

論文の内容の要旨

論文題目 放線菌由来カリウムチャンネル KcsA のゲーティング機構の構造生物学的解析

氏名 今井 駿輔

【序】

放線菌由来のカリウムチャンネル KcsA は細胞内 pH に応答して開閉する。中性では巨視的電流が観測されない閉状態を取るが、pH 5 以下の酸性刺激を与えると、一過性のピーク電流の後 1~3 秒にて減衰し、ピーク電流の 15 %程度の電流を流す開状態に達する。この KcsA の巨視的電流の特徴は多くのカリウムチャンネルに共通し、特に真核生物の電位依存性カリウムチャンネル (Kv) では膜電位の制御に関わる必須の性質である。そのため、KcsA をプロトタイプとしてカリウムチャンネルの開閉 (ゲーティング) の分子機構を理解することは、生命現象の理解だけでなく、チャンネル機能を制御する低分子化合物の創製という観点からも重要である。閉状態を取る中性での KcsA の結晶構造および変異体を用いた電気生理解析から、膜貫通領域に形成される K⁺透過路上に K⁺の透過を阻む helix bundle crossing とその選択性を担う selectivity filter の 2 つのイオンゲートが存在することが示されている (Fig.1)。一方で開状態を反映する立体構造はいまだ得られておらず、酸性刺激に応答して helix bundle crossing が開くこと、K⁺を透過する活性化状態と透過しない不活性化状態の間の平衡にあることが示唆されているのみである。刺激によるピーク電流は、活性化状態と不活性化状態の間の平衡が、刺激直後に活性化状態から開始するためであると想定されているが、その機構は未だ不明である。

そこで本研究では、高分子量タンパク質でも高感度かつ高分解な NMR スペクトルが観測可能なメチル TROSY 法を用いて、(1) 活性化状態と不活性化状態を区別する構造的要因は何か、(2) なぜ helix bundle crossing が開いているにもかかわらず不活性化状態において K⁺ が透過

しないのか、(3) 刺激直後にピーク電流が流れる分子機構は何か、すなわちなぜ活性化状態と不活性化状態の間の平衡が活性化状態から開始するのか、というカリウムチャネルの動作機構を理解する上で重要なこれら 3 つの問題を解明することを目的とした。

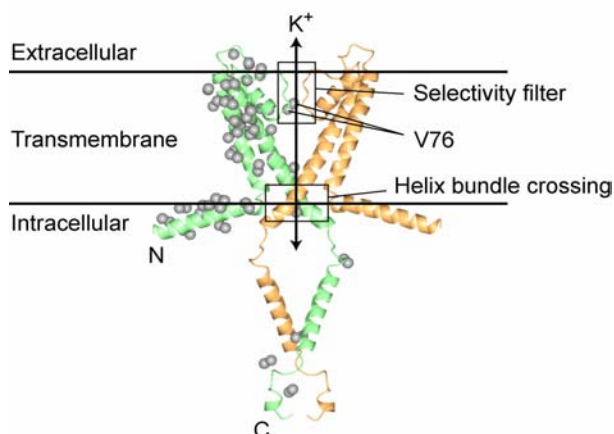


Fig.1 閉状態 KcsA のモデル構造

脂質膜に平行な向きから見た図。対称な 4 量体のうち、向かい合う 2 つのサブユニットを 2 色のリボン図にて示した。球で表した本研究で観測対象としたメチル基は膜貫通領域全体に広く分布している。Selectivity filter に存在する V76 のメチル基にはラベルを付した。

【結果】

1. KcsA のメチル TROSY スペクトル測定とシグナルの帰属

本研究では、dodecyl maltoside (DDM) ミセルに再構成した KcsA のメチル基の直接 NMR 観測を行った。閉状態に対応する pH 6.7、および開状態に対応する pH 3.2、45°C の条件下にて測定した KcsA のメチル TROSY スペクトルを Fig.2 に示す。観測対象となる Leu, Val, Ile のメチル基 (計 83 個) のうち、変異導入などにより、pH 6.7 では 61 個、pH 3.2 では 66 個のシグナルを帰属した。開状態に対応する pH 3.2 においては、強弱 2 つのシグナルを与えるメチル基が観測され、この事実より、KcsA は開状態にて少なくとも 2 種以上の構造をとっていることが明らかとなった (Fig.2B)。これらのメチル基は膜貫通領域の細胞外側に集中しており、特に selectivity filter に存在する V76 において 2 つのシグナルの間の化学シフト差が最も大きかった (Fig.2B, inset)。

