

# X線一分子追跡法により明らかになった KcsA カリウムチャネルのゲート開閉機構

老木成稔 福井大学医学部・分子生理 〒910-1193 福井県吉田郡永平寺町松岡下合月第23号3番地

**要旨** 膜蛋白質である KcsA カリウムチャネルはイオン透過路を開閉（ゲーティング）することにより電気信号を発生させる。X線1分子追跡法により KcsA チャネルが示す構造変化の軌跡をリアルタイムで捉えた。KcsA チャネルは中性 pH ではゲートが閉じている。このときわずかな構造ゆらぎが観察された。一方、ゲーティングを起こす酸性 pH では分子の長軸のまわりに大きくねじれる構造変化を示した。この構造変化は膜貫通ドメインから細胞質ドメインに伝播した。イオンチャネルで可能な1分子測定法について簡単に概観した。

## はじめに

イオンチャネルはあらゆる生物種の、あらゆる細胞の細胞膜に存在する膜蛋白質である。その機能は、膜の主構造である脂質2重層という絶縁物の中にイオン透過路を形成することである。細胞内外液に存在する多種類のイオンの中から特定のイオンを、速やかに ( $10^8$  イオン/秒)、受動的に（電気化学的勾配にしたがって）透過させる。さらに膜内外の化学的・物理的刺激を受容し、これに応じてイオン流のオン・オフを行う（ゲーティング<sup>1)</sup>。イオンチャネルの細胞機能に果たす役割は、細胞膜を介して大量のイオンを輸送することが一つ。さらに、高速に荷電物質を流すことで発生する電流が、他の膜蛋白質では実現しえない機能をイオンチャネルにもたらしている。それは膜電位を速やかに変えることができるということ、それによって膜電位変化という物理現象を情報のメディアとする事が出来ることである。ひとつだけ例を挙げれば、チャネルは膜電位のパルス状変化である活動電位を発生させる。これが細胞膜上を秒速100メートルで神経線維上をどこまでも伝わることで神経ネットワークの高速性を保障している。

チャネルの機能はイオンを流し、イオン流のオン・オフを制御することなので、チャネル機能を電氣的に測定することができる（電気生理学）。すでに40年前に1分子のチャネル機能が測定可能（単一チャネル電流記録法）となり、1分子測定のさきがけとなった<sup>2)</sup>。単一チャネル電流記録法では1分子の振る舞い（イオン透過とゲーティング）を比較的簡単に、しかも詳細に解析でき、このことがチャネルを研究対象とする最大の利点である。もちろんチャネルも蛋白質の一種であるからにはチャネルで得られる情報は蛋白質一般に対する重要な知見を与えてくれる。蛋白質の機能に関わるダイナミクスという重要な課題をチャネル

蛋白質という窓を通して垣間見たい、これがチャネル研究者、とくにチャネル素子学の目指すところである<sup>3)</sup>。

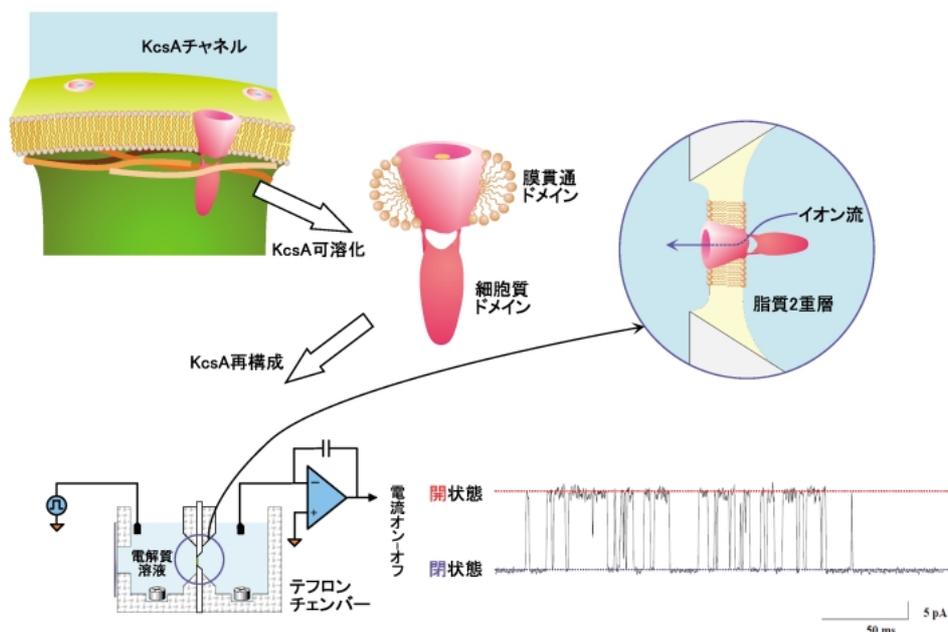
本稿ではイオンチャネルのゲーティングとは何かということを実験例に即して導入し、今回適用したX線1分子追跡法の概要と結果<sup>4)</sup>を紹介したい。

## チャネルのゲーティングとは

チャネル機能の測定について、具体的な実験データを見ることがチャネルのイメージをつかんでいただきたい。ここではチャネル機能を最も単純でコントロールされた条件で測定できる脂質平面膜法での実験について述べる。

