

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02596

研究課題名(和文)膜電位存在下におけるイオンチャネルの機能と構造変化の1分子同時計測

研究課題名(英文)Development of a method for simultaneous recordings of single channel dynamics and currents

研究代表者

清水 啓史(Shimizu, Hirofumi)

福井大学・学術研究院医学系部門・講師

研究者番号：50324158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：イオンチャネル開閉構造変化の全体像を明らかにするため、1分子電流と1分子構造変化の同時計測法開発を目的とした。本研究では、デバイス中への脂質二重膜形成のため、パターンニング可能な新素材を採用し膜穴形成のプロセスを開発した。脂質二重膜を形成し電気容量計測を行った。電気容量の低減プロセスを開発した。次に、電極のパターンニングプロセスを行いデバイス上への電極を配置した。放射線照射実験を行い、照射に伴う電気ノイズレベルの計測と散乱X線の遮蔽方法を検討した。さらに、金ナノ結晶のサイズ制御法を改良し、蛋白質との複合体形成の効率を高めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イオンチャネル蛋白質は1分子機能測定法である1分子電流計測法が確立しており、立体構造情報の蓄積が進んでいる今、1分子動態計測との同時計測の実現は、蛋白質の機能発現機構の解明に極めて重要である。本研究では、X線1分子動態計測法に適合する同時計測チャンバ開発を進めた。観測窓、流路形成素材の決定を始め、観測チャンバに電極を設置し、放射光実験で電極に散乱X線が入射することを防ぐノイズ対策など、同時計測実現に向けた重要な進展があった。また、観測プローブと蛋白質の複合体形成効率を高めるため、サイズ制御法のプロセスの改良も進んだ。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the whole picture of the structure change in the ion channel, we aimed to develop a method for simultaneously measuring single-molecule current and single-molecule structure change. In this study, we developed a process for forming a hole by using a new material that can be patterned for forming a lipid bilayer in the device. A lipid bilayer membrane was formed and the capacitance was measured. And we have developed a process to reduce the electric capacity. Next, an electrode patterning process was performed to place the electrodes on the device. Then irradiation experiments were conducted to measure the electrical noise level associated with irradiation and to examine the method of shielding scattered X-rays. Furthermore, the size control method for probe has been improved to increase the efficiency of complex formation with proteins.

研究分野：生理学

キーワード：1分子計測 蛋白質 X線回折

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

2008年にイオンチャンネル蛋白質である KcsA チャンネルの1分子動態計測に成功して以降、申請者は X 線1分子動態計測法の開発に取り組んできており、これまでに高速観測システムの導入によってサブミリ秒の時間分解能を、白色 X 線集光ミラーの導入によって広い運動観測範囲をもつ手法としてきた。イオンチャンネルの構造変化、特に開閉に伴うねじれ構造変化をサブミリ秒時間分解能で遷移過程を連続的に捉える事が出来るため、「動画」として分子の構造変化の全体像を明らかにすることができる。一方、イオンチャンネル蛋白質の機能測定では、サブミリ秒の時間分解能でイオンチャンネルを流れる電流を計測する、1分子電流計測法が確立しており、1分子動態と同じ時間分解能で同時計測システムの開発は、イオンチャンネルの構造・機能・動きの相関を明らかにするために最も有効な方法である。

### 2. 研究の目的

イオンチャンネル開閉構造変化の全体像を明らかにするため、1分子電流と1分子構造変化の同時計測法を確立することを目的とした。これまでに、X 線散乱ノイズの小さい素材を探索し、マイクロ・ナノ加工技術を用いた低ノイズ溶液置換観測チャンバを作製してきた。本研究では、脂質二重膜形成部にパターンニング可能な新素材を採用し、薄層同時計測チャンバを作製する。また、観測プローブであるサイズ制御した金ナノ結晶とイオンチャンネル蛋白質（KcsA カリウムチャンネル）が反応した複合体を作製する手法を確立することで、1分子電流・動態の同時計測を実現することを目的とした。

### 3. 研究の方法

KcsA カリウムイオンチャンネルは溶液の pH によって開閉が制御される。中性 pH ではイオン透過路は閉じた状態にあり、酸性状態では開閉構造変化を繰り返すことが1分子電流計測の結果から予想されていた。機能と動態の同時計測を行う際の参照データとして、この分子の開閉にともなう動きを、中性、酸性それぞれの溶液条件で、従来型の観測チャンバを用いた平衡状態で、X 線1分子動態計測法を用いてサブミリ秒の

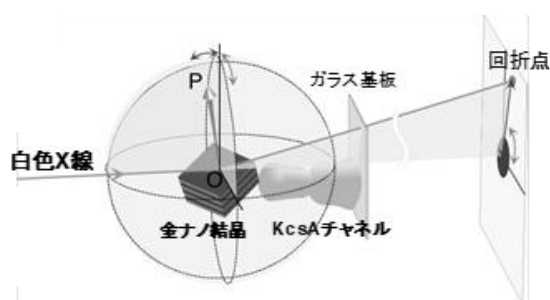
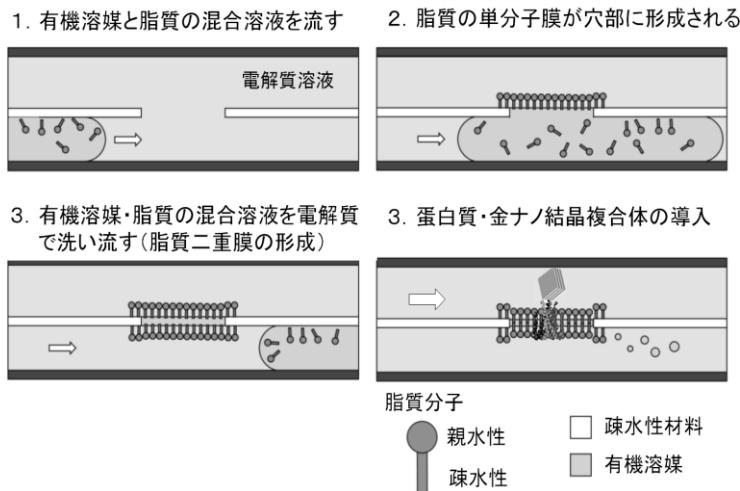


図1. X 線1分子動態計測法の模式図

ガラス基板に固定した蛋白質に金ナノ結晶を取り付け、蛋白質の動きを金ナノ結晶からの回折点の運動として動画計測する (H.Shimizu., Cell (2008))。

時間分解能の動態計測を行った (図1)。次に、同時計測チャンバの開発を行った。新たな疎水性材料をシリコン基板上にパターンニングし、膜穴を形成した隔壁構造を作製する (図2)。片側の流路に有機溶媒に溶解した脂質溶液と電解質溶液を交互に、もう一方の側の流路に電解質溶液を流すことによって、隔壁に形成した穴構造に脂質二重膜を形成する。具体的に流路厚、隔壁層の厚み、膜穴のサイズを検討した。最後に観測プローブとイオンチャンネル蛋白質の複合体形成法について検討した。従来の観測プローブ

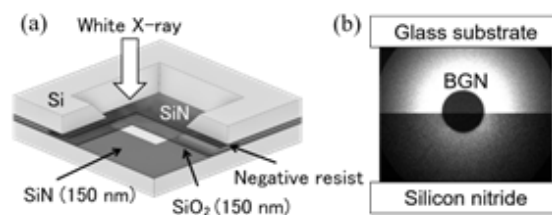


**図 2.** 脂質二重膜の形成とチャネル分子の導入プロセス  
 電解質溶液に満たされた流路に有機溶媒と脂質の混合溶液を流すと 2 流路隔壁の穴形成部に単分子膜が形成される。電解質溶液で洗い流すと脂質二重膜が形成される (1-3)。あらかじめ金ナノ結晶と複合体を形成している試料を脂質二重膜に再構成する (4)。

はサイズ分布が広く、蛋白質と観測プローブの反応比を制御しにくい問題点があった。このため、代表者が開発を続けてきた観測プローブのサイズ制御法の条件を検討し、複合体形成に適切な観測プローブの作製条件を決定した。

#### 4. 研究成果

本研究ではイオンチャネル蛋白質の 1 分子構造変化と 1 分子電流の同時計測システムを確立することを目指し、同時観測システムの開発を行った。観測チャンバについては、脂質二重膜形成部にパターンニング可能な新素材を採用し、薄層同時計測チャンバを作製する方針で進めてきた。同時計測のための膜形成デバイスの作製プロセスの検討を行い、膜穴形成のパターンニング



**図 3.** 観測チャンバ素材と X 線散乱ノイズの関係  
 (a)低ノイズチャンバの模式図 (b) X 線散乱データ。窒化ケイ素膜を観測窓に使用することによって X 線散乱ノイズを大幅に低減できる。

プロセスを開発し、改良を進めた。作製したデバイスに脂質二重膜を形成し、電気容量計測を行った。電気容量とデバイス材料の相関データを取得し、ノイズ源となる電気容量の低減プロセスを開発した。次に、デバイス上への電極のパターンニングプロセスを行った。電極材料、パターンニング法の検討を行い、デバイス上への電極を配置した。このデバイスを用いて、放射線照射実験を行い、照射に伴う電気ノイズレベルの計測と散乱 X 線の遮蔽方法についての検討を行った。放射光実験については、観測チャンバの表面修飾方法、サイズ制御した観測プローブ作製法、蛋白質との反応方法を改良することによって、観測プローブ-蛋白質複合体形成効率が向上し、データ取得効率が向上した。低ノイズ観測チャンバの作製 (図 3) は研究分担者である平井義和助教 (京都大学) の協力を得て行った。放射光施設での X 線回折実験については研究分担者である岩本真幸教授の協力を得て行った。低ノイズ観測チャンバとそれを用いた観測データについての結果を *Transducers 2019* で発表し、優秀な発表として *outstanding paper award finalist top 9* に選ばれた。また、*CHEMINAS39* においても優秀発表賞を受賞した。大型放射光施設での電流計測実験については、研究課題発案当時と観測位置が変更されたため、電磁波遮蔽システムを用いて、1 分子電流計測に必要な、pA レベルの電流計測が可能であることを確認した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 宮崎貴史, 平井義和, 亀井謙一郎, 土屋智由, 田畑修	4. 巻 141-E
2. 論文標題 経上皮電気抵抗測定の高精度化に向けたOrgan-on-a-Chipの設計法	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 電気学会論文誌E (センサ・マイクロマシン部門誌)	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Mita K, Sumikama T, Iwamoto M, Matsuki Y, Shigemi K, Oiki S	4. 巻 118
2. 論文標題 Conductance Selectivity of Na <sup>+</sup> Across the K <sup>+</sup> Channel via Na <sup>+</sup> Trapped in a Tortuous Trajectory	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.	6. 最初と最後の頁 e2017168118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2017168118	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, Oiki S	4. 巻 1
2. 論文標題 Hysteresis of a Tension-Sensitive K <sup>+</sup> Channel Revealed by Time-Lapse Tension Measurements	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JACS Au	6. 最初と最後の頁 467-474
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacsau.0c00098	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 Yano K, Iwamoto M, Koshiji T, Oiki S	4. 巻 627
2. 論文標題 Visualizing the Osmotic Water Permeability of a Lipid Bilayer under Measured Bilayer Tension Using a Moving Membrane Method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Membr. Sci.	6. 最初と最後の頁 119231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.memsci.2021.119231	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 Shimizu Hirofumi	4. 巻 1864
2. 論文標題 Diffracted X-ray tracking method for recording single-molecule protein motions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2019.05.004	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 I. Yamauchi, T. Tabuchi, Y. Hirai, M. Iwamoto, T. Tsuchiya, H. Shimizu, O. Tabata,	4. 巻 43411
2. 論文標題 Diffracted X-Ray Tracking Method for Recording Single-Molecule Protein Motions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc. TRANSDUCERS & EUROSENSORS XXXIII	6. 最初と最後の頁 25-28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1109/TRANSDUCERS.2019.8808206	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 Urakubo K, Iwamoto M, Oiki S	4. 巻 621
2. 論文標題 Drop-in-well chamber for the droplet interface bilayer with built-in electrodes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods Enzymol.	6. 最初と最後の頁 231-244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.mie.2019.02.012	査読の有無 無
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, Oiki S	4. 巻 621
2. 論文標題 In bulla channel synthesis and functional expression mimicking bacterial synthesis system	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods Enzymol.	6. 最初と最後の頁 347-363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.mie.2019.02.011	査読の有無 無
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 Y. Hirai, Y. Mori, T. Tabuchi, H. Shimizu, T. Tsuchiya, O. Tabata	4. 巻 2
2. 論文標題 Microchannel Fabrication Using a Photo-Patternable Adhesive Material for Recording Conformational Changes of KcsA Channel with the Diffracted X-ray Tracking Method	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings	6. 最初と最後の頁 972
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/proceedings2130972	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, 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 無
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 Maki-Yonekura S, Matsuoka R, Yamashita Y, Shimizu H, Tanaka M, Iwabuki F, Yonekura K.	4. 巻 17;7
2. 論文標題 'Hexameric and pentameric complexes of the ExbBD energizer in the Ton system'	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e35419
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.35419	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 Z. Ma, Y. Huang, S. Park, K. Kawai, D.-N. Kim, Y. Hirai, T. Tsuchiya, H. Yamada	4. 巻 14
2. 論文標題 Rhombic-Shaped Nanostructures and Mechanical Properties of 2D DNA Origami Constructed with Different Crossover/Nick Designs	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Small	6. 最初と最後の頁 1702028
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/smll.201702028	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、Oiki Shigetoshi	4. 巻 115
2. 論文標題 Constitutive boost of a K+ channel via inherent bilayer tension and a unique tension-dependent modality	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	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) 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 Takazaki Hiroko、Shimizu Hirofumi、Yasunaga Takuo	4. 巻 67
2. 論文標題 PB-07Structural Analysis of KcsA by Cryo-EM Single Particle Analysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 i35 ~ i35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmicro/dfy096	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 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 清水啓史
2. 発表標題 イオンチャネル構造遷移過程のX線1分子動画計測
3. 学会等名 生理研研究会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水啓史
2. 発表標題 X線1分子動態計測法の開発
3. 学会等名 第67回中部生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名	Shimizu Hirofumi, Kobayashi Takuya, Iwamoto Masayuki, Kajiwara Kentaro, Kurebayashi Nagomi, Ogawa Haruo, Murayama Takashi
2. 発表標題	Single-Molecule Fluctuations and Conformational Changes of the Human Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) Channel Recorded using Diffracted X-ray Tracking
3. 学会等名	第97回日本生理学会大会
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	Hirofumi Shimizu, Takuya Kobayashi, Masayuki Iwamoto, Kentaro Kajiwara, Nagomi Kurebayashi, Haruo Ogawa, Takashi Murayama.
2. 発表標題	SINGLE-MOLECULE TWISTING MOTIONS DURING GATING OF THE HUMAN TRPV1 CHANNEL RECORDED WITH SUB-MILLISECOND TIME RESOLUTION.
3. 学会等名	64th Annual Meeting of Biophysical Society (国際学会)
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	Yoshikazu Hirai
2. 発表標題	" Microfabricated Observation Chamber for Diffracted X-ray Tracking Method to Capture Ion-Channel Gating Motion at Time-Lapse Images "
3. 学会等名	The 13th IEEE International Conference on Nano/Molecular Medicine and Engineering (IEEE-NANOMED 2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Hiroko Takasaki, Hirofumi Shimizu, Takuo Yasunaga
2. 発表標題	Structural Analysis of KcsA by Cryo-EM Single Particle Analysis.
3. 学会等名	The 57th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan
4. 発表年	2019年



