

149. 光刺激による細胞内イオン環境の制御

平野 美奈子

Key words : イオンチャネル, 光感受性

光産業創成大学院大学 光バイオ分野

緒 言

多くの生体分子が複雑に関連し、時々刻々と変化する生命現象を理解するには、変化の起点からの分子や細胞の動的変化を経時的に追う必要がある。そのため、近年、光学と遺伝学を組み合わせた光遺伝学（オプトジェネティクス）という分野が急速に発展し、非侵襲な光刺激によって活性が制御される蛋白質を用いて生命現象を制御する方法が開発されている。例えば、チャネルロドプシン2は光刺激により生体膜の陽イオン（主にNa⁺）の透過性を上昇させる膜蛋白質であり、神経細胞の興奮を操作するツールとして脳・神経研究分野で近年急速に広まった。しかしながら、光刺激により神経細胞の興奮を抑制させる蛋白質や、様々な細胞種で生命現象の制御にかかわっているCa²⁺を調節する蛋白質は未だ開発途上である。チャネルロドプシン2（一般的なイオンチャネルではない）を改変して特定のイオンの選択性を上げる試みはされているが、構造機能相関がほとんど明らかになっていないため、ランダムに変異を入れるという方法が主である。そのため、構造機能相関の情報が豊富である上、高いイオン選択性とイオン透過率を有するイオンチャネルに光感受性を持たせることが求められている。

以前の我々と他のグループのK⁺チャネルのモデルチャネル（KcsAチャネル）の構造機能相関の研究から、KcsAチャネルでは細胞内領域が刺激を感受し、チャネルの開閉を制御していることが明らかとなった^{1,3)}。そのため、KcsAチャネルと他のK⁺チャネル（細胞内領域が刺激感受性を持つもの）の細胞内領域同士を置換したキメラ変異体は、細胞内領域の性質に依存した刺激感受性を持つことがわかった^{2,4)}。このことから、KcsAチャネルの細胞内領域を変えれば、新たな刺激感受性をもつK⁺チャネルを創製できることが示唆された。

そこで、本研究では、新規光感受性イオンチャネルを創製するため、KcsAチャネルの細胞内領域を光感受性蛋白質に置換してKcsAチャネルに光感受性を付加することを検討した。また、イオン選択性フィルター部位への変異導入によるイオン選択性の改変を行った。

方 法

1. KcsAチャネル変異体の作製

遺伝子改変したヒスチジンタグ付きKcsAチャネル変異体を大腸菌で発現させた後、膜画分を界面活性剤n-decyl-β-D-maltosideで可溶化し、TALON affinity columnにより変異体を単離した。

2. 脂質平面膜法による活性の評価

作製したKcsAチャネル変異体を、リポソームに再構成後、電気生理学的手法（脂質平面膜法）で透過するイオンを電流として測定し、活性を評価した。チャネル変異体の光刺激有無による活性の違いを調べた。

3. Ca²⁺感受性色素fura2を用いたCa²⁺透過の測定

リポソームにKcsAチャネル変異体とfura2-dextranを組み込んだ後、リポソーム溶液に最終free Ca²⁺濃度23, 57, 204, 423 nMになるようにCaCl₂を加え、励起波長340 nmと380 nmでの510 nmの蛍光強度を測定した。得られた2つの蛍光強度の比を取り、細胞外Ca²⁺濃度変化に依存したCa²⁺透過の変化を求めた。

結果および考察

1. 光感受性蛋白質付加 KcsA チャンネル変異体の作製と光感受能

光刺激で KcsA チャンネルの開閉を制御するため、KcsA チャンネルの膜貫通領域 (KcsATM) に光感受性蛋白質を付加し、光感受性蛋白質の構造変化を利用して開閉制御することを検討した (図 1)。

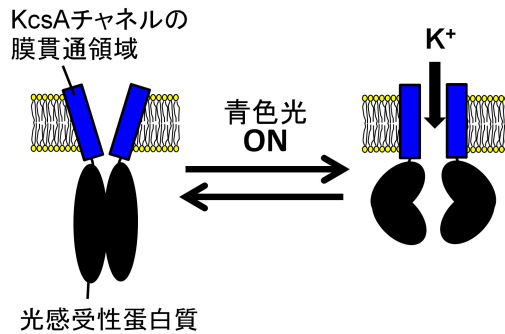


図 1. 光感受性 K⁺チャンネル作製の概要.