細胞膜は脂質2重層からできているが、この膜を人工的に作ることは簡単である（Fig. 1）。電解質溶液を隔てた隔壁に小さな穴をあけ、ここにリン脂質を吹き付けて膜を張る。これを脂質平面膜あるいは人工膜と呼ぶ<sup>5)</sup>。細胞膜上に存在するチャネル蛋白質は膜を壊して抽出し、本来膜に埋まっている膜貫通部分を界面活性剤でカバーすることによって可溶化することができる。これを脂質平面膜に埋め込めば、チャネルは生体膜上と同じように振舞う。チャネル分子はイオン流を受動的に流すデバイスであるので、チャネルの活動は膜を越えて流れる電流として測定することができる。小さな面積の膜にたった1分子のチャネルを埋め込めば、チャネルがイオンを流したり、遮断したりという1分子の活動が、電流の離散的なオン・オフとして観察することができる（数 pA～数十 pA のオーダーの電流）。チャネルはイオンを流すスイッチなのである。このときイオン透過路を開閉するのがゲートである。

ゲートの開閉は確率過程である（Fig. 1 右下）。閉じていたゲートが開くのは突然で、いつ開くかは確率的にしかわからない。じわじわと電流が流れ始めるわけではなく一瞬



**Fig. 1** Single-channel current recordings. Procedures for isolating KcsA potassium channel and for recording single channel current by planar lipid bilayer method. KcsA channel expressed in *E. coli* was solubilized by a detergent, which was then reconstituted into liposome. A Teflon chamber separated by a septum with a hole of 50  $\mu\text{m}$  in diameter was assembled and electrolyte solution was filled in both side of compartments (200 mM KCl). Planar lipid bilayer membrane was formed from defined composition of phospholipids, and liposomes containing the channel molecule were added into one side of the membrane. The channel molecule was transferred from the liposome to the planar membrane, where channel activity was measured as on and off of ionic currents (a single-channel current trace recorded at +200 mV). Note that the noise level was increased during the open state, which represents fluctuation of the open structure.

で定常値に達する（周波数応答性の高いアンプ [数100 kHzの周波数帯域] で測定しても電流値ジャンプの途中経過が測定された例はない）。この電流量を単一チャンネル電流とよび、イオン透過路（ポア）を毎秒 $10^8$ 個程度のイオンが流れている。ある時間ゲートが開いた後、それは突然閉じる。どれだけの時間開いているかも確率的にしかわからない。記録をつづけると一定の高さとランダムな持続時間を持った矩形波が生起する。これが1分子のチャンネル活動の描像である。

キネティクス情報には反応の遷移状態の情報などが含まれているが、これは分光学など他の方法では捉えにくい。構造変化キネティクスのデータを1分子レベルで大量に取得できるのだから、蛋白質ダイナミクスに関する多くの知見がチャンネル研究から得られてきた。たとえばゲーティングの活性化エネルギー、遷移状態の構造、構造変化経路に関する情報、さらにキネティクスの非マルコフ性などである。

ゲーティングという現象の裏でチャンネル分子のどのような構造変化が起こっているのだろうか。単一チャンネル電流でみる離散的で瞬間的なゲーティング現象は、ポアそれ自体の構造変化か、あるいは他の構造物（蓋に相当するもの）がイオン流を遮断することにより起こっているはずである。この問題はチャンネル研究者の長年のテーマであった

が、現実的にアプローチしうる問題になってきたのはチャンネル蛋白質の立体構造が明らかになった10年前に過ぎない。米国ロックフェラー大学 R. MacKinnon のグループが初めてカリウムチャンネルの結晶構造を明らかにしたのである<sup>6,7)</sup>。

## カリウムチャンネル遺伝子

ここでカリウムチャンネルがチャンネルの中で占める意義について簡単に触れておきたい。カリウムチャンネルはチャンネルの中でもっともユビキタスに存在する。もちろん生物種や発現している細胞によってカリウムチャンネル遺伝子は異なるがその基本特性と構造は共通である。きわめて高いカリウムイオン選択性 ( $\text{Na}^+$  と比べて1000倍以上) と速い透過速度 ( $10^8$  イオン/秒) という特性を実現するための基本構造がポアドメインである (Fig. 2)。膜貫通ヘリックスを2つ持ち、イオン選択性に関わるアミノ酸配列をもつことがチャンネルポアを形成させるための最小要件である。このような構造ユニットは4つの同一あるいは相同なサブユニットが会合して、中心にポアが形成される。カリウムチャンネルの場合、 $\text{K}^+$  イオンを選択するための選択性特異配列 (signature sequence: Thr-Val-Gly-Tyr-Gly) が高く保存されている。ポアドメインの基本構造はカリウ

ムチャネルに限らず、ナトリウムチャネルやカルシウムチャネルを含めた巨大な遺伝子集団に共通している。これを**電位依存性類似チャネル超遺伝子族**と呼ぶ<sup>8)</sup>。ポア基本構造は変えずに、選択性特異配列という部分構造を代えることによって他のイオン選択性をもったチャネル種に変化する。実際、ナトリウムチャネルやカルシウムチャネルのポアドメインは分子進化の過程の中でこのようにして作られてきたと考えられている<sup>9)</sup>。これらのチャネルはポアドメイン単独で存在するのではなく、ポアドメインを取り囲んで電位センサドメインを持っている。これによって膜電位変化にตอบสนองしてゲートを開閉することができる。これを**電位依存性チャネル**と呼ぶ。電流を発生させるというチャネルの基本機能に加え、電流発生の結果起こる膜電位変化を感受する特性を獲得するにいたり、フィードバック機構を備えた電気素子が完成する。これらのチャネルが生体電気現象を担う中心的蛋白質である。

電位依存性類似チャネル超遺伝子族の中で最も構造が単純な K チャネルを明らかにすることが、これらの大集団の共通の分子機構を明らかにする上で突破口を開くことになる。

