

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：63903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650203

研究課題名(和文)哺乳動物イオンチャネルの機能的発現と分子機構解析

研究課題名(英文)Functional expression of mammalian ion channels and analysis of the molecular mechanisms

研究代表者

古谷 祐詞 (FURUTANI, Yuji)

分子科学研究所・生命・錯体分子科学研究領域・准教授

研究者番号：80432285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：イオンチャネル蛋白質は、様々な刺激に応じてイオンを選択的に透過することで生体電気信号の発生を制御する。このように重要な生理現象を担うイオンチャネルの機能発現の分子機構の解明には原子レベルでの構造情報が必要である。本研究では、医学・薬学分野で重要な哺乳動物由来のイオンチャネルに対して、分子の構造に詳細な情報を与える全反射赤外分光解析を適用した。様々なカリウムチャネルの中から細胞の静止膜電位に関係するKCNK1チャネルが赤外分光解析に有望であることを明らかにし、イオン選択フィルタの構造情報を得ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Ion channel proteins work for selective permeation of ions in response to various stimuli and regulate electrical signals in living organisms. To understand the molecular mechanisms of these channels, the precise structural information with atomic resolution is required. In this study, mammalian ion channel proteins, which are important targets in medical and pharmaceutical sciences, have been studied by attenuated total reflection (ATR) FT-IR spectroscopy which gives us precise molecular information. After screening of several ion channel proteins, we have succeeded to resolve amide I bands of selectivity filter of KCNK1 channel, which is involved in regulation of resting membrane potential of cell, by using ATR FT-IR spectroscopy.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経化学・神経薬理学

キーワード：赤外分光法 イオンチャネル 生物物理学 分子科学 振動分光法

1. 研究開始当初の背景

イオンチャネル蛋白質は、様々な刺激に応じてイオンを選択的に透過することで生体電気信号の発生を制御する。このように重要な生理現象を担うイオンチャネルの機能発現の分子機構の解明には、電気生理学的手法による機能解析だけでなく、原子レベルでの構造情報が必要である。

パッチクランプ法の開発により、イオンチャネルの機能解析は1分子のチャネル電流を計測するまで極限化されている。また、目的の細胞をパッチすることにより、任意の細胞の電気生理応答を生きたまま計測することも可能である。一方、構造情報については数少ない例外を除くと、細菌などのホモログのチャネル蛋白質のX線結晶構造が解かれているのが現状である。これらはモデル構造としては非常に有益な情報を与えるが、一方で医学・薬学分野で研究されているヒト由来または哺乳動物由来イオンチャネルの機能発現の分子機構に直接的に構造情報を与えるものでない。現状では、様々な化学刺激や部位特異的変異による電気生理応答からブラックボックスとなっているイオンチャネルの分子機構を推測している。哺乳動物由来のイオンチャネルを機能的に発現させることが困難であることと、少量のタンパク質試料から構造情報を得る有効な手段が開発されていないことが要因である。

研究代表者は、分子の構造と環境を鋭敏に捉えることが可能な全反射赤外差分分光計測をナトリウムイオン輸送タンパク質であるV-ATPaseに適用し、イオン結合部位の構造情報を得ることに成功している(Y. Furutani et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2011)。また、KcsAについても実験を完了し、イオン選択フィルターの構造情報の取得に成功しつつある状況である。

2. 研究の目的

イオンチャネル蛋白質は、様々な刺激に応じてイオンを選択的に透過することで生体電気信号の発生を制御する。このように重要な生理現象を担うイオンチャネルの機能発現の分子機構の解明には原子レベルでの構造情報が必要である。カリウムイオンチャネル KcsA に代表されるように、いくつかのX線結晶構造が報告されているが、医学・薬学分野で重要なヒト由来のイオンチャネルの構造解析は、タンパク質の機能的発現方法を含めて、極めて困難な課題である。

本研究では、代表者らが中心となって開発を進めている全反射赤外分光法を哺乳動物由来イオンチャネルに適用し、イオンや分子との相互作用やゲートの開閉に関する分子振動の変化から原子レベルでの構造情報の取得を研究目的とした。

