

## 紫外共鳴ラマン分光法によるカリウムチャネル KcsA の構造解析

(<sup>1</sup>阪大院理、<sup>2</sup>福井大医) ○松田拓之<sup>1</sup>・水野操<sup>1</sup>・清水啓史<sup>2</sup>・老木成稔<sup>2</sup>・水谷泰久<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(K)チャネルタンパク質であり四量体を形成する。細胞質側が酸性条件下になると閉状態からゲート開閉状態になり、選択フィルターと呼ばれる部位をとおして K<sup>+</sup>が選択的に透過する。我々は、紫外共鳴ラマン分光法を用いて、K<sup>+</sup>の存在による KcsA の構造変化を調べた。紫外共鳴ラマン分光法では、共鳴効果によりタンパク質中に含まれる芳香族アミノ酸残基の振動バンドを、選択的に観測できる。今回、KcsA のラマンスペクトルに、K<sup>+</sup>濃度に依存したチロシン残基およびトリプトファン残基のスペクトル変化を観測したので報告する。

【実験】KcsA は、大腸菌中で発現させたものを 0.5 % *n*-dodecyl- $\beta$ -D-maltoside で可溶化し、コバルトアフィニティーカラムにより精製した。

紫外共鳴ラマンスペクトル測定には、チロシンおよびトリプトファン残基のラマンバンド強度が共鳴増大するよう波長 233 nm の紫外光を使用した。測定には回転セルを使用して試料の劣化を防いだ。試料濃度は単量体単位で 50  $\mu$ M に調整した。試料溶液には塩化カリウムと塩化ナトリウムを含むリン酸バッファーを加え、二つの塩の濃度を合わせて 200 mM となるようにした。また、ラマンバンド強度の内部標準として試料溶液には 100 mM 硫酸ナトリウムを加えた。

【結果】図 1 (a)に K<sup>+</sup>濃度が 150 mM のときの KcsA の紫外共鳴ラマンスペクトルを示す。K<sup>+</sup>濃度によってスペクトルは変化した、変化量は小さかったため、差スペクトルの形で、スペクトルの K<sup>+</sup>濃度依存性を示すことにする。K<sup>+</sup>濃度が 30, 10, 5, 0 mM のスペクトルから 150 mM のスペクトルをそれぞれ差し引いたスペクトルを図 1 (b), (c), (d), (e) に示す。スペクトル(a)との比較から、それぞれ 1006, 1361, 1564  $\text{cm}^{-1}$  のバンドは、トリプトファン残基の振動である W16, W7, W3 モードに帰属される。1171  $\text{cm}^{-1}$  のバンドは、チロシン残基の振動である Y9a モードに帰属される。1621  $\text{cm}^{-1}$  のバンドはチロシンの Y8a バンドおよびトリプトファンの W1 バン

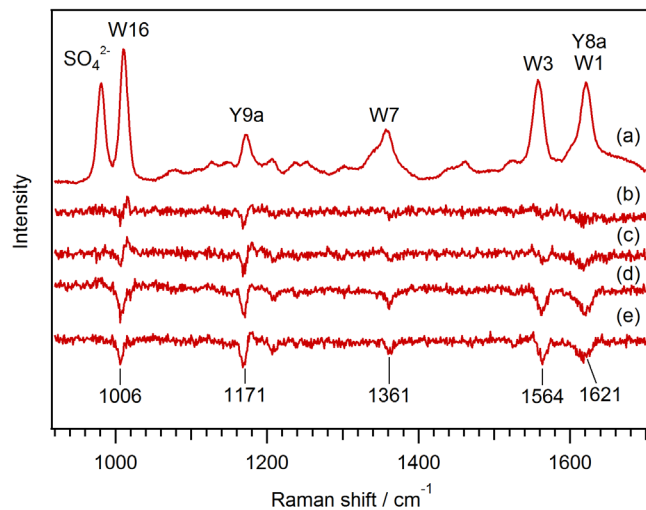


図 1 KcsA の紫外共鳴ラマンスペクトル K<sup>+</sup>濃度(a) 150 mM, とその K<sup>+</sup>濃度に対する差スペクトル K<sup>+</sup>濃度(b) 30 mM, (c) 10 mM, (d) 5 mM, (e) 0 mM.