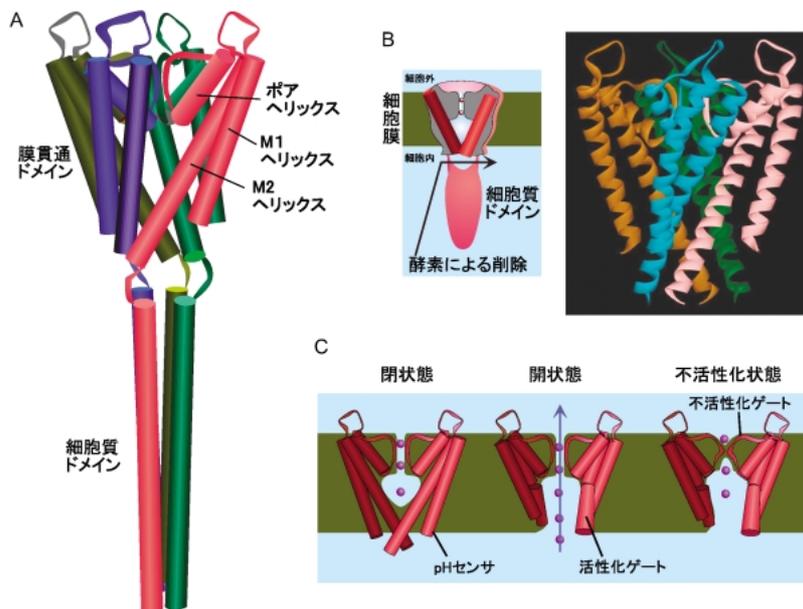
## カリウムチャネルの立体構造

KcsA カリウムチャネルは放線菌 (*Streptomyces lividans*)

由来のチャネル蛋白質で、アミノ酸残基数160と、チャネルとしては分子サイズが小さい。2回の膜貫通ヘリックスを持つ遺伝子族に属し、ヒトでは心筋などで生理的にきわめて重要な内向き整流性 K チャネル族のひとつである。KcsA チャネルには内向き整流性作用はなく、細胞質側が酸性 pH のとき開く。生化学的に安定で、界面活性剤中でも4量体を保ち、脂質平面膜への再構成でチャネル機能が観察できる。大量発現が可能なことで結晶化に成功したわけだが、膨大なチャネル分子種の中で KcsA チャネルのような大量発現が可能で安定性の高い蛋白質を得られたことが、他の分光学研究などを著しく推進した<sup>10-12)</sup>。分子量は小さいが K チャネルの基本機能である高い K 選択性と透過性だけでなく、多くの K チャネルが示す不活性化というゲート特性をも示すので、ポアドメインの基本特性を研究するには最適のチャネル蛋白質である<sup>7)</sup>。

K チャネルは、膜貫通ドメインと細胞質ドメインからなる (Fig. 2A)。膜貫通ドメインの各サブユニットの構成は M1, M2 ヘリックスと短いポアヘリックス、ポアヘリックスと M2 ヘリックスを繋ぐループ領域からなる。KcsA チャネルは細胞質ドメインを削除した状態で結晶化された (Fig. 2B)。膜貫通ドメインだけでもチャネルとしての機能が保たれることが示されている。細胞質ドメインは長いヘリックスであることがごく最近明らかになった。

チャネルのイオン透過は膜貫通ドメインで行われてい



**Fig. 2** Structure of the KcsA potassium channel and its functional parts. **A.** Molecular architecture of the full length KcsA channel. The KcsA channel is formed by tetrameric assembly. **B.** The transmembrane domain of KcsA channel in the closed structure. The ribbon model is drawn from the KcsA coordinate of 1k4c. **C.** The gating status and the relevant parts of the channel molecule. The pH sensor is located at the cytoplasmic side of the transmembrane domain. When the channel is closed the M2 helices form bundle crossing at the cytoplasmic end, which prevents ion permeation. Relaxing the bundle of helices leads to opening of the gate (the activation gating). The upper part of the pore (selectivity filter) collapses its structure and obstructs the ion conduction pathway (the inactivation gating). The channel allows to permeate ions only when both activation and inactivation gates stay open.

る。回転対称軸に一致してイオン透過路（ポア）が存在する。ポアは、細胞内側では M2 ヘリックス束に裏打ちされた内腔の広い領域で、細胞外側では 4 本のループが接近した狭い（内径 3 Å）選択性フィルタからなる（Fig. 2C 開状態参照）。選択性フィルタを形成しているのが選択性特異配列であり、この部分で K<sup>+</sup> イオンを選択する。この選択性フィルタをイオンが透過するには当然水和水を大部分脱ぎ捨てる必要がある。イオン透過・選択性はチャンネル機能の本質であるがここでは触れる余裕がない<sup>13,14</sup>。

