

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 15 日現在

機関番号：33811

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25840055

研究課題名(和文)光駆動性イオンチャネルの創製

研究課題名(英文)Engineering of photo-activated ion channels

研究代表者

平野 美奈子(Hirano, Minako)

光産業創成大学院大学・光産業創成研究科・講師

研究者番号：80585167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞機能を光刺激で操作する系を確立するため、K⁺チャネル(KcsA)を改変し、光駆動型のK⁺チャネルやCa²⁺チャネルを創製することを目的とした。1)KcsAチャネルの活性制御に重要な細胞内領域を光感受性LOVドメインに置換した変異体では、リンカーの長さに応じて活性が変化し、35アミノ酸残基のリンカーを持つ変異体は青色光照射下と比べて暗所で高い活性を示した。2)KcsAチャネルの細胞内領域による活性制御では、E146の荷電状態が最も活性に影響を与えていることがわかった。3) KcsAチャネルのフィルター部位への変異導入により、Ca²⁺透過性へ改変することができた。

研究成果の概要(英文)：We aimed to engineer a photo-sensitive K⁺ channel and Ca²⁺ channel by modifying a KcsA channel to regulate cell functions by light. 1) Chimera mutants which had photo-sensitive LOV domains at a cytoplasmic domain of the KcsA showed various activities depending on length of linkers, and the mutant which had a linker consisting of 35 amino acids had higher activity in dark than under blue light. 2) Electrostatic state of E146 at the cytoplasmic domain in the KcsA affected activities. 3) Some mutations in a selectivity filter site in KcsA changed it to be Ca²⁺ permeable.

研究分野：生物物理学

キーワード：イオンチャネル 光感受性

1. 研究開始当初の背景

近年、非侵襲的な光刺激によって活性が制御される蛋白質を用いて、生命現象を制御する方法が発展し、生命現象の解明が大きく進展している。その中でもチャネルロドプシン2は光刺激により陽イオンを透過させる能力を持つため、神経細胞を興奮させるツールとして脳・神経分野で広く使用されている。しかしながら、光刺激により興奮を抑制させるツールについてはまだ開発途上である。また、すべての細胞の機能制御に重要な役割を果たしているCa²⁺を光刺激によって調節する蛋白質も最適なものも作られていない。

我々はこれまでに、K⁺チャネルの一つであるKcsAチャネルの活性制御に重要な部位が細胞内領域であることを明らかにした (Hirano M et al., Biophys. J., 101(9), 2157-2162 (2011)、Hirano M et al., J.Biol.Chem., 285(6), 3777-3783 (2010))。そのため、KcsAチャネルの細胞内領域を他のK⁺チャネルの膜貫通領域に付加したキメラ変異体は、KcsAチャネルと同様の特性を示した。また、他のグループは、KcsAチャネルの膜貫通領域にcAMP依存性チャネルの細胞内領域を付加すると、cAMP依存的に開閉することを報告した (Ohndorf UM and MacKinnon R, J.Mol.Biol., 350, 857-865 (2005))。よって、K⁺チャネルでは、細胞内領域の性質がチャネル開閉制御に関わっており、細胞内領域を変えれば新たな刺激感受性をもつK⁺チャネル、例えば光刺激によって活性化するK⁺チャネル、を創製できる可能性がある。

本研究では、我々の以前のKcsAチャネルの研究から明らかになった活性制御に重要な部位を、光刺激感受性を持つ蛋白質に置換することで、光駆動型のK⁺チャネルを創製することを目標とする。このチャネルは、チャネルロドプシン2と一緒に用いることで、自在に神経細胞の活動をオン・オフすることができ、より明確に神経細胞の機能を解明することができるかと期待される。

2. 研究の目的

(1) KcsAチャネルと光感受性蛋白質またはドメインを用いて、光刺激によって開閉制御が可能なK⁺チャネルやCa²⁺チャネルを創製することを目的とする。

(2) (1)の目的のため、KcsAチャネルの活性制御機構を解明する。

(3) (1)の目的のため、K⁺選択性を持つKcsAチャネルをCa²⁺透過性へ改変する。

3. 研究の方法

(1) KcsAチャネル変異体の作製

Hisタグ付きのKcsAチャネルと光感受性蛋白質(光活性化アデニル酸シクラーゼ(PAC))またはドメイン(LOVドメイン)を融合したキメラ変異体を大腸菌に発現させ、膜画分を

