

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659097

研究課題名(和文) Kチャネル選択性のメカニズムの解明

研究課題名(英文) The mechanism of the selectivity of potassium channels.

研究代表者

三田 建一郎 (Mita, Kenichiro)

福井大学・医学部附属病院・特命助教

研究者番号：30529342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：代表的なKチャネルであるKcsAチャネルを使用し、脂質平面膜法で単一イオンチャネル電流を計測する電気生理学的実験を行い、Kイオン選択性のメカニズム解明に挑んだ。

Kイオンよりも小さな直径のNaイオンやLiイオンは、Kチャネルの途中までは入り込むことができるが、Kチャネルを通過できないことが明らかになった。また、Naイオンの方がLiイオンよりも容易にKチャネルに入り込みやすいことがわかった。

研究成果の概要(英文)：We challenged to uncover the mechanism of the selectivity of the potassium channel. The channel currents of a mutant E71A was measured using the planar lipid bilayer method under a bi-ionic condition (extracellular: 200 mM KCl, intracellular: 200 mM NaCl or LiCl). Inward K⁺ currents were readily observed, while no outward Na⁺ or Li⁺ currents were detected. When the membrane potential was applied to flow K⁺, K⁺ currents were detected after a short latency. This indicates that the channel was blocked by Na⁺ or Li⁺ and released with latency. And with different membrane potentials, we elucidated that Na⁺ can enter the channel more easily than Li⁺.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：イオンチャネル 選択性 脂質平面膜法 単一チャネル電流 チャネル病

1. 研究開始当初の背景

イオンチャネルの大きな特徴の一つは、様々なイオン種の中から特定のイオンだけを厳密に選択し透過させることである(フィルタ機能)。特に K チャネルは静止膜電位の形成に関わり、神経細胞などの興奮性細胞が正しく機能するためにはその重要性は非常に大きい。近年、二次性高血圧症の代表的疾患である原発性アルドステロン症の原因の一つが K チャネルの選択性の消失であることがわかった(Choi et al, Science 2011)。KCNJ5 と呼ばれるこのチャネルは、K イオンに対する選択性が消失する結果、細胞外から Na イオンが細胞内へ流入し膜電位が脱分極し、電位依存性 Ca チャネルが活性化してしまう。最終的にアルドステロンが過剰に産生され、さらに細胞増殖を引き起こすというメカニズムである。この事実から、より詳細で根本的な病態の理解および治療法の開発のためにも K チャネルの選択性のメカニズムに関する情報は必須である。

これまでに KcsA チャネル(代表的 K チャネル)の X 線結晶構造解析によって、チャネルにはフィルタと呼ばれるイオンの選択を行っている部位があり、そこには 4 つの K イオン結合部位があることがわかった。これらの結合部位に対して適切なサイズのイオンだけが結合でき、このサイズに適合しない大きなイオンや小さなイオンは結合できないことで選択性が生じると考えられた(Snug-fit 仮説)。しかし、このフィルタに K イオン以外のイオンが結合している結晶構造が得られ、この仮説に疑問がもたれた。タンパク質の結晶構造では、生理的な時間領域ではフィルタに入ることがほとんどないイオンが結合してしまう可能性があるが、チャネルのイオンを透過させる現象は 10^7 個/秒のオーダーと非常に速く、イオン選択性の解明にはこのスピードを考慮しなければならない。つまり、結晶構造解析だけでは限界が

あり、電流計測は欠かせない方法である。

2. 研究の目的

本研究では、代表的な K チャネルである KcsA チャネルを使い、脂質平面膜法と呼ばれるユニークな方法で電気生理学的実験を行う。チャネルのフィルタには本当に K イオン以外のイオンが入り込むことができないのか、入り込むならばどの部位までか、K イオンとの入りやすさに違いがあるのかを定量的に評価し、イオン選択性のメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、イオンの流れである電流を計測することによって K イオン以外のイオンがフィルタ内に入っていくことができるのか、もし入ることができるのであればどこまで入るのか、そしてフィルタに入る時の入りやすさには K イオンと違いがあるのか、ということ調べる。