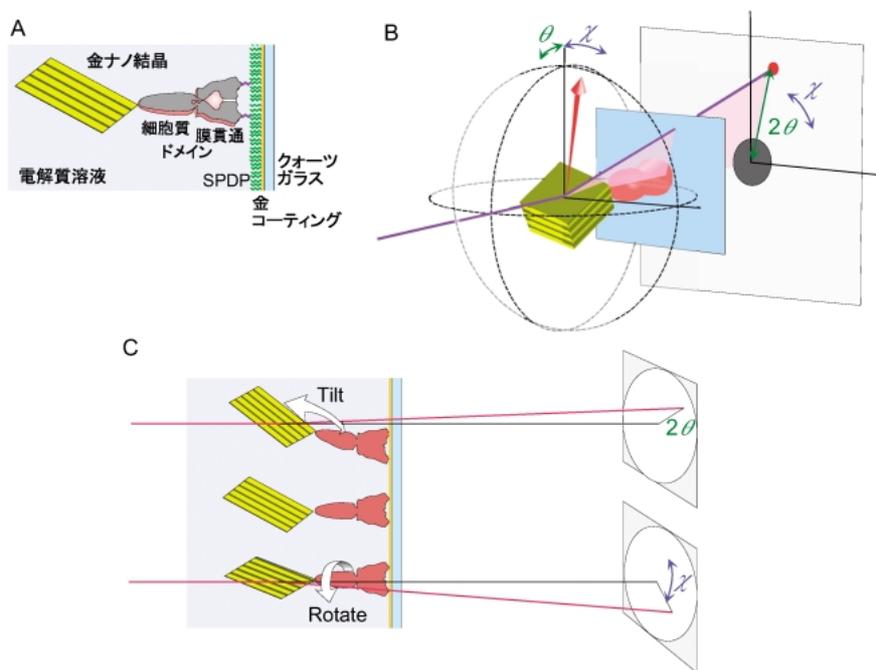
## KcsA カリウムチャンネルのゲーティング

KcsA チャンネルは細胞内酸性 pH で活性化（ゲートの開く確率が上がる）することが知られている。実際、Fig. 1 で示した単一チャンネル電流もそのような条件で測定したものである。変異導入による機能変化が詳細に検討され pH センサとなるアミノ酸残基が同定されている。それは M1 と M2 ヘリックスの細胞質に面する領域にある複数の荷電残基である。中性 pH では荷電残基間の水素結合により安定化され、M2 ヘリックス束がしっかりと組み立てられ、これによりイオン透過路が閉じられている。酸性 pH になるとこの水素結合が消滅しゲートが開く。このとき開くゲート

を活性化ゲートとよぶ。M2 ヘリックス束の絞られた領域がゆるむ必要があるのだが、このとき各 M2 ヘリックスの中央付近で折れ曲がるのが明らかになりつつあった。実際、多くの電位依存性類似チャンネル超遺伝子族の M2 ヘリックスに相当する膜貫通ヘリックスの中央付近にはグリシン残基が存在し、ヘリックスの安定性が低いという共通の構造的特徴を持っている<sup>15-17</sup>。

選択性フィルタ自身もその構造を変えることが知られている。選択性フィルタの開構造はほぼ均一な内径（3 Å）を持った円筒状（長さ 12 Å）の構造をしているが、この構造が虚脱し、イオン透過を遮断する。これを不活性化状態といい、このような構造変化を不活性化ゲートと呼ぶ。

まとめると K チャンネルのイオン透過路にはヘリックス束で制御される活性化ゲートと、フィルタの構造安定性による不活性化ゲートという 2 種類のゲートが直列に存在する。両ゲートともに開いたときに初めてイオンは透過できる。したがって、単一チャンネル電流記録で電流がオンの時には両ゲートともに開いているということがはっきりといえるが、電流オフの時には活性化ゲートが閉じているのか、不活性化ゲートが閉じているのか直接的には特定できない。この場合、活性化ゲートと不活性化ゲートのキネティックな特性の差を利用して、今見えている電流オフの状態



**Fig. 3** Diffracted X-ray tracking (DXT) method. **A.** A sample served for the DXT measurements. KcsA channels are attached to the quartz glass through a surface modifying reagent, SPDP (succinimidyl 6-(30-(2-pyridyldithio) propionamido) hexanoate). At the C-terminal end of the channel a gold nanocrystal was bound through four cysteine residues of the tetrameric channel. The thickness of the electrolyte layer was 7 μm. **B.** Geometrical relationships for the sample and the X-ray beam. The white X-rays were irradiated perpendicular to the glass surface. The diffraction spots were recorded by an image-intensified CCD camera at video rate, which is located at 10 cm from the sample. Experiments were performed in the beamline BL44B2 of SPring-8. **C.** Motions of diffraction spots on the detector plane in relation to the conformational changes of ion channels on the glass surface. (This figure is slightly modified from Fig. 1 of the paper published in Cell 132: 67–78, 2008)

がどちらのゲートに起因するものかを推測することになる。

両ゲートは全く独立に開閉しているわけではなく、機能的にはこれらのゲートの間には連関がある。KcsA チャネルが低 pH に暴露するとセンサがそれを感じ、活性化ゲートが開き、外向きに  $K^+$  の流れが生じ、その後不活性化ゲートが閉じる、という一連の現象が起こる。このような機能の流れに対応する構造変化の流れはどのようにして起こるのか。これは真に蛋白質ダイナミクスの問題であり、結晶構造の空間分解能が高くなったとしてもその中にダイナミクスの情報を読み取ることは容易ではない。

いまや KcsA チャネルはチャンネル電流解析結果だけでなく、立体構造や分光学的情報が膨大に蓄積し、構造と機能の関係が最も深く研究されている。旗艦チャンネル分子といっても過言ではない。

## チャンネルの未解決問題

本研究をはじめた当時のチャンネル研究の状況をまとめると、①チャンネルの機能は1分子レベルで開閉キネティクスなど詳細な情報が明らかになっている。②特定の機能に関わる残基が明らかになり、その変異型の単一チャンネル電流記録でゲーティング機構に関する情報は蓄積している。③チャンネルの構造は高分解能で求められている。とくにカリウムチャネルの中には閉構造で結晶化されたもの、開構造で結晶化されたものが存在する。

しかし、機能するチャンネルが構造を変える様子は未知であった。ホモ4量体である KcsA チャネルが示す4回回転対称構造とその中心を貫くポアがどのように構造変化し、イオン流のオン・オフを制御しているのだろうか。対称構造の構造変化は構造生物学ではアロステリック効果という美しい理論が構築されてきた<sup>18)</sup>。K チャネルのゲーティングは蛋白質構造変化の普遍的課題である。

## X線1分子追跡法

X線1分子追跡法は、蛋白質に金ナノ結晶を結合させ、高輝度白色X線の照射による金ナノ結晶からの回折点を時系列で追跡することにより、蛋白質の構造変化を明らかにする方法である<sup>19,20)</sup>。動的 Laue 法の一つであるが、1分子のダイナミクス情報を幾何学的に単純な原理で追跡できる優れた方法である。2001年のある研究会で佐々木裕次博士がこの方法を発表されているのを聞き、共同研究が始まった。

