

# レアメタルイオン選択性を有するイオンチャネルの創製

所属： 和歌山県立医科大学 薬学部薬品物理化学 専攻

助成対象者：入江 克雅

## 概要

原核生物由来の四量体型イオンチャネルは変異導入によってさまざまなイオンに対する選択性が上昇することが明らかとなっている。本研究では、これらの変異導入を最適化しリチウムイオンやストロンチウムイオンなどのレアメタルイオンに選択性を持つこれまでにないイオンチャネルの創製を目指した。取得した変異体の構造解析と電気生理実験により、チャネルの入り口における水分子の配置やチャネル内腔での多価イオンの安定化によるイオン透過への重要性が示唆された。そこで、チャネル透過の際の水和イオンにおける水和水の挙動を調べるために分子動力学計算の実験系を構築しさらなる詳細な透過機構の解析を可能にした。

## abstract

Prokaryotic tetrametric ion channels increase the selectivity for various ions by amino-acids mutation. We aimed to create unprecedented ion channels with selectivity for rare metal ions such as lithium and strontium ions. Structural analysis and electrophysiological experiments revealed that the arrangement of water molecules at the channel entrance and the stability of polyvalent ions in the inner vestibule are essential for ion permeation. To investigate the behavior of hydration waters in hydrated ions during channel permeation, we established an experimental system of molecular dynamics calculation for further detailed permeation mechanism analysis.

## 研究内容

### 「背景」

イオンチャネルによる選択的なイオン透過は生命が最初に手にした情報伝達の手段である。我々の複雑な神経活動もこれによる電気信号の伝播によって達成される。電気信号のオンオフは特定のイオンのみを透過することができる細胞膜上の小さな孔であるイオンチャネルによって達成される。我々の神経細胞上では、

細胞外に豊富なナトリウムイオン

(Na<sup>+</sup>) を透過するナトリウムチャンネル (Nav) と細胞内に豊富なカリウムイオン (K<sup>+</sup>) を透過するカリウムチャンネル (Kv) が活動電位の伝播と消失をそれぞれ担う。そして、電気刺激による即時的な応答だけでなく、カルシウムチャンネル (Cav) によるカルシウムイオン (Ca<sup>2+</sup>) の選択的な透過によって記憶形成などの長期的な応答をも可能になった。存在量の少ない金属 (レアメタル) は様々な用途があり、これを安定的に取得する方法の確立は重要である。

一つのイオンがイオンチャンネルの透過にかかる時間は1ナノ秒程度であり、これは1mgのイオンチャンネルが一秒間に、Na<sup>+</sup>換算で200gのイオンを選択的に透過することを意味する。イオンチャンネルによる高効率で高選択的なイオンの透過はレアメタルの回収法に期待されるが、レアメタルイオンに対して選択性を示すイオンチャンネルは未だ発見されていない。生命の長い進化の過程において他のイオンに選択性を持つチャンネルも生じていた可能性は高いが、天然にほとんど存在しないレアメタルイオンに対して高い選択性を持つチャンネルを有することは生存競争には不利なため淘汰されたのだと考えられる。

本研究の研究対象である原核生物のNav (BacNav) は6回膜貫通ヘリックスからなるサブユニットが四量体を形成することで機能する (図1A)。高等生物のNavとCavは2回の遺伝子重複によりアミノ酸配列の相同性が高い4つサブドメインを含む一本のポリペプチドだが、構成要素は共通であり全体構造は類似している (図1B)。選択的なイオン透過はC末端側の二本の膜貫通αヘリックス四量体が形成するポアドメイン (Pore domain: PD) が担う (図1A: 黒)。PDのイオン透過経路に面する選択性フィルター (図1A: 丸囲み) は選択的なイオン透過に重要な7残基のアミノ酸からなる領域である (図2)。

NavはCavから派生し、Cavのもとになったチャンネルは進化の初期段階でKvと分岐したと考えられている (図2)。そのため、原始的な原核生物はCavを有す

し、その類縁体にはイオン選択性が未分化なチャンネルがあるのではないかと予測した。

この考えのもと、AnclNav (Ancestor like BacNav) と名付けた新たなチャンネル群を発見し、この中から原核生物

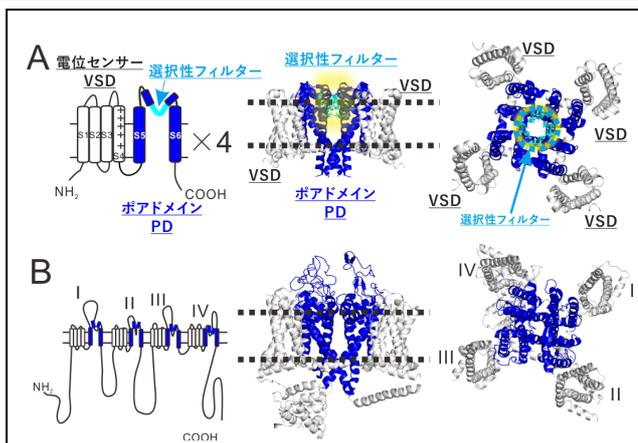


図1. A: 原核生物のNaチャンネル (BacNav) と高等生物のNavの基本構造

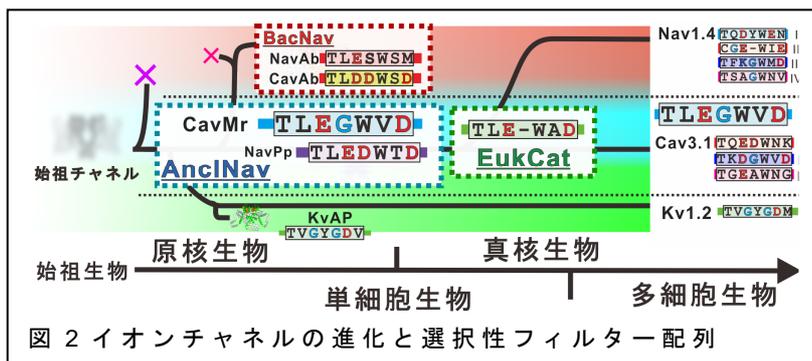


図2 イオンチャンネルの進化と選択性フィルター配列

で初めてとなる高いカルシウム選択性を持つチャンネル (CavMr) の同定に成功した (参考文献 1 : *eLife* 2020;9:e52828 DOI: 10.7554/eLife.52828) (図 2)。そして、CavMr の類縁体の NavPp への変異導入によってストロンチウムイオン ( $\text{Sr}^{2+}$ ) に高い選択性をもつ変異体チャンネルが得られた。さらに、BacNav で最も構造解析が進むホモログである NavAb については、 $\text{Li}^+$  の透過性が上昇する変異体を得ていた。このような変異体は進化の過程で失われたレアメタルイオン選択的なチャンネルやそのプロトタイプに相当すると考えられた。

## 「目的」

NavAb の  $\text{Li}^+$  選択性が上昇する変異体 S178A、S178G や NavPp で  $\text{Sr}^{2+}$  選択性が上昇する変異体について構造解析と透過機構の解析から、既存の Nav や Cav との比較することで様々なイオンについての選択的な透過に関与する領域を決定する。これを最適化することでレアメタルイオンに高い選択性を持つ新奇チャンネルの創製につなげる。

