

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870232

研究課題名(和文)カリウムチャネルにおけるイオン選択性と透過機構を統一的に記述する理論の開発

研究課題名(英文)Development of a theory to describe ion permeation and selectivity through potassium channels

研究代表者

炭竈 享司 (Sumikama, Takashi)

福井大学・医学部・特命助教

研究者番号：30579412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞はイオンチャネルを通る選択的イオン透過を利用して電気シグナルを生成する。そのため、イオンチャネルを通るイオンの選択性と透過は生命にとって必須である。本研究では、このイオン選択性とイオン透過の関係を調べることを目的とした。Punch through法による電流計測は、イオン種によって電流-電圧曲線の線形が異なることを示唆している。この違いを説明するため、分子動力学シミュレーションにより、モデルチャネルを通る電流-電圧曲線の線形とイオン透過の律速段階の関係について解明した。カリウムチャネルを通るナトリウムの電流-電圧曲線は優線形と予想され、これは低電位でのカリウム選択性に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Ion selectivity and ion transports through ion channels are essential for life: Living cells generate electrical signals by utilizing selective ion permeation through channels. The aim of this study is to reveal the relationship between ion selectivity and ion permeation. The electrophysiological measurement employing the punch through method implies that the shape of the current-voltage (i-V) curve differs among ion species. In order to explain this difference, the relationship between the shape of i-V curve and the rate-determining step of ion permeation was analyzed by using the molecular dynamics simulation. The shape of the i-V curve of sodium ions through the potassium channel was predicted to be superlinear, which is considered to contribute to the selectivity for potassium over sodium at low voltage.

研究分野：生物物理学

キーワード：イオンチャネル イオン透過 イオン選択性 分子動力学法 シミュレーション モデルチャネル

1. 研究開始当初の背景

イオンチャネルは、約 60 年前から知られている生体内の細孔である。この膜タンパク質は細胞膜に存在し、細胞内外のイオンの移動を制御することで静止膜電位や活動電位を形成して神経伝導を可能にしている。

教科書的には、イオンチャネルの機能は次のように説明される:「ある種のイオンを高速 (1 秒間に約 1 億個) に移動させるが、同時に他のイオン種に対して約 1000 倍もの高い選択性を有しており、この矛盾したように見える機能を両立させているのがイオンチャネルというタンパク質である」。つまり、イオンの選択的透過こそが、イオンチャネルの機能の根幹である。

1998 年の MacKinnon の K⁺チャネル (K⁺選択的チャネル) の結晶構造解析により¹、この説明は確立したかのように考えられているが、近年その綻びも見つかりつつある。1) イオン透過がなぜ速いのか? という根本的な疑問が、特に分子論的に解決されていない。2) Na⁺溶液中での K⁺チャネルの結晶構造が解かれ、K⁺チャネルに Na⁺の結合する様子 (しかも K⁺とは異なる結合様式で) が観測された²。3) 他の方法による選択性的の見積もりでは、選択性は 6-30 倍とそれほど高くない³。つまり、イオンチャネルにおけるイオンの選択的透過は、単純な問題のようでありながら、実は 60 年以上その解明には到っていない。

2. 研究の目的

実験により報告される選択性は、前述したように、6 倍から約 1000 倍と大きな開きがある。この違いは、選択性の定義の差異に由来するものである。具体的には、6 倍は比較的近年に開発された **punch through** 法による測定、約 1000 倍は伝統的ないわゆる逆転電位の測定から計算された値である。

逆転電位は、細胞内から細胞外への電流が細胞外から細胞内へのそれと逆転する電位である。つまり、電流の流れない電位であり、この電位ではイオン透過が起きない。一方、**punch through** 法による測定では、細胞内外の溶液を KCl 溶液とし、細胞内側にわずかに NaCl を加える³。この状態で細胞内から細胞外への電流を測定すると、NaCl を加えない場合とは電流値が大きく異なり、特に、電流-電圧曲線は特徴的な S 字曲線を描く。重要なことは、この測定法では、イオンが透過している状態での選択性を測定できることである。したがって、イオンの透過と選択性の関係を解明するため、本研究では **punch through** 法により測定される電流-電圧曲線の起源の解明を試みた。

Punch through 法によって測定される S 字の電流-電圧曲線が意味するのは、次のようである。 $V < 100$ mV (V は電位) の低電位では、ほとんどの場合 K⁺が透過し、Na⁺は透過しない。したがって、この電位での電流値は

