

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04675

研究課題名(和文)膜電位存在下におけるイオンチャネルの機能と構造変化の1分子同時計測

研究課題名(英文)Development of a method for simultaneous recordings of single channel dynamics and currents

研究代表者

清水 啓史(Shimizu, Hirofumi)

福井大学・学術研究院医学系部門・講師

研究者番号：50324158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：イオンチャネル蛋白質は細胞内外のイオンの通り道となっている蛋白質であり、機能する際に通り道が開閉する様は1分子電流計測法によって、1分子で計測できる。また、KcsAカリウムイオンチャネルは初めて原子分解能で立体構造が明らかになったイオンチャネル蛋白質である。研究代表者らはX線1分子動態計測法を用いてKcsAカリウムイオンチャネル蛋白質の構造変化を1分子で動画計測することに成功していた。本研究ではイオンチャネル蛋白質の機能と構造変化を同時計測することを目指して、同時観測チャンバー開発、観測プローブ開発に取り組んだ。

研究成果の概要(英文)：Ion channel proteins are ion permeation pathway across cell membranes, whose functions are recorded with single-channel current recording method. The structure of KcsA potassium channel was first resolved at atomic resolutions among the ion channel proteins. We previously succeeded in recording conformational changes of the KcsA channel with the diffracted x-ray tracking method in a single-molecule level. In this study we tried to fabricate a new recording chamber and probes aiming to current-dynamics simultaneous recordings for the ion channel proteins.

研究分野：生理学 生物物理学

キーワード：1分子計測 蛋白質 X線回折 イオンチャネル

1. 研究開始当初の背景

イオンチャンネル蛋白質は1分子での機能測定法が確立している蛋白質であり、イオン透過路の開閉が1分子電流トレース上で電流のON, OFFとして区別して観測できる。また、KcsA カリウムイオンチャンネルの立体構造が1998年にX線結晶構造解析によって初めて明らかになった。機能する際の構造変化を計測するために、研究代表者らはX線1分子動態計測法を用いて、KcsA カリウムイオンチャンネルの開閉に伴うねじれ運動を1分子で動画計測することに成功した(2008年)。X線1分子動態計測法では金ナノ結晶を観測プローブとして目的の蛋白質にとりつけ、放射光白色X線を観測光として蛋白質の構造変化を金ナノ結晶からの回折点の運動として2次元X線検出器上で動画計測する(図1)。研究代表者は、1分子の機能と立体構造変化の同時計測を目指して、X線高速観測カメラシステム、X線集光ミラーシステムを計測システムに導入し、1分子電流計測と同等の観測速度での1分子動態計測を研究開始当初に可能にしていた。

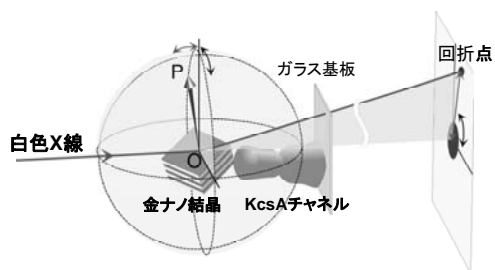


図1. X線1分子動態計測法の原理
蛋白質の動きを金ナノ結晶の回折面の運動として動画計測する。(Shimizu, H., et al. Cell(2008)132 67-78)

2. 研究の目的

本研究ではイオンチャンネル蛋白質の1分子電流と1分子動態の同時計測を実現するため、次の2項目の開発を行うことを目的として研究を遂行した。

(1) 同時計測チャンバーの開発:

X線照射による散乱バックグラウンドノイズの低い材料を検討し、照射領域にあたる窓材料と流路を形成する素材の双方を確定し、X線散乱ノイズの小さい観測チャンバーを開発する。

(2) 観測プローブである金ナノ結晶のサイズ制御・表面修飾法を確立する:

観測プローブである金ナノ結晶は蛋白質と反応させる際、溶液中での分散特性、および蛋白質との反応性が重要である。これらの向上のため、分散特性・反応特性のよい金ナノ結晶の表面修飾法を開発する。特にX線スペクトルとの相関を明らかにする。

3. 研究の方法

同時計測チャンバーの開発については、紫外線フォトリソグラフィーを利用した感光性樹脂材料のパターンニングによって(図2)、流路、および脂質二重膜形成部を作製することを検討した。材料の厚み、溶液を流す流路の厚みと信号計測の際に問題となるX線散乱ノイズの多寡について計測し、適切な観測チャンバーデザインを策定した。試験チャンバー作製については、研究分担者である平井助教(京都大学)、研究協力者である田畑教授(京都大学)の協力を得て行った。観測プローブ開発については、高真空中でターゲット基板にAu薄膜を形成し、結晶成長させる手法を用いてナノ結晶を作製した。薄膜の厚み、形成時の温度条件を様々に制御することによって、サイズ分布の異なるナノ結晶サンプルを得ることができる。それぞれの条件で作製したナノ結晶サンプルの溶液中での分散特性、蛋白質との反応特性について検証した。上記2つの同時観測システムの要素を放射光施設(SPring8)にて評価した。研究代表者は、SPring8にX線集光ミラーを導入しており、アテニューエータを選択することによって、観測光であるX線の輝度やエネルギー範囲を選択して観測することができる。観測チャンバーのX線散乱ノイズと観測したい信号、ナノ結晶のサイズ分布とX線スペクトルの関連についてのデータを取得した。放射光施設での実験は研究分担者である岩本助教(福井大学)の協力を得て行った。

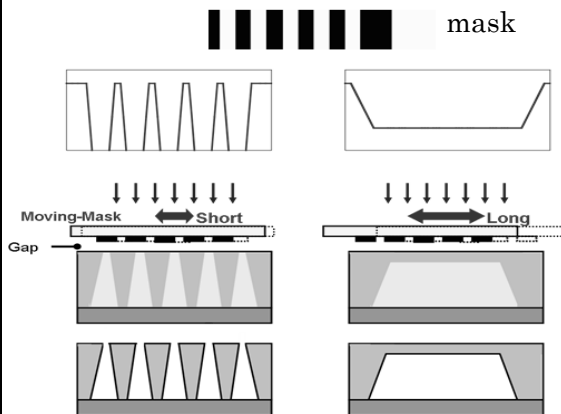


図2. 移動マスク法による流路形成の概念図
感光時にマスクを移動させることによって様々な形態を形成することができる。(Y. Hirai et al., J. Microelectromech. Syst., 19(2010), pp.1058-1069)

4. 研究成果

27年度はX線散乱ノイズを低減するための流路形成材料の検討、および金ナノ結晶のサイズ制御法の検討を行った。流路形成材料については材料の厚みが放射光施設でのX線照射した際にどのような背景ノイズを生じるかについて実験し、厚さとノイズ量の相関について、定量的な解析を行った。金ナノ結晶については、真空中で金をターゲット蒸着して薄膜を作製し、ナノ加工技術を用いてパター

ンニングする手法の応用を行った。この際に使用する基板材料と膜厚、加工プロセスを試行錯誤し、ナノパターンニングに成功した。これらの結果は、電気学会バイオ・マイクロシステム研究会、および日本生物物理学会にて報告した。

28年度は流路形成時における流路厚(水層の厚み)とX線バックグラウンドノイズの相関について計測した。その結果X線スペクトルに応じて最適な流路厚が変化することが分かった。流路形成のためのスペーサー厚を変化させることによって、回折点を観測できる流路厚を決定することができた。金ナノ結晶については、ナノ結晶サイズと回折点の検出効率、およびX線スペクトルの相関についてデータを取得した。様々な金属アテニューエータを用いてX線の照射条件を変更し、金ナノ結晶からの回折像を計測することによって最適なX線照射条件を決定した。これらの結果は The 30th EUROSENSORS (EUROSENSORS XXX)、日本生物物理学会、日本生理学会、日本一台湾ナノメディシンシンポジウムで報告した。平成29年度は、平成28年度に検討したX線スペクトルと流路厚の相関データに基づき、1分子電流計測に用いる脂質二重膜を形成する穴を基板上にパターンニングした。また、パターンニングした穴を用いて1分子電流計測を行い、単分子電流計測が可能であることを確認した。また、穴を形成するのに用いた素材はX線散乱ノイズの原因とならないことを確認した。金ナノ結晶については、種々の条件を検討することにより、従来よりも分散特性がよくなる溶液条件を見出した。また、表面修飾剤との反応特性向上のための表面処理方法を検討した。これらの研究の成果の1部分は、第34回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム、Pacific Rim Nano Medicine Symposium 2018に発表した。なお、同時計測システムの開発は引き続き平成30年度基盤(B)の研究助成を受けて継続して実施することが決定している。

