

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月28日現在

機関番号：12601  
研究種目：基盤研究（C）  
研究期間：2009～2011  
課題番号：21590040  
研究課題名（和文） 電位依存性イオンチャネルにおける電位センサーとイオンゲートとの動作連関  
研究課題名（英文） Motional linkage between voltage sensor and ion gate in voltage-dependent ion channels  
研究代表者  
大澤 匡範（OSAWA MASANORI）  
東京大学・大学院薬学系研究科・助教  
研究者番号：60361606

## 研究成果の概要（和文）：

電位依存性イオンチャネルは、膜電位を感受する電位センサードメイン（VSD）とイオン透過路を有するポアドメイン（PD）からなる。本研究では、VSD中の2残基をシステイン（Cys）に置換した変異体を用いて、どの部位のCys同士間にジスルフィド(SS)結合が形成されるかを調べ、膜電位依存的なVSDの構造変化様式を明らかにした。また、VSDと、阻害毒素との結合様式をNMRにより明らかにし、毒素がVSDに作用しPDにおける電流を阻害する機構を解明した。

## 研究成果の概要（英文）：

Voltage-dependent ion channels consist of a voltage-sensor domain (VSD) and a pore domain possessing the ion permeation pathway. This study demonstrated how VSD changes its conformation in a voltage-dependent manner, by a disulfide-locking method using a series of double cysteine mutants. In addition, the binding mode between VSD and its inhibiting toxin, analyzed by NMR, revealed the inhibition mechanism of the toxin.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：構造生物学

## 1. 研究開始当初の背景

電位依存性イオンチャネルは、膜にかかる電位勾配に応じてイオン透過路を開閉させ、膜内外のイオン濃度差に従って受動的にイオンを透過させる蛋白質である。活動電位、ホルモンや神経伝達物質の分泌、心臓の拍動、卵細胞への複数の精子の受精阻害など、その

生理機能は多岐にわたり、生命の維持に重要な役割を果たしている。

電位依存性カリウムチャネル(Kv)は、電気生理学的機能解析に加え、MackinnonらによるKvAP、Kv1.2などの結晶構造解析(Jiang et al. Nature 2003; Long et al. Science 2005, etc) や、Perozoらの電子スピン共鳴

(ESR) 研究(Perozo et al. Science 1999)など、最も構造・機能研究が進んでいるイオンチャネルである。Kv は四量体として機能ユニットを構成しており、各サブユニットは電位センサードメイン(VSD)と、イオン透過路を形成するポアドメイン(PD)からなる。いずれも静止膜電位において閉状態にあり、脱分極刺激によりVSDが構造変化を起こしそれがPDに伝わり開口する。したがって、チャネル開閉制御機構を解明することは、電位変化によるVSDの構造変化からPDの開口への構造メカニズムを明らかにすることに他ならず、生物学的に非常に重要である。

VSDについては、これまでに、部位特異的変異体を用いた電気生理学的研究などにより、VSD中の4本の膜貫通ヘリックス(S1-S4)のうち、S4が電位センサーであることが明らかにされている。しかし、チャネルのgatingに必要なS4あるいはVSD全体の構造変化については、いくつかのモデルが提唱されているものの解明には至っていない。特に、電位がかかった状態(閉状態)におけるKvの構造は未解明である。

一方、VSDに結合しKvを阻害するgating modifier toxinを用いることにより、VSDならびにKvを不活性化状態に移行させることができる。Gating modifier toxinは一旦生体膜に分配してからVSDと結合することが知られており、このような相互作用系には、試料調製法としてのBPL、分子間相互作用の解析法としてのTCS、ASCSなど、我々独自の手法によってはじめて解析可能となる。さらに、最新のNMR手法として、メチルTROSY法による巨大蛋白質のNMRシグナルの直接観測、およびNMR緩和解析にもとづくマイクロ秒～ミリ秒オーダーの運動性解析法(Korzhnev et al. J. Am. Chem. Soc., 2004)が報告され、これら最新の手法を、前述の我々独自の手法に取り入れることで、これまで単一の状態のsnapshotとしての結晶構造に、分子各部位の運動性・構造変化の情報を加えることができ、Kv開閉の動的な構造メカニズムを解明できると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、電位依存性カリウムイオンチャネルを解析対象として、gatingに伴うVSDおよびPDの構造変化・ダイナミクスをNMRにより明らかにし、イオンチャネル開閉機構を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、電位依存性カリウムチャネルおよびそれを阻害する毒素を、NMRで観測可能な安定同位体で標識し、各種NMR手法により、VSDと毒素との相互作用様式を明らかにした。