DXT法の原理を直感的に解説しよう。ラウエの実験<sup>21)</sup>の1年後、1913年に行われた寺田寅彦博士の実験に遡る<sup>22-24)</sup>。ラウエらはX線回折現象を初めて写真撮影したが、寺田は回折点の観察に蛍光板を使った。大きな岩塩の結晶を手を持って(!)X線を照射し、蛍光板上にかすかに見える回折点を観察した。岩塩の向きを変えれば回折点

は動く。

同じことをスケールダウンしたものがDXT法である。岩塩の結晶を金ナノ結晶<sup>25)</sup>とし、寺田博士の手を蛋白質とするのである。手の動き(蛋白質の構造変化)が結晶(金ナノ結晶)の配向を変える。したがって蛍光板上(ディテクター)の回折点の動きから金ナノ結晶の空間的配向がわかり、これが蛋白質の構造変化を表す。寺田実験の時代のX線発生装置(大学病院から借用したものらしい)が現在のSPRING-8となること(10<sup>20</sup>倍)でサンプルのスケールダウン(10 cmの岩塩から約20 nmの金ナノ結晶)に対応できる。

この方法は水溶液中での測定である。溶液中でチャンネル分子が移動しないように蛋白質の一端を基板に固定する。蛋白質の他端に金ナノ結晶を結合させることで金ナノ結晶の自由度を保つ。チャンネルの基板への固定のために細胞外ループと呼ばれる領域にアミノ酸変異を導入し、表面修飾した基板と特異的に結合させた。KcsAチャンネルは4量体であるため、細胞外ループ4箇所て基板に固定されていることになる。一方、細胞質ドメインは自由端となるが、その末端をシステインに置換し金との反応性を付与した。この場合も4つのシステイン残基で金ナノ結晶を保持することになる。

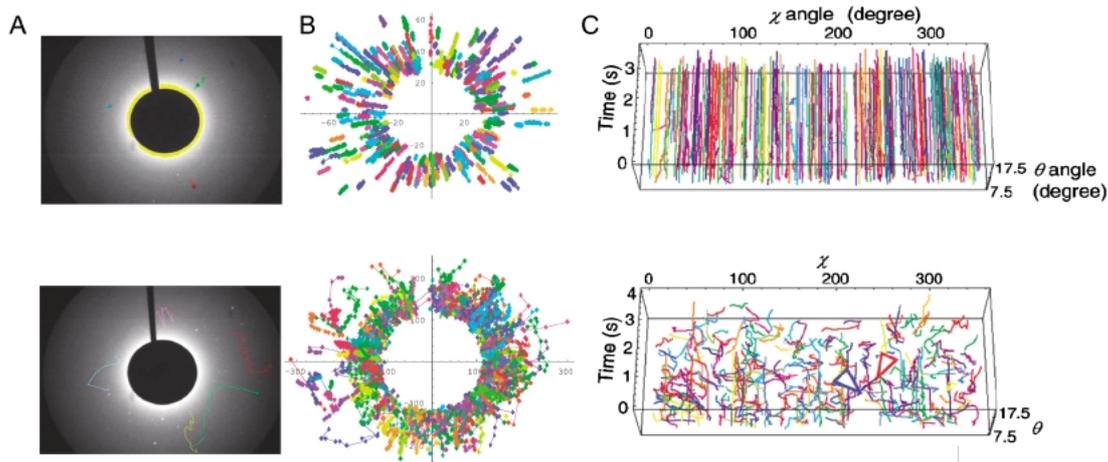
このような固定法でどの程度配向が揃うかについては原子間力顕微鏡で確認した。ここで使用したKcsAチャンネルがチャンネルとしての機能を保っているかどうかは脂質平面膜に再構成することで確認し、さらに金ナノ結晶結合による機能への修飾についても検討した。ゲーティングに対する金ナノ結晶の影響がわずかであることが明らかになった。

この測定ではチャンネルは可溶化したものを使っているが、このような状態で構造変化が起こるかどうかは表面プラズモン共鳴法を使った独自の新しい方法で確認した<sup>26)</sup>。

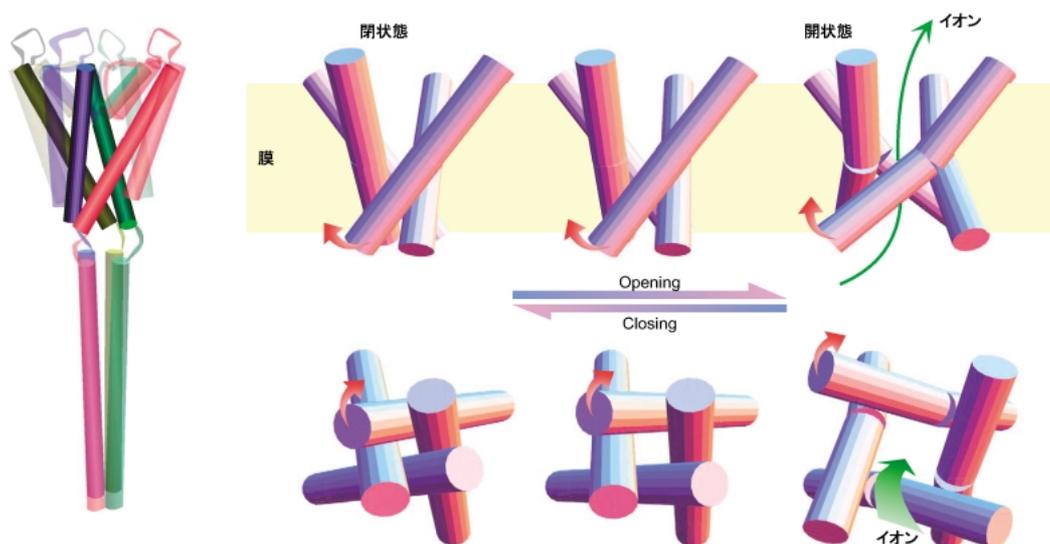
ガラス基板に固定したKcsAを覆う電解質溶液は厚さを7  $\mu\text{m}$ にして密封する。これに白色X線を照射した(SP-pring-8ビームラインBL44B2, エネルギーレンジ: 6-30 keV, 連続パルス: 10 ms, 23 ms 間隔)。回折点の動きはX線イメージ増強 CCD カメラでビデオ(毎秒30フレーム)記録した。このときX線パルスに同期してフレーム記録している。実験は18°Cで行った。

## チャンネルゲーティング構造変化

KcsAチャンネルは中性pHでは活性化ゲートが閉じている。Fig. 4Aは回折点画像を重ね合わせ、回折点の軌跡を辿ったものである。すべての軌跡を重ね焼きしたものがFig. 4Bである。イメージ面上、回折点の動きは $\theta$ 角方向(半径方向)が一見優位であるように見える。回折点座標の時系列( $\chi$ 角- $\theta$ 角-時間の3次元プロット)を追ったものがFig. 4Cである。3秒間の測定時間中、狭い範囲でラ



**Fig. 4** Trajectories of diffraction spots from single molecules of KcsA channel. Results from closed state (at pH 7; upper row) and open state (at pH 4; lower row) of the channel. **A.** Superimposed image of diffraction stops indicating trajectories. **B.** Superimposed trajectories of many spots on the image plane. **C.** The time series of trajectories for conformational changes in the  $\chi$ - $\theta$ - $t$  coordinate. The channel fluctuates its structure slightly in the closed structure. When the channel become active, the channel molecule twists its conformation around the symmetrical axis. (This figure is slightly modified from Fig. 2 of the paper published in Cell 132: 67–78, 2008)



**Fig. 5** Squeezing the helical bundle underlies the global twisting motion upon active gating. The bundle of M2 helices is depicted in the right panes by eliminating the rest of the molecule (the left panel; transparent parts). The side view (upper row) and the bottom view (a view from the cytoplasmic side) of the M2 bundle are shown. Upon opening the channel, the bundle is relaxed initially and the bundle crossing becomes loosen. Then, the helices bend at the middle of their length, which further open the pore, allowing for the ion permeation.

ランダム運動している。これは実空間の座標であり、イメージ上の見かけの $\theta$ 方向優位性は消失し、 $\chi$ 角と $\theta$ 角に関してゆらぎの異方性を示す証拠はなかった。これらの結果は金ナノ結晶およびKcsAチャンネル蛋白質がランダムなブラウン運動を起こしていることを示す。角度の範囲は1~2度とごくわずかであった。

一方、pH 4ではKcsAチャンネルは活性化され、活性化ゲートが開閉する。観察された回折点は画面上で大きく円周方向の動きを示した (Fig. 4A 下図)。重ね焼きを見ても

円周方向に優位な複雑な動きを示している。このとき $\theta$ 角のゆらぎは $\chi$ 角の運動範囲にくらべてはるかに小さかった。このような運動モードはチャンネルが対称軸を中心にねじれ運動を行っていることを示している。ねじれ角は数10度に及ぶことが明らかになった。ヘリックス束のねじれに加え、ヘリックスの中央で折れ曲がること大きなねじれ角を生み出している (Fig. 5)。またこの動きは $\chi$ 角方向に連続して大きなステップの動きとして観察された。回折点の軌跡を時系列で見ると、3秒間の測定時間中、完全

に追跡できず、途中で軌跡が途絶えている。動きが激しく測定範囲 ( $\theta$  角方向) を外れるためである。

イメージ上の円周方向の動きと実空間上のねじれの対応について、チャネルの配向を変えて実験を行った。チャネルを倒立させて(細胞質ドメイン末端でガラス基板に固定し細胞外ループに金ナノ結晶を結合させる)測定した。酸性 pH では全長 KcsA チャネルと同様の回折点の円周運動が観察された。ねじれ構造変化は KcsA チャネル分子全体に及ぶものなので、細胞外ループと細胞質ドメインのどちらで固定しても同じように見える。

一方、KcsA チャネルを横に倒してガラス板に固定する(膜貫通ドメインの細胞質側の残基に変異を導入)と、回折点の動きのパターンが大きく変化した。低 pH で、回折点の半径方向の激しい動きは見られたが、もはや円周方向の回折点の動きを捉えることはなかった。このことはチャネル固定の向きと回折点運動の空間的対応関係がコントロール可能であることを示しており、実験結果解釈の妥当性を保障する。

実験は 18°C で行ったが、温度が数度高いと回折点の運動速度が大きくなり、ビデオレートでは捉えられなくなる。温度が低いと回折点の動きが停止してしまう。これはゲーティング、すなわち蛋白質構造変化の活性化エンタルピーが一般に高い(温度依存性因子  $Q_{10}$  として 5~8) ことに対応する結果である。

中性 pH での構造変化は狭い範囲で動いているので、記録時間である 3 秒間、軌跡をたどることができた。一方、活性化されたゲートはその動きが激しく、 $\theta$  角の測定ウィンドウから外れてしまう。このため開閉遷移の構造変化の全軌跡を辿ることは難しかった。この原因はいくつか考えられる。仮にチャネル分子がフラットな固定面上に垂直に立っていた場合、ねじれ軸が鉛直軸(入射 X 線方向)と一致していれば回折点の動きは同一  $\theta$  角上を円周運動するだろう。この場合、完全に軌跡を追うことができる。従って回折点が測定領域から外れるのはねじれ軸が鉛直軸に一致していないためである。その原因は固定表面がフラットでないためか、あるいはねじれ様式が本来そのようなものか、興味深い問題である。

