

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17768

研究課題名(和文)イオンチャネルの多量体化の機構の解明とその生理的意義

研究課題名(英文)Elucidation of polymerization mechanism of ion channels and its physiological significance

研究代表者

炭竈 享司 (Sumikama, Takashi)

金沢大学・ナノ生命科学研究所・特任助教

研究者番号：30579412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：生合成されたイオンチャネルの単量体がいかに細胞膜に取り込まれ、その後、多量体を形成して機能できるようになるかは未だに解明されていない。本研究では、分子動力学法を用いたシミュレーションにより、それらの過程を観察し解明することを目的とした。その結果、最小のチャネルの一つであるポリセオナミドBが細胞膜に突き刺さる過程を分子レベルから解明することに成功した。多量体の形成機構については研究を進めることは出来なかったが、近年提案されているelectronic continuum correction法がより正確にイオンとタンパク質、脂質分子の相互作用を記述するには不可欠であることを確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イオンチャネルがいかにその機能を発揮するかを調べることは、生理的・生物物理学的に重要であるだけでなく、イオンチャネルは神経や筋肉の動きを支配する分子の一つであり、その機能の欠陥による様々な病気が知られているため、社会的にも意義深いものと考えられる。また、簡便なelectronic continuum correction法がイオンとタンパク質や脂質分子の相互作用の大幅な改善につながることは、今度のシミュレーションにとって不可欠な知識となっていくと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The insertion process of monomers of ion channels to membranes and the mechanism of eventual multimeric formation of them are still unknown. In this study, we aimed to reveal them by using the molecular dynamics simulation. The insertion process of the polytheonamide B, one of the smallest ion channel, was clarified at the molecular level. Though the multimeric formation mechanism was not investigated, it was confirmed that the recently suggested electronic continuum correction is significant for precisely describing ion-protein and ion-lipid interaction.

研究分野：生物物理学、生理学

キーワード：イオンチャネル 細胞膜 分子動力学法 シミュレーション

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) イオンチャネルは細胞膜に存在し、イオンを受動的に細胞内外に通すことで生体の活動に必要な電位、いわゆる静止膜電位や活動電位を発生する。多くのチャネルは多量体であり、例えばカリウムチャネル( $K^+$ チャネル)の場合、四量体を形成する。 $K^+$ チャネルでは、イオンが透過する経路(ポア)は四量体の隙間によって形成される。

(2) 生体内のチャネルには多様な種類が存在する。 $K^+$ チャネルの場合、Kir チャネル、Kv チャネル、KCNE チャネル等がある(厳密にはさらに細かい分類がある)。それらの細胞膜内の構造は酷似しているため、別の種類のチャネルの単量体が会合しても不思議はないように思われる。しかし、それらが正しく機能するためには、同じ種類のチャネルの単量体が会合して多量体を形成する必要がある。

(3) したがって、チャネルがいかに同じ種類の単量体同士で選択的に会合して多量体を形成するかは、チャネルの機能発現機構を知るために重要である。しかし、生合成された様々な種類のチャネルの単量体がどのような機序で細胞膜に輸送されて多量体を形成するのかは、全く分かっていない。

(4) 従来、チャネルの機能や構造は、電気生理学的手法やX線結晶構造解析によって調べられていた。しかし、これらの手法は、生合成された単量体が膜に輸送され多量体が形成された後、つまりチャネル完成後の機能や構造を調べるものであり、多量体の形成過程を調べるには難しい方法であった。

(5) 一方、チャネルに拘らなければ、膜タンパク質が細胞膜に輸送される過程を調べる研究は行われている。例えば、メリチンと言う蜂毒のタンパク質が細胞膜に突き刺さる過程は、分子動力学(molecular dynamics; MD)法によるシミュレーションによって既に観測されている。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、多量体の形成過程の中でも、細胞膜内にチャネルが輸送される過程、その後の輸送された単量体が会合していかに多量体を形成するかを解明することとした。

### 3. 研究の方法

(1) 前述したように、従来の主たるチャネルの研究手法である電気生理学の実験やX線結晶構造解析をこの研究に適用することは難しい。この理由は、X線結晶構造解析では結晶内での平衡状態にある構造、つまり動かない構造を調べるものだからである。一方、電気生理学的手法ではチャネルが動いたこと、あるいはチャネル内をイオンが動いたことを電流として計測可能であるが、電流計測の時間解像度はミリ秒であり、チャネルの状態が変化する時間(およそナノ秒からマイクロ秒)を捉えるには解像度が足りない。

(2) MD法によるシミュレーションは、Newton方程式をコンピュータを使って数値的に解くことにより、対象となる系内の全ての原子の時々刻々の座標を求める手法である。この方法の時間解像度はフェムト秒ととても高い。一方、スパコンを用いれば、チャネルやその周囲の脂質分子、水溶液を含んだ系をマイクロ秒から数十マイクロ秒までシミュレート可能である。したがって、MD法によるシミュレーションは、単量体が細胞膜に輸送される過程、また、多量体を形成する過程を観測するのに適した手法と言える。そこで、本研究ではMDシミュレーションを用いて研究にあたる。

### 4. 研究成果

本研究は、前述のように、チャネルの単量体の細胞膜への輸送とその後の多量体形成の過程を調べることを当初の目的としたが、研究者の異動もあり、十分には研究を進展させられなかった。特に、いかに多量体を形成するのか、については、研究を開始することも出来なかった。しかし、関連する重要な知見も多数得られたので、それを報告する。

(1) 最小のチャネルの1つであるポリセオナミドB(polytheonamide B; pTB)の細胞膜への輸送過程を解明することを試みた。pTBは単量体で機能するチャネルであるが、これを用いたのは、1) 小さくシミュレーションが容易であるため、2) 細胞膜に突き刺さる向きが実験的に分かっているため、である。

pTBを細胞膜である脂質二重膜を含む系内のバルク中に配し、どのように脂質二重膜に入っていくのかをシミュレートして観察した。その結果、用意した構造の全ての場合において、pTBは10マイクロ秒以内に自発的に細胞膜に突き刺さって行った。挿入される向きは、実験から判明している向きと全ての場合で同じであった。輸送過程を詳細に調べたところ、pTBの挿入には2段階あることが分かった。1つは、細胞膜の片側から挿入が始まると、一気に細胞膜の反対側まで貫通してポアを形成するものであった(つまり、挿入の時定数は1つで短い)。もう1つは、挿入開始後、細胞膜の真ん中に到達したところで一旦挿入が止まり、しばらく後に反対側まで到達してポアを形成するものであった(挿入の時定数は2つで、短いものと長いものがある)。さらに、輸送過程を詳細に調べるため、pTBの挿入に関する自由エネルギー計算も行った。自由エネルギー一面には、2段階の挿入過程を反映するショルダーが見られた。

この成果は、知る限りではチャネル単量体の細胞膜への輸送の可視化とその過程の解明に初めて成功したものである。現在、論文に纏めている最中である。

(2) イオンチャネルの最も重要な機能は、イオンを透過させ膜電位をコントロールすることである。そこで、細胞膜に突き刺さった pTB について、電場を印加した非平衡 MD シミュレーションを行い、イオンの輸送速度について見積もることを試みた。この輸送速度については、電気生理学的手法により求めた実験値が既に報告されており、シミュレーションと実験の比較が可能である。

しかし、シミュレーションを行った結果、残念ながらイオン透過は一度も観測されなかった。よく知られたように、シミュレーションの良し悪しはそのモデル（いわゆる力場、パラメータ）に依存する。そこで、最も大きな影響を持つ相互作用は電荷であるため、pTB の電荷を様々にスケールしたモデルを用意し、それぞれのモデルについてイオン透過の観測を試みた。この場合でも、試した全ての場合においてイオン透過は全く観測されなかった。これらの結果は、我々が用いているモデルが良くなく、そのため実験を再現できなかったと解釈すべきである。

MD シミュレーションの古典的モデルの致命的な欠点は、電子の分極（電子状態）を考慮していないことである。従来解決法は、量子論を取り込んだいわゆる QM/MM モデルを用いること、または、分子の分極をあらわに扱える分極モデルを用いることである。しかし、QM/MM モデルでの MD 計算には時間がかかるため、イオン透過を観測するには現実的ではない。また、分極モデルについても十分に開発が進んでいるとは言えない。近年、これを簡便に解決する手段として、electronic continuum correction (ECC) 法が提案されている。これは電荷を 0.8 倍にスケールダウンする荒削りな方法ではあるが、計算速度は従来古典的モデルと変わらない利点はある。また、細胞膜とそれを取り巻くイオン水溶液に適用された場合、従来よりも非常に良い精度で細胞膜近傍のイオンの分布を再現できることが示されている (Melcr ら, *J. Phys. Chem. B* 122, 4546, 2018 年)。そこで、ECC 法を適用してイオンの電荷をスケールダウンしたところ、pTB においてもイオン透過を観測することが出来るようになった。現在、実験との比較を行えるようシミュレーションを進めている段階である。

(3) ECC 法がどれほど有効か、実験と比較する研究も開始している。これはチャネルではないが、ヘビ毒 (phospholipase A2; PLA2) と細胞膜との結合解離について、高速原子間力顕微鏡 (high-speed atomic force microscopy; HS-AFM) による動態観察が進行しているため、ECC 法を用いた MD シミュレーションとの比較を始めている。HS-AFM 観察では PLA2 は細胞膜の端に結合しやすいことが分かりつつあるが、MD シミュレーションの結果ではまさにその構造が再現されている。

さらに、PLA2 の活性には  $\text{Ca}^{2+}$  が必要であり、 $\text{Ca}^{2+}$  と PLA2 が結合することが知られている。 $\text{Ca}^{2+}$  の解離定数程度のイオン濃度で MD シミュレーションを行ったところ、 $\text{Ca}^{2+}$  と PLA2 が何度も結合と解離を繰り返している様子、まさに解離定数の濃度での挙動が観察されている。古典的モデルでは多価イオンの挙動を正しくシミュレートするのが難しいことは従来よく知られており、例えば  $\text{Ca}^{2+}$  は脂質分子やタンパク質の負電荷を帯びた部位と結合し過ぎることが報告されている（これ自体、電子状態をモデルに取り入れることの必要性を示している）。したがって、結合解離の繰り返しが観測されたのは、ECC 法が相当程度モデルを改善し、より現実的なシミュレーションに近づいたことを示している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mizuno Kazuko, Sumikama Takashi, Tarnai Yoshinori, Tani Masahiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Origins of Heat Evolution in Mixing Water and Dimethyl Sulfoxide	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Conference on Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves (IRMMW-THz2018)	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1109/IRMMW-THz.2018.8509894	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 Ajito Katsuhiko, Ueno Yuko, Kim Jae-Young, Sumikama Takashi	4. 巻 140
2. 論文標題 Capturing the Freeze-Drying Dynamics of NaCl Nanoparticles Using THz Spectroscopy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 13793 ~ 13797
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.8b07828	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 炭竈 享司、老木 成稔	4. 巻 58
2. 論文標題 チャン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 012 ~ 016
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 Kalathingal Mahroof, Sumikama Takashi, Mori Toshifumi, Oiki Shigetoshi, Saito Shinji	4. 巻 20
2. 論文標題 Structure and dynamics of solvent molecules inside the polytheonamide B channel in different environments: a molecular dynamics study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Physical Chemistry Chemical Physics	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 Sumikama Takashi、Foster Adam. S.、Fukuma Takeshi	4. 巻 124
2. 論文標題 Computed Atomic Force Microscopy Images of Chromosomes by Calculating Forces with Oscillating Probes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry C	6. 最初と最後の頁 2213 ~ 2218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.9b10263	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 該当する

1. 著者名 Sumikama Takashi、Oiki Shigetoshi	4. 巻 69
2. 論文標題 Queueing arrival and release mechanism for K <sup>+</sup> permeation through a potassium channel	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 919 ~ 930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12576-019-00706-4	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 A.、Sumikama T.、Uchihashi T.、Oiki S.	4. 巻 5
2. 論文標題 High-speed AFM reveals accelerated binding of agitoxin-2 to a K <sup>+</sup> channel by induced fit	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aax0495	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27件 (うち招待講演 11件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 炭電享司
2. 発表標題 KcsAチャンネルでのK <sup>+</sup> とNa <sup>+</sup> の選択的透過のMDシミュレーションによる再現
3. 学会等名 第3回イオンチャンネル研究会チャンネルフェニックス (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 炭竈享司、宮澤佳甫、日笠山拓、中山響介、原田昌征、福間剛士
2. 発表標題 Computational modeling of chromosomes and carbon nanotubes as a probe of atomic force microscopy
3. 学会等名 Biophysical Society Thematic Meeting on the Genome Biophysics: Integrating Genomics and Biophysics to Understand Structural and Functional Aspects of Genomes (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 炭竈享司
2. 発表標題 K+チャンネルでのイオンの透過と選択性の誤謬：どこで何を間違えたか？
3. 学会等名 蛋白質研究会「構造情報に基づいた膜イオン輸送タンパク質の生理機能の解明に向けて」(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 炭竈享司、三田建一郎、老木成稔
2. 発表標題 Na+イオンはKcsA K+チャンネルを遅いが透過する
3. 学会等名 日本生物物理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 炭竈享司
2. 発表標題 Towards elucidating the physical origin of force in AFM measurements and a method analyzing dynamics observed by HS-AFM
3. 学会等名 WPI-NanoLSI workshop "Trends in Computational Molecular Biophysics" (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 炭竈享司、福間剛士
2. 発表標題 染色体の3D-AFM像の理論予測
3. 学会等名 生物物理学会中部支部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 炭竈享司
2. 発表標題 3D-AFM像の理論予測とHS-AFMの動画解析
3. 学会等名 第2回CREST会議（研究課題名：高速原子間力顕微鏡1分子計測のデータ同化による生体分子4次元構造解析法の開発）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 炭竈享司、老木成稔
2. 発表標題 An alternative permeation mechanism through the K <sup>+</sup> channel
3. 学会等名 日本生理学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 炭竈享司、老木成稔
2. 発表標題 イオンチャンネルにおけるノックオン機構は本当に重要か？ーその2ー
3. 学会等名 生物物理学会中部支部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 炭電享司、老木成稔
2. 発表標題 Knock-on is not a canonical mechanism for K <sup>+</sup> permeation through potassium channels
3. 学会等名 アメリカ生物物理学会 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 炭電享司、老木成稔
2. 発表標題 Is Knock-on the Canonical Mechanism for the Ion Permeation through a Potassium Channel?
3. 学会等名 新学術領域研究「動的秩序と機能」第6回国際シンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 炭電享司、老木成稔
2. 発表標題 K <sup>+</sup> チャンネルを通る電流のMichaelis-Menten様の飽和の分子論的説明
3. 学会等名 分子シミュレーション討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 炭電享司
2. 発表標題 Water orientation in nanocavity of the Kv1.2 channel and its role in ion permeation: A molecular dynamics study
3. 学会等名 Workshop on Reaction and Structural Dynamics in Condensed Phases (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 炭電享司
2. 発表標題 何がK+チャンネルでのイオンの透過速度を決めるか？：分子動力学シミュレーションによる研究
3. 学会等名 ナノ計測勉強会2017（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 炭電享司、老木成稔
2. 発表標題 Spontaneous exits of ions from the KcsA channel
3. 学会等名 日本生物物理学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 炭電享司
2. 発表標題 K+チャンネルでのイオン透過におけるイオンと水分子の相互作用の重要性
3. 学会等名 第2回イオンチャンネル研究会チャンネル七夕（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 炭電享司
2. 発表標題 計算科学は膜イオン輸送の実験をどこまで再現できるか？：K+チャンネルでのイオン透過
3. 学会等名 蛋白研研究会「膜イオン輸送の学際研究：計算科学から医学まで」（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 炭龍享司
2. 発表標題 分布関数の時間発展で生体内現象を解析する：K <sup>+</sup> チャンネルにおけるイオン透過を例に
3. 学会等名 第16回計算分子化学コロキウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 炭龍享司、老木成稔
2. 発表標題 イオンチャンネルでのイオン透過を分布関数の時間発展で捉える
3. 学会等名 理論化学討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 炭龍享司
2. 発表標題 イオンチャンネルを通るイオン透過における水分子の役割：モデルチャンネルとK <sup>+</sup> チャンネルを例に
3. 学会等名 福井大学遠赤外領域開発研究センターセミナー（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 炭龍享司、Mahroof Kalathingal、老木成稔、斉藤真司
2. 発表標題 分子シミュレーションで見る毒の作用機序：海綿由来毒ポリセオナミドの細胞膜への挿入
3. 学会等名 トキシシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 炭竈享司、宮澤佳甫、Adam S. Foster、福間剛士
2. 発表標題 染色体の3D-AFM像と実像の關係の理論的解明
3. 学会等名 日本生物物理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 炭竈享司
2. 発表標題 Computational prediction of 3D-AFM images of chromosomes
3. 学会等名 Joint UBI-NanoLSI workshop "Trends in Molecular Biophysics of Living Cells" (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 炭竈享司、宮澤佳甫、Adam S. Foster、福間剛士
2. 発表標題 間期と分裂期の染色体の3D-AFM像の理論的予測
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Sumikama, Niko Oinonen, Fedor Urtev, Adam. S. Foster, Takeshi Fukuma
2. 発表標題 Toward elucidating a relation between computed atomic force microscopy image and actual structure using machine learning
3. 学会等名 The 1st International Conference on Big Data and Machine Learning in Microscopy (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takashi Sumikama, Adam. S. Foster, Takeshi Fukuma
2. 発表標題 Computing Atomic Force Microscopy Images of Chromosomes Using Polymer Simulation
3. 学会等名 アメリカ生物物理学会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 炭竈享司、三田建一郎、老木成稔
2. 発表標題 KcsA K+チャネルでのイオン選択性の分子機構
3. 学会等名 日本生理学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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