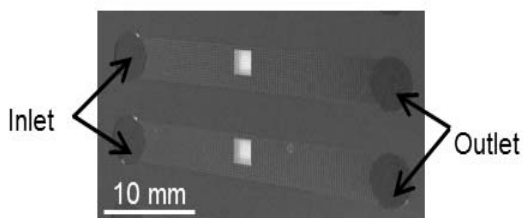


図3. 観測溶液厚評価用チャンバーの例
感光性樹脂材料を用いて図2の方法で作製した観測窓付き流路チャンバー。材料や流路中の溶液層によるX線散乱ノイズに対する影響を測定した。観測窓(中央明部)にはX線透過性の高い材料を用いた(論文⑨参照)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

- ①Maki-Yonekura S, Matsuoka R, Yamashita Y, Shimizu H, Tanaka M, Iwabuki F, Yonekura K. 'Hexameric and pentameric complexes of the ExbBD energizer in the Ton system' *Elife*. 2018 Apr 17;7. pii: e35419. 査読有
- ②Oiki S, Iwamoto M "Lipid Bilayers Manipulated through Monolayer Technologies for Studies of Channel-Membrane Interplay" *Biol. Pharm. Bull.* 41 (2018) 303-311 査読有
- ③Iwamoto M, Oiki S "Membrane Perfusion of Hydrophobic Substances Around Channels Embedded in the Contact Bubble Bilayer" *Sci. Rep.* 7 (2017) 6857 査読有
- ④ Iwamoto M, Sumino A, Shimada E, Kinoshita M, Matsumori N, Oiki S "Channel Formation and Membrane Deformation via Sterol-Aided Polymorphism of Amphidinol 3" *Sci. Rep.* 7 (2017) 10782 査読有
- ⑤岩本真幸, 老木成稔 「脂質平面膜とパッチクランプのハイブリットとしてのCBB(接触液胞2重膜)法」 *生物物理* 57 (2017) 313-317
- ⑥ Iwamoto M, Oiki S "Perfusion of hydrophobic substances around channels embedded in the contact bubble bilayer" *Sci. Rep.* 7 (2017) 6857 査読有
- ⑦ Iwamoto M, Sumino A, Shimada E, Kinoshita M, Matsumori N, Oiki S "Channel formation and membrane deformation via sterol-aided polymorphism of amphidinol 3" *Sci. Rep.* 7 (2017) 10782 査読有
- ⑧ 平井義和, "総説: MEMS 研究と応用の最新動向", *表面技術*, 68(2017), pp.360-366 査読有
- ⑨Hirofumi Shimizu, Masayuki Iwamoto Temperature-Jump effects on the single molecular dynamics of the KcsA Potassium J. *Physiol. Sci.* 67 Suppl S118 201 査読無
- ⑩Kio Tahara, Yoshikazu Hirai, Hirofumi Shimizu, Toshiyuki Tsuchiya, Osamu Tabata., 'Photoresist Micro-Chamber for the Diffracted X-ray Tracking Method Recording Single-Molecule Conformational Changes' *Procedia Engineering* 168 (2016) 1394 - 1397 査読有
- ⑪Y. Furutani, H. Shimizu, Y. Asai, S. Oiki, H. Kandori., 'Specific interactions between alkali metal cations and the KcsA channel studied using ATR-FTIR spectroscopy' *Biophys. Physicobiol.* 12(2015) 37-45 査読有
- ⑫A. Yamakata, H. Shimizu, S. Oiki., 'Surface-enhanced IR absorption upon application of an electric field' *Phys Chem Chem Phys.* 17 (2015) 21104-21111 査読有

[学会発表] (計 15 件)

① Yoshikazu Hirai, Yasuaki Mori, Tomoki Tabuchi, Hirofumi Shimizu, Toshiyuki Tsuchiya, Osamu Tabata, “Microchannel Fabrication using a Photo Patternable Adhesive Material for Recording Conformational Changes of KcsA Channel with the Diffracted X-ray Tracking Method”, The EUROSENSORS 2018, Graz, Austria (September 2018).

② 清水啓史, 岩本真幸 「KcsA チャネル開閉構造変化の遷移過程における立体構造安定性地形」第 95 回 日本生理学会 2018 年 3 月 28 日-30 日 サポートホール高松、高松シンボルタワー

③ Hirofumi Shimizu

‘Development of a Method for Recording Single-Molecule Dynamics of Proteins in a Sub-millisecond time resolution’ Pacific Rim Nano Medicine Symposium 2018 -The 9th Japan-Taiwan Symposium on Nanomedicine- Jan. 24-26 2018, Kobe Riken, JAPAN

④ 森保彰, 田渕友樹, 平井義和, 清水啓史, 土屋智由, 田畑修, “感光性基板接合材料を用いた X 線 1 分子動態計測用マイクロ流体デバイスの作製, 平成 30 年電気学会全国大会, 電気学会, 福岡(March, 2018), 3-139.

⑤ 清水 啓史, 田渕 友樹, 田原 樹生, 岩本 真幸, 平井 義和, 土屋 智由, 田畑修 「低 X 線散乱ノイズ観測チャンパー開発による蛋白質 1 分子構造変化計測」 第 34 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム 2017 年 10 月 31 日 (火) ~11 月 2 日 (木) 広島

⑥ Hirofumi Shimizu, Masayuki Iwamoto, ‘Structural Stabilities during Gating Transitions in KcsA Potassium Channel Revealed by Single-Molecule Dynamics Recordings’ 第 55 回日本生物物理学会年会 2017 年 9 月 19 日~21 日 熊本

⑦ Hiroko Takazaki, Hirofumi Shimizu, Naoko Kajimura, Kaoru Mistuoka, Takuo Yasunaga, ‘An Approach to Structural Analysis of a Small Membrane Protein KcsA by Cryo-electron Microscopy’ 第 55 回日本生物物理学会年会 2017 年 9 月 19 日~21 日 熊本

⑧ Hirofumi Shimizu

‘Single -Molecule Recordings of Gating Motions of KcsA Potassium Channels at Sub-millisecond Time Resolution’ Conformational Ensembles from Experimental Data and Computer Simulations. Biophysical Society thematic meeting, August 25-29, 2017, Berlin, Germany

⑨ 清水啓史, 岩本真幸

「KcsA カリウムイオンチャネルの 1 分子運動

に対する試料温度ジャンプの影響」第 94 回 日本生理学会 2017 年 03 月 28 日~30 日 アクトシティ浜松、浜松

⑩ Hirofumi Shimizu

‘Single-Molecule Fluctuations and Conformational Changes of KcsA Potassium Channel’ The 8th Japan-Taiwan symposium on Nanomedicine (招待講演) (国際学会) 2017 年 03 月 16 日~18 日, Academia Sinica, Taiwan

⑪ 清水啓史, 岩本真幸

「X 線 1 分子動態計測法への試料温度ジャンプシステムの導入」 第 54 回日本生物物理学会 2016 年 11 月 25 日~27 日 つくば国際会議場、つくば

⑫ Kio Tahara, Yoshikazu Hirai, Hirofumi Shimizu, Toshiyuki Tsuchiya, Osamu Tabata,

‘Photoresist Micro-Chamber for the Diffracted X-ray Tracking Method Recording Single-Molecule

Conformational Changes’ The 30th EUROSENSORS (EUROSENSORS XXX) (国際学会) 2016 年 09 月 04 日~07 日 Budapest, Hungary

⑬ 清水啓史

「イオンチャネルの 1 分子構造変化計測」 第一回イオンチャネル研究会 (招待講演) 2016 年 07 月 07 日~08 日 福岡大学、福岡

⑭ 清水啓史

「蛋白質の分子揺らぎと構造変化を計測する X 線 1 分子動態計測法の開発」 第 53 回日本生物物理学会年会, シンポジウム「動的構造生命科学を拓く新発想測定技術」 (招待講演) 2015 年 09 月 13 日~15 日 金沢大学、金沢

⑮ 田原樹生, 平井義和, 清水啓史, 土屋智由, 田畑修 「3 次元微細加工技術を応用した X 線 1 分子動態計測用低ノイズマイクロチャンパーの開発」 電気学会総合研究会 E 部門総合研究会 2015 年 07 月 02 日~03 日 福岡県 九州大学医学部百年講堂

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 2 件)

名称: 脂質平面膜を形成するための貫通孔を有するガラス基板、およびその製造方法と用途

発明者: 老木成稔, 岩本真幸

権利者: 国立大学法人福井大学

種類: 特許

番号: 第 6128554 号

取得年月日: 2017. 5. 17

国内外の別: 国内

名称：脂質平面膜を形成器
発明者：老木成稔、岩本真幸
権利者：国立大学法人福井大学
種類：意匠
番号：第 1585803 号
取得年月日：2017. 8. 18
国内外の別：国内

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 啓史 (Shimizu, Hirofumi)
福井大学・学術研究院医学系部門・講師
研究者番号：50324158

(2) 研究分担者

平井 義和 (Hirai, Yoshikazu)
京都大学大学院・工学系研究科・助教
研究者番号：40452271

岩本真幸 (Iwamoto, Masayuki)
福井大学・学術研究院医学系部門・助教
研究者番号：40452122

(3) 研究協力者

田畑 修 (Tabata, Osamu)
京都大学大学院・工学系研究科・教授
研究者番号：20288624