

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590048

研究課題名(和文) 膜電位に支配される電位依存性イオンチャネルの構造と機能発現機構

研究課題名(英文) Voltage-dependent structural changes and functional mechanism of voltage-dependent ion channels

研究代表者

大澤 匡範(Osawa, Masanori)

東京大学・薬学研究科(研究院)・講師

研究者番号：60361606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：電位依存性カリウムイオンチャネル(Kv)は、脱分極時にカリウムイオン(K<sup>+</sup>)を選択的に透過することで活動電位を制御する膜タンパク質であり、神経伝達や筋収縮において重要な役割を担う。これまでに、静止膜電位存在下の構造解析手法が無く、膜電位依存的な構造変化様式が不明であった。そこで、本研究は、Kvが膜電位を感受する構造メカニズムの解明を目的とした。我々は、従来法では解析が困難であった膜電位存在下の膜タンパク質の構造解析法を確立した。解析結果より、Kvには膜電位の有無に関わらず構造平衡が存在し、膜電位の大きさに応じてその構造平衡がシフトすることを初めて提唱した。

研究成果の概要(英文)：Voltage-dependent K<sup>+</sup> channels (Kv) regulates active potential by selectively permeating K<sup>+</sup> through cell membrane, playing critical roles in neurotransmission and muscle contraction. To date, voltage-dependent conformational changes of Kv remains elusive, due to lack of the method to analyze the structure under membrane potential. The aim of this study is to reveal structural mechanism of Kv that senses membrane potential. We established a novel method to analyze structure under membrane potential. Based on the results obtained here, we propose that Kv undergoes structural equilibrium that shifts depending upon the membrane potential.

研究分野：構造生物学

キーワード：電位依存性イオンチャネル SS-locking 構造変化

### 1. 研究開始当初の背景

Kv は、脱分極時にカリウムイオン( $K^+$ )を選択的に透過することで活動電位を制御する膜タンパク質であり、神経伝達や筋収縮において重要な役割を担う。Kv は、S1-S6 の6本の膜貫通ヘリックスからなるサブユニットが、4量体を形成することで機能している。各サブユニットは、S1-S4 からなる電位センサードメイン(VSD)と S5-S6 からなるポアドメイン(PD)で構成され、 $K^+$ 透過路はPD同士が組んだ4量体の中央に存在する(Chen, X. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 2010、図1)。

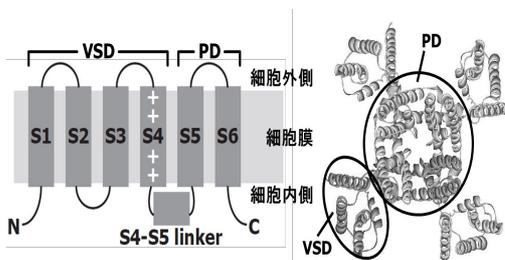


図1: Kv のトポロジー図と立体構造

正電荷を持つ Arg や Lys を多数有する S4 が、静止膜電位存在下では細胞内側に、脱分極時には細胞外側に移行することで、PD の  $K^+$ 透過路の開閉をアロステリックに制御すると想定されている(Swartz, K. J. Nature 2008)。

これまでに明らかとなっている結晶構造はいずれも膜電位非存在下の状態を反映していると考えられている。従来の構造生物学的手法では、膜電位存在下の構造を決定することは困難であり、VSD の膜電位感受機構は不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、電位依存性イオンチャネルの膜電位依存的な動作機構を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) VSD をリボソームに再構成して、VSD 再構成膜に膜電位を形成する手法を確立

した。

(2) VSD の2残基に Cys 変異を導入し、Cys 同士が近接した時に S-S 結合を形成すること(図2)を利用して、2残基が近接するか否かを調べた(SS-locking 解析)。

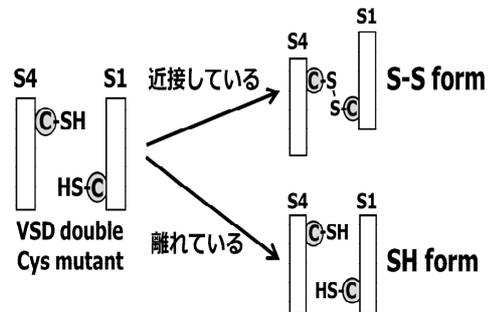


図2: SS-locking 解析の模式図

近接する残基対の探索が可能。

(3) 膜電位依存的に構造変化することが予想される S4 と構造変化しないことが予想される S1 にそれぞれ1残基ずつ Cys 変異を導入し、膜電位非形成時あるいは形成時に近接する残基対を網羅的に探索した。