界面活性剤 n-decyl-β-D-maltoside で可溶化した後、TALON affinity column により変異体を単離・精製した。

(2) 脂質平面膜法によるチャネル活性評価

精製した変異体をリポソームに再構成後、電気生理学的手法(脂質平面膜法)により透過するイオンを電流として測定し、活性を評価した。

(3) K⁺輸送欠損大腸菌を用いた活性の評価

K⁺輸送欠損大腸菌TK405mに変異体を発現させ、低濃度のKClを含むプレート上で37℃一晩培養し、大腸菌の増殖能でK⁺の透過能を評価した。

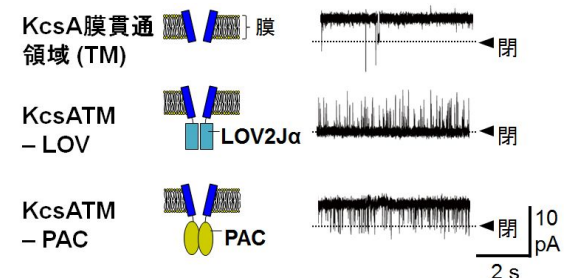
(4) 蛍光色素を用いたKcsA変異体のCa²⁺透過能の測定

KcsA変異体を膜中に再構成したリポソーム内にCa²⁺感受性色素fura2-dextranを組み込み、リポソーム溶液にCaCl₂を最終free Ca²⁺濃度23、57、204、423 nMになるように加えたときの励起波長340 nmと380 nmでの510 nmの蛍光強度を測定した。得られた2つの蛍光強度の比を取り、細胞外Ca²⁺濃度変化に依存したCa²⁺透過の変化を求めた。

4. 研究成果

(1) KcsAチャネルと光感受性蛋白質(PAC)またはドメイン(LOV)を融合したキメラチャネル変異体の創製

KcsAチャネルの活性制御に重要な部位を、光刺激感受性蛋白質PACまたは光感受性LOVドメインに置換し、それらの光刺激による構造変化を利用してKcsAチャネルの活性(開閉)を制御することを検討した。リンカーの長さを変えた数十個の変異体を作製し、電気生理学的手法によりそれらの変異体のチャネル特性(活性)を調べた。その結果、LOVドメインを付加した変異体ではリンカーの長さに応じた活性(開確率)の変化が観察されたが、PACを付加したものの活性はリンカーの長さに関わらず活性状態は変化せず、常に開確率が高い状態であった(下図)。

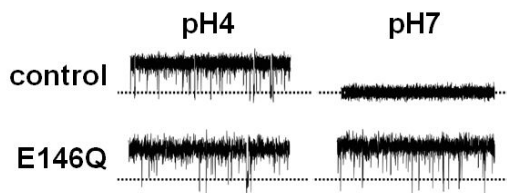


次に、リンカーの長さが違うKcsAチャネルとLOVドメインのキメラ変異体をさらに数個作製し、K⁺輸送欠損大腸菌を用いて活性を評価したところ、9アミノ酸残基以上のリンカーを持つ変異体は高い活性を有すること、また、35アミノ酸残基のリンカーを持つ変異体は青色光照射下と比べて暗所で高い活性を示すと

いう光感受能を持つことが明らかになった。今後は、これらの情報を基にさらにKcsAチャネルを改変し、青色光照射時に高い活性を示すキメラ変異体を作製する予定である。

(2) KcsA チャネルの活性制御機構の解明-1

KcsAチャネルの細胞内領域による活性制御に最も重要なアミノ酸を同定した。以前の研究により、細胞内領域の中性で負の電荷を持つアミノ酸が刺激であるプロトン (pH) の感受とそれによる活性制御に重要な役割を担っていることを明らかにした。今回、細胞内領域の負に荷電したアミノ酸のうち、E146の荷電状態を中性化した変異体E146QではpHに関わらず常に高い活性を示したことから、E146の荷電状態がKcsAチャネルの活性に最も大きな影響を与えていることを明らかにした(下図)。今後は、光感受性蛋白質やドメインの構造変化でE146の荷電状態を操作する仕掛けを作り、KcsAチャネルに光感受能を付与する予定である。