VSDの膜電位依存的な構造変化を解析するために、S1およびS4に1残基ずつのCysを導入したdouble Cys mutantを作製し、これらの残基間でS-S結合が形成されたかどうかを、SDS-PAGEにおけるバンドの移動度、および、遊離のSH基の修飾により調べた。

## 4. 研究成果

VSDと、VSDに結合しチャネルを阻害する毒素との分子認識様式を解明した。まず、結合親和性を、等温滴定型熱量計を用いて明らかにした。また、各種三重共鳴実験により毒素の主鎖NMRシグナルの連鎖帰属を行った。均一 $^2\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ 標識を施した毒素に対する、界面活性剤およびVSD添加時のNMRスペクトル変化、および、交差飽和法の解析を行った。その結果、毒素のどの残基が、界面活性剤中のアシル基およびVSDと相互作用しているかを同定することに成功した。また、毒素が結合した際のVSDの構造変化部位は、毒素結合部位近傍に限られていることから、毒素が電位のかかかっていない脱分極時のVSDと選択的に結合することが示唆された。さらに、アミノ酸選択的交差飽和法により、VSDと毒素の相互作用残基対を同定し、両者の複合体モデルの構築に成功した。VSDに結合する毒素の結合部位は、これまでに変異体を用いた解析により同定されたにすぎなかったが、今回、これらの分子認識の構造基盤が得られた。また、今回用いた界面活性剤のアシル基は、脂質二重膜中のものと類似している。交差飽和法によって、脂質との相互作用と、VSDとの相互作用が観測されたことは、毒素が脂質二重膜中に分配した状態でVSDと結合するといった脂質二重膜中のタンパク質-タンパク質相互作用を反映していると想定できる。

また、DMミセル中で、還元剤あるいは酸化剤を添加した試料をSDS-PAGE解析したところ、酸化後では還元後よりも移動度の小さなバンドが観測され、質量分析により、これらのCysは修飾を受けない、すなわち分子内S-S結合を形成した分子種であることが判明した。

各変異体について、膜電位の有無による分子内S-S結合形成能の違いを評価した。その結果、形成電位0 mVのときにS-S結合が形成された変異体、形成電位188 mVのときにのみS-S結合が形成された変異体、形成電位によらずS-S結合が形成されない変異体の同定に成功した。これらの結果から、静止膜電位が形成されている際には脱分極時に比べ、VSD中の4番目のヘリックスが180度軸回転し、15Å細胞内側にシフトしていることが明らかとなった。このこ

とは、静止膜電位存在下での近接残基対を蛋白質レベルで直接示した初めての例である。

#### 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 11 件)

- ① Mase Y, Yokogawa M, Osawa M, Shimada I. Backbone resonance assignments for G protein  $\alpha$ (i3) subunit in the GTP-bound state. *Biomol NMR Assign.* 査読あり, 2012, in press.
- ② Maruyama T, Imai S, Osawa M, Hattori M, Ishitani R, Nureki O, Shimada I. Backbone resonance assignments for the cytoplasmic region of the  $Mg^{2+}$  transporter MgtE in the  $Mg^{2+}$ -unbound state. *Biomol NMR Assign.* 査読あり, 2012, in press.
- ③ Yokogawa M, Osawa M, Takeuchi K, Mase Y, Shimada I. NMR Analyses of the G $\beta\gamma$  Binding and Conformational Rearrangements of the Cytoplasmic Pore of G Protein-activated Inwardly Rectifying Potassium Channel 1 (GIRK1). 査読あり, 2011, *J. Biol. Chem.* 286, 2215-2223. DOI: 10.1074/jbc.M110.160754
- ④ Kanamori E., Igarashi S., Osawa M., Fukunishi Y., Shimada I., Nakamura H. Structure determination of a protein assembly by amino acid selective cross-saturation, 査読あり, *Proteins.* (2011) 79, 179-190. DOI: 10.1002/prot.22871
- ⑤ Ruan L., Osawa M., Hosoda N., Imai S., Machiyama A., Katada T., Hoshino S., Shimada I. Quantitative characterization of Tob interactions provides the thermodynamic basis for translation termination-coupled deadenylase regulation. 査読あり, *J. Biol. Chem.* (2010) 285(36), 27624-27631. DOI: 10.1074/jbc.M110.138867
- ⑥ Yoshiura C., Kofuku Y., Ueda T., Mase Y., Yokogawa M., Osawa M., Terashima Y., Matsushima K., Shimada I. NMR analyses of the interaction between CCR5 and its ligand using functional reconstitution of CCR5 in lipid bilayers. 査読あり, *J. Am. Chem. Soc.* (2010) 132(19), 6768-6777. DOI: 10.1021/ja100830f
- ⑦ Imai S., Osawa M., Takeuchi K., Shimada

