

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19212

研究課題名（和文）イオンチャネル2次元密度と1分子活性：膜タンパク制御の新基軸展開に向けて

研究課題名（英文）2D Ion Channel Density and Single Molecule Activity: Unraveling a Novel Modality of Membrane Protein Regulation

研究代表者

岩本 真幸 (Iwamoto, Masayuki)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：40452122

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：膜タンパク質が細胞膜上で離合集散することが膜タンパク質の活性にどのような影響を及ぼすのか、これまで定量的にはほとんど明らかにされていない。本研究では、独自の脂質2重膜作成技術であるCBB法を応用し、膜タンパク質の2次元密度を制御しつつ機能解析を行える実験手法の開発を目指した。実験では、イオンチャネルタンパク質のKcsAを蛍光標識し、膜内でのKcsAの凝集状態の違いや、膜面積の操作によるKcsAの挙動の変化を解析した。これにより、2次元密度制御手法確立に向けた基礎的データを取得することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞膜上での膜タンパク質の離合集散を実験的に制御できれば、これまで定量的に解析されていなかった集合状態が活性に与える影響を検討することができる。そのための実験手法を、独自の脂質二重膜操作技術を用いて開発することを目指した本研究は、タンパク質活性の新たな制御様式を解明するという学術的課題に挑むものである。膜タンパク質は、細胞の物質輸送や情報伝達の中心的な役割を果たす重要な分子である。離合集散による制御の仕組みを考慮に入れて医薬品の膜タンパク質に対する作用機序を再評価することで、より精度の高い医薬品設計が可能になるため、社会的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：The quantitative effects of the aggregation and dispersion of membrane proteins on the cell membrane on their activity have not been clearly elucidated. In this study, we aimed to develop an experimental method that allows functional analysis while controlling the two-dimensional density of membrane proteins using our unique lipid bilayer formation technique, the CBB method. In the experiments, the ion channel protein KcsA was fluorescently labeled, and we analyzed differences in the aggregation states of KcsA within the membrane and the changes in the behavior of KcsA upon manipulation of the membrane area. Through these analyses, we were able to obtain fundamental data for establishing a two-dimensional density control method for membrane proteins.

研究分野：脂質2重膜を使ったチャネルタンパク質の機能解析

キーワード：チャネル 脂質2重膜 離合集散 電気生理 蛍光

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞膜上でクラスターを形成する膜タンパク質は、古細菌のバクテリオロドプシンや脳内のグリア細胞に存在するアクアポリンなど数多く知られ、膜上で集合する分子機序や活性制御との関連に学術的関心が集まっている。我々は、かつて KcsA チャンネルが膜上で離合集散の様子を原子間力顕微鏡観察で捉えたことをきっかけに (J. Phys. Chem. Lett. 5, 578-584, 2014)、リガンド結合だけではなくチャンネルの集合状態も活性に影響している可能性を予想した。しかし、膜タンパク質の離合集散を制御することの難しさから、定量的な実験を行うには至っていなかった。そうした状況の中、先行研究成果である独自の脂質 2 重膜作成技術・CBB 法を確立した。膜面積のリアルタイム可変という CBB 法の利点を応用することで、集合状態を制御しながらイオンチャンネルの 1 分子機能解析が可能になると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、独自の CBB 法を応用し、膜タンパク質の 2 次元密度を自在に制御するための基盤実験技術を確立させる。さらに、集合状態と活性の連関が示唆されている KcsA カリウムイオンチャンネルの活性測定に応用し、膜上で集合することがチャンネル 1 分子の開閉挙動に及ぼす影響を初めて明らかにする。“2 次元分子密度による活性制御”という新概念の展開は、脂質ドメインやカベオラ形成といった細胞膜現象の意義を新たな視点で捉え直し、理解を深化させることにもつながる。本研究では、そのたたき台となる最も基礎的な実験データの取得を目指す。

3. 研究の方法

(1) 実験手法の確立

脂質 2 重膜上の膜タンパク質密度を自在に制御しつつ機能・活性の変化を測定するための基盤実験技術を確立する。これには独自の脂質 2 重膜実験法・接触液泡二重膜 (CBB) 法を応用する (図 1A)。CBB 法では、リン脂質単分子膜を纏った油中水滴同士の接触によって脂質 2 重膜を作成し、そこに組み込んだ膜タンパク質の活性測定を行う。本研究では、水滴を膨らませているピペット位置を精密に操作し、水滴間距離を変えることで脂質 2 重膜面積をリアルタイム制御する (図 1B)。

