

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06157

研究課題名(和文) アセチルコリン受容体チャネル・リガンド結合の1分子計測

研究課題名(英文) Single molecule measurement of ligand bindings to the acetylcholine receptor channel

研究代表者

井出 徹 (Ide, Toru)

岡山大学・ヘルスシステム統合科学学域・教授

研究者番号：60231148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：鋭利に加工した金電極の先端で生じる局在表面プラズモン効果を利用した1分子イメージングを試みた。電極は金の細線先端を電解研磨して作製したが、作製効率を上げるため、自動研磨装置を作製した。量子収率が低い蛍光色素を用いて蛍光観察を行い、蛍光色素1分子を観察した。また、電極表面を親水性に改変し、電極表面に人工脂質二重層膜を形成することに成功した。この人工膜を用いて、チャネル蛋白、チャネル形成ペプチド、ポア形成トキシンの単一チャネル電流解析に成功した。
上記の人工膜法によって、チャネル電流計測を従来法に比べて著しく効率化することに成功し、ロボットを用いた自動計測も可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

チャネル蛋白は機能の1分子解析(単一チャネル電流解析)が最も進んだ蛋白である。各々のチャネルに対して、詳細な状態遷移モデルが提案されており、本研究の成果はモデルの直接検証手段を与える。また、チャネルは1分子のリガンド結合と機能の相関を高時間分解で観測できる蛋白であり、計測によって得られた知見を蛋白一般の分子機構の理解に広げることも可能となる。また、チャネル蛋白は膜のイオンの透過性を制御することによって、多岐に渡る生命活動において重要な役割を果たしている。チャネル蛋白一般の活性化分子機構を詳細に知ることは、科学的な興味に止まらず、医療、創薬などの分野においても重要である。

研究成果の概要(英文)：Single molecule imaging system utilizing the local surface plasmon at the tip of a sharp gold electrode was developed. The electrode was fabricated by electro-chemical etching the tip of a thin gold wire. An automatic etching system was developed to increase fabrication efficiency. Fluorescence observation was performed using fluorescent dyes with low quantum yields, and single molecules of fluorescent dyes were observed.
The electrode surface was modified to be hydrophilic, and an artificial lipid bilayer membrane was successfully formed on the electrode surface. Using this artificial membrane, single channel current analysis of channel proteins, channel-forming peptides, and pore-forming toxins was successfully performed.

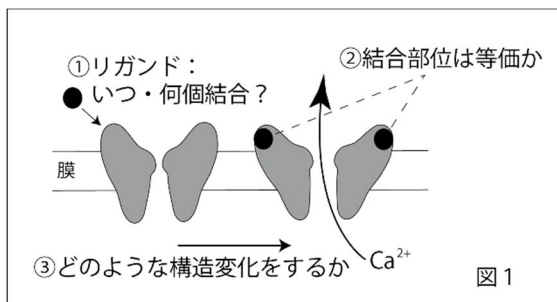
The above artificial membrane method has succeeded in significantly improving the efficiency of channel current measurement compared to conventional methods, and has also enabled automated measurement using a robot.

研究分野：生物物理学

キーワード：イオンチャネル 1分子計測 単一チャネル電流計測 1分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

チャネル蛋白は生体膜にイオンの通り道(孔)を開ける蛋白であり、特定の刺激に応じて孔を開閉させる。アセチルコリン受容体(AChR)チャネルは、アセチルコリン2分子が結合すると活性化されている。しかし、リガンドがいつ、何個結合するとどのような構造変化が起きるかを実験的に検証する方法はこれまでのところ存在していない。電気生理学的手法、特に単一分子の電流計測(単一チャネル電流計測)によれば、機能(電流)をミリ秒以下の分解能で観測可能であるが、個別のチャネルへのリガンドの結合を同時に直視することは出来ない。本研究は、この問いに対する実験的な検証手段(新しい計測法)を与えることを目的とした。

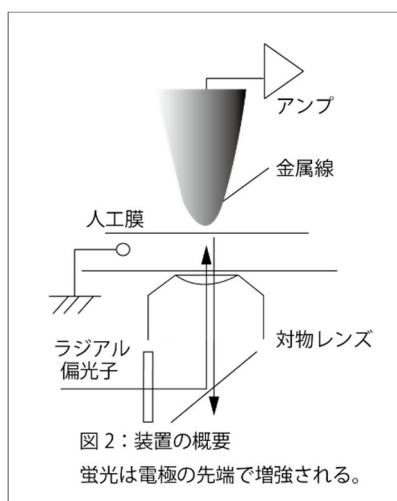


これまでに多くのチャネル蛋白に対して、極めて詳細な状態遷移モデルが提案されている。しかしながら、前述のように、電流計測と同時にリガンドとの詳細な相互作用を測定することは出来ない。よって、これらのモデルを直接検証する手段は存在していない。また、蛋白一般を考えたとき、チャネル蛋白

は、1分子のリガンド結合と機能の相関を高時間分解で観測できる唯一の蛋白であると言える。上記の問いに答えることが出来れば、チャネル蛋白に対して得られた知見を蛋白一般(特にアロステリック蛋白)の分子機構の理解に拡げることにも可能となるであろう。

さらに、チャネル蛋白は膜のイオンの透過性を制御することによって、多岐に渡る生命活動において重要な役割を果たしている。例えば、AChRチャネルは神経末端から放出されたアセチルコリンを感じて開孔し、陽イオンを透過、筋肉の収縮を引き起こす。チャネル蛋白一般の活性化分子機構を詳細に知ることは、科学的な興味に止まらず、医療、創薬などの分野においても重要であることは明らかである。

2. 研究の目的



独自に開発した単一チャネル電流記録法と金属ナノ構造を利用した蛍光増強による1分子イメージング法を融合し、チャネル蛋白1分子の電気・光学同時計測系を構築する。これを用いて、AChRチャネルとリガンド分子との結合解離と電流揺らぎを1分子レベルで同時計測し、リガンド結合から活性化に至る分子メカニズムを詳細に解析する。

この目的のために使用する要素技術、即ち金ナノ構造体によるチャネル電流計測法、および1分子蛍光イメージング法は何れも独自に開発した手法である。とを実用に耐え得るように改良し、融合させることが装置開発の中心課題とである。

3. 研究の方法

1) 装置開発: 要素技術の改良と装置全体の整合を行った。

) 光学系(単一チャネル電流記録法と金属増強蛍光計測の融合): 局在プラズモン共鳴を利用した膜蛋白の1分子観察用蛍光顕微鏡を作製した。レーザー照明の導入、及びプローブ操作系の

開発を実施した。電気測定用人工膜系に適用するために、プローブには、幅広い操作性が要求される。後述の人工膜系の開発に合わせて細部の仕様を改変した。

）プローブ（電極）：本研究に於ける電流計測法の技術的特徴は、電極に固定した蛋白を人工膜に直接挿入する組込法にある。チャンネル蛋白を効率良く人工膜に挿入できる条件を探索した。具体的には、プローブ先端の形状、表面修飾法、チャンネル蛋白の固定法を検討した。また、本研究では電極先端が鋭利であることによる蛍光増強を利用する。電極は金細線を電解研磨することによって作製したが、この「歩留まり」を改善するための条件を検討した。また、研磨の効率を上げるための自動装置を作製した。

2) チャンネル-リガンド相互作用の計測：(1)で開発した技術を融合させ、チャンネル電流の計測と蛍光観察を同時に行った。AChRチャンネルのモデルとして、チャンネル形成トキシンと蛍光標識した阻害剤との相互作用を観測した。

4. 研究成果

当初の目標であったAChRとリガンドとの相互作用の電気・光学的1分子同時計測には至っていない。しかしながら、（測定の高効率化も含めて）要素技術の開発には成功している。また、副次的な成果として、人工膜法によるチャンネル電流計測の高効率化に成功しており、この手法を用いて電流計測の自動化にも成功した。当初の計画よりも遅れているが、計画通りAChRとリガンドとの相互作用を1分子計測し、機能モデルを作成する予定である。以下に各々の要素技術開発の成果について記述する。

(1)局在表面プラズモンによる1分子イメージング

本研究では、鋭利に加工した金電極の先端で生じる局在表面プラズモン効果を利用した1分子イメージングを試みた。同時に行う単一チャンネル電流計測にも同じ電極を使用することから、電極は1回の実験で使い捨てとなるため、多数の電極を安価に準備する必要がある。そこで、金の細線先端を電解研磨して用いることとした。電解研磨による金線の加工は走査プローブ顕微鏡のプローブ作製に用いられ、盛んに研究されている方法であるが、作製の「歩留まり」が悪い。本研究では、作製効率を上げるため、研磨の自動装置（研磨電流の自動遮断装置）を作製し、歩留まりを上げることに成功した。



