

## 全反射赤外分光法によるカリウムチャネルTWIK-1の イオン選択フィルター構造とアルカリ金属イオンとの相互作用解析

<sup>1</sup>分子研, <sup>2</sup>総研大物理, <sup>3</sup>生理研, <sup>4</sup>総研大生命科学, <sup>5</sup>大阪医科大  
塚本寿夫<sup>1,2</sup>, 中條浩一<sup>3,4,5</sup>, 久保義弘<sup>3,4</sup>, ○古谷祐詞<sup>1,2</sup>

### Attenuated total reflection spectroscopy on a potassium ion channel TWIK-1 for investigating the structure of the ion selectivity filter and its interaction with alkali metal cations

Hisao Tsukamoto<sup>1,2</sup>, Koichi Nakajo<sup>3,4,5</sup>, Yoshihiro Kubo<sup>3,4</sup>, ○Yuji Furutani<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute for Molecular Science, Japan

<sup>2</sup> School of Physical Sciences, SOKENDAI, Japan

<sup>3</sup> National Institute for Physiological Sciences, Japan

<sup>4</sup> School of Life Science, SOKENDAI, Japan

<sup>5</sup> Osaka Medical College, Japan

**【Abstract】** Potassium channels are selectively permeable to  $K^+$  ions over  $Na^+$  ions (typically 1000:1 molar ratio), which form a homo tetrameric structure with a pore penetrating along the central symmetric axis. The selectivity filter works as atomic mechanical sieves, which is composed of several carboxyl groups of the main chains at the specific sequence for potassium channels. Recently, the interactions between the channel and alkali metal cations have been studied by infrared spectroscopy. We applied attenuated total reflection FTIR spectroscopy on one of potassium channels, KcsA, and revealed amide I bands changing their frequencies depends on the types of alkali metal cations. Here, we have succeeded to extend the method to a mammalian potassium channel, TWIK-1, which forms a dimer with a pseudo-symmetric pore structure and has less potassium selectivity under some conditions. We found that the ion specific difference spectra of TWIK-1 are basically very similar to those of KcsA and the  $1680\text{ cm}^{-1}$  band would be a general marker band for the selectivity filter interacting with potassium ions.

**【序】** 細胞膜に存在するイオンチャネルは生体電気信号の源であり、カリウム ( $K^+$ ) イオンやナトリウム ( $Na^+$ ) イオンを選択的に透過するチャネルが細胞外の刺激や膜電位の変化に応じて開閉することで生体電気信号を形成する。カリウムチャネルは  $K^+$  イオンを選択的に透過するイオンチャネルであり、 $Na^+$  イオンよりイオン半径が大きい  $K^+$  イオンを選択的に透過できる分子機構について、様々な実験および理論的研究が行われている。イオン選択性の分子機構の解明にはイオンを透過する孔 (ポア) の構造やダイナミクス情報が不可欠である。X線結晶構造解析により、イオン選択フィルターと呼ばれる部位において、主鎖のカルボニル基が  $K^+$  イオンを配位するのに適当な距離で配置されていることが明らかにされた。最近、二次元 IR を含む、赤外分光法により、イオン選択フィルターの構造やダイナミクスを明らかにする試みがなされている[1-5]。これまで全反射赤外分光解析を用いて、細菌由来のカリウムチャネル KcsA において、様々なアルカリ金属イオンとの相互作用を解析し、amide I 領域に特徴的なバンドが見られることを明らかにしてきた[1-3]。本研究では、ほ乳動物由来のカリウムチャネル TWIK-1 に全反射赤外分光解析を適用し、二量体構造により 4 回対称性が崩れたイオン選択フィルター (Fig. 1) を持ち、条件により  $Na^+$  イオンの透

過性が上昇する特異なイオン選択性の分子機構を明らかにすることを試みた。

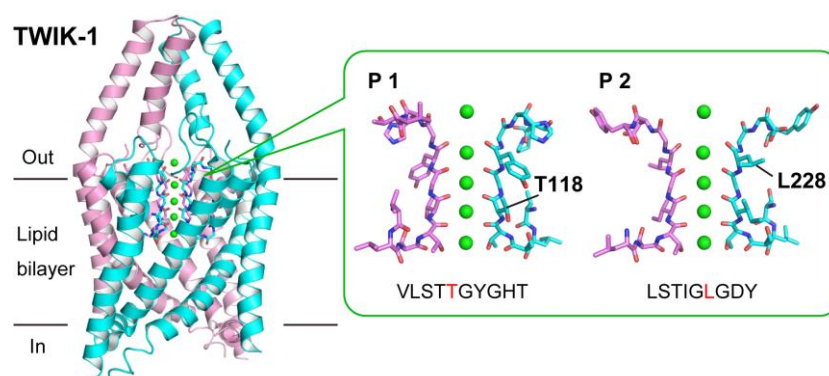


Fig. 1. X-ray crystal structure of TWIK-1 (PDB: 3UKM)

**【方法 (実験)】** マウス由来の TWIK-1 の全長配列の C 末端に 8xHis を精製用タグとして付加した pMT ベクターを、COS-1 細胞にトランスフェクションした。細胞膜を回収し、1% n-dodecyl- $\beta$ -D-maltoside (DDM)を含む緩衝液で抽出し、Ni カラムおよびゲルろ過カラムクロマトグラフィーを用いて精製した。その後、脂質膜 (POPE:POPG=3:1) に再構成した (脂質とタンパク質のモル比は 50:1)。KcsA での計測[2, 3]と同様に、9 回反射型ダイヤモンド製の内部反射結晶の全反射赤外分光装置にクロマトグラフィー用のペリスタポンプやバルブ切換装置を接続し、イオン交換による赤外差スペクトルを計測した。20 mM HEPES (pH7.0)に 200 mM KCl もしくは 200 mM NaCl を含む緩衝液を用いた。

**【結果・考察】** Fig. 2 に典型的なイオン交換誘起赤外差スペクトルを示す。KcsA での結果[2, 3]と同様に amide I 領域に特徴的なバンドが正負に現れた。WT では細胞外が低  $K^+$ イオン状態であったり、酸性状態であるなどの条件下において、 $Na^+$ イオンも透過する性質を示す。一方、T118I 変異体は KcsA と同様に恒常的に  $K^+$ イオン選択性が高いことが報告されている。今回の  $K^+/Na^+$ の赤外差スペクトルにおいて、正側、つまり  $K^+$ イオン存在下では 1680, 1654  $cm^{-1}$  の 2 本のバンドが同様に見られたが、負側、 $Na^+$ イオン存在下では 1642, 1624  $cm^{-1}$  の 2 本のバンドのうち、1642  $cm^{-1}$  のバンドの強度が大きいことが分かった。過去の KcsA の報告によると、1680  $cm^{-1}$  はイオン選択フィルターのモード、1654  $cm^{-1}$  はヘリックスモードと帰属されている[4]。今回、TWIK-1 でも同様のバンドが観測され、 $K^+$ イオン存在下では WT と T118I に違いはほとんど見られず、 $Na^+$ イオン存在下ではヘリックスモードの変化がより大きいことが明らかになった。TWIK-1 の特異なイオン選択性は  $K^+$ イオンが存在しない状況下での構造の差異によって説明されるのかもしれない。

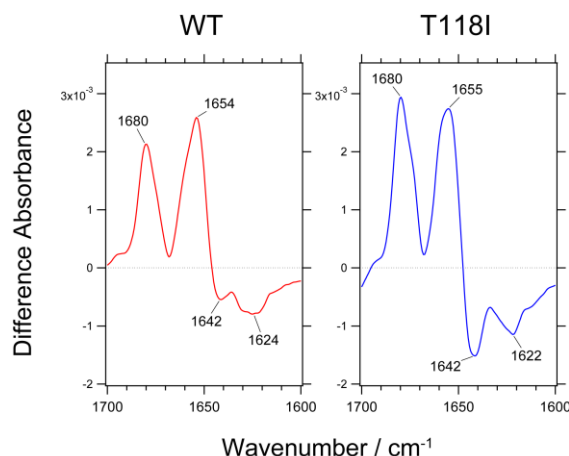


Fig. 2. The ion-exchange-induced ( $K^+$ -minus- $Na^+$ ) difference infrared spectra of TWIK-1 WT and T118I mutant in the amide-I region.

#### 【参考文献】

- [1] 古谷ら, 第3回分子科学討論会, 4B16(2009). [2] Y. Furutani *et al.* *J. Phys. Chem. Lett.* **3**, 3806 (2012). [3] Y. Furutani *et al.* *Biophys. Physicobiol.* **12**, 37 (2015). [4] P. Stevenson *et al.* *J. Phys. Chem. B* **119**, 5824 (2015). [5] H.T. Kratochvil *et al.* *Science* **353**, 1040 (2016).