

長期間派遣成果報告

タイトル	細菌機械受容チャネルのゲーティング機構の解明 Gating mechanism of mechanosensitive channels in bacteria	
所属・氏名	独立行政法人 科学技術振興機構 Japan Science and Technology Agency	野村 健 Takeshi NOMURA
派遣期間	2010年4月6日 – 2013年3月20日 April 6, 2010 – March 20, 2013	
研究機関	Victor Chang Cardiac Research Institute Molecular Cardiology and Biophysics Division 405 Liverpool Street, Darlinghurst (Sydney) NSW 2010, Australia	
研究指導者	Prof. Boris Martinac	

(Summary)

The bacterial mechanosensitive channels of small (MscS) and large (MscL) conductance are the major players in the protection of bacterial cells against hypoosmotic shock. Although a great deal is known about structure and function of these channels, much less is known about how membrane lipids may influence their mechanosensitivity and function. In this study, we used liposome co-reconstitution to examine the effects of different types of lipids on MscS and MscL mechanosensitivity simultaneously using the patch-clamp technique and confocal microscopy. Co-reconstitution of MscS and MscL into liposomes made of shorter phospholipids, i.e. phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylcholine (PC) having 16 instead of 18 hydrocarbons (PE16:PC16), dramatically decreased the activation threshold ratio (MscL/MscS) by decreasing of the activation threshold of MscL. Addition of 5-30% cholesterol, known to affect the bilayer thickness, stiffness and transbilayer pressure profile, led also to a decrease of the activation threshold ratio. In contrast, application of lysophosphatidylcholine (LPC) led to an increase of the activation threshold ratio. These findings suggest that differences in hydrophobic mismatch and bilayer stiffness, change in transbilayer pressure profile, and close proximity of MscS and MscL affect the structural dynamics of both channels to a different extent.

研究目的

細菌が真水などの低張な溶液に晒されると、細胞の内外に浸透圧差が生じ、細胞膜を透過した水分子が細胞内に蓄積する。細胞内への過剰な水分子の蓄積は、細胞膜の張力を上昇させ、やがて細胞破裂を起こして細胞死に至る。細菌はこのような破裂死から身を守るために、細胞膜からの張力を直接感知して開口する機械受容 (mechanosensitive; MS) チャンネルと呼ばれるイオンチャンネルを発現している。大腸菌には主に2のタイプのMSチャンネル、即ちMscS (MS channel of small conductance) 及びMscL (MS channel of large conductance) が細胞質膜上に発現しており、細胞膜に生じた張力を感知して閾値の低いMscSから順次開口し、水分子、イオン、浸透圧調節物質などを細胞外へ放出させ、細胞内の浸透圧を一定に保つように調節している。しかしこれらのイオンチャンネルがどのように膜張力を感知して開口するのかの詳細はよく分かっていない。

我々は先行研究において、MscS 及び MscL の張力感知部位を同定した (Yoshimura, et al., *Biophys J*, 2004; Nomura et al., *Biophys J*, 2006)。張力の感知には油水の界面に位置する疎水性アミノ酸残基と脂質との相互作用が重要であることを明らかにした。一方、張力の感知機構を解明するためにはチャンネルを取り巻く脂質環境についても考慮する必要がある。そこで本研究では、様々なタイプの人工脂質二重膜に MscS 及び MscL を共再構成し、脂質環境の違いが両チャンネルの機械刺激感受性にどのような影響を及ぼすかについて検討することを目的とした。

方法

His-tagを付けたMscS及びMscLを大腸菌でそれぞれ大量発現させ、Ni-NTAカラムを用いて両チャンネルタンパク質を精製した。精製したMscS及びMscLは、脱水和・再水和法を用いて様々なタイプの脂質分子で構成された人工脂質二重膜に組み込み、パッチクランプ法により両チャンネルの機械刺激感受性を検討した。

