

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2014

課題番号：22370059

研究課題名(和文) 1分子計測法によるチャンネルタンパクのゲーティングダイナミクスの研究

研究課題名(英文) Study on channel protein gating dynamics by single molecule measurement.

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) 14,700,000円

研究成果の概要(和文)：イオンチャンネルタンパクの活性発現に伴う構造変化を解明するために、単一チャンネルの電気・光学的同時計測システムを開発した。これを用いて、阻害剤のチャンネルタンパクへの結合解離と機能変化を1分子レベルで電氣的・光学的に同時計測した。装置開発の過程に於いて、新しいチャンネル電流測定法の開発に成功し、センサーデバイスの開発に応用した。さらに、巨視的手法を用いて、カリウムチャンネルの構造変化と機能変化の関係を解明した。

研究成果の概要(英文)：In order for elucidating the structure-function relationship of ion-channel proteins, we have developed an apparatus for simultaneous optical and electrical measurement of single ion-channel proteins. Using this apparatus, we successfully measured single ligand bindings to single ion-channel proteins. We developed a novel method for measuring ion-channel current in the course of apparatus development process, which is applicable to ion-channel sensor devices. We revealed a relationship between the structure and the function of potassium channel, KcsA, using macroscopic methods.

研究分野：生物物理学

キーワード：1分子計測(SMD) 生物物理学 イオンチャンネル

1. 研究開始当初の背景

チャンネルタンパクの重要な機能である「ゲーティング」の分子メカニズムは未だ解明されていない。チャンネルタンパクの機能（透過する電流の揺らぎ）は、単一チャンネル電流記録法を用いて、1分子レベルで詳細に解析されている。これらの解析から、膨大な種類のチャンネルタンパクに対して状態遷移モデルが提出され、非常に詳細に検討されている。導き出された「状態」、あるいはそれらの間の遷移を構造解析によって得られた「スナップショット」と対応させてダイナミクスを説明することになるが、それらは推論に依っており、構造情報が少ないことと併せて、チャンネル機能の分子実体を十分に説明しているとは言えない。機能しているチャンネルの構造情報の実時間1分子計測を実現することが、チャンネルタンパクのダイナミクスの理解には必要不可欠であると考えた。

2. 研究の目的

上記の目的のために、単一チャンネルの電気・光学的同時計測システムを作製し、構造変化と機能変化を電氣的・光学的に同時計測することを目指した。単一チャンネルの構造揺らぎと機能揺らぎを同時に計測することによって、構造機能相関が直視可能となり、従来の巨視的測定や単一チャンネル電流記録単独では見えなかったダイナミクスの解析が可能となる。申請時までに開発した装置をより効率的なものに改良すること、開発した装置を用いて、チャンネルタンパクとリガンドとの結合解離、ゲーティングに伴うチャンネルタンパクの構造変化を1分子レベルで計測することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Kチャンネルの構造機能相関研究

構造情報が得られると予想されるタンパ

ク上の部位を蛍光標識する。

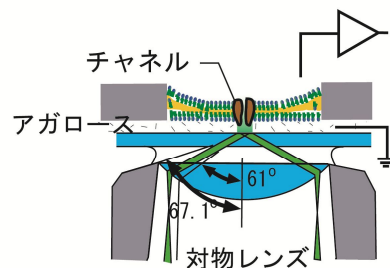
卵母細胞等巨視的実験系を用いて蛍光変化をチェックする。

1 分子同時計測の実施。

構造変化を予測し、遷移モデルを作成する。

(2) 装置開発（あるいは改良）

申請時までに開発した同時計測装置（全反射蛍光顕微鏡と単一チャンネル計測法の組み合わせ；下図）を改良し、測定効率を上げる。



チャンネル1分子の電気・光学的同時計測装置

申請時までに、親水性ゲルの表面に固定したチャンネルタンパクを予め形成した人工膜に組み込み、その単一チャンネル電流を計測することに成功した。この方法と、上記と同様の1分子イメージング法を組み合わせることによって、新たな同時計測実験系を開発する。