光感受性蛋白質の光刺激に伴う構造変化によって、チャンネルを開閉させる。

KcsA チャンネルの膜貫通領域にフォトトロピンの光感受ドメインである LOV2J *a* または光活性化アデニル酸シクラーゼ (PAC) を付加した変異体 (KcsATM-LOV, KcsATM-PAC) を作製した。これらの変異体は、野生型 KcsA チャンネルの膜貫通領域のみ (KcsATM) とは異なる特性を示した (図 2)。KcsATM は常に高い開確率を示す一方、LOV2J *a* を付加した KcsATM-LOV の開確率は常に低かった。LOV2 は二量体を形成することが知られているので、KcsATM-LOV では LOV2J *a* が複合体を作り、四量体からなる KcsA チャンネルのポア部分を閉じた構造にさせているのではないかと考えられる。また、KcsATM-PAC は KcsATM と同じく高い開確率を示したが、KcsATM よりスパイクライク状の短い閉状態が多く見られた。

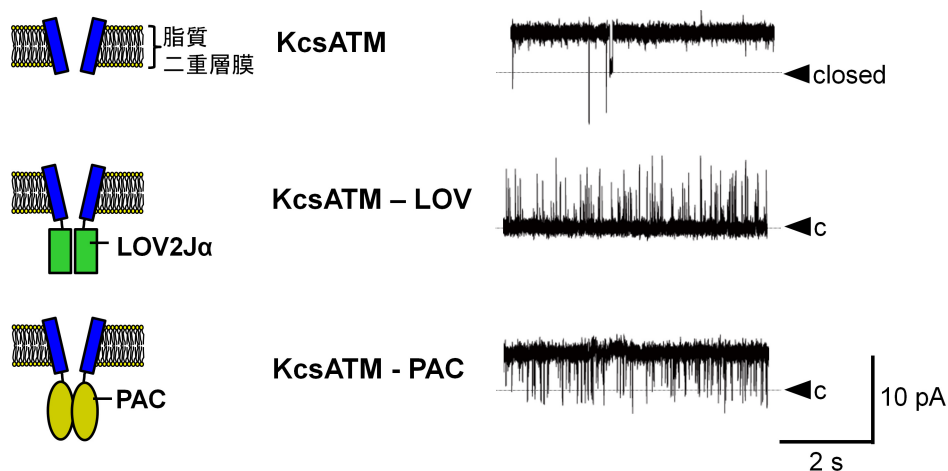


図 2. 光感受性蛋白質付加による KcsA チャンネルの特性の変化.

KcsA チャンネルの膜貫通領域のみ (KcsATM)、KcsATM に LOV2J *a* を付加した変異体 (KcsATM-LOV)、KcsATM に PAC を付加した変異体 (KcsATM-PAC) の電流測定 (+40 mV)。

次に、これらの変異体の LOV2J *a* や PAC による影響を調節するため、KcsATM と LOV2J *a* または PAC の間にリンカーを導入した。他の K⁺チャンネル (BK チャンネル) では、リンカーの長さによって細胞内領域の構造変化のポア部分への伝達が調節され、開閉が制御されることが知られている⁵⁾。その結果、KcsATM-LOV に 18 のアミノ酸からな

るリンカーを導入した KcsATM-18a.a-LOV は、KcsATM-LOV と同様に低い開確率を示すものの他に、高い開確率を示すものも観察され、2つの異なる活性状態を示した。これにより、KcsATM-LOV では、リンカーの長さをさらに微調節することで、光刺激時に活性が変化する変異体を作りだせる可能性が示唆された。一方、PAC 付加変異体への6 または 18 リンカー導入による活性の変化は見られなかった。

2. 変異導入による KcsA チャンネルの K⁺ から Ca²⁺ へのイオン選択性の改変

光感受性 Ca²⁺ チャンネルの創製に向け、K⁺ 選択性を有する KcsA チャンネルの選択性フィルター部位に変異導入し、KcsA チャンネルを Ca²⁺ 透過性へ改変した。Heginbotham らの *Shaker* チャンネルの選択性改変の報告⁶⁾を参考に、KcsA チャンネルの選択性フィルター部位に3つの変異を導入した変異体 ($\Delta Y78 \Delta G79D80E$) と、さらに KcsA チャンネルの不活性化を抑制する変異である E71A も導入した変異体 (E71A $\Delta Y78 \Delta G79D80E$) を作製した。Ca²⁺ 感受性色素 fura2 を用いてこれらの変異体の Ca²⁺ 透過を測定した結果、どちらの変異体も野生型の KcsA チャンネルの場合と比べて、高い Ca²⁺ 透過性を示した (図3)。

