

## エレクトロスプレー・冷却イオントラップ法による カリウムイオンチャネルのイオン選択性に対する水和効果

<sup>1</sup>東工大科創院化生研, <sup>2</sup>東工大生命理工, <sup>3</sup>イリノイ大, <sup>4</sup>東工大WRHI  
○根来拓己<sup>1,2</sup>, 石内俊一<sup>1,2</sup>, James M. Lisy<sup>3,4</sup>, 藤井正明<sup>1,2,4</sup>

### Hydrogen effect on ion selectivity of K<sup>+</sup> channel by using electrospray cryogenic ion trap technique

○Takumi Negoro<sup>1</sup>, Shun-ichi Ishiuchi<sup>1</sup>, James M. Lisy<sup>1,2</sup>, Masaaki Fujii<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory for Chemistry and Life Science, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology, Japan

<sup>2</sup>School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, Japan

<sup>3</sup>Department of Chemistry, University of Illinois at Urbana-Champaign, USA

<sup>4</sup>World Research Hub Initiatives, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology, Japan

**【Abstract】** The K<sup>+</sup> channel is permeable to K<sup>+</sup>, while Na<sup>+</sup> cannot go through even though its ion radius is smaller than that of K<sup>+</sup>. Local interactions between the selectivity filter, a specific domain which binds K<sup>+</sup>, and the ions are responsible for the selectivity. This ion-selectivity is explained by energetical competition between ion-selectivity filter and ion-water interactions. In this work, in order to clarify the role of hydration for the ion-selectivity experimentally, we applied IR spectroscopy combined with electrospray / cold ion trap technique to Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> complexes of AcYNHMe peptide, which is a partial peptide of the selectivity filter, and their hydrated clusters. It was revealed that the hydrated structures of the two complexes is significantly different.

**【序】** K<sup>+</sup>チャネルは K<sup>+</sup>を選択的に透過する膜タンパク質である。Na<sup>+</sup>はイオン半径が 1.16 Å で K<sup>+</sup> (1.51 Å) よりも小さいにも関わらずほとんど通過しない。このような選択的イオン透過のメカニズムの解明のために多くの研究が報告されている。K<sup>+</sup>チャネルの 1 つである KcsA はその結晶構造が解かれ、選択フィルターと呼ばれるアミノ酸配列 Gly-Tyr-Gly (GYG) が K<sup>+</sup> に特異的に配位していることが明らかになった[1]。K<sup>+</sup>チャネルに入る前は、K<sup>+</sup> は水和された状態で存在しているが、チャネルを透過するには脱水和しなければならない。K<sup>+</sup> の場合、GYG への配位構造が K<sup>+</sup> の水和構造に近いいため、K<sup>+</sup> の脱水和によるエネルギー損失を、選択フィルターに結合して得られるエネルギー利得が相殺するため、水和イオンから選択フィルターに容易に移行できる。しかし、Na<sup>+</sup> の場合は水和構造と選択フィルターとの配位構造が異なり、水和構造の方が安定となるため、チャネル内へ侵入できないと考えられている。つまり、イオン選択性は、金属イオンと選択フィルターの結合と水和との競合によって生み出されていると考えられている。K<sup>+</sup> イオンが選択フィルターに結合する様子は X 線結晶構造解析で明らかになった。一方、Na<sup>+</sup> が水和と競合して選択フィルターから除外される様子は理論計算[2]による類推のみで、実験的には観測され

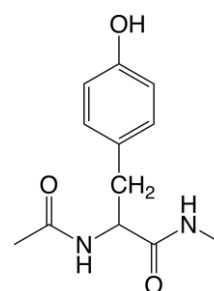


Fig.1. AcYNHMe

ていない。そこで、イオン選択性のメカニズムを解明するために、選択フィルターの部分ペプチド AcYNHMe (Fig.1) のアルカリ金属イオン錯体とその水和クラスターの構造を気相クラスター分光の手法を用いて調べることを着想した。

本研究では、AcYNHMe の  $K^+$  及び  $Na^+$  錯体の水和クラスターをエレクトロスプレー・冷却イオントラップ法で生成し、赤外光解離分光法によりそれらの構造の差異を明らかにすることでイオン選択性のメカニズムを解明することを目的とした。

