

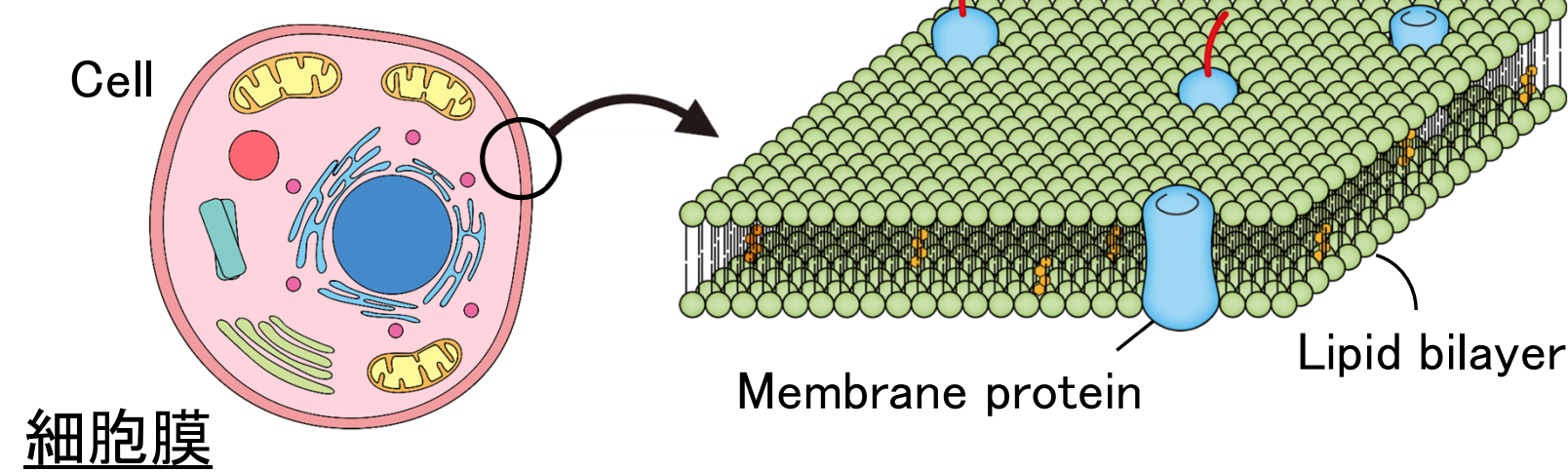
人工脂質膜系を用いた膜タンパク質の構造・機能解析

- イオンイメージセンサ上への支持脂質二重膜形成とチャネル応答計測への応用 -

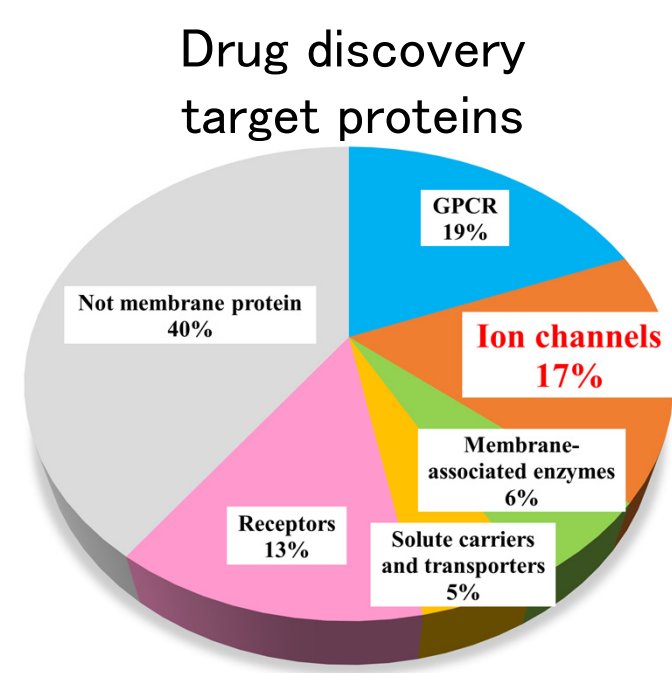
竹内 郁弥, 今井 健太, 堀尾 智子, 服部 敏明, 澤田 和明, 手老 龍吾
豊橋技術科学大学 応用化学・生命工学系

細胞膜モデル系としての脂質二重膜

研究背景



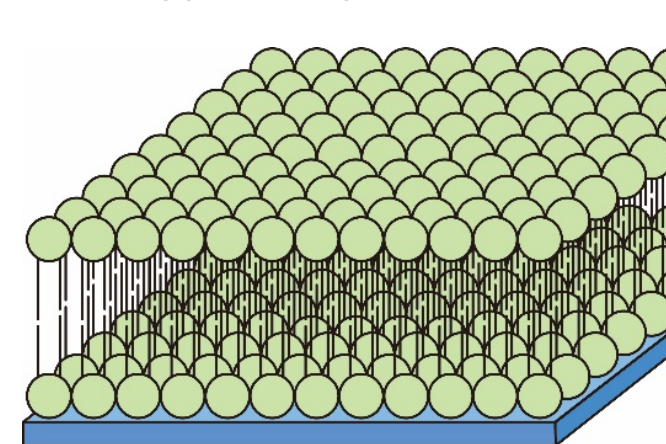
- 脂質二重膜を基本骨格とし、細胞内外を隔てる。
- イオンチャネルなどの膜タンパク質を介して、物質輸送・情報伝達を行う反応場