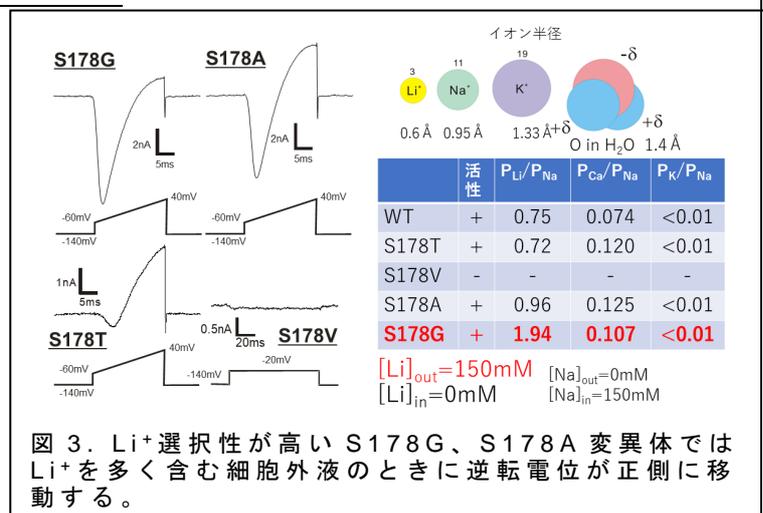
水溶液中ではこれらのイオンは水和イオンとして存在している。一つのイオンのイオンチャンネルの透過が完了する 1 ナノ秒程度の間に、水和イオンの水和水とイオンチャンネルを構成するアミノ酸の主鎖や側鎖の酸素原子に置換が複数回行われる。これにより、イオンは水溶液中の水和環境と同じ環境を保ちつつ脂質二重膜を透過できる。すなわちイオンチャンネルの酸素原子の配置が特定のイオンに最適化されることで選択的なイオン透過が達成される。水和イオンの水和水の交換速度は 100 ピコ秒である。このようなナノ秒程度の微小時間で完了する現象を直接観察することは困難だが、分子動力学計算では 2 フェムト秒程度の時間分解能で事象を再現できる。そこで、イオン透過過程の解析にこれを活用する。

## 「結果」

### 1. 変異体の結晶構造解析

#### 1) $\text{Li}^+$ 選択性を実現する透過機構の解析

NavAb の Ser178 に側鎖の小さい残基への変異を導入することで  $\text{Li}^+$  の透過性が上昇することを電気生理実験により発見していた (図 3)。これらの変異体の結晶化条件を最適化し分解能の向上を達成した。分解能の向上により、得られた結晶構造において  $\text{Li}^+$  選択性が上がる変異体ではチャンネル開口部が広がることで野生型に



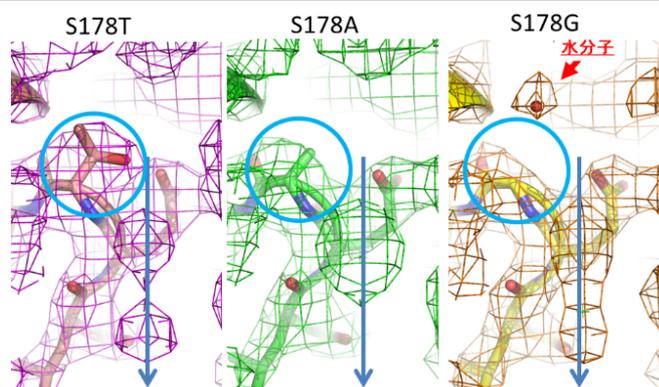


図 4. Ser178 変異体のイオンポア入口周辺の電子密度：矢印はイオンの透過経路、丸は変異導入残基を示す。右の変異体ほど  $\text{Li}^+$  選択性が高い。

は存在しない水分子が開口部に観測された(図 4 右)。 $\text{Li}^+$ は原子番号が小さくイオン半径が  $\text{Na}^+$ よりも小さいため、より強く水と結合する(図 3)。この変異体ではイオンポアが広がりより水分子が入り込めることで水と水分子の交換回数が少なくなることで、効率の良い透過が可能になったと考えている。

## 2) 新奇イオン選択性を示すチャンネルの透過機構の解析

$\text{Sr}^{2+}$  選択性が上昇する変異体が見られる NavPp では二価カチオンによる電流の阻害が起きることが分かっていた(参考文献 1)。 $\text{Sr}^{2+}$  選択性を上昇させる変異の探索において、この二価カチオンによる阻害を NavAb で生じる変異体が見られた。選択的なイオン透過は選択性フィルター周辺と二価カチオンの相互作用と二価カチオンの濃度勾配による拡散力が近い時に生じ、二価カチオンによる電流阻害はフィルターとの相互作用が強い時に生じると考えられる。よって、これらの変異体の立体構造は二価カチオン選択性に重要な知見を与える可能性が高い。そこで、強い阻害を受ける L176Q 変異体と弱い阻害を受ける L176G 変異体の変異体の結晶構造解析を行った(図 5)。この構造から  $\text{Ca}^{2+}$  による阻害を受ける変異体ではチャンネル内腔への入り口のカルシウムイオンの滞在が観測され、これが電流阻害の原因になっていると考えられた。阻害が起こる変異は親水性に富む残基や嵩の低い残基であったため、チャンネル内腔の親水性の向上が  $\text{Ca}^{2+}$  の内腔での安定化に寄与すると考えられた。

