

令和 4 年 5 月 12 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2021

課題番号：17H05058

研究課題名(和文) 高速AFMによるカリウムチャネルの構造 機能ダイナミクスの解析

研究課題名(英文) Structural dynamics of K⁺ channel imaged by high-speed atomic force microscopy

研究代表者

角野 歩 (Sumino, Ayumi)

金沢大学・ナノ生命科学研究所・助教

研究者番号：80717140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,800,000円

研究成果の概要(和文)：探針走査型高速AFMと電気生理の同時計測系を開発し、チャネルのナノ構造と機能を観察する計画であったが、作製した探針走査型高速AFMが安定動作しなかった。よって方針を変更し、探針走査型高速AFMを、動作が安定な試料走査型高速AFMへ作り替えた。脂質膜中の電位依存性Na⁺チャネルを試料走査型高速AFMで計測すると、4つの粒子が四角に集合したポアドメイン(PD)の構造が観察された。その周囲にはより小さな粒子が密着しており、これは電位センサードメイン(VSD)と考えられる。電位依存性を变化させた変異体ではVSDらしき粒子がPDから解離しており、電位依存性に関連した分子内モチーフの会合・解離を発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

電位依存性チャネルは生理機能の維持に欠かせない重要な分子群であるが、その電位依存的な開閉の際の構造変化は不明点が多い。本研究は脂質膜中における電位センサードメインとポアドメインの位置関係を一分子レベルで直接観察した初の結果であり、電位依存的開閉機構の完全解明に向けて重要な知見となった。

研究成果の概要(英文)：The plan was to develop a simultaneous tip-scanning high-speed AFM and electrophysiology measurement system to observe the nanostructure and function of channels, but the fabricated tip-scanning high-speed AFM did not work stably. Therefore, we changed our plan and replaced the tip-scanning high-speed AFM with a sample-scanning high-speed AFM with stable operation. When the voltage-gated Na⁺ channels in lipid membranes were measured with the sample-scanning high-speed AFM, a pore domain (PD) structure was observed, in which four particles were assembled in a square shape. Surrounding them are smaller particles closely packed, which are considered to be voltage sensor domains (VSDs). In mutants with altered voltage dependence, VSD-like particles dissociate from the PD, revealing an association and dissociation of intramolecular motifs related to voltage dependence.

研究分野：生物物理学

キーワード：イオンチャネル 高速原子間力顕微鏡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

様々な生理現象を司る生体内の電気信号は、細胞膜中に存在する膜タンパク質であるイオンチャネルにより制御されている。イオンチャネルはイオンを通過させる通り道(ポア)を有しており、チャネルが刺激に応じてポアを開閉させるチャネルの構造変化により、細胞の膜電位が制御されている。チャネルの構造および構造変化が機能を生み出していることは明白だが、膜中でのチャネルの構造変化を捉える方法は限定的である。原子間力顕微鏡(AFM)は、鋭く尖った微小な探針で試料表面をなぞり、探針 - 試料間に働く原子間力を検知して、試料表面の凹凸構造を描画する顕微鏡である。常温・常圧・水溶液中での高分解観察(水平~1 nm, 垂直~0.1 nm)が可能であり、近年では生体分子の構造観察に適用されている。申請者は近年、膜に再構成したカリウムチャネル KcsA を開閉各条件下で AFM 観察し、KcsA チャネルのホモ 4 量体構造および中心のポアの可視化に成功した(Sumino, A. et al., *Sci. Rep.* 2013, 3, 1063.)。さらに興味深いことに、KcsA は閉状態で互いに集合し、開状態では離散するという、チャネル開閉と連動した膜中集合・離散現象を発見した。(Sumino, A. et al., *J. Phys. Chem. Lett.* 2014, 5, 578-584. *ACS Live Slides* 掲載)。しかし、このようなイオンチャネルの集合・離散状態やそのダイナミクスがチャネル機能との関連は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、チャネルの開閉と連動した集合離散現象とチャネル機能との関連を分子レベルで明らかにするため、高速原子間力顕微鏡と電気生理の同時計測システムを開発する。構築したシステムを用いて、膜電位依存性カリウムチャネルの電位依存的開閉ダイナミクスや協同性を直接観察し、さらにチャネルの集合離散動態とイオン透過機能との動的相関を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

探針走査型高速 AFM と電気生理の同時計測チェンバーを構築し、電位制御やチャネル電流の測定を行いながら、高速 AFM でチャネルのナノ構造ダイナミクスを観察することを計画した。2017-2019 年度は探針走査型高速 AFM を作製し、その試料ステージ上で電気生理計測系を立ち上げた。ノイズ対策などによって電気生理計測環境は単一チャネル電流が計測できるレベルに整ったが、作製した探針走査型高速 AFM の光学系が不安定で、安定動作に至らなかった。そのため当初の方針を変更し、探針走査型高速 AFM を解体して、より動作が安定な試料走査型高速 AFM へ作り替えた。まずは電位依存性チャネルの構造を鮮明に可視化することを目標に、試料走査型高速 AFM によって脂質膜に再構成した電位依存性ナトリウムチャネルの表面形状を計測した。

4. 研究成果

電位依存性チャネルの Na_vAb を試料として用いた。Na_vAb はホモ 4 量体を形成し、4 つのポアドメインが集まった中心にイオンの透過路を有する。電位センサードメインは、ポアドメインを取り囲むように密着して配置されている様子が構造解析によって明らかになっている。しかし、結晶構造解析や電子顕微鏡の単粒子解析では膜タンパク質が十分な量の膜脂質中に存在しているとはいえず、観測も液体窒素温度で脂質膜の流動性が失われている。そ

のため、より生理的な環境においても電位依存性チャネルのポアドメインと電位センサードメインが密着しているかは不明であった。本研究では、 Na_vAb を試料走査型高速 AFM の基板上で脂質膜に再構成し、ナノ構造を観察した。すると、4つの粒子が四角に集合した様子が観察され、隣接する粒子間の距離が約 3.5 nm であったことから、この構造はポアドメインに相当する。また、ポアドメインの周囲にはより小さな粒子が密着しており、これは電位センサードメインの細胞外ループと考えられる。興味深いことに、電位依存性を変化させた変異体では電位センサーらしき粒子がポアドメインから解離しており、電位依存性に関連した分子内モチーフの会合・解離を発見した。当初予定していた分子間の集合・分散とそのチャネル機能との関連は解明できなかったが、これまで AFM で可視化されたことのない微小な電位センサーを高速 AFM で捉えたことと、チャネル機能と関連した分子内モチーフの会合・解離を発見したことは重要な進歩である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 H. Yamamura, T. Hagiwara, Y. Hayashi, K. Ogawa, H. Kato, T. Katsu, K. Masuda, A. Sumino, H. Yamashita, R. Jinno, M. Abe, A. Miyagawa	4. 巻 6(47)
2. 論文標題 Antibacterial Activity of Membrane-Permeabilizing Bactericidal Cyclodextrin Derivatives	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 31831-31842
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.1c04541	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 L. Pupplin, D. Kanayama, N. Terasaka, K. Sakai, N. Kodera, K. Umeda, A. Sumino, M. Arin, W. Wei, H. Tanaka, T. Fukuma, H. Suga, K. Matsumoto, M. Shibata	4. 巻 13(46)
2. 論文標題 Macrocyclic Peptide-Conjugated Tip for Fast and Selective Molecular Recognition Imaging by High-Speed Atomic Force Microscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Applied Materials & Interfaces	6. 最初と最後の頁 54817-54829
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssami.1c17708	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 A. Yurtsever, S. Das, T. Nishimura, R. Rodriguez, D. Hirose, K. Miyata, A. Sumino, T. Fukuma, K. Maeda	4. 巻 57(92)
2. 論文標題 Visualisation of helical structures of poly(diphenylacetylene)s bearing chiral amide pendants by atomic force microscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 12266-12269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1cc05341h	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 T. Komori, H. Satria, K. Miyamura, A. Ito, M. Kamiya, A. Sumino, T. Onshi, K. Ninomiya, K. Takahashi, J. Anderson, T. Uto, K. Kuroda	4. 巻 9(35)
2. 論文標題 Essential Requirements of Biocompatible Cellulose Solvents	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Sustainable Chemistry & Engineering	6. 最初と最後の頁 11825-11836
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssuschemeng.1c03438	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 S. Hosogi, Y. Marunaka, E. Ashihara, T. Yamada, A. Sumino, H. Tanaka, L. Puppulin	4. 巻 179
2. 論文標題 Plasma membrane anchored nanosensor for quantifying endogenous production of H2O2 in living cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biosensors & Bioelectronics	6. 最初と最後の頁 113077-113077
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bios.2021.113077	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 R. Fukuda, M. Saito, S. Shibukawa, A. Sumino, M. Nakano, T. Murakami	4. 巻 59 (15)
2. 論文標題 Urea-Assisted Reconstitution of Discoidal High-Density Lipoprotein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1455-1464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.0c00075	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 A. Sumino, T. Sumikama, T. Uchihashi, S. Oiki	4. 巻 118(3)
2. 論文標題 Induced-Fit Pathway Accelerated Binding of Agitoxin-2 to A K+ Channel Imaged by HS-AFM	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 236a
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpj.2019.11.1392	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 A. Sumino, T. Sumikama, T. Uchihashi*, S. Oiki	4. 巻 5(7)
2. 論文標題 High-speed AFM reveals accelerated binding of agitoxin-2 to a K+ channel by induced fit	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aax0495	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 M. Inada, M. Kinoshita, A. Sumino, S. Oiki, N. Matsumori	4. 巻 1059
2. 論文標題 A concise method for quantitative analysis of interactions between lipids and membrane proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 103-112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aca.2019.01.042	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 T. Noji, M. Matsuo, N. Takeda, A. Sumino, M. Kondo, M. Nango, S. Itoh, T. Dewa	4. 巻 122(3)
2. 論文標題 Lipid-Controlled Stabilization of Charge-Separated States (P+QB ⁻) and Photocurrent Generation Activity of a Light-Harvesting-Reaction Center Core Complex (LH1-RC) from Rhodospseudomonas palustris	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 1066-1080
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-11135-x	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 M. Iwamoto, A. Sumino, E. Shimada, M. Kinoshita, N. Matsumori, S.Oiki	4. 巻 7
2. 論文標題 Channel Formation and Membrane Deformation via Sterol-Aided Polymorphism of Amphidinol 3	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 10782
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-11135-x	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 -