### 4. 研究成果

36種類の変異体を用いた SS-locking 解析を完了した。解析結果より、膜電位の有無に関わらず、S1 の V55 に対して S4 の C 末端側が近接する up state と N 末端側が近接する down state の間の平衡にあり、中間的な状態はとらないことが示唆された(図3)。また、down state は up state と比較して、S4 が細胞内側に 14 Å 程度移行していた。膜電位非形成時には V55 と S4 の C 末端側が、膜電位形成時には V55 と S4 の N 末端側がより近接したことから、膜電位非形成時には up state に、膜電位形成時には down state に平衡がシフトすることが示唆された。

これまでの研究においては、静止膜電位存在下と脱分極時のそれぞれに単一の構造が想定されていたのに対し、本研究では、膜電位の有無に関わらず VSD に平衡が存在し、膜電位変化に応じて平衡がシフトするモデルを初めて提唱した。

また、本研究を通じて、VSD の down state を分子内 S-S 結合により安定化することに成功し、膜電位存在下の構造情報を取得する技術基盤を確立した。

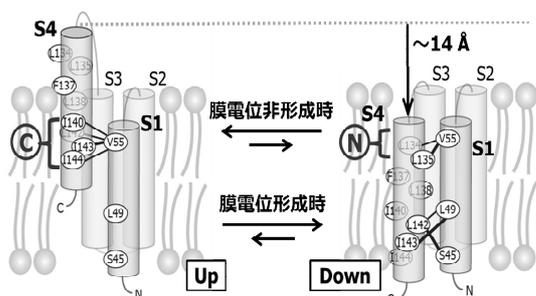


図3：解析結果から考察したVSDの膜電位感受機構の模式図

#### 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 14 件)

Nishida N, Osawa M, Takeuchi K, Imai S, Stampoulis P, Kofuku Y, Ueda T, Shimada I, Functional dynamics of cell surface membrane proteins, J Magn Reson, 査読あり、241, 2014, 86-96, 10.1016/j.jmr.2013.11.007.

Imai S, Osawa M, Mita K, Toyonaga S, Machiyama A, Ueda T, Takeuchi K, Oiki S, Shimada I, "Functional equilibrium of the KcsA structure revealed by NMR.", J Biol Chem., 査読あり、287(47), 2012, 39634-41, 10.1074/jbc.M112.401265.

Osawa M, Hosoda N, Nakanishi T, Uchida N, Kimura T, Imai S, Machiyama A, Katada T, Hoshino S, Shimada I. "Biological role of the two overlapping poly(A)-binding protein interacting motifs 2 (PAM2) of eukaryotic releasing factor eRF3 in mRNA decay.", RNA 査読あり、18(11) 2012, 1957-67, 10.1261/rna.035311.112.

Osawa M, Takeuchi K, Ueda T, Nishida N, Shimada I. Functional dynamics of proteins revealed by solution NMR. Curr Opin Struct Biol., 査読あり、22(5) 2012, 660-9, 10.1016/j.sbi.2012.08.007.

##### 〔学会発表〕(計 13 件)

Osawa M, Mase Y, Yokogawa M, Takeuchi K, Shimada I, "Structural basis for regulation of G

protein-activated inwardly rectifying potassium channel 1 (GIRK1) by G proteins", International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2014年8月27日、Dallas (USA).

Osawa M, Mase Y, Yokogawa M, Takeuchi K, Shimada I, "Structural basis for regulation of G protein-activated inwardly rectifying potassium channel 1 (GIRK1) by G proteins", 日本生物物理学会年会, 2014年9月25日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

大澤匡範、今井駿輔、竹内恒、嶋田一夫、メチル TROSY 法による膜タンパク質の機能調節メカニズムの解明、2014年11月4日、大阪大学(大阪府吹田市)

##### 〔図書〕(計 2 件)

Osawa M, Mase Y, Yokogawa M, Takeuchi K, and Shimada I, Royal Society of Chemistry, Large protein complexes revealed by solution-state NMR: G proteins and G protein-activated inwardly rectifying potassium ion channel, 2013年、32ページ

大澤匡範、今井駿輔、嶋田一夫、丸善、【試料分析講座】「蛋白質の分析」、分析化学会、2012年、34ページ

##### 〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

##### 〔その他〕

ホームページ等  
東京大学大学院薬学系研究科生命物理化学教室  
[http://ishimada.f.u-tokyo.ac.jp/public\\_html/index\\_j.html](http://ishimada.f.u-tokyo.ac.jp/public_html/index_j.html)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大澤 匡範 (OSAWA, Masanori)

東京大学・大学院薬学系研究科・講師

研究者番号：60361606

(2)研究分担者

嶋田 一夫 (SHIMADA, Ichio)

東京大学・大学院薬学系研究科・教授

研究者番号：70196476

(3)連携研究者

( )

研究者番号：