

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2010

課題番号：20247016

研究課題名（和文） イオンチャネルの構造—機能ダイナミクス：ゲーティング構造変化の単一分子解析

研究課題名（英文） Structural and functional dynamics of the KcsA channel: Single molecule measurements of the conformational change during gating.

研究代表者

老木 成稔 (OIKI SHIGETOSHI)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：10185176

研究成果の概要（和文）：回折X線追跡（DXT）法を改良し、従来の数百倍の時間分解能であるサブミリ秒レベルの記録を達成することに成功した。また高速カメラと大容量メモリーの設置により数十秒間の記録が可能となった。この方法のために基礎的実験を ESRF (European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble, France)と SLS (Swiss Light Source, Villigen, Switzerland)の2か所の高輝度放射光施設で年間数100時間の実験を行った。白色X線のスペクトルなどを調整することによりバックグラウンドノイズを顕著に減少させることができた。この方法で KcsA カリウムチャネルのイオン透過路開閉（ゲーティング）に伴う構造変化を単一分子レベルで追跡した。KcsA チャネルは溶液の pH を酸性にすることによってゲーティングを起こす。定常状態での測定ではどちら向きのねじれ運動が開過程なのか閉過程か特定できない。そこで、溶液の pH ジャンプ（中性→酸性）による構造変化を捉えるための装置を開発した。中性から酸性への pH ジャンプを行えば KcsA チャネルは閉状態から開状態への構造遷移過程を追跡することができる。本法では測定容器が密閉されているので、溶液 pH を短時間で変化させるためにケージド化合物を紫外線レーザーで励起することによって行った。pH ジャンプ前の閉状態での構造揺らぎと、ジャンプ後の構造変化を捉えることに成功した。動画データから回折点を抽出し、フレーム間で回折点の軌跡を追跡するためのプログラムを開発中である。

研究成果の概要（英文）： To detect conformational changes of ion channels upon gating, the diffracted X-ray tracking method has been established. We improved the method to trace fine movements of the diffraction spots with the high spatial and temporal resolutions. For the high flux white X-ray source, we used two synchrotron facilities (ESRF [European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble, France]; SLS [Swiss Light Source, Villigen, Switzerland]). By optimizing the spectrum of white X-rays with the aid of the beam scientists, the background noise was reduced substantially, and we attained the high speed recording as high as 5000 frame/s. Under these experimental setups, the conformational changes of the KcsA potassium channel upon opening and closing of the gate were recorded in the single molecule level. The KcsA channel is a pH-sensitive channel, and by jumping the solution pH from neutral to acidic, the initial gating processes were expected to be recorded. The pH jump was attained by utilizing a caged proton, to which the UV laser of 355 nm was irradiated. The time course of the pH jump in the chamber was measured and it was revealed that the pH jump was completed within 100 ms. The conformational changes before and after the pH jump differed significantly. These video data were under the image processing for detecting the diffraction spots and tracing of the trajectories on the series of the frames. Automatic retrieval of the coordinate of the spots is the goal of this program.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	19,600,000	5,880,000	25,480,000
2009年度	10,400,000	3,120,000	13,520,000
2010年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	34,000,000	10,200,000	44,200,000

研究分野：生物物理

科研費の分科・細目：生物化学・生物物理学

キーワード：チャンネル、構造変化、ゲーティング、構造機能相関、一分子計測

1. 研究開始当初の背景

(1) 回折X線追跡(DXT)法を KcsA カリウムチャンネル蛋白質に適用し、ゲート開閉に伴う構造変化を一分子レベルで測定することに成功し、発表した。しかしこの測定法の時間分解能が低い(30 フレーム/秒)ため方法自体、根本的に考え直す時期に来ていた。またそのような基礎的実験を行うためのまとまった実験時間(放射光施設利用時間)を確保するための方策を探る必要があった。そこで従来利用してきた SPring-8 以外の海外の施設利用の可能性を模索した。

(2) 高速測定のためにどのような装置を導入するのが適切か。現在さまざまな原理のディテクターが存在する。空間分解能と時間分解能を勘案しさまざまな装置の可能性を探る必要があった。

2. 研究の目的

(1) 回折X線追跡法の空間・時間分解能をあげるにより高精度の構造変化測定を行う。時間分解能の目標はサブミリ秒レベルである。またできるだけ長時間にわたって構造変化を追跡したい。一方、大きな構造変化を追跡するためには、広い白色X線スペクトルと、広い測定領域を持つディテクターが必須である。X線スペクトルに関しては放射光施設の設定に依存する必要があるため各施設のビームラインごとの情報を集める必要がある。

(2) 定常的な条件での測定に加え、ゲートの過渡的応答を観察する。定常状態の測定ではゲートの開過程と閉過程の両方が観察されるが、測定そのものからはどちら向きのねじれ運動が開過程に対応するかは特定できない。ゲートの直接の引き金となる pH をジャンプさせ、pH 変化前後の構造変化様式の変化を捉える。KcsA チャンネルは中性 pH では完全

にゲートが閉じており、pH4 まで変化するとゲートが開く。したがって中性から酸性への pH ジャンプでどのチャンネル分子も閉状態から開状態へのゲートが開く過程をたどることになり、これを捉えることが期待できる。

