

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007 ～2008
 課題番号：19380058
 研究課題名 (和文) 巨大化した微生物を用いたイオンチャネルの機能解析系の構築と
 輸送体の機能同定
 研究課題名 (英文) Analysis of function of ion channel using giant bacteria and
 identification of membrane transporters
 研究代表者
 魚住 信之 (UOZUMI NOBUYUKI)
 東北大学・大学院工学研究科・教授
 研究者番号：40223515

研究成果の概要：

巨大化酵母の液胞膜を用いた機能解析を行い、たばこKチャネルは特徴的なpH依存性を明らかにした。また、酵母の液胞膜内在性イオン電流を示すイオンチャネルは、Caの有無によって輸送活性が調節を受けることを見いだした。さらにKチャネルに存在する膜電位センサーの形成機構の新規膜組込みとなる、2つの膜貫通領域が相互作用をする様式が一部膜貫通領域の挿入に寄与する様式を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2008年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
年度			
総計	7,800,000	2,340,000	10,140,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：パッチクランプ、イオンチャネル、KAT1、YVC1、酵母

1. 研究開始当初の背景

原核生物および真核生物のイオン輸送系の機能解明の重要性は明らかであるが、機能未知のイオン輸送系の解析手段の限界が機能解明の限界となっている。私たちの過去の成果と最近の予備実験の結果を踏まえて、細胞のサイズが小さいためパッチクランプ法が適用できなかった大腸菌と酵母にパッチクランプ法を適用してイオン輸送系計測方法の構築と新規輸送機能の同定を行なう。

2. 研究の目的

イオン輸送系の機能解明の重要性は明らかであるが、機能未知のイオン輸送系の解析手段の限界が機能解明の限界となっている。本申請では、私たちの過去の成果と最近の予備実験の結果を踏まえて、細胞のサイズが小さいためパッチクランプ法が適用できなかった大腸菌と酵母にパッチクランプ法を適用してイオン輸送系計測方法の構築と新規輸送機能の同定を行なう。酵母液胞膜に発現するイオンチャネルの同定と機能特性が明

らかでは無い植物由来のKチャンネルの測定をすすめる。KAT1チャンネルは宿主細胞に毒性を示すため大量のタンパク質の獲得は非常に困難とされてきた。昆虫細胞発現系を用いた高発現を試みる。また、酵母液胞膜に発現するYVC1チャンネルの巨大化酵母を用いた機能解析を行う。

3. 研究の方法

本研究室で構築と改良を進めてきたパッチクランプ装置を用いて酵母液胞膜パッチクランプ測定をすすめる。タバコから膜電位センサーを持たないタイプのKチャンネル遺伝子をクローン化する。イオン選択性、ポリアミンやCaの添加による活性化を検討する。膜電位センサーの組み込みの検討は試験管内転写、翻訳、膜組み込み系を用いる。またシロイヌナズナKチャンネルKAT1を昆虫細胞に発現させて大量発現を試みる。

4. 研究成果

巨大化酵母の液胞膜輸送系のパッチクランプによる機能解析を行うために、酵母液胞膜に内在するバックグランド電流YVC1遺伝子変異株を作成後、それを用いてタバコから遺伝子を単離したKチャンネル遺伝子の機能を測定した。K選択性の高いチャンネルであることが分かった。細胞質内を酸性化すると(pH5.5)、中性の状態と比較して顕著に活性化されることが分かった。またこのチャンネルのC末端領域にはCa結合領域が存在しており、pH6.5において電流はCaによって2倍程度活性化することが分かった。ポリアミン感受性についても検討した。スペルミジンとスペルミンでKチャンネル電流抑制を受けることが分かった。タバコのポリアミン含量を調べたところ、スペルミジンの濃度がスペルミンやブトレッシンよりも高いことが分かり、何らかの制御を受けている可能性があると考えられた。液胞膜を用いたチャンネル測定系の有効性が示された。

原核生物には膜電位センサーが存在しているが、その作動は動物や植物のチャンネルとは異なることが報告されている。一方、それに反する報告もある。そこで、微生物のKチャンネルと並行して動物のKチャンネルの膜電位センサーの形成機構を明らかにした。膜電位センサーは電荷のあるアミノ酸で構成されていることから、通常の膜組み込みとは異な

り、2つの膜貫通領域が相互作用をして組み込まれることが明らかになった。これは疎水性が低い植物由来のKチャンネルのそれと同じ傾向を示している。今回の動物のチャンネルの結果は、微生物のチャンネルと疎水度の点で同様の傾向にあることから、同じ方式の組み込み様式を示す可能性が高いことが示唆された。

巨大化したK輸送体遺伝子変異酵母の巨大化の調製を試みる際に、酵母の液胞膜内在性イオン電流が観察された。これらは植物のKチャンネルと同様のイオン輸送系が観察された。その本体は原核生物や真核生物に存在する陽イオン輸送体であり植物のイオンチャンネル測定系として利用するにあたり、重要な知見であることからそのイオン特性について検証を行った。Caで活性化されることが明らかとなり、タバコKチャンネルと類似の性質をもつことが明らかとなった。液胞膜輸送変異系酵母においてイオン選択性が低く陽イオンの種類に関係なくイオンを輸送するイオンチャンネル活性のCaによる影響をパッチクランプ法によって検討したところ、Caの有無によって輸送活性が依存することが観測された。このCaはイオンチャンネル電流に影響を与えている可能性と、その作用に加えてCaがイオンチャンネルを透過している可能性の2つが考えられる。今後植物の液胞膜に存在するイオン輸送系の機能解析には、本遺伝子変異株を用いた解析がバックグランド電流を抑制する上で有効であることが示された。

シロイヌナズナの孔辺細胞に発現しているKチャンネルKAT1の構造と機能を明らかにするために、精製系について検討した。昆虫細胞系を用いて全長の蛋白質を生産させたところ、これまでには得られない量の蛋白質を精製することが可能となった。以前に、ペプチドにおいて昆虫細胞系で精製を行われた報告はしているが、今回のように全長の蛋白質が得られたことは、今後のKAT1の機能と構造解析に有効である。

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 6 件)

① Hamamoto, S., Marui, K., Matsuoka, K., Higashi, K., Igarashi, K., Nakagawa, T.,

Kuroda, T., Mori, Y., Murata, Y.,
Nakanishi, Y., Maeshima, M., Yabe, I., and
Uozumi, N.

Characterization of a tobacco TPK-type K⁺
channel as a novel tonoplast K⁺ channel
using yeast tonoplasts.

J. Biol. Chem. 283, 1911-1920 (2008)

査読有

② Hibi, T., Aoki, S., Oda, K., Munemasa,
S., Ozaki, S., Shirai, O., and Uozumi, N.

Purification of the functional plant
membrane channel KAT1

Biochem. Biophys. Res. Commun. 374,

465-469 (2008) 査読有

③ Suga, H., Nagasaki, H., Kondo, T.,
Okajima, Y., Suzuki, C., Ozaki, N., Arima,
H., Yamamoto, T., Ozaki, N., Akai, M., Sato,
A., Uozumi, N., Inoue, M., Hasegawa, M.,
and Oiso, Y.

Novel treatment for lithium induced
nephrogenic diabetes insipidus rat model
using the Sendai-virus vector carrying
aquaporin 2 gene

Endocrinology, 149, 5803-5810, (2008)

査読有

④ Hamamoto, S., Yabe, I., and Uozumi, N.

Electrophysiological property of NtTPK1
expressed in yeast tonoplast

Biosci. Biotech. Biochem., 72, 2785-2787,

(2008) 査読有

⑤ Zhang, L., Sato, Y., Hessa, T., von
Heijne, G., Lee, J-K., Kodama, I.,
Sakaguchi, M., and Uozumi, N.

Contribution of hydrophobic and
electrostatic interactions to the
membrane integration of the Shaker K⁺
channel voltage sensor domain

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104, 8263-8268

(2007) 査読有

⑥ Kato, N., Akai, M., Zulkifli, L.,
Matsuda, N., Kato, Y., Goshima, S., Hazama,
A., Yamagami, M., Guy, H. R., and Uozumi,
N.

Role of positively charged amino acids in
the M2_D transmembrane helix of
Ktr/Trk/HKT-type cation transporters.

Channels 1, 161-171 (2007) 査読有

[学会発表] (計 9 件)

① 佐藤愛子、谷口光隆、三宅博、梅澤泰史、
篠崎一雄、後藤デレック、魚住信之
KAT1 のリン酸化によるK⁺輸送活性調節
日本農芸化学会 2009 年度大会 平成 21 年 3
月 27-29 日、福岡

② 四十九俊彰、飯塚龍、松本秀之、新井史
人、魚住信之
マイクロ流路を用いたラン藻の高浸透圧ス
トレスに対する適応機構のリアルタイム観
察
第 50 回日本植物生理学会年会 平成 21 年 3
月 21 日、名古屋

③ 浜本晋、矢部勇、魚住信之
タバコ液胞型Kチャンネルの酵母を用いたパッ
チクランプ解析
日本生体エネルギー研究会第 34 回討論会
平成 20 年 11 月 7 日、東京

④ 四十九俊彰、松本秀之、赤井政郎、新井
史人、魚住信之
マイクロ流路を用いたラン藻の浸透圧適応
のリアルタイム観察
第 60 回日本生物工学会大会、平成 20 年 8 月
28 日、仙台

⑤ 浜本晋、森泰生、中西洋一、前島正義、
矢部勇、魚住信之
植物K⁺チャンネルの酵母液胞膜を用いたパッチ
クランプ法による特性評価
第 60 回日本生物工学会大会、平成 20 年 8 月
28 日、仙台

⑥ 魚住信之
細胞の膨張と収縮に関するイオンチャネ
ル

日本農芸化学会 2008 年度大会シンポジウム
平成 20 年 3 月 26-29 日、名古屋

⑦ 浜本晋、森泰生、矢部勇、魚住信之
酵母の液胞膜に発現しているイオンチャネルの性質

日本農芸化学会 2008 年度 平成 20 年 3 月
26-29 日、名古屋

⑧ 佐藤愛子、谷口光隆、三宅博、Franco
Gambale、Ingo Dreyer、後藤デレック、魚住
信之

シロイヌナズナ K チャネル KAT1 のリン酸化
による K 透過調節とリン酸化部位の検討
第 49 回日本植物生理学会 平成 20 年 3 月
20-22 日 札幌

⑨ Nobuyuki Uozumi

Structure and function of K channel and
Na/K transporter

The 2nd Membrane Protein Conference, 2007,
11, Daejeon Korea

6. 研究組織

(1) 研究代表者

魚住 信之 (UOZUMI NOBUYUKI)
東北大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：40223515

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし