

## 自己評価報告書

平成 23 年 3 月 31日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究 (S)

研究期間：2008～2012

課題番号：20679002

研究課題名 (和文)

電場と動態：膜電位存在下での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) Simultaneous recording of conformational changes and ionic currents of single-molecular ion channels reveals the relationship between membrane potentials and motions of the channels

研究代表者

清水 啓史 (SHIMIZU HIROFUMI) 福井大学・医学部・講師

研究者番号：50324158

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：生体膜・チャネル・1分子計測・放射線

## 1. 研究計画の概要

生体内で重要な働きをしている膜蛋白質は細胞膜または細胞内小器官にあって常に膜内外にかかる膜電位、およびその変動の影響をうけている。この生理的な状態で膜蛋白質が機能する際にどのように動いているのか。それを1分子で調べるための測定システムを確立することを目指す。具体的には、イオンチャネルを用いた1分子電流と1分子構造変化の同時計測システムの実現を目指す。

## 2. 研究の進捗状況

同時計測システムの構築のため下記のテーマに順次取り組んでいる。

## (1) 高速度測定の実現

従来の計測システムは、1秒間に30枚の画像を取得するシステムでした (33 ms/1枚)。

新たに高速撮像システムを導入し、1秒間に5000枚の画像を取得することが可能になりました (0.2 ms/1枚)。この速度は1分子電流計測でよく使われる観測速度 (5000点/秒) と同じ観測速度であり、1分子の電流と「動き」を同じ時間スケールで計測できることは同時計測への重要な進歩です。

## (2) 高速度測定と広範囲測定との両立

蛋白質の運動を広い範囲にわたって記録・追跡するためには、輝度が高くなおかつ広いエネルギー範囲を持つ白色X線が必要である。本研究では「X線スペクトルをデザインする」ことでこれを実現し、イオンチャネル蛋白質の動きを高速度で広範囲の計測をすることに成功しました。

## (3) 2溶液置換観測チャンバーの開発

蛋白質はその周囲の溶液条件によって機能や動きが変わります。その変化を計測するため、観測中に蛋白質の周囲の溶液条件を変え、その運動応答を計測するシステムの開発に取り組みました。

微小流路を設計し、微小ポンプと流量センサを利用してフィードバック制御することにより、より精密に流路中を流れる溶液の流量を制御します。2溶液の流量を制御することによって、観測領域中の溶液をAからBへと変化させられる溶液置換チャンバーの開発に成功しました。

## (4) 光トリガー動態計測システムの開発

光を受けると分子についている「かご」が外れる光分解化合物を利用すると、蛋白質の機能に重要な小分子の蛋白質の「動き」に対する影響を光をトリガーにして測定できます。

光の照射条件やサンプル位置の集光システム、x線照射やカメラ記録とのタイミングの調整といった様々な課題を解決し、光でイオンチャネル蛋白質の構造変化を開始することに成功しました。

## 3. 現在までの達成度

## ①当初の計画以上に進展している

(理由)

困難と思われた課題をすでに克服し、海外の研究者を含む協力者を得て、予想外に大きく研究が進展し、当初予想していなかった思わぬよい成果につながっている。

(1) 観測光であるX線スペクトルの最適化 ESRF に研究協力者を得て、「研究遂行に最

適なスペクトルをデザインする」という当初全く考えていなかったことが可能となった。これは、広範囲の動きを計測できるようにするだけでなく、従来の実験では無視できなかった蛋白質に対する X 線照射損傷について、計測ができないほど非常に小さくすることを可能にした。

#### (2) 光トリガー観測システムの確立

当初予定していなかったが、溶液置換チャンパー作製の際に浮上した問題点の解決へ向けた取り組みが生んだ。このシステムにより、従来 平衡状態の観測であったために観測点とイオンチャネルの構造との対応をつけるのが困難であった問題が解決し、KcsA イオンチャネルについて運動開始点を閉状態とし、光トリガーによって閉状態から開状態への遷移を計測することが可能になった。

また同時に、この計測システムの確立は原理的に様々な他の蛋白質の動態計測へ応用がすでに可能になったことを意味している。

#### (3) 高速度測定の実現

1 分子測定に必要な光量を確保しながら高速度測定を行うには感度の高い計測システムが必要であり、困難が予想された。しかし高輝度ビームラインと高感度計測システムの導入により、電流計測と同等の計測速度で 1 分子の動きを計測することに成功した。

#### 4. 今後の研究の推進方策

これまでに得られた知見を元に 1 分子電流と動きの同時計測システムの開発に取り組みます。観測チャンパーを構成する素材や流路設計、微小流路を流れる溶液の制御についての知見が蓄積しており、研究期間内に観測システムの構築が実現すると考えています。

また、観測システムの X 線スペクトルは計測に最適化されており、同時計測システム開発の際に有用な光トリガー計測システムの開発に成功しており、課題実現へ向けた視界は良好です。

#### 5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Shigetoshi Oiki, Hirofumi Shimizu, Masayuki Iwamoto and Takashi Konno : Single Molecular Gating Dynamics for the KcsA Potassium Channel. *Advances in Chemical Physics* Volume 146 in press 無

[学会発表] (計 20 件)

① Hirofumi Shimizu (Invited) ‘Recordings of Gating Motions of the KcsA Potassium Channels in a Single Molecule Level’ “New Developments in Time-Resolved Studies with Synchrotron Radiation” Structural Dynamics Workshop of the ESRF Users’ Meeting, (Grenoble, France, 7-9 Feb 2011.)

② Hirofumi Shimizu ‘Gating motions of KcsA potassium channel detected as a movie’ Symposium of Molecular Ensemble 2009, Dec7-9 2009, Wako, Saitama, Invited speaker

③ Hirofumi Shimizu, Masayuki Iwamoto, Takashi Konno, Reo Sakakura, Yoshimitsu Aoki, Shigetoshi Oiki: Conformational Changes of Single-Molecular KcsA Potassium Channels during Gating Recorded in a Sub-Millisecond Time Resolution. The 47th annual meeting of the Biophysical Society Japan, 2009 10/30-11/1, Tokushima

④ Hirofumi Shimizu, Masayuki Iwamoto, Amiko Nihei, Takashi Konno, Yuji C. Sasaki, Shigetoshi Oiki: “Global Twisting Motion of Single Molecular KcsA Potassium Channel Upon Gating.” *New Approaches to Complexity of Protein Dynamics by Single Molecule Measurements : Experiments and Theories* 2008 12/7-9 Osaka Gold Poster Award 受賞

⑤ Hirofumi Shimizu, Masayuki Iwamoto, Amiko Nihei, Takashi Konno, Yuji C. Sasaki, Shigetoshi Oiki: Visualization of conformational changes of single molecular KcsA potassium channels revealed global twisting motions upon gating. The 46th annual meeting of the Biophysical Society Japan, 2008 12/3-5, Fukuoka

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

2010 年文部科学大臣表彰若手科学者賞受賞  
清水啓史 「イオンチャネル開閉構造変化の X 線 1 分子計測についての研究」