イオンチャネルの研究分野では、従来パッチクランプ法が用いられてきたが、細胞膜にもともと存在する別のイオンチャネル及び細胞内に存在するタンパク質等の影響を取り去ることができないという重大な欠点が存在する。一方、脂質平面膜法(図1)は、電解質溶液中に人工的に脂質二重膜(すなわち擬似細胞膜)を作成し、その中に精製した目的のイオンチャネルを組み込む。これに

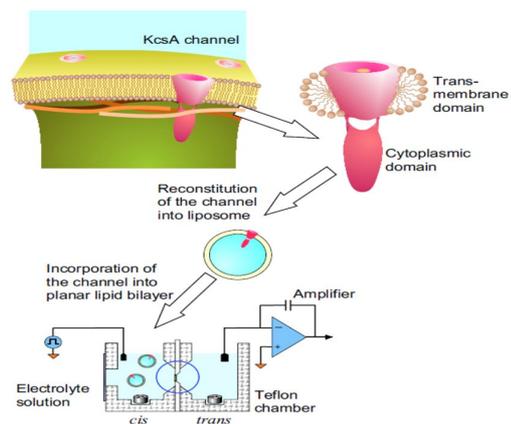


図1 脂質平面膜法

より、膜の両側の電解質溶液および膜電位を自由に設定することができ、条件を生理的範囲から大きく変化させることができる。また、パッチクランプ法のように目的以外のイオンが入り込むこともなく、チャンネル以外のタンパク質などの不純物を考慮する必要がない。さらに二重膜を作成する脂質の組成も変えることができ、非常に純粋な系による実験が可能となる。他にも、パッチクランプ法はリーク電流が問題となることがあるが、脂質平面膜法ではいわゆる“シール抵抗”を1000G程度にすることができるなどの利点が存在する。このため、今回のような実験を行う場合は脂質平面膜法以外の適切な方法がないため、この方法で行った。

イオンチャンネルは、代表的KチャンネルであるKcsAチャンネルを用いた。これは放線菌由来のKイオンチャンネルで、初めて原子分解能の立体構造が明らかになったKイオンチャンネルである。2回膜貫通型膜タンパク質で、イオンチャンネルとしてコアとなる領域だけを持つチャンネルであり、フィルタ部位も他のKチャンネルと共通の構造を持つため、非常に有用なチャンネルである。実験は、不活性化せず常に開構造をとるE71A変異型を用いた。

電解質は、KイオンおよびKイオンよりも直径の小さなイオンであるNaイオンとLiイオン、そしてKイオンよりも大きなイオンであるNMDGイオンを用いた。KcsAチャンネルは、細胞内ドメインにpHセンサーを持っており、酸性条件下でゲートが開き、それ以外ではゲートが閉じることが知られている。そのため、水溶液の一方を酸性(pH 4.0)とし、もう一方を非酸性(pH 7.5)とすることで、膜に組み込まれたチャンネルのうち、細胞内ドメインがpH 4.0の水溶液に存在するチャンネルだけがゲートが開く。従って、たとえ脂質二重膜にバラバラの向きにチャンネルが組み込まれたとしても計測される電流は一定方向のみの電流を計測することが可能と

なる(図2)。

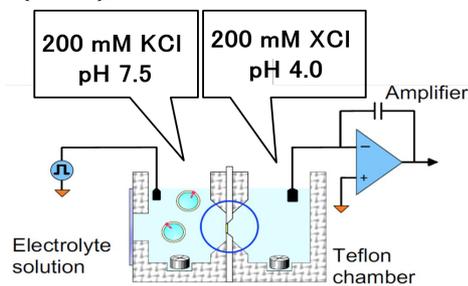


図2 実験条件

(X : K or Na or Li or NMDG)

