

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：63903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15109

研究課題名(和文)哺乳類カリウムチャネルの環境依存的イオン透過制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of molecular mechanisms underlying environment-dependent regulation of ion permeation through mammalian potassium channels.

研究代表者

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

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)：一般にカリウムチャネルはナトリウムイオンを透過しないが、TWIK-1というカリウムチャネルは細胞外環境に応じてナトリウムイオンも透過する。この「緩い」イオン選択性を生み出すメカニズムを明らかにすることをめざして、TWIK-1に対して赤外分光解析と蛍光分光解析を行った。赤外分光解析からは、イオン選択性を生み出す選択フィルタ部位のカリウムイオンに対する親和性が低いことがわかり、蛍光分光解析からは細胞外ドメイン内のイオンの「出入口」が、ナトリウムイオン濃度が高いと広がることを示唆する結果を得た。すなわち、TWIK-1の選択フィルタ部位と細胞外ドメインが協調的にイオン選択性を制御していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内外に電位差を生み出すために重要な、カリウムイオンチャネルがカリウムイオンを通すが、より小さなナトリウムイオンは通さないメカニズムは、主にX線結晶構造解析から明らかにされ、2003年度のノーベル化学賞の対象となっている。TWIK-1の結晶構造も2012年に報告されているが、選択フィルタ部位の構造が他のカリウムイオンチャネルと同一であり、なぜイオン選択性が低いのか不明のままであった。今回の研究成果は、TWIK-1の「緩い」イオン選択性を生み出す分子メカニズムに新しい知見を与えるものであり、カリウムイオンチャネルの機能制御機構をより深く理解する上で意義深いと考えている。

研究成果の概要(英文)：Generally, potassium ion channels selectively permeate potassium ions and block sodium ions to generate potentials across biological membranes. However, some potassium channels, such as a two-pore domain potassium channel TWIK-1, can permeate sodium ions under specific conditions. It is poorly understood how the potassium channels regulate their ion selectivity. We aimed to reveal molecular mechanisms underlying the "loose" ion selectivity of TWIK-1 using infrared and fluorescence spectroscopic techniques. Infrared spectroscopy revealed that the selective filter moiety in TWIK1 possesses lower the affinity for potassium ions. Also, fluorescence spectroscopy showed that an "entry" site for ions in the extracellular domain of TWIK-1 becomes more opened depending on sodium concentrations. These results suggested that the selectivity filter and the entry site in the extracellular domain cooperatively play important roles in unconventional sodium permeability in TWIK-1.

研究分野：タンパク質機能学

キーワード：イオンチャネル 赤外分光 蛍光標識 膜タンパク質

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞膜において、イオンチャネルが特定のイオン種を選択的に透過することは、細胞内外に電位差を生み出し、神経伝達などの生物機能に必須である。例えばカリウムイオン( $K^+$ )を選択的に通す $K^+$ チャネルは、ナトリウムイオン( $Na^+$ )を全く通さないことにより、細胞内 $K^+$ 濃度を高く保っている。カリウムチャネルが $K^+$ より小さな $Na^+$ を通さないメカニズムはX線結晶構造解析から解明され、2003年にノーベル化学賞の対象となっている。

その一方で、すべての $K^+$ チャネルが高い選択性を示すわけではない。例えば静止膜電位の発生に関わる漏洩チャネルである TWIK-1 (KCNK1, K2P1とも表記される)は、細胞外の環境に応じて $Na^+$ も通すことがわかっている。この「緩い」イオン選択性には、 $K^+$ チャネルの高いイオン選択性を生み出す選択フィルタ(図1参照)と呼ばれる部位のアミノ酸配列が TWIK-1 と他の $K^+$ チャネルでは異なっていることが関わることが電気生理学的解析から明らかにされていた。さらに、TWIK-1の結晶構造も2012年に解かれたが、選択フィルタ部位の形状は他の( $K^+$ 選択性の高い) $K^+$ チャネルと同一であり、イオン選択性を制御する分子メカニズムはむしろわからなくなってしまっていた。研究開始時点までの状況をまとめると、TWIK-1が特異な選択フィルタ配列を持つことと、特徴的な細胞外ドメイン(図1)を持つことにより、細胞外の環境変化を細胞外ドメインで何らかのメカニズムによって感知し、選択フィルタ部位に何らかの構造的な変化をもたらすと推測されていた。

