

## 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 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21550079

研究課題名（和文） イオンチャネルを介した膜透過についての新規解析法の構築

研究課題名（英文） New analytical method on channel transports across bilayer lipid membranes

研究代表者

白井 理（SHIRAI OSAMU）

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：40355011

研究成果の概要（和文）：物質収支と電気的中性の原理を念頭において、平面脂質二分子膜を介したイオン透過についての新規解析法の構築を試みた。イオンチャネルが働く際には透過対象イオンについてだけでなく、共存するイオンの対向輸送および共輸送も考慮しなければいけない。本研究によって、チャネルでのイオン透過特性はイオンサイズ（水和イオン）とチャネル孔径の関係だけでは決まらず、透過イオン及び共存イオンの BLM 内あるいはチャネル孔内への分配特性の寄与も大きく、両者を考慮した解析が必要であることが判明した。

研究成果の概要（英文）：New analytical method on channel transports across bilayer lipid membranes was proposed by considering mass balance and electroneutrality. When the ion channel serves in the membrane, not only the transport of the target ion but also those of coexisting ions should be evaluated. The ion-transport property was not controlled by only the relation between the ion size and the pore-size of the ion channel. It was proved that the distribution coefficients of both the target ion and the counter ion and their diffusion coefficients within the membrane were important factors.

交付決定額

（金額単位：円）

|         | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2009 年度 | 1,700,000 | 510,000   | 2,210,000 |
| 2010 年度 | 1,400,000 | 420,000   | 1,820,000 |
| 2011 年度 | 700,000   | 210,000   | 910,000   |
| 年度      |           |           |           |
| 年度      |           |           |           |
| 総計      | 3,800,000 | 1,140,000 | 4,940,000 |

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学 4701

キーワード：状態分析

## 1. 研究開始当初の背景

細胞膜は、細胞内環境を維持するだけでなく、呼吸・代謝などの酸化還元による電子移動と共役して多くのイオンや物質の取込・排出を制御している。細胞膜を介したイオン透過において重要な役割を担うものとして、①疎水性イオン、②キャリア化合物および③イ

オンチャネル・ポンプがあり、生体機能発現に関しては特にイオンチャネル・ポンプの役割に興味を持たれてきた。従来はチャネル蛋白質と親和性が高いイオンのみが膜を透過するとされてきたが、電気的中性の原理や膜内外での物質収支を考慮すると単一イオンだけの移動では説明ができない。よって、対

イオンの移動や他のイオン移動系・電子移動系との共役を常に考慮する必要があるが、そのような研究例はこれまでほとんどなかった。

申請者はこれまで、①疎水性イオン、②キャリア化合物及び③チャンネル形成ペプチドを添加した際の脂質二分子膜を介したイオン透過について電気化学的な視点から研究し、対イオンの役割を考慮して解析を行ってきた。疎水性イオンを水相に添加した場合は、共存する親水性イオンが対イオンとして膜内に分配し、疎水性イオンだけでなく親水性の対イオンも同時に移動することを明らかにした。同様にして、代表的なキャリア化合物であるバリノマイシンを用いて、キャリアによるイオンの膜透過は、キャリア化合物と錯形成するイオンが対イオンと共に膜内に分配し、膜電位印加に伴って両イオンが同時に互いに逆向きに移動していることを解明した。さらに、チャンネル形成ペプチドであるグラミシジン A チャンネルは水素イオンやアルカリ金属イオンを選択的に透過すると考えられてきたが、対イオンによってもイオン透過電流の大きさが変化することを見出した。以上のように、チャンネルによるイオン透過においても対イオンが何らかの関与をしていると予測していた。

## 2. 研究の目的

グラミシジン A、アンホテリシン B などのチャンネル形成ペプチドを用いて、単一チャンネルに関する電流の電位依存特性、透過イオン選択性、開確率（チャンネルが開いている割合）を評価する。このとき、対イオンを含む共存イオンの影響も評価する。本研究では、単一チャンネルの開閉挙動とともに多チャンネル系での測定も同時に行うので、マクロな熱力学データを基にしたチャンネル開閉機構の解明が期待できる。また、本研究で用いる平面膜型のセルは、水相のイオン組成を自由に変えられるので、透過イオン選択性、対イオンを含む共存イオンの影響、阻害剤および抗体の添加効果などの研究が容易に行えるという特徴がある。これまでイオンチャンネルはさまざまな細胞系で発現され、パッチクランプ法でチャンネル活性が確認されてきた。しかし、用いた細胞によって、単一チャンネル電流の大きさ、開確率および電位依存性が異なることがしばしば報告されている。これは、それぞれの測定系における水相のイオン組成が異なることにもよるが、他のチャンネル蛋白質、膜構成脂質、チャンネル蛋白質を可溶化する際に用いる界面活性剤の影響が大きいと考えられる。平面脂質二分子膜法は、これらの影響を最小限に抑えられると同時に膜

構成脂質の種類・比率を自由に調製でき、界面活性剤の影響も評価できる測定法であるので最大限活用して特性の評価を行う。

チャンネルによるイオン透過は、透過イオンと考えられてきたものだけでなく、電気的中性の原理を念頭において、対イオンを含む共存イオンの影響を考えなければならない。従来は、イオン透過性の評価に透過係数が用いられてきたが、透過係数は分配係数と拡散係数を含むので、それを念頭に置いた解析が必要となる。イオン対の分配係数は両イオン（カチオンおよびアニオン）の二相間移行エネルギーによって表現されるが、脂質二分子膜や生体膜では実測できないので水和エネルギーを換わりに用いることを想定している。一般的に水和エネルギーは表面電荷密度（イオン半径と電荷数から見積もられる）に依存し、一価のイオンであればほぼイオン半径の二乗に反比例して小さくなる。また、拡散係数は一般的に小さなイオンの方が大きな値を示し、チャンネル孔より大きなイオンはほとんど透過できない。本研究は、常に電気的中性の原理を念頭において、イオン対の膜内（チャンネル孔を含む）への分配過程（界面移動）と膜内輸送過程を分けて評価するので、チャンネルを介した透過機構の詳細な解明が期待される。

## 3. 研究の方法

1 個または少数個のチャンネルのみが存在する系で、単一チャンネル電流の電位依存特性、開確率の電位依存特性、透過イオン選択性、対イオンを含めた共存イオンの影響、阻害剤および抗体の反応機構など、各種イオンチャンネルの電気生理学的な機能を電気的中性の原理に基づいて解明する。

多数のチャンネルを含む平面脂質二分子膜（多チャンネル系）を介した 2 水相間の電位差-電流の関係、膜電位印加時の電流の時間変化などを測定し、特性を評価する。また、平面膜型のセルでは水相のイオン組成を自由に変えられるので、透過イオン選択性、対イオンを含む共存イオンの影響、阻害剤の添加効果などについても検討する。単一チャンネル電流の大きさと開確率の評価から、多チャンネル系でのイオン透過挙動が説明できるか検討する。その際、それぞれの開孔時の持続時間とその分布などについても検討を行い、各種チャンネルのミクロな特性を調べる。このとき、透過イオン選択性、共存イオンの影響、阻害剤の添加効果なども評価する。

(1) グラミシジン A を含む平面脂質二分子膜を介したイオン透過

二分子で一つのチャンネル（直径約 4 Å）

を形成するグラミシジン A (GA) を平面脂質二分子膜に添加し、GA によるイオンの膜輸送に及ぼす対イオンの影響を明らかにする。少数個の GA チャンネルが存在する系で、膜電位印加時の単一チャンネル電流の大きさと開確率を評価し、透過イオン選択性、共存イオンの影響、阻害剤の添加効果などを評価する。その際、それぞれの開孔時の持続時間とその分布などについても検討を行う。多数のチャンネルを含む平面脂質二分子膜を介した 2 水相間の電位差-電流の関係、電位印加時の電流の時間変化などから多チャンネル系でのイオン透過特性を評価する。それと単一チャンネル系での結果を比較することにより、チャンネルの開閉機構や電位依存特性を議論する。

