

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06030

研究課題名（和文）カリウムチャンネルKcsAの脂質内高分解能構造解析によるゲーティング機構の解明

研究課題名（英文）High-resolution structural analysis of potassium channel KcsA in lipids to elucidate the gating mechanism.

研究代表者

高崎 寛子（Takazaki, Hiroko）

大阪大学・蛋白質研究所・助教

研究者番号：50610432

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、イオンチャンネルのモデルタンパク質であるKcsAの構造解析を行い、多様に存在するイオンチャンネル間の共通のゲーティング機構を明らかにすることを目的としている。目的達成のため、ナノディスク技術を用いて、生体内と同じ脂質二重膜内に存在するKcsAの構造解析を行うこととした。本研究では、KcsAの活性が確認されているPOPEとPOPGの3:1混合脂質を用い、KcsAを含むナノディスク形成に成功した。これにより、今後の構造解析の基盤を作ることができた。また、KcsAを脂質二重膜内に埋め込んだ状態でのMDシミュレーションを開始し、動態解析やこれまでの構造解析の結果を含め、議論を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カリウムチャンネルのKcsAは、分子量70 kDaと非常に小さく、チャンネル機能を示す最小単位と考えられる。その膜貫通部位の構造は、原核生物からヒトに至るまで高く保存され、さらにナトリウムやカルシウムのイオンチャンネルとも共通する。KcsAの結晶構造は、KcsAを界面活性剤で可溶化し、さらに抗体を結合させた、特殊な構造であったため、より生体内に近い自然な状態での高分解能構造取得が求められている。本研究によりナノディスク形成に成功したことで、KcsAの構造解析によってイオンチャンネル共通のゲーティング機構を解明する基盤が整ったことは学術的に意義深く、それを用いた機能解析など、応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on KcsA, a model protein for ion channels, to elucidate the common gating mechanism of diverse ion channels, and attempted to analyze the structure of KcsA in lipid bilayers, the same as in vivo, using nanodisc technology. We have successfully formed nanodiscs containing KcsA using a 3:1 mixture of POPE and POPG lipids, which have been shown to be active in KcsA. This provided the basis for future structural analysis. We have also started MD simulations of KcsA embedded in lipid bilayers and are discussing the results, including diffracted X-ray tracking and the results of previous structural analysis.

研究分野：構造生物学

キーワード：チャンネルタンパク質 クライオ電子顕微鏡 単粒子解析 ナノディスク

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

イオンチャネルは、全生物のあらゆる細胞に存在する膜タンパク質であり、膜内外の化学的・物理的刺激を受容し、これに応じてイオン流のオン・オフを行う、「ゲーティング」と呼ばれる機能を持つ。放線菌 *Streptomyces lividans* のカリウムチャネルである KcsA は、分子量 70 kDa と非常に小さく、チャネル機能を示す最小単位と考えられる。KcsA は pH 依存性チャネルで、中性条件では Closed 状態となりイオンを流さず、酸性条件で Open 状態となってイオンを透過させる。KcsA のゲーティング機能を示す膜貫通ドメインの基本構造は、原核生物からヒトに至るまで高く保存され、さらにナトリウムやカルシウムのイオンチャネルとも共通している。このことから、KcsA は多くのイオンチャネルのゲーティング機構における共通原理を保持していると考えられ、イオンチャネルのモデルタンパク質として様々な研究が進められている。すでに、KcsA 全長の Closed 状態・擬似 Open 状態の構造が X 線結晶構造解析で解かれている(Uysal et al. PNAS. 2009, Uysal et al. PNAS. 2011)。しかし、両者の構造は極めてよく似ており、わずかな構造差しか確認できず、その構造変化とゲーティングの分子機構に対して疑問が残っている。事実、X 線 1 分子追跡法では、Open 状態で KcsA の大きな回転運動が示されたが(Shimizu et al. Cell. 2008)、これは X 線結晶構造解析で解かれた Open 状態には見られず、その構造が生体内での Open 状態を反映していないことが示唆された。このことから、X 線結晶構造解析よりも、生体内に近い、より自然な状態での高分解能構造解析が求められている。