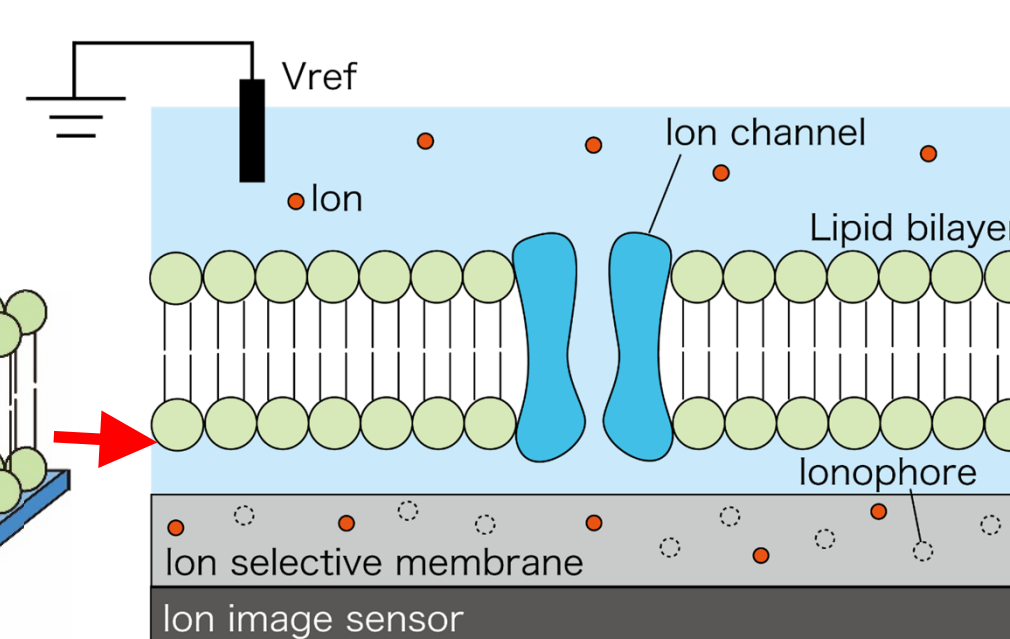
タンパク質をターゲットとした薬剤の60%が膜タンパク質

目的

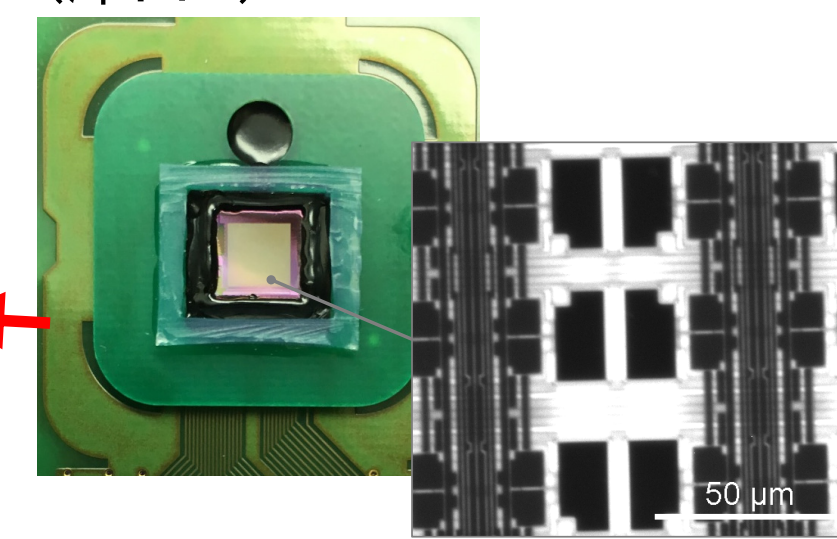
支持脂質二重膜
(Supported lipid bilayer: SLB)



