

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07360

研究課題名(和文) 膜脂質によるイオンチャネル開閉制御の分子基盤を探る

研究課題名(英文) Exploring the molecular mechanism of the membrane lipid dependent gating of ion channels

研究代表者

岩本 真幸 (Iwamoto, Masayuki)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：40452122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜で働くイオンチャネルタンパク質が細胞膜脂質の影響をどの様に受けているのか、代表的イオンチャネル(KcsAカリウムチャネル)を使って調べた。膜脂質を厳密に制御するために独自の人工細胞膜実験技術を応用し、膜脂質組成の瞬時変更がイオンチャネル活性に及ぼす影響を解析できる実験方法を開発した。これを利用し、コレステロールがKcsAチャネル開閉に影響を及ぼす現象を発見した。また、それが直接の作用ではなく膜張力の変化を介する作用であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞膜は細胞内外を区切る隔壁としてだけでなく、細胞膜に組み込まれたタンパク質の働きを調節する役割も併せ持つことが明らかになってきている。それがどのようなメカニズムによるものなのか、未だ全体像が捉えられていない。本研究では膜コレステロールによる調節メカニズムの一端を、代表的な膜タンパク質・イオンチャネルを使って明らかにすることができた。膜タンパク質は医薬品の作用標的、あるいは、生体センサー素子として注目されているが、本研究成果はその調節メカニズムと関連するものであり、学術的な観点だけでなく創薬や産業への応用も期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the effects of membrane lipids on the function of a prototypical ion channel, the KcsA potassium channel. We developed a methodology for the instantaneous exchange of the lipid composition of the lipid bilayer (membrane perfusion) based on our original lipid bilayer technique, the CBB method. Using the membrane perfusion, we found for the first time that cholesterol affected the open-close behavior of the KcsA channel. We revealed that the cholesterol effect originated from indirect action of cholesterol, i.e., reduction of the membrane tension.

研究分野：生物物理学

キーワード：チャネル 膜 脂質

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) イオンチャネル機能と細胞膜脂質

イオンチャネルの基本的機能は、イオンが受動拡散できるポア(孔)を細胞膜に形成するという単純なものであるが、神経細胞での活動電位発生や神経伝達物質放出、筋収縮、ホルモン分泌など、数々の重要な生理現象の引き金となっている。これは、チャネルがポアを必要に応じて開閉(ゲーティング)する仕組みを備えているため、ゲーティング制御こそがチャネル機能の本質的要素と言える。実際、電位・リガンド・機械刺激依存性チャネル等、開閉制御因子の違いで多種多様なチャネルが存在する。また、これら絶対的な制御因子に加え、膜を構成する脂質類がチャネルの活性を調節する補助因子として働くことがわかってきた(膜脂質効果)。膜脂質組成は細胞種や内・外葉で異なるほか、ラフト仮説のように膜局所においても過渡的に変化するなど、時・空間的に不均一であると考えられている。よってイオンチャネル活性も、脂質種の偏在・変動により緻密に調節されている可能性が考えられる。それでは、脂質がチャネル分子にどの様に作用し活性を調節し得るのだろうか?チャネル-脂質相互作用から脂質効果発現に至る過程は生物物理学的観点からの興味が尽きない。一方、現在明らかになっているのは各チャネルに影響を及ぼす脂質種、といった定性的な側面ばかりで、脂質効果の背景に存在する分子機序の理解には至っていない。これは、細胞膜脂質組成を厳密に制御した環境で各種実験を行うことの難しさ故の現状である。

(2) 研究着想までの経緯

KcsA カリウムチャネルの活性に陰イオン性リン脂質依存性があることは定性的に知られていた。研究代表者は、脂質組成を完全に制御した人工脂質二重膜で単一 **KcsA** チャネル電流解析を行い、脂質結合部位や結合による構造変化への影響など、分子機序解明に繋がる重要な手掛かりを得ていた。また、更なる研究推進のためには膜脂質組成の時間軸上での制御も必要と考え、それが原理的に可能な独自の人工膜実験技術(CBB法、図1)を確立させた(H25~27基盤C)。よって、膜脂質効果を定量的・速度論的に捉えるための準備は整い、本研究の着想に至った。

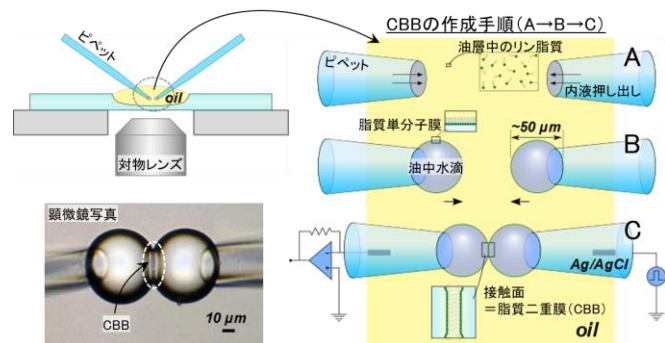


図1. 本研究の基盤実験技術 Contact Bubble Bilayer (CBB) 法の概要

2. 研究の目的

イオンチャネルの開閉は一般に膜電位やリガンド等によって制御されるが、細胞膜脂質も開閉制御を調節することがわかってきた。しかし、細胞膜脂質組成の厳密な制御下での実験の難しさから、膜脂質効果の定量的側面や背景に存在する分子基盤の理解には至っていない。本研究では、膜脂質組成の定常的および時間依存的制御が可能な独自の人工膜実験技術を駆使し、代表的イオンチャネル(**KcsA** カリウムチャネル)の開閉に対する膜脂質効果を1分子レベルで解析する。チャネル分子内の脂質作用点のみならず、効果発現に至る分子機序や速度論的パラメータを明らかにすることで、膜脂質効果の体系的理解を目指す。

3. 研究の方法

先行研究成果のCBB法(図1)を基盤実験技術とし、以下の研究を計画した。

(1) 脂質二重膜組成の瞬時変更実験の最適な条件・手順の確立: 既に予備実験は行っているが、実際にどの程度の膜組成変更を行えるのか、手法の具体的な適用範囲などを検討する。

(2) 様々な膜脂質組成条件下での **KcsA** チャネルの単一チャネル電流解析および膜脂質効果の評価: 上述の手法を応用し、**KcsA** チャネルのゲート開閉挙動などを変化させ得る膜脂質条件を見つめる。

(3) 膜脂質効果の作用メカニズム検討: 明らかになった **KcsA** チャネルに対する脂質の作用が直接的な作用なのか、あるいは膜物性変化による間接的な作用なのかを検討する。直接作用の場合はチャネルへの作用部位、間接作用の場合は具体的な膜物性変化を明らかにし、膜脂質効果の分子メカニズム解明を目指す。

4. 研究成果

(1) CBB 法を応用した膜脂質組成の瞬時変更法の確立

CBB 法で形成される脂質二重膜は、内部の疎水性領域が膜の末端で開放されている特徴がある。この点に着目し、脂質などの疎水性物質を開放部から膜内部に直接灌流する方法を試みた (図 2)。実際に開放部に向けてコレステロールを灌流したところ、それが瞬時に脂質二重膜に組み込まれることが確認できた。また脂質のみならず、細胞膜に作用する疎水性の高い抗生物質も同様の投与方法で膜に組み込むことができた。今回開発した「膜灌流」による膜実験法は、膜脂質組成の動的側面とその生理的意義の解明、さらには、細胞膜に作用する様々な内・外因性化合物の作用メカニズムへのアプローチといった研究への応用が期待できる。

