

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04017

研究課題名(和文)再構成生理学：チャネルと膜の機能構築的アプローチ

研究課題名(英文)Reconstitution physiology: Functional construction of channel and membrane

研究代表者

老木 成稔(Oiki, Shigetoshi)

福井大学・高エネルギー医学研究センター・特命教授

研究者番号：10185176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜は分子・細胞・組織という階層の中で生理機能の中核となる反応の場であり、細胞膜に存在する様々な膜蛋白質の内イオンチャネルは細胞機能だけでなく組織の情報伝達の基礎となる。しかし細胞膜は極めて複雑な構成であるため、チャネルが膜という環境の中でどのように機能するか明らかにすることは難しい。本研究では生体膜の特徴を抽出し単純化した脂質2重膜を使い、生体膜機能を再現させるような実験系を確立することが目的である。研究代表者らが独自に開発した方法によって、細胞膜で起こる物理学的な張力変化などを負荷させ、これに対するチャネルの応答を捉えることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生理学は「細胞や組織をありのままに観察することでその機能を明らかにする」という伝統的手法が使われてきたが、複雑系である生体の機能を明らかにするにはこのような方法だけでは不十分である。このようなトップダウンとは逆の「ボトムアップアプローチを行うことによって生体機能を明らかにする」というコンセプトに基づくのが本研究の学術的意義である。そしてこのようなアプローチを行うには方法論が不可欠であるが、そのための基礎的方法を独自に開発したことが本研究の戦略となる。この方法をもとに、生体膜の複雑性を次々に再現し、この実験系ならではの解析力によってチャネルと膜の相互作用についてその分子機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Cell membrane is a core platform for the cellular activity, in which ion channel proteins, embedded in the membrane, operate their function through interaction with the membrane. However, cell membrane has complex structure, and elucidating molecular mechanism of channel-membrane interaction is very difficult. To circumvent this difficulty, we established a simple lipid bilayer membrane, in which channel proteins were incorporated. We developed a method to synthesize channel protein in this lipid bilayer system, where newly synthesized channel proteins were transferred into the membrane and exhibited channel activities. Changes in chemical composition of the membrane and force generated in the membrane were reproduced, and we found that channel are subject to change its activity by membrane stretch under quantitative evaluation of the membrane tension. Effect of various types of native lipids and other hydrophobic substances were examined for the molecular mechanism.

研究分野：一般生理学

キーワード：脂質2重膜 接触バブル2重膜法 膜張力 イオンチャネル コレステロール

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞とはどういうものか、どのように機能を生み出しているのか。このような生命の基本問題に医学・生物学が取り組んできた中で、分析的な手法による研究が大きな成果を残してきた。一方、生理学は全体性を重んじて細胞機能を統合する研究が行われてきた。ここで本研究が提案するのは、分析的でも統合的でもない第 3 の方法としての再構成的アプローチである。分解した細胞の要素をシステムとして組み上げ、そのシステムの機能を明らかにする過程でシステムの構築原理を理解するという方法である。「細胞要素が実際に働く場どのように運用されているか」ということを、それらの構成要素を変えながら実験することで、より多様な機能を理解できる。この考え方は工学では常套手段であるが、生物学で根付いていないのは対象を自由に操作できる系が存在しなかったからである。

対象とするのはチャンネル - 膜系である。私達はチャンネル分子の機能を明らかにする研究を長年続けてきたが、チャンネルが働く場である膜のことを必ずしも重視してきたわけではなかった。もちろんチャンネルの電気現象を追うには膜に埋め込むことが不可欠であり、その技術的な進展には一方ならず傾注してきたのは事実である。しかしそれは電氣的測定に不可欠な絶縁体を形成し、チャンネル電流測定の間を提供するものとして捉えていたという側面が強かった。そして今になってチャンネルと膜が関係しあい、働きあう統合体としての意味を持つことに改めて気が付いた。そのように考えると脂質平面膜法は単にチャンネル電流を測定する方法ではなく、チャンネル - 膜系を自在に組み立てられるシステムであると考えられる。