#### (2) アンホテリシン B を含む平面脂質二分子膜を介したイオンの透過

GA より大きなチャンネル孔を形成するアンホテリシン B (AB) を平面脂質二分子膜に添加し、AB によるイオンの膜輸送に及ぼす対イオンの影響を明らかにする。少数個の AB チャンネルが存在する系で、膜電位印加時の単一チャンネル電流の大きさと開確率を評価し、透過イオン選択性、共存イオンの影響、阻害剤の添加効果などを評価する。その際、それぞれの開孔時の持続時間とその分布などについても検討を行う。多数のチャンネルを含む平面脂質二分子膜を介した 2 水相間の電位差-電流の関係、電位印加時の電流の時間変化などを測定から多チャンネル系でのイオン透過特性を評価する。それと単一チャンネル系での結果を比較検討することにより、チャンネルの開閉機構や電位依存特性を議論する。

#### 4. 研究成果

二分子で一つのイオンチャンネル (孔径約 4 Å) を形成するグラミシジン A (GA) を平面脂質二分子膜系に添加し、GA チャンネルによるイオンの膜輸送について検討した。水相中の電解質の種類を換えて、少数個の GA チャンネルが存在する脂質二分子膜系で、膜電位印加時の単一チャンネル電流の大きさについて統計学的に評価した。

図 1 には、0.1 M の電解質溶液を用いた際の単一チャンネル電流の大きさ (120 mV 印加時) を示した。カチオン種を換えた場合には塩化物イオンをアニオンとして用い、アニオン種を換えた場合にはカリウムイオンをカチオンとして用いた。カチオンの透過選択性については、Rb<sup>+</sup> まではイオン半径が大きいほど透過しやすく、それより大きなイオンは孔を塞いでしまうため流れにくくなるこ

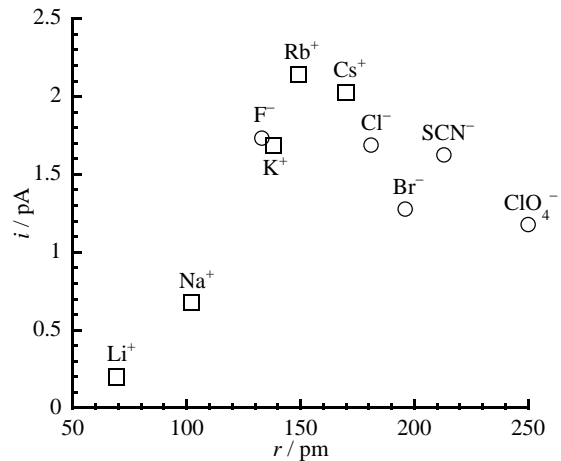


図 1. 結晶イオン半径と単一チャンネル電流の関係

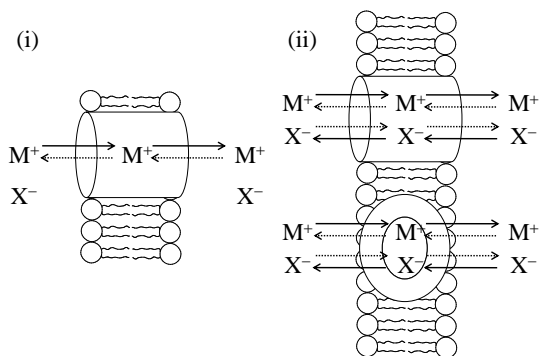


図 2. グラムシジンチャンネルでのイオン透過機構  
(i)従来のモデル、(ii)今回提案したモデル

とが分かった。また、アニオンもイオン半径が大きいほど透過しにくいことが判明した。2 水相の電解質濃度を非対称にしてゼロ電流電位を測定することでアニオンとカチオンの透過係数の比を評価できることを見出し、その評価を行った。その結果、従来 GA チャンネルはカチオン選択性と言われてきたが、アニオンも膜電位印加時にカチオンの移動とは逆方向へカチオンの 1 割程度であるが移動することを明らかにした (図 2)。ところで、GA はチャンネルとしてだけでなく、キャリア型のイオン輸送も行うことも明らかにした。