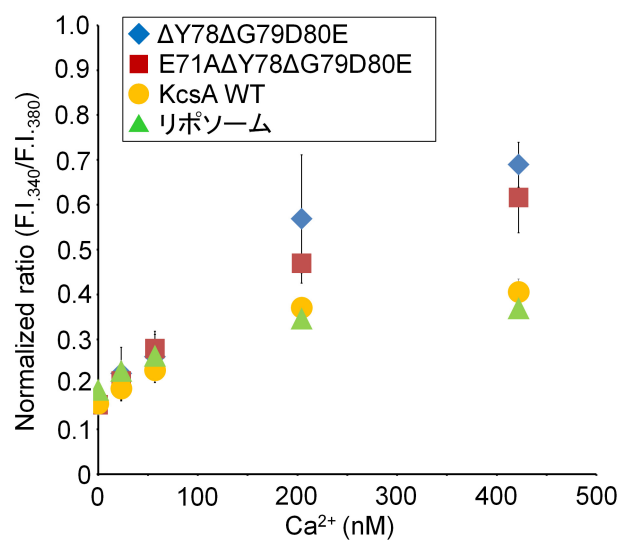


図3. 選択性フィルターへ変異を導入した KcsA チャンネル変異体の Ca²⁺ 透過性.

選択性フィルター部位に数個変異を導入した KcsA チャンネル変異体 2 種 ($\Delta Y78 \Delta G79D80E$, E71A $\Delta Y78 \Delta G79D80E$) と、野生型 KcsA (KcsA WT) を Ca²⁺ 感受性色素 fura2-dextran を含むリポソームに再構成し、リポソーム外液に CaCl₂ を加え、fura2 の蛍光特性の変化を測定した (n = 4)。

また、脂質平面膜法を用いて、カルシウムバッファー中での電流を測定した結果、野生型 KcsA チャンネルでは Ca²⁺ 透過による電流は全く見られなかったが、これらの変異体では Ca²⁺ 電流が観察された (図4)。選択性フィルターはそれぞれのイオン選択性を持つチャンネルで特徴的な配列を保持しているのもので、その配列を考慮して変異を導入すれば、K⁺ から Ca²⁺ だけでなく、K⁺ から Na⁺ への改変もできると考えられる。

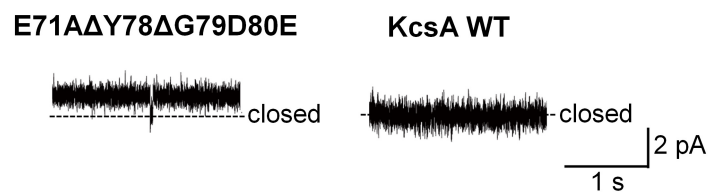


図4. 選択性フィルターへ変異を導入した KcsA チャンネル変異体の Ca²⁺ 電流.

選択性フィルター部位に数個変異を導入した KcsA チャンネル変異体 (E71A $\Delta Y78 \Delta G79D80E$) と、野生型 KcsA (KcsA WT) のカルシウムバッファー中で電流測定 (+40 mV)。

以上1, 2により, KcsA チャネルの刺激感受部位とイオン選択性フィルター部位を改変することで, 様々な特性を持つ変異チャネルを創製できることが示された. 本研究で得られた変異体をさらに改変すれば, 光感受性を有するイオンチャネルが創製できるはずである.

最後に, 本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします.

文 献

- 1) Hirano, M., Takeuchi, Y., Aoki, T., Yanagida, T. & Ide, T. : Rearrangements in the KcsA cytoplasmic domain underlie its gating. *J. Biol. Chem.*, **285** : 3777-3783, 2010.
- 2) Hirano, M., Onishi, Y., Yanagida, T. & Ide, T. : Role of the KcsA channel cytoplasmic domain in pH-dependent gating. *Biophys. J.*, **101** : 2157-2162, 2011.
- 3) Hirano, M., Okuno, D., Onishi, Y. & Ide, T. : A single amino acid gates the KcsA channel . *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **450** : 1537-1540, 2014.
- 4) Ohndorf, U. M. & MacKinnon, R. : Construction of a cyclic nucleotide-gated KcsA K⁺ channel. *J. Mol. Biol.*, **350** : 857-865, 2005.
- 5) Niu, X., Qian, X. & Magleby, K. L. : Linker-gating ring complex as passive spring and Ca²⁺-dependent machine for a voltage- and Ca²⁺-activated potassium channel. *Neuron*, **42** : 745-756, 2004.
- 6) Heginbotham, L., Abramson, T. & MacKinnon, R. : A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K⁺ channels. *Science*, **258** : 1152-1155, 1992.