このような考え方の転換ができたのは私達が従来のパッチクランプ法と脂質平面膜法を融合した contact bubble bilayer (CBB)法を独自に開発し、この系で従来の脂質平面膜法のみならずパッチクランプ法をも凌駕する自由な実験が可能になったからである。

方法の開発において、従来、脂質平面膜法で培ってきた物理化学的知識が重要である。膜の物理化学的物性の知識のみならず、電気生理学的測定において、主に単一チャンネル電流測定を行ってきたことで、測定に関わる電氣的知識のみならず、一分子解析法についても最先端の知識を備えていることが大きな利点である。膜張力などの力学的な特性に関する知識と経験も蓄積しつつある。

2. 研究の目的

細胞膜は分子・細胞・組織という階層の中で生理機能の中核となる反応の場であり、細胞膜に存在する様々な膜蛋白質の内イオンチャンネルは細胞機能だけでなく組織の情報伝達の基礎となる。しかし細胞膜は極めて複雑な構成であるため、チャンネルが膜という環境の中でどのように機能するか明らかにすることは難しい。本研究では生体膜の特徴を抽出し単純化した脂質 2 重膜を使い、生体膜機能を再現させるような実験系を確立することが目的である。研究代表者らが独自に開発した方法は膜の化学的組成を自由に換えられるだけでなく、細胞膜で起こる物理学的な張力変化などを負荷させ、これに対するチャンネルの応答を捉えることを目指す。「膜を作って、操作し、解析する」という新しい研究の方法を確立することを目指す。

具体的にはチャンネルと膜との相互作用を明らかにする上で、膜のリン脂質組成の中からチャンネルと特異的な相互作用を行うリン脂質をスクリーニングする。一方、膜のチャンネルに対する物理的な作用を明らかにするために、膜張力の測定系を確立する。

3. 研究の方法

脂質 2 重膜法が本研究の基本的手法であるが、数年前に研究代表者らが CBB 法という独自の方法を開発し、従来の脂質平面膜法に完全に取って代わった。この方法は膜リン脂質の組成を自由に瞬間的に変化させることができるという利点があるだけでなく、従来パッチクランプで行われてきた張力負荷の欠点を補うことができる。この方法は油相の中にパッチクランプ用のガラスピペットから電解質溶液を吹き出して液滴を作ると、あらかじめ油相に溶かしたリン脂質が油・水界面に形成されることを利用しており、誰にでも簡単に脂質 2 重膜を形成することができるようになった。

従来、膜組成の特定の成分がチャンネルとどう相互作用するかということをはっきりさせるには技術的な問題があった。新しい方法ではチャンネル機能を測定している最中に一瞬で膜組成を変えることができる。この方法を開発することによって生体膜組成に重要な成分のチャンネルに対する効果をリアルタイムで捉えることができる。

4. 研究成果

CBB 法の利点を利用して、従来不可能であった新しい実験を行い、チャンネルと膜の物理的・化学的相互作用とその分子機構を明らかにすることができた。

細胞膜ではそのリン脂質組成が時々刻々と変化しているが、このような変化を実験的に起こしてチャンネルの応答を見る方法が限られており、また組成変化も極めて遅かった。CBB 法を使うことによって一瞬にして (< 1 秒) 膜のコレステロール組成を変化させることに成功し、チャンネルが活性を失うことを発見した。

(1) 非対称膜形成

生体膜に倣い、脂質 2 重膜の外葉 (outer leaflet) と内葉 (inner leaflet) の脂質組成を非対称にし、KcsA チャンネルが内葉に存在する酸性リン脂質によって活性化ゲートを開くことを発見した。またチャンネルの部分構造である M0 ヘリックスが酸性リン脂質のセンサーであることを解明した。

