

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15179

研究課題名(和文) TREK-1チャネルをターゲットとした新薬開発のための分子機構解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of TREK-1 channel for

研究代表者

老木 成稔(Oiki, Shigetoshi)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：10185176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：チャネルが膜とどのような相互作用を起こすか明らかにするために脂質二重膜法の新しい実験法を開発した。膜に向きをそろえてチャネル挿入するためにin vitro転写/翻訳系でチャネルを発現させたこの結果すべてのチャネルが一方向向きに膜に挿入され、チャネル電流を測定することができた。この系はあらゆるチャネル蛋白質に適用できる。このような系で膜リン脂質の組成を変えてチャネルのゲーティングに対する影響を観察した。特に私達が開発した膜灌流法によってコレステロールを膜に加えることができ、これによりチャネルの活性化ゲートが閉じることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To study channel-lipid interplay in the lipid bilayer membrane, we developed several basic methods using the contact bubble bilayer (CBB) method. For the CBB, in vitro transcription/translation system was used, and the KcsA channel proteins were inserted, folded and assembled as functional channels detected as single channel currents. This system provides a versatile platform for channel protein expression-functional studies including the TREK-1 channel. CBB allowed formation of lipid bilayer with arbitrary lipid composition, and we developed the rapid perfusion method. The KcsA potassium channel closed its activation gate upon cholesterol perfusion, and stopping the perfusion led recovery of the channel activity because of dilution of cholesterol in the bilayer. Repeated on and off of the perfusion produced repeated activation and deactivation of the channel gating. This system allows examinations of hydrophobic drug actions to channel proteins.

研究分野：分子生理学

キーワード：イオンチャネル 脂質二重膜 リン脂質 コレステロール in vitro転写/翻訳

### 1. 研究開始当初の背景

イオンチャンネルは膜の存在下で初めてそのイオン透過の機能を発揮する。膜が絶縁体であるからこそ、そこに負荷される電位差をチャンネルに電場として負荷できるのである。このような支持体としての膜のみならず、膜を構成するリン脂質はチャンネル機能を巧妙に制御することは知られていたが、実験的に膜組成を変えることは容易ではない。そのために私達は細胞膜ではなく脂質平面膜での実験を長年行ってきた。しかしこの方法にも技術的な制約があり、膜組成を変えることが精一杯であった。

ところが私達は新しい脂質 2 重膜法を開発し、これを接触液滴 2 重膜法 (Contact Bubble Bilayer; CBB) として確立することができた。この方法でチャンネルと膜の相互作用を様々な実験条件で研究することができるようになった。例えば非対称 2 重膜を簡単に形成することができ、チャンネルのリン脂質依存性が膜の内葉の酸性リン脂質によることを明らかにした。この方法をさらに発展させることによりチャンネル 膜相互作用研究の新たな実験系として確立し、様々な実験が可能になると期待できる。

### 2. 研究の目的

CBB 法を使ってチャンネルと膜の相互作用の分子機構を明らかにすることが本研究の目的である。まず CBB の新しい方法を確立し、すでに特性のよくわかっている KcsA カリウムチャンネルで実験法の有効性を検証することが第一の目的である。

CBB 法の方法的可能性を探ることで新しい実験が可能になる。チャンネルに対して膜は化学的・物理的影響を及ぼすが、これらの膜変化を CBB で実現することによって従来検証困難であったチャンネル 膜相互作用の新しい局面について解明することを目的とする。

さらに様々なチャンネル蛋白質を機能測定

するための *in vitro* 転写/翻訳系を確立することを目指す。

### 3. 研究の方法

CBB 法によって再構成したチャンネルの単一チャンネル電流を測定し、膜環境 (リン脂質組成などの化学的、張力などの物理的) の変化によってチャンネル機能がどう変化するかを捉える。ここで従来からの懸案事項である「チャンネルの向きをそろえて膜に組み込む」ための方法を確立する。

チャンネルを膜に向きを揃えて組み込むために、新しい方法を開発した。それはチャンネルを埋め込んだ膜を基板に展開するのではなく、可溶化したチャンネル蛋白質をまず基板に結合し、その後、リン脂質を加え、膜に埋め込む方法である。ここでも重要な方法上のトリックを工夫することで、基板表面を膜で埋め尽くすことができた。

***in bulla* (bubble のラテン語) 転写/翻訳による一方向向き再構成法** CBB のバブル内でチャンネル蛋白質を *in vitro* 転写/翻訳系を使って DNA から合成し、これが膜に組み込まれ会合して機能チャンネルを単一チャンネル電流として捉える。

生体膜と比べて膜脂質組成を自由に变化させることのできる脂質 2 重膜法でチャンネルとリン脂質、チャンネルと膜の関係についてその構造・機能の両面から基礎的な実験結果を蓄積する。チャンネル機能に関しては CBB 法を土台にして新しい方法を開発した。この方法によって脂質 2 重膜のリン脂質組成を自由に換えられるだけでなく、単分子層レベルで組成を変え、非対称膜を実現させることに成功した。またこの方法をさらに発展させ、疎水性物質を膜に投与する方法を開発した。チャンネル機能の測定は膜組成によっては室温で行うことが難しいことがある。そのため温度コントロール下で単一チャンネル電流を測定する系を確立す

る。

**膜灌流法の開発** 生体膜で膜組成を任意に変えることは極めてむづかしい。唯一生体膜内のコレステロールを  $\beta$ -cyclodextrin で引き抜くことができるが、短時間での変化は望めない。私達は CBB の特徴的な相を利用し、脂質 2 重膜の脂質組成を瞬間的に変える方法を着想し、膜灌流実験法として確立することができた。

#### 4. 研究成果

向きをそろえてチャンネルを脂質 2 重膜に再構成することを 2 つの系で確立し成功した。原子間力顕微鏡のための雲母表面上と CBB 膜とである。

雲母上でチャンネルが向きをそろえて組み込まれている様子を原子間力顕微鏡によって動画で捉えることに成功した (Sumino et al. 2017)。KcsA チャンネルのプロッカーである agitoxin 2 を加えることによって、表面に細胞外領域を向けて膜に挿入されていることが証明された。

一方、脂質 2 重膜上にも *in vitro* 転写/翻訳系を利用して KcsA チャンネルを再構成することに成功した。証明法は省略するが、KcsA チャンネルが細胞質側の pH でゲートがコントロールされている特性を利用した (Iwamoto et al. 2018)。

チャンネル機能に関しては CBB 法によって、膜リン脂質の組成を膜リーフレット毎に変えられることを利用し、チャンネル活性へのリン脂質の効果を詳細に検討した。KcsA チャンネルには膜内葉の酸性リン脂質を捉える脂質センサーがあることを発見した。さらに膜灌流法により脂質 2 重膜に急速にコレステロールを加えることができた。コレステロールは様々なチャンネルに影響を与えることが知られているが、KcsA カリウムチャンネルの変異型を使うことによって、活性化ゲートがコレステロールによって直ちに閉じることを明らかにした。しかしコ

レステロールの注入を止めるとコレステロールが有機溶媒バルク相に戻るため、チャンネル機能は短時間で回復した。このような可逆的なチャンネル機能制御が明らかになったのは初めてである。

さらに様々な薬物がチャンネル活性を変えることを明らかにした。

他のリン脂質組成では脂質 2 重膜を形成できないことがあった。これは当該リン脂質の相転移温度が室温より高いからである。このような場合、チェンバーの温度を上げることで脂質 2 重膜が形成された。十分高い温度になればどんなリン脂質組成でも脂質 2 重膜が形成できることになり、実験の多様性が広がった。

以上のように膜環境を自由に換えチャンネルの単一チャンネル電流の変化をリアルタイムで捉えることができる系を確立することができた。

#### 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 18 件)

Kojima, S., Iwamoto, M., Oiki, S., Tochigi, S. and Takahashi, H.: Thylakoid membranes contain a non-selective channel permeable to small organic molecules. *J. Biol. Chem.* 293: 7777-7785, 2018. DOI:

10.1074/jbc.RA118.002367

Iwamoto, M., Elfaramawy, M. A., Yamatake, M., Matsuura, T. and Oiki, S.: Concurrent *in vitro* Synthesis and Functional Detection of Nascent Activity of the KcsA Channel under the Membrane Potential. *ACS Synth. Biol.* 7 (4): 1004-1011, 2018.

DOI: 10.1021/acssynbio.7b00454

Kalathingal, M., Sumikama, T., Mori, T., Oiki, S. and Saito, S.: Structure and dynamics of solvent molecules inside Polytheonamide B channel in different environments: A molecular dynamics study. *PCCP* 20: 3334-3348, 2018. DOI:

10.1039/C7CP06299K

Oiki, S., Iwamoto, M.: Channel-Membrane Interplay in Lipid Bilayer Membranes Manipulated through Monolayer Technologies. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 41: 303-311, 2018. DOI: 10.1248/bpb.b17-00708

(表紙)

Iwamoto, M., Sumino, A., Shimada, E.,

Kinoshita, M., Matsumori, N. and Oiki, S.: Channel Formation and Membrane Deformation via Sterol-Aided Polymorphism of Amphidinol 3. *Sci. Rep.* 7: 10782, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-11135-x

Iwamoto, M. and Oiki, S.: Membrane Perfusion of Hydrophobic Substances Around Channels Embedded in the Contact Bubble bilayer. *Sci. Rep.* 7: 6857, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-07048-4

Sumino, A., Uchihashi, T. and Oiki, S.: Oriented reconstitution of the full-length KcsA potassium channel in a lipid bilayer for AFM imaging. *J. Phys. Chem. Lett.* 8: 785-793, 2017.