Na⁺を加えない場合と変わらず、電位の上昇とともに電流値も増加する。 100 mV $< V < 200$ mV では、電位を上げて、驚くことに、電流値は減少する。これは、透過速度の遅い Na⁺が K⁺チャネルに侵入し始めたからと考えられる。 $V > 200$ mV では、電位の上昇に伴い、再び電流が増加する。これは、Na⁺が K⁺チャネルをそれなりの (しかし、K⁺よりは遅い) 速度で透過するためと考えられる。以上の結果は、Na⁺の K⁺チャネルを通る電流は、その値が小さすぎるため実測されたことはないが、もし実測できるなら電流-電圧曲線が優線形 (**superlinear**) になっていることを示唆する。一方、K⁺の電流-電圧曲線は劣線形 (**sublinear**) であることが分かっている。そこで、本研究では、どのような場合に電流-電圧曲線が劣線形になり、どのような場合に優線形になるのかを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

イオン透過の分子レベルでの機構を解明するのに最も適した方法は、分子動力学 (Molecular Dynamics; MD) 法によるシミュレーションによって、具体的な原子の配置に基づきイオン透過を再現して観測することであろう。MD 計算は、いわゆる力場を仮定することで Newton 方程式をコンピュータを用いて数値的に解き、原子の時々刻々の座標・速度を求める方法である。この方法によるシミュレーションは、時間と空間に関して超高解像度の顕微鏡での観測を擬似的に可能にする。

K⁺チャネルの結晶構造は、前述したように、既に解明されているため¹、この構造を用いて MD シミュレーションを行い、上記の電流-電圧曲線の違いの由来を調べるのが最良であると考えられる。しかし、世界最速と言って良い MD 計算に特化した Anton computer を用いた近年のシミュレーションであっても、K⁺の劣線形の電流-電圧曲線を再現できないことが分かっている⁴。そこで、本研究では、カーボンナノチューブに負電荷を付加したモデルチャネル (**Anion-doped nanotube; ANT**) を用いて、どのような条件で電流-電圧曲線が優線形・劣線形になるのかを調べた。具体的には、MD シミュレーションを用いて、ANT を透過する K⁺電流の電位依存性を調べ、電流値を決める律速段階の起源と電流-電圧曲線の線形の関係を調べた。

4. 研究成果

図 1 に MD シミュレーションによって得られた電流-電圧曲線を示す。ANT⁻⁵ (上付の数値は ANT 上の電荷である) を通る電流-電圧曲線は劣線形であり、一方、ANT⁻⁶ を通るそれは優線形である。これは、ANT とイオンとの相互作用に電流-電圧曲線の線形が強く依存することを示している。

研究代表者らは、過去の論文において、

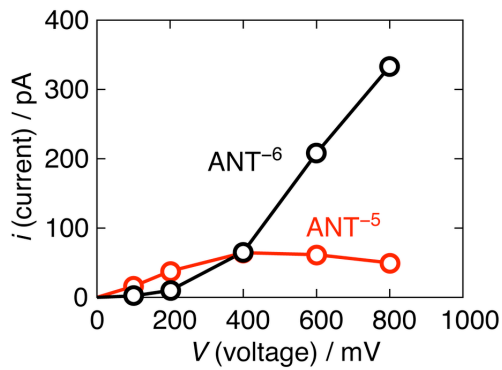


図 1: ANT-5 と ANT-6 を通る電流-電圧曲線。上付の数値は ANT 上の電荷である。

ANT-5 と ANT-6 を通る電流の律速段階の物理的起源を解明している⁵。それによれば、ANT-5 を通るイオン透過はエントロピー律速であり、ANT-6 でのそれは主にイオン間反発に由来するエネルギー律速である。図 1 は、高電圧になるほどエネルギー障壁が電圧によるエネルギーによって減少され、それによって透過速度 (= 電流) が上がることを示唆する。一方、エントロピー律速の場合はそもそもエネルギー障壁が小さいため、電圧をあげても律速段階を超える速度は上がらず、結果として電流は上がらずに飽和する。

このことを確かめるため、状態間の遷移速度を求めた。ANT-5 では、イオン透過は次の状態間遷移を経て起きる： $S_2 \rightarrow S_{2+1} \rightarrow S_3 \rightarrow S_{1+2} \rightarrow S_2$ (図 2A)。この時、律速段階は $S_2 \rightarrow S_{2+1}$ であり、これは次のイオンがチャンネルに入る過程である。この過程は、前述したように、エントロピーに支配されている⁵。このため、電位をあげても、この律速段階を超える速度が上がることはなく (図 2C)、結果として、図 1 に示したような劣線形の電流-電圧曲線 (= 電流の飽和) に帰着する。一方、ANT-6 では、イオン透過は次の状態間遷移を経て起きる： $S_3 \rightarrow S_{3+1} \rightarrow S_{2+2} \rightarrow S_{1+3} \rightarrow S_3$ (図 2B)。この時、律速段階は $S_{3+1} \rightarrow S_{2+2}$ である。これは次のイオンがチャンネルに近づいた後、イオン間反発を乗り越えてチャンネル内に既存する 3 つのイオンを押し流す段階である。図 2D は、電位をあげるほど、この過程のエネルギー障壁が小さくなり、この過程の速度が上昇することを示している。その結果、図 1 で示したような優線形の電流-電圧曲線が得られる。

