

# 論文の内容の要旨

## 論文題目

### NMR 多量子遷移の緩和速度を用いたカリウムイオンチャネルの 開閉機構の解明

氏名

外山 侑樹

#### 【背景】

pH 依存性カリウムイオン ( $K^+$ ) チャネル KcsA は、細胞内 pH が 5.0 以下に低下することで開口する。KcsA の各サブユニットは 2 本の膜貫通ヘリックスからなる膜貫通領域と、1 本の  $\alpha$ -ヘリックスからなる細胞内領域からなり、4 量体を形成することにより機能する。4 量体の中央には  $K^+$ 透過路が形成され、 $K^+$ の選択的透過を担う selectivity filter (SF) と、各サブユニットの 4 本の膜貫通ヘリックスが組み合わさった helix bundle crossing (HBC) の 2 か所の領域が  $K^+$ 透過を制御するゲートとして機能する (Fig.1A)。

KcsA の単一チャネル電流解析より、KcsA が活性化する pH 3.0 の条件において、 $3,000\text{ s}^{-1}$ 程度のサブミリ秒のタイムスケールで  $K^+$ を透過しない状態と、 $K^+$ を透過する状態を遷移していることが知られている (Fig.1B)。このサブミリ秒オーダーの開閉は真核生物の  $K^+$ チャネルにおいても観測されており、神経伝達速度の制御に関与していることが示唆されているものの、どの部位の構造変化に起因するのかわかっていない。このサブミリ秒オーダーの開閉の構造機構を明らかにするには、KcsA のどの部位に化学交換が存在するかを明らかにする必要がある。

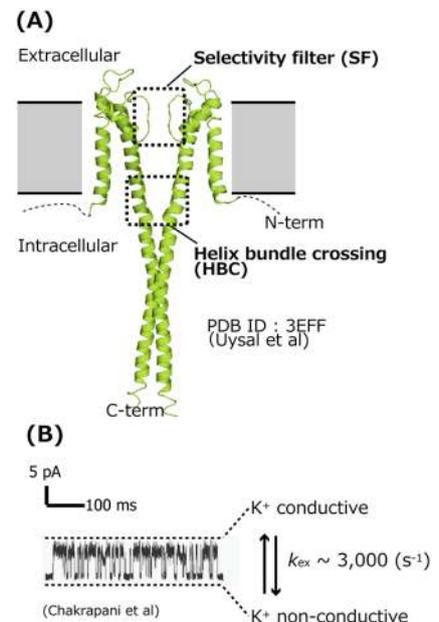


Fig.1 (A) KcsA の立体構造 (PDB ID: 3EFF) (B) pH 3.0 における KcsA の単一チャネル電流解析の結果 (Chakrapani et al, 2007)

界面活性剤に可溶化した KcsA4 量体は分子量が 120 kDa 以上となり、シグナルの感度と分解能が大きく低下する。このような場合、側鎖メチル基を選択的に  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  標識した試料を用いて、多量子 (multiple quantum, MQ) 遷移を観測する methyl-TROSY 法が有効である。Methyl-TROSY 法で観測する MQ 遷移は、Fig.2(A) に示すような零量子 (zero quantum, ZQ) 遷移と二量子 (double quantum, DQ) 遷移からなる。

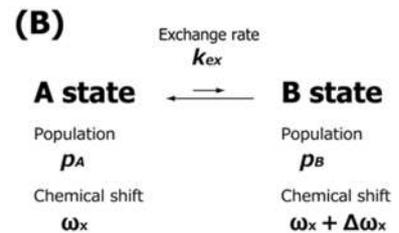
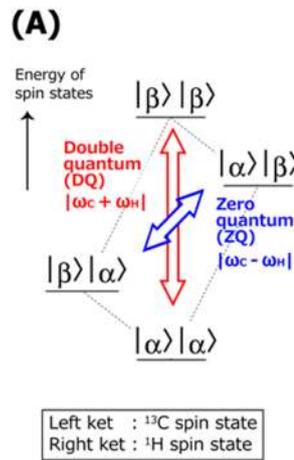


Fig.2 (A) Methyl-TROSY 法により観測対象となる多量子遷移のエネルギー図 (B) A 状態, B 状態の 2 状態間の化学交換にある系の説明図。(X= $^1\text{H}$  or  $^{13}\text{C}$ )

DQ 遷移と ZQ 遷移はエネルギー差が異なるため、Fig.2 (B) に示すような 2 状態の化学交換がある場合、DQ 遷移は  $\Delta\omega_C + \Delta\omega_H$ 、ZQ 遷移は  $\Delta\omega_C - \Delta\omega_H$  の異なる化学シフト差により緩和が生じる。したがって、methyl-TROSY 法によるマイクロ秒からミリ秒の化学交換の解析を行う場合、DQ 遷移, ZQ 遷移の化学交換による緩和の影響が打ち消しあうため、化学交換が存在する部位の同定や、化学シフト差の大小や速度論的なパラメーターを定量的に評価することが困難であった。

そこで、本研究は、(1) 高分子量タンパク質の側鎖メチル基を対象として、マイクロ秒からミリ秒オーダーの化学交換を解析する新規 NMR 手法の開発すること、そして開発した手法により (2) KcsA のサブミリ秒オーダーの開閉がどの部位の構造変化、化学交換に起因するのかを明らかにすることを目的とした。

## 【結果】

### (1) 高分子量タンパク質の側鎖メチル基を観測対象とし、マイクロ秒からミリ秒オーダーの化学交換が存在する部位の検出、その定量的評価が可能なメチル- $\Delta R_{MQ}$ 法を確立した。

高分子量タンパク質の化学交換を解析する汎用性の高い手法を考案するにあたり、本研究では多量子遷移の緩和速度の差  $\Delta R_{MQ}$  に着目した。 $\Delta R_{MQ}$  は下記のように DQ 遷移と ZQ 遷移の緩和速度  $R_{DQ}$ ,  $R_{ZQ}$  の差によって定義されるパラメーターである。

$$\Delta R_{MQ} = R_{DQ} - R_{ZQ}$$

$\Delta R_{MQ}$  における化学交換の寄与は、Fig.2 (B) の化学交換のパラメーターを用いて下記の式で近似することができる。

$$\Delta R_{MQ,ex} = \frac{4\Delta\omega_H\Delta\omega_C\rho_A\rho_B}{k_{ex}}$$

$\Delta R_{MQ,ex}$  の大きさは  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  化学シフト差の積に対して比例することから、化学シフト差の違いをより鋭敏に反映し、その大きさを定量的に比較することが容易となると考えた。また  $\Delta R_{MQ}$  は多量子遷移からなるため methyl-TROSY 効果によって、高感度かつ高精度に解析することが可能である。

ただし、 $\Delta R_{MQ}$ の実測値には化学交換の寄与  $\Delta R_{MQ,ex}$  だけではなく、化学交換非依存項  $\Delta R_{MQ,0}$  が含まれ、その大きさは高分子量タンパク質では  $\Delta R_{MQ,ex}$  と同程度になりうる。そこで、本研究では交換速度に応じて  $\Delta R_{MQ,ex}$  を分離して評価するための2つの手法、異種核二重共鳴 (HDR) 法と、磁場依存性解析法を用いることとした。

第1の方法である HDR 法では、10 kHz 程度の高周波数の HDR パルスを照射しながら、 $\Delta R_{MQ}$  を測定すると、通常は 1 kHz 程度の大きさである化学シフト差がほぼ完全に平均化し、 $\Delta R_{MQ,ex}$  の大きさがほぼ 0 になることを利用する。以下の式のように、HDR 非照射時に測定した  $\Delta R_{MQ}^{(-)}$  と HDR を照射しながら測定した  $\Delta R_{MQ}^{(+)}$  の差を計算することで、 $\Delta R_{MQ,ex}$  を算出することが可能となると考えた。HDR 法は HDR パルスが化学シフト差を平均化できる、交換速度が  $10^2 \sim 10^4$  ( $s^{-1}$ ) の化学交換に有効である。

$$\begin{aligned} \text{異種核二重共鳴非照射時} \quad \Delta R_{MQ}^{(-)} &= \Delta R_{MQ,0} + \Delta R_{MQ,ex} \\ \text{異種核二重共鳴照射時} \quad \Delta R_{MQ}^{(+)} &= \Delta R_{MQ,0} \\ \text{化学交換の寄与の抽出} \quad \Delta R_{MQ,ex} &= \Delta R_{MQ}^{(-)} - \Delta R_{MQ}^{(+)} \end{aligned}$$

第2の方法である磁場依存性解析法は、 $\Delta R_{MQ,ex}$  の大きさが磁場強度の2乗に比例することを利用して化学交換の寄与を解析する方法である。磁場強度の2乗に対する  $\Delta R_{MQ}$  の傾き  $S$  は下記式で表せられる。 $S$  には化学交換の寄与に加えて、CSA 相互作用の寄与  $\Delta_{CSA}$  の大きさも反映されるため半定量的ではあるが、HDR 法の適用が困難な、交換速度が  $10^4 \sim 10^5$  ( $s^{-1}$ ) の化学交換に有効である。

$$S = \frac{\partial(\Delta R_{MQ})}{\partial(B_0^2)} = \frac{4\gamma_H\gamma_C\Delta\omega_H\Delta\omega_C\rho_A\rho_B}{k_{ex}} + \Delta_{CSA}$$

以上より、高分子量タンパク質の側鎖メチル基の  $\Delta R_{MQ}$  を算出し、HDR 法もしくは磁場依存性解析法により化学交換の寄与を抽出する一連の解析法であるメチル- $\Delta R_{MQ}$  法を考案した。モデルタンパク質を用いた検討から、化学交換がない系で  $\Delta R_{MQ,ex}$  が検出されないこと、化学交換が存在する系で正しい  $\Delta R_{MQ,ex}$  を算出できたことを示し、メチル- $\Delta R_{MQ}$  解析を確立することに成功した。

## (2) 野生型 KcsA のメチル- $\Delta R_{MQ}$ 解析より、サブミリ秒オーダーの化学交換が存在する部位を同定した。

界面活性剤ミセルに可溶化した野生型 KcsA の側鎖 Leu, Val メチル基を解析対象として、メチル- $\Delta R_{MQ}$  解析法を適用した。磁場依存性解析法により各メチル基の  $\Delta R_{MQ}$  の傾き  $S$  を算出したところ、Leu40 $\delta$ 2 や Val76 $\gamma$ 1, Leu110 $\delta$ 1 をはじめとするメチル基には  $\Delta_{CSA}$  の予測値よりも顕著に大きな  $S$  が観測されており、これら部位にサブミリ秒オーダーの化学交換が存在することが分かった (Fig.3)。

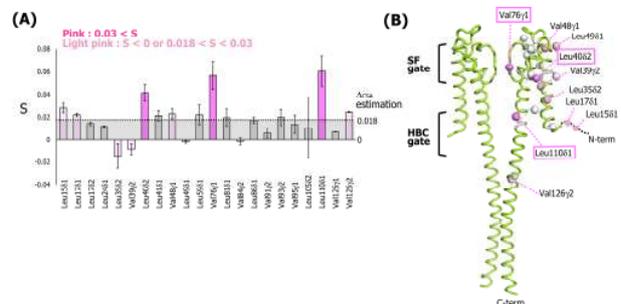


Fig.3 (A) KcsA のメチル- $\Delta R_{MQ}$  解析において、顕著な  $S$  が観測された部位をピンクで示した。(B) 立体構造上へのマッピング (PDB ID :3pjs)

**(3) サブミリ秒オーダーの開閉の性質の異なる E71Q 変異体とのメチル- $\Delta R_{MQ}$  解析結果の比較より、開閉に伴う構造変化と関連した化学交換が存在する部位を同定した。**

サブミリ秒オーダーの開閉の性質が異なる E71Q 変異体と比較することで、ゲート開閉を反映した化学交換を同定することとした。野生型と E71Q 変異体とで単一チャネル電流解析におけるサブミリ秒オーダーの開閉を比較した場合、野生型では  $K^+$  を透過しない状態の割合が 20 % 程度である一方、E71Q 変異体では  $K^+$  を透過しない状態の割合が 40 % 程度にまで上昇している。

そこで E71Q 変異体についても  $\Delta R_{MQ}$  の磁場依存性を解析し、野生型と比較した。その結果、Leu35 $\delta$ 2, Leu41 $\delta$ 1, Val84 $\gamma$ 2, Val91 $\gamma$ 2, Val93 $\gamma$ 2 には野生型と比べて E71Q 変異体で  $S$  の増大が観測された (Fig.4)。これらの部位にはゲーティングの変化と対応した  $p_B$  の増大が生じている部位であることが示唆され、サブミリ秒オーダーの開閉と密接に関連した化学交換が存在する部位であると同定した。

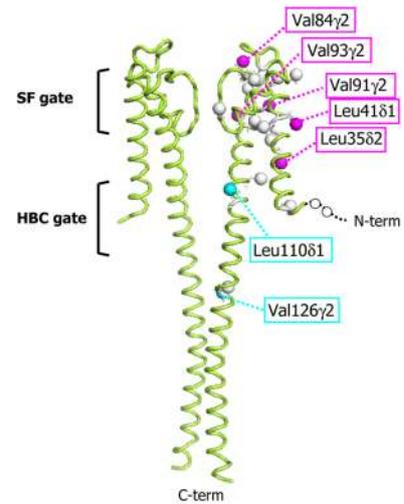


Fig.4 E71Q 変異体のメチル- $\Delta R_{MQ}$  解析において、 $S$  の増大が観測された部位をマゼンタで、 $S$  の減少が観測されたメチル基をシアンでマッピングした。(PDB ID :3pjs)

**【考察】**

SF ゲートを形成する Val76 $\gamma$ 1 に着目した場合、野生型と E71Q 変異体では  $S$  の変化は観測されていないことから、SF ゲートはサブミリ秒オーダーの開閉において、顕著な構造、運動性の違いが生じていないことが分かった。一方、膜貫通領域のヘリックス間の相互作用部位 (Val91 $\gamma$ 2, Val93 $\gamma$ 2) や HBC ゲート近傍 (Leu35 $\delta$ 2) に  $S$  の増大が観測されていたことから、 $K^+$  透過活性の変化は膜貫通領域のヘリックスの構造、運動性の変化を伴うことが示唆された。

以上より、KcsA のサブミリ秒オーダーの開閉は、HBC ゲートの構造変化に起因するという機構を提唱した。

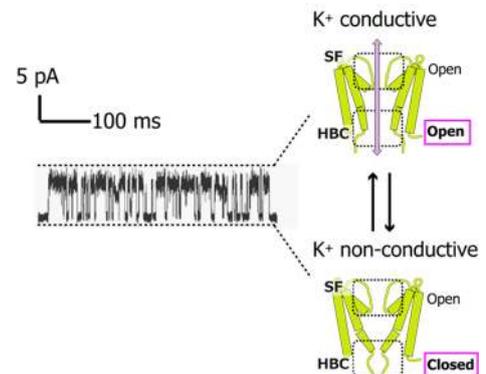


Fig.5 提唱したサブミリ秒オーダーの開閉の構造機構の模式図 (電気生理解析は(Chakrapani et al, 2007)より)

**【結論】**

本研究において私は、高分子量タンパク質の側鎖メチル基を対象として、マイクロ秒からミリ秒オーダーの化学交換を解析するメチル- $\Delta R_{MQ}$  解析法を確立し、そして KcsA のサブミリ秒オーダーの開閉は、HBC ゲートの構造変化を伴う化学交換に起因するという構造機構を提唱した。本研究で提唱された機構は  $K^+$  チャネルのポア領域の高い保存性から、他の真核生物の  $K^+$  チャネルにも適用可能であり、 $K^+$  チャネルをターゲットとした新規薬物の開発に資することが期待される。