福井大学リポジトリ
UNIVERSITY OF FUKUI REPOSITORY

水-イオン流束比から解析するイオンチャネルのイオン選択的透過機構

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2013-01-23 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 岩本, 真幸, IWAMOTO, Masayuki メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10098/7150

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成２３年　５月３１日現在

機関番号：13401
研究種目：若手研究（Ｂ）
研究期間：2009～2010
課題番号：21790198
研究課題名（和文）　水ーイオン流束比から解析するイオンチャネルのイオン選択的透過機構
研究課題名（英文）　Analysis of the water-ion coupling ratio during ion-selective permeation through ion channels
研究代表者
岩本　真幸（IWAMOTO MASAYUKI）
福井大学・医学部・助教
研究者番号：40452122

研究成果の概要（和文）：本研究ではイオンチャネルに発生する流動電位を高精度に測定する方法を開発し，KcsA カリウムチャネルの流動電位を系統的に解析してチャネル内をイオンが透過する際に伴う水分子数を明らかにした．また透過イオン種やイオン濃度によってチャネル内部でのイオンと水分子の透過方法が変化することを実験的に証明した．それら結果を踏まえて従来のイオン透過モデルに対して更なる解析を加え，濃度条件によって状態間遷移ルートが変化する様子を可視化した直観的な透過モデルを提案した．

研究成果の概要（英文）：In this study we succeeded in developing the improved method to measure the streaming potential that generates upon ion-selective permeation through ion channels. Extensive analysis of the streaming potential using KcsA potassium channel revealed that the number of water molecules accompanying with a permeating ion is modulated by ion species and its concentration. Based on the experimentally obtained water-ion coupling ratios, we presented here more dynamic and intuitive permeation model for the potassium channels than the conventional model.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２００９年度	2,800,000	840,000	3,640,000
２０１０年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総　計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般
キーワード：生体膜・チャネル・透過

１．研究開始当初の背景

イオンチャネルタンパク質は細胞膜を介するイオンの輸送を制御し，情報伝達や恒常性の維持など重要な生理機能を担っている．この際，イオンチャネルは細胞膜中の単なる「穴」ではなく，多種イオンの中から特定のイオンのみを効率良く透過させる「高効率フィルター」として振舞う．

イオンチャネルにおけるイオン選択的透過機構は基礎医学分野における重要な研究課題であり，様々な手法によってその過程を捉える試みがなされてきた．例えば，イオンチャネル１分子内でのイオンの流れを観測する単一チャネル電流測定，そして結晶構造解析によってイオンチャネル内部のイオン分布を観測する方法などがある．しかし，各手法で観測している現象には時間軸上の大きな隔たりがあり，静的な結晶内イオン分布

と動的な単一チャネル電流（＝僅か 10 pA でも～10^8 個／秒ものイオンの流れに相当）をどの様に結びつけるのか，包括的な見解が未だ得られていない．

一方，現在提唱されているイオン透過機構には着目すべき点がある．それはイオン透過に際し，水がイオンに付随して透過する点である．結晶構造解析によると，イオンチャネル内の透過経路の幅はイオンや水分子の直径程度であり，両者は１列に並んで透過すると考えられている．この様な特殊な環境では，透過経路両側の浸透圧差（＝水の駆動力）によってイオンチャネル内のイオンを押し流す力が生じ，流動電位という起電力として観測されることが予想される．

流動電位を系統的に解析することでイオンチャネル内を透過するイオンと水の比率が得られる．これまでイオン透過機構を考える上でイオンの流れ（＝電流）のみに大きな関心が寄せられてきたが，水分子の関与も考慮することで，より包括的な理解に繋がる可能性がある．

２．研究の目的

本研究では，高い選択性と透過効率を兼ね備えるイオンチャネルタンパク質内のイオン透過機構の理解に向け，新しい観点に立った実験的アプローチを試みる．具体的には，イオンチャネル内透過経路においてイオンと水分子の流れの共役が予想されている点に着目し，実際にカリウムイオンチャネルで共役によって生じる流動電位という起電力を観測することで，これを実証する．また，流動電位の系統的解析からイオンと水の透過比率やその変化を解析し，よりダイナミックで直観的なイオン透過モデルを提案したい．