このモデルチャンネルを用いた研究の結果は、生体内の K^+ チャンネルに関して、次の 2 点の疑問に対する 1 つの回答を示している。

(1) Anton computer を用いた MD シミュレーションが、なぜ実験によって得られた電流-電圧曲線を再現できないか？

(2) K^+ と Na^+ の透過の違いは何か？

(1) に関しては、普通実験によって得られる K^+ チャンネルを通る電流-電圧曲線は劣線形である。しかし、Anton computer によって得られた曲線は優線形である。本研究は、実

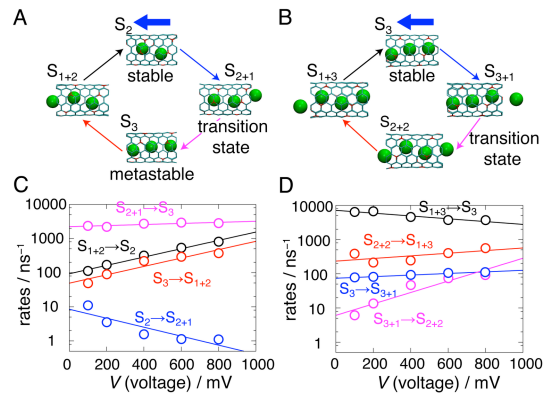


図 2: イオン透過スキームと状態間遷移速度。(A) ANT-5 を通るイオン透過のスキーム。青い太矢印はイオン (緑の球) の流れる向きを示している。イオン透過は次のように起きる： $S_2 \rightarrow S_{2+1} \rightarrow S_3 \rightarrow S_{1+2} \rightarrow S_2$ 。(B) ANT-6 を通るイオン透過のスキーム。イオン透過は次のように起きる： $S_3 \rightarrow S_{3+1} \rightarrow S_{2+2} \rightarrow S_{1+3} \rightarrow S_3$ 。(C) ANT-5 を通るイオン透過の状態間遷移の速度定数の電位依存性。(D) ANT-6 を通るイオン透過の状態間遷移の速度定数の電位依存性。

際の生体内の K^+ チャンネルにおけるイオン透過はエントロピー律速であることを示している。一方、シミュレーションによって得られた優線形の電流-電圧曲線は、律速段階がエネルギー障壁に由来することを示している。この違いは、MD シミュレーションで用いられる古典的パラメータが、律速段階の物理的起源を再現できていないことを示している。

また、本研究は、実験で得られる電流-電圧曲線をシミュレーションによって再現することがいかに難しいかを示している。図 1 は、ANT 上の電荷 $1e$ の違いが電圧-電流曲線の線形を完全に壊してしまうことを示している。 K^+ チャンネルはホモ四量体であることを考えると、これは一量体当たり $0.25e$ の誤差である。したがって、ポテンシャル関数に僅かな誤差が存在するだけで、実験の電流-電圧曲線は再現することが出来ない。換言すれば、これを再現するようにポテンシャル関数を調節することで、より良い古典的パラメータを作ることが出来ると考えられる。

(2) に関して、「2. 研究の目的」で、 K^+ の透過の電流-電圧曲線は劣線形であり、 Na^+ のそれは優線形と予測されると書いた。本研究によれば、 K^+ の透過はエントロピー律速であり、一方、 Na^+ の透過はエネルギー律速であると予想される。近年、次のような Na^+ の K^+ チャンネル内での配位構造が明らかになった： K^+ チャンネルの四量体のそれぞれから 1 つのカルボニル酸素が、また前後の水分子が 1 つずつ Na^+ に配位することで、 Na^+ は K^+ チャンネル内で六配位構造を形成している²。したがって、配位構造的には Na^+ も K^+ チャンネル内に安定に存在することが出来るのである。

Na⁺の方が K⁺よりイオン半径が小さいことを考えると、K⁺チャンネルとの結合力は Na⁺の方が大きいだろう。この大きな結合エネルギーを切断するためにエネルギー障壁が大きくなれば、予想される優線形の電流-電圧曲線を説明できるだろう。