アンホテリシン B (AmpB) はステロール類と 1:1 で結合し、これが複数集まり、平面脂質二分子膜中にイオンチャンネルを形成することが知られている。AmpB チャンネルはグルコースや塩化物イオンなどを透過することは報告されていたが、本研究により各種有機酸イオンも膜透過することを見出した。このとき、対イオンであるカチオンと同時に逆方向へ有機酸イオンは移動したが、チャンネル孔径より小さなイオンの方がより透過しやすいことが判明した。さらに、チャンネル孔径より明らかに大きな物質(NADH など)はチ

チャネル孔を介して透過できないことをリポソーム内からのそれらの流出挙動の観察によって確認した。図3には、結晶イオン半径と透過係数の関係を示した。なお、カチオン種を換えた場合には塩化物イオンをアニオンとして用い、アニオン種を換えた場合にはカリウムイオンをカチオンとして用いた。四級アンモニウムイオン及び有機酸アニオンの分子量と透過係数は反比例関係になっており、分子量が250程度以上のイオンは膜内に分配するが透過はできないことが明らかになった。また、透過不可能な大きなイオンでも対イオンは移動すること、対イオンが疎水的であるほど透過電流が上昇することも明らかにした。

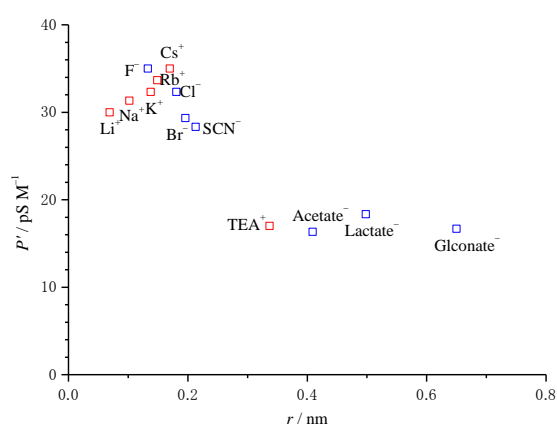


図3. 結晶イオン半径と AmpB チャネルでの透過係数の関係

本研究で構築した解析法により、他のチャネルによるイオン透過についてより定量的な解析が行えるものと期待している。

## 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6件)

- (1) Takafumi Yamauchi, Osamu Shirai, Seiya Tsujimura, and Kenji Kano, Electrochemical Investigation on Permeability of Organic Acid Ions Through amphotericin B channels, *Electrochemistry*, 80(5), 2012, 315-317. 査読有. Doi:<http://dx.doi.org/10.5796/electrochemistry/8.0.315>
- (2) Kei Hichiri, Osamu Shirai, and Kenji Kano, Influence of Inhalation Anesthetics on Ion Transport across a Planar Bilayer Lipid Membrane, *Analytical Sciences*, 28, 2012, 45-47. 査読有. DOI: 10.2116/analsci.28.45
- (3) Keisuke Sasakura, Osamu Shirai, Kei Hichiri, Maiko Goda-Tsutsumi, Seiya Tsujimura, and Kenji Kano, Ion Transport across Planar Bilayer

Lipid Membrane Driven by D-Fructose Dehydrogenase-Catalyzed Electron Transport, *Chemistry Letters*, 40, 2011, 486-488. 査読有. DOI: 10.1246/cl.2011.486

(4) 辻村清也, 白井 理, 分極曲線・サイクリックボルタンメトリー(5)生物電気化学, *electrochemistry*, 77, 2009, 486-492. 査読有.