同様の実験を、細胞質ドメインを削除したもので行った。この場合、基板への結合は全長 KcsA チャネルの場合と同じだが、金ナノ結晶は切断後の C 末端近傍に結合させた。細胞質ドメイン削除 KcsA チャネルは全長 KcsA チャネルと同様のダイナミックなふるまいを示した。つまり KcsA 分子のねじれに細胞質ドメインは必要ないということになる。これはまた、細胞質ドメインが膜貫通ドメインで発生しているねじれを忠実に細胞質ドメインの末端まで伝えていることでもある。当初、細胞質ドメインの構造は分かっていなかったため、もっとフレキシブルで膜貫通ドメインのねじれ運動を吸収して末端まで伝えないのではないかという印象をもっていた。実際には細胞質ドメインが

剛体的な振る舞いを行っている。ゲーティングにともなって細胞質ドメインも往復ねじれ運動をしているわけだが、誰がこのようなイメージを抱いただろう。さらにこのイメージを発展させると、細胞質ドメイン自体が力学的トランスデューサとして働く可能性がある。

最後に、実用的な成果につながる可能性のある結果を紹介する。イオンチャネルの機能を制御するための薬物が多数存在する。その中でゲートが開くとポアの中に入り込んでイオン流を遮断するものがある<sup>27)</sup>。これを開チャネルブロッカーと呼ぶ。KcsA チャネルの単一チャネル電流を観察すると、ブロッカーの一つである TBA (tetrabutylammonium) を加えると電流は消失する。同じ状況で DXT 測定を行った。pH 4 でねじれ運動を示している状況で TBA を加えると、ねじれ運動が完全に停止した。これはゲートの動きをロックしたことになる。他の実験結果から開状態での固定(開ロック状態)であることが明らかになった。イオン透過をブロックするという観点からは TBA がポアに結合してイオン流を遮断すれば十分で、ゲートをロックする必然性もなければ、そのような予想もされてこなかった。実際には TBA の結合はイオン流を遮断すると同時にゲートが閉じないように固定してしまっているのである。TBA の分子サイズは小さく、これが結合することによってチャネルの構造変化を妨げないということは結晶構造で明らかになっている。それでは TBA はどのような機構でチャネルの構造を固定することができるのだろうか。薬物作用に関する全く新しい問題が浮上してきたことになる。

## おわりに

イオンチャネルにはポア軸の周りに回転対称構造をもつものが多い。K チャネルは 4 回回転対称構造だが、5 回(アセチルコリン受容体などリガンド作動性チャネル<sup>28)</sup>、細菌機械受容チャネル MscL<sup>29)</sup>、6 回(connexin<sup>30)</sup>、7 回( $\alpha$ -hemolysin<sup>31)</sup>、細菌機械受容チャネル MscS) 対称性のものが存在する。開状態と閉状態の安定構造がいずれも対称構造を保ち、その間を結ぶ構造変化の軌跡がねじれであればこれは極めて合理的であり、普遍的な機構であると考えられる。

蛋白質の美しい構築の中に構造変化の情報が書き込まれているはずであるが、それを読み取ることは容易ではない。構造変化する分子の軌跡を 1 分子レベルで追跡し、その力学的特性を明らかにすることが有力なアプローチである。より高い空間的・時間的分解能で構造変化の軌跡を追うことが求められている。構造変化のもっと速い現象をどこまで捉えることができるか、 $\theta$  角の測定領域をいかに広げるか、どこまで長時間軌跡を追跡することができるか。これらの技術的な課題に答えていくことがさらなる発展を約束する。新しく見えてきた蛋白質のダイナミックな

描像をもとに、チャンネル蛋白質をとおして蛋白質ダイナミクスの秘密に迫りたい。

## 謝辞

共同研究者である清水啓史, 岩本真幸, 今野 卓, 井上史子, 二瓶亜三子, 奥村泰章, 宮崎拓也, 佐々木裕次博士に, また SPring-8 ビームライン BL44B2 の関係者に感謝する。