(2) 実証実験

確立した手法を KcsA チャンネル活性測定に適用し、チャンネル密度操作の活性への影響を、最終的には 1 分子レベルで解明することを目指す。その過程では以下の検討が必要となる。

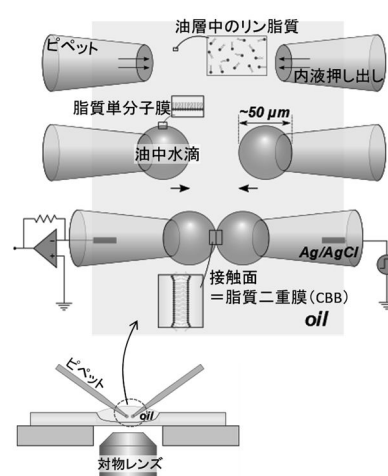
1. イオンを通さない KcsA チャンネルの作製: チャンネル 2 次元密度の増大のみに寄与し、それ自身はイオン電流を流さない不活性チャンネルを作製する。その作製に向け、KcsA の近縁チャンネルの事例を参考に変異導入を行う。近縁のカリウムイオンチャンネルではイオン選択性フィルター近傍への変異導入により、正常な立体構造を保ったままイオン透過性のみ失う変異体が見つかる報告されている。それらに対応する KcsA チャンネル変異体を作製して実験に用いる。

2. 孤立した 1 分子および高密度集団中の 1 分子の特性解析: 野生型チャンネルと不活性チャンネルを同時に脂質 2 重膜に組み込む。この際、大多数を不活性チャンネルとする一方、チャンネル電流を示す野生型がちょうど 1 分子程度となるように調節する。膜面積操作により膜内のチャンネル密度を連続的に変化させながら、野生型チャンネル 1 分子の電流信号を取得し、チャンネル開閉特性への影響を解析する (図 2)。

4. 研究成果

CBB 法において 2 つの油中水滴間距離を変えて接触面積 (脂質 2 重膜面積) を制御し、これに連動させて接触膜に組み込まれている膜タンパク質の 2 次元密度を変化させることを試みた。この操作によって実際に膜タンパク質の密度あるいは集合状態が変化したことを確認するには、膜タンパク質を蛍光標識して可視化する必要がある。我々は、Alexa532 で蛍光標識した KcsA カリウムイオンチャンネルを接触膜に組み込み、膜での挙

