

研究報告書

「原子間力顕微鏡を駆使した膜中イオンチャネル集団動作機構の革新的理解」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 角野 歩

1. 研究のねらい

様々な生理現象を司る生体内の電気信号は、細胞膜中に存在する膜タンパク質であるイオンチャネル分子により制御されている。イオンチャネルはイオンを通過させる通り道(ポア)を有しており、チャネルが刺激に応じてポアを開閉させる構造変化(ゲーティング)と、特定のイオン種を選択的に透過させる機能(選択性)によって、細胞の膜電位を調節している。我々はこれまでに、pH 依存性カリウムチャネル KcsA が開閉と連動して集合・離散することを原子間力顕微鏡(AFM)により明らかにした。しかし、集合・離散といった集団構造がチャネル機能に及ぼす影響については明らかでない。本さきがけ研究は、チャネルの集団的動作機構を分子レベルで明らかにすることを最終目標とした。

2. 研究成果

(1)概要

イオンチャネルの集団的動作機構を明らかにするために、下記の研究を行った。

A. KcsA の開閉と連動した集合・離散の分子メカニズムの解明

膜タンパク質の集合・離散をはじめとする再構成膜中での自己組織化構造や動態を分子レベルで評価するために、まずはAFM基板上で Ni^{2+} -His-tag の特異的相互作用を用いて膜タンパク質の配向を揃えて任意の脂質膜中に再構成する手法を開発した。この手法をもとにして、KcsA チャネルの集合離散現象が引き起こしているのか、諸種のドメイン切除体や膜組成の影響を検討した。その結果、ポアドメインと膜との相互作用が集合離散を引き起こしていることが明らかになり、脂質膜が薄くて流動的なほど開チャネルが離散しやすく、膜が厚くて流動性が低いほど開条件においてもチャネルが集合したままになることがわかった。また、薄い膜のほうがチャネルは開きやすいことが先行研究から明らかになっており、チャネルの開閉と膜の厚さ、チャネルの集合・離散状態に相関があることを明らかにした。

B. K^+ チャネルとサソリ毒の結合動態の高速 AFM による一分子解析

サソリの毒液に含まれるアジトキシン-2(Agtx2)は、細胞外からチャネルのポアに結合してイオン透過をブロックするペプチドである。今回我々は、 K^+ チャネルと Agtx2 の結合動態を高速AFMによって一分子観察することに成功した。得られた結合・解離の時間変化を解析したところ、KcsA の状態に高親和性状態と低親和性状態があり、また Agtx2 がアロステリックエフェクターであることが明らかになった。(金沢大学の内橋貴之教授との共同研究)

C. AFM/電気生理同時測定系の開発

チャネルの集合・離散とチャネルの機能の関係を直接的に解明することを目的として、AFMと電気生理の同時計測システムの構築に取り組んだ。

(2) 詳細

研究テーマ A「KcsA の開閉と連動した集合・離散の分子メカニズムの解明」

A-a. 膜タンパク質の自己組織化を観察するための再構成手法の開発

近年、再構成膜中の膜タンパク質の表面構造や自己組織化構造の観察に AFM が適用されるようになってきた。AFM は常温・常圧・水溶液中での試料の構造や動態を非標識かつ高分解観察することができる唯一の手法であるためである。ここで共通の課題になっているのは、観察基板上での膜タンパク質の配向制御である。膜タンパク質の配向が揃っていないと、膜タンパク質のどの表面構造を観察しているのか特定できず、また形成された自己組織化構造の解釈も難しくなる。そこで私は、これらの検討に対し汎用的に適用可能、かつ簡便な配向制御および膜再構成手法を開発した。

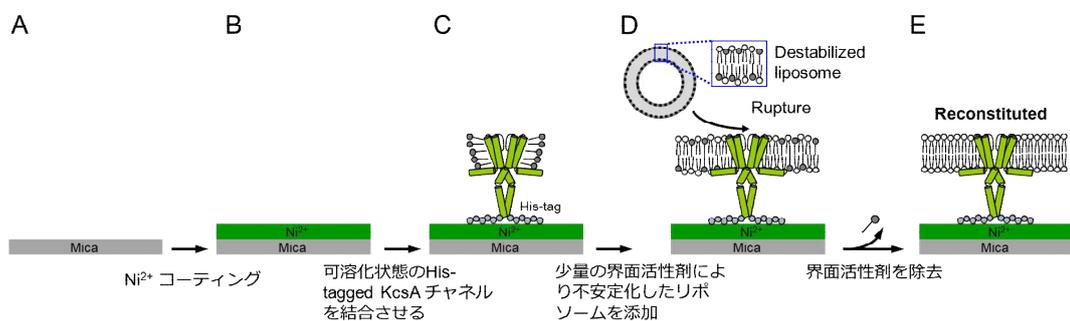


図 1. AFM 基板上での膜タンパク質の配向制御した脂質膜中への再構成

今回開発した再構成手法の概略図を図1に示す。この手法のポイントは、界面活性剤に可溶化した His-tag 膜タンパク質を Ni^{2+} をコーティングしたマイカ基板上に配向制御して固定化し、その後界面活性剤で不安定化したリポソームを添加して平面膜中に再構成することである。用いる脂質や界面活性剤の濃度等を最適化することで、配向選択的な基板上での組織化と表面構造、自己組織化構造の観察に成功した。この手法を用いて KcsA の開閉各状態における自己組織化状態を観察した結果が図 2 である。KcsA チャンネルの中性・閉状態では集合し、酸性・開状態では離散するという、特徴的な自己組織化構造の変化を観察することができた。この再構成手法は膜タンパク質の His-tag の位置を変えることで観察する表面を自由に制御することができ、また再構成する脂質の電荷やアシル鎖長などの制限もない。試料調製の所要時間は 15 分程度であり、特別な実験装置も必要としない点からも、膜タンパク質の AFM 観察に汎用的な手法を開発できた。(Sumino et al., *J. Phys. Chem. Lett.* 2017)

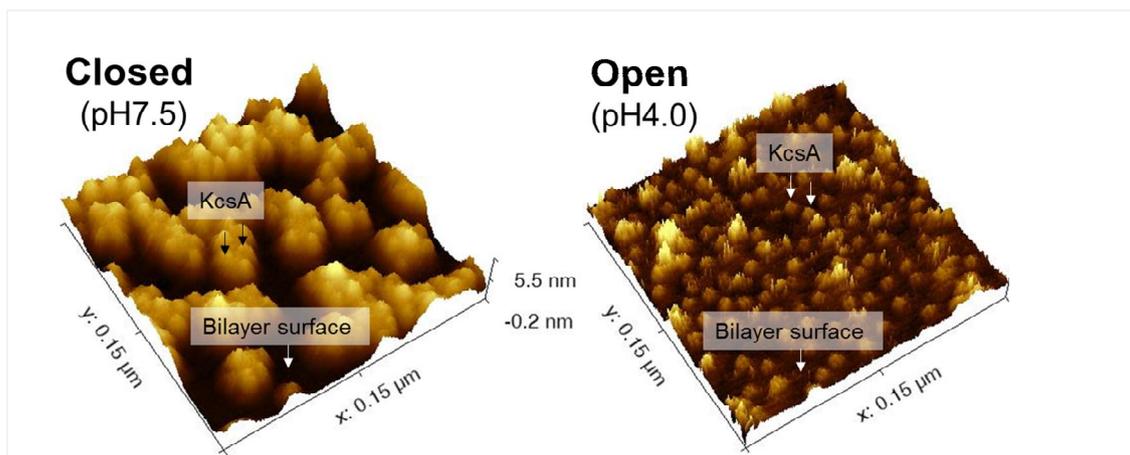


図 2. 配向制御した再構成膜中での KcsA の開閉と連動した集合・離散

以下の研究成果については論文準備中のため、報告書の非公開項目欄に記載する。

A-b. KcsA の集合離散を引き起こす部位の検討

A-c. KcsA の局在に及ぼす膜の相状態・厚さの影響

研究テーマ B「K⁺チャネルとサソリ毒の結合動態の高速 AFM による一分子解析」

研究テーマ C「AFM/電気生理同時測定系の開発」

3. 今後の展開

本研究では K⁺チャネルの開閉と連動した集合・離散がポアドメインと膜との相互作用によりおこることを明らかにした。また、チャネルが離散しやすい膜環境とチャネルが開きやすい膜環境に相関があることも明らかになった。ポアドメインは K⁺チャネルの基本的機能（開閉や選択的透過）を担う最も重要なドメインであり、すべての K⁺チャネルで保存されている。本研究は、イオンチャネルの働きがチャネル単独の開閉のみならず、膜上での集団的振る舞いも寄与していることを初めて明らかにしたものであり、チャネルの生理機能を考える上で重要な知見をもたらしたと考えている。我々が KcsA の集合・離散を発表した直後に、植物の孔辺細胞に存在する K⁺チャネル GORK においても同様の現象が発見された。現時点ではこの二種類の K⁺チャネルでしかこのような集合・離散は報告されていないが、今後同様のポアドメインを有する様々なチャネルで確認されるかもしれないと期待している。AFM と電気生理の同時計測システムの開発については十分な進捗が得られなかったが、今後も引き続き検討していく予定である。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

さがけ研究期間の前半は、変異体調製や配向制御手法の確立に四苦八苦してほとんど研究が進まなかったため、期間全体で考えても当初期待していたほどの進捗は達成できなかった。後半に差し掛かって、膜タンパク質の配向制御した再構成の基盤技術ができてからは、かなりスムーズにデータが出るようになり、集合・離散の分子メカニズムに迫ることができ

た。また、当初予定していなかった研究テーマにおいてもインパクトの大きい論文になりうる量・質のデータが出ており、さきがけ期間内には間に合わなかったものの、十分な成果になると感じている。ただ、当初は「集合・分散の分子メカニズム解明」と「AFM/電気生理同時計測系の開発」を研究の両輪としていたが、実際にはほとんどの時間と労力を前者に費やしてしまい、後者に関しては十分な進捗が得られていない。さきがけ期間終了後は後者に重点をおいて研究活動を続ける所存である。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

pH 依存性カリウムチャンネル KcsA の開閉と集合・分散の関係とそのメカニズムの解明を目指し、pH 依存的な離合集散をAFM観察するための再構成膜調製法を確立した。ポアドメインと膜との相互作用、膜の相状態、厚さが影響を及ぼすことを見いだしたことは立派な成果であると評価できる。

チャンネルの開閉についてより詳細な機能解析を行うために、AFM 観察と電気生理計測を同時に行うことができるような技術をぜひ開発して欲しい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. 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.* 2014, 5, 578-584.
2. Sumino, A.; Uchihashi, T.; Oiki, S. Oriented Reconstitution of the Full-Length KcsA Potassium Channel in a Lipid Bilayer for AFM Imaging. *J. Phys. Chem. Lett.* 2017, acs.jpcclett.6b03058.
3. Urugami, C.; Sugai, Y.; Hanjo, K.; Sumino, A.; Fujii, R.; Nishioka, T.; Kinoshita, I.; Dewa, T.; Nango, M.; Gardiner, A. T.; et al. Observation of Hybrid Artificial Photosynthetic Membranes Using Peripheral and Core Antennae from Two Different Species of Photosynthetic Bacteria by AFM and Fluorescence Micro-Spectroscopy. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 2015, 313, 60-71.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【学会発表】

1. Ayumi Sumino, Takayuki Uchihashi, Toshio Ando, Shigetoshi Oiki “HS-AFM revealed blocking dynamics of a scorpion toxin on the KcsA potassium channel” 4th Kanazawa Bio-AFM Workshop, 2016, Kanazawa, Japan (国際・口頭)

【受賞】

1. 「福井大学医学部優秀論文賞」(2014)
2. 第91回日本生理学会年会ポスター賞(2014)

【解説記事】

1. Sumino, A.; Yamamoto, D.; Sumikama, T.; Iwamoto, M.; Dewa, T.; Oiki, S. Structure and Dynamics of Membrane-embedded KcsA Potassium Channel Revealed by Atomic Force Microscopy. 生物物理 55 (1), 005-010 (2015)

【その他】

1. 発表論文(Sumino et al., J. Phys. Chem. Lett. 2014, 5, 578-584.)がACS Live Slides掲載対象に選ばれる
2. 生理学会誌表紙掲載(2014)とができた。