そのため、研究代表者はこれまでに、中性条件でも酸性条件でも機能する両親媒性ポリマーを用いて KcsA を可溶化し、クライオ電子顕微鏡・単粒子解析法を用いて構造解析を行ってきた。その結果、Closed 状態と Open 状態間で大きな構造差異が確認された。研究代表者が用いた両親媒性ポリマーは、界面活性剤に替わる膜タンパク質の可溶化材料として近年多く用いられているが、脂質を含まないため、膜タンパク質の自然な状態を反映しているとは言い難い。一方、近年注目を集めるナノディスク技術は、膜タンパク質の周りを脂質二重膜が覆う形で可溶化するため、膜タンパク質をより自然に近い構造で保持できるとされている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、イオンチャネルのモデルタンパク質である KcsA の構造解析を行い、多様に存在するイオンチャネル間の共通のゲーティング機構を明らかにすることである。そのために、ナノディスク技術を用い、生体内と同じ脂質二重膜内にある KcsA を精製し、KcsA の Closed 状態と Open 状態の構造をクライオ電子顕微鏡・単粒子解析法を用いて明らかにする。pH 刺激によって、KcsA がどのようにして大きな構造変化を生み出しているのかを明らかにすることで、イオンチャネル共通のゲーティング機構を解明する。

### 3. 研究の方法

#### (1) MSP の発現・精製

ナノディスクの材料となる membrane scaffold protein (MSP)を準備した。この時、分子量が 70 kDa と非常に小さな KcsA に対応できるよう、形成ナノディスクの直径が小さい、MSP1D1(ナノディスク直径 9.6 nm)と MSP1E3D1(ナノディスク直径 12.1 nm)の 2 種類を発現・精製した。精製した MSP と使用脂質候補の 1 つでもある大豆脂質を用いてナノディスク形成を確認した。まず、MSP と大豆脂質混合溶液をゲルろ過クロマトグラフィーにかけ、ピークを分取した。分取した溶液を負染色法により電子顕微鏡観察し、粒子の形状を確認した。その後、KcsA の活性が確認されている、POPE と POPG の 3:1 混合脂質を用いて、大豆脂質と同様の実験を行なった。

#### (2) KcsA ナノディスク作製の最適化

POPE と POPG の 3:1 混合脂質を用いて KcsA を含むナノディスクを形成させ、形成条件の最適化を行なった。脂質混合液、MSP と KcsA をさまざまな量比で混ぜたのち、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて、分子サイズごとに分取した。分取した溶液を用いて SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動と負染色法による電子顕微鏡観察により、KcsA を含むナノディスクの形成を確認した。

### 4. 研究成果

#### (1) MSP の発現・精製

MSP1D1 と MSP1E3D1 の発現・精製により得られた精製物と大豆脂質を混合し、ゲルろ過クロマトグラフィーを行った結果、複数のピークが確認された。ピークごとに溶液を回収し、それらを負染色法により電子顕微鏡観察した結果、クロマトグラフィー前半で見られるボイド領域では、大きなリボソームと思われる構造が確認された。一方、後半の分子半径の小さいピークでは、想定しているナノディスク直径と同じサイズの粒子が確認された。このことから、発現・精製した MSP がナノディスク形成能を持つことが確認できた。

次に、POPE と POPG の 3:1 混合脂質を用いて大豆脂質と同様の実験を行なった。さらに MSP

と脂質の混合比を変えた実験も行なった。その結果、大豆脂質と同様の結果を得たため、POPE と POPG の 3:1 混合脂質でも、ナノディスクを形成できることが確認できた。さらに、混合する脂質の量を減らすことで、目的ナノディスクのピークがメインピークになることも確認できた。

## (2) KcsA ナノディスク作製の最適化

POPE と POPG の 3:1 混合脂質と MSP、KcsA をさまざまな量比で混ぜ、ナノディスク形成条件の最適化を行なった。ゲルろ過クロマトグラフィーでは、KcsA を含まない空のナノディスクに比べ、KcsA を含むナノディスクでは、分子半径が大きい方にわずかにピークがシフトすることが確認できた。このピークを分取し、その溶液を用いて SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った結果、MSP と KcsA がともに存在することが確認できた。負染色法による電子顕微鏡観察では、均質な大きさのナノディスクが観察され、さらに、KcsA がナノディスク内に埋め込まれたような像を得ることができた。このことから、KcsA ナノディスク作製の最適化に成功したと言える。この結果を元に KcsA ナノディスクを大量精製し、クライオ電子顕微鏡観察を行う。

その他、マイクロ流路を用いた KcsA の動体解析において、中性条件から酸性条件、酸性条件から中性条件への溶液変換に成功し、溶液変換による KcsA の動体変化を観測した。今後、さらにデータ取得を進め、現在考えている KcsA の閉構造から開構造への構造変化モデルを再検討する。また、MD シミュレーションも開始した。KcsA を脂質二重膜内に埋め込み、膜の内外のイオン濃度を変えながら、MD 計算を行なった。現在、電子顕微鏡構造マップによる拘束条件を含め、計算の精密化を進めている。KcsA のゲーティング機構を解明する準備は着実に整ってきている。生体内に近い状態での KcsA の構造変化モデルの提唱のため、KcsA の高分解能構造取得を急ぎたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yusuke Asagoe, Hirofumi Shimizu, Yoshikazu Hirai
2. 発表標題 Microfluidic-Based Diffracted X-ray Tracking Method for Precise Recording of Ion Channel Motion in Response to Sequential Chemical Solution Changes
3. 学会等名 The 27th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yusuke Asagoe, Hirofumi Shimizu, Yoshikazu Hirai
2. 発表標題 Microfluidic Device for Diffracted X-ray Tracking Method to Measure the Conformational Change of Ion Channel in Response to Chemical Stimuli
3. 学会等名 The 19th IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 浅越雄介, 清水啓史, 平井義和
2. 発表標題 pH変化に対するKcsAイオンチャネルの運動応答を解析するためのX線1分子動態計測用流体デバイス
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第47回研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 琴屋健太郎, 山内一慶, 清水啓史, 平井義和
2. 発表標題 化学刺激によるイオンチャネル構造変化を解析する1分子動態計測技術
3. 学会等名 第40回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiroko Takazaki, Hirofumi Shimizu, Takuo Yasunaga
2. 発表標題 KcsA K+ Channel Structure Incorporated into Nanodisc
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroko Takazaki, Hirofumi Shimizu, Takuo Yasunaga
2. 発表標題 Structural Basis for pH-gating of the K+ channel KcsA
3. 学会等名 日本顕微鏡学会2022年度若手シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hirofumi Shimizu, Hiroko Takasaki, Yoshikazu Hirai, Takuo Yasunaga
2. 発表標題 A new gating model of K+ channel based on cryo-EM structures and single-molecule dynamics measurements with x-ray
3. 学会等名 日本生理学会 第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiroko Takazaki
2. 発表標題 Conformational Changes of KcsA K+ Channel upon Gating
3. 学会等名 the PDB 50th Anniversary Symposium in Asia (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高崎寛子, 清水啓史, 安永卓生
2. 発表標題 カリウムチャネルKcsAの開閉にともなう構造変化 Conformational Changes of KcsA K+ Channel upon Gating
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高崎寛子, 清水啓史, 安永卓生
2. 発表標題 カリウムチャネルKcsAの開閉時の構造変化 Conformational Changes between the Closed and Open States in KcsA K+ Channel
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第64回シンポジウム
4. 発表年 2021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
研究 分担者	清水 啓史  (Shimizu Hirofumi)  (50324158)	福井大学・学術研究院医学系部門・講師   (13401)	
研究 分担者	安永 卓生  (Yasunaga Takuo)  (60251394)	九州工業大学・大学院情報工学研究院・教授   (17104)	

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------