3. 研究の方法

本研究は主に以下の2つの研究項目から

なる。

(1) 哺乳動物イオンチャネルの蛋白質発現系構築

(2) 全反射赤外差分分光計測によるイオン結合誘起赤外差スペクトル計測

研究項目(1)では、発現コンストラクトの設計を進めた。具体的に対象とするイオンチャネルとして、研究分担者の中條博士(生理研)が専門とする電位依存性カリウムチャネル KCNQ や、他のカリウムイオンチャネルを対象とした。タンパク質発現量だけでなく、必要に応じて電気生理実験を行い、発現量を上昇させるために導入した変異がチャネル機能に影響しないかを確認する。また、KCNQの発現が困難な場合には、他のカリウムイオンチャネル(内向き整流性Kチャネル Kir2.1 や KCNK チャネルなど)のコンストラクトも設計し、発現量を確認する。

チャネルタンパク質の大量調製に最適なコンストラクトの選別をするために、緑色蛍光タンパク質 EGFP との融合タンパク質を発現させ、蛍光ゲル濾過カラムクロマトグラフィーを利用することで発現したイオンチャネルが正常なコンフォメーションであることを確認する(FSEC 解析)。ピーク強度が最も大きく、かつ目的の分子量(4量体のものでは単量体ではなく4量体の分子量)に相当するピークであるものが最良と判断する。最適なコンストラクトについては His タグを結合したコンストラクトを設計し、哺乳培養細胞にて大量発現を行い、Ni-NTA カラムにて精製を行う。赤外分光計測にはフォスファチジルコリン(PC)等に再構成したものを使う。

哺乳動物由来イオンチャネルタンパク質の試料調製と赤外分光計測への流れ

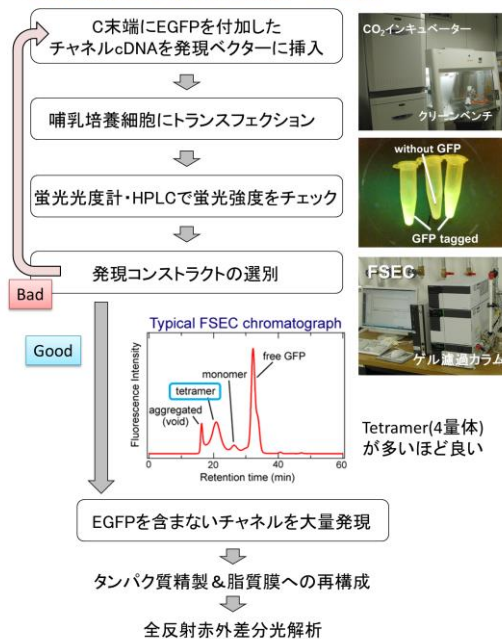


図1 研究方法の概略図

研究項目(2)では、大量調整した哺乳動物由来のカリウムイオンチャネルを脂質膜リポソームへと再構成した試料について、全反射赤外差分光解析を行った。

全反射赤外分光装置の ATR セル上にタンパク質試料を乗せ、乾燥後、緩衝液を灌流させて吸着及び洗浄を行う。その後、任意のイオン組成の緩衝液2液を用意し、両条件間の赤外差スペクトルを計測する。たとえば、カリウムイオンチャネルを透過するカリウムイオン(K^+)と透過しないナトリウムイオン(Na^+)間の差を計測することで、イオン透過経路での K^+ イオン脱着に伴う構造変化に関する情報を得る。これまで KcsA では既に同様の手法により、イオン選択フィルター部位のカルボニル基に由来する変化を計測することに成功している(研究成果:雑誌論文①)ので、本質的には同様の結果が得られるものと期待した。

