

## 電場と動態：膜電位存在下でのイオンチャネルの機能と構造変化の1分子同時計測

Simultaneous recording of conformational changes and ionic currents of single-molecular ion channels reveals the relationship between membrane potentials and motions of the channels



清水 啓史 (SHIMIZU HIROFUMI)

福井大学・医学部・講師

### 研究の概要

生体内で重要な働きをしている膜蛋白質は細胞膜または細胞内小器官にあって常に膜内外にかかる膜電位、およびその変動の影響を受けている。この生理的な状態で膜蛋白質が機能する際にどのように動いているのか。それを1分子で調べるための測定システムを確立することを目指す。

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：生体膜・チャネル・トランスポーター・能動輸送

### 1. 研究開始当初の背景

私達の研究グループは、イオンチャネル蛋白質の1種である KcsA カリウムイオンチャネル蛋白質が機能する際に大きくねじれる様子を X 線 1 分子計測法を用いて、1 分子で動画計測することに成功しました(2008)。この計測法では金ナノ粒子をイオンチャネル蛋白質にとりつけ、その動きをナノ粒子の X 線回折像として動画追跡します。X 線回折像を利用するため小さな動きでも捉えられる特徴があります。

### 2. 研究の目的

この X 線 1 分子計測法を発展させ、イオンチャネル分子を流れる 1 分子電流と、1 分子の動きを同時に計測できる観測システムを開発することにより、蛋白質分子の機能と動き(構造変化)の相関を調べることを可能にすることを目的としています。

### 3. 研究の方法

イオンチャネル蛋白質に金ナノ粒子を取り付け、大型放射光施設 (SPring8 など) を利用して X 線を照射し、その回折像を特殊な高速度カメラシステムで動画撮影します。1 分子電流との同時計測システムの開発へ向けて、一つ一つ課題を解決しています。

### 4. これまでの成果

#### 「高速度測定の実現」

従来の計測システムは、1 秒間に 30 枚の画像を取得するシステムでした (33 ms/1 枚)。残念ながらこの速度では遅く、蛋白質の構造変化を完全に追跡・計測することはできませんでした。

本研究では新たに高速撮像システムを導入し、1 秒間に 5000 枚の画像を取得できるようになりました (0.2 ms/1 枚)。この速度は 1 分子電流計測でよく使われる観測速度 (5000 点/秒) と同じ観測速度であり、1 分子の電流と動きを同じ時間スケールで議論できるようになりました。

「高速度測定と広範囲測定との両立」

蛋白質の運動を広い範囲にわたって記録・追跡するためには、広いエネルギー範囲を持つ白色 X 線が必要です。しかし、エネルギー範囲が狭いほうが光を集めやすいため、輝度が高くなおかつエネルギー範囲の広い X 線が利用可能な施設を見つけるのは難しいことです。

そこで本研究では発想を変え、自ら「X 線スペクトルをデザインする」ことによって明るくなおかつエネルギー範囲の広い X 線を観測光として利用することに成功しました。

その結果、イオンチャネル蛋白質の動きを広い範囲で、高速度 (0.2 ms/秒) で記録することに成功しました。

「2 溶液置換観測チャンバーの開発」

蛋白質はその周囲の溶液条件によって機能や動きが変わります。その変化を計測するため、観測中に蛋白質の周囲の溶液条件を変え、その運動応答を計測するシステムの開発に取り組みました。

微小流路を設計し、微小ポンプと流量センサを利用してフィードバック制御することにより、より精密に流路中を流れる溶液の流量を制御します。

2 溶液の流量を制御することによって、観測領域中の溶液を A から B へと変化させられる溶液置換チャンバーの開発に成功しました。

本開発で得られた知見 (エックス線によるノイズの少ない素材、流路厚、流路加工精度、ポンプ制御システムなど) は 1 分子電流・動態同時計測システムを開発する上で必要不可欠なものです。

「光トリガーによる動態計測システムの開発」

蛋白質の機能に重要な生体内小分子には研究用に光を受けると分子についている「かご」が外れて分子が機能するようになる光分解化合物があります。

これらの光分解化合物を利用すると、蛋白質の機能に重要な小分子の蛋白質の「動き」に対する影響を測定することが可能です。

そこで、光の照射条件やサンプル位置での集光システム、また X 線照射やカメラ記録とのタイミングの調製といった様々な課題を解決し、光でイオンチャネル蛋白質の構造変化を開始することに成功しました。

これは、1 分子電流と動態の同時計測システムにおいて、様々な生体内小分子の蛋白質分子の動きに対する働きを必要に応じて計測できるようになったことを意味します。

## 5. 今後の計画

これまでに得られた知見を元に 1 分子電流と動きの同時計測システムの開発に取り組みます。観測チャンバーを構成する素材や流路設計、微小流路を流れる溶液の制御についての知見が蓄積しており、研究期間内に観測システムの構築が実現すると考えています。

## 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

- ①2010 年文部科学大臣表彰若手科学者賞  
受賞  
清水啓史 「イオンチャネル開閉構造変化の X 線 1 分子計測についての研究」
- ② Hirofumi Shimizu, *et al.* Conformational Changes of Single-Molecular KcsA Potassium Channels during Gating Recorded in a Sub-Millisecond Time Resolution. The 47th annual meeting of the Biophysical Society Japan, 2009 10/30-11/1, Tokushima
- ③ Hirofumi Shimizu, *et al.* "Global Twisting Motion of Single Molecular KcsA Potassium Channel Upon Gating." New Approaches to Complexity of Protein Dynamics by Single Molecule Measurements : Experiments and Theories 2008 12/7-9 Osaka  
Gold Poster Award
- ④ Hirofumi Shimizu, *et al.* Global Twisting Motion of Single Molecular KcsA Potassium Channel upon Gating. (2008) *Cell*132 67-68