

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15178

研究課題名（和文）光応答性DNAによるK+チャネルKcsAの集合・離散構造の制御と協同的機能の解明

研究課題名（英文）Controlling of the ion channel clustering and collective function by photoresponsive DNA

研究代表者

角野 歩 (Sumino, Ayumi)

金沢大学・新学術創成研究機構・助教

研究者番号：80717140

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：近年、イオンチャネルの離合集散とチャネル機能の関連に関心が寄せられている。本研究の目的は、光応答性DNAをイオンチャネルの架橋剤として利用することでチャネル間距離を精密に制御し、チャネル機能に及ぼす影響について明らかにすることである。適切な配列のDNAを設計することで、室温におけるチャネル間距離の制御に成功した。

研究成果の概要（英文）：Recently, we have focused on the relationship between clustering and dispersion of ion channels and its functions. In this study, we have controlled the distance between channels by using photoresponsive DNA as a crosslinking agent for ion channels. By designing DNA with an appropriate sequence, we succeeded in controlling the distance between channels at room temperature.

研究分野：生物物理学

キーワード：イオンチャネル 光応答性DNA

1. 研究開始当初の背景

様々な生理現象を司る生体内電気信号は、細胞膜中に存在するイオンチャネル分子により制御されている。イオンチャネルが刺激に応じてイオンの通り道を開閉させる働きにより、膜電位が変化して神経伝達が行われる。イオンチャネル分子は細胞膜中で均一に分散するばかりではない。有髄神経のランビエ絞輪における Na⁺チャネルの集積化など、細胞内で局在することがある (図 1)。

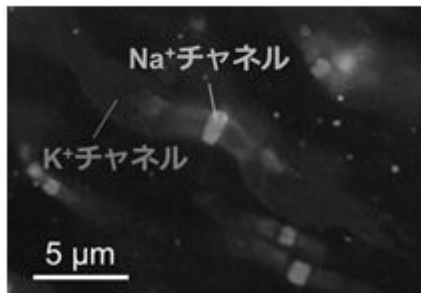


図 1. 有髄神経におけるイオンチャネルの集積化(Rasband, M. N. et al., *Journal of Physiology* **2000**, 525, 63-

pH 依存性カリウムチャネルである KcsA は、中性ではイオンの入り口(ゲート)を閉じてイオンの流れを止め、酸性でゲートを開いてイオンを透過させる。申請者らは近年、膜に再構成した KcsA を開閉各条件下で AFM 観察した。すると興味深いことに、KcsA は閉状態で互いに集合し、開状態では離散するという、チャネル開閉と連動した膜中集合・離散現象を発見した。(図 2 . Sumino, A. et al., *Sci. Rep.* 2013, 3, 1063. Sumino, A. et al., *J. Phys. Chem. Lett.* 2014, 5, 578-584. ACS Live Slides 掲載)。集合・離散状態は個々のチャネル機能(開確率やコンダクタンス)にどのように影響するのだろうか? 酸性でも集合させたチャネルはゲートを開かないのだろうか?

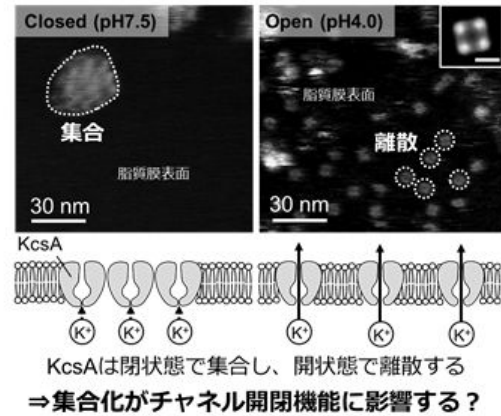


図 2. KcsA のチャネル開閉と連動した膜中集合・離散。AFM 像(上)と模式図(下)。挿入図(右上)は 14 個のチャネルの平均像 (scale bar: 3nm)

2. 研究の目的

本申請では、光応答性 DNA をチャネル間距離の制御分子として応用し、KcsA チャネルの集合・離散状態が個々のチャネル機能(開確率やコンダクタンス)に与える影響の解明を目的とする。

