

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23770190

研究課題名（和文） 1分子計測・操作によるイオンチャネルの開閉機構の解明

研究課題名（英文） A study on ion-channel gating by single molecule measurement and manipulation.

## 研究代表者

平野 美奈子 (HIRANO MINAKO)

独立行政法人理化学研究所・細胞動態計測研究グループ・客員研究員

研究者番号：80585167

## 研究成果の概要（和文）：

環境依存的な蛍光色素を用いて、カリウムチャネルの開閉に伴う構造変化を、1分子レベルで蛍光のオン・オフとして明確に捉えることができた。また、イオンチャネルの構造変化と機能変化を1分子レベルで同時計測して構造機能相関を明らかにするため、以前開発した同時計測装置に新たなチャネル電流測定法を組み込んだ。その結果、チャネルの膜中での拡散の問題が解消され、初めて安定にイオンチャネル1分子の蛍光像を得ることに成功した。

## 研究成果の概要（英文）：

Using environment-sensitive fluorophore, conformational changes of a single ion channel were clearly detected. And, to clarify the relationship between conformational and functional changes of an ion channel, I improved an apparatus to measure these changes simultaneously at the single channel level. Using this apparatus, functional changes were easily detected and fluorescence images of a single ion channel were stably obtained.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

## 研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：1分子計測、イオンチャネル、蛍光色素

## 1. 研究開始当初の背景

イオンチャネルは生体膜に存在し、細胞内外の環境変化を感知してイオン環境を調節することにより細胞の生理機能を制御するタンパク質である。循環器疾患、神経疾患を含めた種々の疾患にイオンチャネルは関与しており、有望な創薬標的として考えられている。イオンチャネルの機能は、イオンの流れを電流として捉えることで、1分子レベルで詳細に測定することが可能である。しかしながら、構造に関する情報は構造解析などからの特定の状態でのスナップショットしかなく、機能しているイオンチャネルの構造の

遷移は明らかではない。イオンチャネルの分子実体の理解には、機能しているイオンチャネルの構造変化を機能変化とともに1分子レベルで同時計測し、その構造機能相関を明らかにすることが必要であると考えられる。

以前、我々は、構造変化と機能変化を1分子レベルで同時に測定することができる計測装置を開発した(Jpn. J. Physiol., 52 (5), 429-434(2002)、Single Molecules, 3 (1), 33-42(2002))。また、カリウムチャネルの一つである KcsA チャネルの構造変化を、蛍光色素の特性を利用して、巨視的な計測系で明確に捉えることができた。本研究では、我々

が開発した同時計測装置を改良して、主に KcsA チャンネルの機能変化（活性変化）に伴う構造変化を 1 分子レベルで同時に捉え、チャンネルの開閉機構を明らかにすることを目的とした。

## 2. 研究の目的

機能しているイオンチャンネルの構造変化を機能変化とともに 1 分子レベルで同時計測し、その構造機能相関を明らかにすることを目的とした。そのため、以下の 2 つを目標とした。

(1) カリウムチャンネル (KcsA チャンネル) の構造変化を蛍光像として 1 分子レベルで捉える。

(2) イオンチャンネル開閉時の構造変化と機能変化を 1 分子レベルで同時に捉える装置を開発・改良し、KcsA チャンネルの構造変化を 1 分子、実時間で機能変化と同時に記録する。

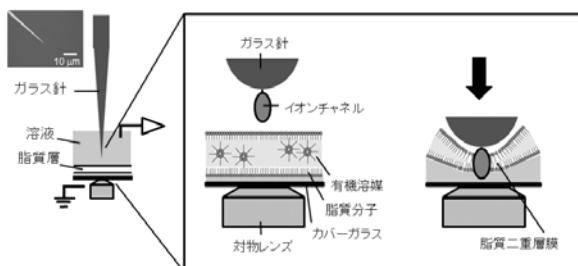
## 3. 研究の方法

(1) KcsA チャンネルの 1 分子レベルでの構造変化の可視化

環境依存的な蛍光色素であるテトラメチルローダミン (TMR) で標識した KcsA チャンネルを組み込んだリポソームを、カバーガラス上に展開し、固体支持膜に再構成した。その後、再構成された TMR-KcsA チャンネルを全反射顕微鏡で観察し、1 分子レベルで蛍光色素を蛍光の輝点として捉えた。そして、KcsA チャンネルの活性化条件下と不活性化条件下で、蛍光強度変化を測定した。

(2) 同時計測系の開発・改良

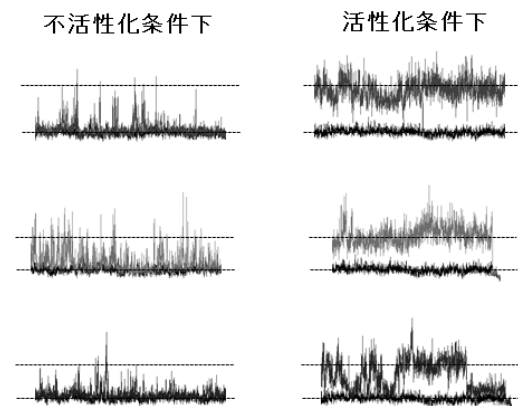
以前、イオンチャンネル 1 分子の機能変化と構造変化を同時に捉えることができる電気的・光学的同時計測装置を開発し、大枠はできていた。今回、チャンネルの膜への組み込み効率を上げるため、最近開発した探針に固定したチャンネルを直接人工膜に組み込む方法を同時計測装置に組み込み、改良を行った (Small, 7(16), 2379-2383 (2011))。直径 100nm 以下に尖らせたガラス棒の先に His タグを介してカリウムチャンネル (KcsA チャンネル、MthK チャンネル) を固定し、チャンネルを直接脂質二重層膜に組み込んだ (下図)。