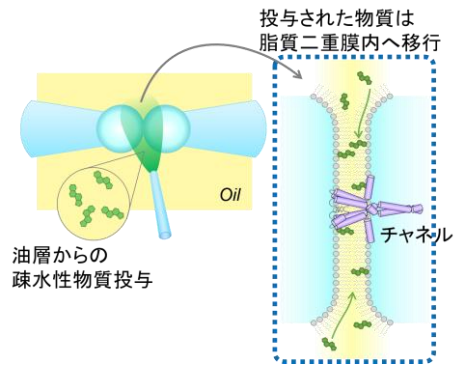


図 2. CBB 法での「膜灌流」実験

(2) KcsA チャンネル開閉に対するコレステロールの影響解明

開発した膜灌流実験により、KcsA チャンネルを含む脂質二重膜にコレステロールを瞬時投与するとチャンネルが閉塞する現象を発見し (図 3)、そのメカニズム解明に向けて研究を進展させた。その結果、コレステロールに限らず様々な膜ステロール類が濃度依存的に同様の効果を示すこと、いずれの膜ステロール類も濃度依存的に膜張力を減少させる効果があることが明らかになったことから、ステロールによるチャンネルの閉塞は、膜張力の変化を介した間接的な効果である可能性が浮上した。これを証明するため、KcsA チャンネルを酸性 pH で活性化させ、CBB 法で膜張力を直接操作してチャンネル開確率への影響を調べた。その結果、膜張力の減少によって開確率が低下することがわかった (図 4)。また、KcsA チャンネルが活性化しない中性 pH 下では、膜張力を増大させてもチャンネルの活性化は観測されなかった。以上の結果から、KcsA チャンネルの開確率 (活性) は第 1 に酸性 pH (水素イオン)、第 2 に細胞膜張力で制御されていることが明らかになった (図 5)。

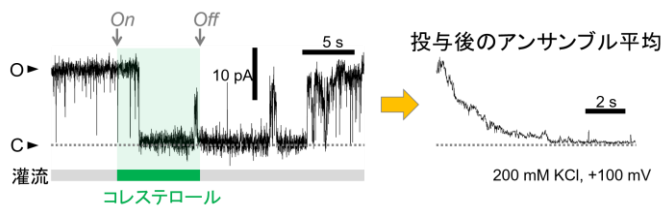


図 3. KcsA の単一チャンネル電流に対するコレステロール灌流の効果

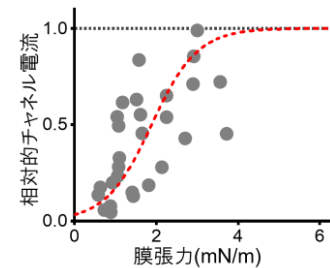


図 4. 膜張力とチャンネル活性の関係

(3) KcsA チャンネルの膜張力感知メカニズム解明に向けた取り組み

膜張力感知メカニズム解明に向け、チャンネル分子内の膜張力感知部位特定を試みた。脂質二重膜の各リーフレットごとに張力変化を与え単一チャンネル電流測定を行った。脂質二重膜の非対称張力操作は CBB 法の特徴である。現時点での予備実験結果からは、KcsA チャンネルのゲート開閉挙動は細胞質側リーフレットの張力に依存することが示唆された。今後データ数を増やして再現性を確認するとともに、膜張力感知部位をアミノ酸レベルで特定する必要がある。部位特定には、脂質との接点として予想されるトリプトファン残基をターゲットとした変異体チャンネルを作製し、膜張力に対する感受性を解析する。KcsA チャンネルは典型的カリウムチャンネルであることから、膜張力感受性はカリウムチャンネルに本来備わる性質である可能性が高い。その仕組みを応用し、チャンネル活性制御の新様式を確立したい。

