

Title	クライオ電子顕微鏡法による電位依存性カリウムイオンチャネルKvAPの動作機構の解明
Sub Title	Elucidation of the functional mechanism of voltage-dependent K ⁺ channel by cryo-EM
Author	石田, 英子(Ishida, Hanako)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2024
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2023.)
JaLC DOI	
Abstract	電位依存性カリウムイオンチャネル (Kvチャネル) は、神経細胞や心筋において活動電位の終結に寄与している。Kvチャネルの膜貫通領域は、膜電位を感知する電位センサードメイン (VSD) とK⁺透過孔を形成するポアドメイン (PD) から成り、VSDのS4ヘリックスが膜電位依存的に構造変化することによって、PDのゲート開閉が誘起されると考えられている。これまでに、膜電位非存在下における開状態のKvチャネルの構造は多数報告されているが、静止膜電位下における閉状態の構造に関する知見は乏しい。そこで本研究では、VSDのS4とS1にCys変異を1箇所ずつ導入し、これらが近接した時にSS結合を形成するdouble-Cys変異体を作製し、閉状態の構造および開状態から閉状態への各遷移構造を明らかにすることを目的として検討を行った。 本研究では古細菌Aeropyrum pernix由来のKvチャネルであるKvAPを解析対象とした。初めにKvAP WTのクライオ電子顕微鏡解析を行ったところ、界面活性剤ミセル中ではKvAP分子が柔軟に動いており、解析が困難であった。そこで本研究では、KvAPのナノディスクへの再構成を検討した。MSPは2N2を用い、再構成させる脂質を複数検討した結果、分解能約3.8Åの密度マップを得ることに成功した。これは以前解析されているKvAP WTの開状態の構造 (5.9Å) よりも高い分解能である。今後はKvAP double-Cys変異体のクライオ電顕解析を進め、立体構造を原子レベルで決定することを目指す。 Voltage-dependent K⁺ channels (Kv channels) play a crucial role in regulating physiological processes such as the termination of action potential in neurons and cardiomyocytes. The transmembrane domain of Kv channels consists of a voltage-sensing domain (VSD) that senses the membrane potential and a pore domain (PD) that conducts K⁺ ions. Upon the S4 helix senses the change of membrane potential, Kv channels undergo conformational changes that lead to the opening or closing of the pore. To date, many Kv channel structures of open state are reported however little is known about closed state structures. In this research, we constructed double-Cys mutants that introduced combinations of single Cys residue each into helices S4 and S1 of the VSD of KvAP and investigated to determine structures of transition states from opened form to closed form of KvAP. In this study, we used KvAP, a voltage-dependent K⁺ channel from thermophilic archaeobacterium Aeropyrum pernix. The initial attempt to determine the KvAP structure by cryo-EM was unsuccessful, possibly due to the structural heterogeneity in the detergent micelles. Therefore, we investigated and optimized the reconstruction of KvAP to nanodisc. We employed MSP (membrane scaffold protein) 2N2 and examined various lipids for reconstruction, successfully obtaining a 3D map of the KvAP double-Cys mutant with a maximum resolution of 3.8 Å. Our data is much higher resolution than those reported in a previous study (5.9 Å). Further cryo-EM analyses will be performed to determine the structure of the double-Cys mutants at the atomic level.
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2023000010-20230184

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.

2023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	助教	補助額	500千円 (特B)
	氏名	石田 英子	氏名(英語)	Hanako Ishida		
研究課題(日本語)						
クライオ電子顕微鏡法による電位依存性カリウムイオンチャネルKvAPの動作機構の解明						
研究課題(英訳)						
Elucidation of the functional mechanism of voltage-dependent K+ channel by cryo-EM						
1. 研究成果実績の概要						
電位依存性カリウムイオンチャネル(Kvチャネル)は、神経細胞や心筋において活動電位の終結に寄与している。Kvチャネルの膜貫通領域は、膜電位を感知する電位センサードメイン(VSD)とK+透過孔を形成するポアドメイン(PD)から成り、VSDのS4ヘリックスが膜電位依存的に構造変化することによって、PDのゲート開閉が誘起されると考えられている。これまでに、膜電位非存在下における開状態のKvチャネルの構造は多数報告されているが、静止膜電位下における閉状態の構造に関する知見は乏しい。そこで本研究では、VSDのS4とS1にCys変異を1箇所ずつ導入し、これらが近接した時にSS結合を形成するdouble-Cys変異体を作製し、閉状態の構造および開状態から閉状態への各遷移構造を明らかにすることを目的として検討を行った。 本研究では古細菌Aeropyrum pernix由来のKvチャネルであるKvAPを解析対象とした。初めにKvAP WTのクライオ電子顕微鏡解析を行ったところ、界面活性剤ミセル中ではKvAP分子が柔軟に動いており、解析が困難であった。そこで本研究では、KvAPのナノディスクへの再構成を検討した。MSPは2N2を用い、再構成させる脂質を複数検討した結果、分解能約3.8Åの密度マップを得ることに成功した。これは以前解析されているKvAP WTの開状態の構造(5.9Å)よりも高い分解能である。今後はKvAP double-Cys変異体のクライオ電顕解析を進め、立体構造を原子レベルで決定することを目指す。						
2. 研究成果実績の概要(英訳)						
Voltage-dependent K+ channels (Kv channels) play a crucial role in regulating physiological processes such as the termination of action potential in neurons and cardiomyocytes. The transmembrane domain of Kv channels consists of a voltage-sensing domain (VSD) that senses the membrane potential and a pore domain (PD) that conducts K+ ions. Upon the S4 helix senses the change of membrane potential, Kv channels undergo conformational changes that lead to the opening or closing of the pore. To date, many Kv channel structures of open state are reported however little is known about closed state structures. In this research, we constructed double-Cys mutants that introduced combinations of single Cys residue each into helices S4 and S1 of the VSD of KvAP and investigated to determine structures of transition states from opened form to closed form of KvAP. In this study, we used KvAP, a voltage-dependent K+ channel from thermophilic archaebacterium Aeropyrum pernix. The initial attempt to determine the KvAP structure by cryo-EM was unsuccessful, possibly due to the structural heterogeneity in the detergent micelles. Therefore, we investigated and optimized the reconstruction of KvAP to nanodisc. We employed MSP (membrane scaffold protein) 2N2 and examined various lipids for reconstruction, successfully obtaining a 3D map of the KvAP double-Cys mutant with a maximum resolution of 3.8 Å. Our data is much higher resolution than those reported in a previous study (5.9 Å). Further cryo-EM analyses will be performed to determine the structure of the double-Cys mutants at the atomic level.						
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)			