

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 1 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究（S）

研究期間：2008～2011

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

研究成果の概要（和文）：イオンチャネル蛋白質の機能と構造変化の1分子同時計測を実現するため、X線1分子動態計測法の開発に取り組みました。その結果、高速観測システムの導入、溶液置換観測チャンバーの開発、照射X線スペクトルの最適化、画像データ解析プログラムの開発に成功し、1分子同時計測システムを構成する要素技術を確立しました。

研究成果の概要（英文）：We developed the Diffracted X-ray Tracking method for targeting the simultaneous recordings of conformational changes and ionic currents in a single ion channel molecule. As a result of this research project we established some essential technologies for the recordings: a high-speed data recording, a fluid exchangeable recording chamber, optimized x-ray spectrum, and an image data analyzing program.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|------------|------------|
| 2008年度 | 35,800,000 | 10,740,000 | 46,540,000 |
| 2009年度 | 8,500,000 | 2,550,000 | 11,050,000 |
| 2010年度 | 8,600,000 | 2,580,000 | 11,180,000 |
| 2011年度 | 8,600,000 | 2,580,000 | 11,180,000 |
| 年度 | | | |
| 総計 | 61,500,000 | 18,450,000 | 79,950,000 |

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・トランスポーター・能動輸送

1. 研究開始当初の背景

私達の研究グループは、イオンチャネル蛋白質の1種であるKcsAカリウムイオンチャネル蛋白質が機能する際に大きくねじれる様子をX線1分子動態計測法を用いて、1分子で動画計測することに成功しました（H.Shimizu *et.al.* (2008) *Cell* 132 67-78）。この計測法では金ナノ粒子をイオンチャネル蛋白質にとりつけ、その動きをナノ粒子のX線回折像として動画追跡します。X線回折像を利用するため小さな動きでも捉えられる特徴がありました。世界の研究の潮流として

脂質膜中に存在する膜蛋白質の立体構造が次々に明らかになっており、機能する際の蛋白質の「動き」を計測する重要性が高まっていました。

2. 研究の目的

X線1分子計測法を発展させ、イオンチャネル分子を流れる1分子電流と、1分子の動きを同時に計測できる観測システムを開発することにより、蛋白質分子の機能と動き（構造変化）の相関を調べることを可能にする計測システムを確立することを目的としています。

3. 研究の方法

イオンチャネル蛋白質に金ナノ粒子を取り付け、大型放射光施設 (SPring8 など) を利用して高輝度白色 X 線を照射し、金結晶からの回折点を X 線検出 2 次元カメラシステムで動画撮影します。1 分子電流との同時計測システムを開発するには、高速観測システムの開発、観測チャンパー開発、照射 X 線スペクトルの最適化、画像解析プログラムの開発といった課題があります。

高速観測システムの開発：従来法ではビデオレート (30 フレーム/秒) の観測速度でした。高速観測を可能にするために、様々な X 線観測カメラシステムを検討しました。

観測チャンパー開発：X 線 1 分子計測システムでは、蛋白質の機能測定に必要な水溶液層や観測チャンパー自体がバックグラウンドノイズの原因となります。同時計測システムを確立するためには、溶液置換が可能なシステム開発、溶液条件を観測中に変えられるシステムの開発が必要でした。素材検討、流路設計を行い、X 線のバックグラウンドノイズに対する影響を観測しました。

照射 X 線スペクトルの最適化：照射 X 線のスペクトル幅はそのまま蛋白質の運動の観測範囲を決定します。できるだけ広い観測範囲を持ちながら高速観測が可能なスペクトルを求めて、各国の複数のビームラインを試験的に利用しました。

画像解析プログラムの開発：高速観測システムの樹立によって、データ量が飛躍的に増大したため、その画像解析プログラムの開発が必要となりました。共同研究を含めて各種アルゴリズムの検討を行いました。

4. 研究成果

機能と構造変化の同時計測システムの開発に関する課題に対して下記の成果を上げました。また、研究の進展が評価され、本研究課題は計画時の最終年度を待たずに基盤 A の研究課題として採択され、継続して実施されています。

(1) 従来法はビデオレート (30 フレーム/秒; 33 ミリ秒/1 フレーム) の観測速度であり、蛋白質の構造変化計測を行うには時間分解能が足りないことが示唆されていた。同時計測システム開発において最初の関門である観測速度の高速化に取り組んだ。新たな観測システムの導入により、1 分子電流計測と同等の観測速度である、1 ミリ秒以下の観測速度を実現しました。イオンチャネルの 1 分子動態計測の業績により、2010 年文部科学大臣表彰若手科学者賞を受賞しました。

(2) 1 分子電流・動態同時計測チャンパーの開発には、放射光 X 線によるバックグラウンドノイズの原因とならない素材を用いて、流路を最大限に薄くする必要がありました。また、微小流路中の流体制御も必要であったため、要素技術確立のため、2 溶液置換チャンパー開発を行い、高速で 2 溶液が置換可能な溶液置換チャンパーの開発に成功しました。

(3) 観測に最適な白色 X 線を求めて各国の放射光施設を調べ、試験利用して最適なビームラインを探しました。ヨーロッパ放射光施設 (ESRF) で、ビームラインが通常提供している X 線ではなく本手法に最適化した X 線スペクトルを現地研究者とともに創ることに成功しました。

(4) 1 分子電流・動態同時計測システムを電位依存性チャネルだけでなくリガンド依存性チャネルを含む多くの膜蛋白質に適応可能なシステムとするためには開閉の開始を光で制御し、観測中に任意のタイミングで開閉を開始できるシステムが必要でした。レーザー光で光分解化合物を分解することによってイオンチャネルの開閉を開始するシステム開発にヨーロッパ放射光施設で成功しました。

(5) 1 ミリ秒以下で 1 フレーム記録できる高速度測定によって得られる大量の画像データをいかに解析するかが一つの大きな課題でした。3 年にわたって様々なアルゴリズムを開発、検討した結果、観測データの自動解析プログラムの開発に成功しました。本解析プログラムは 1 分子・動態同時計測システムにおいて必要不可欠であり、重要な要素技術が確立しました。

5. 主な発表論文等

(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 10 件)

1. A. Yamakata, H. Shimizu, M. Osawa, S. Oiki: Structural changes of the KcsA potassium channel upon application of the electrode potential studied by surface-enhanced IR absorption spectroscopy. (2013) Chemical Physics, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphys.2013.02.035> 査読あり

2. Y. Furutani, H. Shimizu, Y. Asai, T. Fukuda, S. Oiki, H. Kandori: ATR-FTIR spectroscopy revealing the different vibrational modes of the selectivity filter interacting with K⁺ and Na⁺ in the open and collapsed conformations of the KcsA potassium channel (2012) Journal of

Physical Chemistry Letter 3 3806-3810
査読あり

3. H. Shimizu, M. Iwamoto, T. Konno, A. Royant, D. Setten, L. Guerin, M. Wulff, S. Oiki: Laser-Triggered Single Molecular Gating Motions of the KcsA Potassium Channels Recorded in a Sub-Millisecond Time Resolution. *Biophys. J.* 102 (2012) 37a 査読なし

4. Shigetoshi Oiki, Hirofumi Shimizu, Masayuki Iwamoto and Takashi Konno: 'Single Molecular Gating Dynamics for the KcsA Potassium Channel' *Advances in Chemical Physics Volume 146* (2011) 147-194 査読あり

5. Iwamoto, M., Shimizu, H., Muramatsu, I., Oiki, S.: A cytotoxic peptide from a marine sponge exhibits ion channel activity through vectorial-insertion into the membrane *FEBS Lett* (2010) 584 3995-9 査読あり

6. 清水啓史

X線1分子計測法に適合するマイクロ流路測定装置の開発 福井大学重点研究成果集・明日への挑戦 (2010) 30-31 査読なし

7. Shimizu, H., Iwamoto, M., Konno, T., Nihei, A., Sasaki, Y. C., Oiki, S.: Global Twisting Motions during Gating in KcsA Potassium Channels. (2009) *Journal of Physiological Sciences* 59 256-256 査読なし

8. Myokai, T., Ryu, S., Shimizu, H., Oiki, S.: Topological mapping of the asymmetric drug binding to the human ether-à-go-go-related gene product (HERG) potassium channel by use of tandem dimers. (2008) *73(6):1643-51* 査読あり

9. 老木成稔, 安藤博之, 久野みゆき, 清水啓史, 岩本真幸 “Kチャンネルのイオン透過機構: 新しい流動電位測定法により明らかになったイオン-水流束比” *生物物理* 48 246-252, 2008 査読なし

10. Hirofumi Shimizu, Masayuki Iwamoto, Yuji C. Sasaki, Shigetoshi Oiki “Twisting Conformational Changes of Single KcsA Potassium Channel upon Gating using Diffracted X-ray Tracking” *Research Frontiers* 2007, 42-43, 2008 査読なし

[学会発表] (計 21 件)

1. 清水啓史

イオンチャンネル開閉構造変化のX線1分子動画計測 一分子揺らぎと構造変化の相関の解明を目指して— 日本物理学会第 68 回年次大会 シンポジウム「タンパク質の動きを解