(3) 画像データ処理の自動化。従来回折点の座標データを取り込むために自動化できたのは限られた条件であり、激しい回折点の動きを捉えるために手作業で座標を取り込んでいた。時間分解能が上がるとそのような方法では不十分であり、新しいプログラムを書き座標取得を自動化する必要がある。すでに様々な困難を経験しており、専門家の協力が必要とする。

3. 研究の方法

(1) 放射光利用の海外施設への展開

そもそも放射光施設で白色X線のビームラインを備えているところが多くない。これに加え新しい方法の確立のためには、ルーチンの実験のための細切れの利用時間ではどうも実現できない。そこで海外施設での実験に踏み切った。

ESRF (European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble, France)と SLS (Swiss Light Source, Villigen, Switzerland) に対して半年ごとの利用時間申請を行い、1 週間単位で測定時間を確保する。

本研究の構成員全員で実験にあたる。

(2) 測定機器の導入

時間分解能と広い測定領域のディテクターをめぐって様々な方式のものを検討した。特に時間分解能の高いものを得るために様々な方式のものを実際に見て検討する。

(3) 定常過程から過渡的過程へ

KcsA チャンネルは細胞質側に pH センサーを持ち、酸性 pH になるとゲートが開くことが知

られている。現在の DXT 法では溶液を灌流することができない閉システムなので、pH 変化を瞬間におこすためにケージド化合物を使用する。X 線照射領域をカバーする領域の pH をレーザー光照射により行い、100 ミリ秒以内に中性 pH から酸性 pH にジャンプさせる。

(4) 実験系の確立のための研究員の駐在  
ビームラインにおける X 線スペクトルの最適化やケージド化合物へのレーザー照射の最適条件を探るために、清水を ESRF に一年間駐在させた。

様々な予備実験とビーム時間のための準備を万全に行うことができ、効率のよい実験を遂行することが期待できる。

(5) 動画データ解析用ソフトウェアの開発  
信号雑音比の低い画像データから回折点を抽出し、フレーム間で軌跡として追跡しなければならない。従来のビデオレートでの測定では一部手作業で処理してきたが今回のように 1 ファイルに数万フレームもあるデータでは手作業は不可能である。画像解析の専門家との共同研究をめざす。

#### 4. 研究成果

本研究で全く新しい測定系を確立することに成功した。

(1) ESRF と SLS の利用申請し、厳しい競争に打ち勝ち、まとまった実験時間を確保することができた。フランス・スイスを合わせ年間約 400 時間のビームタイムとなった。

海外施設利用の副産物は ESRF のビーム担当者がビーム物理学が専門で、“白色” X 線の最適条件を得るための様々な実験を行うことができたことである。白色 X 線のスペクトルを変化させ、詳細に検討することができた。このことがバックグラウンドノイズを低減させ高速取り込みを可能にした要因である。

#### (2) 新しい機器の導入

様々なディテクターの可能性を探るため海外の企業に出向いて検討した。X 線回折点記録のための高感度ディテクター (image intensifier) と高速カメラを導入した。この結果最大取り込み速度を 5000 フレーム/秒まで上げることができるようになった。

大容量のメモリーをカメラに内蔵することによって高速測定下でも数十秒間の測定が可能となった。ただデータ転送に関しては Gigabit ethernet であってもかなり時間がかかり、現在でも実験効率の律速段階になっている。

#### (3) 空間時間分解能の驚異的な改善

本研究の大きな成果が、白色 X 線スペクトルの最適化である。白色 X 線のスペクトルを変化させることにより水による散乱などのバックグラウンドノイズを低減させることに成功した。白色 X 線の広いスペクトル幅により、20 角 (ビーム軸からの傾き角) を広く記録することが可能となった。

#### (4) 過渡的測定系の確立

ケージド化合物 1-(2-nitrophenyl)ethyl sulfate を使用し、紫外線レーザー (355 nm) の照射により 100 ミリ秒以内の溶液の pH を 7 から 4 に変化させることができた。レーザー系の実験の空間配置を工夫し、X 線照射との同期のタイミングを最適化した。これによる構造変化軌跡の変化をとらえることに成功した。

#### (5) 動画解析用ソフトウェアの開発

画像解析はきわめて困難であった。信号雑音比が画面上で不均一であり、そのようなバックグラウンドの中を動き回る回折点を抽出することが困難であった。さらにそれらのスポットがフレーム上で錯綜し、フレーム間で軌跡として追跡することが困難であった。プログラムは現在も開発中である。最終的には自動回折点座標取得プログラムの完成を目指す。

#### 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 10 件)

- ① Oiki, S., H. Shimizu, M. Iwamoto and T. Konno: Single Molecular Gating Dynamics for KcsA Potassium Channel. *Adv. Chem. Phys.* 査読有、In press.
- ② Mori, T., Kokubo, H., Oiki, S. and Okamoto Y.: Dynamic structure of the polytheonamide B channel studied by normal mode analysis. *Molec Sim*、査読有、In press.
- ③ Oiki, S., M. Iwamoto, T. Sumikama: Cycle Flux Algebra for Ion and Water Flux through the KcsA Channel Single-file Pore Links Microscopic Trajectories and Macroscopic Observables. *PLoS ONE* 査読有、6: e16578, 2011.
- ④ Iwamoto, M., H. Shimizu, I. Muramatsu, and S. Oiki: A cytotoxic peptide from a marine sponge exhibits ion channel activity through vectorial-insertion into the membrane. *FEBS Lett.* 査読有、584: 3995-3999, 2010.
- ⑤ Oiki, S., M. Iwamoto and T. Sumikama: A Mesoscopic Approach to Understanding

- the Mechanisms Underlying the Ion Permeation on the Discrete-State Diagram. *J. Gen. Physiol.* 査読有、136: 363-365. 2010.
- ⑥ Kuno, M., H. Ando, H. Morihata, H. Sakai, H. Mori, M. Sawada & S. Oiki: Temperature dependence of Proton Permeation through a Voltage-Gated Proton Channel. *J. Gen. Physiol.* 査読有、134: 191-205, 2009.
- ⑦ Imai, Y.N., S. Ryu and S. Oiki: Docking Model of Drug Binding to the Human Ether-à-go-go Potassium Channel Guided by Tandem Dimer Mutant Patch-Clamp Data: A Synergic Approach. *J. Med. Chem.* 査読有、52: 1630-1638, 2009
- ⑧ 老木 成稔: X線一分子追跡法により明らかになった KcsA カリウムチャンネルの開閉機構。放射光、査読有、22: 183-191, 2009
- ⑨ Myokai, T., Ryu, S., Shimizu, H. & Oiki, S.: Topological Mapping of the Asymmetric Drug Binding to the HERG Potassium Channel By Use of Tandem Dimers. *Mol. Pharmacol.* 査読有、73: 1643-1651, 2008.
- ⑩ Shimizu, H., Iwamoto, M., Konno, T., Nihei, A., Sasaki, Y.C. and Oiki, S.: Global Twisting Motion of Single Molecular KcsA Potassium Channel Upon Gating. *Cell* 査読有、132: 67-78, 2008.

[学会発表] (計5件)

- ① Oiki, S.: Structural and Functional Fluctuations of the KcsA Potassium Channel. The 3<sup>rd</sup> International Symposium: Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions. Nagoya, 2009, 12, 20.
- ② Oiki, S.: Real time monitoring of structural changes in K-channel gating. IUPS PSJ Symposium. Kyoto, 2009, 7, 29.
- ③ Oiki, S.: International Symposium on "Reaction Dynamics of Many-Body Chemical Systems", Kyoto, 6, 22-24, 2009
- ④ Shimizu, H., M. Iwamoto, T. Konno, A. Nihei, Y.C. Sasaki, S. Oiki: Global Twisting Motion of Single Molecular KcsA Potassium Channel upon Gating. "New Approaches to Complexity of Protein Dynamics by Single Molecule Measurements: Experiments and Theories." 2008, 12, 7-9, Osaka.
- ⑤ Oiki, S.: Single-molecular measurements for structural and functional fluctuations of KcsA potassium channel. 第47回生物物理学会年会シンポジウム「生体分子の

揺らぎをはかる」徳島、2009, 10. 30.

[図書] (計2件)

- ① Oiki, S.: The Planar Lipid Bilayer Method for the Study of Channel Molecules. "Modern Patch Clamp Techniques". Y. Okada, Ed. Springer-Verlag 2011 in press.
- ② Oiki, S.: Single-Channel Structure-Function Dynamics: The Gating of Potassium Channels. "Cell Signaling Reactions: Single-Molecular Kinetic Analysis". Eds. Y. Sako and M. Ueda, Springer, 79-105, 2010.

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称: 変異型 HERG チャンネル発現細胞およびその用途  
 発明者: 柳承希・明貝俊彦・今井友美・老木成稔  
 権利者: 柳承希・明貝俊彦・今井友美・老木成稔  
 種類: 特許  
 番号: 特願 2005-269153 号  
 出願年月日: 2005年9月15日  
 国内外の別: 国内

○取得状況 (計1件)

名称: シストランス液流方式によるイオンチャンネル解析方法と、その方法に使用するイオンチャンネル解析装置  
 発明者: 老木 成稔・山内紀宏・坪田圭介  
 権利者: 老木 成稔・山内紀宏・坪田圭介  
 種類: 特許  
 番号: 第 4516356 号  
 取得年月日: 平成 22 年 5 月 21 日  
 国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等  
 準備中

6. 研究組織

(1) 研究代表者

老木 成稔 (OIKI SHIGETOSHI)  
 福井大学・医学部・教授  
 研究者番号: 10185176

(2) 研究分担者

岩本 真幸 (IWAMOTO MASAYUKI)  
 福井大学・医学部・助教  
 研究者番号: 40452122  
 清水 啓史 (SHIMIZU HIROFUMI)  
 福井大学・医学部・講師  
 研究者番号: 50324158  
 今野 卓 (KONNO TAKASHI)  
 福井大学・医学部・准教授  
 研究者番号: 50225637