まとめれば、本研究は、電流-電圧曲線の線形の起源を明らかにした。イオン透過がエントロピー律速の場合に電流-電圧曲線は劣線形になり、エネルギー律速の場合に優線形になる。K⁺チャンネルを通る K⁺電流には大きなエネルギー障壁はなく（したがって、電流値も大きい）、エントロピー律速であると考えられる。一方、K⁺チャンネルを Na⁺が透過するにはエネルギー障壁が大きく、それゆえ電流値は実測できないほど小さい。また、そのために、punch through 法から予想されるように、電流-電圧曲線は優線形になると考えられる。

<引用文献>

- ① D. A. Doyle et al. *Science* **280**, 69 (1998).
- ② A. N. Thompson et al. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 1317 (2009).
- ③ W. W. L. Cheng et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 5272 (2011).
- ④ M. Ø. Jensen et al. *J. Gen. Physiol.* **141**, 619 (2013).
- ⑤ T. Sumikama et al. *J. Chem. Phys.* **139**, 165106 (2013).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

- ① 炭竈 享司「Origin of the Shape of Current-Voltage Curve through Nanopores: A Molecular Dynamics Study」*Scientific Reports*、査読有、6巻、2016、25750 DOI: 10.1038/srep25750
- ② 炭竈 享司、三田 建一郎、老木 成稔「Bridging ion permeation and ion selectivity through K⁺ channel」*The Journal of Physiological Sciences*、査読有、66巻、2016、S95
- ③ 炭竈 享司、老木 成稔「Visualization of fluctuating motions of the selectivity filter in the potassium channel: A computational study」*The Journal of Physiological Sciences*、査読有、65巻、2015、S137
- ④ 角野 歩、山本 大輔、炭竈 享司、岩本 真幸、出羽 毅久、老木 成稔「膜内 KcsA カリウムチャンネルの原子間力顕微鏡による構

造と動態解析」*生物物理*、査読有、55巻、2015、5-10

DOI: 10.2142/biophys.55.005

〔学会発表〕(計7件)

- ① 炭竈 享司、三田 建一郎、老木 成稔「K⁺チャンネルを通るイオン透過と選択性をつなぐ」*日本生理学会*、1P-008、2016年3月、札幌コンヴェンションセンター(北海道)
- ② 炭竈 享司、老木 成稔「Difference in ion permeation mechanism through the Kv1.2 and KcsA channels: A molecular dynamics study」*The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies*、890、2015年12月、Hawaii Convention Center (アメリカ)
- ③ 炭竈 享司、三田 建一郎、老木 成稔「A kinetic model describing punch-through of Na⁺ through KcsA potassium channel: イオン透過と選択性を記述する速度論モデル」*日本生物物理学会*、3Pos157、2015年9月、金沢大学角間キャンパス(石川県)
- ④ 炭竈 享司、老木 成稔「K⁺チャンネルの選択性フィルタの構造揺らぎのコンピュータシミュレーションによる可視化」*日本生理学会*、P1-154、2015年3月、神戸国際会議場(兵庫県)
- ⑤ 炭竈 享司、老木 成稔「Fluctuation of carbonyl backbone of the selectivity filter of the Kv1.2 channel during K⁺ permeation」*The 45th NIPS International Symposium, co-sponsored by The Journal of Physiology "Cutting-edge approaches towards the functioning mechanisms of membrane proteins"*、P24、2014年11月、岡崎コンファレンスセンター(愛知県)
- ⑥ 炭竈 享司、齊藤 真司、老木 成稔「Kv1.2でのイオン透過における透過パターンの解析 Analysis on Ion Permeation Pattern through the Kv1.2 channel」*日本生物物理学会*、2P221、2014年9月、札幌コンヴェンションセンター(北海道)
- ⑦ 炭竈 享司「The Ratio of Flux of Water Molecules over that of Ions through Ion Channel Reflects Interactions between Channel and Ions」*OIST Workshops "Single Protein Dynamics in Cellulo 2014: Spatio-Temporal, Structural and Quantitative Analyses"*、25、2014年4月、OIST(沖縄県)

〔産業財産権〕

○取得状況(計1件)

名称: 晶析過程制御方法および装置

発明者：味戸 克裕、上野 祐子、久々津 直哉、芳賀 恒之、斉藤 真司、炭竈 享司
権利者：日本電信電話株式会社、大学共同利用機構法人自然科学研究機構
種類：特許
番号：5704630
取得年月日：平成 27 年 3 月 6 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://t-profile.ad.u-fukui.ac.jp/profile/ja.18d998eff7a2044d520e17560c007669.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

炭竈 享司 (SUMIKAMA, Takashi)

福井大学・医学部・特命助教

研究者番号：30579412