回日本生理学会大会、2014.3.16-18、鹿児島大学（鹿児島市）
 2. 岩本真幸・老木成稔、膜脂質組成が KcsA カリウムチャネルの不活性化ゲート開閉に及ぼす影響、第91回日本生理学会大会、2014.3.16-18、鹿児島大学（鹿児島市）
 3. 松木悠佳・岩本真幸・松永茂樹・老木成稔、ポリセオナミド B チャネルのプロトン透過：単一チャネル電流記録とプロトン透過モデル、第91回日本生理学会大会、2014.3.16-18、鹿児島大学（鹿児島市）
 4. 角野歩・山本大輔・岩本真幸・出羽毅久・老木成稔、カリウムイオンチャネル KcsA のゲート開閉と運動した膜中集合・離散挙動：原子間力顕微鏡による直接観察、第91回日本生理学会大会、2014.3.16-18、鹿児島大学（鹿児島市）
 5. 老木成稔、チャネル蛋白質と水動態、研究会「水シグナリングの分子動態から病態へ」、福井市地域交流プラザ Aossa（福井市）2014.3.5-6
 6. M. Iwamoto, S. Oiki Membrane lipids modulate the inactivation gating of the KcsA potassium channel, Biophysical Society 58th Annual Meeting, San Francisco, **Moscone Center (San Francisco, California, USA)**, 2014.2.15-19
 7. T. Sumimaka, S. Saito, S. Oiki, 3rd International Conference on Molecular Simulation, Hydrophobic Cavity in the Potassium Channels: Anomalous Nanospace Controlling Ion Condition, 2013.11.18-20, Kobe International Conference Center (神戸市)
 8. T. Sumikama, S. Saito, S. Oiki, Pdependency of ion permeation pattern on K⁺ concentration through the Kv1.2 channel, Biophysical Society 57th Annual Meeting, 2013.02.2-3, Baltimore, Maryland(USA)
 9. M. Iwamoto, S. Oiki, The sensing sites for the membrane inner lipids regulate the activation gating of the KcsA potassium channel, Biophysical Society 57th Annual Meeting, 2013.02.2-3, Baltimore, Maryland(USA)
 10. S. Oiki, M. Iwamoto, MEMBRANE LIPID-SENSITIVE GATING OF THE KcsA POTASSIUM CHANNEL, 揺らぎが機能を決める生命分子の科学公開シンポジウム, 2012.12.05-06、京都テルサ（京都市）
 11. H. Shimizu, M. Iwamoto, T. Konno, A. Royant, V. D. Stetten, L. Guerin, M. Wolff, S. Oiki, Development of diffracted X-ray tracking method for measuring gating transitions of the KcsA potassium channels in a sub-millisecond time resolution, 第89回日本生理学会, 2012.03.29-31, 長野県松本文化会館（松本市）
 12. H. Shimizu, M. Iwamoto, T. Konno, A. Royant, S. Von David, G. Laurent, M. Wulff, S. Oiki, Laser-Triggered Single Molecular Gating Motions of the KcsA Potassium Channels Recorded in a Sub-Millisecond Time Resolution, Biophysical Society 56th Annual Meeting, 2012.02.02-06, Philadelphia, Pennsylvania(USA)
 13. Takashi Sumikama, S. Saito, S. Oiki, Role of central cavity in Ion permeation through the KV1.2 Channel, Biophysical Society 56th Annual Meeting, 2012.02.02-06, Philadelphia, Pennsylvania(USA)
 14. M. Iwamoto, S. Oiki, The asymmetric lipid bilayer revealed sidedness of the effective phospholipids on the single-channel properties of the KcsA potassium channel, Biophysical Society 56th Annual Meeting, 2012.02.02-06, Philadelphia, Pennsylvania(USA)
 15. M. Iwamoto, S. Oiki, Envisioning the Ion Permeation Process through the KcsA Potassium Channel Using the Cycle Flux Algebra, 揺らぎが機能を決める生命分子の科学 第5回公開シンポジウム, 2012.01.07-08、東大寺総合文化