4. 研究成果

(1) チャンネルタンパクの構造機能相関

特にカリウムチャンネルの一つであるKcsAチャンネルについて、このチャンネルのpHセンサー部位を特定するために、細胞内領域の酸性アミノ酸を中性に替える変異を行った。その結果、特定の酸性アミノ酸がpHセンシングに大きくかかわっていることが明らかとなった。これは我々が従来より主張するモデル-細胞内領域の変形が、チャンネル活性発現の引き金となっている(図2)-を裏付けるものと考えられる。さらにこれらのうち機能制御に重要であるアミノ酸をさらに絞り込むために点変異体を多数作製し、上記装置を用いて機能解析を行った結果、タンパクのC末端に近い位置

にある酸性アミノ酸が機能制御の鍵となることが分かった。

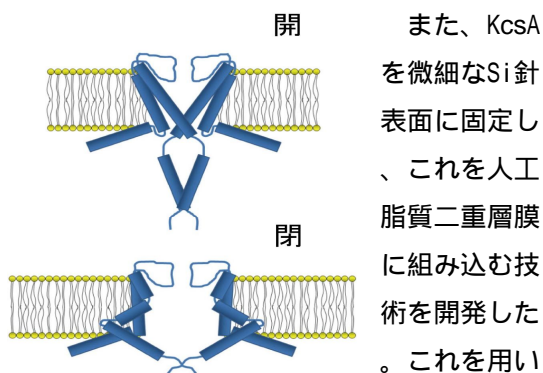


図 2

また、KcsAを微細なSi針表面に固定し、これを人工脂質二重層膜に組み込む技術を開発した。これを用いて、単一チャンネル電流を計測しながらチャンネルに力を加え、機能を制御することに成功した。KcsAの細胞内領域部分に膜と垂直方向に力を加えることによって、チャンネル電流をコントロールできた。この結果も上記モデルを支持している。

さらに、このpHセンシング部位の構造変化がタンパクの機能に及ぼす影響を1分子計測によって明らかにすることを試みた。既に、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ていたが、この方法を1分子イメージングに応用した。その結果、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では輝点が持続して観測され、不活性化状態の高pHでは明滅を繰り返す様子が観測された。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繁に構造状態が変化していることが示唆された。

さらに、KcsAチャンネルのイオン種選択性を担っていると考えられる部位から遠く離れた領域の構造変化が、選択性制御に深く関与していることが分かった。逆に、フィルター周

辺のアミノ酸を置換しても細胞内領域の構造に大きな違いは見られなかった。これらの結果から、光刺激で開閉するチャンネルの作製など、新たな研究課題も創出された。

(2) 装置開発 (あるいは改良)

前項でゲル上に固定したチャンネルの人工膜への組込について記したが、この技術を応用して、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(光学的・電気的同時計測装置)の改良を行った。直径100nm以下に尖らせたガラス棒の先にHisタグを介してKcsA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むことに成功した。この方法では、ほぼ100%の確率でチャンネルを膜に再構成することができる上、ガラス棒を膜に接触させて数分以内でチャンネル電流を測定することができた。この方法を従来の同時計測装置に組み込み、全反射顕微鏡で蛍光1分子が観察できるエバネッセント場の範囲でイオンチャンネルを脂質二重層膜に再構成し、電流を測定することができた。この方法により、チャンネルの膜への組み込み効率が上がり、異分子同時計測の障害となっていたチャンネルの拡散の問題が解消された。

上記装置の開発の一環として、これまでにAFM探針を用いたチャンネルタンパクの人工膜への組み込み法を開発した。測定をさらに簡便かつ高効率に行うために、チャンネルタンパクを表面に固定したガラス微小針、あるいは金属電極を用いて人工膜を瞬時に作製し、同時にチャンネルタンパクをその膜に組み込む方法を開発した。前者では、先端を鋭利に加工したガラスファイバーにチャンネルタンパクをHis-tag、あるいはAvi-tagを介して固定し、力学的に人工膜に組み込む。ファイバーを通して照明することにより、先端の蛍光を観測可能である。後者では、電解研磨した金電極に同様に固定したチャンネルを用いて計測を行っ

た。金電極を用いた方法は、副次的産物としてチャンネルを用いたハイスループットセンサーの作製に应用可能である。何れの方法も、事前に人工脂質二重層膜の形成が不要であることから、従来法と比較して、一層の高効率化に成功しており、100%の確率でチャンネルを膜に再構成することができる上、人工膜を形成すると同時にチャンネル電流を測定することができた。

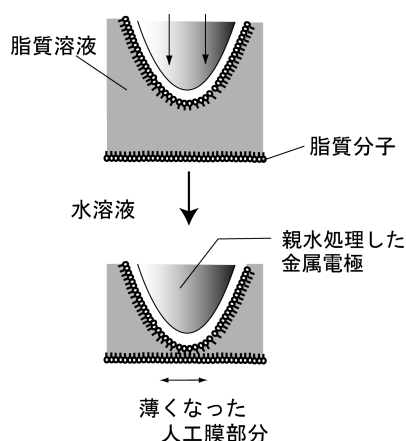


図3 新しい人工膜形成法

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 11件)

A single amino acid gates the KcsA channel. Hirano, M, Okuno, D, Onishi, Y, Ide, T., *Biochem Biophys Res Commun.* **450(4)**,1537-40 (2014). 査読あり

Uncovering the Protein Translocon at the Chloroplast Inner Envelope Membrane. Kikuchi, S., Bédard, J., Hirano, M., Hirabayashi, Y., Oishi, M., Imai, M., Takase, M., Ide, T., Nakai, M., *Science* **339**, 571-574 (2013). 査読あり

Automated Parallel Recordings of Topologically Identified Single Ion Channels. Ryuji Kawano, Yutaro Tsuji,

Koji Sato, Toshihisa Osaki, Koki Kamiya, Minako Hirano, Toru Ide, Norihisa Miki, Shoji Takeuchi, *Scientific Reports* **3**, 1995 (2013). 査読あり

Role of the KcsA channel cytoplasmic domain in pH-dependent gating.

Hirano, M., Onishi, Y., Yanagida, T., Ide, T., *Biophysical Journal* **101**, 2157-2162 (2011). 査読あり

Channels formed by amphotericin B covalent dimers exhibit rectification. Hirano, M., Takeuchi, Y., Matsumori, N., Murata, M., Ide, T., *J. Membr. Biol.* **240**, 159-164 (2011). 査読あり

Direct Manipulation of a Single Potassium Channel Gate with an Atomic Force Microscope Probe. Kitta M, Ide, T., Hirano, M., Tanaka, H., Yanagida, T., Kawai, T., *Small* **7**, 2379-2383 (2011). 査読あり

Rearrangements in the KcsA cytoplasmic domain underlie its gating. Hirano, M., Takeuchi, Y., Aoki, T., Yanagida, T., Ide, T., *J. Biol. Chem.* **285**, 3777-3783 (2010). 査読あり

Simultaneous optical and electrical recording of single drug bonding to single ion channel proteins. Ide, T., *ChemPhysChem* **11**, 3408-3411 (2010). 査読あり

Simultaneous optical and electrical single channel recordings on a PEG glass. Ide, T., Takeuchi, Y., Noji, H., Tabata, K., *Langmuir* **26(11)**, 8540-8543 (2010). 査読あり

[学会発表](計 25件)

A simple method for lipid bilayer formation using a fine gold electrode. Daichi Okuno, Hiroaki Yokota, Yukiko Onishi, Toshio Yanagida, Toru Ide. The Joint symposium of 9th International Symposium on Medical, Bio- and Nano-Electronics, and 6th International Workshop on Nanostructures & Nanoelectronics, (2015/3/2)

Simple method for lipid bilayer formation with simultaneous incorporation of ion channels using gold electrode. Daichi Okuno, Hiroaki Yokota, Yukiko Onishi, Toshio Yanagida, Toru Ide. The 52nd Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (2014/9/25-27).