## 4. 研究成果

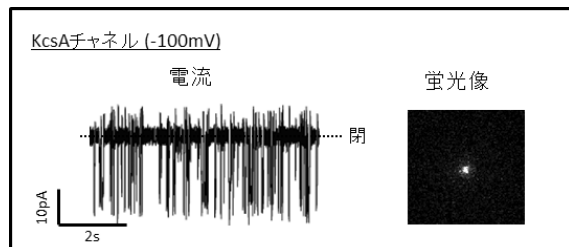
(1) KcsA チャンネルの 1 分子レベルでの構造変化の可視化

以前、多分子系で KcsA チャンネルの開閉を疎水度によって蛍光強度が変化する蛍光色素 (テトラメチルローダミン、TMR) を用いて捉えることに成功したが、今回 1 分子レベルでも、固体支持膜に再構成した TMR 標識 KcsA の開閉を蛍光のオン・オフとして明確に捉えることができた。KcsA チャンネルが活性化される低 pH では輝点が安定に見られ、不活性化状態の高 pH では明滅を繰り返す、または輝点が見られなくなる様子が見られた (下図)。これらのことにより、KcsA は、活性化条件下では安定した構造状態をとっている一方、不活性化条件下では頻りに構造状態が変化していることが示唆された。



(2) 同時計測系の開発・改良

ガラス針の先端にカリウムチャンネルを His タグを介して固定して直接膜に押し込むという新しい方法を、同時計測装置に組み込んだ。その結果、ガラス針を膜に押し付けて数秒から数分以内にチャンネル電流が見られ、チャンネルの膜への組み込み効率が上がった。さらに、チャンネルが固定されたことにより、正確な蛍光計測を困難にしていたチャンネルの膜中での拡散の問題が解消された。この方法により、初めて安定にイオンチャンネル 1 分子



の蛍光像を得ることに成功した。

現在、上記の 2 つの結果を踏まえ、1 分子レベルでイオンチャンネルの開閉に伴う機能と構造変化の同時計測を推進中である。

## 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4件)

- ① S. Kikuchi, J. Bédard, M. Hirano, Y. Hirabayashi, M. Oishi, M. Imai, M. Takase, T. Ide, M. Nakai.,  
“Uncovering the Protein Translocon at the Chloroplast Inner Envelope Membrane.”,  
Science, 339(6119), 571-574 (2013), 査読有  
DOI: 10.1126/science.1229262.
- ② 井出 徹、平野 美奈子、奥野 大地、  
“「ちから」でイオンチャネルの機能を制御する”  
生物物理学会誌、52(6), 289-290 (2012)  
査読なし  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/biophys/52/6/52\\_289/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/biophys/52/6/52_289/_pdf)
- ③ M. Hirano, Y. Onishi, T. Yanagida, T. Ide,  
“Role of the KcsA channel cytoplasmic domain in pH-dependent gating” ,  
Biophys. J., 101(9), 2157-2162 (2011), 査読有  
DOI: 10.1016/j.bpj.2011.09.024.
- ④ M. Kitta, T. Ide, M. Hirano, H. Tanaka, T. Yanagida, T. Kawai,  
“Direct Manipulation of a Single Potassium Channel Gate with an Atomic Force Microscope Probe” ,  
Small, 7(16), 2379-2383 (2011), 査読有  
DOI: 10.1002/sml.201002337

[学会発表] (計8件)

- ① M. Hirano, Y. Onishi, D. Okuno, T. Ide  
“The KcsA channel cytoplasmic domain effects on the inactivation gating”  
Biophysical Society 57th Annual Meeting, フィラデルフィア (アメリカ合衆国) (2013/2/2-6)
- ② M. Hirano, Y. Onishi, D. Okuno, T. Ide  
“The KcsA channel cytoplasmic domain effects on the inactivation gating”  
Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions, The 6th International Symposium, 京都 (2012/12/ 5-6)
- ③ T. Ide, M. Hirano, D. Okuno

“Single molecule imaging of bio-molecules”

The 14th Takayanagi Kenjiro Memorial Symposium  
静岡(2012/11/28)

- ④ M. Hirano, Y. Onishi, D. Okuno, T. Ide,  
“The KcsA channel cytoplasmic domain effects on the inactivation gating”  
第50回 日本生物物理学会、名古屋 (2012/9/23)
- ⑤ D. Okuno, M. Hirano, Y. Onishi, T. Yanagida, T. Ide,  
“Reconstitution of ion channel into lipid bilayer using glass needle.”  
第50回 日本生物物理学会、名古屋 (2012/9/24)
- ⑥ R. Kawano, Y. Tuji, K. Kimiya, T. Osaki, M. Hirano, T. Ide, N. Miki, S. Takeuchi  
“Automated drug screening system for ion channel proteins using artificial cell membranes.”  
第50回 日本生物物理学会、名古屋 (2012/9/24)
- ⑦ M. Hirano, Y. Onishi, T. Yanagida, T. Ide,  
“Mechanism for opening and closing by the KcsA channel”  
第49回 日本生物物理学会、兵庫 (2011/9/18)
- ⑧ M. Hirano  
“The KcsA channel opening and closing mechanism”  
QBiC Retreat 2011: How to achieve “Whole Cell Modeling”  
兵庫(2011/9/ 10)

[その他]

ホームページ等

<http://www.gpi.ac.jp/research/teacher/professor-06.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野 美奈子 (HIRANO MINAKO)

独立行政法人理化学研究所・細胞動態計測研究グループ・客員研究員

研究者番号：80585167

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし