

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 24 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26253014

研究課題名(和文) チャネル機能発現における膜上集合・分散動態の新しい機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism underlying the clustering-dispersion dynamics of the channel protein on the membrane

研究代表者

老木 成稔(Oiki, Shigetoshi)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：10185176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,900,000円

研究成果の概要(和文)：私達はKcsAカリウムチャネルが他の膜蛋白質と同様に細胞膜上で動き回り、その活性化状態によって集合・分散することを初めて原子間力顕微鏡で明らかにした。この仕組みを明らかにするための脂質2重膜での実験において、チャネルの向きをそろえてチャネル蛋白質を膜に組み込む方法を確立した。一方、チャネル機能に関しては新しく開発した液滴接触2重膜法によって、膜リン脂質の組成を膜内外葉毎に変えられることを利用し、チャネル活性へのリン脂質の効果を詳細に検討した。

研究成果の概要(英文)：We found that the KcsA potassium channel move randomly on the membrane surface, and undergo clustering and dispersion in relation to the activation gating using the atomic force microscopy. To elucidate the underlying mechanism, we developed the method such that the channel was reconstituted into the membrane with the same orientation. Nearly 100% of the channels were oriented with their extracellular side up in the membrane. This orientation was confirmed by a scorpion toxin, agitoxin 2, using AFM. The clustering-dispersion status on the membrane was examined using the AFM in different lipid compositions, and the distribution was highly related to the phase separation of the membrane. On the other hand, the channel activities were measured using a newly developed contact bubble bilayer method, which allows varying the lipid composition of the membrane in each leaflet. We have screened various types of hydrophobic substances via the positive effects to the KcsA channel.

研究分野：生理学一般

キーワード：lipid bilayer single-channel current membrane lipid clustering channel gating

1. 研究開始当初の背景

従来、イオンチャネルは単一チャネル電流の測定をその典型として、チャネル分子単独での機能を明らかにすることで細胞機能を理解することができると信じられていた。ところが私達は細菌由来の KcsA カリウムチャネルが他の膜蛋白質と同様に細胞膜表面上を動き回るだけでなく、その活性化状態によって集合・離散することを初めて原子間力顕微鏡で明らかにした。つまり膜でのチャネル機能は個々のチャネルの総和としてだけでなく、協同的な仕組みが重要であることが初めて明らかになった。もちろん従来から細胞膜上にチャネルが高密度に集積している領域が観察されていたが、このような領域は細胞の特定の場所に限られており、しかも固定されていた。一方、私達が発見したのはチャネルが自由に膜を拡散する中で、集合・離散を繰り返し、しかもそれがチャネルのゲーティング開閉状態に依存したのである。私達の発見の後、細胞膜でもチャネル機能に関連した集合・離散が見出され、その生理的意義を明らかにする必要性が高まっている。

2. 研究の目的

チャネルの膜上での集合・離散の仕組みと機能との関係を明らかにすることが目的である。そのためには、チャネル蛋白質を膜に組み込むとき、チャネルの向きをそろえる必要がある。従来の膜形成法では膜にチャネルがランダムに配向していることが否定できなくなっている。さらに膜組成など膜環境の変化でチャネルの機能と集合・離散状態がどう変わるか、を脂質 2 重膜の実験で確かめる必要がある。このようなチャネルの膜上でのダイナミックな仕組みを明らかにするためにチャネル機能を脂質 2 重膜で測定し、チャネルの構造とその集合・離散を原子間力顕微鏡で測定することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

生体膜と比べて膜脂質組成を自由に变化させることのできる脂質 2 重膜法でチャネルとリン脂質、チャネルと膜の関係についてその構造・機能の両面から基礎的な実験結果を蓄積する。チャネル機能に関しては Contact Bubble Bilayer (CBB)法という新しい方法を開発した。この方法によって脂質 2 重膜のリン脂質組成を自由に換えられるだけでなく、単分子層レベルで組成を変え、非対称膜を実現させることに成功した。またこの方法をさらに発展させ、疎水性物質を膜に投与する方法を開発した。チャネル機能の測定は膜組成によっては室温で行うことが難しいことがある。そのため温度コントロール下で単一チャネル電流を測定する系を確立する。

チャネルを膜に向きを揃えて組み込むために、新しい方法を開発した。それはチャネルを埋め込んだ膜を基板に展開するのではなく、可溶化したチャネル蛋白質をまず基板に結合し、その後、リン脂質を加え、膜に埋め込む方法である。ここでも重要な方法上のトリックを工夫することで、基板表面を膜で埋め尽くすことができた。

4. 研究成果

向きを揃えてチャネルを膜に組み込むことは私達の方法で成功した。原子間力顕微鏡でチャネルの細胞外表面構造を明らかにしただけでなく、この面に特異的に結合するペプチド毒を作用させ、その結合を捉えることでチャネルの向きを証明した。集合・離散に関しては向きをそろえた場合にも起こることを確認することができた。この方法を元に、膜組成を変えたときにチャネルの集合・離散がどう変化するか、を系統的に実験し、リン脂質組成で集合状態が大きく変わることを明らかにした。原子間力顕微鏡による実験は高速測定も含めさら