３．研究の方法

(1)イオンチャネルタンパク質の巨大一枚膜リポソーム（GUV）への再構成

本研究では構造生物学的な研究が最も進んだイオンチャネル，KcsA カリウムチャネルを研究対象とした．まず，精製チャネル試料をアゾレクチンリポソームに再構成したプロテオリポソーム（重量比；タンパク質：脂質＝1:100）を透析法により調製した．次に，プロテオリポソームをカバーガラス上に滴下・乾固させ，室温で一晩かけて再水和させることで直径数十 μm 程度の GUV（**図１A**）を得た．

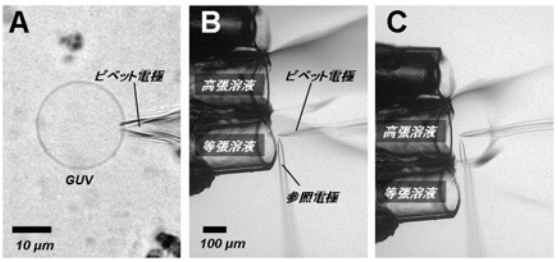

図１．GUV を用いた流動電位測定

(2)流動電位測定

KcsA チャネルを再構成した GUV に対してパッチクランプ法を適用し，流動電位測定を行った。流動電位は膜の両側に浸透圧差を与えた際に生じるイオンチャネルの電気的特性の変化から求めるが，従来法は定常状態で測定を行うため，副反応による膜の電気特性変化分を考慮し補正する必要があった．この場合の副反応とは，浸透圧差に従って膜を横断して水が流れ，膜の片側表面のイオン濃度が希釈されることによる局所的なイオンの濃度勾配の形成である．より正確な流動電位を得るため，本研究では測定中に浸透圧を瞬間的に変化させる手法を試みた．この浸透圧ジャンプによる電気特性の経時変化を解析し，浸透圧を変化させた直後の時間への内挿により副反応が生じる前の変化分のみを抽出した（**図２左下**）．本法ではピエゾ素子で駆動する急速溶液置換装置を用い，溶液条件を数 ms 以内に変化させることができた（**図１B，C**）．

４．研究成果

(1)GUV を用いた流動電位測定法の開発

本研究では先ず，巨大一枚膜リポソーム（GUV）上に埋め込んだイオンチャネルに発生する流動電位を観測する測定系を開発した．本法は細胞系での測定とは異なり精製したイオンチャネルを用いるため，内在性イオンチャネル等の影響を考慮する必要が無い．従って，発生する流動電位に対して一意的な解釈が可能である．また，膜電位コマンドと同期する急速溶液置換装置を備え（**図１B，C**），浸透圧差印加後のイオンチャネル電流の経時的な性質の変化を観測できるようにした．

(2)カリウムチャネルに発生する流動電位の観測

実際のイオンチャネルでの流動電位観測を試みた．実験に用いた KcsA カリウムチャネルは構造解析が最も進んだイオンチャネルで，現在提唱されているイオン透過モデルはこの構造データに基づいている．流動電位の発生は，イオンチャネル電流がゼロとなる電位（＝逆転電位；膜の両側のイオン活量が同じであれば 0 mV）のシフトとして現れる．GUV に組み込んだ KcsA チャネルに対し，膜の両側に浸透圧差を与えたところ，その間逆転電位が僅かにシフトした（**図２**）．逆転電位のシフトは次式①に従って印加した浸透圧差に比例することから，流動電位の発生を観測したものと考えられる．

$$\Delta\Psi = n \cdot \frac{V_w}{z \cdot F} \cdot \Delta\Pi \qquad ①$$

（$\Delta\Psi$，流動電位；$\Delta\Pi$，浸透圧差；n，水ーイオン透過比；V_W，水のモル体積；z，価電数；F，ファラデー定数）

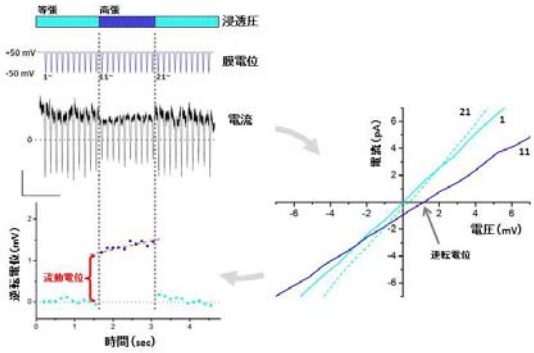

図２．浸透圧ジャンプによる逆転電位のシフト，およびその経時変化データからの流動電位の算出

(3)イオン透過様式の変化

流動電位の解析から水ーイオン透過比(式①の n）を求めることができる．この透過比は，チャネル内をどの様にイオンが透過するかを推察するに重要な指標である．本研究では様々な K^+ 濃度下で発生する流動電位を解析し，濃度依存的に n が変化することを明らかにした（**図３**）．K^+ 200 mM 存在下では１つの K^+ に対して H_2O が 1.0 分子付随して透過する（n＝1.0）ことが分かった．この結果は，K^+ と H_2O が交互に並んでチャネル内を移動するという既存の透過モデルを支持するものであった．そして K^+ 濃度を 3 mM まで下げると H_2O が 2.2 分子（n＝2.2）となり，透過イオンの濃度によって透過様式が変化することを明らかにした．また K^+ を Rb^+ に置換した場合，200 mM 存在下でも n＝2.0 となった．Rb^+ もカリウムチャネルを透過することは知

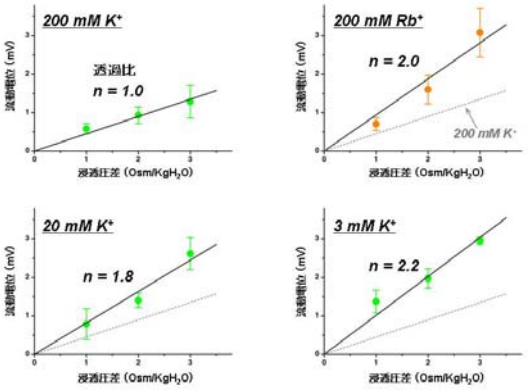

図３．溶液のイオン条件による水ーイオン透過比（n）の変化

られていたが，K^+ とは異なる透過様式であることを明らかにした．

(4)直観的なイオン透過モデルの構築

結晶構造中のイオン分布や単一チャネル電流データから構築されたイオン透過モデル（８状態透過モデル，**図４Ａ**）に今回の実験結果を加味し，実際の透過ではどの状態をどのように遷移しているのか解析・可視化を試みた．この際，８状態透過モデル上の任意の状態から別の状態へ次々に遷移し再び元の状態に戻るルートをサイクルと呼び，サイクルが完結する速度をサイクルフラックスとした．８状態透過モデルには様々なサイクルが存在し，水ーイオン透過比や単一チャネル電流は各サイクル固有の透過比やサイクルフラックスの加重平均となる．この関係を利用して各サイクルの寄与率を求め，イオン濃度条件によって透過に利用する状態遷移ルートが変化する様子を可視化することができた（**図４Ｂ**）．

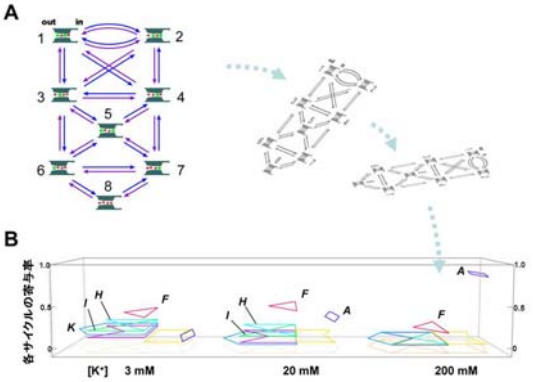

図４．８状態イオン透過モデルとイオン濃度による状態間遷移サイクルの変化

(5)まとめ

以上，本研究ではKcsAカリウムチャネルに発生する流動電位の系統的解析により，チャネル内をイオンが透過する際に伴う水分子の数（n）を明らかにした．透過イオン濃度やイオン種によるnの明らかな変化は，チャネル内部での透過イオンと水分子の配位の変化，つまり透過機構の変化を示唆する．この実験結果を踏まえ，既存の透過モデルに対してサイクルフラックスの概念を導入した解析を試みた．イオン濃度条件ごとに使用する状態間遷移ルートが変化していく様子が可視化され，イオン透過がより直観的に表現された透過モデルを提案した．

