

平成22年 4月30日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20710161
 研究課題名（和文） イオン輸送系の構造形成過程および活性調節機構の解明
 研究課題名（英文） Biogenesis of ion transporters and analysis of their functional regulation
 研究代表者
 佐藤 陽子（SATO YOKO）
 東北大学・大学院工学研究科・助教
 研究者番号：40455803

研究成果の概要（和文）：

膜電位依存性 K チャネル（Kv）は、基本構造として6回の膜貫通部位（S1～S6）を持ち、膜電位センサー（S1～S4）の S4 には多くの正電荷残基が存在する。本研究では、古細菌の Kv チャネル（KvAP）の膜電位センサーの組み込み様式について、ウサギ網状赤血球由来タンパク質合成系およびイヌ臍臓由来の粗面小胞体を用いた *in vitro* 解析を行った結果、KvAP の構造形成過程は、植物や昆虫の Kv チャネルとは異なる挿入機構を経ることが分かった。

研究成果の概要（英文）：

The voltage sensors in voltage-dependent potassium channels (Kv channels) consist of the highly positively charged segment, S4, and the negatively charged segments, S2 and S3. How can such highly charged protein domains be efficiently inserted into biological membranes? In this study, we used *in vitro* translation and translocation experiments to evaluate interactions between residues in the voltage sensor of an archaeal potassium channel, KvAP, and their effect on the final topology in the endoplasmic reticulum (ER) membrane. These results suggest that insertion mechanism of the KvAP is different from plant and insect Kv channels.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：膜タンパク質、トランスロコン、トポロジー、生体膜、チャネル

1. 研究開始当初の背景
 近年膜タンパク質の機能の解析は急速に | 進められているが、膜への組み込みなどの構造形成過程については理解が遅れている。

我々は植物や動物由来の膜輸送体を解析し、新規トポロジー形成様式を発見した。しかし、未だトポロジー形成機構が不明な膜輸送体は多く存在する。また、膜輸送体は水溶性タンパク質因子による活性調節機構の存在が示唆されており、それらの機構解明が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、微生物・植物・動物のチャネルやトランスポーターなどを研究対象に用いて、膜タンパク質の構造形成過程および活性調節機構の解明を目指し、(1)膜貫通構造(トポロジー)形成過程および(2)水溶性タンパク質の脂質修飾による生体膜への移行プロセスを解析すること目的とした。また、膜輸送体とはトポロジー形成機構が異なるC末端アンカー型膜タンパク質について、膜挿入に必要な疎水性の指標を作成する。

3. 研究の方法

本研究では、膜タンパク質がトポロジー形成をした後ミリスチル化やパルミトイル化などの脂質修飾された調節因子と相互作用し、必要な活性を発揮するまでを明らかにする。そのために、まずマルチスパン型膜タンパク質・C末端アンカー型膜タンパク質・イオンチャネル調節因子候補の中から解析モデルを選出し、遺伝子をクローニングする。クローニングした遺伝子をベースに、解析用タンパク質(コンストラクト)遺伝子を設計し無細胞タンパク質合成系用の発現ベクターに挿入し、コンストラクトの合成を行う。トポロジー解析用のコンストラクトに関しては、種々のマーカ部位を導入することで膜貫通部位の配向を明らかにしたのち、解析結果をもとに改変コンストラクトを設計し、タンパク質全長のトポロジー形成過程解析を行う。また放射性標識ミリスチン酸を添加して調節因子の合成を行い、ミリスチル化の有無を明らかにする。無細胞タンパク質合成系を用いた解析と並行して、酵母を用いた生体内パルミチン酸修飾の解析も行う。

(1)解析用タンパク質(コンストラクト)の設計

以下のチャネル・トランスポーター・C末端アンカー型膜タンパク質およびイオンチャネル調節因子候補をクローニングする。マルチスパン型膜タンパク質(トポロジー解析): 好熱菌由来 K^+ チャネル(KvAP)、シロイヌナズナ由来 K^+ トランスポーター(AtKUP1)

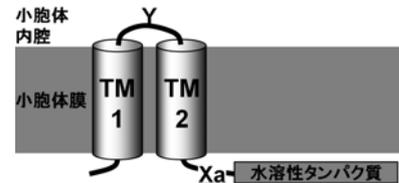
C末端アンカー型膜タンパク質(トポロジー解析): 小胞体型シトクロム b5、Sec61 α 、シナプトブレビン II (すべてヒト由来)