A. CBB法の概要



B. 膜面積のコントロール

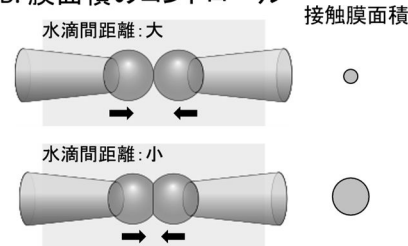


図 1. CBB 法での膜面積制御

A. リン脂質が分散した油中では油中水滴表面に自発的に脂質単分子膜が形成する。それらを接触させて脂質 2 重膜を作成する。B. 2 つの油中水滴間距離の操作によって膜面積を制御できる。

動の観察を試みた。従来の CBB 法では 2 つの油中水滴を水平方向に横並びにして接触させる。よって、接触面は垂直となり、接触膜面を顕微鏡で観察することはできない。そこで、2 つの油中水滴を垂直方向に重ねるように配置することで水平な接触面を形成させ、その観察を試みた。しかし、油中水滴内のリポソームに存在し接触膜に組み込まれていない蛍光標識 KcsA チャンネルに由来するバックグラウンド蛍光により、接触膜に組み込まれたチャンネルの蛍光を区別して観察することはできなかった。この問題を克服するため、上下に重ねる油中水滴のうち下の水滴を極めて薄い水層に代え、全反射蛍光(TIRF)観察を行うこととした。TIRF 観察ではカバーガラスのごく近傍にある (~100 nm) の蛍光色素のみが励起されるため、バックグラウンド蛍光の影響を排除できる。また、水層は薄いながらも TIRF 観察ができる範囲で適度な厚さも確保する必要があった。これは、後の電気生理測定を考慮し、電極から膜面までの電気抵抗を可能な限り小さくするためである。そこで、カバーガラス表面に水層としてハイドロゲル薄膜を作成し、その上にリン脂質が溶解したオイルを添加し、ハイドロゲルとオイルの界面にリン脂質単分子膜を形成させた。そしてオイル層に蛍光標識チャンネルを再構成したりポソーム懸濁液の油中水滴を滴下した。油中水滴表面にはリン脂質単分子膜が形成するので、ハイドロゲル表面の単分子膜と接触させることで接触面に脂質 2 重膜を形成させた。油中水滴中のリポソームに組み込まれている膜タンパク質は膜融合によりハイドロゲル上の脂質 2 重膜に組み込まれると考えられ、接触膜に組み込まれた蛍光標識チャンネルの輝点を多数観測することができた。ここで、上の油中水滴を移動させると、蛍光輝点は脂質 2 重膜が形成されている部分に合わせて移動することが分かった。また、従来の CBB 法の手順による電気生理実験において、巨視的電流が測定できるほどの KcsA チャンネル分子を脂質二重膜に組み込んだ後、膜面積を減少させながら巨視的電流を観測したところ、電流値は膜面積の減少に対して大きく変化しなかった。この電流測定の結果と上述の蛍光輝点観察の結果から、膜面積操作を行っても既に接触膜に組み込まれた KcsA チャンネル分子数は変わらず、結果として膜内での分子密度を変えることができることがわかった。

ここで、各輝点が 1 個のチャンネル分子に由来するものなのか、あるいは複数のチャンネル分子が集合しているものなのかを判別することは、集合状態の影響を解析するうえで必須である。そこで、輝点の蛍光消光ステップ数を解析することでその判別を試みた。KcsA チャンネルはホモ 4 量体で形成されるため、1 つのチャンネルには 4 分子の蛍光色素が結合する。よって、輝点が 1 つのチャンネル分子に由来するのであれば、その輝点は最大 4 ステップで消光することになる。この実験に際し、励起光強度と撮影時間、そして撮影した映像から各輝点の消光ステップ数をカウントする方法について検討を行い、最適な実験手順を確立させた。それにより蛍光輝点の消光ステップ数を解析したところ、興味深いことに、KcsA チャンネルには膜上に単一のチャンネル分子として存在している状態と、いくつかのチャンネル分子が集合している状態があることが示唆された。さらに、各状態の確率は溶液の pH や膜脂質組成によって変化する可能性を示す結果が得られた。溶液の pH は KcsA チャンネルの活性化因子であり、また、酸性 pH で活性化した KcsA は膜脂質組成によって活性修飾を受けることが明らかになっている。よって今回得られた結果は、集合状態と活性の関係を反映している可能性があり、今後より詳細な検討を行う必要がある。

一方、当初の研究計画遂行に必要な、2 次元密度のみに関する不活性な KcsA 変異体の作製については難航しており、適切な変異導入部位の発見にはまだ至っていない。チャンネルの集合状態には影響を与えず電流を流さない特性を持った変異体チャンネルの探索は今後の課題である。