Modifications of ion channel function. Minako Hirano, Daichi Okuno, Yukiko Onishi, Hiroaki Yokota, Toru Ide. The 52nd Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (2014/9/25-27).

Coordination between the cytoplasmic domain and the inactivation gate in the KcsA channel. M. Hirano, Yukiko Onishi, Daichi Okuno, Toru Ide. The 51st Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (2013).

Reconstitution of ion channel immobilized on solid support into lipid bilayer. Daichi Okuno, Minako Hirano, Yukiko Onishi, Toru Ide. The 51st Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (2013).

The KcsA channel cytoplasmic domain effects on the inactivation gating. M. Hirano, Y. Onishi, D. Okuno, T. Ide. Biophysical Society 57th Annual Meeting (2013/2/2-3), Philadelphia
Reconstitution of ion channel into lipid bilayer using glass needle. Daichi Okuno, Minako Hirano, Toru Ide. The 50th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (2012/9/22-24). Nagoya

The KcsA channel cytoplasmic domain effects on the inactivation gating. M. Hirano, Y. Onishi, T. Ide, The 50th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (2012/9/22-24). Nagoya

膜タンパクの1分子計測・操作, 井出徹、高分子学会・バイオ高分子研究会, 2012/9/22, 蒲郡

The KcsA channel cytoplasmic domain effects on the inactivation gating. M. Hirano, Y. Onishi, D. Okuno, T. Ide, Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions, The 6th International Symposium (2012/9/22-24), Nagoya

平野美奈子, 蛍光色素を利用したイオンチャネルの開閉機構の可視化, 新学術領域研究「細胞機能と分子活性の多次元蛍光生体イメージング」第1回研究代表者会議, 2011年6月30日, 北海道大学
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, 2011/9/18, 兵庫県立大学(兵庫県)

T. Ide, M. Hirano, D. Okuno, M. Kitta,

Direct Manipulation of a Single Potassium Channel Gate with an Atomic Force Microscope Probe. 第 49 回 日本生物物理学会, 2011/9/18, 兵庫県立大学 (兵庫県)

Minako Hirano, Toru Ide, The role of the cytoplasmic domain in pH-dependent gating by the KcsA channel, Biophysical Society 55th Annual Meeting, 2011.3.7, Baltimore, Maryland US

Minako Hirano, Toru Ide, The role of the cytoplasmic domain in pH-dependent gating by the KcsA channel, GCOE / Structural Biology Research Center International Symposium, 2010.11.23, Nagoya

Minako Hirano, Toru Ide et al. The role of the cytoplasmic domain in pH-dependent gating by the KcsA channel, Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions, The 4rd International Symposium, 2010.12.1, Ohtsu Shiga

Minako Hirano, Toru Ide, The role of the cytoplasmic domain in pH-dependent gating by the KcsA channel, 48th Annual Meeting Biophys Soc Jpn, 2010.9.22, Sendai

Toru Ide, The role of the cytoplasmic domain in pH-dependent gating by the KcsA channel, 48th Annual Meeting Biophys Soc Jpn, 2010.9.22, Sendai

〔図書〕(計 2 件)

菊池、平野、井出、中井、細胞工学 8 月号、” 明らかになった葉緑体トランスロコン ” 学研メディカル秀潤社、32 (8) 882-883

Toru Ide, “Simultaneous optical and electrical recording of single drug

bindings to single ion channel proteins.” in Cell Signaling Reactions: Single-Molecular Kinetic Analysis (Ed. by Y. Sako and M. Ueda), 107-120, Springer, 2011

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.gpi.ac.jp/research/bunya/bio.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

井出 徹 (IDE TORU)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号 : 60231148