イオンチャネル調節因子候補(脂質修飾解析): CPK1~34、CBL1~9、PEPRK、SnRK

(すべてシロイヌナズナ由来)

上記でクローニングしたKvAPなどの膜タンパク質遺伝子に標識となる糖鎖付加・部位特異的タンパク質分解酵素などを効果的に挿入し、トポロジー解析用コンストラクトを設計する(図1)。また、CBLなどに存在するミリスチン酸修飾モチーフ配列にマーカとなる水溶性タンパク質を融合したミリスチル化解析用コンストラクトを設計する。(2)無細胞タンパク質合成系を用いたコンストラクトの合成

作成したコンストラクトは放射性標識アミノ酸を添加した無細胞タンパク質合成系を用いて合成する。トポロジー解析用のコンストラクトはイヌ臍臓由来小胞体膜を添加することで小胞体膜へ組み込ませ、糖鎖付加やプロセッシング反応を行う。ミリスチル化解析用コンストラクトは、放射性標識アミノ酸のかわりに放射性標識ミリスチン酸を添加してタンパク質合成することで修飾反応を行う。



(図1) トポロジー解析用コンストラクトの例。

膜貫通部位(TM)の前後に糖鎖付加部位(Y)、部位特異的タンパク質分解酵素認識部位(Xa)、マーカ水溶性タンパク質などを導入し、トポロジーを決定する。

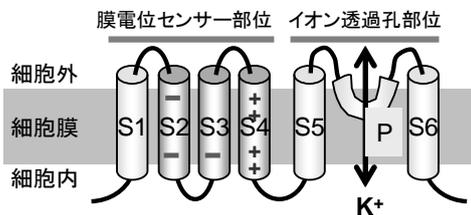
(3)酵母を用いた生体内パルミチン酸修飾の解析

パルミトイル化されたタンパク質は、その多くがミリスチル化されているが、パルミトイル化反応は翻訳後修飾であり無細胞タンパク質合成系で検出することはできない。そこで、酵母を用いてパルミトイル化を検出する。ミリスチル化が検出されたタンパク質を抗体認識タグ付きで酵母で発現させ、放射性標識パルミチン酸を添加した培地で培養したのち、目的タンパク質を免疫沈降しSDS-PAGE、フルオログラフィによってパルミトイル化の有無を検出する。

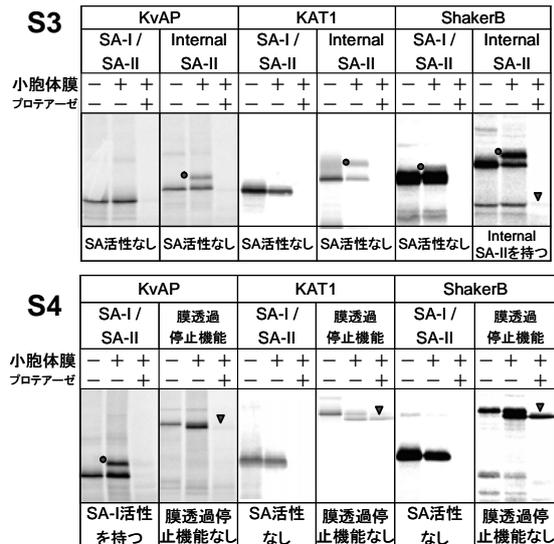
4. 研究成果

膜電位依存性Kチャネル(Kv)は、基本構造として6回の膜貫通部位(S1~S6)を持ち、膜電位センサー(S1~S4)のS4には数個の正電荷残基が存在する(図2)。このためS4は通常は比較的親水性が高く、疎水的環境である膜への挿入機構は不明であった。我々は、

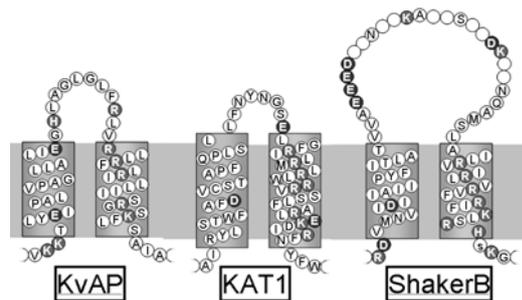
ショウジョウバエの Kv チャンネル Shaker においては S3 がその高い疎水性により自立的に組込まれ、S4 には通常の膜挿入機構で組込まれる能力があるが、シロイヌナズナの Kv チャンネルである KAT1 の S4 は S3 と一体となって膜へ組込まれることをすでに報告してきた。本研究では、細菌の KvAP の膜電位センサーの組込み様式について、ウサギ網状赤血球由来蛋白質合成系およびイヌ膵臓由来の粗面小胞体を用いた *in vitro* 解析を行った。その結果、KvAP の S3 は組込み特性を持たないが、S4 は N 末端側を小胞体内腔へトランスロケートさせる活性 (SA-I 活性) を持つことが見出された (図 3)。しかし、KvAP S4 の SA-I 活性は比較的弱いものであり、S4 の N 末端側に大きな水溶性ドメインを融合した場合において、SA-I 活性が阻害されることが分かった。このため、S4 の SA-I 活性によって強制的に膜内に引き込まれた S3 が正常な位置で停止するためには、S3-S4 間のループ長が短いこと、および静電相互作用の寄与が必要なことが示唆された。KvAP の S3-S4 間ループ内の残基にマーカーとして糖鎖付加部位を導入しループ長を調べたところ、KvAP の S3-S4 間ループは KAT1 同様に短いことが分かった。KAT1 の場合、S3-S4 間の相互作用が組込みに必要であることが分かっており、KvAP においても同様に相互作用が必要であるため、ループ長が短くなっていることが示唆された (図 4)。KvAP S2 および S3 内の負電荷残基、S4 内の正電荷残基に注目し、電荷を変化させるような部位特異的変異を導入した場合、S2 内の Asp72 と S4 内の Arg123 および Arg126 の静電相互作用が示唆される結果を得た (図 5 および 6)。KAT1 や Shaker においても、相同部位に静電相互作用が検出されていた。従って、KvAP、KAT1 および Shaker の S3・S4 部位の組込み開始機構は異なっているが、膜貫通部位を安定化するための静電相互作用部位は保存されていることが明らかになった。



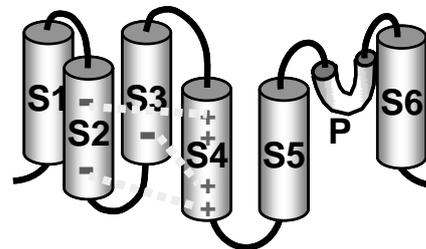
(図 2) Kv チャンネルの基本構造
S1~S4 (膜電位センサー) と S5-P-S6 (イオン透過孔部位) からなり、S2 および S3 には負電荷残基、S4 には多数の正電荷残基が存在する。



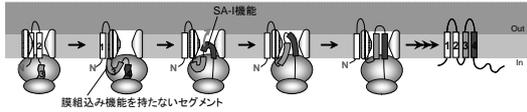
(図 3) Kv チャンネルの膜貫通機能解析
Shaker-S3 は SA-II 活性を持ち、自立的に膜に挿入することができるが、KvAP や KAT1 の S3 には活性が無いため、自立的に膜挿入することはできない。KvAP では S4 の SA-I 活性により S3 が同時に膜へ引き込まれる経路が考えられる。



(図 4) Kv チャンネル S3-S4 間のループ長比較
KvAP と KAT1 はループ長が短く、Shaker は長いことが分かった。



(図 5) KvAP の組込み時における残基間相互作用
S4 の膜組込み活性によって S3 が組込まれ、S2 内の Asp72 と S4 内の Arg123 および Arg126 の静電相互作用によって安定化されることが示唆された。



(図6) KvAPの組み込みモデル

S4の補助によってS3が組み込まれ、S2との相互作用によって安定化される。この様式は、植物や昆虫のKvチャンネルとは一部が異なるものであった。

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)

[学会発表] (計2件)

1. 三島枝里子、佐藤陽子、張麗艷、阪口雅郎、魚住信之
K⁺チャンネル膜電位センサーのトポロジー形成機構の解明
第82回日本生化学会大会、2009年10月22日、神戸市
2. 佐藤陽子、三島枝里子、張麗艷、阪口雅郎、魚住信之
K⁺チャンネル膜電位センサーの形成機構の解明
日本生化学会東北支部第75回例会、2009年5月9日、仙台市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 陽子 (SATO YOKO)

東北大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：40455803

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし