

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790245

研究課題名（和文） 強力な細胞毒性を示す新奇ペプチドチャンネルにおける未知のイオン透過・制御機構

研究課題名（英文） Investigation of the mechanism of ion permeation through a highly cytotoxic peptide channel

研究代表者

岩本 真幸（IWAMOTO MASAYUKI）

福井大学・医学部・助教

研究者番号：40452122

研究成果の概要（和文）： 強力な細胞毒性を示す海綿由来のチャンネル形成ペプチド・ポリセオナミド B (pTB) のイオンチャンネル特性を、人工脂質平面膜を用いて解析した。その結果、イオン透過路には同時に 2 つのイオンが入らないこと、ゲート開閉速度が著しく速く、膜電位依存的事であることがわかった。pTB では、類似構造を持つグラミシジン A (gA) チャンネルとは異なるメカニズムでイオンが透過し、gA で見られるペプチドの会合・解離によるゲート開閉ではなく、ペプチド内の構造変化が透過制御に関与していると推定される。

研究成果の概要（英文）： In this study ion permeation mechanism of a highly cytotoxic peptide from a marine sponge, polytheonamide B (pTB), was evaluated by use of planer lipid bilayer. We found that the pTB channel had one-ion pore. This result indicates that the mechanism underlying the ion permeation is different from that of the gramicidin A (gA) channel although both channels have similar  $\beta$ -helical structure. In addition, we revealed that the pTB channel exhibited voltage-dependent gating and fast transition between open and closed state. We suggest that, different from gA channels, the changes in the intra-peptide structure govern the gating of the pTB channel.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：生体膜・チャンネル・ペプチド・細胞毒性・生理活性

## 1. 研究開始当初の背景

微生物や細菌が産生する非リボソームペプチドは生理活性や薬理学的特性を持つ分子として自然界に広く存在する。良く知られた例として、グラミシジン類や医薬品として利用されているバンコマイシン、シクロスポリンなどが挙げられる。海綿 (*Theonella swinhoei*) から発見されたポリセオナミド B (polytheonamide B, pTB) も非リボソームペ

チドの一種で、海綿に寄生する微生物によって産生されるペプチドと考えられている。pTB は非常に特徴的な分子構造を持つ。直鎖状に連なる 48 個のアミノ酸から構成されるが、その中には多数の異常アミノ酸が含まれる。さらにその配列においては、D、L 体のアミノ酸（生体内のアミノ酸は全て L 体）が交互に並び、 $\beta$ ヘリックス（図 1）という特異な立体構造を有することが明らかになっている。

また、pTB は培養がん細胞に対して非常に強い細胞毒性 (IC50 値、約 70 pg/ml) を示すことが報告されており、薬理的にも興味深いペプチドである。

これまで、pTB が脂質二重膜に容易に移行して一価陽イオン選択性チャネルを形成すること (Iwamoto et al. *FEBS Lett.* 2010) が明らかにされ、またそのイオンチャネルはイオン流を制御するゲートを膜電位依存的に開閉していること (Iwamoto et al. *Biophys. J.* 2010) が示唆されている。一方、pTB がどのように細胞膜に挿入され、膜中でどのような性質から強力な細胞毒性が示されるのか、詳細な作用機序はいまだ明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

特異な  $\beta$  ヘリックス構造を持ち、強力な細胞毒性を示すポリセオナミド B (pTB) が生体膜に形成するイオンチャネルはどのような特性を持つのか？また、僅か 48 アミノ酸から成るペプチドがどのようにしてイオンの流れを制御しているのか？本研究では pTB を介する未知のイオン透過・制御機構を探求し、その強力な細胞毒性の分子構造的根拠を明らかにしたい。