3. 研究の方法

チャネルの集合・離散状態を自在に制御するためのツールとして、DNA を活用する。DNA は配列相補的に二重鎖形成する自己組織化能を有する魅力的な素材である。また、核酸化学の発展に伴い有機化学的に DNA に機能性分子を修飾し、DNA に天然にはない新たな機能を付与することも可能となってきた。そこで、外部刺激によって DNA 二重鎖の形成と解離を制御することが可能な人工 DNA を化学的に調製し、これをチャネルに結合させることで、チャネルの集合・離散状態を制御する。光応答性 DNA とチャネルを化学的に結合するために、光応答性 DNA の片末端をマレイミド修飾し、KcsA チャネルの細胞外ループにシステインを導入した。システインの導入箇所は細胞外ループ中の三箇所を検討し、最も反応性が高いものを選択した。センス鎖、もしくはアンチセンス鎖の光応答性 DNA と KcsA チャネルを結合した後、それぞれの DNA 修飾

チャンネル溶液を等量で混合し、4 で 16 時間程度静置して DNA の二重鎖形成によってチャンネルを二量体化した。

4 . 研究成果

この試料を SDS-PAGE で解析した結果、センス鎖修飾チャンネルとアンチセンス鎖修飾チャンネルが共存したときのみ二量体化が確認されたことから、DNA の二重鎖形成によるチャンネルの二量体化に成功したと考える。さらに、二重鎖を開裂する紫外線を照射すると、チャンネルの二量体が 90%程度減少し、単量体に変化した。単量体にしてから、再度二重鎖を形成する可視光を照射すると、再び二量体化が確認された。以上より、光応答性 DNA をチャンネルの架橋剤として用いることで、光刺激で二量体の形成と解離が制御可能であることを示した。

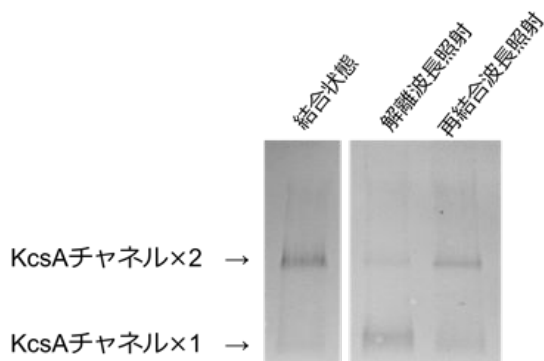
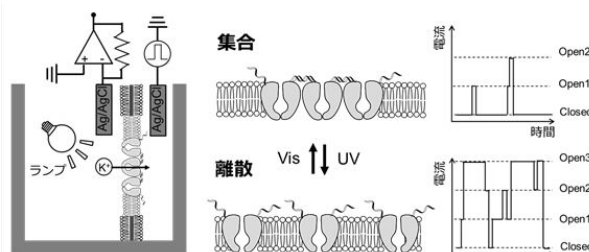


図3 SDS-PAGE 解析の結果

しかし、現状ではチャンネルの DNA 修飾率や光制御実験の再現性が低く、取り扱いの困難なイオンチャンネルだけではなく、より安定な水溶性タンパク質などでも実験系の評価をする必要がある。

チャンネルの集合離散状態の制御の再現性が上がったら、図4のように電気生理測定をする予定である。



光照射でチャンネルの集合・離散を制御しながら、チャンネル電流を記録する

図4. 光応答性 KcsA 集合体の集合・離散状態の光制御下での電気生理測定

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) Sumino, A.; Uchihashi, T.; Oiki, S. Oriented Reconstitution of the Full-Length KcsA Potassium Channel in a Lipid Bilayer for AFM Imaging. J. Phys. Chem. Lett. 2017, 8, 785–793.

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[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：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6 . 研究組織 (1)研究代表者

角野 歩 (Sumino, Ayumi)
金沢大学・新学術創成研究機構・助教
研究者番号： 80717140

(2)研究分担者

神谷 由紀子 (Kamiya, Yukiko)
名古屋大学・工学研究科・准教授
研究者番号： 00527947

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()