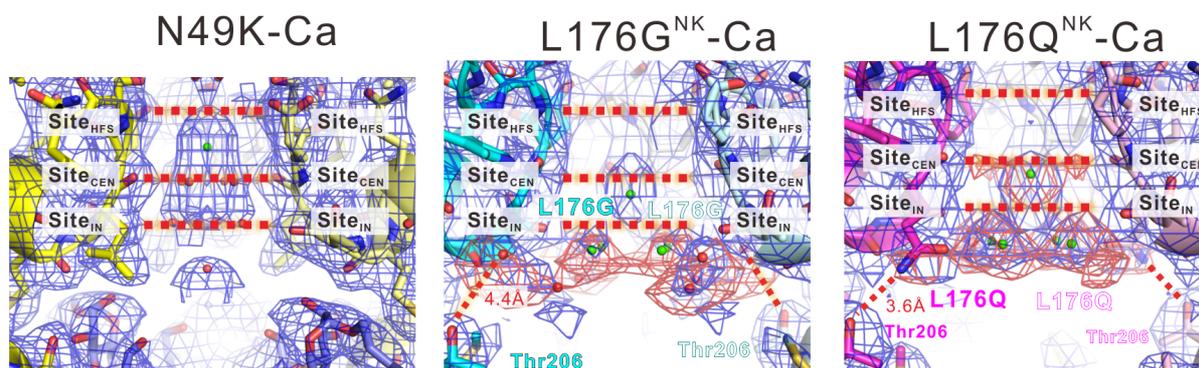
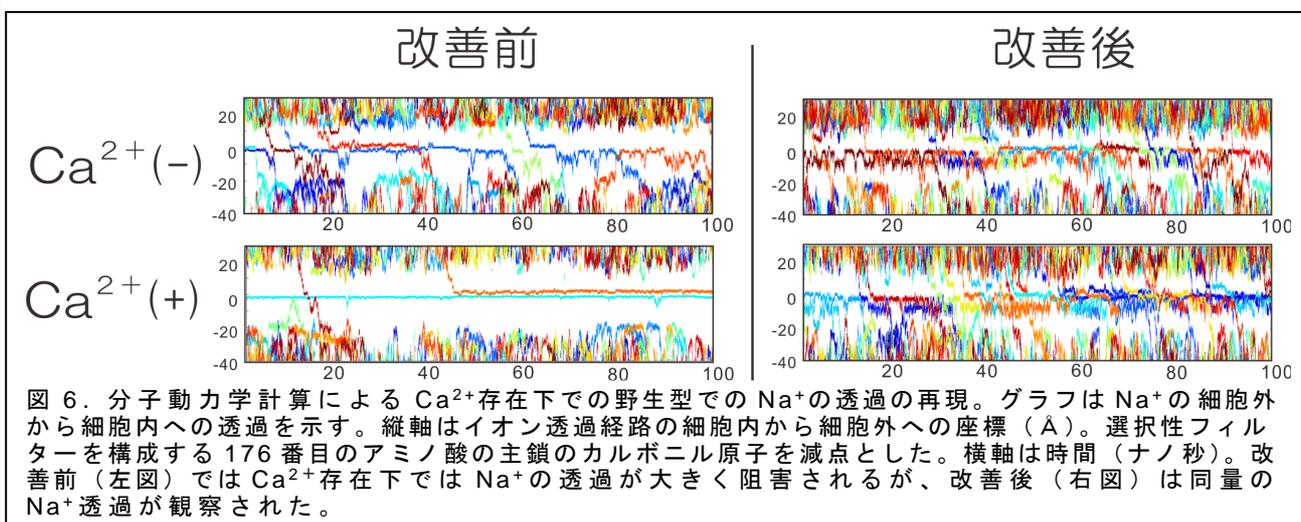