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計７件）

① Oiki S., Iwamoto M., Sumikama T. “Cycle flux algebra for ion and water flux through the KcsA channel single-file pore links microscopic trajectories and macroscopic observables” *PLoS ONE* 6 (2011) e16578 査読有

② Iwamoto M., Shimizu H., Muramatsu I., Oiki S. “A cytotoxic peptide from a marine sponge exhibits ion channel activity through vectorial-insertion into the membrane” *FEBS Lett.* 584 (2010) 3995-3999 査読有

③ Oiki S., Iwamoto M., Sumikama T. “A mesoscopic approach to understanding the mechanisms underlying the ion permeation on the discrete-state diagram” *J. Gen. Physiol.* 136 (2010) 363-365 査読有

④ Iwamoto M., Shimizu H., Muramatsu I., Matsunaga S., Oiki S. “A cytotoxic peptide from a marine sponge, polytheonamide B: I. Channel activity and vectorial-insertion into the membrane” *Biophys. J.* 98 (2010) 110a 査読無

⑤ Iwamoto M., Shimizu H., Muramatsu I., Matsunaga S., Oiki S. “A cytotoxic peptide from a marine sponge, polytheonamide B; II. Properties for ion conduction and voltage dependent gating” *Biophys. J.* 98 (2010) 109a 査読無

⑥ Iwamoto M., Shimizu H., Oiki S. “The water-ion coupling ratio for ion permeation through the KcsA potassium channel: Dependencies on concentration and species of permeating ions” *Biophys. J.* 96 suppl. (2009) 179a 査読無

⑦ Iwamoto M., Shimizu H., Oiki S. “Ion distribution in the open KcsA channel evaluated by the streaming potential” *J. Physiol. Sci.* 59 suppl. (2009) 256 査読無

〔学会発表〕（計６件）

① 岩本真幸，清水啓史，村松郁延，松永茂樹，老木成稔 「新奇異常ペプチドの一方向膜挿入による一価陽イオン選択性ポアの形成」 日本生物物理学会第48回年会，仙台，2010.9.22

② 岩本真幸，清水啓史，村松郁延，松永茂樹，老木成稔 「海綿由来細胞毒性ペプチドポリセオナミドBのイオンチャネル活性および細胞膜挿入機構」 第87回日本生理学会大会，盛岡，2010.5.20

③ Iwamoto M., Shimizu H., Muramatsu I., Matsunaga S., Oiki S. “A cytotoxic peptide from a marine sponge, polytheonamide B: I. Channel activity and vectorial-insertion into the membrane” Biophysical Society 54th Annual Meeting, San Francisco, USA, 2010.2.21

④ Iwamoto M., Shimizu H., Muramatsu I., Matsunaga S., Oiki S. “A cytotoxic peptide from a marine sponge, polytheonamide B; II. Properties for ion conduction and voltage dependent gating” Biophysical Society 54th Annual Meeting, San Francisco, USA, 2010.2.21

⑤ 岩本真幸，清水啓史，老木成稔 「流動電位から解析した開状態 KcsA カリウムチャネル内のイオンと水の分布」 日本生物物理学会第 47 回年会，徳島，2009.11.1

⑥ Iwamoto M, Shimizu H, Oiki S. “Ion distribution in the open KcsA channel evaluated by the streaming potential” 第 36 回国際生理学会世界大会，京都，2009.7.29

６．研究組織

(1) 研究代表者

岩本　真幸（IWAMOTO MASAYUKI）
福井大学・医学部・助教
研究者番号：40452122