研究結果

1. 細胞膜の厚さの違いがMscS及びMscLの機械刺激感受性に及ぼす影響

脂質の脂肪酸鎖の長さの違いがMscS及びMscLの機械刺激感受性に影響を及ぼすか否かを検討するため、脂肪酸の炭素数が異なる2つのタイプの脂質分子（PE16:PC16及びPE18:PC18、それぞれ7:3の割合で構成）に精製したMscS及びMscLをそれぞれ共再構成し、両チャネルの機械刺激感受性の測定を行った。その結果、PE16:PC16及びPE18:PC18の両リポソーム膜においてMscLの閾値の低下が見られた。一方、MscSにおいては大きな変化は見られなかった。MscSとMscLは分子構造や細胞膜からの張力を感じ取る部位（メカノセンサー）に大きな違いがあることから脂質との相互作用は両チャネルにおいて異なるものと思われる。

2. コレステロールがMscS及びMscLの機械刺激感受性に及ぼす影響

コレステロールはチャネルタンパク質を含む様々な膜タンパク質の機能に影響を及ぼすことが知られている。本実験では、5～30%の範囲でコレステロールを混合したアズレクチン（大豆由来のリン脂質）リポソームにMscS及びMscLを共再構成し、両チャネルの機械刺激感受性を測定した。その結果、コレステロール存在下においてMscLには顕著な変化は見られなかったが、MscSにおいてはチャネルの閾値を増加させ、それに伴いチャネル活性の閾値比（MscL/MscS）を有意に低下させた。コレステロールがリポソーム膜に入り込むと、リン脂質や膜タンパク質などの機能分子の自由度が制限され（膜流動性の低下）、脂質膜の柔軟性が失われることにより膜が硬くなると考えられている。すなわち、コレステロールは細胞膜の物理的性質を変え、MscSの機械刺激感受性を低下させていると思われる。

3. LPC投与によるMscS及びMscLのチャネル活性

これまでの先行研究において、リゾリン脂質であるリゾフォスファチジルコリン（lysophosphatidylcholine: LPC）の投与はMscS及びMscLの自発的チャネル活性を引き起こすと報告されている。しかしながら、MscS及びMscLを人工脂質二重膜に共再構成し、LPC投与による両チャネルの機械刺激感受性への効果については未解明のままである。そこで本実験では、アズレクチン（100%）リポソームに両チャネルを共再構成し、LPCを投与した場合の両チャネルの機械刺激感受性を検討した。その結果、LPCの投与

により両チャネルの閾値が有意に低下し、それに伴い閾値比 (MscL/MscS) の有意な増加が見られた。細胞膜へのLPCの投与は、局所的な曲率の形成やリン脂質分子の間にLPCが入り込むことによって脂質二重膜横断圧力分布をMscS及びMscLが開口しやすい分布に変え、機械刺激感受性の感度を高めているものと思われる。

考察

今回の研究で明らかになったことは、①人工脂質二重膜の膜厚を薄くすると、MscLの活性化閾値を下げる。すなわち、脂肪酸の炭素数を減らすと脂質膜の疎水性部位の厚さと、チャネルタンパク質の膜貫通 α ヘリックスで構成される疎水性部位の厚さが一致しない状態 (hydrophobic mismatch) が生じる。MscLの疎水性部位が水相に露出した状態ではエネルギー的に不利であるため、MscLは構造変化を引き起こし、圧力による活性化閾値を下げる、②コレステロールは細胞膜の物理的性質を変化させ、MscS及びMscLの活性化閾値を上げる、③LPCの投与は細胞膜の局所的な曲率を生じさせ、MscS及びMscLの活性化閾値を下げる。これら①～③の事実から、MscS及びMscLの機械刺激感受性は、両チャネルを取巻く脂質環境の違いにより変化し、その程度はそれぞれのチャネルで異なることが示唆された。

研究発表

口頭発表

Nomura T, AR. Battle, and B. Martinac Lipid and lyso-lipid effects on the mechanosensitivity of liposome co-reconstituted MscS and MscL. 7th Asian Biophysics Association (ABA) Symposium & Annual Meeting of the Indian Biophysical Society (IBS) 2011, Delhi, India, Jan 30, 2011

誌上発表

Nomura T, C. Cranfield, E. Deplazes, D. Owen, A. Macmillan, A. Battle, M. Constantine, M. Sokabe and B. Martinac. Differential effects of lipids and lyso-lipids on the mechanosensitivity of the mechanosensitive channels MscL and MscS. Proc Natl Acad Sci U S A. 109(22): 8770-8775, 2012