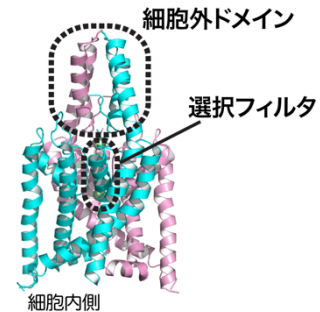


図1: TWIK-1の全体構造

### 2. 研究の目的

本研究では、タンパク質周辺の環境変化(具体的にはイオン環境の変化)に応じて、TWIK-1がどのような構造変化を起こすのかを、選択フィルタ部位については赤外分光を用いて、細胞外ドメインについては部位特異的蛍光標識を用いて解明することを目的とした。得られた結果から、TWIK-1が外部環境に応じてイオン選択性を変化させる分子メカニズムを明らかにすることを目指した。

### 3. 研究の方法

(1) 哺乳培養細胞で強制発現させた TWIK-1 タンパク質を界面活性剤を用いて可溶化し、アフィニティカラムとゲルろ過カラムを用いて精製した。精製した TWIK-1 タンパク質を脂質小胞(リポソーム)に再構成した試料について全反射赤外分光(ATR-FTIR)装置を用いて、外液を様々なイオン種を含んだ溶液に交換した際に生じるタンパク質の赤外吸収スペクトル変化を測定・解析した。

(2) (1)と同様に調製した TWIK-1 タンパク質(細胞外ドメインにシステイン残基を部位特異的変異として導入した)に蛍光標識 Bimane を添加し、細胞外ドメインの特定の位置に蛍光標識した。Bimane 由来の蛍光は、標識部位近傍にトリプトファン残基が存在すると消光されるため、TWIK-1の結晶構造から標識部位近傍にあると推測されるトリプトファン残基を他のアミノ酸に置換した場合に、どの程度蛍光強度が変化するかを指標として、周辺環境が変化した際の細胞外ドメインの変化を解析した。

### 4. 研究成果

(1) 発現・精製した TWIK-1 タンパク質を $K^+$ 存在下でリポソームに再構成した上で、 $Na^+$ を多く含む溶液中に移した際の、脂質膜内外のイオンの移動量について蛍光インジケータを用いて測定し、調製した TWIK-1 およびその変異体が $K^+$ チャネルとして機能を保持していることを確認した。また、名古屋大学の内橋教授との共同研究で、高速原子間力顕微鏡を用いて TWIK-1 試料の形状も測定し、結晶構造解析で明らかになったような特徴的な形の細胞外ドメインを持った精製試料が得られていることを確認した。これらの結果から、本研究で用いた TWIK-1 タンパク質は機能・構造を保った状態で調製できていることを確認できた。

次に、TWIK-1の野生型と、選択フィルタ部位の配列が「普通」の( $K^+$ 選択性が高い) $K^+$ チャネルに合わせた T118I 変異体ならびに L228F 変異体について、外液に $K^+$ を含んだ環境から $Na^+$ を含んだ環境に変化させたときの amide-I 領域の赤外吸収変化を調べた。その結果、野生型と変異体ではおよそ似たスペクトル変化を示したが、 $Na^+$ 側の  $1642\text{ cm}^{-1}$  のバンド強度が野生型で小さくなっていた。これは野生型と変異体とでは、タンパク質と $Na^+$ との相互作用様式に違いがあることを示唆していた。

