

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22382

研究課題名(和文)チャネル-膜系構成的システムのボトムアップによる人工細胞膜の開発

研究課題名(英文)Development of the artificial cell membrane via bottom-up of the channel-membrane reconstitution system

研究代表者

老木 成稔(Oiki, Shigetoshi)

福井大学・高エネルギー医学研究センター・特命教授

研究者番号：10185176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：生体膜は液体性とモザイク性をあわせもつ極めて複雑な存在である。この複雑系上で起こる膜蛋白質の活動は膜との相互作用が不可欠であるが、生体膜をそのまま実験対象にすると複雑すぎて捉えどころがない。そこで生体膜機能の最小機能要素である脂質2重膜と膜蛋白質(その中で最も理解が進んでいるイオンチャネル)を対象に、再構成膜実験系を確立した。膜の化学的組成を急速に変え、膜張力など物理的特性を変え、それを精密に測定しつつ、チャネル活性の変化を捉える実験が可能になった。従来、KcsAカリウムチャネルを主に対象としてきたが、この方法によって様々なチャネルに対する実験が効率よくできることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昨年のノーベル医学生理学賞が機械受容チャネルに対してであったように、最近、膜の力学的刺激に応答するチャネルの研究が広く行われている。構造生物学などの進歩により複雑なチャネル構造が明らかになりつつある一方、機能測定に関しては方法的限界が広く知られているにもかかわらずパッチクランプ法が未だ主な方法となっている。私達が開発したContact Bubble Bilayer法は膜張力などの定量的測定が可能であるので、パッチクランプ法に代わって広く使われることが期待される。実際、世界の数か所の研究室が導入し成果が出始めている。

研究成果の概要(英文)：Biological membranes are complex systems but can be characterized as fluidic and mosaic features. Membrane proteins are influenced by fluidic lipid bilayer such that bilayer tension modulates the activity of membrane proteins. We have established a simple membrane reconstitution system consisting of the lipid bilayer and ion channels (the Contact Bubble Bilayer method). In this method, membrane physical properties, such as membrane tension and thickness, are readily applied and measured with physical principles. With this system, the dynamic behavior of ion channels upon changes in the bilayer tension was studied, and tension-dependent channel activity was quantitatively evaluated.

研究分野：生物物理学

キーワード：イオンチャネル 脂質2重膜 再構成膜 膜張力 膜脂質 contact bubble bilayer

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脂質 2 重膜は膜蛋白質であるチャンネルに単なる居場所を与える受動的な場ではなく、リン脂質などの化学組成が多様に变化し、脂質 2 重膜の内部では膜張力・曲率・膜内電場などの物理特性が变化する動的なプラットフォームである。この中でチャンネルはその影響を大きく受け機能を变化させている。そして膜の物理特性は、外部からの力学的刺激だけでなく、脂質組成の変動や膜に溶け込む小分子(リガンドや薬物)によっても变化する。すなわち脂質 2 重膜は、リガンドや薬物が膜に入り込み化学組成に変化が起これば、内部の物理特性を変化させ(化学 - 物理変換)、それをチャンネルに作用させる、一種の「化学 - 物理変換体」である。この機構を解明することが本研究の目的であるが、生体膜の構造はあまりに複雑で詳細に解析することが難しい。従来チャンネルの機能測定、とくに膜張力負荷時の機能変化を測定するにはパッチクランプ法が長年使われてきた。しかしこの方法では膜張力の定量的測定には限界がある。

そこで膜とチャンネルの相互作用機構を解明するために生体膜を解体し、脂質 2 重膜にチャンネルを組み込んだ系(再構成チャンネル膜)で実験を行うことが本研究の戦略である。研究代表者らが世界に先駆けて開発した再構成チャンネル膜法(Contact Bubble Bilayer 法)によって様々な実験が可能になってきた。この方法を展開することでチャンネル - 膜システムを再構成し、膜の化学組成や物理特性を変化させる操作を可能にし、その変化を詳細にとらえることが本研究の目的である。それによって、「脂質 2 重膜の化学-物理変換という普遍的な機構とチャンネルへの作用」を解明する。特に膜張力は様々な生理的環境の中で変化し、その変化が直接チャンネルに作用するので、膜張力をダイナミックに測定することが不可欠である。これにより従来、静的・半定量的であった実験の精度を上げ、より詳細なチャンネル - 膜相互作用について検討する。

### 2. 研究の目的

細胞膜は分子・細胞・組織という階層の中で生理機能の中核となる反応の場であり、細胞膜に存在する様々な膜蛋白質の内イオンチャンネルは細胞機能だけでなく組織の情報伝達の基礎となる。しかし細胞膜は極めて複雑な構成であるため、チャンネルが膜という環境の中でどのように機能するか明らかにすることは難しい。本研究では生体膜の特徴を抽出し単純化した脂質 2 重膜を使い、生体膜機能を再現させるような実験系を確立することが目的である。研究代表者らが独自に開発した方法は膜の化学的組成を自由に換えられるだけでなく、細胞膜で起こる物理学的な張力変化などを負荷させ、これに対するチャンネルの応答を捉えることを目指す。「膜を作って、操作し、解析する」という新しい研究の方法を確立することを目指す。

### 3. 研究の方法

脂質 2 重膜法が本研究の基本的手法であるが、数年前に研究代表者らが CBB 法という独自の方法を開発し、代表者の研究室では従来の脂質平面膜法に完全に取って代わった。この方法は膜リン脂質の組成を自由に瞬間的に変化させることができるという利点があるだけでなく、従来パッチクランプで行われてきた張力測定の原理的欠点を補うことができる。この方法は油相の中にパッチクランプ用のガラスピペットから電解質溶液を吹き出して液滴を作り、あらかじめ水相か油相に加えたリン脂質が油・水界面に単分子層を形成することを利用している。2枚の単分子層を接触させることによって誰にでも簡単に脂質 2 重膜を形成することができるようになった。

従来、膜組成の特定の成分がチャンネルとどう相互作用するかということをはっきりさせるには技術的な問題があった。新しい方法ではチャンネル機能を測定している最中に一瞬で膜組成を変えることができる。この方法を開発することによって生体膜組成に重要な成分のチャンネルに対する効果をリアルタイムで捉えることができるようになった。

具体的にはチャンネルと膜との相互作用を明らかにする上で、膜のリン脂質組成の中からチャンネルと特異的な相互作用を行うリン脂質をスクリーニングする。一方、膜のチャンネルに対する物理的な作用を明らかにするために、膜張力の測定系を確立する。

さらにこの方法の普遍的適用性を示すために数種類のチャンネルに対して実験を行う。

#### 4. 研究成果

私たちが開発した接触バブル 2 重膜法に様々な工夫を行った結果、膜物理測定のための方法論としてほぼ完成の域に達した。技術的な成果としては次のようなものである。

##### (1) 非対称膜形成

様々な化学組成が異なる非対称膜を形成することができた。単に脂質頭部の化学的特性だけでなく、アシル鎖の長さを変えたものでも自由に脂質 2 重膜を形成することができた。これによって変化する膜厚も静電容量と膜面積を正確に測定することによって定量的に評価することができた。これらの実験によるチャンネル活性の変化について現在論文準備中である。

##### (2) 膜張力の自由なコントロールと正確な測定

新しい圧コントローラの導入により電気ノイズの混入に苦しめられたが、これを解決することによって応答速度の高い圧力変化実験が可能になった。一方、張力測定に不可欠な画像処理についてプログラムの更新により精度が増した。これには界面科学の知識だけでなく、微分幾何学・画像解析の知識も必要であった。また莫大な量のデータを処理するために、物理化学的特性を組み込んだプログラムを作成した。そして張力とチャンネル電流を同期して解析できるプログラムを開発した。膜張力を広い範囲 ( $<1 \text{ mN/m} \sim 10 \text{ mN/m}$ ) で変化させることができるようになった。

##### (3) 膜電位に対する応答

膜電位は脂質 2 重膜に対して大きな力を負荷し、その結果膜張力を変化させている。このような作用に関する実験を高い精度で行うことは極めて難しかった。CBB 法の実験・解析法を改良することによって従来見落とされていた膜動態を高分解能で捉えることに成功し、物理化学原理を基にした詳細な解析を行い、膜物性を明らかにしつつある。

#### 様々なチャンネルへの適用と成果

チャンネル種に関しては従来の KcsA カリウムチャンネルだけでなく、アクアポリン・TMEM16F を含めた数種類のチャンネルの実験と解析を進めた。従来の脂質平面膜法に比べチャンネル再構成という点だけから見ても格段に効率を上げることができたので、膜脂質組成を変えるなど様々な実験を行うことができた。それぞれのチャンネルで見つかる新しい現象に対応する解析法を工夫することによって、従来捉えることのできなかった新しい現象を発見することができた。

チャンネル形成毒素である polytheonamide B はペプチドであり、実験的に膜挿入が最も簡単なチャンネルである。様々な方法で厚さを変えた膜にチャンネルを組み込み、活性がどのように変わるかを実験し定量的な解析を行った。膜に埋め込まれたチャンネルの長さや膜の厚さから、疎水性不適合を定量的に評価することができた。さらに膜挿入過程を分子動力学シミュレーションによって再現することに成功し、そのクリティカルなステップを解明した (Kalathingal et al. Biophys. J. 2021)。

KcsA カリウムチャンネルは放線菌由来であるが、その取扱いの簡便性から結晶構造が初めて得られ、豊富な構造情報と様々な生物物理学的実験の蓄積から最も深くその分子機構が解明したチャンネルである。このようなモデルチャンネルとしての利用される一方、KcsA が本来放線菌の細胞膜上でどのような機能を果たしているのか全く手つかずであった。様々なリン脂質の KcsA チャンネルへの結合を測定する実験系を確立し、放線菌の膜に豊富に存在するリン脂質が KcsA に強い親和性を持つことを発見した。

そしてこのリン脂質がチャンネルを活性化させることを初めて示すことができた。さらに CBB 法で非対称膜の実験を行い、チャンネル活性の新しいメカニズムを明らかにした。

カリウムチャンネルのカリウムイオン選択性機構は長年議論されてきた。特にカリウムチャンネルがカリウムイオンよりもサイズの小さなナトリウムイオンを排除する機構は決着がついていなかった。私達は KcsA チャンネルでどの程度ナトリウムイオンを透過するかを単一チャンネル電流で初めて示した。そしてナトリウムイオンが透過しにくい機構を分子動力学シミュレーションによって解析し、その機構を明らかにした (Mita et al. PNAS 2021)。

KcsA カリウムチャンネルは機械受容チャンネルでないことは知られていたが、私達はチャンネルを酸性 pH 下で準備状態にすると、膜張力に対して応答することを発見した。このことは従来機械受容チャンネルと分類されていなかったものでも内在的に張力応答性を持つことを示した。そして測定法が精密化した結果、さらに新しい特性を発見することができた。KcsA チャンネルに張力を負荷すると、張力増大相における応答と減少相における応答が一致しない。これは履歴現象と呼ばれるものである。膜張力に対して履歴現象が見つかったのは初めてであり、このような現象がどのような分子機構で起こるかについて検討した (Iwamoto & Oiki, JACS Au 2021)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10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 Yano Keita, Iwamoto Masayuki, Koshiji Takaaki, Oiki Shigetoshi	4. 巻 627
2. 論文標題 Visualizing the osmotic water permeability of a lipid bilayer under measured bilayer tension using a moving membrane method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Membrane Science	6. 最初と最後の頁 111-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.memsci.2021.119231	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 Masayuki, Oiki Shigetoshi	4. 巻 1
2. 論文標題 Hysteresis of a Tension-Sensitive K <sup>+</sup> Channel Revealed by Time-Lapse Tension Measurements	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JACS Au	6. 最初と最後の頁 467 ~ 474
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/jacsau.0c00098	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 Mita Kenichiro, Sumikama Takashi, Iwamoto Masayuki, Matsuki Yuka, Shigemi Kenji, Oiki Shigetoshi	4. 巻 118
2. 論文標題 Conductance selectivity of Na <sup>+</sup> across the K <sup>+</sup> channel via Na <sup>+</sup> trapped in a tortuous trajectory	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2017168118	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 Masayuki, Oiki Shigetoshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Physical and Chemical Interplay Between the Membrane and a Prototypical Potassium Channel Reconstituted on a Lipid Bilayer Platform	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnmol.2021.634121	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 Sumino A., Sumikama T., Uchihashi T., Oiki S.	4. 巻 5
2. 論文標題 High-speed AFM reveals accelerated binding of agitoxin-2 to a K <sup>+</sup> channel by induced fit	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaax0495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aax0495	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 Sumikama, T. and Oiki, S.	4. 巻 69
2. 論文標題 Queueing arrival and release mechanism for K <sup>+</sup> permeation through a potassium channel.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Physiol. Sci.	6. 最初と最後の頁 919-930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12576-019-00706-4	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 Urakubo Kazuhiro, Iwamoto Masayuki, Oiki Shigetoshi	4. 巻 621
2. 論文標題 Drop-in-well chamber for droplet interface bilayer with built-in electrodes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods Enzymol.	6. 最初と最後の頁 347 ~ 363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.mie.2019.02.012	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 Inada Masataka, Kinoshita Masanao, Sumino Ayumi, Oiki Shigetoshi, Matsumori Nobuaki	4. 巻 1059
2. 論文標題 A concise method for quantitative analysis of interactions between lipids and membrane proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 103 ~ 112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aca.2019.01.042	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 Masayuki, Oiki Shigetoshi	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 Journal of Visualized Experiments	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 Masayuki, Oiki Shigetoshi	4. 巻 621
2. 論文標題 In bulla functional channel expression systems that mimic bacterial synthetic membranes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods Enzymol.	6. 最初と最後の頁 231 ~ 244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.mie.2019.02.011	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 -

1. 著者名 老木成稔	4. 巻 88
2. 論文標題 脂質2重膜の水透過	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 腎と透析	6. 最初と最後の頁 322-326
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 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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Yuka Matsuki, Masayuki Iwamoto, Shigetoshi Oiki
2. 発表標題 Apparent discrepancy of pH-dependent gating behavior of KcsA potassium channel in macroscopic and single-channel current recordings
3. 学会等名 日本生物物理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masayuki Iwamoto, Shigetoshi Oiki
2. 発表標題 Hysteretic behavior of the tension-dependent gating of the KcsA potassium channel revealed by the dynamic manipulation of membrane tension
3. 学会等名 日本生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuka Matsuki, Masayuki Iwamoto, Masako Takashima, Shigetoshi Oiki
2. 発表標題 Relationship between polytheonamide B channel activity and the thickness of lipid bilayers
3. 学会等名 日本生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 老木成稔
2. 発表標題 イオンチャネル—分子研究の再構成膜系からのアプローチ
3. 学会等名 生理研研究会「イオンチャネルと生体膜のダイナミズム：構造生物学の先にあるもの」（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 脂質二重膜の制御装置、制御プログラム、制御方法、制御システム及び薬剤のスクリーニング方法	発明者 吉田俊之、老木成稔、岩本正幸	権利者 国立大学法人福井大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021- 14217	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

EurekaAlert!  
[https://www.eurekaalert.org/pub\\_releases/2021-03/uof-nsc022521.php](https://www.eurekaalert.org/pub_releases/2021-03/uof-nsc022521.php)  
EurekaAlert!  
[https://www.eurekaalert.org/pub\\_releases/2021-04/uof-nmo040821.php](https://www.eurekaalert.org/pub_releases/2021-04/uof-nmo040821.php)

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
研究分担者	岩本 真幸  (Iwamoto Masayuki)  (40452122)	福井大学・学術研究院医学系部門・教授    (13401)	

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