慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	電位依存性イオンチャネルの機能発現メカニズムの解明
Sub Title	Elucidation of the functional mechanism of voltage-dependent K+ channels
Author	大澤, 匡範(Osawa, Masanori)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2021
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2020.)
JaLC DOI	
Abstract	電位依存性K+チャネル（Kv）は神経伝達や心臓の拍動の源となる活動電位を担う。Kvの膜貫通領域は、膜電位を感受する電位センサードメイン(VSD)とK+透過路を形成するポアドメイン(PD)からなり、VSDの膜電位依存的構造変化によりPDのゲート開閉が誘起される。現在、膜電位非存在下の開状態のKvの立体構造は報告されているが、静止膜電位下の閉状態の構造は不明であり、Kvの膜電位依存的開閉機構は未解明である。そこで本研究では、VSDのヘリックスS1とS4にCys残基を1個ずつ導入し、これらの近接時に形成される分子内ジスルフィド(SS)結合を検出するSS-locking解析によりVSDの構造変化に伴う近接残基対の同定し、SS結合で安定化した機能構造の解析によるKvの膜電位依存的な構造変化機構の解明を目的とした。 本研究では古細菌Aeropyrum pernix由来のKvであるKvAPを解析対象とした。近年報告されたKvAPの立体構造を基に、S1は開状態でS4と近接するIle130を中心とした連続する5残基のいずれかを、S4は側鎖をS1側に向けた5残基のいずれかをCys残基に置換し、25種類のdouble Cys変異体を調製した。SS-locking解析の結果、S1とS4間の複数の近接残基対を同定した。これらの残基対は、単一の立体構造で同時に近接しえないため、それぞれのSS結合によりKvAPの異なるコンホメーションが安定化されたことが示唆された。各変異体構造はKvAPの開状態と閉状態の間の構造変化過程を反映している可能性がある。今後、各変異体の機能解析と立体構造解析を進めていく。 Voltage-dependent K+ channels play important roles in producing action potential, which causes neurotransmissions and heart beats. Transmembrane region of Kv is comprised of a pore domain possessing of a K+-permeation pathway with a gate and a voltage-sensing domain (VSD) regulating opening/closing of a gate at the center of the pore domain in a voltage-dependent manner. To date, three-dimensional structures of only depolarized state of Kv have been reported. However, no information is available for the structure of the resting state under polarized condition, and therefore, structural mechanism of the gating remains unknown. Here, we tried to capture the resting state structure by introducing a disulfide bond in VSD for the determination of the resting state structure, by using an archaea Kv channel, KvAP. We identified several pairs of the VSD residues that transiently come close to each other and form an S-S bond. Each structure captured by an S-S bond seems to reflect a conformation occurring during the voltage-dependent structural changes. The functional and structural analyses of these S-S locked KvAP are underway.
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2020000008-20200142

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

2021 年 4 月 3 日

2020 年度　学事振興資金（個人研究）研究成果実績報告書

研究代表者	所属	薬学部	職名	教授	補助額	500 （特B）千円
	氏名	大澤 匡範	氏名（英語）	Masanori Osawa		

研究課題（日本語）

電位依存性イオンチャネルの機能発現メカニズムの解明

研究課題（英訳）

Elucidation of the functional mechanism of voltage-dependent K+ channels

１．研究成果実績の概要

電位依存性 K+チャネル（Kv）は神経伝達や心臓の拍動の源となる活動電位を担う。Kv の膜貫通領域は、膜電位を感受する電位センサードメイン(VSD)と K+透過路を形成するポアドメイン(PD)からなり、VSD の膜電位依存的構造変化により PD のゲート開閉が誘起される。現在、膜電位非存在下の開状態の Kv の立体構造は報告されているが、静止膜電位下の閉状態の構造は不明であり、Kv の膜電位依存的開閉機構は未解明である。そこで本研究では、VSD のヘリックス S1 と S4 に Cys 残基を 1 個ずつ導入し、これらの近接時に形成される分子内ジスルフィド(SS)結合を検出する SS-locking 解析により VSD の構造変化に伴う近接残基対の同定し、SS 結合で安定化した機能構造の解析による Kv の膜電位依存的な構造変化機構の解明を目的とした。

本研究では古細菌 Aeropyrum pernix 由来の Kv である KvAP を解析対象とした。近年報告された KvAP の立体構造を基に、S1 は開状態で S4 と近接する Ile130 を中心とした連続する 5 残基のいずれかを、S4 は側鎖を S1 側に向けた 5 残基のいずれかを Cys 残基に置換し、25 種類の double Cys 変異体を調製した。SS-locking 解析の結果、S1 と S4 間の複数の近接残基対を同定した。これらの残基対は、単一の立体構造で同時に近接しえないため、それぞれの SS 結合により KvAP の異なるコンホメーションが安定化されたことが示唆された。各変異体構造は KvAP の開状態と閉状態の間の構造変化過程を反映している可能性がある。今後、各変異体の機能解析と立体構造解析を進めていく。

２．研究成果実績の概要（英訳）

Voltage-dependent K+ channels play important roles in producing action potential, which causes neurotransmissions and heart beats. Transmembrane region of Kv is comprised of a pore domain possessing of a K+-permeation pathway with a gate and a voltage-sensing domain (VSD) regulating opening/closing of a gate at the center of the pore domain in a voltage-dependent manner. To date, three-dimensional structures of only depolarized state of Kv have been reported. However, no information is available for the structure of the resting state under polarized condition, and therefore, structural mechanism of the gating remains unknown. Here, we tried to capture the resting state structure by introducing a disulfide bond in VSD for the determination of the resting state structure, by using an archaea Kv channel, KvAP. We identified several pairs of the VSD residues that transiently come close to each other and form an S-S bond. Each structure captured by an S-S bond seems to reflect a conformation occurring during the voltage-dependent structural changes. The functional and structural analyses of these S-S locked KvAP are underway.

３．本研究課題に関する発表

発表者氏名 （著者・講演者）	発表課題名 （著書名・演題）	発表学術誌名 （著書発行所・講演学会）	学術誌発行年月 （著書発行年月・講演年月）
Matsumura K, Shimomura T, Kubo Y, Oka T, Kobayashi N, Imai S, Yanase N, Akimoto M, Fukuda M, Yokogawa M, Ikeda K, Kurita J, Nishimura Y, Shimada I, Osawa M.	Mechanism of hERG inhibition by gating-modifier toxin, APETx1, deduced by functional characterization	BMC Mol. Cell Biol.	2021 年 1 月