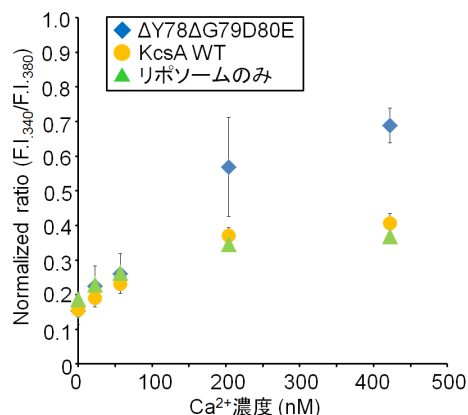


(3) KcsA チャネルの活性制御機構の解明-2

KcsAチャネルのプロトン感受に重要な細胞内領域の荷電状態が、不活性化へ移行する速さだけでなく、イオン選択性へも影響を与えることを明らかにした。KcsAチャネルの細胞内領域の8つの負電荷のアミノ酸をすべて中性化した変異体CPD-nと2つのアミノ酸を中性化したE146QD149Nは不活性化が起こらない上、K⁺選択性も低下した。一方、E146Qの特性は野生型と変わらなかった。これらのことから、D149の荷電状態が不活性化とイオン選択性に大きな影響を与えていることがわかった。今後は、光駆動性KcsAチャネルの作製では、D149の荷電状態には影響を与えないように設計する予定である。

(4) KcsA チャネルのイオン選択性の改変

KcsAチャネルのイオン選択性フィルター部位に3つの変異(Y78 G79 D80E)を導入し、Ca²⁺感受性色素fura2と脂質平面膜法を用いてCa²⁺透過能を調べた。これらの変異は、以前報告された他のK⁺チャネルのイオン選択性をCa²⁺透過性へ改変した変異と相同のものである。Ca²⁺透過能測定の結果、変異体では、Ca²⁺濃度依存的なCa²⁺感受性色素の蛍光特性の変化と(下図) Ca²⁺透過に依る電流が捉えられた。これらのことから、3つの変異導入により、KcsAチャネルをK⁺からCa²⁺透過性へ改変することに成功した。今後は、作製された光駆動性のKcsAチャネルに、これらの変異を導入し、光駆動性Ca²⁺チャネルを創製する予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

M. Hirano, D. Okuno, Y. Onishi, T. Ide, A single amino acid gates the KcsA channel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有、450(4)、2014、1537-1540
DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.07.032

R. Kawano, Y. Tsuji, K. Sato, T. Osaki, K. Kamiya, M. Hirano, T. Ide, N. Miki, S. Takeuchi, Automated parallel

recordings of topologically identified single ion channels, *Scientific Reports*, 査読有、3、2013、1995

DOI: 10.1038/srep01995

〔学会発表〕(計 4 件)

M. Hirano, Y. Onishi, D. Okuno, T. Ide, Coordination between the cytoplasmic domain and the inactivation gate in the KcsA channel, 第51回日本生物物理学会、2013年10月30日、国立京都国際会館(京都府・京都市)

D. Okuno, M. Hirano, Y. Onishi, T. Ide, Reconstitution of ion channel immobilized on solid support into lipid bilayer, 第51回日本生物物理学会、2013年10月30日、国立京都国際会館(京都府・京都市)

M. Hirano, D. Okuno, Y. Onishi, H. Yokota, T. Ide, Modifications of ion channel function, 第52回日本生物物理学会、2014年9月27日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

M. Hirano, D. Okuno, Y. Onishi, T. Ide,
The cytoplasmic domain regulates
inactivation in the KcsA channel、第
53 回日本生物物理学会、2015 年 9 月 14
日、金沢大学・角間キャンパス(金沢県・
金沢市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.gpi.ac.jp/research/teacher/professor-06.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

平野 美奈子 (HIRANO, Minako)

光産業創成大学院大学・光産業創成研究
科・講師

研究者番号：80585167