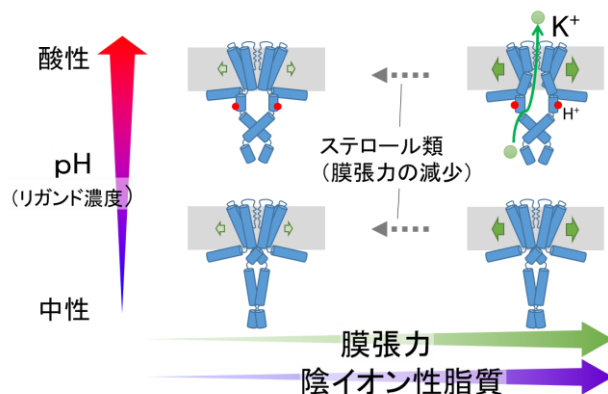


図 5. KcsA チャンネル開閉に対する膜脂質効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Iwamoto M, Oiki S	4. 巻 115
2. 論文標題 Constitutive boost of a K ⁺ channel via inherent bilayer tension and a unique tension-dependent modality	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.	6. 最初と最後の頁 13117 ~ 13122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1812282115	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 Iwamoto M, Oiki S	4. 巻 143
2. 論文標題 Lipid Bilayer Experiments with Contact Bubble Bilayers for Patch-Clampers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Vis. Exp.	6. 最初と最後の頁 e58840
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/58840	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 Iwamoto M, Oiki S	4. 巻 7
2. 論文標題 Membrane Perfusion of Hydrophobic Substances Around Channels Embedded in the Contact Bubble Bilayer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 6857
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-07048-4	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 Iwamoto M, Sumino A, Shimada E, Kinoshita M, Matsumori N, Oiki S	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 -

1. 著者名 Oiki S, Iwamoto M	4. 巻 41
2. 論文標題 Lipid Bilayers Manipulated through Monolayer Technologies for Studies of Channel-Membrane Interplay	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biol. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 303-311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b17-00708	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 岩本真幸, 老木成稔	4. 巻 57
2. 論文標題 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	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 313-317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.57.313	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 Iwamoto M, Elfaramawy MA, Yamatake M, Matsuura T, Oiki S	4. 巻 7
2. 論文標題 Concurrent In Vitro Synthesis and Functional Detection of Nascent Activity of the KcsA Channel under a Membrane Potential	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Synth. Biol.	6. 最初と最後の頁 1004-1011
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssynbio.7b00454	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 Kojima S, Iwamoto M, Oiki S, Tochigi S, Takahashi H	4. 巻 293
2. 論文標題 Thylakoid membranes contain a non-selective channel permeable to small organic molecules	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 7777-7785
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.002367	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 Iwamoto M, Oiki S	4. 巻 68 suppl
2. 論文標題 Membrane tension-assisted gating of the KcsA potassium channel revealed by the membrane sterol effects	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Physiol. Sci.	6. 最初と最後の頁 s113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 岩本真幸、老木成稔
2. 発表標題 ステロールによる膜張力を介したKcsAカリウムチャネル活性の制御(Regulation of the activity of the KcsA potassium channel via bilayer tension-mediated sterol action)
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 Iwamoto Masayuki、Oiki Shigetoshi
2. 発表標題 Tension-mediated regulation of the KcsA channel: a novel dual modality of the channel activation
3. 学会等名 第49回生理研国際シンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Iwamoto Masayuki、Oiki Shigetoshi
2. 発表標題 A tension-modulated modality of the KcsA channel exclusive for acid-activated state
3. 学会等名 第9回アジア・オセアニア生理学会連合大会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩本真幸
2. 発表標題 膜脂質組成とKcsAチャネル開閉
3. 学会等名 第2回 イオンチャネル研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岩本真幸、老木成稔
2. 発表標題 脂質二重膜がカリウムチャネル開閉に及ぼす多様な影響 (Specific and non-specific actions of membrane lipids on the gating of the potassium channel)
3. 学会等名 日本生物物理学会第55回年会 シンポジウム「いろんなスケールで働く膜タンパク質の作動原理：実験と理論の新展開（招待講演）」
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Iwamoto M, Oiki S
2. 発表標題 Method for rapid perfusion of hydrophobic substances into lipid bilayer and its application for ion channel studies
3. 学会等名 Biophysical Society 62th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩本真幸、老木成稔
2. 発表標題 膜ステロール効果の解析から明らかになったKcsAカリウムチャネル開閉に対する膜張力の寄与 (Membrane tension-assisted gating of the KcsA potassium channel revealed by the membrane sterol effects)
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 脂質二重膜形成器	発明者 老木成稔、岩本真幸	権利者 国立大学法人福井大学
産業財産権の種類、番号 意匠、意匠登録第1585803号	取得年 2017年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

福井大学医学部分子神経科学分野 https://www.med.u-fukui.ac.jp/laboratory/molecular-neuroscience/
--

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