1. 発表者名 Hiroko Takazaki, Hirofumi Shimizu, Takuo Yasunaga.
2. 発表標題 Structural analysis of KcsA potassium channel by Cryo-EM.
3. 学会等名 日本顕微鏡学会生体解析分科会 Frontiers in Cellular, Viral and Molecular Microscopy with Cryo-specimen Preparation Techniques (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高崎寛子, 清水啓史, 安永卓生.
2. 発表標題 「クライオ電子顕微鏡単粒子解析法を用いたKcsAの構造解析。」
3. 学会等名 第61回日本顕微鏡学会九州支部集合・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山内一慶, 田淵友樹, 平井義和, 岩本真幸, 土屋智由, 清水啓史, 田畑修,
2. 発表標題 “ シリコン窒化膜を用いたX線一分子動態計測用溶液チャンバの開発 ”
3. 学会等名 第80回 応用物理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水啓史
2. 発表標題 「X線1分子動態計測法に適する新たなターゲット分子の探索」
3. 学会等名 第4回イオンチャネル研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ikkei Yamauchi, Tomoki Tabuchi, Yoshikazu Hirai, Masayuki Iwamoto, Toshiyuki Tsuchiya, Hirofumi Shimizu, and Osamu Tabata
2. 発表標題 Microfabricated Solution Chamber for High Resolution Diffracted X-ray Tracking Method to Observe Ion Channel Gating Motion
3. 学会等名 Transducers 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山内一慶, 田淵友樹, 平井義和, 岩本真幸, 土屋智由, 清水啓史, 田畑修
2. 発表標題 「イオンチャネルの開閉機構観察のための高解像度X線一分子動態計測用溶液チャンバの開発」
3. 学会等名 CHEMINAS39 化学とマイクロ・ナノシステム学会第39回研究会, 化学とマイクロ・ナノシステム学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirofumi Shimizu, Masayuki Iwamoto, Kentaro Kajiwara, Yoshikazu Hirai, Osamu Tabata
2. 発表標題 Method to Record Single-Molecule Fluctuations and Conformational Changes in Proteins
3. 学会等名 9th FAOPS CONGRESS (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshikazu Hirai, Yasuaki Mori, Tomoki Tabuchi, Hirofumi Shimizu, Toshiyuki Tsuchiya, Osamu Tabata,
2. 発表標題 Microchannel Fabrication using a Photo Patternable Adhesive Material for Recording Conformational Changes of KcsA Channel with the Diffracted X-ray Tracking Method
3. 学会等名 The EUROSENSORS 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroko Takazaki, Hirofumi Shimizu, Kaoru Mitsuoka, Takuo Yasunaga
2. 発表標題 Structural Analysis of KcsA by Cryo-EM Single Particle Analysis
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

福井大学統合生理学 <a href="https://www.med.u-fukui.ac.jp/laboratory/integrative/">https://www.med.u-fukui.ac.jp/laboratory/integrative/</a>
--

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)	
研究分担者	平井 義和  (Hirai Yoshikazu)  (40452271)	京都大学・工学研究科・助教   (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------