図 5.  $\text{Ca}^{2+}$  による電流阻害を受ける L176G, L176Q 変異体の選択性フィルターとイオン内腔周辺の電子密度。フィルターの内腔入り口において  $\text{Ca}^{2+}$  による電子密度の増加がみられた。

## 2. 分子動力学計算による二価カチオン透過過程の解析法の開発

構造解析により  $\text{Li}^+$  選択性の向上は水とイオンと水と水の交換効率が影響し、 $\text{Ca}^{2+}$  の選択性フィルターへの相互作用の強さには  $\text{Ca}^{2+}$  とチャンネル内腔の親水的な

相互作用が寄与することが示唆された。イオンの親水性側鎖や水との動的な相互作用を知るためには、1 ピコ秒ほどの高い時間分解能が必要になる。分子動力学計算は高い時間分解能を誇るが、その一方で、イオンの挙動の際現において二価カチオンのような多価数のイオンの電荷を正しく見積もれないことに起因する問題を抱えていた。従来の計算法では、 $\text{Ca}^{2+}$ のような二価カチオンは負電荷をもつ選択性フィルターに強く結合し、本来  $\text{Ca}^{2+}$  による阻害を受けない野生型の NavAb でも  $\text{Na}^+$  の透過が阻害されてしまう。この問題の解決のために、ECC 法 (Electronic continuum correction method) (Melcr *et al.* J Phys. Chem. 2018) と呼ばれる、溶液中のイオンの荷電状態を正確に見積もる手法の適用を検討した。これにより  $\text{Ca}^{2+}$  存在下での野生型での  $\text{Na}^+$  の透過を再現することができた (図 6)。さらに、この条件で阻害を受ける変異体での計算を行ったところ、 $\text{Ca}^{2+}$  存在下での  $\text{Na}^+$  の透過の阻害が観察された。



### 3.さらなる AnclNav ライブラリーの取得

新たな AnclNav の遺伝子を 10 種類ほど遺伝子合成により取得し、蛍光検出器を用いたゲルろ過法によって安定性を評価した。

#### 「今後」

本研究は、貴助成金によりイオン選択性の分子基盤の解明につながる分子機構を同定に成功した。これまでの結果をまとめ論文にし、今後は得られた知見をさらに深めるべく次の研究を進める。分子動力学計算法によって  $\text{Li}^+$  選択性が向上する変異体での透過イオンと水和水の相互作用を動的に解析し、 $\text{Li}^+$  選択性の向上の分子基盤を解明する。また、二価カチオンによる阻害を受ける変異体の解析により、二価カチオンとチャネル内腔との相互作用を変化させる要因を明らかにし、二価カチオン選択性への応用につなげる。さらに、 $\text{Ca}^{2+}$  の選択的な透過を計算機上で再現の道が開けたことから、選択的透過を行う主要なイオンである  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、

Ca<sup>2+</sup>のイオンが各種選択性チャネルで如何にして分別されているかを明らかにしていきたい。

本助成に関わる成果物

[論文発表]

細菌の祖先型イオンチャネルから探る, 普遍的なカルシウム選択機構

下村拓史, 入江克雅, 入江克雅

生物物理(Web) 61(4) 2021年

The insights into calcium ion selectivity provided by ancestral prokaryotic ion channels

Katsumasa Irie

Biophysics and Physicobiology 18 274-283 2021年11月

[口頭発表]

“細菌由来のイオンチャネルに見いだされたカルシウムの選択的透過と機能阻害”  
2021.9.7 生理研研究会”構造情報を基盤とした膜機能分子の生理機能理解に向けて”

“細菌のカルシウムチャネルが示すカルシウム選択的なイオン透過機構”

2022.3.29 第95回日本細菌学会総会

[ポスター発表]

“The generation of the divalent cation blocking on tetrameric sodium channel”

Katsumasa Irie, Yoshinori Oda and Atsunori Oshima

2021.Nov.25<sup>th</sup> 第59回日本生物物理学会

[その他]