

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657110

研究課題名(和文) KCSAチャネルの1分子操作による構造機能相関研究

研究課題名(英文) Study on structure-function relationship of KcsA channel by single molecule manipulation.

研究代表者

井出 徹 (Ide, Toru)

岡山大学・自然科学研究科・教授

研究者番号：60231148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：チャネルタンパク1分子のみを操作・照明できる光学系を構築し、KcsAチャネルタンパクの活性化に至る分子間、あるいは分子内情報伝達を実時間で直視可能とすることを目指した。

1) ガラスファイバーに固定したKcsAチャネルの1分子操作に成功した。ガラスファイバーへのレーザ照明の導入、及びプローブの操作系開発を行った。2) プローブに固定したチャネルを人工膜に直接挿入する再構成法を開発した。3) 再構成条件を検討・改良することにより、計測効率を著しく上げることに成功した。人工膜をガラスプローブ先端のみに形成し、(2)の方法により再構成した。従来法に比較して極めて高効率に計測が可能となった。

研究成果の概要(英文)：Our purpose was to develop an apparatus for simultaneous mechanical manipulation and optical recording of single ion channel protein, KcsA, by which we measure inter- and intra-molecule interactions that activate the channel. We have succeeded in (1) single molecule manipulation of KcsA immobilized at the tip of a fine glass needle (2) developing a technique for mechanically incorporating the KcsA into an artificial bilayer (3) making the measurement efficiency much higher than conventional methods by optimizing experimental conditions.

研究分野：生物物理学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：イオンチャネル 1分子計測 単一チャネル電流

## 1. 研究開始当初の背景

チャンネルタンパクは、特定の刺激に応じてゲートを開閉し、生体膜のイオン透過性を制御している。しかし、このゲーティングの分子機構は殆ど分かっていない。これを明らかにするために、様々な試みがなされてきたが、チャンネルの1分子操作もその一つである。チャンネルタンパクは、1分子を透過するイオン性電流を測定できることから、直接の力学操作によって1分子の構造を変えることが出来れば、構造と機能の相関について推論を介さない直截な議論が可能となる。このような理由から、チャンネルタンパク1分子の直接操作に関して多くの試みがなされてきたが、膜の脆弱性やチャンネルの膜内拡散が原因で実現しなかった。しかし、我々は最近、原子間力顕微鏡の探針を用いて、バクテリアKチャンネル(KcsA)1分子のゲートを操作することに初めて成功した。

## 2. 研究の目的

KcsAは初めて結晶構造が解かれたチャンネルタンパクで、構造解析が最も進んでいるチャンネルタンパクである。本研究では、上述の1分子操作技術を改良、発展させることにより、KcsAの構造変化が如何にゲーティングに結びついているかを解明する。

## 3. 研究の方法

### 【顕微鏡開発】

1分子蛍光計測・力学操作と単一チャンネル電流記録を同時に可能とすることが目的である。

### 1) 光学系(単一チャンネル電流記録法とSNOMの融合)

1分子蛍光観察用顕微鏡(開発済み)とSNOMを融合させた。ここでは便宜的にSNOMと呼んでいるが、イメージングの必要はないので(Scanningの必要なし)、レーザ照明の導入、及びプローブの操作系開発が主眼となった。後述の電気測定用人工膜系に適用するために、プローブには数cmに及び大きな動きからnmレベルの微小な動きまで、幅広い操作性が要求

される。先行研究が全くないので、後述の人工膜系の開発に合わせて、細部の仕様を改変した。

### 2) プローブ

本研究の最大の技術的特徴は、プローブに固定したチャンネルを人工膜に直接挿入する再構成法にある。この方法は最近我々が開発した方法で、適用例もごく限られている。現在は、His-tag等を介してチャンネルを固定し、界面活性剤存在下で人工膜に挿入した。より組込効率を上げるため、プローブ先端の形状、表面修飾、チャンネルタンパクの固定法など、再構成条件を探索した。

### 3) 電流計測装置(人工膜装置)

人工膜は、疎水性隔壁(テフロンフィルムなど)上の開口に形成した。この装置では膜の揺動を防ぐため、人工膜はアガロース層に支持される形で形成した。本研究では、探針を透明素材にする他に、膜下方よりの制御因子結合を観測するため、アガロース層の形状、濃度等に改変を加えた。また、プローブのナノメートルレベルの微小な変位を感知するためには、(アガロースは力学刺激による変形が激しいので)支持体として固体を使用する必要がある。このための素材、形状も検討した。

3) 電流計測装置(人工膜装置): 従来的人工膜法では、疎水性隔壁(テフロンフィルムなど)上の開口に膜を形成する。膜の揺動を防ぎ、膜下方よりの制御因子結合を観測するため、人工膜はアガロース層に支持される形で形成するが、人工膜の脆弱性等により技術的に極めて難しかった。そこで、本研究では新たに人工膜の形成法とチャンネルタンパクの組み込み法を開発した。ここでは、人工膜をアガロース層に接触させず、ガラスプローブ先端のみに形成した。これにより、従来法に比較して極めて高効率に計測が可能となった。