センター（奈良市）

〔図書〕（計 7 件）

1. 老木成稔：イオン透過装置：イオンチャンネル、野地博行編、化学フロンティア 23「1 分子ナノバイオ科学の新パラダイム～極限計測と理論，分子からシステムへ」化学同人、2014、印刷中
2. 老木成稔：イオンチャンネル：チャンネルとその機能をつなぐ膜 寺嶋正秀編『揺らぎ・ダイナミクスと生体機能—物理化学的視点から見た生体分子—』253-266、化学同人、2013、pp. 347.
3. Oiki, S.: Gating Dynamics of the Potassium Channel Pore. *Comprehensive Biophysics*. Edward Egelman Ed. Volume 6. Channel Proteins, Mauricio Montal Ed. Oxford: Academic Press 31-67, 2012, pp. 245. 978-0-12-374920-8
4. Oiki, S.: “Chapter 16. Planar Lipid Bilayer Method for Studying Channel Molecules.” Y. Okada Ed. *Patch Clamp Techniques: From Beginning to Advanced Protocols*. Springer Protocols Handbooks. Springer-Verlag 229-275, 2012, pp. 439.
5. Kukita, F. and S. Oiki: “Chapter 1. Prologue: The Ion Channel.” Y. Okada Ed. *Patch Clamp Techniques: From Beginning to Advanced Protocols*. Springer Protocols Handbooks. Springer-Verlag 1-19, 2012, pp. 439..
6. 久木田文夫、老木成稔：序論：イオンチャンネル。「新パッチクランプ実験技術法」(岡田泰伸 編)，吉岡書店，7-18，2011，pp. 274.
7. 老木成稔：チャンネル研究のための脂質平面膜法「新パッチクランプ実験技術法」(岡田泰伸 編)，吉岡書店，153-183。2011，pp. 274.

〔産業財産権〕

出願状況（計 2 件）

名称：脂質平面膜を形成するための貫通孔を有するガラス基板、およびその製造方法と用途

発明者：老木 成稔・岩本真幸

権利者：老木 成稔・岩本真幸

種類：特許

番号：特願 2013 - 155692 号

出願年月日：2013 年 7 月 26 日

国内外の別：国内

名称：生体組織に範をとったエネルギー・情報生成膜システム

発明者：老木 成稔・岩本真幸

権利者：老木 成稔・岩本真幸

種類：特許

番号：特願 2011 - 245986 号

出願年月日：2011 年 11 月 9 日

国内外の別：国内

取得状況（計 2 件）

名称：変異型 HERG チャンネル発現細胞およびその用途

発明者：柳承希・明貝俊彦・今井友美・老木 成稔

権利者：国立大学法人福井大学・武田薬品工業株式会社

種類：特許

番号：特願 2005 - 269153 号

取得年月日：平成 23 年 9 月 22 日

国内外の別：国内

名称：シス - トランス液流方式によるイオンチャンネル解析方法と、その方法に使用するイオンチャンネル解析装置

発明者：老木 成稔・山内紀宏・坪田圭介

権利者：老木 成稔・轟産業株式会社

種類：特許

番号：特願 2004 - 153209 号

取得年月日：平成 22 年 5 月 21 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

老木成稔：イオンチャンネルの動的構造と分子機構解明のための 1 分子研究. 科研費 NEWS2013 年度 Vol.2, 17, 2013.

日本生理学会 サイエンスピックアップ No. 82 岩本真幸（老木成稔）：K⁺チャンネルが細胞膜の脂質の環境を感じ取り活性を制御する機構の解明

日本生理学会 サイエンスピックアップ No. 92 角野歩（老木成稔）：カリウムチャンネル KcsA のゲート開閉と連動した膜中集合・離散ダイナミクス

6. 研究組織

(1) 研究代表者

老木 成稔 (Shigetoshi Oiki)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：10185176

(2) 研究分担者

清水啓史 (Hirofumi Shimizu)

福井大学・医学部・講師

研究者番号：50324158

(3) 研究分担者

岩本真幸 (Masayuki Iwamoto)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：40452122