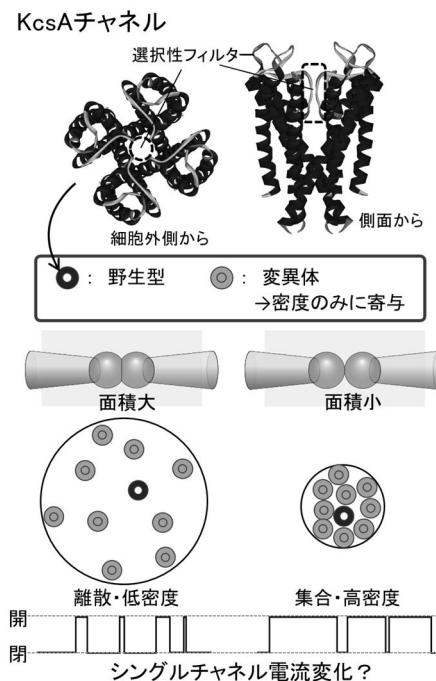


図 2 .KcsA チャンネルを用いた 2 次元密度制御実験の概略

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hayakawa Eri Saki H., Ueki Misuzu, Alhatmi Elmukhtar, Oiki Shigetoshi, Tokumasu Fuyuki, Mitchell Drake C., Iwamoto Masayuki	4. 巻 1866
2. 論文標題 Different lateral packing stress in acyl chains alters KcsA orientation and structure in lipid membranes	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 184338 ~ 184338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamem.2024.184338	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, Morito M, Oiki S, Nishitani Y, Yamamoto D, Matsumori N	4. 巻 26
2. 論文標題 Cardiolipin binding enhances KcsA channel gating via both its specific and dianion-monoanion interchangeable sites	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 108471 ~ 108471
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.108471	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 岩本真幸	4. 巻 6
2. 論文標題 膜タンパク質機能における細胞膜の役割を人工膜実験で解明する	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 445-449
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 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 Ueki Misuzu, Iwamoto Masayuki	4. 巻 595
2. 論文標題 Fluorescent labeling in size controlled liposomes reveals membrane curvature induced structural changes in the KcsA potassium channel	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 1914 ~ 1919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14141	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 Keita, Iwamoto Masayuki, Koshiji Takaaki, Oiki Shigetoshi	4. 巻 38
2. 論文標題 Geometrical and electrophysiological data of the moving membrane method for the osmotic water permeability of a lipid bilayer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Data in Brief	6. 最初と最後の頁 107309 ~ 107309
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dib.2021.107309	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 岩本真幸	4. 巻 54
2. 論文標題 膜タンパク質特性の検査台としての人工細胞膜	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 200-203
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 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 -

〔学会発表〕 計24件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Masayuki Iwamoto
2. 発表標題 Reconstituted lipid bilayers to elucidate physicochemical interactions between ion channels and membranes
3. 学会等名 Ion Channel Modulation Symposium (ICMS) 2023 Tokyo (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 真木孝尚、松木悠佳、吉田俊之、老木成稔、岩本真幸
2. 発表標題 TRAAKチャネルの特徴的なフリッカーゲーティングは内葉張力によって制御されている
3. 学会等名 日本生物物理学会第61回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松木悠佳、高島政子、岩本真幸、吉田俊之、老木成稔
2. 発表標題 接触バブル二重膜法を用いた膜張力クランプ法の開発
3. 学会等名 第101回日本生理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 岩本真幸
2. 発表標題 カリウムイオンチャンネルにおけるtrans-leaflet情報伝達
3. 学会等名 生理研研究会「構造情報を基盤とした膜機能分子の生理機能理解に向けて」(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松木悠佳、岩本真幸、高島政子、老木成稔
2. 発表標題 Concurrent effect of the membrane thickness and tension on the gating of the KcsA potassium channel
3. 学会等名 日本生物物理学会第60回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 植木美鈴、宮腰雅美、老木成稔、岩本真幸
2. 発表標題 Exploring the membrane tension sensing sites in the KcsA potassium channel
3. 学会等名 日本生物物理学会第60回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 真木孝尚、植木美鈴、宮腰雅美、松木悠佳、老木成稔、岩本真幸
2. 発表標題 脂質二重膜張力の非対称制御によるカリウムチャネル開閉機構の探究
3. 学会等名 生理研研究会「細胞の局所コミュニティ研究会」
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 真木孝尚、松木悠佳、吉田俊之、老木成稔、岩本真幸
2. 発表標題 Asymmetric manipulation of the lipid bilayer tension revealed an inner leaflet tension dependence in the single TRAAK channel gating
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松木悠佳、岩本真幸、高島政子、老木成稔
2. 発表標題 The interplay between the membrane thickness and tension on the gating of the KcsA potassium channel
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 植木美鈴、岩本真幸
2. 発表標題 Fluorescence detection of membrane curvature-induced structural changes in the KcsA potassium channel
3. 学会等名 日本生物物理学会第59回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 植木美鈴、岩本真幸
2. 発表標題 蛍光標識による KcsAカリウムイオンチャネルの膜曲率依存的な構造変化の評価
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松木悠佳、岩本真幸、高島政子、老木成稔
2. 発表標題 KcsAカリウムチャネルのチャネル活性と脂質2重膜の膜厚の関係
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Matsuki Y, Iwamoto M, Oiki S	4. 発行年 2024年
2. 出版社 Humana New York, NY	5. 総ページ数 292
3. 書名 Potassium Channels : Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology), Simone Furini Ed.	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>福井大学医学部分子神経科学HP https://www.med.u-fukui.ac.jp/laboratory/molecular-neuroscience/</p>

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
研究協力者	真木 孝尚 (Maki Takahisa)		
研究協力者	植木 美鈴 (Ueki Misuzu)		

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