### 【チャンネルタンパクの作成】

細菌由来のKチャンネル (KcsA) を大腸菌に発現させ精製した。このチャンネルタンパクの変異体を作成し、蛍光標識、プローブへの固定を行った。KcsAは、シリコン (AFM) 探針による直接挿入による再構成に成功しているタンパクで、力学刺激による活性化も記録されている。また、これらは蛍光標識された阻害剤 (CTX) による阻害が確認されているので、阻害剤との結合解離が1分子イメージング可能である。これを用いて開発した顕微鏡の評価を行った。

#### 4. 研究成果

制御因子との結合解離、構造揺らぎと電流揺らぎを1分子レベルで同時計測することによって、KcsAチャンネルタンパクの活性化に至る分子間、あるいは分子内情報伝達を実時間で直視可能とすることを目指した。具体的な研究成果は以下の通り。

1) 光学系 (単一チャンネル電流記録法とSNOMの融合): 1分子蛍光観察用顕微鏡上でガラスファイバーに固定したKcsAチャンネルの1分子操作に成功した。また、ガラスファイバーへのレーザー照明の導入、及びプローブの操作系開発を行った。ここでは便宜的にSNOMと呼んでいるが、イメージングの必要はない (走査の必要なし)。

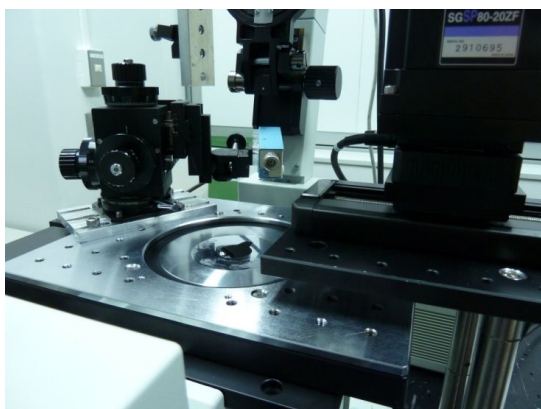


図1 1分子計測装置

2) プローブ開発: 本研究の最大の技術的特徴は、プローブに固定したチャンネルを人工膜に直接挿入する再構成法にある。より組込効

率を上げるため、プローブ先端の形状、表面修飾 (各種PEG)、チャンネルタンパクの固定法 (His-tag、Av-tag等)、タンパクの可溶化法 (ナノディスク、PMAL等) など、再構成条件を検討・改良することにより、計測効率を著しく上げることに成功した。

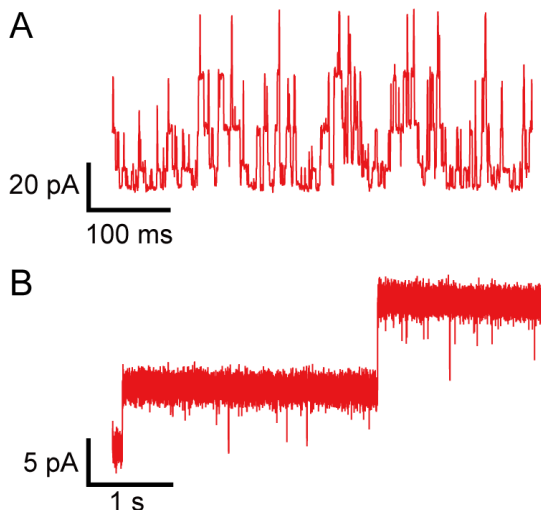


図2 新規再構成法による電流計測

#### 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 3件)

Kawano R, Tsuji Y, Sato K, Osaki T, Kamiya K, Hirano M, Ide T, Miki N, Takeuchi S., Automated Parallel Recordings of Topologically Identified Single Ion Channels., *Scientific Reports* 3, 2013, 1955, 査読有り

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), 査読有り, DOI: 10.1126/science.1229262.

井出 徹、平野 美奈子、奥野 大地、  
“「ちから」でイオンチャン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)

[学会発表] (計 8件)

M. Hirano, Y. Onishi, D. Okuno, T. Ide,

Coordination between the cytoplasmic domain and the inactivation gate in the KcsA channel

第 51 回 日本生物物理学会年会、  
京都 (2013/10/30)

D. Okuno, M. Hirano, Y. Onishi, T. Ide,  
Reconstitution of ion channel  
immobilized on solid support into  
lipid bilayer, 第 51 回 日本生物物理  
学会年会、  
京都 (2013/10/30)

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)

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)

T. Ide, M. Hirano, D. Okuno  
“ Single molecule imaging of  
bio-molecules ”  
The 14th Takayanagi Kenjiro Memorial  
Symposium  
静岡(2012/11/28)

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)

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)

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)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.gpi.ac.jp/research/teacher/professor-05.html>

6 . 研究組織  
(1)研究代表者  
井出 徹 ( IDE TORU )

研究者番号 : 60231148