

イオンチャネル蛋白質 1 分子の動きを動画でとらえる ～ X 線 1 分子動態計測法の開発～

福井大学 医学部 清水 啓史

京都大学 学際融合教育研究推進センター ナノテクノロジーハブ拠点 井上 良幸



上左：福井大学 医学部 清水 啓史
上右：京都大学 学際融合教育研究推進センター ナノテクノロジーハブ拠点 井上 良幸



研究の背景とこれまでの経緯

細胞内外の境界である細胞膜中にはイオンを選択して通す穴の役割をする蛋白質があり、イオンチャネル蛋白質と呼ばれています。イオンチャネル蛋白質は細胞膜を貫き内外両側に面しています。様々な化学刺激、機械刺激、電気刺激を受容し、刺激に応じて蛋白質内のイオン透過路を開閉することによって、受容した刺激を新たな電気信号（イオン流）に変換し、細胞間および細胞内情報伝達を担っています。このイオン透過路の開閉に際して、蛋白質の構造変化が起きると考えられています。1998年にカリウムイオンを選択的に透過する K⁺ チャネル（KcsA チャネル）の立体構造 [1] が R. Mackinnon 博士（2003 年ノーベル化学賞）によって明らかにされて以降、イオンチャネル蛋白質の立体構造が次々に明らかになり、原子分解能の静止画像として研究が進みました。とりわけ K⁺ チャネルでは開閉を制御する刺激の種類にかかわらず、イオンを選択して透過するイオン透過路は共通の構造を

していることが明らかになりました（図 1）。蛋白質が機能する際には分子内の構造変化が起きる（動く）と考えられるため、現在の課題は「機能と動きの相関を解明すること」です。1976年に E. Neher 博士と B. Sakmann 博士（1991 年ノーベル医学生理学賞）により 1 分子電流計測法が開発され [2]、イオンチャネル蛋白質は機能研究が 1 分子レベルで最も進んでいる蛋白質です。私達は機能する際のイオンチャネルの動きを 1 分子レベルで明らかにするため、X 線 1 分子動態計測法（DXT 法）を用いてこの課題に取り組んでいます。

X 線 1 分子動態計測法は、計測目的の生体分子 1 分子の特定部位に標識した金ナノ結晶の運動を計測することにより、～0.1 度程度の高空間分解能で生体分子の動きを計測できるため、蛋白質の機能発現機構を解明する手法として注目を集めています。精製した蛋白質を薄いガラス基板に固定し、蛋白質のガラス基板側とは逆側に金ナノ結晶（20nm 程度）を固定します。固定にはそれぞれ蛋白質に導入した、アミノ基（ガラス側）、チオール基（金ナノ結晶側）を用います。蛋白質分子の適切な位置に

固有の反応基を導入することで、分子配向を制御することができます。フィルムでガラス基板を覆うことにより、数 μm 厚の溶液層を保つことができます。金ナノ結晶に大型放射光施設（SPring8, ESRF など）で高輝度白色 X 線を照射すると、1つのナノ結晶からの回折点が X 線 2次元検出器上に得られ、金結晶の動きを回折点の運動として実時間計測することができます（図 2）。X 線照射方向をガラス基板と垂直にすると、蛋白質が屈曲運動する際には回折点は半径方向へ、ねじれ運動する際には円周方向へ動きます。

私達はカリウムイオンを選択して透過させるカリウムイオンチャンネル（KcsA チャンネル）を計測対象分子としています。この蛋白質は溶液の pH が中性ではイオン透過路

が閉じた状態に、酸性で開閉を繰り返す pH 依存性イオンチャンネルと呼ばれる蛋白質です。この蛋白質を X 線 1 分子動態計測法で計測しました。図 1 緑丸の細胞外領域の 4 点でガラス基板に固定し、細胞内側のオレンジ丸 4 点で金ナノ結晶を固定します。溶液 pH が中性の時には数度程度の小さな揺らぎ運動のみが観測されたのに対して、酸性条件では、数十度の大きな分子のねじれ運動が観測されました（図 3）。これは世界で初めてイオンチャンネル蛋白質の分子内構造変化を実時間動画計測に成功した例となりました [3]。また、酸性条件であってもこの蛋白質の阻害剤であるテトラブチルアンモニウム（TBA）を添加すると、回折点の円周運動が観測されなくなることで、ガラス板へ分子を固定する向きを変えて横向きになると円