I. Structural basis underlying the dual gate properties of KcsA. 査読あり, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2010) 107(14), 6216-6221. DOI: 10.1073/pnas.0911270107

- ⑧ Igarashi S., Osawa M., Ozawa S., Shimada I. Backbone resonance assignments for the ligand binding subunit of the histidine permease complex (HisJ) from *Escherichia coli*, under histidine-bound and unbound states. 査読あり, *Biomol. NMR Assign.* (2010) 4(1), 17-20. DOI: 10.1007/s12104-009-9200-6
- ⑨ Yokogawa M., Muramatsu T., Takeuchi K., Osawa M., Shimada I. Backbone resonance assignments for the cytoplasmic regions of G protein-activated inwardly rectifying potassium channel 1 (GIRK1). 査読あり, *Biomol. NMR Assign.* (2009) 3(1), 125-128. DOI: 10.1007/s12104-009-9156-6
- ⑩ Osawa M., Yokogawa M., Muramatsu T., Kimura T., Mase Y., Shimada I. Evidence for the direct interaction of spermine with the inwardly rectifying potassium channel. 査読あり, *J. Biol. Chem.* (2009) 284(38), 26117-26126. DOI: 10.1074/jbc.M109.029355
- ⑪ Shimada I., Ueda T., Matsumoto M., Sakakura M., Osawa M., Takeuchi K., Nishida N., Takahashi H. Cross-saturation and transferred cross-saturation experiments. 査読あり, *Prog. Nuc. Magn. Reson. Spect.* (2009) 54, 123-140. DOI:10.1016/j.pnmrs.2008.07.001

[学会発表] (計 12 件)

- ① 原田 瞳、Structural investigation of voltage-sensing mechanism of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels, 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 14 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ② 小澤 新一郎、Structural basis for the inhibition of voltage-dependent potassium (Kv) channels by gating modifier toxins, 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 14 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ③ Toyama Y. NMR analysis of the gating mechanism of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel, KirBac, 日本薬学会年会, 2011 年 3 月 29 日、ツインメッセ静岡 (静岡)
- ④ Mase Y. Structural basis for the specificity and efficiency of the

- G-protein signaling in GIRK-gating, 日本分子生物学会・日本生化学会合同学会, 2010年12月10日, 神戸ポートアイランド(兵庫)
- ⑤ Ozawa S. Development of residue selective cross-saturation method for modeling a large protein-protein complex, NMR 討論会, 2010年11月16日, タワーホール船堀(東京)
  - ⑥ Imai S. Structural basis underlying the dual gate properties of KcsA, NMR 討論会, 2010年11月16日, タワーホール船堀(東京)
  - ⑦ Toyonaga S. Transferred Cross-Saturation Method under Magic Angle Spinning for Structural Analysis of Protein - Protein Interaction at the Solid - Liquid Interface, NMR 討論会, 2010年11月16日, タワーホール船堀(東京)
  - ⑧ Ozawa S. Development of residue selective cross-saturation method for modeling a large protein-protein complex, 国際生体系磁気共鳴学会, 2010年8月16日, Cairns (オーストラリア)
  - ⑨ Imai S. Structural basis underlying the dual gate properties of KcsA, 国際生体系磁気共鳴学会, 2010年8月16日, Cairns (オーストラリア)
  - ⑩ Toyonaga S. Transferred Cross-Saturation Method under Magic Angle Spinning for Structural Analysis of Protein - Protein Interaction at the Solid - Liquid Interface, 国際生体系磁気共鳴学会, 2010年8月16日, Cairns (オーストラリア)
  - ⑪ Mase Y. Structural basis on the specificity and efficiency of the G-protein signaling for the GIRK-gating, 日本分子生物学会, 2009年12月9日, パシフィコ横浜
  - ⑫ Izawa N. Structural basis of the inhibitory mechanism of collagen-binding to vWF and  $\alpha 2\beta 1$  integrin mediated by leech product LAPP, 日本分子生物学会, 2009年12月9日, パシフィコ横浜

[その他]

ホームページ等

[http://ishimada.f.u-tokyo.ac.jp/public\\_html/](http://ishimada.f.u-tokyo.ac.jp/public_html/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大澤 匡範 (OSAWA MASANORI)  
東京大学・大学院薬学系研究科・助教  
研究者番号：60361606

### (2) 研究分担者

嶋田 一夫 (SHIMADA ICHIO)  
東京大学・大学院薬学系研究科・教授  
研究者番号：70196476