## 参考文献

- 1) B. Hille: Ion Channels of Excitable Membranes, 3rd Edition (Sunderland, MA: Sinauer Associates) (2001).
- 2) B. Sakmann and E. Neher: Single-Channel Recording. 2nd Edition (Plenum, New York) (1995).
- 3) 老木成稔: モデルチャンネルの構造と機能—単一チャンネル記録から原子レベルの構造と素過程へ「シリーズ・ニューバイオフィジックス⑤イオンチャンネル」(曾我部正博編集), 共立出版, 78-100, 1997.
- 4) H. Shimizu, M. Iwamoto, T. Konno, A. Nihei, Y. C. Sasaki and S. Oiki: Global Twisting Motion of Single Molecular KcsA Potassium Channel Upon Gating. *Cell* **132**, 67-78 (2008).
- 5) 老木成稔: チャンネル研究のための脂質平面膜法「新パッチクランプ実験技術法」(岡田泰伸編集), 吉岡書店, 208-244, 2001.
- 6) D. A. Doyle, J. Morais Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait and R. MacKinnon: The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* **280**, 69-77 (1998).
- 7) 老木成稔: K チャンネルの結晶構造に至る道: K 選択性透過を担うポア構造. 蛋白質 核酸 酵素 **43**, 1990-1997 (1998).
- 8) F. H. Yu, V. Yarov-Yarovoy, G. A. Gutman and W. A. Caterall: Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacol Rev.* **57**, 387-395 (2005).
- 9) 老木成稔: カリウムチャンネル「イオンシグナルの謎: カルシウムの40億年を渉猟する」(唐木英明編集)メディカルレビュー社, 99-121, 1999.
- 10) Y. S. Liu, P. Somporpnisut and E. Perozo: Structure of the KcsA channel intracellular gate in the open state. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 883-887 (2001).
- 11) B. L. Kelly and A. Gross: Potassium channel gating observed with site-directed mass tagging. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 280-284 (2003).
- 12) K. Takeuchi, H. Takahashi, S. Kawano and I. Shimada: Identification and characterization of the slowly exchanging pH-dependent conformational rearrangement in KcsA. *J. Biol. Chem.* **282**, 15179-15186 (2007).
- 13) 老木成稔: イオン流で探るチャンネルポアのプロファイル. *膜* **22**, 307-315 (1997).
- 14) 老木成稔, 安藤博之, 久野みゆき, 清水啓史, 岩本真幸: K チャンネルのイオン透過機構: 流動電位によるアプローチ. *生物物理* **48**, 246-252 (2008).
- 15) E. Perozo, D. M. Cortes and L. G. Cuello: Structural rearrangements underlying K<sup>+</sup>-channel activation gating. *Science* **285**, 73-78 (1999).
- 16) E. Magidovich and O. Yifrach: Conserved gating hinge in ligand- and voltage-dependent K<sup>+</sup> channels. *Biochemistry* **43**, 13242-7 (2004).
- 17) 老木成稔: 機能するKチャンネルが見える. 蛋白質 核酸 酵素 **45**, 1946-1959 (2000).
- 18) J. W. Karpen and M. L. Ruiz: Ion channels: does each subunit do something on its own? *Trend in Biochem Sci* **27**: 402-409 (2002).
- 19) Y. C. Sasaki, Y. Suzuki, N. Yagi, S. Adachi, M. Ishibashi, H. Suda, K. Toyota and M. Yanagihara: Tracking of individual nanocrystals using diffracted x rays. *Phys. Rev. E Stat. Phys. Plasmas Fluids Relat. Interdiscip. Topics* **62**, 3843-3847 (2000).
- 20) Y. C. Sasaki, Y. Okumura, S. Adachi, H. Suda, Y. Taniguchi and N. Yagi: Picometer-scale dynamical x-ray imaging of single DNA molecules. *Phys. Rev. Lett.* **87**, 248102 (2001).
- 21) W. Friedrich, P. Knipping and M. V. Laue: Interferenzerscheinungen bei rontgenstrahlen. *Proc. Bavarian Acad. Sci.* 303-322 (1912).
- 22) T. Terada: X-rays and crystals. *Nature* **91**, 135-136 (1913).
- 23) T. Terada: X-rays and crystals. *Nature* **91**, 213 (1913).
- 24) T. Terada: On the transmission of x-rays through crystals. *Proc. Tokyo Math. Phys. Soc.* **7**, 60-70 (1913).
- 25) Y. Okumura, T. Miyazaki, Y. Taniguchi and Y. C. Sasaki: Fabrications of dispersive gold one-dimensional nanocrystals. *Thin Solid Films* **471**, 91-95 (2005).
- 26) M. Iwamoto, H. Shimizu, F. Inoue, T. Konno, Y. C. Sasaki and S. Oiki: Surface structure and its dynamic rearrangements of the KcsA Potassium channel upon gating and tetrabutylammonium blocking. *J. Biol. Chem.* **281**, 28379-28386 (2006).
- 27) Y. N. Imai, S. Ryu and S. Oiki: Docking Model of Drug Binding to the Human Ether-à-go-go Potassium Channel Guided by Tandem Dimer Mutant Patch-Clamp Data: A Synergic Approach. *J. Med. Chem.* In press.
- 28) N. Bocquet, H. Nury, M. Baaden, C. Le Poupon, J-P. Changeux, M. Delarue and P-J. Corringer: X-ray structure of a pentameric ligand-gated ion channel in an apparently open conformation. *Nature* **457**, 111-114 (2009).
- 29) B. Corry and B. Martinac: Bacterial mechanosensitive channels: experiment and theory. *Biochem. Biophys. Acta* **1778**, 1859-1870 (2008).
- 30) A. L. Harris: Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap. *Q Rev Biophys.* **34**, 325-472 (2001).
- 31) G. Menestrina, M. D. Serra and G. Prevost: Mode of action of beta-barrel pore-forming toxins of the staphylococcal alpha-hemolysin family. *Toxicon* **39**, 1661-1672 (2001).

## ● 著者紹介 ●



### 老木成稔

福井大学医学部分子生理学教授

E-mail: oiki-fki@umin.ac.jp

専門: イオンチャンネル構造機能相関

### 【略歴】

1986年京都大学大学院医学研究科博士課程修了, 医学博士。京都大学医学部助手, 生理学研究所助教授を経て, 福井医科大学教授。大学合併による名称変更により2003年より現職。イオンチャンネルの電気生理学と構造生物学の研究に従事。

# Mechanism of Opening and Closing of the Gate for KcsA Potassium Channel Revealed by Diffracted X-Ray Tracking Method

**Shigetoshi OIKI** Department of Molecular Physiology and Biophysics,  
University of Fukui Faculty of Medical Sciences  
23-3, Matsuokashimoaizuki, Eiheiji-cho, Yoshida-gun, Fukui 910-1193 JAPAN

**Abstract** Conformational changes of KcsA potassium channels upon gating were elucidated in single molecular level by the diffracted X-ray tracking method. When the channel was quiet at neutral pH, the structure of the channel fluctuates slightly. Upon gating the channel protein twisted its conformation around the longitudinal axis of the molecule. This conformational change originated from the transmembrane domain and spreaded towards the C-terminal end of the cytoplasmic domain. Single molecular measurements for ion channels and the DXT method applied here were reviewed briefly.

---