以前の研究から微生物の $K^+$ チャネルである KcsA について同様の解析をすると、 $1680\text{ cm}^{-1}$ に選択フィルタと $K^+$ との相互作用に対応するバンドが見られることがわかっており、TWIK-1でも同じ位置にバンドが見られた。この結果は、TWIK-1の結晶構造中で $K^+$ が結合した選択フィルタ部位の形状が他の $K^+$ チャネルと同一であったことと一致していた。にもかかわらず TWIK-1ではイオン選択性が緩くなっている原因をより詳細に解析するために、陽イオンとして $Na^+$ のみを含んだ溶液から、 $Na^+$ と $K^+$ を様々な割合で含んだ溶液に交換した際の(選択フィルタ部位と $K^+$ との相互作用に由来する) $1680\text{ cm}^{-1}$ のバンド強度の変化を測定して、 $K^+$ 濃度に対してプロットした。その結果、変異体と比べて、野生型は $K^+$ 結合に伴う $1680\text{ cm}^{-1}$ のバンド強度が、高い $K^+$ 濃度

にしないと変化しない(図2)、言い換えると野生型の選択フィルタにはK<sup>+</sup>が結合しにくくなっていることを示していた。すなわちTWIK-1の選択フィルタはK<sup>+</sup>への結合親和性が低下しており、これはK<sup>+</sup>チャンネルの結晶構造解析が進められる以前の理論的研究からK<sup>+</sup>チャンネルのイオン選択性には選択フィルタとK<sup>+</sup>との高い結合親和性が重要である、との知見と一致した結果であった。

さらに、TWIK-1の野生型・変異体について、K<sup>+</sup>から様々な一価カチオンに溶液中のイオン種を置換した際のスペクトル変化も測定した。その結果、イオン選択性の高い変異体であるT118IやL228Fでは、イオン種ごとに特徴的なスペクトル変化を示したが、野生型では置換するイオン種にかかわらず似たスペクトル変化を示した。これらの結果は、TWIK-1では特異な選択フィルタ配列により、周辺のイオン種が変わっても相互作用様式があまり変化せず、そのことが緩いイオン選択性を生み出していることを示唆していた。

以上のTWIK-1を用いたATR-FTIR解析により、TWIK-1の選択フィルタ部位周辺構造が、環境変化(イオン種の変化)によってどのような構造変化を起こすのかを明らかにすることができ、選択フィルタ部位がTWIK-1の「緩い」イオン選択性にどのように寄与しているのかを考察することができた。これらの結果は2018年に原著論文として発表した(Tsukamoto et al., *J. Biol. Chem.*, 2018)。

(2) TWIK-1などのtwo-pore型K<sup>+</sup>チャンネルには特徴的な円錐型の細胞外ドメインが存在し(図1)、細胞外環境を感知してチャンネル特性を制御する役割を果たしていると推測されていた。しかし、具体的に細胞内環境が変わった際にどのように細胞外ドメインが変化するのか(あるいはしないのか)についての知見はない。また、TWIK-1の結晶構造解析から、細胞外ドメインの中にチャンネルを通過するイオンの「出入口」が存在することが明らかになったが、出入口を構成するアミノ酸残基群についてはdisorderしており、具体的にその出入口がどのような形状をしているのかは不明である。

そこで、細胞外ドメイン中のイオンの出入口を構成するアミノ酸残基に網羅的にシステイン残基を導入し、そのシステイン残基に特異的に蛍光標識Bimaneを結合させて、その蛍光特性から出入口の形状ならびにイオン環境が変化した際に起こる構造変化を解明することを目指した。Bimane由来の蛍光は、近傍にトリプトファン残基が存在すると消光されることが知られており、幸運なことに、TWIK-1のイオン出入口近傍にトリプトファン残基がもともと存在する。すなわち、そのトリプトファン残基が存在するとき、Bimane由来の蛍光を消光しない他のアミノ酸(フェニルアラニンなど)に置換したときの蛍光強度変化を追跡することで、Bimane標識部位すなわちイオン出入口の構造・構造変化を明らかにできると考えた。