に精度が上がった。

一方、チャネル機能に関しては新しく開発した液滴接触 2 重膜法によって、膜リン脂質の組成を膜リーフレット毎に変えられることを利用し、チャネル活性へのリン脂質の効果を詳細に検討した。KcsA チャネルには膜内葉の酸性リン脂質を捉える脂質センサーがあることを発見した。さらに膜組成を急速に変化させる方法により脂質 2 重膜に急速にコレステロールを加えることができた。コレステロールは様々なチャネルに影響を与えることが知られているが、KcsA カリウムチャネルではコレステロールによって直ちにその活性を消失した。しかしコレステロールの注入を止めると、チャネル機能は短時間で回復した。このような可逆的なチャネル機能制御が明らかになったのは初めてである。

他のリン脂質組成では脂質 2 重膜を形成できないことがあった。これは当該リン脂質の相転移温度が室温より高いからである。このような場合、チェンバーの温度を急速に上げることで脂質 2 重膜が形成された。十分高い温度になればどんなリン脂質組成でも脂質 2 重膜が形成できることになり、実験の多様性が広がった。

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 21 件)

Sumino, A., Uchihashi, T. and Oiki, S.: Oriented reconstitution of the full-length KcsA potassium channel in a lipid bilayer for AFM imaging. *J. Phys. Chem. Lett.* 8: 785-793, 2017. 査読有

Sumikama, T. and Oiki, S.: Digitalized K⁺ Occupancy in the Nanocavity Holds and Releases Queues of K⁺ in a Channel. *J. Am. Chem. Soc.* 138: 10284-10292, 2016. 査読有

Matsuki, Y., Iwamoto, M., Mita, K., Shigemitsu, K., Matsunaga, S., and Oiki, S.: Rectified Proton Grotthuss Conduction Across a Long Water-Wire in the Test Nanotube of the Polytheonamide B Channel. *J. Am. Chem. Soc.* 138 (12): 4168-4177, 2016. 査読有

Chang, H.-K., Iwamoto, M., Oiki, S. and Shieh,

R.-C.: Mechanism for attenuated outward conductance induced by mutations in the cytoplasmic pore of Kir2.1 channels. *Sci. Rep.* 5: 18404 (1-14), 2015. 査読有

Furutani, Y., Shimizu, H., Asai, Y., Oiki, S. and Kandori, H.: Specific interactions between alkali metal cations and the KcsA channel studied using ATR-FTIR spectroscopy. *Biophysics and Physicobiology* 12: 37-45, 2015. 査読有

Iwamoto, M. and S. Oiki: Contact Bubble Bilayers with Flush Drainage. *Sci. Rep.* 5: 9110 (1-7), 2015. 査読有

Nakao, H., Ikeda, K., Iwamoto, M., Shimizu, H., Oiki, S., Ishihara, Y., Nakano, M.: pH-dependent promotion of phospholipid flip-flop by the KcsA potassium channel. *BBA Biomemb.* 1848: 145-150, 2015. 査読有

Oiki, S.: Channel Function Reconstitution and Re-animation: A Single-channel Strategy in the Post-crystal Age. *J. Physiol.* 593: 2553-2573, 2015. 査読有

Yamakata, A., Shimizu, H., Oiki, S.: Surface-Enhanced IR Absorption Spectroscopy of the KcsA Potassium Channel upon Application of an Electric Field. *Physical Chemistry Chemical Physics* 17: 21104 – 21111, 2015. 査読有

Phongphanphanee, S., Yoshida, N., Oiki, S. and Hirata, F.: Distinct configurations of cations and water in the selectivity filter of the KcsA potassium channel probed by 3D-RISM theory. *J. Mol. Liq.* 200: Part A, 52-58, 2014. 査読有

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. 査読有

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. 査読有

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. 査読有

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. 査読有

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.

査読有

Watanabe, R., Tabata, K.V., Iino, R., Ueno, H., Iwamoto, M., Oiki, S. and Noji, H.: Biased Brownian Stepping Rotation of F₀F₁-ATP Synthase Driven by Proton Motive Force. *Nature Commun.* 4: 1631 (1-6), 2013. 査読有

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. *Scientific Reports* 3: 1063 (1-7), 2013. 査読有

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. 査読有

老木成稔：イオンチャネルの分子構造「特集 電解質の新しい見方・考え方」【水電解質と機能蛋白調節（基礎）】腎と透析, 80 (3): 390-396, 2016. 査読有

角野歩、山本大輔、炭竈享司、岩本真幸、出羽毅久、老木成稔：膜内 KcsA カリウムチャネルの原子間力顕微鏡による構造・動態解析 生物物理 55(1) 005-010, 2015. 査読有

②老木成稔：KcsA カリウムチャネルでみるチャネル - 膜相互作用 膜 39(5): 309-315, 2014. 査読有

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 1 件)

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 分子ナノバイオ計測～分子から生命システムを探る革新的技術」69-80, 化学同人、2014, pp. 222. ISBN: 978-4-7598-0753-0

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：脂質二重膜形成器
発明者：老木 成稔・岩本真幸
権利者：福井大学
種類：意匠
番号：特願 2017-006362 号
出願年月日：2017 年 3 月 28 日
国内外の別：国内

取得状況 (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：福井大学
種類：特許
番号：特願2013 - 155692号

取得年月日：平成 2017 年 4 月 21 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

老木 成稔 (OIKI, Shigetoshi)
福井大学・学術研究院医学系部門・教授
研究者番号：10185176

(2)研究分担者

岩本 真幸 (IWAMOTO, Masayuki)
福井大学・学術研究院医学系部門・助教
研究者番号：40452122

角野 歩 (SUMINO, Ayumi)

福井大学・学術研究院医学系部門・特別研究員
研究者番号：80717140

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()