(2) 膜組成の急速変化

膜灌流法により、チャンネル電流を記録中にコレステロール濃度を急速に変化させ、チャンネルが閉じることを発見した。この効果はコレステロールに限らず、他のステロールでも同等の効果を示すことを見出した。

(3) 膜張力の測定

上記のステロール効果が、分子種によらないことから物理的な作用を予想し、膜張力測定法を確立した。この方法と膜灌流法により、ステロールの効果が膜張力を低下させることでチャンネル活性を抑制することを初めて明らかにした。膜張力測定法はさらに方法を改良しつつある。

(4) 膜張力の自由なコントロール

化学組成の変化による膜張力の変化だけでなく、純粋に力学的に膜張力を変化させることにも成功した。膜張力を減少させることで KcsA チャンネルが閉じることを明らかにし、このことから上記のステロールの効果が膜張力を介するものであることを証明した (Iwamoto &

Oiki PNAS 2018)

(5) CBB 上へのチャネルの発現

従来、チャネル蛋白質は大腸菌で発現させ、分離・精製の過程が不可欠であった。そこでチャネル蛋白質を CBB の液滴の中で蛋白質合成し、膜に組み込む方法を確立した。これを *in bulla* 法と呼ぶ。In vitro 転写・翻訳系の中でも pure system は精製した既知の最小限の組成からなり、チャネルの DNA を加えることで蛋白質生成を開始する。電気的測定をしながら生成を開始したところ、約 10 分ではじめのチャネル活性を捉えることに成功した (Iwamoto et al. ACS Synth. Biol. 2018)。従来の数日間という準備期間に比べて劇的な短縮である。この方法をさらに使い易いものにしていきたい。

(6) CBB 法のさらなる簡易法の確立

CBB 法ではガラスピペットを利用し、パッチクランプ並みの技術的手技が必要である。これをさらに簡単に誰でもできる方法を開発した。試験管での実験と同等の簡便さで脂質 2 重膜実験が可能である。これを drop-in-well 法と呼ぶ (Urakubo et al. Method. Enzymol. 2018)。