4. 研究成果

脂質平面膜法で単一チャンネル電流が計測できるようになった。

(1) 得られた電流で、膜にかかる電位を変化させて実験を行った(図3)。かけた電位の条件は、はじめ膜電位をマイナスとし()、プラスにステップさせ()、再びマイナスにステップさせた() (図3 最上段)。1番目に、細胞内外が200 mM KClの水溶液では、いずれの電位でもK電流は計測され、チャンネルの開き方に変化はなかった(図3 A)。

2番目に、細胞外に200 mM KCl、細胞内にはKイオンよりも大きなイオン種であるNMDGイオンを用いた(200 mM)。の電位でKイオン電流が流れることを確認し、次にの電位でNMDGが流れないことを確認した。

最後にの電位にすると、再びKイオン電流は遅延なく流れた(図3 B)。3番目に、200 mM LiClとしたところ、の電位ではKイオン電流は計測されたが、の電位ではLiイオン電流は計測されなかった。の電位に戻したところ、電流は閉状態から始まり、潜時を経た後に開状態となった(図3 C)。これはの電位でLiイオンがチャンネルのフィルタ内に留まり、の電位でLiイオンがフィルタから外れるまでに時間がかかることを示している。最後に4番目として、200 mM NaClとしたところ、Liイオンの時と同様に、潜時が現れ、Naイオンによるブロック現象が認められた(図3 D)。

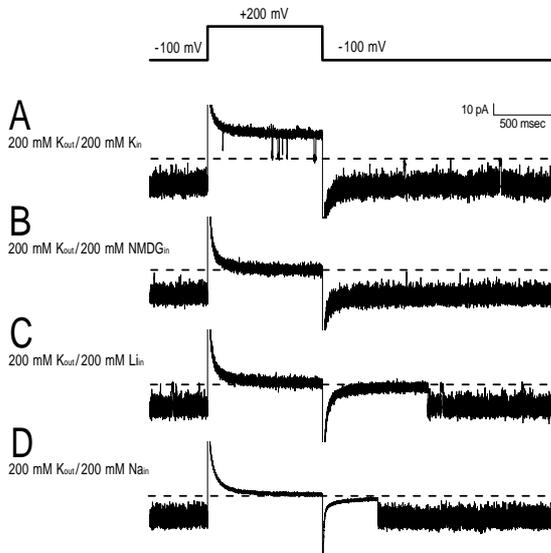


図3 単一チャンネル電流

(2) Li イオンと Na イオンとで、KcsA チャンネルをブロックする程度に違いがあるのか調べた。

得られた単一チャンネル電流波形より、ブロックする確率を得ることができる。Li イオンの場合と Na イオンの場合とでブロック確率を計算し、さらにプラスにける電位(前出の電位: Load 電位)を様々に変化させ、ブロック確率に違いが生じるのか解析した(図4)。Li イオンの場合、負荷する電位が高いほどブロック確率も高くなり、400 mV ではほぼ 100% ブロックした。一方、Na イオンの場合は、途中までは Li イオンと同じようなブロック確率であったが、高電位ではブロック確率は 100% となることはなく、50% 程度となった。

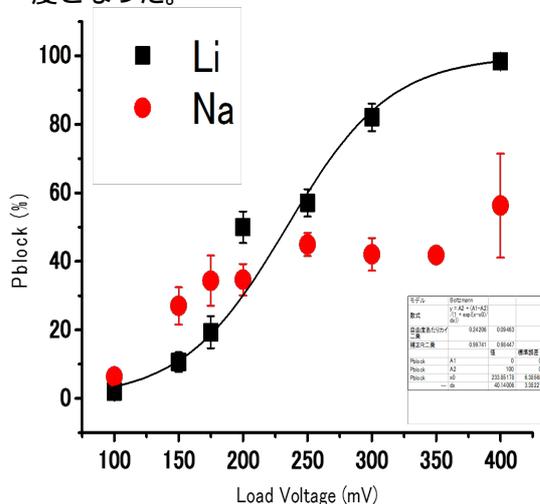


図4 ブロック確率

また、Li イオンや Na イオンが K チャンネルをブロックした後、再び K イオン電流が流れ始めるまでの時間の時定数を解析したところ、Li イオンの方が Na イオンよりも時間が長いということが明らかになった。このことから、Li イオンと Na イオンとでは、Na イオンの方が K チャンネル内に入り込みやすく、また入り込んだ後も抜けやすいということが明らかになった。

(3) これまで K チャンネルの K イオン選択性は、K イオンだけがチャンネルのフィルタ内に入り込むことができ、それ以外は入り込むこともできないと考えられていたが、今回の実験により、高電位をかけることによって Li イオンや Na イオンも入り込むことができることが明らかとなった。このことはフィルタ入口に Li イオンや Na イオンに対する高エネルギーバリアが存在することを意味している。また、一旦フィルタ内に入り込んだ Li イオンや Na イオンは、マイナス電位をかけないと外れず、外れるためには時間がかかる。このことは、入り込んだイオンが再び外れるためにエネルギーバリアを乗り越えないといけないということを意味している。今回の実験結果からは、Li イオンと Na イオンとではこれらのエネルギーバリアの高さが違うことが示唆された(図5)。

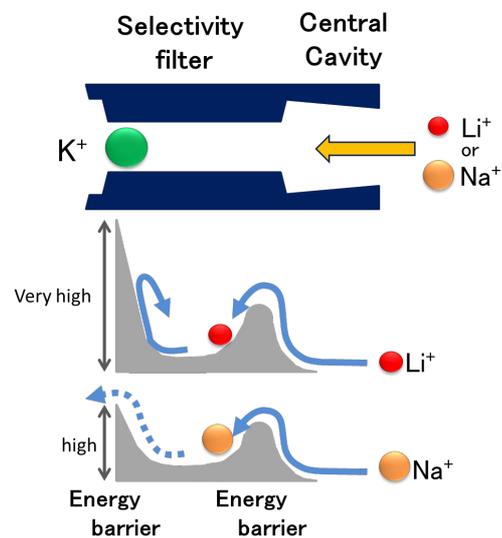


図5 フィルタ内のエネルギーバリア

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Shunsuke Imai, Masanori Osawa,
Kenichiro Mita, Shou Toyonaga, Asako
Machiyama, Takumi Ueda, Koh Takeuchi,
Shigetoshi Oiki, and Ichio Shimada
Functional Equilibrium of the KcsA
Structure Revealed by NMR. The Journal
of Biological Chemistry, 査読有, 287(47),
2012, pp.39634-39641, DOI
10.1074/jbc.M112.401265

〔学会発表〕(計4件)

松木悠佳、三田建一郎、岩本真幸、重見研
司、老木成稔、心電図 QT 時間における K チ
ャネルへの Mg イオンの効果とその分子機構、
第 34 回日本循環制御医学会総会、2013 年 6
月 7 日、福井

三田建一郎、岩本真幸、老木成稔、重見研
司、イオンチャネルのイオン選択性メカニズ
ムの解明、日本麻酔科学会東海・北陸支部第
10 回学術集会、2012 年 9 月 1 日、名古屋

松木悠佳、三田建一郎、岩本真幸、老木成
稔、高倉康、重見研司、カリウムチャネルモ
デルを用いた神経細胞へのカルシウムイオ
ンの直接効果、日本麻酔科学会東海・北陸支
部第 10 回学術集会、2012 年 9 月 1 日、名古
屋

松木悠佳、三田建一郎、岩本真幸、老木成
稔、高倉康、重見研司、心電図 QT 時間への
マグネシウムイオンの直接効果 カリウム
チャネルモデルを用いて、日本麻酔科学会
第 59 回学術集会、2012 年 6 月 8 日、神戸

〔図書〕(計0件)

6 . 研究組織

(1) 代表研究者

三田 建一郎 (MITA, Kenichiro)

福井大学・医学部附属病院・特命助教

研究者番号：30529342