

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870233

研究課題名(和文) 高分解顕微鏡観察を主としたカリウムチャネルKcsAの柔軟な構造と機能の相関解明

研究課題名(英文) Elucidation of the flexible structure-function relationship of the potassium channel KcsA using high resolution microscopy

研究代表者

角野 歩 (Sumino, Ayumi)

福井大学・医学部・特別研究員

研究者番号：80717140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：pH依存性カリウムチャネルKcsAの構造は、大きく分けて膜貫通ドメインと細胞質ドメインに分けられる。膜貫通ドメインの高分解構造は結晶構造により明らかになっているが、細胞質ドメインの高分解構造は不明である。本研究では、水中・非結晶化状態におけるKcsAチャネルの細胞質ドメインの構造および構造変化の端緒をつかむことを目的とした。原子間力顕微鏡観察により、水中においてはKcsAチャネルの細胞質ドメインは高速に揺らいでおり、硬い特定の構造をとらないことを明らかにした。蛍光色素を用いた実験により、閉状態から開状態へ変化する際に、細胞質ドメイン末端同士の間隔が離れることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Structure of pH-dependent potassium channel KcsA is roughly divided into transmembrane and cytoplasmic domains. The high resolution structure of the transmembrane domains have been revealed by the crystal structure, but the high resolution structure of the cytoplasmic domain is unknown. In this study, we aimed to elucidate the structure of the cytoplasmic domain of KcsA channel in water and non-crystalline state. Atomic force microscopy revealed that, the cytoplasmic domain of KcsA channel were fluctuating at a high speed. The result indicates that the cytoplasmic domain of KcsA does not take a hard specific structure in water.

研究分野：生物物理学

キーワード：生体膜 受容体 チャンネル 原子間力顕微鏡

01. 研究開始当初の背景

カリウムチャンネルは細胞膜のカリウムイオン透過を制御する膜タンパク質である。カリウムチャンネルが刺激に応じてカリウムイオン選択的な通路を開閉する働きにより、神経伝達や筋収縮などの様々な生理機能が維持されている。カリウムチャンネルのポアドメインにはイオン選択フィルターおよびイオンの通り道を開閉する活性化ゲートという部位があり、多くのカリウムチャンネルで同様の構造をとっている。これに対し細胞質ドメインは様々な刺激に対するセンサーの役割を担う場合が多く、多種多様な構造と機能を有している。

pH依存性カリウムチャンネルのKcsAは酸性条件下で活性化ゲートを開いてイオンを透過させる。カリウムチャンネルのポアドメインの構造は、KcsAの細胞質ドメイン切除体にて初めて高分解結晶構造が発表された(Doyle et al. *Science* 1998)。KcsAのポアドメインの開閉各状態の結晶構造から、カリウムチャンネルのイオン透過やゲート開閉機構の理解が大きく進展したが、一方細胞質ドメインの構造については、結晶構造解析を含む諸種の構造解析において一貫性のある結果が得られておらず、構造・機能共に不明点が多い。KcsAのさらなる動作機構の理解のためには、細胞質ドメインの構造の解明が必要である。

2. 研究の目的

KcsAチャンネルの膜貫通ドメインの構造はX線結晶構造解析により明らかになった。しかし細胞質ドメインの構造は、結晶構造解析を代表とする各種構造解析において一貫性のある結果が得られていない。これは細胞質ドメインの柔軟さを捉えられていないことが原因の一つだと考えられる。しかし近年の関連研究より、KcsAの構造の柔軟さや脂質膜との相互作用が機能発現に重要であることが明白となっている(Shimizu et al., *Cell* 2008, Iwamoto et al., *PNAS* 2013)。本研究の目的は、原子間力顕微鏡と電子線トモグラフィを用いた高分解顕微鏡観察により、非結晶状態・脂質膜中における細胞質ドメインの柔軟な構造を描き出すことである。

3. 研究の方法

原子間力顕微鏡および電子線トモグラフィ観察によりKcsAチャンネルの開閉各状態における構造を観察する。また、細胞質ドメイン末端を蛍光色素で標識し、開閉に伴う構造変化の端緒をつかむ。

4. 研究成果

平成26年度は、細胞質ドメインが水中で特定の硬い構造をとっているのか、それとも柔軟に揺らいでいるのかを原子間力顕微鏡(AFM)観察により検討した。脂質膜に再構成したKcsAチャンネルを雲母基板上に組織化し、開閉各状態をとるpH条件下でAFM観

察した。膜面から数nm突出した細胞質ドメインらしき構造が観察されたが、得られた構造は不鮮明な粒状であり、一分子毎の鮮明な構造は観察されなかった。ここで用いた一般的なAFM観察では、一枚の画像の取得に10分程度要しており、構造揺らぎに対して走査速度が遅すぎて構造が平均化されたために、不鮮明な粒状の構造として観察されたのだと考えられる。構造が揺らいでいるのかどうか確認するため、10 frame/secの走査速度で高速AFM観察を行った。すると、高速に揺らぐ細胞質ドメインと思われる構造が観察された。このことより、水中においてはKcsAチャンネルの細胞質ドメインは高速に揺らいでおり、KcsAの細胞質ドメインは水中において硬い特定の構造をとらないことが示唆された。

平成27年度は、揺らいでいる細胞質ドメインの4つの末端同士の距離が、チャンネルの開閉に際して変化するかどうか検討した。細胞質ドメインの末端を蛍光標識し、開閉各条件での蛍光強度の変化を測定した。比較として、開閉に際して色素間の距離が変化しないと思われる細胞外の部位に標識したものをを用いた。結果として、細胞外に標識した蛍光色素は開閉どちらの条件においても蛍光強度は変化しなかったが、細胞質末端では開状態において蛍光強度の増大が確認され、閉状態から開状態へ変化する際に、細胞質ドメイン末端同士の距離が離れることが示唆された。

電子線トモグラフィ観察については、チャンネルの構造を特定するほどの分解能がならず、現時点で有用な実験データの取得には至っていない。試料溶液からなる氷薄膜の形成において、50nm程度まで氷薄膜を薄くすることが分解能をあげるために必要だが、現時点ではほとんどの試料で100nm以上の厚さになっている。また、氷薄膜中での試料の分散性が不十分であることも、観察分子数を稼ぐ障壁となっている。今後、観察試料の調製条件を最適化することで高分解観察が可能になることを期待する。

上記の実験データはH28.6時点で論文未発表であるため、本報告書への記載は割愛する。

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4件)

Ayumi Sumino, Takayuki Uchihashi, Shigetoshi Oiki, "Clustering-dispersion behavior of the KcsA channels: high-speed AFM imaging and effects of the membrane lipids on the clustering" *The journal of physiological science* 66. (2016) S117. (査読あり)

Uragami, C.; Sugai, Y.; Hanjo, K.; Sumino, A.; Fujii, R.; Nishioka, T.; Kinoshita, I.; Dewa, T.; Nango, M.; Gardiner, A. T.; et al. Observation of Hybrid Artificial Photosynthetic Membranes Using Peripheral and Core Antennae from Two Different Species of Photosynthetic Bacteria by AFM and Fluorescence Micro-Spectroscopy. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* (2015) 313, 60-71. (査読あり)

Ayumi Sumino, Takayuki Uchihashi, Daisuke Yamamoto, Masayuki Iwamoto, Takehisa Dewa, Shigetoshi Oiki, "Dynamic behavior of the KcsA potassium channel in membrane: Direct observation by high-speed atomic force microscopy" *The journal of physiological science* 66. (2015) S119. (査読あり)

角野 歩, 山本 大輔, 炭竈 享司, 岩本 真幸, 出羽 毅久, 老木 成稔 "膜内 KcsA カリウムチャネルの原子間力顕微鏡による構造と動態解析" 生物物理 vol.55 no.1, p5-10 (2015) (査読あり)

[学会発表](計 7 件)

Ayumi Sumino, Takayuki Uchihashi, Shigetoshi Oiki "Clustering-dispersion behavior of the KcsA channels: high-speed AFM imaging and effects of the membrane lipids on the clustering" 第 93 回日本生理学会大会 (2016) 札幌

Ayumi Sumino, Takayuki Uchihashi, Daisuke Yamamoto, Masayuki Iwamoto, Takehisa Dewa, Shigetoshi Oiki 高速原子間力顕微鏡で見るカリウムチャネル KcsA の動的挙動 第 92 回日本生理学会大会 (2015) 神戸

Ayumi Sumino, Takayuki Uchihashi, Daisuke Yamamoto, Masayuki Iwamoto, Takehisa Dewa, Shigetoshi Oiki "Dynamic behavior of the KcsA potassium channel in membrane observed by high-speed atomic force microscopy" 第 53 回日本生物物理学会年会 (2015) 金沢

Sumino, Ayumi; Yamamoto, Daisuke; Iwamoto, Masayuki; Dewa, Takehisa; Oiki, Shigetoshi "Gating-associated clustering-dispersion behavior of the KcsA potassium channel in membrane:

Direct observation by atomic force microscopy" Single Protein Dynamics in Cellulo 2014: Spatio-Temporal, Structural and Quantitative Analyses: 沖縄科学技術大学院大学シーサイドハウス (2014) 沖縄

角野 歩, 山本 大輔, 岩本 真幸, 出羽 毅久, 老木 成稔 カリウムチャネル KcsA のゲート開閉と連動した膜中集合・分散: 原子間力顕微鏡で明らかになった集団の振る舞い 第 24 回 バイオ・高分子シンポジウム (2014) 東京

角野 歩, 山本 大輔, 岩本 真幸, 出羽 毅久, 老木 成稔 カリウムチャネル KcsA のゲート開閉と連動した膜中集合・分散 第 52 回日本生物物理学会年会 (2014) 札幌

Sumino, Ayumi; Yamamoto, Daisuke; Iwamoto, Masayuki; Dewa, Takehisa; Oiki, Shigetoshi "Gating-associated clustering-dispersion dynamics of the KcsA potassium channel in a lipid membrane: Direct observation using atomic force microscopy" The 45th NIPS International Symposium, co-sponsored by The Journal of Physiology "Cutting-edge approaches towards the functioning mechanisms of membrane proteins" (2014) 岡崎

[図書](計 0 件)

[学術記事](計 1 件)

角野 歩, 老木 成稔 "カリウムチャネル KcsA のゲート開閉と連動した膜中集合・分散ダイナミクス" サイエンスピックアップ-92 (2014)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:

国内外の別：

〔その他〕

セミナー講演

角野 歩 “原子間力顕微鏡による生体膜研究へのアプローチ” アサイラム AFM セミナー「blueDrive フォトサーマル励振技術」2014/8/1 大阪

福井大学医学部 2013 年度優秀論文発表会

角野 歩 Gating-Associated Clustering Dispersion Dynamics of the KcsA Potassium Channel in a Lipid Membrane 2014/7/31 福井大学医学部

6. 研究組織

(1)研究代表者

角野 歩 (Sumino Ayumi)

福井大学・医学部・特別研究員

研究者番号：80717140

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

内橋 貴之 (Uchihashi Takayuki)

金沢大学・数物科学系・教授

研究者番号：30326300

ウルフ・スコグランド (Ulf Skoglund)

沖縄科学技術大学院大学・構造細胞生物学ユ

ニット・教授