〔学会発表〕 計16件(うち招待講演 6件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 D. Mukai, Y. Zhao, M. Shibata, M. Hattori, A. Sumino
2. 発表標題 Structural Dynamics of The Cytoplasmic Domain of Transient Receptor Potential Vanilloid1(TRPV1) in Lipid Bilayer Observed by High Speed Atomic Force Microscopy (HS-AFM)
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 向 大地, Yimeng Zhao, 柴田 幹大, 服部 素之, 角野 歩
2. 発表標題 高速原子間力顕微鏡による膜中TRPV1 チャネルの動態観察
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神谷 孫斗, 柴田 幹大, 上田 直子, 角野 歩
2. 発表標題 高速AFMによるハブ毒液由来脂質分解酵素PLA2の膜認識機構の解明
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 角野 歩, 炭竈 享司, 内橋 貴之, 老木 成稔
2. 発表標題 Induced-Fit Pathway Accelerated Binding of Agitoxin-2 to A K+Channel Imaged by HS-AFM
3. 学会等名 米国生物物理学会第64回年会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 角野 歩, 炭竈 享司, 内橋 貴之, 老木 成稔
2. 発表標題 高速AFMによるサソリ毒ペプチドが効率的にK+ チャネルを阻害する仕組みの解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 角野 歩
2. 発表標題 高速AFMによる膜関連分子の動態観察
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 フォーラム (チュートリアル企画 (招待講演))
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayumi Sumino
2. 発表標題 High-speed AFM reveals ligand binding dynamics on membrane proteins: accelerated binding of agitoxin-2 to a K ⁺ channel by induced fit
3. 学会等名 TRENDS IN MOLECULAR BIOPHYSICS OF LIVING CELLS (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 角野 歩, 神谷 孫斗, 上田 直子,
2. 発表標題 高速原子間力顕微鏡によるハブ毒液由来ホスホリパーゼA2の脂質膜分解動態の観察
3. 学会等名 第66回トキシシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神谷 孫斗, 上田 直子, 角野 歩
2. 発表標題 高速AFMによるリン脂質分解酵素の脂質膜分解動態の解析
3. 学会等名 日本生物物理学会 平成30年度中部支部講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石黒 大輝, 後藤 朱音, 豊田 貴大, 角野 歩, 柴田 幹大, 古寺 哲幸
2. 発表標題 曲率を持った膜上のタンパク質の集合-解離現象の高速AFM 観察
3. 学会等名 日本生物物理学会第56回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 角野 歩, 炭竈 享司, 内橋 貴之, 老木 成稔
2. 発表標題 Studying Ion Channels in Reconstituted Membrane Using Atomic Force Microscopy
3. 学会等名 日本生物物理学会第56回年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 角野 歩
2. 発表標題 原子間力顕微鏡のイオンチャネル研究への応用
3. 学会等名 第3回イオンチャネル研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齊藤 実央, 福田 亮介, 角野 歩, 村上 達也
2. 発表標題 脂質/タンパク質ドラッグキャリアの1ステップ作製
3. 学会等名 第34回 日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 角野 歩
2. 発表標題 高速AFMによるサソリ毒ペプチドとK+チャネルの結合動態解析
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研究所セミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齊藤 実央, 福田 亮介, 角野 歩, 村上 達也
2. 発表標題 脂質とタンパク質からなる生体ナノ粒子のワンステップ再構成法
3. 学会等名 第39回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 角野 歩
2. 発表標題 高速原子間力顕微鏡を用いたカリウムチャネルとサソリ毒ペプチドの結合動態解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会（ConBio2017）（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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
---------	---------