## 3. 研究の方法

### (1) 単一チャネル電流測定

脂質平面膜法により単一 pTB チャネル電流を測定した。目的濃度の CsCl または KCl 水溶液 1.5 mL で満たした 2 つのチェンバー間を、直径約 100  $\mu\text{m}$  の小孔を 1 つ有する厚さ 0.3 mm のテフロンシートで仕切った (図 2)。その小孔に対し、20 mg/mL の濃度で *n*-decane に溶解した diphtanoyl-phosphatidylcholine をガラスピペットで吹き付け、脂質平面膜を作成した。一方のチェンバーにエタノールに溶解したポリセオナミド B (pTB) を少量添加し、攪拌することで脂質平面膜に移行さ

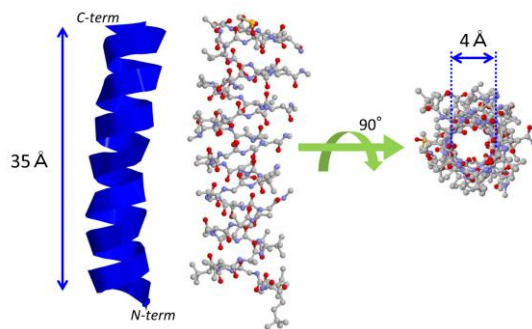


図 1. pTB チャネルの  $\beta$  ヘリックス構造 (PDB; 2RQ0)。

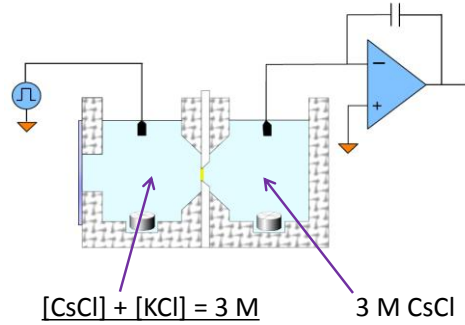


図 2. モル分率効果 (mole-fraction effect) 検討のための測定方法

せた。平面膜に挿入した pTB チャネルを流れるイオン電流は、両チェンバーに設置した銀・塩化銀電極によって膜電位固定下で測定した。

### (2) 透過イオン種のモル分率効果 (mole-fraction effect) の検討

一方のチェンバーは 3.0 M CsCl 水溶液で満たし、もう一方には合計濃度を 3.0 M に保ったまま CsCl と KCl が混合した様々な溶液で満たした (図 2)。pTB チャネル電流を様々な膜電位下で測定し、電流がゼロとなる膜電位 (逆転電位) を解析し、 $\text{Cs}^+$  のモル分率に対してプロットした。

## 4. 研究成果

pTB は  $\beta$  ヘリックスという特異な分子構造を持つが、pTB 以外唯一の  $\beta$  ヘリックス型チャネルには抗生物質として知られているグラミシジンがある。グラミシジン A (gA) チャネルのイオン透過機構に関する知見は多く蓄積しており、これと比較することで pTB チャネル特有のイオン透過特性を明らかにしようと試みた。

### (1) pTB チャネルのイオン透過機構

イオン透過機構を考察する際の基本的情報であるチャネル内イオン数を検討した。イオン透過速度のイオン濃度依存性、および様々なモル比で 2 種イオンを混合した各溶液条件でのイオン選択性の変化を単一チャネル電流から解析した (図 2)。pTB チャネルのコンダクタンスと  $\text{Cs}^+$  濃度の関係を Eadie-Hofstee プロットしたところ、明確な直線関係が見られた。また、 $\text{Cs}^+$  と  $\text{K}^+$  の混合溶液を用いて逆転電位のモル分率効果 (mole-fraction effect) を解析したところ、逆転電位と  $\text{Cs}^+$  のモル分率の関係は、透過に際して各イオンの独立を仮定している Goldman-Hodgkin-Katz の理論曲線と良く一致し

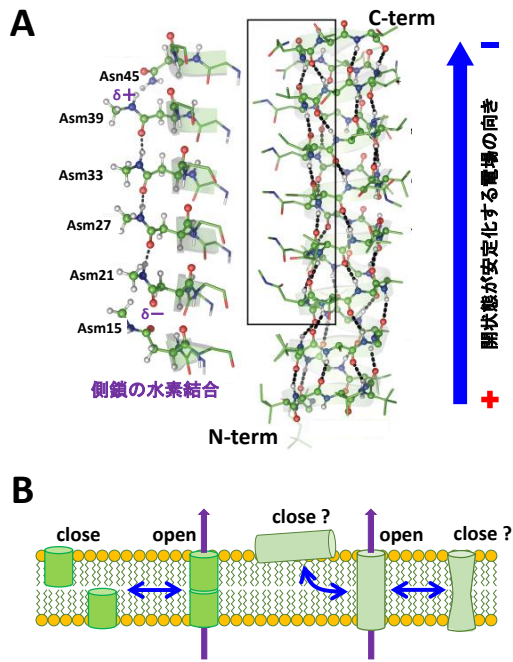


図 3. pTB チャンネルのゲート開閉機構。ペプチド構造に対する開状態を安定化させる膜電場の向き (A)、および、ゲーティングに伴う推定される構造変化 (B)。

た。以上の結果はすべて、pTB チャンネルは、同時に複数のイオンは入らない単イオンポアであることを示している。全長が pTB チャンネルより短いにもかかわらず、gA チャンネルでは同時に 2 つのイオンが入り得ることから、両チャンネル内イオン透過の背景に存在するメカニズムは異なると考えられる。この点に関し、分散状態マルコフモデルを用いて実験データを解析したところ、イオンが pTB チャンネル内を透過する際にも、チャンネル内の 2 つのイオン結合部位を介していることが示唆された。なぜ pTB ではこれら 2 つの結合部位にイオンが同時に結合することが無いのか、今後さらなる検討を加える必要がある。

#### (2) pTB チャンネルのゲート開閉機構

pTB チャンネルの電位依存的なゲート開閉特性について詳細に解析した。その結果、開状態の寿命に電位依存性があり、特定の方向の膜電場中で開構造が安定化することを明らかにした (図 3A)。さらに、開閉遷移速度が gA チャンネルと比較して著しく速いことがわかり、pTB チャンネルのゲート開閉には、gA チャンネルのようなペプチドの会合・解離 (図 3B・左) ではなく、ペプチド内の構造変化が関与していると推定された (図 3B・右)。この様なゲート開閉機構の

例は他に無く、今後具体的な分子機構を検討していきたい。

#### (3) まとめ

本研究により、pTB のイオンチャンネルとしての特異な性質が明らかになった。僅か 48 アミノ酸で構成される 1 本のペプチド内でイオン透過のゲート制御も行っている点は非常に興味深い。近年 pTB の全合成に成功したとの報告もあり、デバイスとしても注目され始めている。よって、その基本原理解明が一層必要となることが予想される。本研究成果は pTB チャンネル特性に関する現時点で最も先進的な情報であり、これを基に今後さらに研究を進めていきたい。

#### 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 10 件)

- ① Iwamoto M., Oiki S. “Amphipathic antenna of an inward rectifier K<sup>+</sup> channel responds to changes in the inner membrane leaflet” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 749-754, 査読有  
DOI:10.1073/pnas.1217323110
- ② Sumino A., Sumikama T., Iwamoto M., Dewa T., Oiki S. “The open gate structure of the membrane-embedded KcsA potassium channel viewed from the cytoplasmic side” *Sci. Rep.* 3 (2013) 1063, 査読有  
DOI:10.1038/srep01063
- ③ Watanabe R., Tabata K.V., Iino R., Ueno H., Iwamoto M., Oiki S., Noji H. “Biased Brownian stepping rotation of FoF1-ATP synthase driven by proton motive force” *Nat. Commun.* 4 (2013) 1631, 査読有  
DOI:10.1038/ncomms2631
- ④ Iwamoto M., Oiki S. “The sensing sites for the membrane inner lipids regulate the activation gating of the KcsA potassium channel” *Biophys. J.* 104 (2013) 128a, 査読無  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349512019790>
- ⑤ Iwamoto M., Oiki S. “The sensor for the inner membrane lipid modulating the activation gating of the KcsA potassium channel” *J. Physiol. Sci.* 63 Suppl. (2013) s131, 査読無
- ⑥ Iwamoto M., Oiki S. “The asymmetric lipid bilayer revealed sidedness of