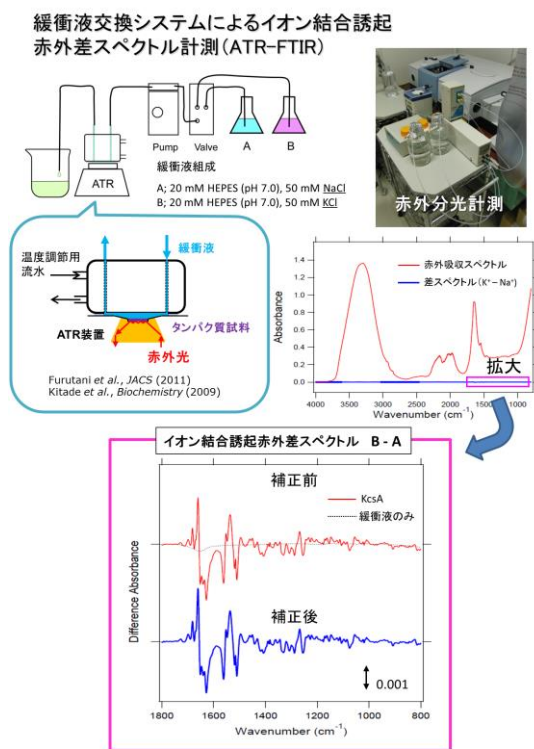


図2 全反射赤外差分光解析

4. 研究成果

(1) KCNQ チャネル

KCNQ1は心臓や内耳ではKCNE1と複合体を構成し、非常にゆっくりとした開閉速度を持つ電位依存性カリウムチャネルを構成する。腸ではKCNE3と複合体を構成し、電位によらず開きっぱなしのカリウムチャネルを構成する。このようにKCNQ1の活性は相互作用するタンパク質によって制御されており、その分子機構は興味深い。本研究では、哺乳培養細胞でのタンパク質発現に向けた条件検討を行った。

哺乳培養細胞での大量発現系を構築するため、中條博士から提供された KCNQ1,

KCNE1 遺伝子を元に、1. human KCNQ1-GFP のみ、2. human KCNQ1-GFP +KCNE1 の発現コンストラクトを作成した。この2種類について、実際に哺乳培養細胞で発現を試みた結果、図3に示すような結果が得られた。

矢印で示したピークが目的とするタンパク質に由来すると考えられるが、イオンチャネル KCNQ1 の発現は顕著には認められなかった。その他にも KCNE3 との共発現も試したが、発現量の向上は確認できなかった。

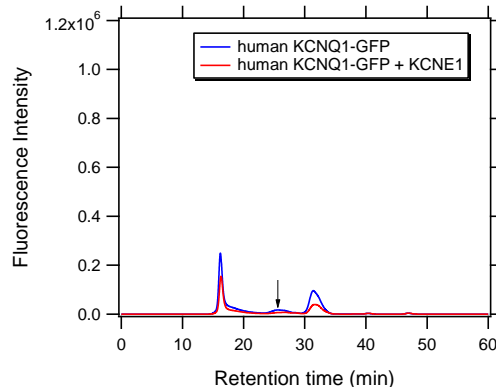


図3 KCNQ1 の FSEC 解析の結果

(2) KCNK-1(TWIK-1)チャネル

KCNK1(TWIK-1とも呼ばれる)チャネルは、2量体で機能するいわゆる two-pore 型カリウムイオンチャネル(K チャネル)の一種であり、刺激を受けていない細胞が示す静止膜電位を生み出す「漏洩」電流に寄与していると考えられている。KCNK1はイオン選択性が他のカリウムチャネルよりも甘く、周辺の環境変化に応じてナトリウムイオンも透過することが知られている。変異体を用いた電気生理解析から、この甘いイオン選択性が、イオン選択性を生み出す選択フィルタと呼ばれる領域にある Thr-118 残基(他の K チャネルでは、この位置は Ile か Val で高度に保存されている)によって生じることが報告されている(Ma et al., Sci. Signal., 2011)。ところが、2012年に報告された野生型の KCNK1 の結晶構造(Miller and Long, Science, 2012)では、選択フィルタの立体構造が、カリウム選択性の高い他の K チャネルの構造と極めて似ており、KCNK1 の甘いイオン選択性を生み出すメカニズムは今なおよく分かっていない。

私たちは中條博士と共同して、KCNK1 など様々な KCNK (two-pore 型)チャネルのコンストラクトを作製し、マウスの KCNK1 がタンパク質の大量調製に適切な試料であることを確認した(図4)。

さらに、培養細胞を用いて大量発現し、ニッケルカラムとゲルろ過カラムを用いて精製することに成功した。そして、精製した KCNK1 の野生型を脂質膜に再構成し、全反射赤外分光(ATR-FTIR)法を用いて、カリウム-ナトリウムイオン交換に伴う赤外吸収スペクトル変化を測定することに成功した(図5)

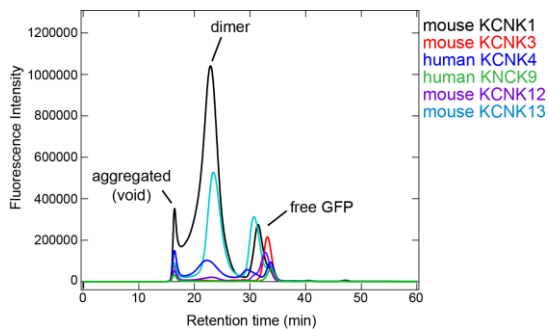


図4 KCNK チャンネル群のFSEC解析の結果

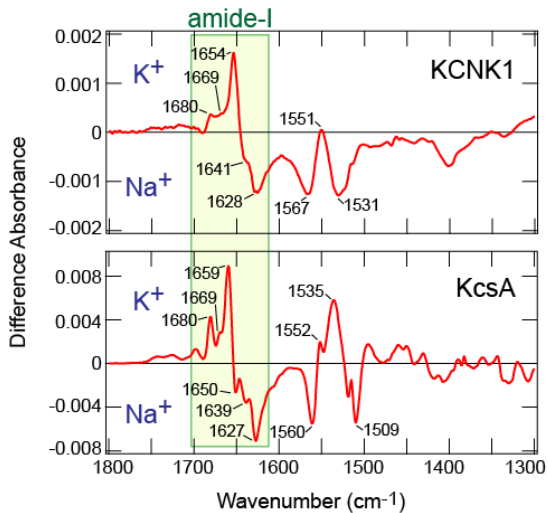


図5 KCNK1 の全反射赤外差分光解析の結果

バクテリアのカリウムチャンネル KcsA の赤外分光解析（研究成果：雑誌論文①）から、選択フィルタ由来のシグナルと同定された amide-I 領域のスペクトル変化は、KCNK1 の野生型と KcsA との間で類似していた（図5）。このことは、KCNK1 を含めてカリウムチャンネルのカリウムイオン結合状態の結晶構造において、選択フィルタの構造が極めて類似していることと一致している。さらに、現在 KCNK1 の各種変異体についてもイオン交換に伴うプレリミナリーなスペクトル変化情報を得ることに成功している。

上述したように、本研究では研究期間内に、タンパク質の大量調製に適した哺乳動物由来のカリウムチャンネルの発現コンストラクトの選別から、実際の試料調製、調整したタンパク質に対する全反射赤外分光解析までを行うことに成功している。実際に解析を行った KCNK1 チャンネルにおいては、緩いカリウムイオン選択性について、イオン選択フィルタの構造から説明することにつながる赤外差スペクトルの計測にも成功した。今後、KCNK1 の変異タンパク質などの解析を進めることで、論文にまとめて発表する予定である。

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 1 件）

- ① Yuji Furutani, Hirofumi Shimizu, Yusuke Asai, Tetsuya Fukuda, Shigetoshi Oiki* and Hideki Kandori*, “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, 3806-10, 2012 (査読有り)
DOI: 10.1021/jz301721f

