

## 全反射赤外分光法による KcsA チャネルの イオン選択および pH センシング機構の解析

(名工大院工<sup>1</sup>・分子研<sup>2</sup>・福井大医<sup>3</sup>)

○古谷 祐詞<sup>1,2</sup>、清水啓史<sup>3</sup>、浅井祐介<sup>1</sup>、老木成稔<sup>3</sup>、神取 秀樹<sup>1</sup>

【序】 KcsA は真正細菌の *Streptomyces lividans* の細胞膜に存在するカリウムイオンチャネルタンパク質であり、細胞内が酸性条件下 ( $\text{pH} < 5.5$ ) で  $\text{K}^+$ イオンを選択的に透過する。R. MacKinnon は、1998年に X 線結晶構造解析により、その分子構造を原子レベルで明らかにし (図 1)、 $\text{K}^+$ イオンの選択性やイオン透過機構の解明に大きな貢献を果たした。しかしながら、これまでに明らかにされている構造はチャネルが閉じた静止状態のものであり、開状態についての構造情報は限られている。このような中で、老木・清水博士らは X 線 1 分子解析により、「開」状態となる酸性条件下で激しく“ひねり運動”していることを示した[1]。このような pH 依存的な構造変化を誘起させる分子機構を明らかにするためには、チャネルが揺らいでいる酸性条件下での詳細な構造情報が必要となる。光誘起赤外差スペクトル計測は、光受容タンパク質の機能発現機構について原子レベルでの構造情報を得る有力な手法であるが、KcsA のような光が関与しないタンパク質には無力と考えられてきた。本研究では、液中での計測が可能な全反射赤外分光法を最適化し、KcsA の  $\text{K}^+$ および  $\text{Na}^+$ イオン結合に誘起される微細な赤外差スペクトルの計測を試みた。

【実験方法】 KcsA 試料の調製 KcsA (1-160 残基と His-tag) 配列を挿入した pQE-82L ベクターを大腸菌 M15 に導入し、0.5 mM の isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside で発現誘導した。菌体を超音波破碎し、KcsA を含む膜各分を 1% の n-dodecyl- $\beta$ -D-maltoside で可溶化し、 $\text{Co}^{2+}$ アフィニティーカラムにより KcsA を精製した。KcsA と脂質 (1:3 の重量比で混合した 1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylethanolamine および 1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidyl glycerol) をモル比で 1:100 となるように混合し、ゲル濾過カラム (BioSpin30 カラム) により界面活性剤を除去することで脂質膜に再構成した。

全反射赤外分光法によるイオン結合誘起赤外差スペクトルの計測 KcsA 脂質膜再構成試料 (1 mg/ml) を 5  $\mu\text{L}$  滴下し、乾燥させることで ATR 結晶の表面に吸着させた。緩衝液 (20 mM HEPES,

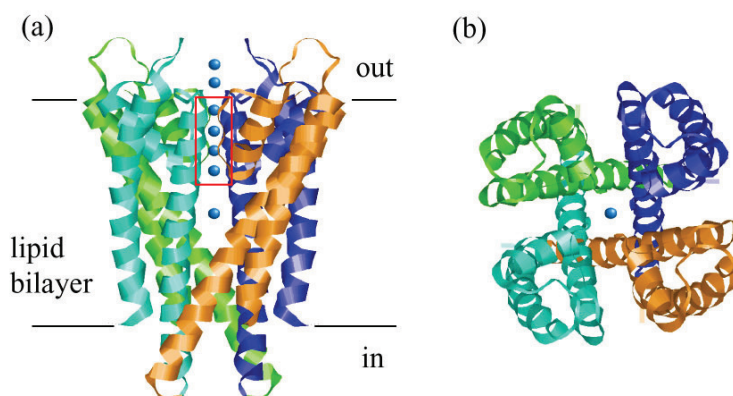


図 1 KcsA の膜貫通領域の X 線結晶構造

(a) 横から見た図 脂質二重膜中でホモ 4 量体を形成し、中央にイオンを透過するポアを形成している。赤枠で囲った部分がイオン選択フィルターと呼ばれる。(b) 上から見た図 中央の球が  $\text{K}^+$ イオン