the effective phospholipids on the single-channel properties of the KcsA potassium channel” *Biophys. J.* 102 (2012) 537a, 査読無  
[http://www.cell.com/biophysj/fulltext/S0006-3495\(11\)04281-0](http://www.cell.com/biophysj/fulltext/S0006-3495(11)04281-0)

- ⑦ Iwamoto M., Oiki S. “Sidedness of the effective phospholipids on the function of the KcsA potassium channel revealed by the single-channel recording in the asymmetric lipid bilayer” *J. Physiol. Sci.* 62 suppl. (2012) s84, 査読無
- ⑧ 岩本真幸、老木成稔 「脂質二重膜組成が KcsA カリウムチャネル活性に及ぼす影響」 *日本生理学雑誌* 74 (2012) 66, 査読無  
<http://geo.shunpike.info/jpsj/07402/074020051.pdf>
- ⑨ Iwamoto M., Oiki S. “Counting ion and water molecules in a streaming file through the open-filter structure of the K channel” *J. Neurosci.* 31 (2011) 12180-12188, 査読有  
DOI:10.1523/JNEUROSCI.1377-11.2011
- ⑩ Yanagisawa M., Iwamoto M., Kato A., Yoshikawa K., Oiki S. “Oriented reconstitution of a membrane protein in a giant unilamellar vesicle: Experimental verification with the potassium channel KcsA” *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 11774-11779, 査読有  
DOI: 10.1021/ja2040859

[学会発表] (計 7 件)

- ① 岩本真幸、老木成稔 「KcsA カリウムチャネルの活性化ゲート開閉に影響を及ぼす細胞内脂質センサー部位の同定」第 90 回日本生理学会大会 (タワーホール船堀、東京) 2013. 3. 27-29
- ② Iwamoto M., Oiki S. “The sensing sites for the membrane inner lipids regulate the activation gating of the KcsA potassium channel” Biophysical Society 57th Annual Meeting (Philadelphia Convention Center, Philadelphia, Pennsylvania, USA) 2013. 2. 3
- ③ 岩本真幸、老木成稔 「KcsA カリウムチャネル活性に影響を及ぼすリン脂質作用部位の同定」日本生物物理学会第 50 回年会 (名古屋大学、名古屋) 2012. 9. 24
- ④ 岩本真幸、老木成稔 「非対称脂質二重膜を用いた KcsA カリウムチャネル機能に影響を及ぼす陰イオン性リン脂質作用部位の検討」第 89 回日本生理学会大会 (松本市総合体育館、松本)

2012. 3. 29

- ⑤ Iwamoto M., Oiki S. “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 (San Diego Convention Center, San Diego, California, USA) 2012. 2. 28
- ⑥ 岩本真幸、老木成稔 「脂質二重膜組成が KcsA カリウムチャネル活性に及ぼす影響」第 58 回中部日本生理学会 (福井県民ホール・福井) 2011. 11. 1
- ⑦ 岩本真幸、老木成稔 「KcsA カリウムチャネルの開閉に対する脂質二重膜組成の影響」日本生物物理学会第 49 回年会 (兵庫県立大学・姫路) 2011. 9. 18

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

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: 福井大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2011-245986  
出願年月日: 2011 年 11 月 9 日  
国内外の別: 国内

[その他]

福井大学医学部分子生理学研究室ホームページ

<http://seiril.med.lab.u-fukui.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩本 真幸 (IWAMOTO MASAYUKI)  
福井大学・医学部・助教  
研究者番号: 40452122