Sumikama, T. and Oiki, S.: Digitalized K<sup>+</sup> Occupancy in the Nanocavity Holds and Releases Queues of K<sup>+</sup> in a Channel. *J. Am. Chem. Soc.* 138: 10284-10292, 2016.

Matsuki, Y., Iwamoto, M., Mita, K., Shigemi, K., Matsunaga, S., and Oiki, S.: Rectified Proton Grotthuss Conduction Across a Long Water-Wire in the Test Nanotube of the Polytheonamide B Channel. *J. Am. Chem. Soc.* 138 (12): 4168-4177, 2016.

Chang, H.-K., Iwamoto, M., Oiki, S. and Shieh, R.-C.: Mechanism for attenuated outward conductance induced by mutations in the cytoplasmic pore of Kir2.1 channels. *Sci. Rep.* 5: 18404 (1-14), 2015.

Furutani, Y., Shimizu, H., Asai, Y., Oiki, S. and Kandori, H.: Specific interactions between alkali metal cations and the KcsA channel studied using ATR-FTIR spectroscopy. *Biophysics and Physicobiology* 12: 37-45, 2015.

Iwamoto, M. and S. Oiki: Contact Bubble Bilayers with Flush Drainage. *Sci. Rep.* 5: 9110 (1-7), 2015.

Nakao, H., Ikeda, K., Iwamoto, M., Shimizu, H., Oiki, S., Ishihara, Y., Nakano, M.: pH-dependent promotion of phospholipid flip-flop by the KcsA potassium channel. *BBA Biomemb.* 1848: 145-150, 2015.

Oiki, S.: Channel Function Reconstitution and Re-animation: A Single-channel Strategy in the Post-crystal Age. *J. Physiol.* 593: 2553-2573, 2015.

炭竈享司、老木成稔：チャネルの入口がイオンの透過速度を決める。 *生物物理* 58 (1): 012-016, 2018. DOI: 10.2142/biophys.58.012

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ドとしてのCBX(接触液胞2重膜)法。 *生物物理* 57 (6): 313-317, 2017. DOI: 10.2142/biophys.57.001 (表紙)

老木成稔：イオンチャネルの分子構造「特集 電解質の新しい見方・考え方」【水電解質と機能蛋白調節(基礎)】腎

と透析, 80 (3): 390-396, 2016

角野歩、山本大輔、炭竈享司、岩本真幸、出羽毅久、老木成稔：膜内 KcsA カリウムチャネルの原子間力顕微鏡による構造・動態解析 *生物物理* 55(1) 005-010, 2015.

〔学会発表〕(計 7 件)

老木成稔、岩本真幸：KcsA カリウムチャネル膜相互作用のための一分子実験法。膜イオン輸送の学際研究—計算科学から医学まで—蛋白研シンポ 2017, 7

炭竈享司、老木成稔：計算科学は膜イオン輸送の実験をどこまで再現できるか？：K<sup>+</sup>チャネルでのイオン透過 膜イオン輸送の学際研究—計算科学から医学まで—蛋白研シンポ 2017, 7

Oiki, S.: Ion Permeation and Gating of the KcsA Potassium Channel Reconstituted in the Manipulated Membrane. "Ion Channel Modulation Symposium", 2017, 6, 21-22, Cambridge, UK.

Sumikama, T. and Oiki, S.: A 3-D movie of ion permeation through ion channel at the atomic level filmed by computer simulation. 94<sup>th</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2017, 3, 28-30, Hamamatsu.

老木成稔：チャネル研究のための人工膜法 .3 プロジェクト合同 終了シンポジウム「次ステージ機能生命科学の展望」2017, 3, 10, 岡崎コンファレンスセンター、岡崎

老木成稔：“人工膜マニピュレーション”第38回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム ミニシンポジウム1「人工膜を用いた研究最前線」名古屋市立大学 田辺通りキャンパス 2016, 11,17-18

老木成稔、岩本真幸：バイオジャパン 2016 パシフィコ横浜 2016、10、12-14

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称：接触液胞2重膜法による膜物性変化の実時間測定法

発明者：老木 成稔・岩本真幸

権利者：福井大学

出願番号：特願2017 - 246976号

出願日：2017年12月22日

名称：脂質二重膜形成器

発明者：老木 成稔・岩本真幸

権利者：福井大学

種類：意匠

番号：特願 2017-006362 号  
出願年月日：2017 年 3 月 28 日  
国内外の別： 国内

取得状況（計 1 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：福井大学

種類：特許

番号：特願2013 - 155692号

取得年月日：平成 2017 年 4 月 21 日

国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

老木成稔 (Oiki, Shigetoshi)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：10185176

### (2)研究分担者

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

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