**【実験方法】** 図 2 に装置図を示す。エレクトロスプレーイオン化法を用いて AcYNHMe  $\cdot M^+$  ( $M=Na, K$ ) 錯体を気相中に取り出し、クラスター生成トラップに導入した。ここでイオンを保持し、水蒸気を含む低温のヘリウムガスと衝突させ、AcYNHMe  $\cdot M^+$  水和クラスター (AcYNHMe  $\cdot M^+ \cdot (H_2O)_n$ ) を生成した。その後、四重極質量分析器で特定のサイズのクラスターを選び出し、冷却イオントラップで保持・冷却 ( $\sim 10$  K) した[3]。ここに波長可変赤外レーザーを導入し、水クラスターの赤外吸収によって解離生成したモノマーイオン (AcYNHMe  $\cdot M^+$ ) を飛行時間型質量分析器で検出した。赤外吸収が起きたときだけモノマーイオンが生成するので、このモノマーイオン量をモニターしながら赤外レーザーを波長掃引することで赤外光解離 (IRPD) スペクトルを測定した。

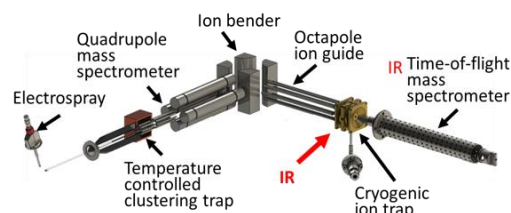


Fig.2. Experimental setup

**【結果・考察】** 図 3 に (a) AcYNHMe  $\cdot K^+ \cdot (H_2O)_1$  と (b) AcYNHMe  $\cdot Na^+ \cdot (H_2O)_1$  の IRPD スペクトル (赤) を示す。水由来のバンドを帰属するために、 $D_2O$  によるクラスターの IRPD スペクトル (青) も測定した。クラスター生成トラップでは、冷却しながら水和クラスターを生成しているため、H/D 交換反応は起こらない。従って、図中に示した振動数領域では、 $H_2O$  クラスターのみを観測されているバンドが水由来のバンドと一義的に帰属できる。水由来のバンドのうち、 $3700 \sim 3750$   $cm^{-1}$  のバンドは水分子の OH 逆対称伸縮振動と帰属できる。 $K^+$  錯体のみを観測された  $3550$   $cm^{-1}$  のバンドは、振動数からプロトンドナーとして水素結合している水の OH 伸縮振動と考えられる[4]。その様な水素結合構造は、水分子がペプチドに結合したときしか起こりえないので、 $K^+$  錯体では水分子がペプチドに水素結合した構造も取りうることを示唆された。一方で、 $Na^+$  錯体ではその様なバンドは観測されておらず、水分子の酸素原子が  $Na^+$  に配位した構造のみが生成していると考えられる。これらの結果は、 $Na^+$  は水和構造の方が安定で、 $K^+$  は選択フィルターと水和の安定性が拮抗しているとする従来の説を支持している。講演ではさらに大きなサイズの水和クラスターの結果についても議論する。

**【参考文献】**

- [1] J. H. Morais-Cabral, et al., *Nature*. **414**, 37-42 (2001)., Y. Zhou, et.al., *Nature*. **414**, 43-48 (2001).
- [2] T. Allen, et al., *Biophys. J.*, **77**, 2502-2516 (1999).
- [3] S. Ishiuchi, et al., *J. Mol. Spectrosc.* **332**, 45-51 (2017).
- [4] D. J. Miller, J. M. Lisy, *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 15393-15404 (2008)

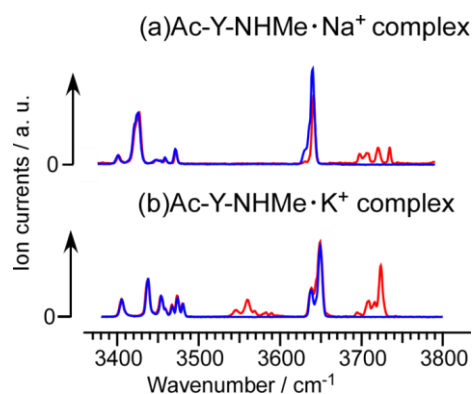


Fig.3. IRPD spectra of hydrated cluster. (a) Red: AcYNHMe  $\cdot K^+ \cdot (H_2O)_1$ , Blue : AcYNHMe  $\cdot K^+ \cdot (D_2O)_1$ , (b) Red: AcYNHMe  $\cdot Na^+ \cdot (H_2O)_1$ , Blue: AcYNHMe  $\cdot Na^+ \cdot (D_2O)_1$