まず、TWIK-1にもともと存在するシステイン残基のうちいくつかを構造を保ったまま、他のアミノ酸残基(アラニンやセリンなど)に置換し、「バックグラウンド」の蛍光レベルを最小化した。そのうえで、出入口を形成するが結晶構造ではdisorderしているアミノ酸残基を一つずつシステインに置換した変異体を(1)と同じ条件で精製する過程でBimaneを添加して、蛍光標識を行った。精製したTWIK-1タンパク質について、このチャンネルのイオン選択性が変わることが知られている、K<sup>+</sup>濃度が高い条件と低い(Na<sup>+</sup>濃度が高い)条件下で蛍光スペクトルを測定し、同様の解析を出入口近傍のトリプトファン残基をフェニルアラニンに置換した変異体についても行った。

蛍光スペクトル測定の結果、一つのBimane導入部位において、外液のK<sup>+</sup>とNa<sup>+</sup>との置換に伴う蛍光強度の変化が見られた。具体的にはK<sup>+</sup>濃度が高い条件よりもNa<sup>+</sup>濃度が高い条件

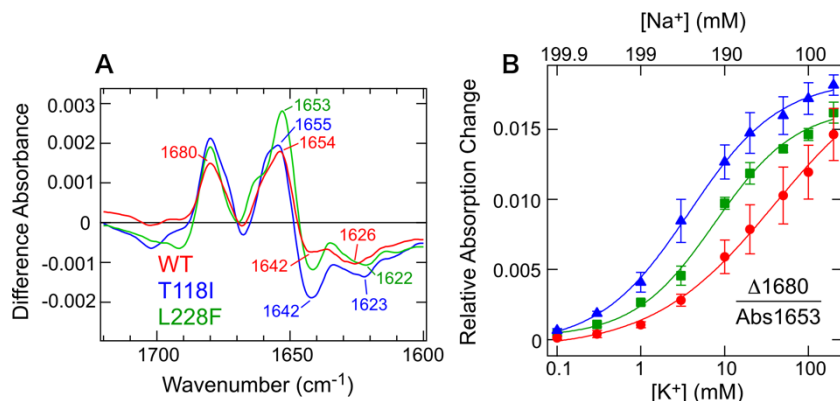


図2: イオン交換に伴うTWIK-1の赤外吸収スペクトル変化  
A: 外液のK<sup>+</sup>をNa<sup>+</sup>に置換したときに生じた赤外差吸収スペクトル  
B: 外液のK<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>の濃度比を変化させた際の1680 cm<sup>-1</sup>のバンド強度変化のプロット

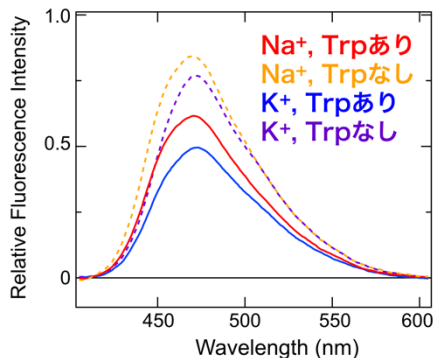


図3: TWIK-1の細胞外ドメインに導入した蛍光標識Bimaneのイオン交換に伴う蛍光強度変化  
K<sup>+</sup>条件に比べて、Na<sup>+</sup>条件の方が蛍光強度が大きくなっていることから、蛍光標識部位と近傍のTrp残基との距離がNa<sup>+</sup>条件で広がっていることがわかる。

において蛍光強度が高くなっており(図 3)、このことは  $K^+$ 濃度が低くなると、Bimane 標識部位とトリプトファン残基との距離が広がることを示唆していた。すなわち、TWIK-1 の細胞外ドメイン中のイオン出入口は、 $K^+$ 濃度が高いと狭まり、低いと広がると考えられた。以前の知見から、TWIK-1 は細胞外の  $K^+$ 濃度が低くなるとイオン選択性が緩くなることが知られており、今回のデータをあわせて考えると、 $K^+$ 濃度の低下に伴い広がる出入口部位の構造と  $K^+$ への親和性の低い選択フィルタ部位が協調的にはたらいで透過するイオン選択性を制御するというメカニズムが考えられた。

