

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659096

研究課題名(和文)上皮様複合膜作成法の開発

研究課題名(英文)Development of the epithelium-like complex membrane system

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：上皮様膜系を確立するにはその前段階として1枚膜の脂質平面膜を形成し、膜蛋白質を再構成する系を確立する必要がある。従来の方法に比べて約10分の1のサイズの液滴で脂質2重膜を形成した。膜面積も小さく電気的背景雑音を劇的に低減させることに成功した。また異なるリン脂質のリポソームを液滴に加えることにより、非対称組成の脂質2重膜を形成できた。さらに溶液の急速灌流が可能な系を確立した。

研究成果の概要(英文)：To develop the epithelium-like complex membrane system, we start to establish a single-membrane system with a reproducible way. Compared to the conventional droplet interface bilayer method, the size of the droplet was decreased to one tenth, and the background noise was substantially attenuated. The asymmetric membrane was formed by adding different liposomes composed of distinct lipid compositions to the droplets. We revealed that the gating of the KcsA potassium channel was regulated by the acidic lipid in the inner leaflet of the membrane. The rapid perfusion system was introduced into the bilayer system, in which two glass pipettes were inserted into one of the droplet. The solution was exchanged within several tens of ms, and the pH-dependent activation of the KcsA channel was readily measured.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：脂質平面膜 液滴界面2重膜法 溶液急速灌流

1. 研究開始当初の背景

生体上皮組織に範をとった全く新しい発想の相界面膜構造をもつ「人工上皮様膜」を確立することが本研究の目的である。生体の上皮組織の特徴は細胞膜に極性をもつことであるが、これは細胞膜に異なる輸送特性を示す2領域があるということになる。この上皮の基本構築を2枚の異なる膜を形成することにより実現する。このような膜を形成するための手法は申請者が長年にわたってその方法論を改良してきた脂質平面膜法 (Oiki, 2012) を基本とする。この技術の上に最近申請者が成功した膜蛋白質埋め込み技術 (Yanagisawa et al., JACS, 2011) を加えることにより、膜蛋白質を2枚の膜のどちらにでも自由な向きに組み込むことができる。この2枚の膜の一方にはチャンネルを、他方にはポンプを再構成することにより上皮として最小限の機能を生み出すことが可能となる。このような単純な膜構成ではチャンネルとポンプの分子特性を上皮輸送特性に直結することができ、新しい上皮輸送研究系のプロトタイプとして基礎研究の大きな発展が期待できる。

2. 研究の目的

上皮組織は複雑な構造をもつため、その輸送特性を明らかにする上でチャンネルなどの膜分子機能とシステムとしての物質輸送機能を関連付けるための研究が容易ではなかった。本申請では上皮組織の最も本質的な構築を抽出した人工上皮様組織を作り出す技術を確認し、分子レベルから組織レベルまでを統合した新しい実験系として利用することを目指す。人工上皮様組織の基本技術は人工膜と呼ばれる脂質平面膜法であり、方法論として十分確立している。従来1枚の平面膜上にチャンネルなどの膜蛋白質を埋め込み電気生理学的実験が行われてきたが、申請者は最近になって全く新しい2枚膜を形成する方法の着想を得、これが輸送上皮としての要件を備えていることに思い至った。このシステムを上皮フィジオームの一つの実験系アプローチとして確立したい。

3. 研究の方法

上皮様複合膜の形成法を確認し、最小構成で稼働可能な膜蛋白質 (チャンネルとポンプ) を組み込み上皮機能を発現させる。この上皮に対して従来から行われてきた上皮輸送特性を明らかにする実験 (経上皮電位や短絡電流の測定、アイソトープ流束比の測定) を行う。これらの実験で上皮機能が証明されれば、この上皮系を使って従来行えなかった次のような実験を行う。それはチャンネルやポンプの発現量を変化させ、その時のイオン輸送量との関係を探ることである。もうひとつの計画は、他のチャンネルとポンプという膜蛋白質の組み

合わせを変えて異なる“上皮”を作り出すことである。長期的な展望としては通常の上皮と同様にナトリウムポンプなどを発現させて実験を行いたい。

4. 研究成果

新しい脂質2重膜形成法の確立

上皮様膜系を確立するにはその前段階として1枚膜の脂質平面膜を形成し、膜蛋白質を再構成する系を自由自在に作成できなければならない。

(1) 改良 DIB 法の確立

従来の DIB (Droplet Interface Bilayer) は液滴のサイズが大きく取り扱いにくい。これに比べて約10分の1のサイズの液滴で脂質2重膜を形成した。膜面積も小さく電氣的バックグラウンドノイズを劇的に低減させることができた。さらにこの方法では液滴をモータードライブで動かすので、操作性が極めて優れている。

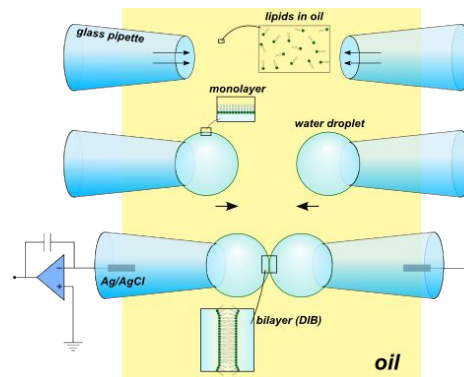


図1 .ヘキサデカンにあらかじめリン脂質を加えておく。液滴 (KCl 溶液) 表面に形成されたリン脂質の単分子膜を接触させることで脂質2重膜が簡単に形成される。このとき膜の厚さは使用する有機溶媒の分子種により、ヘキサデカンの場合、約4 nmの厚さの膜ができる。チャンネルはリポソームに再構成し、あらかじめ液滴内に加えておく。脂質2重膜にリポソームが膜融合し、チャンネルが取り込まれる。

(2) 非対称性膜の形成

各液滴内に異なる組成のリン脂質で形成したリポソームを加えることによって、非対称脂質2重膜を簡単に形成できるようになった。

(3) 非対称性膜による KcsA カリウムチャンネルの脂質依存性機構解明

KcsA カリウムチャンネルが膜リン脂質組成によってそのゲーティングを大きく変えることは知られていた。そのメカニズムを明らかにするために脂質2重膜の組成を完全非対称にして実験を行った。その結果、膜内葉の負電荷リン脂質がチャンネルのゲートを開状態に保つことを明らかにした。

(4) 急速溶液灌流法の開発

pH 依存性カリウムチャンネルである KcsA の pH 依存性を明らかにするには溶液の pH を急速にジャンプし、その時のチャンネルの応答を観察する必要がある。液滴の一方に微小ガラス管を刺入し、異なる pH 溶液を灌流することによって、数十ミリ秒で溶液を置換することができた。これによってチャンネルの pH 依存性活性化だけでなく、活性化に引き続いて起こる不活性化の時間経過を捉えることができた。

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. Sumino, A., Yamamoto, D., Iwamoto, M., Dewa, T., and Oiki, S.: Gating-associated clustering-dispersion dynamics of the KcsA potassium channel in a lipid membrane. *J. Phys. Chem. Lett.* 5: 578-584, 2014. DOI:10.1016/j.molliq.2014.03.050
2. Iwamoto, M., Matsunaga, S. and Oiki, S.: Paradoxical one-ion pore behavior of a long β -helical peptide of marine cytotoxic polytheonamide B. *Sci. Rep.* 4: 3636 (1-7), 2014. DOI:10.1021/jz402491t
3. Phongphanphanee, S., Yoshida, N., Oiki, S. and Hirata, F.: The “ambivalent” snug-fit sites in the KcsA potassium channel probed by “3D-RISM microscopy”. *Pure and Applied Chemistry*, 86: 97-104, 2014. DOI:10.1515/pac-2014-5018
4. Ryu, S., Imai, Y.N., S. Oiki: The synergic modeling for the binding of fluoroquinolone antibiotics to the hERG potassium channel. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23: 3848-3851, 2013. DOI:pii: S0960-894X(13)00564-7. 10.1016/j.bmcl.2013.04.074
5. Yamakata, A., Shimizu, H., Osawa, M. and Oiki, S.: Structural changes of the KcsA potassium channel upon application of the electrode potential studied by surface-enhanced IR absorption spectroscopy. *Chemical Physics* 419: 224-228, 2013. DOI: なし
6. Watanabe, R., Tabata, K.V., Iino, R., Ueno, H., Iwamoto, M., Oiki, S. and Noji, H.: Biased Brownian Stepping Rotation of F_0F_1 -ATP Synthase Driven by Proton Motive Force. *Nature Commun.* 4: 1631 (), 2013. DOI:10.1038/ncomms2631
7. Sumino, A., Sumikama, T., Iwamoto, M., Dewa, T., and Oiki, S.: The Open Gate Structure of the Membrane-Embedded KcsA Potassium Channel Viewed From the Cytoplasmic Side. *Sci. Rep.* 3: 1063 (1-7), 2013. 注目の論文. DOI:10.1038/srep01063
8. Iwamoto, M. and S. Oiki: The amphipathic

antenna of an inward rectifier K^+ channel responds to changes in the inner membrane leaflet. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 749-754, 2013.

DOI:10.1073/pnas.1217323110

9. Furutani, Y., Shimizu, H., Asai, Y., Fukuda, T., Oiki, S. and Kandori, H.: ATR-FTIR Spectroscopy Revealed 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: 3806-3810, 2012. DOI:10.1021/jz301721f
10. Imai, S., Osawa, M., Mita, K., Toyonaga, S., Machiyama, A., Ueda, T., Takeuchi, K., Oiki, S. and Shimada, I.: Functional Equilibrium of the KcsA Structure Revealed by NMR. *J. Biol. Chem.* 287: 39634-39641, 2012. DOI:10.1074/jbc.M112.401265

[学会発表](計 24 件)

1. 老木成稔、チャンネル機能の再構成と再生：ポスト結晶時代の単一チャンネル研究 第 91 回日本生理学会大会、2014.3.16-18、鹿児島大学（鹿児島市）
2. 岩本真幸・老木成稔、膜脂質組成が KcsA カリウムチャンネルの不活性化ゲート開閉に及ぼす影響、第 91 回日本生理学会大会、2014.3.16-18、鹿児島大学（鹿児島市）
3. 松木悠佳・岩本真幸・松永茂樹・老木成稔、ポリセオナミド B チャンネルのプロトン透過：単一チャンネル電流記録とプロトン透過モデル、第 91 回日本生理学会大会、2014.3.16-18、鹿児島大学（鹿児島市）
4. 角野歩・山本大輔・岩本真幸・出羽毅久・老木成稔、カリウムイオンチャンネル KasA のゲート開閉と連動した膜中集合・離散挙動：原子間力顕微鏡による直接観察、第 91 回日本生理学会大会、2014.3.16-18、鹿児島大学（鹿児島市）
5. 老木成稔、チャンネル蛋白質と水動態、研究会「水シグナリングの分子動態から病態へ」、福井市地域交流プラザ Aossa（福井市）2014.3.5-6
6. M. Iwamoto, S. Oiki Membrane lipids modulate the inactivation gating of the KcsA potassium channel, Biophysical Society 58th Annual Meeting, San Francisco, **Moscone Center (San Francisco, California, USA)**, 2014.2.15-19
7. T. sumimaka, S. Saito, S. Oiki 3rd International Conference on Molecular Simulation, Hydrophobic Cavity in the Potassium Channels: Anomalous Nanospace Controlling Ion Condition, 2013.11.18-20, Kobe International Conference Center（神戸市）
8. 老木成稔、最新イオンチャンネル 1 分子科学：素過程から疾患克服まで、第 51 回日本生物物理学会年会、2013.10.28-30、京都国際会議場（京都市）

9. 角野歩・山本大輔・岩本真幸・出羽毅久・老木成稔、カリウムイオンチャネル KcsA のゲート開閉と運動した膜脂質内での集合・離散ダイナミクス、第 51 回日本生物物理学会年会、2013.10.28-30、京都国際会議場（京都市）
 10. 炭竈享司・斉藤真司・老木成稔、K⁺チャネルの中心空洞内の水の配向は静電的相互作用を増強する、第 51 回日本生物物理学会年会、2013.10.28-30、京都国際会議場（京都市）
 11. 岩本真幸・老木成稔、負に帯電した膜内葉表面でのアミノ末端両親媒性ヘリックスの回転が KcsA カリウムチャネルの開状態を安定化する、第 51 回日本生物物理学会年会、2013.10.28-30、京都国際会議場（京都市）
 12. 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年会、2013.10.28-30、京都国際会議場（京都市）
 13. 松木悠佳・三田建一郎・岩本真幸・重見研司・老木成稔、心電図 QT 時間における K チャネルへの Mg イオンの効果とその分子機構、第 34 回日本循環制御医学会総会、2013.6、福井県民ホール（福井市）
 14. 岩本真幸・老木成稔、KcsA カリウムチャネルの活性化ゲート開閉に影響を及ぼす細胞内脂質センサー部位の同定、第 90 回日本生理学会大会、2013.03.27-29、タワーホール船堀（東京）
 15. 松木悠佳・三田建一郎・炭竈享司・岩本真幸・清水啓史・老木成稔、ポリセオアミド B のプロトン透過と pH 依存性ゲーティング、第 90 回日本生理学会大会、2013.03.27-29、タワーホール船堀（東京）
 16. T.Sumikama, S.Saito, S.Oiki, Pdependency of ion permeation pattern on K⁺ concentration through the Kv1.2 channel, Biophysical Society 57th Annual Meeting, 2013.02.2-3, Baltimore, Maryland(USA)
 17. M.Iwamoto, S.Oiki, The sensing sites for the membrane inner lipids regulate the activation gating of the KcsA potassium channel, Biophysical Society 57th Annual Meeting, 2013.02.2-3, Baltimore, Maryland(USA)
 18. S.Oiki, M.Iwamoto, MEMBRANE LIPID-SENSITIVE GATING OF THE KcsA POTASSIUM CHANNEL, 揺らぎが機能を決める生命分子の科学公開シンポジウム、2012.12.05-06、京都テルサ（京都市）
 19. 岩本真幸・老木成稔、KcsA カリウムチャネル活性に影響を及ぼすリン脂質作用部位の同定、日本生物物理学会第 50 回年会、2012.09.22-24、名古屋大学（名古屋市）
 20. 清水啓史・岩本真幸・A. Royant・D. Setten・L.Guerin・青木義満・M. Wulff、老木成稔、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、日本生物物理学会第 50 回年会、2012.09.22-24、名古屋大学（名古屋市）
 21. 老木成稔・炭竈享司・斉藤真司、Kv1.2 チャネルでの選択的イオン透過、日本生物物理学会第 50 回年会、2012.09.22-24、名古屋大学（名古屋市）
 22. 岩本真幸・老木成稔、KcsA カリウムチャネル活性に影響を及ぼすリン脂質作用部位の同定、日本生物物理学会第 50 回年会、2012.09.22-24、名古屋大学（名古屋市）
 23. 老木成稔・岩本真幸・炭竈享司・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、2012.09.06-07、岡崎コンフェアレンスセンター（岡崎市）
 24. 清水啓史・岩本真幸・今野卓・A. Royant, D. Setten・L. Guerin・M. Wulff・老木成稔、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、2012.06.20-22、名古屋国際会議場（名古屋市）
- 〔図書〕(計 5 件)
1. 老木成稔：イオン透過装置：イオンチャネル、野地博行編、化学フロンティア 23「1 分子ナノバイオ科学の新パラダイム～極限計測と理論、分子からシステムへ」化学同人、2014、印刷中
 2. 老木成稔：イオンチャネル：チャネルとその機能をつなぐ膜 寺嶋正秀編『揺らぎ・ダイナミクスと生体機能—物理化学的視点から見た生体分子—』253-266, 化学同人、2013, pp. 347.
 3. Oiki, S.: Gating Dynamics of the Potassium Channel Pore. *Comprehensive Biophysics*. Edward Egelman Ed. Volume 6. Channel Proteins, Mauricio Montal Ed. Oxford: Academic Press 31-67, 2012, pp. 245. 978-0-12-374920-8
 4. Oiki, S.: "Chapter 16. Planar Lipid Bilayer Method for Studying Channel Molecules." Y. Okada Ed. *Patch Clamp Techniques: From Beginning to Advanced Protocols*. Springer Protocols Handbooks. Springer-Verlag 229-275, 2012, pp. 439.
 5. Kukita, F. and S. Oiki: "Chapter 1. Prologue: The Ion Channel." Y. Okada Ed. *Patch Clamp Techniques: From Beginning to Advanced Protocols*. Springer Protocols Handbooks. Springer-Verlag 1-19, 2012, pp. 439.
- 〔産業財産権〕
出願状況（計 1 件）

名称：脂質平面膜を形成するための貫通孔を有するガラス基板、およびその製造方法と用途

発明者：老木 成稔・岩本真幸

権利者：老木 成稔・岩本真幸

種類：特許

番号：特願 2013 - 155692 号

出願年月日：2013 年 7 月 26 日

国内外の別：国内

取得状況（計 2 件）

名称：変異型 HERG チャ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：国立大学法人福井大学・武田薬品工業株式会社

種類：特許

番号：特願 2005 - 269153 号

取得年月日：平成 23 年 9 月 22 日

国内外の別：国内

名称：シス - トランス液流方式によるイオンチャネル解析方法と、その方法に使用するイオンチャネル解析装置

発明者：老木 成稔・山内紀宏・坪田圭介

権利者：老木 成稔・轟産業株式会社

種類：特許

番号：特願 2004 - 153209 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

老木成稔：イオンチャネルの動的構造と分子機構解明のための 1 分子研究. 科研費 NEWS2013 年度 Vol.2, 17, 2013.

日本生理学会 サイエンスピックアップ No. 82 岩本真幸 (老木成稔): K⁺チャネルが細胞膜の脂質の環境を感じ取り活性を制御する機構の解明

日本生理学会 サイエンスピックアップ No. 92 角野歩 (老木成稔): カリウムチャネル KcsA のゲート開閉と連動した膜中集合・離散ダイナミクス

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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：