固体基板(センサ表面)と生体試料(細胞)の橋渡し

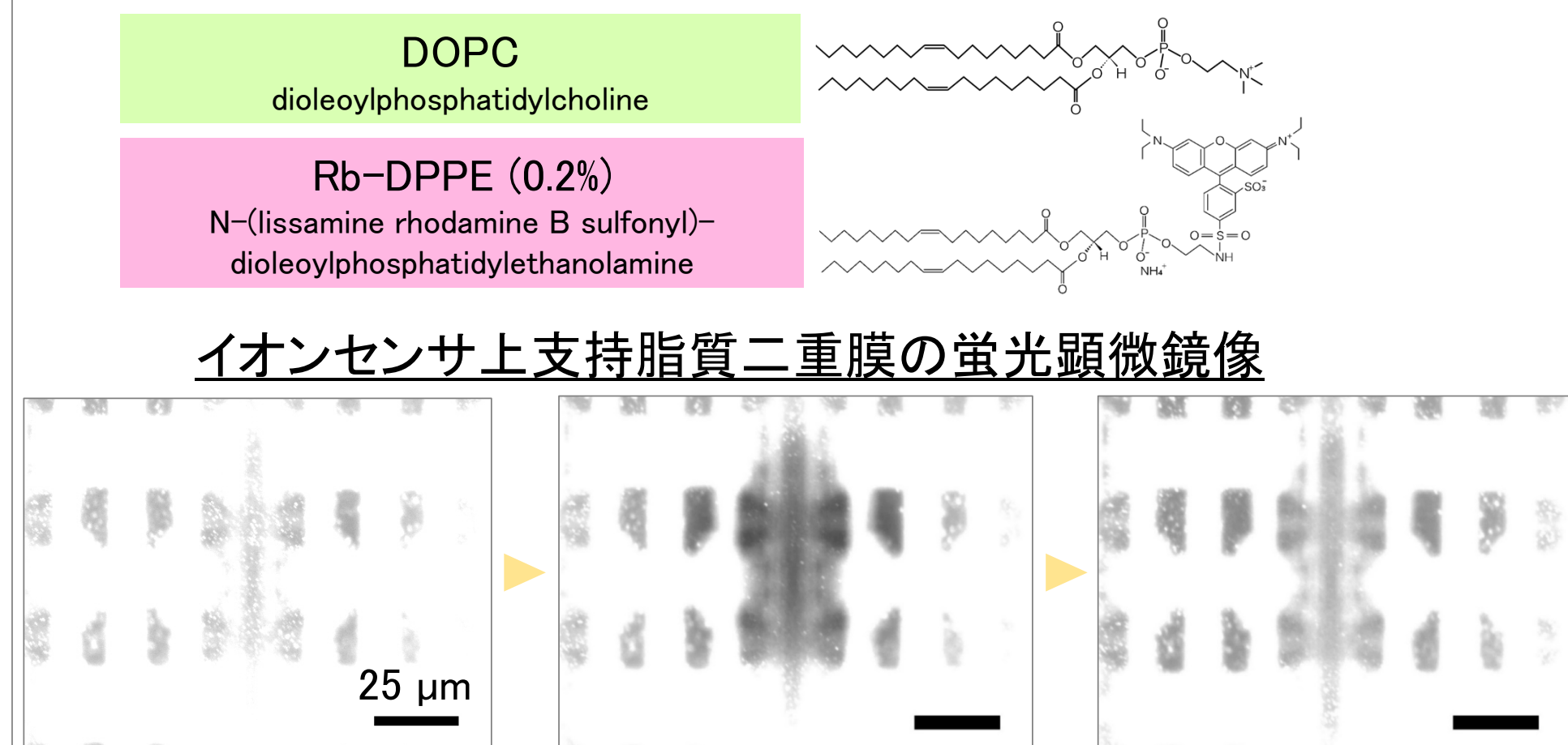


イオンイメージセンサ
(澤田G)

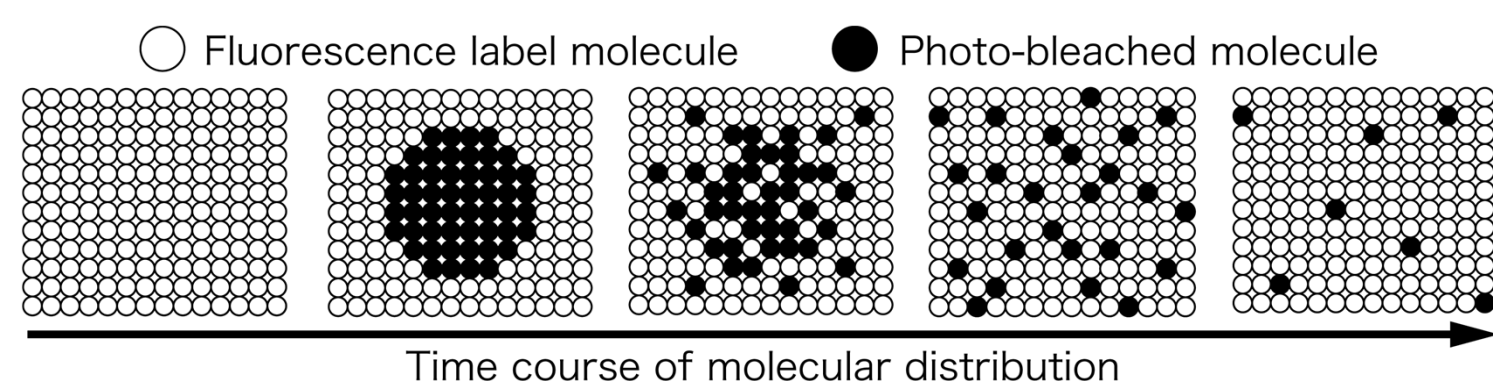


研究成果

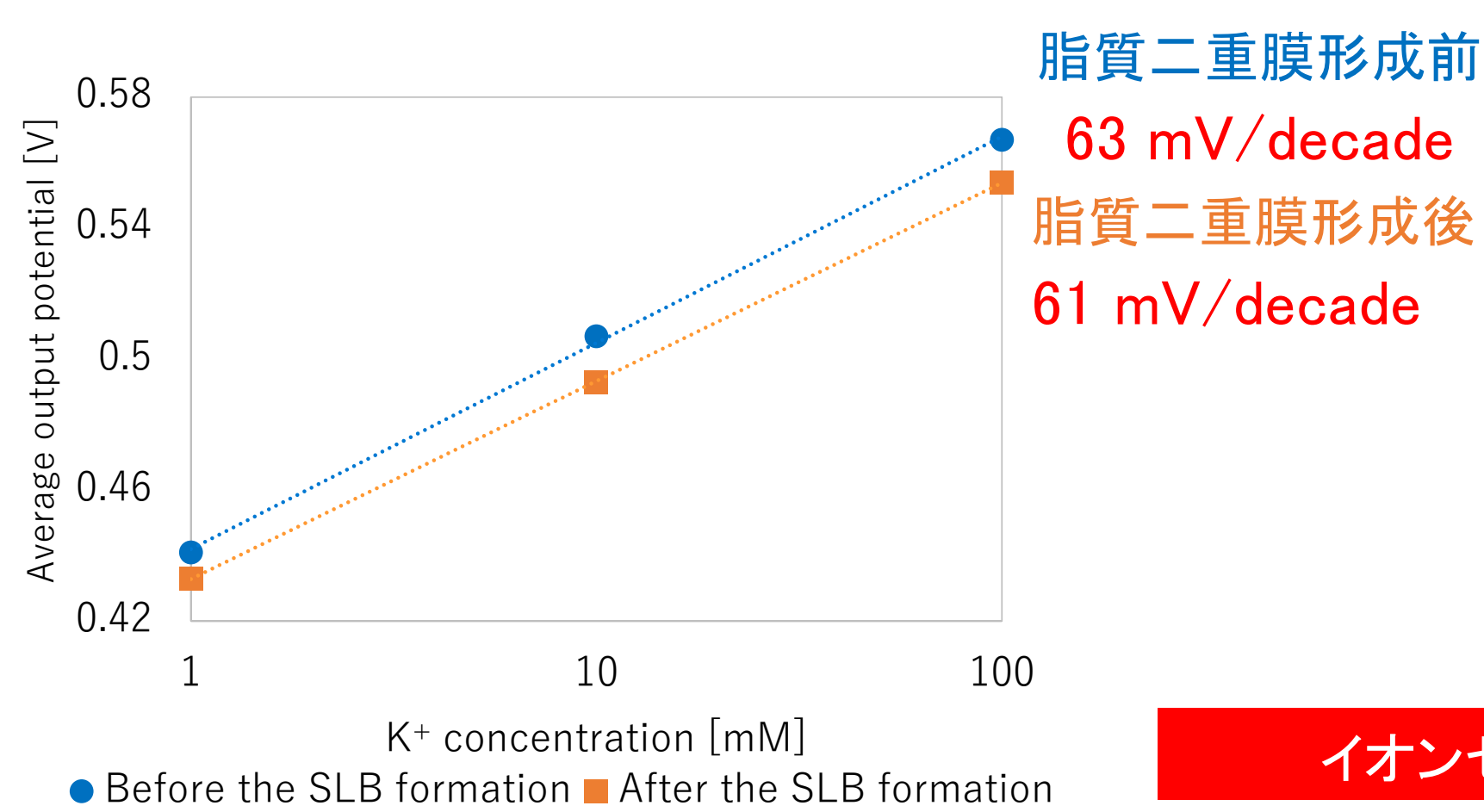
センサ上支持脂質二重膜の遮蔽効果の実証 / チャネルペプチドを用いたイオンチャネル活性評価の実証



Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)



脂質二重膜での被覆によるセンサの電位応答変化



脂質二重膜によるイオン遮蔽

センサ上 [KCl] = 1 mM 緩衝液

[KCl] = 100 mM 緩衝液を滴下

K⁺濃度の変化による電位の応答を計測

X mM KCl, 100-X mM NaCl, 25 mM HEPES / NaOH (pH 7.4)
X = 1 or 100

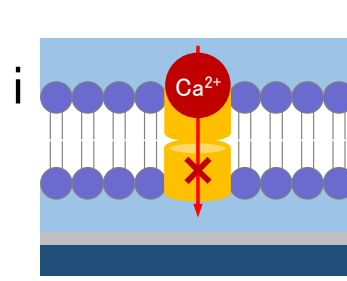
$t_{1/2max}$: [K⁺] = 1 mMでの電位から 100 mMでの電位の50%に到達するまでの時間

SLB形成前: $t_{1/2max}$ = 0.28 sec

SLB形成後: $t_{1/2max}$ = 1.67 sec

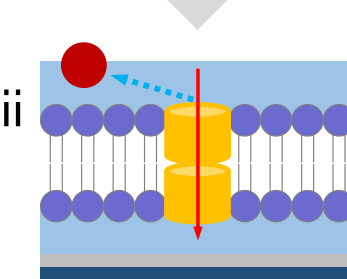
脂質二重膜によりK⁺が遮蔽され、応答時間が遅くなった。

チャネルペプチド(グラミシジンA)の添加と阻害



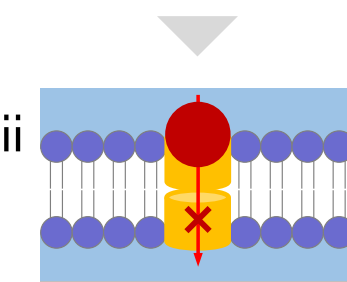
Ca²⁺含有緩衝液を添加

2価のカチオンによりGAのチャネル活性が阻害される。



EGTA含有緩衝液で置換洗浄

EGTA : Ca²⁺のキレート剤
溶液中からCa²⁺を除去

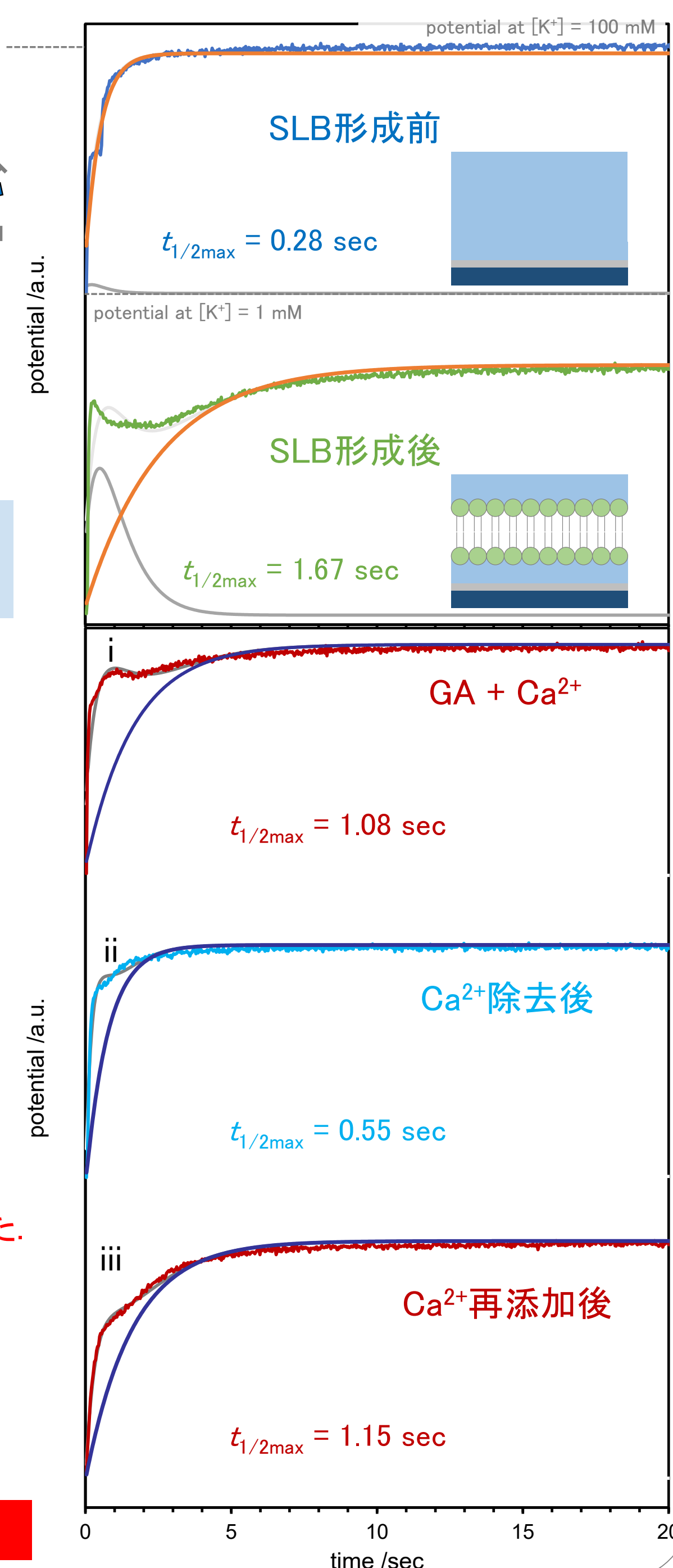


再度 Ca²⁺を添加

$t_{1/2max}$: 0.55 s → 1.15 s GAが阻害された。

Ca²⁺ : X mM KCl, 100-X mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 25 mM HEPES (pH 7.4)
EGTA : 100 mM KCl, 12 mM EGTA, 25 mM HEPES (pH 7.4)