(5) Jun Onishi, Osamu Shirai and Kenji Kano, Electrochemical elucidation of the facilitated ion transport across a bilayer lipid membrane in the presence of neutral carrier compounds, *Electroanalysis*, 22(11), 2010, 1229-1238. 査読有. DOI: 10.1002/elan.200900481

(6) Osamu Shirai, Shunsuke Ozaki, Jun Onishi, N. Kozai, Toshihiko Ohnuki and Kenji Kano, *Chemistry Letters*, 38, 2009, 1038-1039. 査読有. DOI: 10.1246/cl.2009.1038

〔学会発表〕(計13件)

- (1) 七里 慧, 白井 理, 加納健司, モデル生体膜系における膜結合型酵素 D-Fructose Dehydrogenase による電子移動に駆動されたイオン透過, 日本農芸化学会 2012 年度大会, 京都市, 2012/3/24.
- (2) 植屋宣義, 串田優輝, 白井 理, 加納健司, 膜電位差の伝播機構の基礎検討, 第57回ポーラログラフイーおよび電気分析化学討論会, 那覇市, 2011/12/2.
- (3) 山内隆史, 松本隆平, 藤田修二, 酒井秀樹, 渡辺陽子, 戸木田陽一, 辻村清也, 白井 理, 加納健司, Selective transport of organic acids across bilayer lipid membranes in the presence of amphotericin B channels, *Shikata Discussion 2011*, Awaji, 2011/5/29.
- (4) 植屋宣義, 白井 理, 辻村清也, 加納健司, Neurotransmission model by use of liquid membrane cell system, *International Congress on Analytical Sciences 2011*, Kyoto, 2011/5/26.
- (5) 植屋 宣義, 白井 理, 辻村 清也, 加納 健司, 有機液膜型セルを用いた神経伝達メカニズムの新規提案, 2011年電気化学会第78回大会, 横浜市, 平成23年3月29日.
- (6) 白井 理, 七里 慧, 辻村 清也, 加納 健司, 吸入麻酔剤の作用機序についての基礎検討, 第56回ポーラログラフイーおよび電気分析化学会, 秋田市, 平成22年11月7日.
- (7) 白井 理, 加納 健司, 生体機能発現の場・生体膜, 第56回ポーラログラフイーおよび電気分析化学討論会, 秋田市, 平成22年11月7日.
- (8) 白井 理, 新村 美智子, 辻村 清也, 加納 健司, 脂質二分子膜を介した物質輸送に与えるポリイオンの効果, 第56回ポーラログラフイーおよび電気分析化学会, 秋田市, 平成22年11月6日.
- (9) 白井 理, 新村 美智子, 辻村 清也, 加納

健司, ポリイオンによる脂質二分子膜を介した促進イオン移動, 日本分析化学会第 59 年会, 仙台市, 平成 22 年 9 月 16 日.

(10) 白井 理, 新村 美智子, 辻村 清也, 加納健司, 生体膜モデルを介した物質輸送に及ぼすポリイオンの影響, 2010 年電気化学秋季大会, 厚木市, 平成 22 年 9 月 2 日.

(11) 白井 理, 大西 純, 加納健司, Ion Transport Facilitated by Carrier Compounds across a Bilayer Lipid Membrane, The 7<sup>th</sup> Asian Conference on Electrochemistry in Kumamoto, 熊本市, 平成 22 年 5 月 20 日.

(12) 七里 慧, 辻村 清也, 白井 理, 加納 健司, 吸入麻酔剤の作用メカニズムの新解釈, 第 71 回分析化学討論会, 松江市, 平成 22 年 5 月 16 日.

(13) 白井 理, 加納健司, 生体膜の機能評価, 2009 年電気化学秋季大会, 小金井市, 平成 21 年 9 月 10 日.

[図書] (計 1 件)

(1) 白井 理 (分担執筆), シーエムシー出版, バイオ電池の最新動向, 2011, 70-74.

[その他]

ホームページ等

<http://www.bapc.kais.kyoto-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

白井 理 (SHIRAI OSAMU)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号: 40355011

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: