

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440067

研究課題名(和文)油中水滴接触膜を応用したイオンチャネル機能に対する脂質効果の一分子解析

研究課題名(英文)Development and application of the experimental platform for the single-molecule analysis of the lipid-effects on the ion channel function

研究代表者

岩本 真幸 (Iwamoto, Masayuki)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：40452122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では油中水滴同士の接触膜形成の原理を応用し、膜タンパク質機能に対する細胞膜脂質組成の効果を定量的に解析するための人工膜実験プラットフォームを開発した。これを使い、非対称膜を含む様々な脂質二重膜組成下で代表的イオンチャネル(KcsAカリウムイオンチャネル)の活性を測定したところ、1分子レベルでの活性の脂質依存性を捉えることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Based on the principle of formation of the contact bilayer between water-in-oil droplets, we developed the platform for the artificial membrane experiments to analyze quantitatively the "lipid-effects" on the function of the membrane proteins. We prepared a variety of lipid bilayer membranes having different lipid composition including asymmetric membranes on the platform. We reconstituted the KcsA potassium channel into these membranes and succeeded in detecting the lipid-dependency in the activity of the channel at single-molecule level.

研究分野：イオンチャネルの分子生理学

キーワード：生体膜 1分子計測 チャネル 脂質 電気生理

1. 研究開始当初の背景

(1) 膜タンパク質機能と脂質環境

細胞膜の脂質組成は細胞種ごとに異なるほか、脂質代謝やフリップ・フロップなどにより膜面内の局所においても時々刻々と変化している。膜タンパク質はこのように脂質環境が変動する細胞膜中に存在しており、その活性・機能は周囲の脂質に依存することが知られている(脂質効果)。これまで、膜タンパク質機能に対する脂質効果に関し、個々の膜タンパク質に対して活性保持に必要な特定の脂質分子が明らかにされるなど、定性的な観点から調べられてきた。一方、脂質分子がどのようにして膜タンパク質機能を修飾しているのか、その詳細な分子機序はほとんどのケースで明らかになっていない。現在、膜タンパク質の立体構造が次々に解かれ、構造を基にタンパク質の作動原理を推察する研究が盛んに行われている。しかし、膜環境中で解かれた構造がほとんど無いため、活性・機能を左右する重要なファクター(脂質効果)を十分に考慮することが困難な場合も多い。膜タンパク質の構造-機能連関を正しく理解するために、脂質効果の具体的なメカニズム解明が強く望まれる。

(2) イオンチャネル活性の脂質依存性

イオンチャネルは最も普遍的に存在する膜タンパク質であるが、その活性・機能が脂質環境に影響されることが古くから知られている。また、近年解かれたイオンチャネル結晶構造の中には、分子内の特定の部位に結合した脂質も見つかっており、活性・機能修飾との関連が議論されはじめています。イオンチャネルの場合、その活性を膜中のチャネル分子を介するイオン流(=電流)として一分子レベルで感度良くモニターできる利点がある。したがってイオンチャネルを用いれば、機能に対する脂質効果のメカニズムを詳細に検討することが可能と考えられる。

2. 研究の目的

本研究では生体膜に普遍的に存在する膜タンパク質・イオンチャネルを用い、膜脂質による機能修飾メカニズムを最もミクロなレベルで追究する。具体的には、油中水滴間の接触膜を応用し、脂質二重膜表裏の脂質組成をそれぞれ自在にコントロールできる一分子機能解析プラットフォームを確立させる。これを基盤実験技術とし、チャネル分子内のどこに脂質が作用し、機能・活性にどのような影響を与えるのか、一分子レベルでの精密な解析を行う。膜タンパク質機能・活性の緻密な制御と膜脂質組成のダイナミックな特性との関連を、最もミクロな視点から解明することを目指したい。

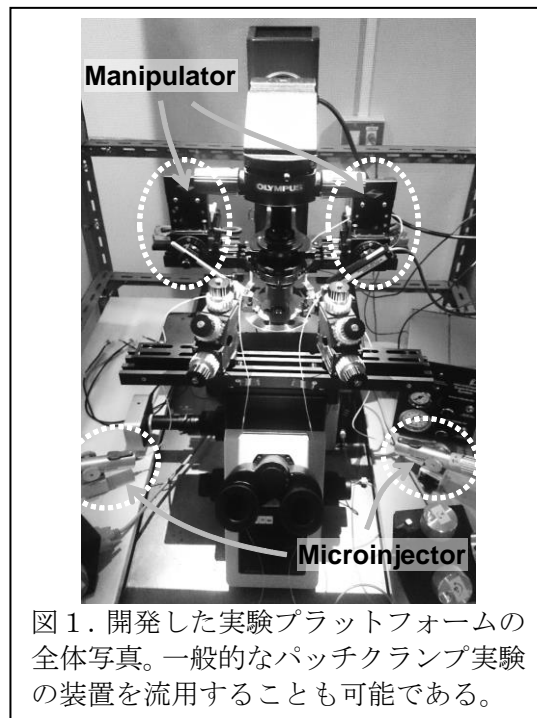


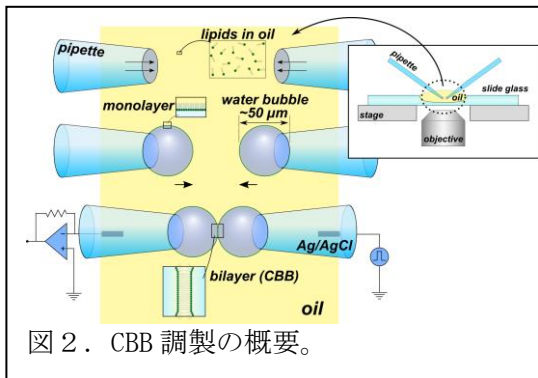
図1. 開発した実験プラットフォームの全体写真。一般的なパッチクランプ実験の装置を流用することも可能である。

3. 研究の方法

(1) 人工膜実験プラットフォームの開発

油中水滴の油水界面に脂質単分子層を形成させ、2つの油中水滴同士を接触させると脂質二重膜(接触膜)が形成される。これをイオンチャネル一分子機能解析の場として利用するため、倒立型顕微鏡、各種マニプレータ、電気生理測定システムを組み合わせた測定プラットフォームを開発した(図1)。倒立型顕微鏡ステージ上に置いたホールスライドガラスをチャンバーとし、ホール(15φ×0.4 mm)に150μLのリン脂質(25 mg/mL)を溶解したヘキサデカンを満たし油相とした。油相内に先端径約30μmの先細ガラスピペット2本の先端を浸し(図2上段)、ここからピペット内の電解質溶液を押し出し油相に膨らませた(約300 pL、図2中段)。ピペット先端の油中水滴同士をマニプレータ操作で接触させ、接触面に脂質二重膜を形成させた(図2下段)。我々はこの様にして作成した脂質二重膜を Contact Bubble Bilyaer (CBB) と名付けた。両ピペット内の電解質溶液には Ag/AgCl ワイヤ電極が浸漬しており、接続した電気生理学測定アンプにより脂質二重膜の膜電位・電流の制御・測定が可能である。CBB に接する電解質溶液の急速灌流は、油中水滴にインジェクション用ピペット(先端径約2μm)を刺入して行った。インジェクションにより油中水滴内の電解質溶液は電極側のピペット内に流れ込み、CBB 近傍の溶液が置換される(図3)。

(2) チャネル調製



研究対象に用いた KcsA カリウムイオンチャネルおよびその変異体は、N または C 末端に His タグを付加し大腸菌膜に大量発現させた。細胞膜画分をドデシルマルトシドで可溶化後、アフィニティーカラム (TALON) で高純度精製した。

(3) 蛍光ラベル実験

KcsA に対する蛍光ラベルにはテトラメチルローダミン (TMR) を用いた。目的のラベル導入部位は Cys 置換し、TMR のマレイミド体を反応させて部位特異的にラベルした。ラベル化 KcsA は目的脂質で調製したリポソームに再構成し、pH4 または pH7 の電解質溶液中にて蛍光分光光度計で蛍光強度を解析した。

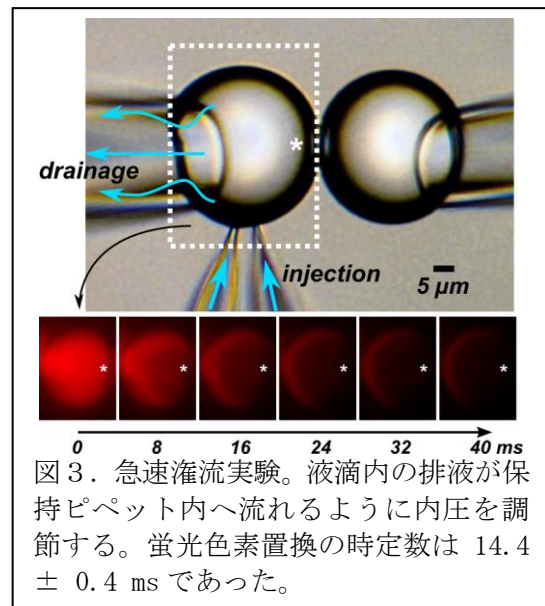
4. 研究成果

(1) CBB 実験プラットフォームの評価

本研究で開発した CBB 法で特筆すべき点は、極小の油中水滴を用いることで CBB の面積を従来法の脂質平面膜法 (PLB 法) の 1/100 程度にまで小さくした点である。これにより電気生理測定時のノイズ特性および膜の物理的強度を大きく向上させることができた。

形成された CBB にチャネルタンパク質を挿入するにはリポソームを用いた。KcsA を再構成したリポソーム懸濁液をピペット内に含ませて液滴を形成させれば、チャネルが CBB に移行し、単一チャネル電流や巨視的電流を観測できた。またこの際、それぞれ異なる脂質組成のリポソームを含む油中液滴同士を接触させれば、非対称脂質二重膜を容易に形成させることもできた。

パッチクランプ法では、アゴニストまたはブロッカー急速投与後の経時的チャネル電流変化の解析が一般的に行われている。これにはチャネル周囲の溶液を迅速に置換する必要があるが、PLB ではその面積の大きさに起因する物理的安定性の低さから、溶液置換は膜が破れないよう静穏に行う必要がある。CBB ではそのような制約はなく、液滴に直接インジェクションピペットを挿入して溶液を急速に置換しても膜は安定に保たれた。蛍光および電気生理学的測定から、CBB 近傍の溶液は 20 ms 以内に置換されることがわかり、CBB 法が急速投与実験にも応用可能であるこ



とが示された (図 3)。

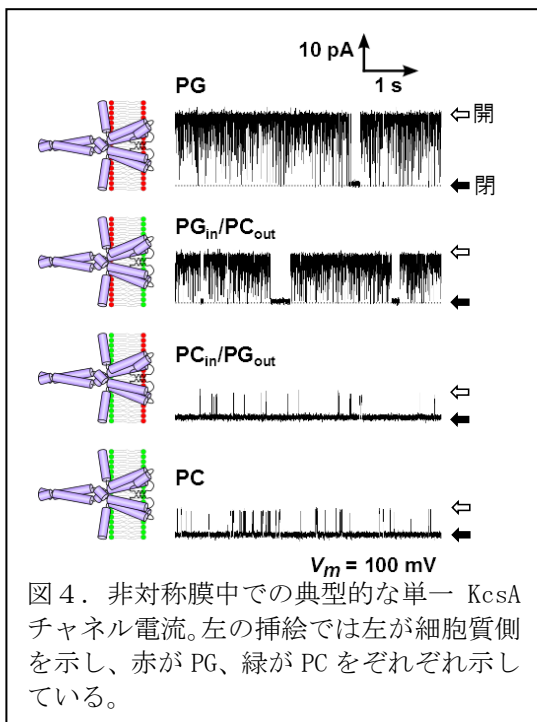
以上から CBB 法は、低ノイズ電流信号記録、非対称脂質二重膜作成、急速溶液置換が行えるなど、従来法よりも汎用性が高い人工膜実験法であると言える。

(2) KcsA チャネル機能の脂質依存メカニズムの解明

KcsA チャネルの単一チャネル電流測定を様々な脂質二重膜組成下で行った (図 4)。KcsA チャネル活性には細胞膜中にフォスファチジルグリセロール (PG) が含まれる必要があることは、過去の生化学的な実験で定性的には知られていた。この KcsA の性質を、本研究で開発した CBB 実験プラットフォームを用いて単一チャネル電流レベルで捉えた。CBB 法で様々な非対称膜を作成し実験を行ったところ、PG が脂質二重膜の細胞質側リーフレットに存在すると開確率が 10 倍程度高くなることを示した。PG は 1 チャネル当たりのイオン透過速度 (単一チャネルコンダクタンス) も増加させたが、その度合いは 3 倍程度だったので、PG 効果の主要因は開確率の増加であることが明確になった。

KcsA 分子に対する PG の作用点を特定するため、変異体チャネルを用いた系統的な調査を行った。PG は正味の負電荷を有するため、チャネル分子側は正電荷を有するアミノ酸を変異のターゲットとし、電荷を持たないものに置換した。その結果、チャネル本体から細胞質側リーフレット表面に突出した両親媒性ヘリックス (M0 ヘリックス) に存在する Arg11 と Lys14 の 2 つのアミノ酸側鎖の正電荷が PG の作用点と特定された。

PG 効果のメカニズムを解明するため、M0 ヘリックスに対する蛍光ラベル実験を行った。その結果、チャネルが閉構造から開構造となる構造変化の際、M0 ヘリックスがヘリックス軸を回転軸として膜表面で回転することを明らかにした。この回転によって Arg11 と Lys14 の側鎖が PG の負電荷と相互作用で



きる配置となり、開構造を安定化していると推察した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Matsuki Y, Iwamoto M, Mita K, Shigemi K, Matsunaga S, Oiki S, Rectified proton Grotthuss conduction across a long water-wire in the test nano-tube of the polytheonamide B channel, *J. Am. Chem. Soc.* 138 (2016) 4168-4177, DOI: 10.1021/jacs.5b13377, 査読有
- ② Iwamoto M, Oiki S, Instantaneous change in lipid compositions in the bilayer membrane during current recordings using the contact bubble bilayer method, *J. Physiol. Sci.* 66 Suppl. (2016) s117, 査読無
- ③ Chang HK, Iwamoto M, Oiki S, Shieh RC, Mechanism for attenuated outward conductance induced by mutations in the cytoplasmic pore of Kir2.1 channels, *Sci. Rep.* 5 (2015) 18404, DOI: 10.1038/srep18404, 査読有
- ④ Iwamoto M, Oiki S, Methods for the functional analysis of ion channels on the contact bubble bilayer by the intra-bubble perfusion, *J. Physiol. Sci.* 65 Suppl. (2015) s117, 査読無
- ⑤ Iwamoto M, Oiki S, Contact bubble bilayers with flush drainage, *Sci. Rep.* 5 (2015) 9110, DOI: 10.1038/srep09110, 査読有
- ⑥ Nakao H, Ikeda K, Iwamoto M, Shimizu H, Oiki S, Ishihama Y, Nakano M, pH-dependent promotion of phospholipid

flip-flop by the KcsA potassium channel, *Biochim. Biophys. Acta* 1848 (2015) 145-150, DOI: 10.1016/j.bbame.2014.10.001, 査読有

- ⑦ Iwamoto M, Oiki S, Effect of membrane lipids on the inactivation gating of the KcsA potassium channel, *J. Physiol. Sci.* 64 Suppl. (2014) s123, 査読無
- ⑧ Iwamoto M, Matsunaga S, Oiki S, Paradoxical one-ion pore behavior of the long β -helical peptide of marine cytotoxic polytheonamide B, *Sci. Rep.* 4 (2014) 3636, DOI: 10.1038/srep03636, 査読有
- ⑨ Sumino A, Yamamoto D, Iwamoto M, Dewa T, Oiki S, Gating-associated clustering-dispersion dynamics of the KcsA potassium channel in a lipid membrane, *J. Phys. Chem. Lett.* 5 (2014) 578-584, DOI: 10.1021/jz402491t, 査読有
- ⑩ Iwamoto M, Oiki S, Amphipathic antenna of an inward rectifier K^+ channel responds to changes in the inner membrane leaflet, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 749-754, DOI: 10.1073/pnas.1217323110, 査読有

[学会発表] (計 12 件)

- ① 岩本真幸, 膜脂質がカリウムイオンチャンネルのゲート開閉を制御する分子機構, 蛋白研セミナー: 膜タンパク質の構造ダイナミクス, 大阪大学蛋白質研究所 (大阪府・吹田市), 2016. 5. 13
- ② 岩本真幸, 油中水滴接触膜でのイオンチャンネル電流測定中に脂質二重膜組成を瞬間的に変更する試み, 第 93 回日本生理学会大会, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市), 2016. 3. 23
- ③ 岩本真幸, 液滴接触膜を応用したイオンチャンネル機能解析法, 第 62 回中部日本生理学会, 富山大学五福キャンパス (富山県・富山市), 2015. 11. 13
- ④ 岩本真幸, 流動電位測定により明らかにされたカリウムチャンネルポア内でのイオンと水の共役的透過, 日本生物物理学会第 53 回年会シンポジウム, 金沢大学角間キャンパス (石川県・金沢市), 2015. 9. 15
- ⑤ 岩本真幸, 微小な液滴接触膜の形成とイオンチャンネル機能解析への応用, 日本生物物理学会第 53 回年会, 金沢大学角間キャンパス (石川県・金沢市), 2015. 9. 14
- ⑥ 岩本真幸, 液滴内灌流による液滴接触膜上でのチャンネル機能解析法, 第 92 回日本生理学会大会, 神戸コンベンションセンター (兵庫県・神戸市), 2015. 3. 21
- ⑦ Iwamoto M, Molecular mechanism of the membrane lipid-dependent gating of the KcsA potassium channel, 第 45 回生理研国際シンポジウム, 岡崎コンファレンスセ

- ンター (愛知県・岡崎市), 2014. 11. 26-28
- ⑧ 岩本真幸, 脂質はイオンチャネルのゲート開閉をどのように制御するのか?:新奇脂質センサーによる制御機構, 日本生物物理学会第 52 回年会シンポジウム, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市), 2014. 9. 26
 - ⑨ Iwamoto M, Modulation of the activation gating of the KcsA potassium channel by the membrane lipids, Single Protein Dynamics in Cellulo 2014, 沖縄科学技術大学院大学 (沖縄県・恩納村), 2014. 4. 21-25
 - ⑩ 岩本真幸, 膜脂質組成が KcsA カリウムチャ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, 鹿児島大学 (鹿児島県・鹿児島市), 2014. 3. 16
 - ⑪ Iwamoto M, Membrane lipids modulate the inactivation gating of the KcsA potassium channel, Biophysical Society 58th Annual Meeting, サンフランシスコ (アメリカ合衆国), 2014. 2. 18
 - ⑫ 岩本真幸, 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, 日本生物物理学会第 51 回年会, 京都国際会議場 (京都府・京都市), 2013. 10. 29

[その他]

研究室ホームページ

<http://seiril.med.lab.u-fukui.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩本 真幸 (Iwamoto Masayuki)

福井大学・医学部・助教

研究者番号: 40452122