イオンセンサ上で脂質二重膜によるイオン遮蔽とチャネル活性計測を実証した。

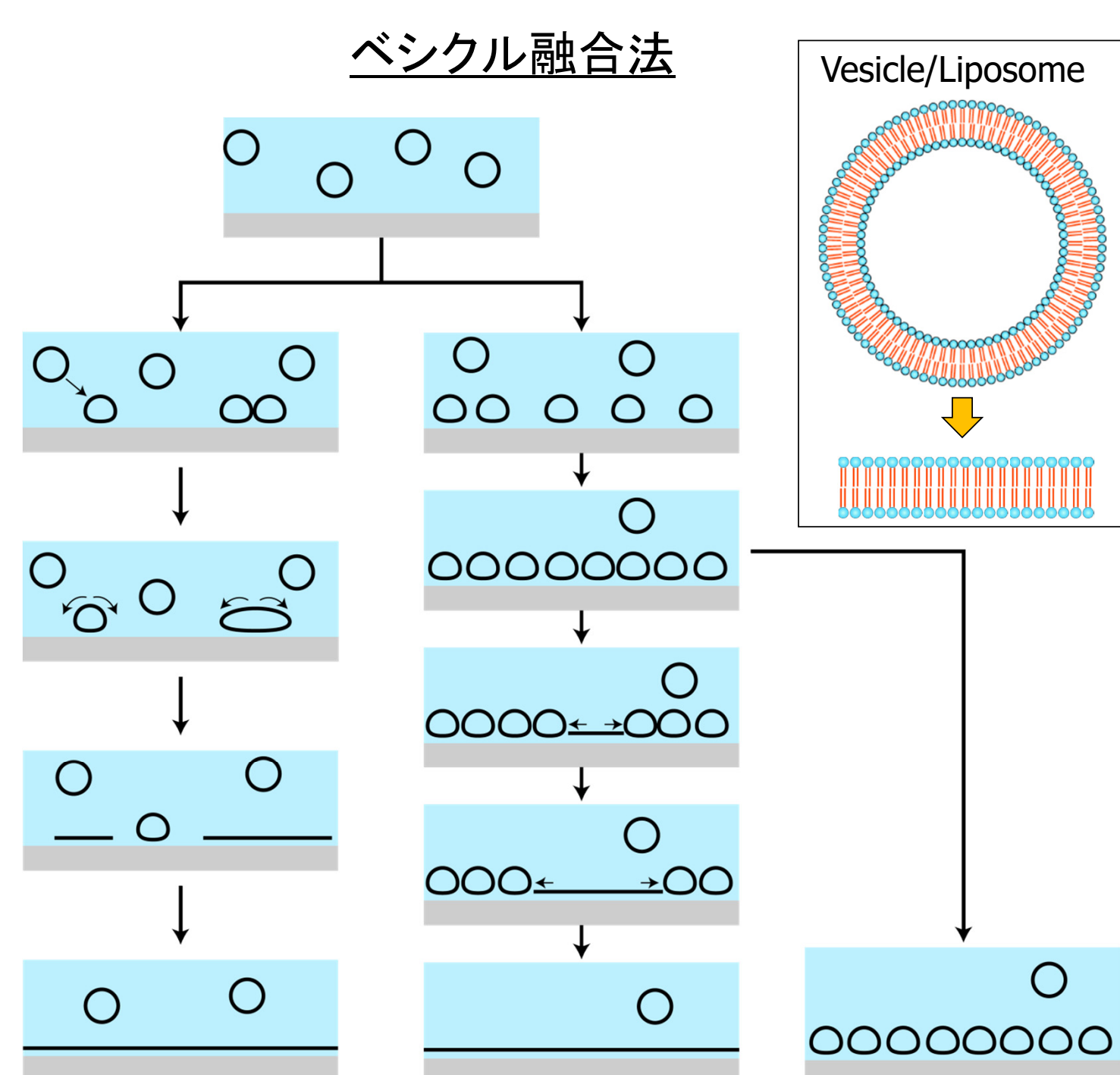


脂質二重膜試料の作製

膜タンパク質再構成

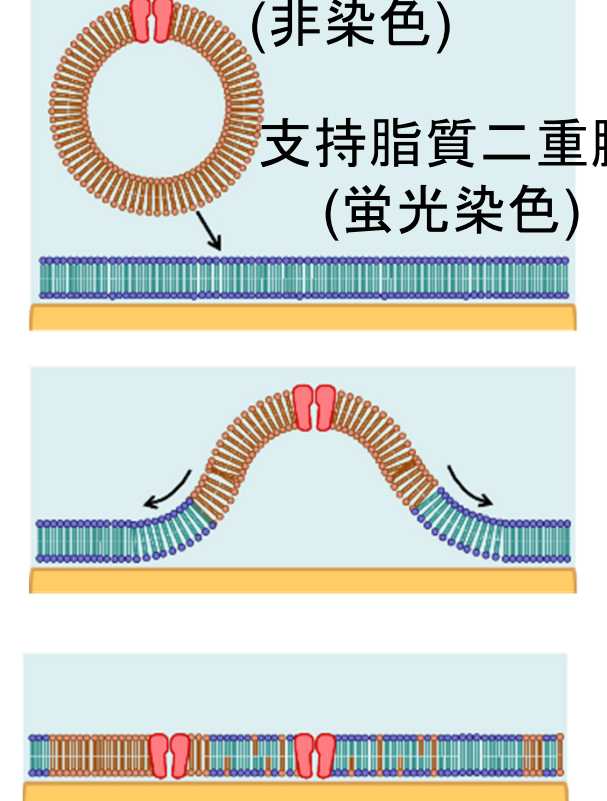
繰り返し溶液交換

ベシクル融合法

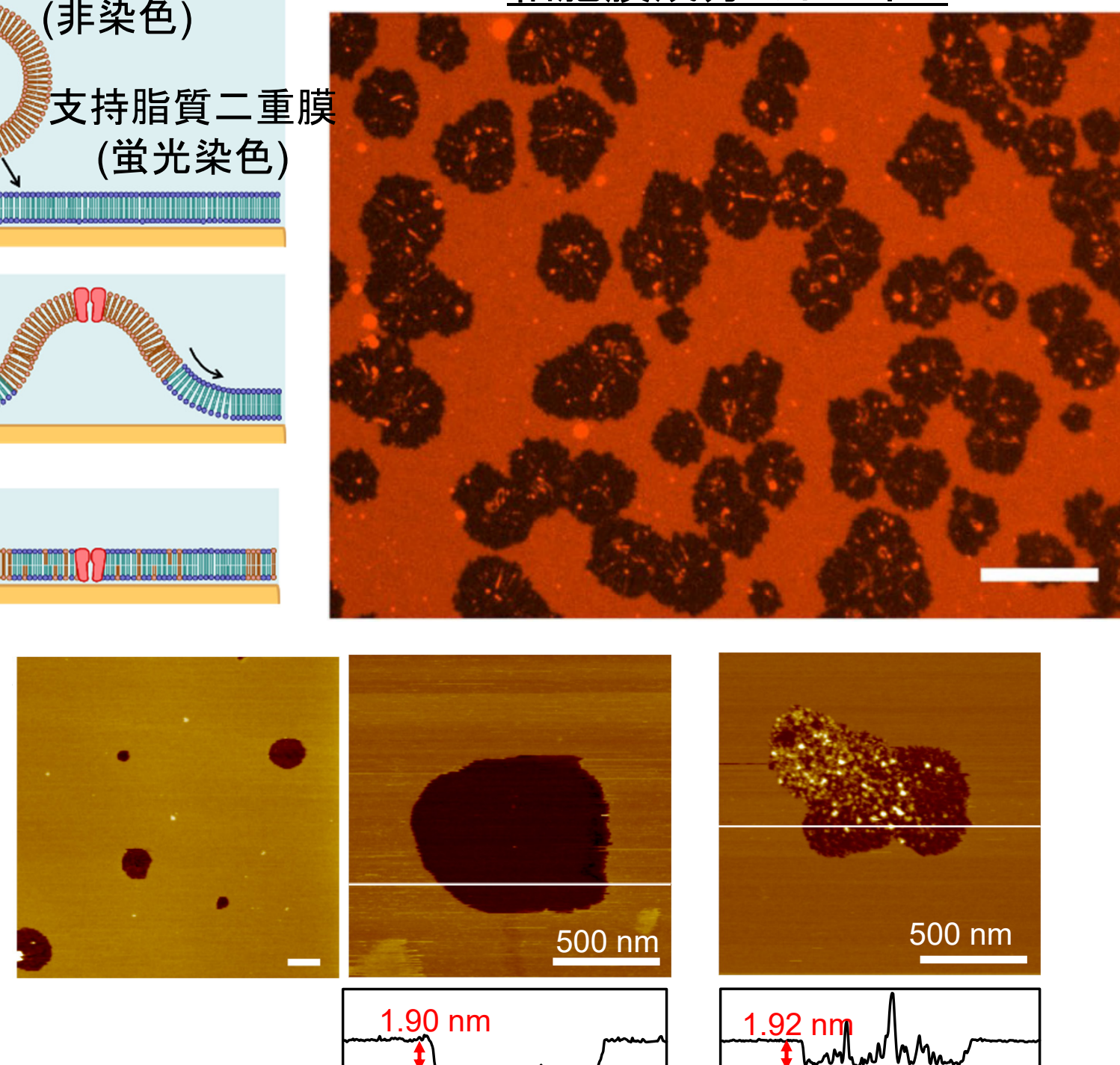


[R. Tero, *Materials*, 5 (2012) 2658.]