〔学会発表〕（計 10 件）

- ① Yuji Furutani, “Stimulus-Induced Difference FTIR Spectroscopy on Ion-Channel and Ion-Pump Proteins”, Sixth Korea-Japan Seminars on Biomolecular Sciences: Experiments and Simulations, Nov. 25-27, 2013, Okazaki Conference Center, Okazaki, Japan (招待講演)
- ② 塚本寿夫、中條浩一、久保義弘、古谷祐詞 「哺乳類 two-pore 型カリウムチャンネル TWIK-1 の全反射赤外分光解析」、第 51 回日本生物物理学会年会、2013 年 10 月 28-30 日、京都（京都国際会議場）（ポスター）
- ③ Yuji Furutani, “Water Molecules and Ions in Membrane Proteins Studied by FTIR Spectroscopy”, Annual Meeting on Photochemistry 2013, Sep. 11-13, 2013, Ehime University, Matsuyama, Japan (招待講演)
- ④ Yuji Furutani, “Water Molecules and Ions in Membrane Proteins Studied by Stimulus-induced Difference FTIR Spectroscopy”, Seventh International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy, Aug. 25-30, 2013, Kobe Convention Center, Kobe, Japan (招待講演)
- ⑤ Yuji Furutani, “Stimulus-Induced Difference FTIR Spectroscopy Reveals Structural Dynamics of Membrane Proteins”, 15th Japan-Korea Symposium on Molecular Science Hierarchical Structure from Quantum to Functions of Biological Systems, July 3-5, 2013, Hotel Kitano Plaza Rokkoso, Kobe, Japan (招待講演)
- ⑥ Yuji Furutani, “Water Molecules and Ions in Membrane Proteins Studied by FTIR Spectroscopy”, The 5th International Conference as the 2012 OCARINA Annual International Meeting, Mar. 4, 2013, Osaka City Univ. Media Center, Osaka, Japan (招待講演)
- ⑦ 塚本寿夫、中條浩一、久保義弘、古谷祐詞 「哺乳動物カリウムチャンネルの赤外分光解析」、平成 24 年度 生物物理学会中部支部講演会、2013 年 2 月 19 日、名古屋（名古屋大学）（口頭）
- ⑧ Yuji Furutani, “Ion-protein Interactions Studied by ATR-FTIR Spectroscopy”, 17th Malaysian Chemical Congress (17MCC) 2012,

Oct. 15-17, 2012, Putra World Trade Centre, Kuala Lumpur, Malaysia (招待講演)

⑨ 塚本寿夫、中條浩一、久保義弘、古谷祐詞 「生物物理学的解析を目指した、哺乳培養細胞を用いた哺乳類カリウムイオンチャネルの大量発現の試み」、第50回日本生物物理学会年会、2012年9月22-24日、名古屋(名古屋大学) (ポスター)

⑩ Yuji Furutani, "Ion-Protein Interactions Studied by ATR-FTIR Spectroscopy", The 16th East Asian Workshop on Chemical Dynamics, Apr. 16-19, 2012, National Tsing Hua University, Hsinchu, Taiwan (招待講演)

[図書] (計 1件)

① 古谷祐詞 「微生物型ロドプシンの光誘起イオン輸送メカニズムの解明」、オプトジェネティクスー光光学と遺伝学による行動制御技術の最前線ー (NTS), 69-78, 2013 (4月10日)

[産業財産権]

なし

[その他]

ホームページ等

http://groups.ims.ac.jp/organization/furutani_g/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古谷 祐詞 (FURUTANI, Yuji)
分子科学研究所・生命・錯体分子科学研究
領域・准教授
研究者番号：80432285

(2) 研究分担者

中條 浩一 (NAKAJO, Koichi)
生理学研究所・分子生理研究系・助教
研究者番号：80390699

(3) 連携研究者

塚本 寿夫 (TSUKAMOTO, Hisao)
分子科学研究所・生命・錯体分子科学研究
領域・助教
研究者番号：90579814

(4) 連携研究者

木村 哲就 (KIMURA, Tetsunari)
理化学研究所 播磨事業所・研究員
研究者番号：70506906

(5) 連携研究者

久保 義弘 (KUBO, Yoshihiro)
生理学研究所・分子生理研究系・教授
研究者番号：80211887