

イオンチャネルの1分子計測・操作による構造機能相関の解明

光産業創成大学院大学・光バイオ分野

平野 美奈子

要旨

生理的に重要なイオンチャネル蛋白質の構造機能相関を明らかにするため、機能しているイオンチャネルの構造変化を機能変化とともに1分子レベルで同時計測し、その構造機能相関を明らかにすることを目的とした。本研究では、環境依存的な蛍光色素を用いて、カリウムチャネルの開閉に伴う構造変化を、1分子レベルで蛍光のオン・オフとして明確に捉えることができた。また、以前開発した構造変化・機能変化同時計測装置に、新たなチャネル電流測定法を組み込んだ。その結果、チャネルの膜への組み込み効率が上がっただけでなく、チャネルの膜中での拡散の問題が解消され、初めて同時計測装置で安定にイオンチャネル1分子の蛍光像を得ることに成功した。

1. 背景と目的・目標

イオンチャネルは生体膜に存在し、細胞内外の環境変化を感知してイオン環境を調節することにより細胞の生理機能を制御する蛋白質である。循環器疾患、神経疾患を含めた種々の疾患にイオンチャネルは関与しており、有望な創薬標的として考えられている。イオンチャネルの機能は、イオンの流れを電流として捉えることで、1分子レベルで詳細に測定することが可能である。しかしながら、構造に関する情報は構造解析などからの特定の状態でのスナップショットしかなく、機能しているイオンチャネルの構造の遷移は明らかではない。イオンチャネルの分子実体の理解には、機能しているチャネルの構造変化を機能変化とともに1分子レベルで同時計測し、構造機能相関を明らかにすることが必要である。

以前、我々は、構造変化と機能変化を1分子レベルで同時に測定することができる同時計測装置を開発した(*Jpn. J. Physiol.*, 52 (5), 429-434(2002))。また、カリウムチャネルの一つである KcsA チャネルの構造変化を、蛍光色素の特性を利用して、巨視的な計測系で明確に捉えることができた(*J.Biol.Chem.*, 285(6), 3777-3783 (2010))。本研究では、イオンチャネルの構造変化を機能変化とともに1分子レベルで同時計測し、その構造機能相関を明らかにすることを目的とした。そのため、以下の3つを目標とした。

- (1)カリウムチャネル(KcsA チャネル)の構造変化を蛍光像として1分子レベルで捉える。
- (2)イオンチャネル開閉時の構造変化と機能変化を1分子レベルで同時に捉える装置を開発・改良する。
- (3)KcsA チャネルの構造変化を1分子、実時間で機能変化と同時に記録する。

2. 結果及び考察

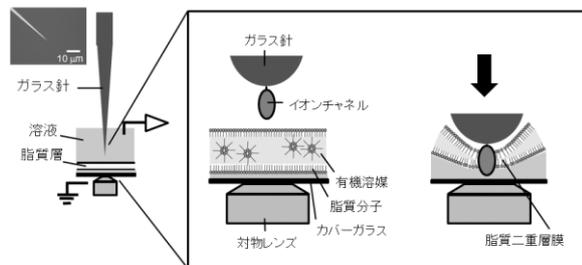
(1)KcsA チャネルの1分子レベルでの構造変化の可視化

以前、多分子系で KcsA チャネルの開閉を蛍光色素(テトラメチルローダミン、TMR)の環境依存特性を利用して捉えることに成功したが、今回1分子レベルでも、TMR 標識

KcsA の開閉を蛍光のオン・オフとして明確に捉えることができた。固体支持膜に再構成した TMR 標識 KcsA チャンネルを全反射顕微鏡で観察し、1 分子レベルで TMR の輝点の蛍光強度変化を捉えた。その結果、KcsA チャンネルが活性化される低 pH では輝点が安定に見られ、不活性化状態の高 pH では明滅を繰り返す、または輝点が見られなくなる様子が見られた。これらのことにより、KcsA は、活性化条件下では安定した構造状態をとる一方、不活性化条件下では頻りに構造状態が変化していることが示唆された。

(2) 同時計測系の開発・改良

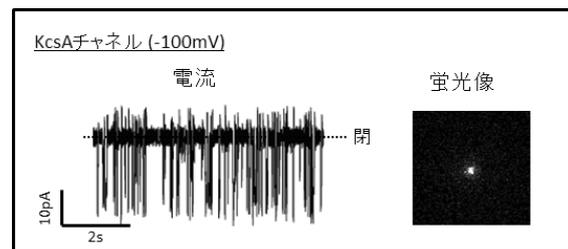
以前開発した機能変化と構造変化の同時計測装置でのチャンネルの膜への組み込み効率を上げるため、最近開発した探針に固定したチャンネルを直接人工膜に組み込む方法を同時計測装置に組み込み、改良した (Small, 7(16), 2379-2383 (2011))。直径 100nm 以下に尖らせたガラス棒の先にカリウムチャンネルを固定し、チャンネルを直接脂質二重層膜に組み込んだ (右図)。



その結果、ガラス針を膜に押し付けて数秒から数分以内にチャンネル電流が見られ、チャンネルの膜への組み込み効率が上がった。

(3) 1 分子、実時間での KcsA チャンネルの構造変化と機能変化の同時計測

(2) で改良した同時計測装置を用い、膜に再構成された TMR 標識 KcsA チャンネルの電気的・光学的計測を行った。その結果、チャンネルの活性が見られ、TMR の蛍光が輝点として捉えることができた (右図)。この方法により、正確な蛍光計測を困難にしていたチャンネルの膜中での拡散の問題が解消され、初めて安定に同時計測装置でイオンチャンネル 1 分子の蛍光像を得ることに成功した。



この方法により、正確な蛍光計測を困難にしていたチャンネルの膜中での拡散の問題が解消され、初めて安定に同時計測装置でイオンチャンネル 1 分子の蛍光像を得ることに成功した。

3. まとめと課題

- (1) KcsA チャンネルの構造変化の 1 分子計測から、KcsA チャンネルは活性化条件下では安定した構造状態をとる一方、不活性化条件下では頻りに構造状態が変化することが示唆された。
- (2) イオンチャンネルの構造変化と機能変化を 1 分子レベルで同時に捉える装置を改良し、チャンネルの膜への組み込み効率を上げることができた。
- (3) 改良された同時計測装置を用い、初めて安定にイオンチャンネル 1 分子の蛍光像を得ることに成功した

現在、本研究で得られた結果をもとに、1 分子レベルでイオンチャンネルの開閉に伴う機能と構造変化の同時計測を推進中である。現状では、ガラス針先端に固定したイオンチャンネルを下方から照明して観察しているが、ガラス内を通して上方から照明できれば、背景光を減じることが可能であり S/N を上げることができる。このために光ファイバーを用いた実験系の構築を計画している。