パッチクランプ法でも脂質平面膜法でも従来不可能であった実験が可能になり、完全人工再構成系のチャネル - 膜系がほぼ完成したことになる。再構成生理学に向けて着実に方法論が備わってきつつある。またこのようなシステムによってチャネルと膜という極めて基本的な関係の様々な側面が明らかになってきた。さらに様々な方法の適用により、その分子機構を解明することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Masataka Inada, Masanao Kinoshita, Ayumi Sumino, Shigetoshi Oiki & Nobuaki Matsumori	4. 巻 1059
2. 論文標題 A Concise Method for Quantitative Analysis of Interactions between Lipid and Membrane Proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anal. Chim. Acta	6. 最初と最後の頁 103-112
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） org/10.1016/j.aca.2019.01.042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Iwamoto, M. and Oiki, S.	4. 巻 143
2. 論文標題 Lipid bilayer experiments with Contact Bubble Bilayers for Patch-Clampers.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Vis. Exp.	6. 最初と最後の頁 e58840
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/58840	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Iwamoto, M. and Oiki, S.	4. 巻 115
2. 論文標題 Constitutive Boost of an Active KcsA Channel under the Intrinsic Lipid Bilayer Tension Attenuated by Cholesterol in the Membrane.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. USA	6. 最初と最後の頁 13117-13122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） org/10.1073/pnas.1812282115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kojima, S., Iwamoto, M., Oiki, S., Tochigi, S. and Takahashi, H.	4. 巻 293
2. 論文標題 Thylakoid membranes contain a non-selective channel permeable to small organic molecules.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 7777-7785
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA118.002367	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iwamoto, M., Elfaramawy, M. A., Yamatake, M., Matsuura, T. and Oiki, S.	4. 巻 7
2. 論文標題 Concurrent in vitro Synthesis and Functional Detection of Nascent Activity of the KcsA Channel under the Membrane Potential.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Synth. Biol.	6. 最初と最後の頁 1004-1011
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssynbio.7b00454	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kalathingal, M., Sumikama, T., Mori, T., Oiki, S. and Saito, S.	4. 巻 20
2. 論文標題 Structure and dynamics of solvent molecules inside Polytheonamide B channel in different environments: A molecular dynamics study.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PCCP	6. 最初と最後の頁 3334-3348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c7cp06299k	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iwamoto Masayuki, Sumino Ayumi, Shimada Eri, Kinoshita Masanao, Matsumori Nobuaki, Oiki Shigetoshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Channel Formation and Membrane Deformation via Sterol-Aided Polymorphism of Amphidinol 3	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10782
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-11135-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Iwamoto Masayuki, Oiki Shigetoshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Membrane Perfusion of Hydrophobic Substances Around Channels Embedded in the Contact Bubble Bilayer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6857
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-07048-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sumino Ayumi, Uchihashi Takayuki, Oiki Shigetoshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Oriented Reconstitution of the Full-Length KcsA Potassium Channel in a Lipid Bilayer for AFM Imaging	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 785 ~ 793
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcllett.6b03058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oiki Shigetoshi, Iwamoto Masayuki	4. 巻 41
2. 論文標題 Channel-Membrane Interplay in Lipid Bilayer Membranes Manipulated through Monolayer Technologies.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biol. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 303-311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b17-00708	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 炭竈享司、老木成稔	4. 巻 58
2. 論文標題 チャネルの入口がイオンの透過速度を決める	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 12-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.58.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 岩本真幸、老木成稔	4. 巻 57
2. 論文標題 脂質平面膜とパッチクランプのハイブリッドとしてのCBB (接触液胞2重膜) 法	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 313-317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.57.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 岩本真幸、老木成稔
2. 発表標題 コレステロールがKcsAカリウムチャネル機能に及ぼす影響(Effects of cholesterol on the function of the KcsA potassium channel)
3. 学会等名 第94回日本生理学会大会（アクトシティ浜松、浜松）（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岩本真幸、老木成稔
2. 発表標題 脂質二重膜がカリウムチャネル開閉に及ぼす多様な影響(Specific and non-specific actions of membrane lipids on the gating of the potassium channel)
3. 学会等名 日本生物物理学会第55回年会（熊本大学、熊本）シンポジウム「いろんなスケールで働く膜タンパク質の作動原理：実験と理論の新展開（Operating principles of membrane proteins at multiscale resolutions）」（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 老木成稔
2. 発表標題 KcsAカリウムチャネル膜相と作用のための一分子実験法
3. 学会等名 蛋白研セミナー（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Oiki, S.
2. 発表標題 Ion Permeation and Gating of the KcsA Potassium Channel Reconstituted in the Manipulated Membrane.
3. 学会等名 Ion Channel Modulation Symposium, Cambridge, UK（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Shigetoshi Oiki	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 43
3. 書名 Reference Module in Life Sciences	

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 脂質二重膜の水透過性の評価システム、脂質二重膜の水透過性の評価方法、および、脂質二重膜の水透過性を制御する薬剤のスクリーニング方法	発明者 老木 成稔・岩本真幸・矢野啓太	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019 - 12092号	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 接触液胞2重膜法による膜物性変化の実時間測定法	発明者 老木 成稔・岩本真幸	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017 - 246976号	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 脂質二重膜形成装置、脂質二重膜形成方法、および評価システム	発明者 老木 成稔・岩本真幸	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-063796号	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 脂質二重膜形成器	発明者 老木 成稔・岩本真幸	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 意匠、意願2017-006362号	取得年 2017年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岩本 真幸 (Iwamoto Masayuki) (40452122)	福井大学・学術研究院医学系部門・教授 (13401)	