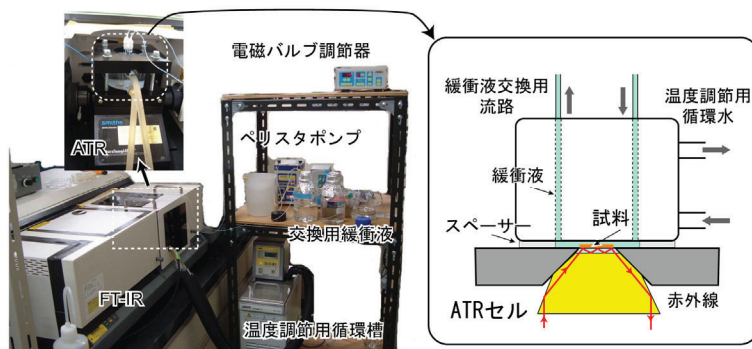


図2 全反射赤外分光装置

全反射 (Attenuated Total Reflection; ATR) 装置は Smith 社の DurasampIR II の 9 回反射型ダイヤモンド・ZnSe 結晶を使用した。FT-IR は Bio-Rad 社の FTS-6000 (現在は Varian 社) を用いた。試料の温度調節および緩衝液交換のためのガラスセルを枠内に示すように配置した[2]。

pH 7.0, 50mM KCl) を 0.5 mL/min の流速で 2 時間程度流し、吸着の弱い試料や不純物を洗い流した。その後、pH 7.0 の条件下では 20 mM HEPES、pH 4.0 の条件下では 20 mM コハク酸を pH 緩衝剤として用い、50 mM KCl もしくは NaCl を含む緩衝液を交互に流すことで、イオン結合に由来する赤外吸収スペクトル変化を計測した。試料の温度は温度調節用循環槽から水をガラスセルに循環させることで 20°C に保った。

【結果と考察】 KcsA が開く酸性条件下と閉じている中性条件下で全く異なる形状のイオン結合誘起赤外差スペクトルが得られた。1727 (+)/ 1713 (-)  $\text{cm}^{-1}$  (pH 7) と 1745 (+)/ 1702 (-)  $\text{cm}^{-1}$  (pH 4) に見られるバンドはプロトン化したカルボン酸の C=O 伸縮振動に由来すると考えられる。K<sup>+</sup>イオン存在下では、pH 7 で 1727  $\text{cm}^{-1}$  であるが pH 4 では 1745  $\text{cm}^{-1}$  と高波数にシフトし

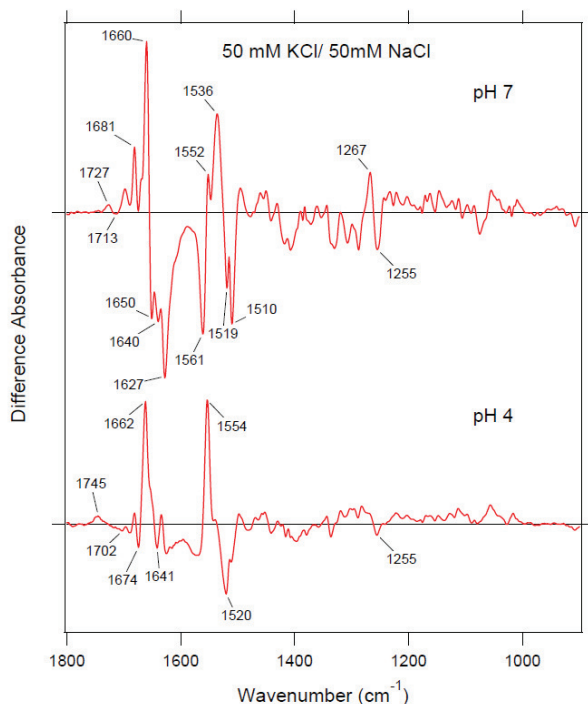


図3 KcsA のイオン結合誘起赤外差スペクトル (正 ; K<sup>+</sup>、負 ; Na<sup>+</sup>)

上が pH 7、下が pH 4 で計測した結果。縦軸の 1 メモリが吸光度 0.005 に対応。Amide I、II 以外にカルボン酸の C=O 伸縮など、側鎖に由来すると思われるバンドも観測されている。

ている。これは pH 7 で水素結合環境下にあったものが pH 4 では結合が切れているのではないかと考えられる。KcsA チャンネルで唯一膜貫通領域に存在する Glu71 が有力な候補と考えられる。

1681 (+), 1660 (+)/ 1650 (-), 1640 (-), 1627 (-)  $\text{cm}^{-1}$  のバンドは蛋白質骨格の amide I (に由来すると考えられる。おそらくイオン選択フィルター部分 (TVGYG) が候補として考えられる。また、1267 (+)/ 1257 (-)  $\text{cm}^{-1}$  のバンドは Tyr の C-O 伸縮もしくは C-O-H 変角振動と推測され、フィルター部分の Tyr78 が候補として考えられる。

講演では、現在計測中の Asp、Glu 変異体の結果を含めて、KcsA のイオン選択および pH センシング機構について議論する。

#### 【参考文献】

- [1] H. Shimizu, M. Iwamoto, T. Konno, A. Nihei, Y. C. Sasaki, S. Oiki, *Cell* 132, 67-78, 2008.
- [2] Y. Kitade, Y. Furutani, N. Kamo and H. Kandori, *Biochemistry* 48, 1595-1603, 2009