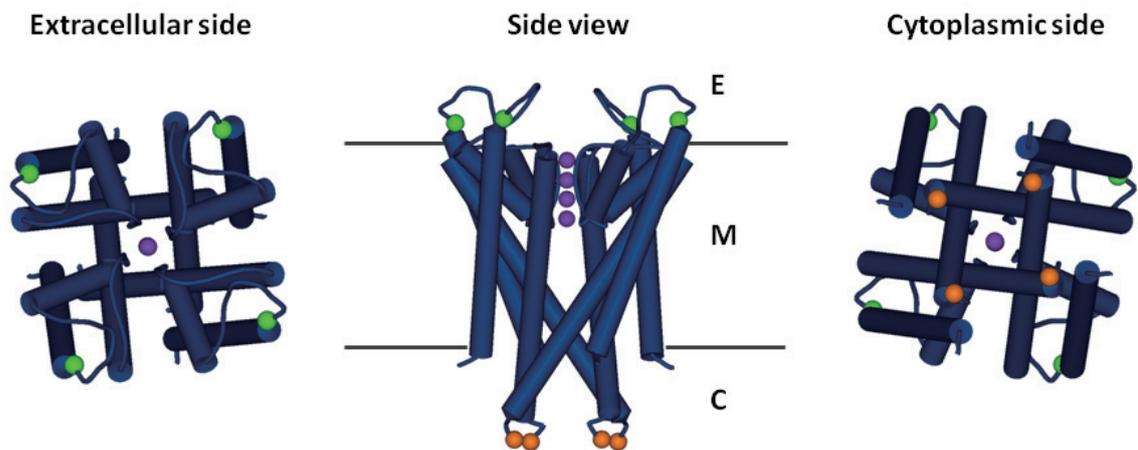


図 1 カリウムチャンネル（KcsA チャンネル）のイオン透過路の構造（PDBID：1K4C を改変）
 中央図：中央のイオン透過路に沿ってイオンは流れる。紫色丸はカリウムイオン。閉状態の立体構造。M（細胞膜）、C（細胞質側）、E（細胞外側）。
 左図：細胞外側から見たチャンネル。分子中央にイオン透過路がある。イオンは脱水和して透過路に入る。
 右図：細胞内側から見た構造。細胞内側ではイオンは水和した状態であるため通過できない。

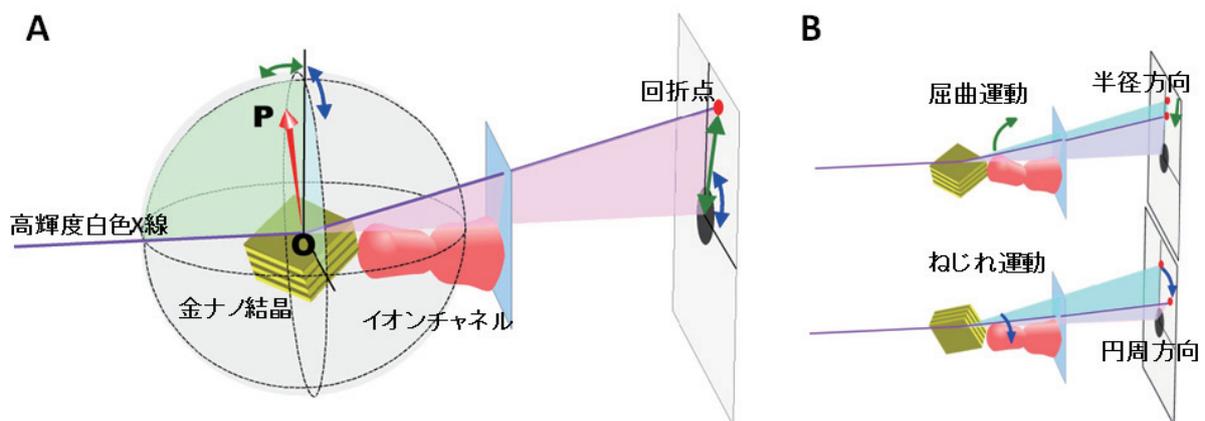


図 2 X 線 1 分子動態計測法の概略
 A. ガラス基板に固定したチャンネル分子に金ナノ結晶をつける。これに X 線を照射すると、金ナノ結晶からの回折点が X 線検出器上で観測される。矢印 OP は金結晶の X 線回折面の向き。
 B. チャンネルの構造変化と回折点の動きの相関。チャンネルが屈曲すると半径方向に、ねじれると円周方向に回折点が動く。文献 [3] より改変 (with permission from Elsevier)。

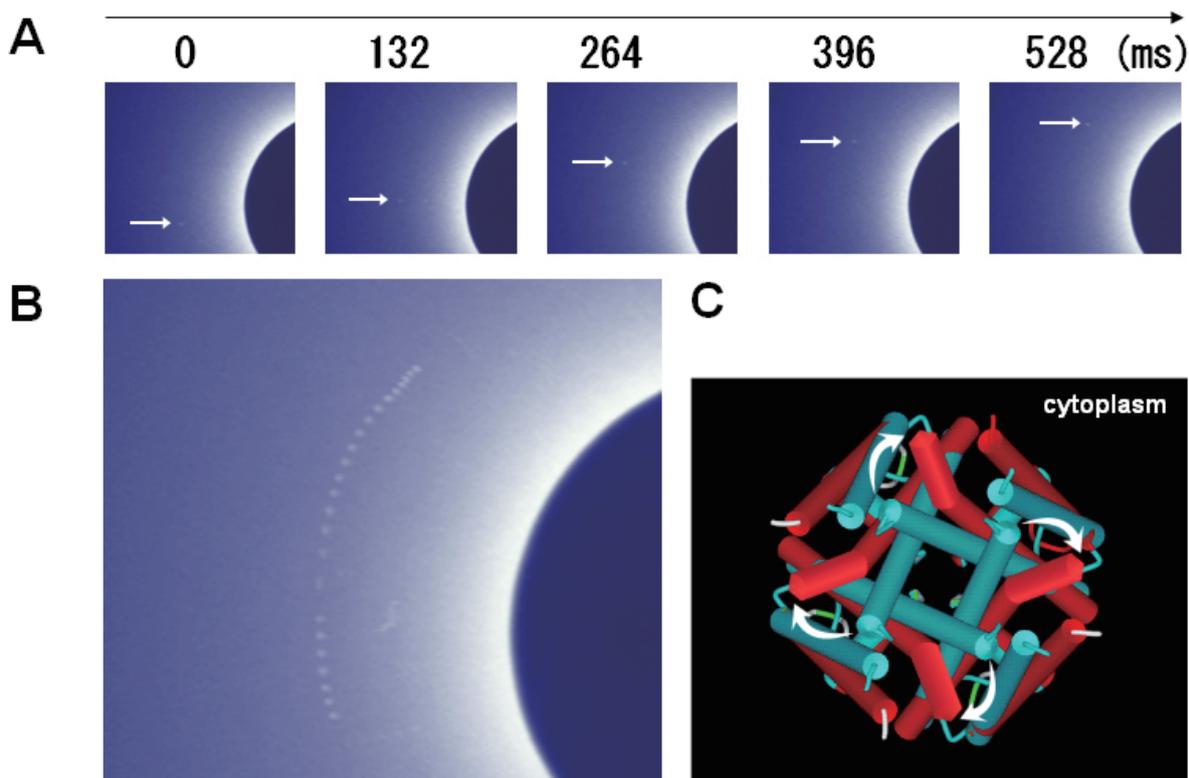


図3 カリウムイオンチャンネル蛋白質の開閉構造変化の1分子動画計測例
 A. 回折点の動きを撮影した連続画像。実際の撮影は33ms間隔。抜粋して表示。
 B. 回折点の軌跡。24枚、759msの画像を重ねた画像。右の青円が図1AのX線モニター中央黒丸に相当。回折点の回転運動はチャンネルのねじれを意味する。
 C. 細胞内側（細胞質側）から見た開閉に伴うチャンネルの構造変化。青（閉構造）から赤（モデル）へと変化することによって中央のイオン透過路が開く。分子のねじれ運動を円周方向への運動として実時間で観測に成功した。

周運動が観測されなくなる一方で上下反転させると円周運動が観測されることから、回折点の円周運動がイオン透過路を軸としたねじれ運動であることが示されました。しかし、当時の時間分解能はビデオレートであり、ミリ秒の時間スケールで起きるとされ、蛋白質の構造変化の全体像を捉えるには至っておらずさらなる手法開発が必要でした（図4）[3][4]。

X線1分子動態計測法の構成要素には、1. 放射光白色X線、2. X線観測カメラシステム、3. データ解析プログラム、4. 観測チャンバー、5. 観測プローブである金ナノ結晶、の5つがあります。各要素についてここ数年で次の開発を行ってきました。

放射光白色X線について：

X線1分子動態計測法の核心は観測光として白色X線を使用することにあります。金ナノ結晶の回折面が傾斜した際に連続的に回折点の運動を記録するには様々な波長のX線が含まれる白色X線を観測光として、連続的に回折条件を満たす必要があります。観測範囲が白色X線のエネルギー範囲によって規定されるため、高輝度でエネルギー範囲の広いX線スペクトルが必要です。私たちはヨーロッパ放射光施設

(ESRF)とSPring8で観測X線スペクトルの最適化を行っています。

X線観測カメラシステムについて：

従来のカメラシステムではビデオレートでの観測しか実現できませんでした。新規のカメラシステムの導入と、X線スペクトルの最適化により、時間分解能は大幅に向上し、現在はサブミリ秒時間スケールでの観測に成功しています[5]。これはイオンチャンネル蛋白質の1分子電流計測と同等の時間分解能であり、機能と構造変化を同じ時間分解能で議論することが可能になりました。

データ解析プログラムについて：

ビデオレートからサブミリ秒時間スケールへ飛躍的に時間分解能が向上したことにより、大量の画像から回折点を抽出し、運動を追跡する画像解析プログラムが必要となりました。ノイズの多い画像からの輝点抽出を可能にするアルゴリズムを開発することにより、回折点の抽出・運動追跡の自動処理が可能になりました。

観測チャンバーについて：

観測チャンバーに必要な要素はX線照射によるバックグラウンドノイズの原因とならない素材であるこ

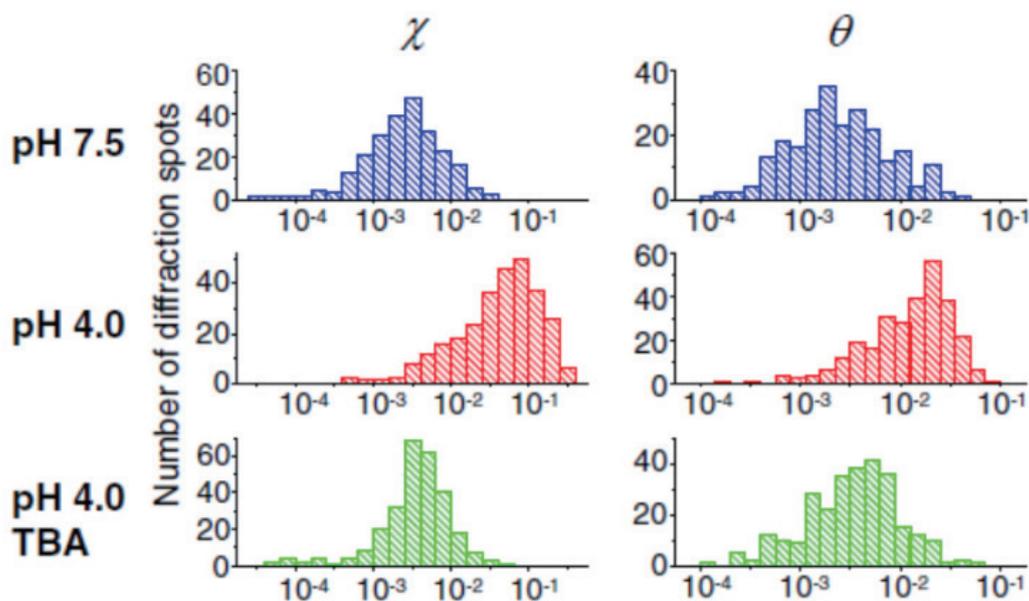


図4 構造変化の初期速度の分布
各溶液条件における、円周方向 (χ), 半径方向 (θ) の初期速度分布. 円周方向の運動が得られる酸性条件において時間分解能の不足により高速度領域が計測できていないことがわかる. 文献 [3] より (with permission from Elsevier).

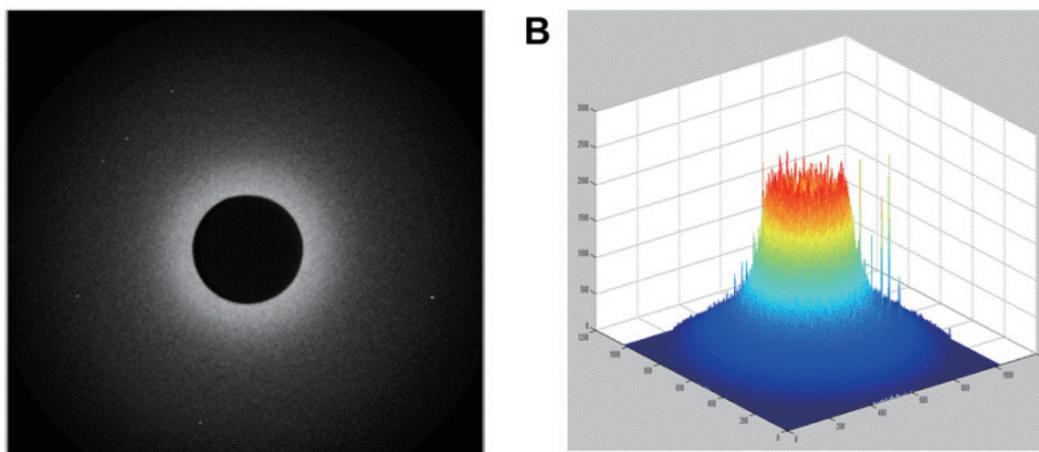


図5 従来法での観測画像におけるバックグラウンドノイズ
A. 従来の観測チャンバーを用いた際の観測画像の例
B. 左画像の輝度を3次表示した像. 観測チャンバーによるバックグラウンドノイズが大きく、輝点の信号とのS/N比は中心付近で悪くなっていくことがわかる. ナノテクノロジーハブ拠点の利用により新たな観測チャンバーを作製することでS/N比の向上を図り、より小さな観測プローブからの信号を高速観測することを目指す.

と、溶液条件を観測中に変化させることのできる溶液置換能です。これまでに種々の素材検討し金ナノ結晶からの回折点を観測可能な溶液置換チャンバーの開発に成功しましたが、いまだにバックグラウンドノイズが高く、改善の必要があります(図5)。

観測プローブである金ナノ結晶について：

金ナノ結晶の作製法には、エピタキシャル成長法、レーザーアブレーション法など様々な手法があります。これらの手法を一つ一つ検討し、従来よりもサイズ分布の狭い金ナノ結晶の作製法を確立しつつあります。

ナノテクノロジープラットフォームの利用による手法開発

平成23年度より共通利用が始まった京都大学ナノテクノロジーハブ拠点を利用させていただいてX線1分子動態計測法のさらなる改良に着手しています。手法の構成要素の中で特に観測チャンバー開発、観測プローブ開発についてナノテクノロジーハブ拠点に集結しているナノ加工・ナノ構造評価機器を多数利用させていただいて

ます。観測チャンバー開発では、京都大学工学系研究科田畑教授、平井助教との共同研究で、X線照射した際の観測チャンバーの素材から生み出されるバックグラウンドノイズを最小にする溶液置換観測チャンバー開発を行っています。観測プローブ開発においては、蛋白質の運動の定量的な評価のため、種々のサイズの金ナノ結晶のサイズ分布を極力小さくして作製する手法開発に挑んでいます。これらの開発は、現在進行中のSPRING8での観測スペクトルの改良、光トリガー運動計測システムの構築と合わせてより高速で定量的な1分子動態計測システムの確立に資すると考えられます。蛋白質分子の分子揺らぎをも計測できる空間分解能をもつ本計測システムが確立すれば、動きを指標とした創薬スクリーニングシステムへの応用が期待されます。



参考文献

- [1] D.A. Doyle, J. Morais Cabral, R.A. Pfuetzner, A. Kuo, J.M. Gulbis, S.L. Cohen, B.T. Chait, R. MacKinnon, Science, 280 (1998) 69-77.
- [2] E. Neher, B. Sakmann, Nature, 260 (1976) 799-802.
- [3] H. Shimizu, M. Iwamoto, T. Konno, A. Nihei, Y.C. Sasaki, S. Oiki, Cell, 132 (2008) 67-78.
- [4] S. Oiki, H. Shimizu, M. Iwamoto, T. Konno Adv. Chem. Phys. 146 (2011) 147-194
- [5] H. Shimizu, M. Iwamoto, T. Konno, A. Royant, D. Setten, L. Guerin, M. Wulff, S. Oiki Biophys. J. 102 (2012) 37a
- 研究助成金**
平成25年度ナノテクノロジープラットフォーム試行的利用課題 (NPS13077)
挑戦的萌芽研究 (25670107), 基盤研究 (A) (24249013), 特定領域研究 (高次系分子科学) (22018007, 20050010), 新学術領域研究 (過渡的複合体) (22121507), 若手研究 (S) (20679002), 武田財団研究奨励対象 2012, 福井大学学内競争的配分経費 2010

(福井大学 医学部 清水 啓史)



【お問い合わせ】

微細加工プラットフォーム

京都大学

☎ 075-753-5231

E-mail kyodai-hub@saci.kyoto-u.ac.jp

ホームページ

<http://www.nanoplat.cpier.kyoto-u.ac.jp/>