き明かす—分子計測の最前線」(招待講演)
2013年03月26日~29日 広島

2. Hirofumi Shimizu

Development of a method for recording single molecular gating dynamics of KcsA potassium channel in a sub-millisecond time resolution

Nagoya Symposium *Frontiers in Structural Physiology* Jan. 22-24, 2013 Nagoya

3. 清水啓史

KcsA カリウムイオンチャンネルの溶液条件変化応答 1 分子開閉ダイナミクスの解析 第 50 回日本生物物理学会年会, シンポジウム「先端顕微計測が照らす生命の輝き」2012年09月22日~24日 名古屋

4. 老木成稔, 岩本真幸, 炭竈享司, 清水啓史 カリウムチャンネルの選択透過性とゲーティング 平成 24 年度生理学研究所研究会「膜機能分子の機能・構造ゆらぎの時空間スペクトル解析」2012年09月06日~7日

5. 清水啓史

サブミリ秒時間スケールでの KcsA カリウムイオンチャンネル開閉構造変化の 1 分子動画計測 第 12 回日本蛋白質科学会年会, シンポジウム「YouTube 時代の構造生物学」2012年6月12日~14日 (招待講演)

6. H. Shimizu, M. Iwamoto, T. Konno, A. Royant, D. Setten, L. Guerin, M. Wulff, S. Oiki: Laser-Triggered Single Molecular Gating Motions of the KcsA Potassium Channels Recorded in a Sub-Millisecond Time Resolution

Biophysical Society 56th Annual Meeting, 2012.2, San Diego (USA)

7. 清水啓史, 岩本真幸, 今野卓, Antoine Royant, David Von Stetten, Laurent Guerin, Michael Wulff, 老木成稔 「X線1分子計測法によるカリウムイオンチャンネルの1分子ダイナミクスの計測」第49回日本生物物理学会年会「膜蛋白質の構造変化を研究するための新しい実験ツール」シンポジウム 2011年9月16-18日 兵庫 (招待講演)

8. 清水啓史「X線1分子計測法によるイオンチャンネル開閉構造変化の計測」新学術領域研究「過渡的複合体」公開シンポジウム 2011年7月21日東京大学 (招待講演)

9. 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.)*

10. Hirofumi Shimizu (Invited) ‘Gating Motions of KcsA Potassium Channel Measured in a Single Molecule by

Diffraction X-ray Tracking Method'
Institute of Physics University of Rennes
(Rennes, France, 14 Dec 2010)

11. Hirofumi Shimizu (Invited) 'Gating motions of KcsA potassium channel detected in a single molecule' Institut de Biologie Structurale (Grenoble, France, 23 Sep 2010)

12. Hirofumi Shimizu
'Conformational changes of KcsA potassium channel during gating detected in a single molecule' Scientific Highlights of Soft Matter Science Day (Sassenage, France, 15 Sep 2010)

13. Hirofumi Shimizu 'Global Twisting Motions of KcsA Potassium Channels upon Gating' PSB Carl-Ivar Brändén building (Grenoble, France, 7 July 2010)

14. Hirofumi Shimizu 'Gating motions of KcsA potassium channel detected as a movie' Symposium of Molecular Ensemble 2009, Dec7-9 2009, Wako, Saitama, (Invited)

15. 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

16. 清水啓史、岩本真幸、今野卓、老木成稔
「KcsA カリウムイオンチャネルの構造ダイナミクス研究の現状」第7回ミニ公開シンポジウム「イオンチャネルの構造ダイナミクス II」2009年8月31日—9月1日福井

17. 清水啓史「イオンチャネル開閉構造変化の X 線 1 分子動画計測」

第 261 回触媒化学研究センター談話会
2009年8月3日 北海道大学 (招待講演)

18. 清水啓史「KcsA カリウムイオンチャネル開閉ねじれ運動の X 線 1 分子計測」第6回ミニ公開シンポジウム「表面・界面を観る非線形分光の新しい展開」2009年3月23日—24日 埼玉 和光 (招待講演)

19. Hirofumi Shimizu, Masayuki Iwamoto, Takashi Konno, Amiko Nihei, 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

20. 清水啓史「KcsA カリウムイオンチャネルの構造ダイナミクス」
第2回ミニ公開シンポジウム「イオンチャネルの構造ダイナミクス」

2008年7月9日 福井

21. 清水啓史「イオンチャネル開閉ねじれ運動の1分子動画計測」第26回 ナノ・バイオテクノロジー研究会 2008年6月19日 名古屋工業大学(招待講演)

[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」

清水啓史 「チャネル分子のねじれがイオンの通り道を開閉する」サイエンスピクセス 60 日本生理学会 Web Site 2008/4/13

6. 研究組織

(1) 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