以上(1), (2)の研究成果から、TWIK-1 における外部環境の変化に伴う、選択フィルタ部位と細胞外ドメインの変化を明らかにすることができた。

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tsukamoto H, Shichida Y	4. 巻 12
2. 論文標題 Session 2SFA-the symposium "Elucidation of biological functions by optical control" on BSJ2019 at Miyazaki, Japan.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysical Reviews	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12551-020-00640-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nagata Takashi, Koyanagi Mitsumasa, Tsukamoto Hisao, Mutt Eshita, Schertler Gebhard F. X., Deupi Xavier, Terakita Akihisa	4. 巻 2
2. 論文標題 The counterion?retinylidene Schiff base interaction of an invertebrate rhodopsin rearranges upon light activation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-019-0409-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Ayers Thomas, Tsukamoto Hisao, G?hmann Martin, Veedin Rajan Vinoth Babu, Tessmar-Raible Kristin	4. 巻 16
2. 論文標題 A Go-type opsin mediates the shadow reflex in the annelid Platynereis dumerilii	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Biology	6. 最初と最後の頁 41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12915-018-0505-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Tsukamoto Hisao, Higashi Masahiro, Motoki Hideyoshi, Watanabe Hiroki, Ganser Christian, Nakajo Koichi, Kubo Yoshihiro, Uchihashi Takayuki, Furutani Yuji	4. 巻 293
2. 論文標題 Structural properties determining low K+ affinity of the selectivity filter in the TWIK1 K+ channel	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 6969 ~ 6984
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.001817	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tsukamoto Hisao, Chen I-Shan, Kubo Yoshihiro, Furutani Yuji	4. 巻 292
2. 論文標題 A ciliary opsin in the brain of a marine annelid zooplankton is ultraviolet-sensitive, and the sensitivity is tuned by a single amino acid residue	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 12971 ~ 12980
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M117.793539	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 塚本寿夫
2. 発表標題 チャンネル機能の操作ツールとしての無脊椎動物光受容体
3. 学会等名 生理研研究会「イオンチャンネルと生体膜のダイナミズム:構造生物学の先にあるもの」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚本寿夫
2. 発表標題 "総力戦"としての光操作技術
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚本寿夫
2. 発表標題 無脊椎動物オプシンの物性を利用してイオンチャンネルを光操作する
3. 学会等名 The 49th Natl. Inst. Physiol. Sci (NIPS) International Symposium "Ion channels: looking back, seeing ahead" (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚本寿夫, I-Shan Chen, 久保義弘, 古谷祐詞
2. 発表標題 動物プランクトンの脳内紫外光受容体を持つ分子特性
3. 学会等名 「機能タンパク質の構造と機能のダイナミクスと、それに基づく細胞・生体システム作動機構の研究拠点の形成」平成29年度末シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塚本寿夫, 古谷祐詞
2. 発表標題 無脊椎動物が持つ繊毛型オプシンが示す多様な機能特性
3. 学会等名 第20回日本光生物学協会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H. Tsukamoto, Y. Furutani
2. 発表標題 Investigation of ligand-protein interaction in a G protein-coupled receptor via ATR-FTIR spectroscopy.
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hisao Tsukamoto, Koichi Nakajo, Yoshihiro Kubo, Yuji Furutani
2. 発表標題 Infrared spectroscopic and biochemical properties of a mammalian two-pore domain potassium channel TWIK-1
3. 学会等名 The 49th Natl. Inst. Physiol. Sci (NIPS) International Symposium "Ion channels: looking back, seeing ahead" (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塚本寿夫, I-Shan Chen, 久保義弘, 古谷祐詞
2. 発表標題 動物プランクトンの脳ではたらく紫外光受容体の分光・電気生理解析
3. 学会等名 第2回イオンチャンネル研究会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hisao Tsukamoto, Koichi Nakajo, Yoshihiro Kubo, Yuji Furutani.
2. 発表標題 Functional properties and the regulating mechanisms of a mammalian two-pore domain potassium channel TWIK-1
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 塚本寿夫, I-Shan Chen, 久保義弘, 古谷祐詞
2. 発表標題 動物プランクトンの脳ではたらく繊毛型オプシンの分子特性
3. 学会等名 日本動物学会第88回富山大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----