ドの両方が重なったものに帰属される。 $K^+$ 濃度の低下に伴い、上記の5つのバンドの強度は減少した。また、Y9aバンドは、差スペクトルにおいて微分系の波形を示した(図1(e))。これは、 $K^+$ 濃度によってバンドがシフトしていることを意味している。そこで、Y9aバンドの中心位置を求め、それを $K^+$ 濃度に対してプロットした。これを図2に示す。 $K^+$ 濃度が0 mMから150 mMへ変化するのに伴って、約 $2\text{ cm}^{-1}$ のシフトが観測された。

【考察】本研究では、KcsAのチロシンおよびトリプトファン残基のバンドにスペクトル変化が観測された。KcsAは四量体で、各サブユニットに5個のチロシン残基と5個のトリプトファン残基が存在する。5個のチロシン残基のうち、1つは選択フィルター部位(Tyr78)、1つは選択フィルター部位付近(Tyr82)、残りの3つは選択フィルターから離れた位置(Tyr45, 62, 137)に存在する。また、5個のトリプトファン残基のうち、

2つは選択フィルター部位付近(Trp67, 68)、残りの3つは選択フィルターから離れた位置(Trp26, 87, 113)に存在する。X線結晶構造解析から、Tyr78残基を含む選択フィルター部位のアミノ酸残基は $K^+$ 濃度に依存して大きく変化することが報告されている[1]。一方、それ以外の4個のチロシン残基は、 $K^+$ 濃度に対して構造変化は小さい。したがって、Y9aバンドのスペクトル変化は主にTyr78によると考えられる。また、NMR分光法から $K^+$ 濃度0 mMから30 mMの間で選択フィルター部位のバリン残基(Val76)の構造が、大きく変化することが明らかになっている[2]。図2のY9aバンドの位置はVal76のNMRシグナル強度と同様の $K^+$ 濃度依存性を示した。このことはスペクトル変化がTyr78によるという解釈を支持する。5つのトリプトファン残基のうち、選択フィルター部位付近にあるTrp67, Trp68は、 $K^+$ 濃度に対して構造変化するアミノ酸残基(Glu71)と水素結合ネットワークを介して相互作用している。したがって、Trp67, Trp68は $K^+$ 濃度に依存して変化をする。一方、他の3個のトリプトファン残基は選択フィルターから離れた位置に存在し、 $K^+$ 濃度に対して構造変化は小さい[1]。よって、スペクトル変化は主にTrp67, Trp68によると考えられる。今後、低pHの試料についても測定を行い、閉状態と開状態の構造の違いについても調べる予定である。

#### 【参考文献】

[1] Zhou, Y.; Morais-Cabral, J. H.; Kaufman, A.; MacKinnon, R. *Nature* **2001**, *414*, 43–48.

[2] Imai, S.; Osawa, M.; Takeuchi, K.; Shimada, I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 6216–6221.

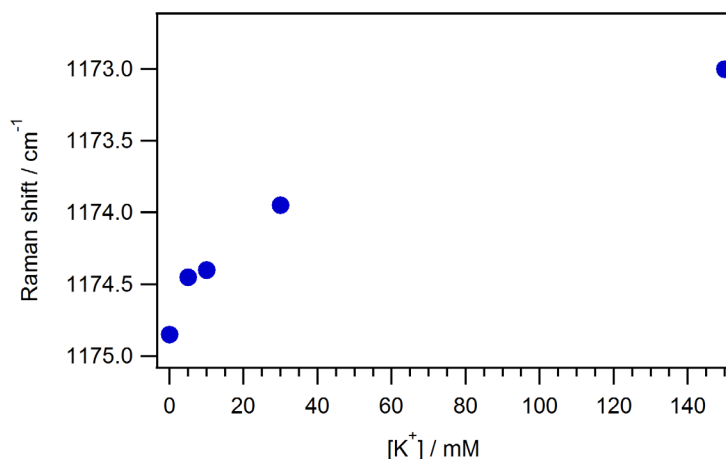


図2 Y9aバンド位置の $K^+$ 濃度に対する変化