様　式　C－１９、F－１９、Z－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２７ 年　 ５ 月 ２９ 日現在

機関番号：１３４０１
研究種目：基盤研究(A)
研究期間：2012～2014
課題番号：２４２４９０１３

研究課題名（和文）膜電位存在下におけるイオンチャネルの機能と構造変化の１分子同時計測

研究課題名（英文）Development of a method for simultaneous recordings of single channel dynamics and currents

研究代表者
清水　啓史（Shimizu, Hirofumi）

福井大学・医学部・講師

研究者番号：５０３２４１５８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　36,700,000円

研究成果の概要（和文）：イオンチャネル蛋白質1分子の機能（電流）と構造変化の同時計測システムの開発を目標として、1分子電流計測と同等のサブミリ秒時間分解能の1分子動態計測を可能にすることを目指した。本助成でX線集光ミラーとX線スペクトル計測システムを導入したことにより、サブミリ秒時間分解能でX線照射による照射損傷の少ない観測光を実現した。

研究成果の概要（英文）：Prior to realizing simultaneous recordings of single-molecular dynamics and currents we tried to increase time-resolution of the dynamics measurementin this project. We intorduced a X-ray focusing mirror and a spectrum measurement system to the sychrotorn facility(SPring8). The time resolutions of the dynamics measurements became to be in a sub-millisecond level, which is equivalent to that of single channel current measurement. And the X-ray radiation damages of the ion channel proteins were decreased by using the spectrum measurement system. These advances of the method will lead to the development of simultaneous measurement system in near future.

研究分野：生理学・生物物理学

キーワード：蛋白質　1分子動態計測

１．研究開始当初の背景

イオンチャネル蛋白質は細胞膜または細胞内小器官において種々の刺激を受容し、刺激に応じてイオン透の開閉を制御することによって、細胞間情報伝達の一翼を担うタンパク質である。この刺激の伝達の過程で立体構造変化が起きると考えられている。1998年以降イオンチャネルの立体構造が次々に明らかになり、静止画像としてイメージが得られた。しかし、蛋白質分子は機能する際に動くため、動きを計測する計測法の開発が重要となった。

代表者はＸ線１分子計測法を用いて、イオンチャネルの１分子の開閉構造変化をビデオレートで１分子動画計測することに成功した (H.Shimizu, et.al. Cell (2008) 132　67-78)。イオンチャネル蛋白質の機能測定については１分子電流計測法が確立している。この方法ではイオンの透過路が開いた際に１分子の蛋白質を流れる電流をピコアンペアレベルで計測することができる。観測速度は 1kHz から 10kHz が一般的である。

１分子電流と１分子構造変化の同時計測システムの開発を目指して観測速度の高速化など、手法開発を進めてきた。その結果、海外の放射光施設を用いて、高速動態観測に成功した。本研究開発開始当時に直面していた問題は、海外の放射光施設で高速動態観測に成功したものの、日本の放射光施設で上記実験を遂行できる環境になく、研究開発の実験効率が悪いことであった。

２．研究の目的

本研究では、１分子電流と動態の同時計測システムの構築を目指して、１分子電流計測の観測速度と同等の１分子動態計測システムを日本国内で実現することである。日本の放射光施設の既存ビームラインにＸ線の輝度を上げるためのＸ線集光ミラーを導入する。また、Ｘ線スペクトル計測システムを導入し、種々の金属板を用いて調整したＸ線のスペクトルを計測する。Ｘ線スペクトルを１分子動態計測法に最適化し、照射損傷の少ない高輝度観測光を実現することを目的とした。

３．研究の方法

Ｘ線１分子動態計測法は蛋白質を観測チャンバー底面に固定し、固定した側とは逆側に金ナノ結晶を観測プローブとして取り付ける（図１）。放射光Ｘ線をこのサンプルに照射し、金ナノ結晶からの回折点を２次元検出器上で検出する。固定方法を適切に選ぶことで、イオンチャネル蛋白質について、イオン透過路の開閉構造変化にともなうねじれ運動を回折点の回転運動として捉える事が出来る。