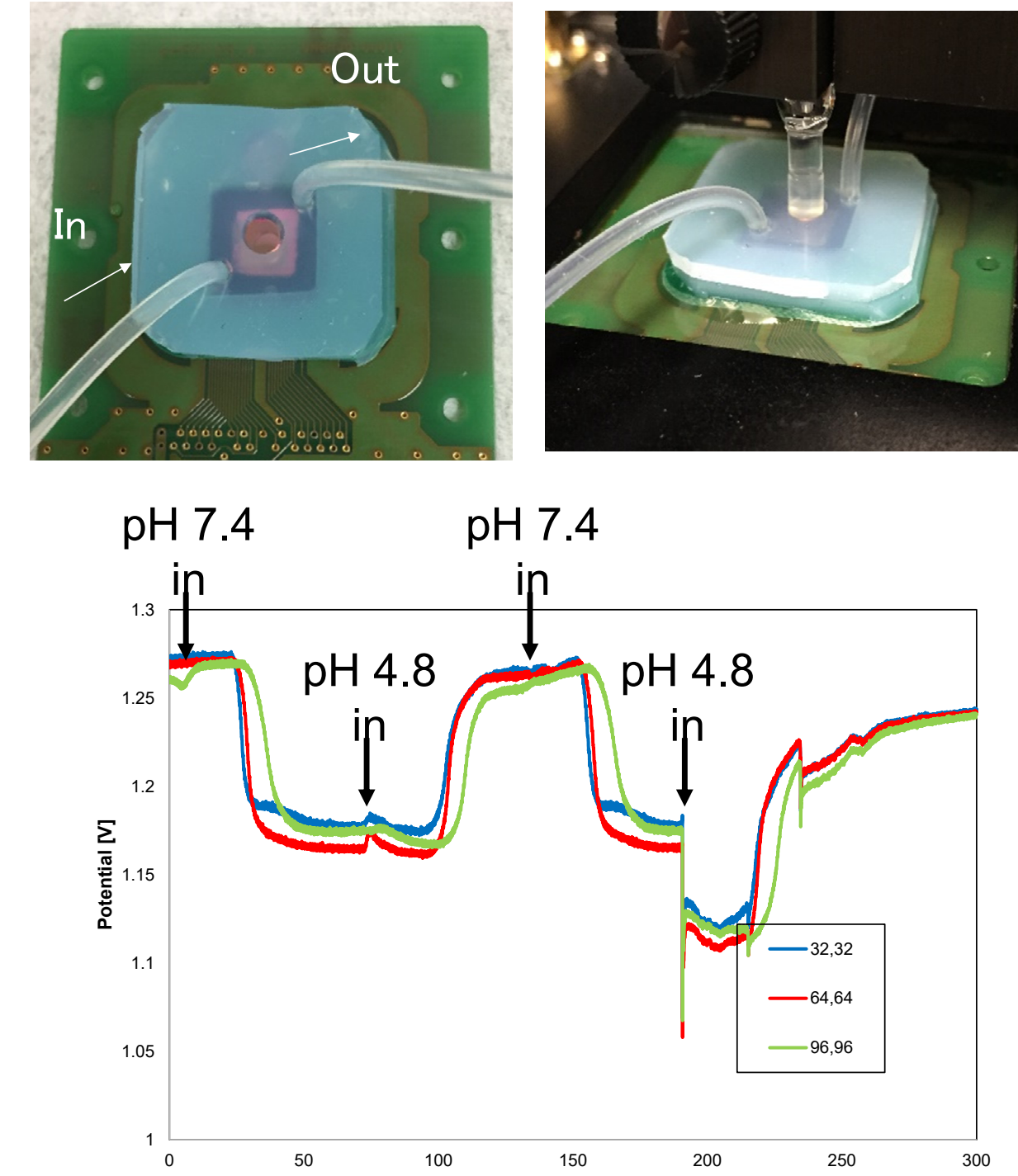
プロテオリポソーム (非染色)



細胞膜成分のドメイン



脂質二重膜を壊さず溶液交換



Acknowledgements

本研究はJST-A-STEP, JST-CREST (Grant Number JPMJCR14F3), カシオ科学振興財団研究協賛, 天野工業技術研究所助成金およびEIIIRISプロジェクトの支援を受けて行われた。