図3: 蛍光色素1分子のイメージング。破線は金電極の概形を示す。赤丸は電極の先端位置を表している。

金電極の先端曲率が概ね100nm以下の時に共鳴が起こると考えられるが、量子収率が低い蛍光色素を用いて蛍光観察を行ったところ、背景光が抑制され電極先端のみ蛍光が観測された。即ち、プラズモン共鳴による局所励起および量子収率の改善に成功した。図3に上記による色素1分子の蛍光

像を示す。

(2) 単一チャンネル電流計測

金電極表面を親水性に改変し、脂質溶液層を通過させることにより、電極表面に人工脂質二重層膜を形成することに成功した。この人工膜を用いて、グラミシジン、アラメチシン等のチャンネル形成ペプチド、ヘモリシン等のポア形成トキシンの単一チャンネル電流解析に成功した。人工膜の形成は数秒で可能であり、これらチャンネル形成ペプチド等の電流計測の効率を著しく上げることができた。

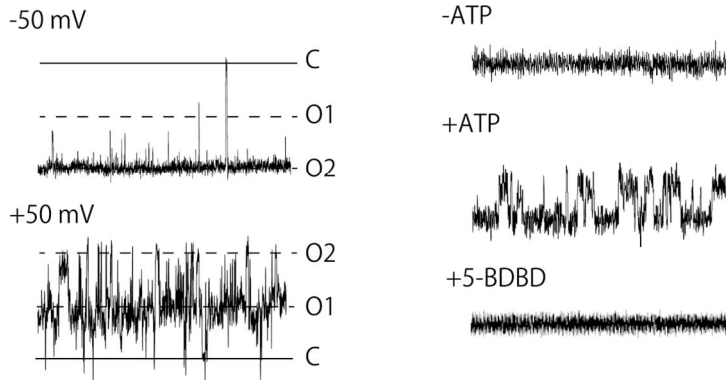


図4: 金電極による単一チャンネル電流測定例 (左) BK (右) P2X4

のチャンネルタンパクに共通の条件を決定した。図4にこの方法で計測したBKおよびP2X4チャンネルの単一チャンネル電流記録を示す。チャンネル電流は細胞内での機能を保持しており、チャンネル阻害剤による阻害も観測可能であった。

また、AChRの他に KcsA、MthK、BK等の単一チャンネル電流計測にも成功した。これには電極表面の親水性修飾（親水基の長さ等）、およびチャンネルタンパクの固定法をタンパク毎に最適化する必要があったが、装置の汎用性を高めるために多く

(3) 副次的な結果



図5: 単一チャンネル電流計測自動計測ロボット

上記の人工膜法によって、チャンネル電流計測を従来法に比べて著しく効率化することに成功した。従来法では計測開始までに数十分程度要していたが、本法によって数十秒に短縮することができた。また、測定操作が簡便であることから、ロボットを用いた自動計測も可能となった（図5）。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8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 Minako Hirano, Masahisa Tomita, Chikako Takahashi, Nobuyuki Kawashima and Toru Ide	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 Development of an automated system to measure ion channel currents using a surface-modified gold probe.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 17934, 17934
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-97237-z	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 Mise Shintaro, Matsumoto Akinobu, Shimada Keisuke, Hosaka Toshiaki, Takahashi Masatomo, Ichihara Kazuya, Shimizu Hideyuki, Shiraishi Chisa, Saito Daisuke, Suyama Mikita, Yasuda Tomoharu, Ide Toru, Izumi Yoshihiro, Bamba Takeshi, Kimura-Someya Tomomi, Shirouzu Mikako, Miyata Haruhiko, Ikawa Masahito, Nakayama Keiichi I.	4. 巻 13
2. 論文標題 Kastor and Polluks polypeptides encoded by a single gene locus cooperatively regulate VDAC and spermatogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1071
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-28677-y	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 Shiraishi Yuri, Shiozaki Tomoya, Asakura Mami, Ide Toru, Hayakawa Tohru	4. 巻 57
2. 論文標題 Characteristics of channel pores formed by Bacillus thuringiensis mosquito-larvicidal Cry4Aa toxin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applied Entomology and Zoology	6. 最初と最後の頁 63 ~ 70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13355-021-00762-6	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 Hayakawa Tohru, Miyazaki Midoka, Harada Syoya, Asakura Mami, Ide Toru	4. 巻 104
2. 論文標題 Channel-pore cation selectivity is a major determinant of Bacillus thuringiensis Cry46Ab mosquitocidal activity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 8789 ~ 8799
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-020-10893-5	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 Hirano Minako, Yamamoto Daiki, Asakura Mami, Hayakawa Tohru, Mise Shintaro, Matsumoto Akinobu, Ide Toru	4. 巻 11
2. 論文標題 A Lipid Bilayer Formed on a Hydrogel Bead for Single Ion Channel Recordings	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 1070 ~ 1070
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/mi11121070	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 Sakakibara Akira, Takebe So, Ide Toru, Hayakawa Tohru	4. 巻 54
2. 論文標題 Characterization of the channel-pores formed by Bacillus thuringiensis Cry46Ab toxin in planar lipid bilayers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Entomology and Zoology	6. 最初と最後の頁 389 ~ 398
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13355-019-00635-z	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 Minako Hirano, Toru Ide	4. 巻 1861(1)
2. 論文標題 Electrostatic state of the cytoplasmic domain influences inactivation at the selectivity filter of the KcsA potassium channel.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 220-227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamem.2018.07.011	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 HIRANO Minako, ASAKURA Mami, IDE Toru	4. 巻 63
2. 論文標題 単一イオンチャンネルの簡便計測システム	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Seibutsu Butsuri	6. 最初と最後の頁 110 ~ 114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.63.110	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13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Daiki Yamamoto, Mami Asakura, Minako Hirano, Toru Ide
2. 発表標題 Artificial bilayers on a hydrogel bead for channel current recordings
3. 学会等名 The 59th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mami Asakura, Daiki Yamamoto, Minako Hirano, Toru Ide
2. 発表標題 Development of a novel channel current measurement method using agarose gel beads
3. 学会等名 The 59th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Minako Hirano, Masahisa Tomita, Chikako Takahashi, Nobuyuki Kawashima, Toru Ide
2. 発表標題 Development of an automated system for measuring channel currents using a gold probe
3. 学会等名 The 59th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Midoka Miyazaki, Tohru Hayakawa, Toru Ide
2. 発表標題 Channel-pores formation of Bacillus thuringiensis Cry46Ab toxin and its mosquitocidal activity
3. 学会等名 The 59th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Minako Hirano, Masahisa Tomita , Chikako Takahashi, Nobuyuki Kawashima, Toru Ide
2. 発表標題 Development of a system for automated ionic current measurement
3. 学会等名 The 58th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Toru Ide, Minako Hirano, Daiki Yamamoto, Mami Asakura, Yuki Kitamura
2. 発表標題 Artificial bilayers on hydrogel for channel current recordings
3. 学会等名 The 58th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Toru Ide, Minako Hirano, Kota Kaneko, Huimin Ma
2. 発表標題 A gold nano-electrode for single channel detection.
3. 学会等名 The 57th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsuhito Fukasawa, Gaku Nakano, Minako Hirano, Toru Ide, Hiroaki Yokota
2. 発表標題 Wide-field single-molecule fluorescence polarization detection by hybrid photo-detectors (HPDs)
3. 学会等名 The 57th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 早川 徹, 榊原 暁, 武部 聡, 井出 徹
2. 発表標題 新規な殺蚊Cry46Abトキシンの殺虫活性メカニズム
3. 学会等名 第63回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsuhito Fukasawa, Gaku Nakano, Hiroaki Yokota, Minako Hirano, Toru Ide
2. 発表標題 Wide-field single-molecule multicolor fluorescence detection by hybrid photo-detectors (HPDs)
3. 学会等名 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kota Kaneko, Huimin Ma, Minako Hirano, Toru Ide
2. 発表標題 A simple method for single ion channel recordings.
3. 学会等名 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Modifications of K ⁺ channel property.
2. 発表標題 Tomoya Ishido, Toru Ide, Minako Hirano
3. 学会等名 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mami Asakura, Atsuya Mukuno, Minako Hirano, Toru Ide
2. 発表標題 An artificial lipid bilayer ion-channel recording method using agarose gel beads
3. 学会等名 The 60th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan
4. 発表年 2022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
---------	---------