観測プローブである金ナノ結晶からの回折点の運動計測を行う際、屈曲方向の構造変化を捉えるためには観測光であるＸ線のエネルギー幅が広いことが重要である。ブラッグの反射条件（2dsinθ=nλ）より、観測光に含まれるエネルギー幅が広ければ広いほど、運動追跡が可能な空間範囲が広くなる。ナノ結晶からの回折点の観測を高速で行うためには、大型放射光施設で集光された白色Ｘ線が必要である。従来はこの集光設備がなかったため、白色集光ミラーを導入して、高速で運動観測可能な計測システムとした。また、Ｘ線照射によって蛋白質分子が損傷することを抑えるために、観測Ｘ線のスペクトルの最適化を行う。観測しているＸ線のスペクトルを計測するため、Ｘ線スペクトル観測システムを導入した。

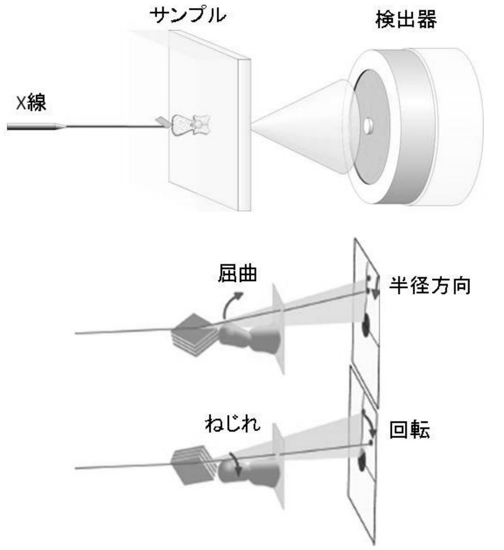

図１　Ｘ線１分子動態計測法の概略
ガラス基板にイオンチャネル蛋白質を固定し、他端に金ナノ結晶を取り付ける（上）。放射光Ｘ線を照射し、金ナノ結晶からの回折点を計測する。蛋白質が屈曲すれば半径方向に、ねじれれば回転方向に回折点が運動する（下）。この様子を動画計測する。

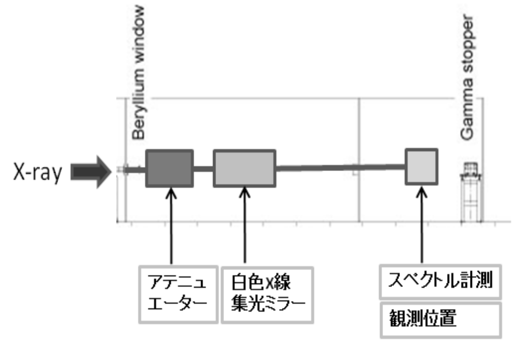

図２　導入した機器の配置
放射光施設においてＸ線を集光する集光ミラー、Ｘ線スペクトルを計測するスペクトル計測システム、スペクトルを調製するアテニュエータの配置

４．研究成果
　イオンチャネル蛋白質の構造変化はミリ秒オーダーの速い構造変化であることが予想されていた。本研究では、X 線集光ミラーを動態計測法に最適化して設計し、導入することにより、従来ビデオレート（３３ミリ秒の時間分解能）であった観測速度を大幅に高速化し、１ミリ秒以下の時間分解能まで高めることに成功した。図２に導入した機器の配置を示す。左から放射光 X 線が入射する。アテニュエータ位置には様々な X 線吸収特性をもつ金属板を配し、X 線スペクトルのデザインを行った。集光ミラーは高エネルギー領域まで集光できるようにデザインした。X 線を集光し、観測位置で集光前の数百倍の輝度を持ちうる設計とした。X 線観測位置にスペクトル計測システムを導入し、アテニュエータの組み合わせに対して X 線スペクトルがどのように変化するかを計測する。
　図３に X 線スペクトルの概要を示す。従来は輝度は高いがエネルギー幅の狭いビームライン（BL40XU)、エネルギー幅は広いが輝度が低いビームライン（BL28B2）が利用可能であった。本助成で BL28B2 に集光ミラーを導入して輝度を高めることによって、広いエネルギー幅をもつ高輝度観測光を実現した。
　また、様々なアテニュエータを導入することにより、蛋白質に対する照射損傷の少ない X 線照射条件を探索した。
　これらの開発の結果、観測位置でサブミリ秒時間分解能でのイオンチャネル蛋白質の 1 分子構造変化計測に成功した（図４）。

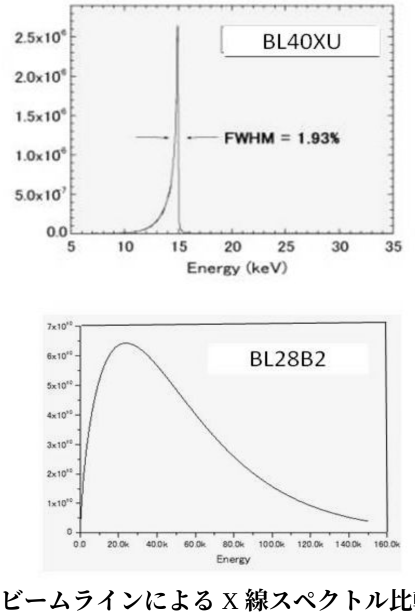

図３ビームラインによる X 線スペクトル比較
SPring8 における利用可能なビームラインの X 線 スペクトル比較。BL40XU は高輝度ビームラインであり輝度は高速観測可能であるが、エネルギー幅が狭い。BL28B2 はエネルギー幅は広いが輝度は不足していた。(SPring8 web page)

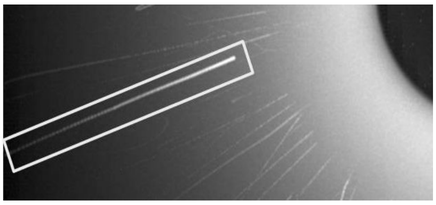

図４サブミリ秒時間分解能での計測例
一枚一枚の画像には点として観測されるが、画像を重ね合わせて運動の軌跡を表示した。図の四角内のように、半径方向に広く運動軌跡が観測できていることがわかる。これは高輝度でエネルギー範囲の広い観測光が得られたことを示している。右黒丸は画像中央を示す（図１での中心点）。

　サブミリ秒の時間分解能は、イオンチャネル蛋白質の機能測定法である１分子電流計測法と同等の観測速度であり、本研究の成果は 1 分子での動態計測システムの時間分解能が機能測定法の時間分解能と同等になったことを意味する。
　この開発が、日本国内で実現した意味は大きい。イオンチャネル蛋白質は細胞内外のイオンの通り道として重要な蛋白質であり、創薬の標的分子としても重要であることが知られている。国内での高速動態観測システムの開発の成功により、動きと機能の同時計測システムの開発が加速すると考えられる。本研究課題は基盤（B）助成（課題番号：15H04675）に継続される。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　４　件）
①H. Nakao, K. Ikeda, M. Iwamoto, H. Shimizu, S. Oiki, Y. Ishihama, M. Nakano pH-dependent promotion of phospholipid flip-flop by the KcsA potassium channel Biochim. Biophys. Acta-Biomembr. 1848 (2015) 145-150　査読有

②A. Yamakata, H. Shimizu, M. Osawa, S. Oiki: Structural changes of the KcsA potassium channel upon application of the electrode potential studied by surface-enhanced IR absorption spectroscopy Chem. Phys. 419 (2013) 224-228　査読有

③Y. Furutani, H. Shimizu, Y. Asai, T. Fukuda, S.Oiki, H. Kandori: ATR-FTIR spectroscopy revealing the different vibrational modes of the selectivity filter interacting with K+ and Na+ in the open and collapsed conformations of the KcsA potassium channel　J.Phys.Chem.Lett 3 (2012) 3806-3810 査読有

④H. Shimizu, M. Iwamoto, T. Konno, A. Royant, D. Setten, L. Guerin, M. Wulff, S. Oiki Laser-Triggered Single Molecular Gating Motions of the KcsA Potassium Channels Recorded in a Sub-Millisecond Time Resolution Biophys. J. 102 (2012) 37a 査読無

〔学会発表〕（計 １０ 件）
①Hirofumi Shimizu, Masayuki Iwamoto, Yumiko Oota, Shigetoshi Oiki: Relationship between Structural Fluctuations and the Opening Conformational Changes of The KcsA Potassium Channel. 第120回日本解剖学会総会 全国学術集会，第92回日本生理学会 2015年3月21日～23日 神戸国際会議場・展示場

②Hirofumi Shimizu, Masayuki Iwamoto, Yumiko Oota, Yoshikazu Hirai, Osamu Tabata, Shigetoshi Oiki "The diffracted X-ray tracking method for recording the single-molecule conformational changes of the KcsA potassium channel in a sub-millisecond time resolution", The 45th Natl Inst Physiol Sci (NIPS) International Symposium, Okazaki, Japan 25-28 November, 2014 .

③平井義和、田畑修、清水啓史：X線１分子動態計測法で用いる低ノイズ観測チャンバーの開発 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第30回研究会（CHEMINAS30）2014年10月2日～3日 北海道大学フロンティア応用科学研究棟

④Hirofumi Shimizu, Masayuki Iwamoto, Yumiko Oota, Shigetoshi Oiki:The Enhancement of the Structural Fluctuations Prior to The Opening Conformational Changes of the KcsA Potassium channel. 第52回 日本生物物理学会 2014年9月25日～27日 札幌コンベンションセンター

⑤Hirofumi Shimizu, Masayuki Iwamoto, Antoine Royant, David von Stetten, Laurent Guerin, Micahel Wulff, Shigetoshi Oiki: Development of a method for measuring single-molecule motions of the KcsA potassium channel in a sub-millisecond time resolution. Single Protein Dynamics in Cellulo 2014: Satio-Temporal, Structural and Quantitative Analyses. 2014年4月21日～25日 OIST seaside house, Okinawa

⑥清水啓史、岩本真幸、老木成稔 高時間分解能で蛋白質の分子揺らぎと構造変化を計測するためのX線１分子動態計測法の開発 第51回日本生物物理学会 2013年10月28日～30日 国立京都国際会館

⑦ Hirofumi Shimizu: Development of a method for recording single molecular gating dynamics of KcsA potassium channel in a sub-millisecond time resolution. Nagoya Symposium Frontiers in Structural Physiology 2013年01月22日～2013年01月24日 名古屋

⑧清水啓史 et.al KcsA カリウムイオンチャネルの溶液条件変化応答 1 分子開閉ダイナミクスの解析 第50回日本生物物理学会年会，シンポジウム「先端顕微計測が照らす生命の輝き」2012年09月22日～2012年09月24日
名古屋

⑨老木成稔，岩本真幸，炭竃享司，清水啓史 カリウムチャネルの選択透過性とゲーティング 平成24年度生理学研究所研究会「膜機能分子の機能・構造ゆらぎの時空間スペクトル解析」2012年09月06日～2012年09月07日 岡崎

⑩清水啓史 et.al.サブミリ秒時間スケールでの KcsA カリウムイオンチャネル開閉構造変化の１分子動画計測 第12回日本蛋白質科学会年会，シンポジウム「YouTube 時代の構造生物学」2012年06月12日～2012年06月14日 名古屋

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

イオンチャネル蛋白質１分子の動きを動画でとらえる～X線１分子動態計測法の開発～
清水啓史、井上良幸
NanotechJapan Bulletin Vol.6, No.5, 2013

６．研究組織
(1)研究代表者
清水 啓史 (Shimizu, Hirofumi)
福井大学・医学部・講師
研究者番号：50324158

(2)連携研究者
岩本 真幸 (Iwamoto, Masayuki)
福井大学・医学部・助教
研究者番号：40452122