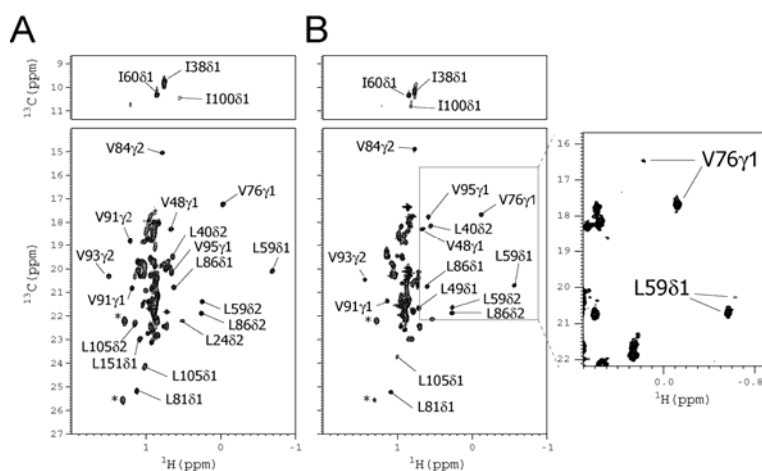


Fig.2 KcsA のメチル TROSY スペクトル

(A) 閉状態 (pH 6.7)

(B) 開状態 (pH 3.2)

いずれも 45°C、120 mM K⁺存在下にて測定した。アスタリスクは DDM サンプル由来の不純物のシグナルを表す。

2 つのシグナルを与えるメチル基が観測されたことから、開状態における構造平衡が示された (B, inset)。

2. 開状態における構造平衡

開状態にて平衡にある 2 種の状態の実体を明らかとするため、酸性で活性化状態のみをとる E71A 変異体、野生型よりも不活性化状態の割合が大きい Y82A 変異体のメチル TROSY スペクトルを野生型と比較した。測定条件を電気生理解析の条件と合わせるために、まず野生型のスペクトルの温度依存性を調べた(Fig.3A)。pH 3.2 にて温度を 45°C から 5°C 刻みで低下させたところ、45°C にて観測された弱いシグナルの強度は温度低下に伴って増大し、強いシグナルの強度は減少した。両者は 30°C でほぼ一致し、25°C では逆転した。そこで、電気生理解析が行われる条件に近い 25°C にて、野生型と E71A 変異体、Y82A 変異体のシグナル強度を比較した。その結果、selectivity filter に存在する V76 のメチル基の 2 つのシグナルのうち ^1H : -0.13 ppm, ^{13}C : 17.7 ppm に観測されるものの相対強度が、E71A 変異体で 1.0、野生型で 0.31, Y82A 変異体で 0.17 であり、電気生理解析における活性化状態の割合とそれぞれよく一致した (Fig.3B)。これらの結果から、開状態で観測される 2 つのシグナルはそれぞれ活性化状態と不活性化状態由来のものと結論した。また、上記の温度依存性を利用して、pH 3.2, K^+ 濃度 120 mM の条件下では 45°C で活性化状態が、25°C で不活性化状態が選択的に観測されることが判明した。

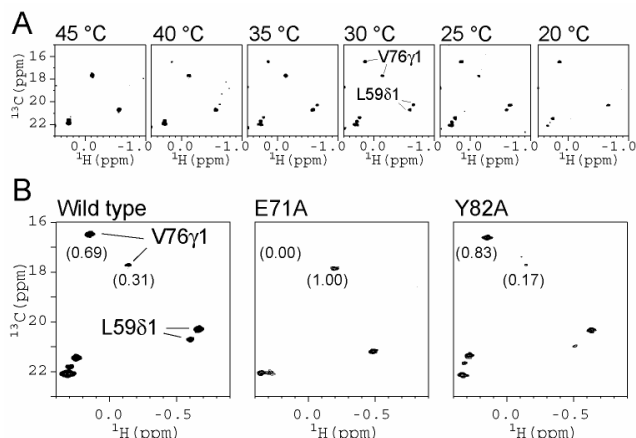


Fig.3 開状態における構造平衡

(A) 野生型 KcsA のメチル TROSY スペクトルの温度依存性。pH は 3.2, K^+ 濃度は 120 mM とした。
(B) 野生型、E71A、Y82A の pH 3.2, 25°C, 120 mM K^+ 存在下におけるスペクトルの比較。括弧内には V76 γ 1 由来のシグナルの強度比を示した。

3. Selectivity filter と K^+ , H_2O の相互作用

次に、閉状態と開状態における selectivity filter と K^+ との相互作用を解析するため、 K^+ 滴定実験を行った。その結果、開状態における K^+ との相互作用に伴うスペクトル変化が、不活性化状態から活性化状態への移行に伴うスペクトル変化と一致することが明らかとなった。この結果は、活性化状態が K^+ 結合型、不活性化状態が K^+ 非結合型にそれぞれ対応することを示している。また、V76 γ 1 のシグナル強度の K^+ 濃度依存性から、45°C における selectivity filter と K^+ との相互作用の解離定数が閉状態において 6 mM,

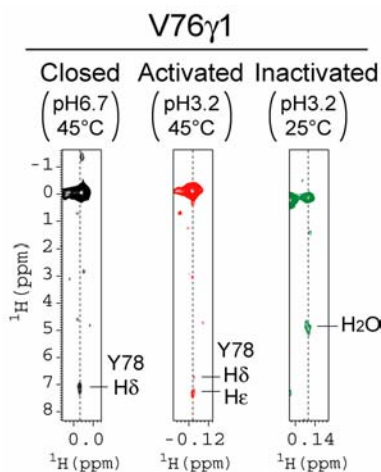


Fig.4 H_2O と V76 γ 1 との NOE
120 mM K^+ , 90% H_2O 存在下における NOESY スペクトル。メチル TROSY のための標識と同時に、Tyr が選択的に ^1H 化されたサンプルを用いた。pH と温度は図中に示した通り。左から閉状態、活性化状態、不活性化状態に対応する。

開状態において 50 mM であり、開状態においては閉状態と比較して親和性が 8 倍程度減少することが明らかとなった。さらに、120 mM K⁺の存在下、溶媒を 100% D₂O から 10% D₂O / 90 % H₂O に変更して NOESY 解析を行った結果、負の NOE シグナルが観測されたことから、不活性化状態においてのみ、V76 γ1 の近傍 5 Å 以内に 300 ps 以上とどまる水分子が結合することが明らかとなった(Fig.4)。

4. Selectivity filter の構造変化に寄与するプロトン化部位の同定

化学シフト変化および NOE パターンの変化から、閉状態から開状態への移行時に selectivity filter の構造が変化することが示された。V76 のシグナル強度変化の pH 依存性から、その構造変化の引き金となるプロトン化部位が Glu, Asp, His 残基であることが示唆されたため、膜貫通領域の Glu, Asp, His 残基を 1 つずつ Ala に置換した各種変異体のメチル TROSY スペクトルを解析した。その結果、helix bundle crossing 周辺の H25 を Ala に置換した変異体 H25A において、selectivity filter 近傍のシグナルの pH 感受性が低下することが明らかとなった。H25 のプロトン化が helix bundle crossing の構造変化の引き金となるという当研究室の先行報告と合わせると、この結果は helix bundle crossing の開閉が selectivity filter の構造変化と共役していることを示している。

【考察】

本研究の成果を元に、【序】で設定した 3 つの問題について順に考察する。

(1) については、活性化状態と不活性化状態の違いが selectivity filter の K⁺ および水分子との結合様式にあり、酸性条件下において selectivity filter に K⁺ が結合した状態が活性化状態、K⁺ が解離し水分子が強く結合した状態が不活性化状態に対応することが明らかとなった。

(2) については、不活性化状態のみにおいて同定された、selectivity filter に 300 ps 以上の間滞在する水分子が、この状態において K⁺ が透過しない構造的要因であることが示唆された。分子動力学シミュレーションによると、K⁺ は selectivity filter 内部に 4 つ存在する K⁺ 結合部位にそれぞれ数 10 ~ 数 100 ps の間滞在しながら透過するため、それと同程度かそれ以上に滞在するこの水分子は K⁺ の透過を阻む plug となり得る。

(3)のピーク電流の機構に関しては、閉状態と開状態における selectivity filter の K⁺ 親和性の違いから、以下の機構を明らかにした。閉状態では selectivity filter の K⁺ 親和性が高く、K⁺ 濃度が数 mM と低い細胞外側から K⁺ を捕捉できるため、生理的な条件下においては通常 selectivity filter に K⁺が結合している。酸性刺激によって helix bundle crossing が開くと、これと共役した selectivity filter の構造変化に伴って K⁺ 親和性が低下し、活性化状態と不活性化状態の平衡が開始する。このとき selectivity filter が K⁺ 結合状態にあるために、この平衡は K⁺ 結合状態である活性化状態から開始する。これがピーク電流が観測される機構である。また、その後の減衰についても、活性化状態から開始したこの平衡が、次第に不活性化状態の割合が大きい定常状態に達するために起こることが明らかとなった。

感受する刺激こそ異なるものの、KcsA の電気生理学的性質および selectivity filter の配列と構造は K_v チャネルとよく類似しており、以上の知見はこれらのチャネルにも適用できると期待される。