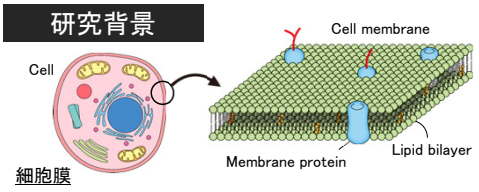
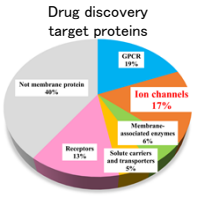
人工脂質二重膜系への膜タンパク質の再構成と機能解析手法の開発

竹内 郁弥, 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





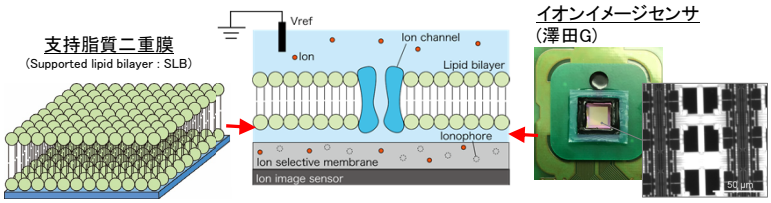
Revision [L. Tiefenauer & S. Demarche, *Materials*, **5** (2012) 2005–2242]

- 脂質二重膜を基本骨格とすし，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

固体基板(センサ表面)と生体試料(細胞)の橋渡し

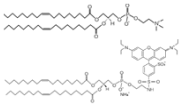


研究成果

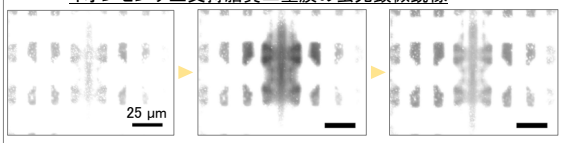
センサ上支持脂質二重膜の遮蔽効果の実証 / **チャネルペプチドを用いたイオンチャネル活性評価の実証**

DOPC
dioleoylphosphatidylcholine

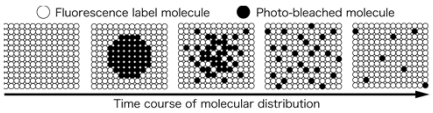
Rb-DPPE (0.2%)
N-(lissamine rhodamine B sulfonyl)-dioleoylphosphatidylethanolamine



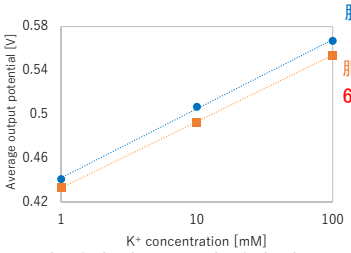
イオンセンサ上支持脂質二重膜の蛍光顕微鏡像



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



脂質二重膜形成前
63 mV/decade
脂質二重膜形成後
61 mV/decade

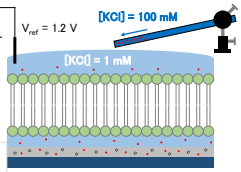
脂質二重膜によるイオン遮閉

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

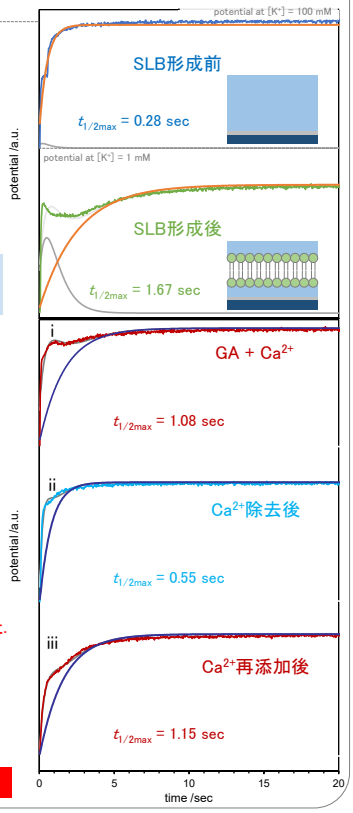


$t_{1/2max}$: $[K^+]$ = 1 mMでの電位から 100 mMでの電位の 50% に到達するまでの時間

SLB形成前 : $t_{1/2max}$ = 0.28 sec

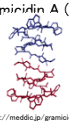
SLB形成後 : $t_{1/2max}$ = 1.67 sec

脂質二重膜によりK^+が遮蔽され，応答時間が遅くなった.

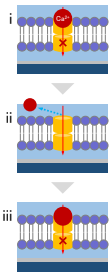


チャネルペプチド(グラミシジンA)の添加と阻害

Gramicidin A (GA)



[http://meddic.jp/gramicidin]



i Ca^{2+}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.

ii EGTA含有緩衝液で置換洗浄
EGTA ・Ca^{2+}のキレート剤
・溶液中からCa^{2+}を除去
$t_{1/2max}$: 1.08 s → 0.55 s GAの活性が回復した.

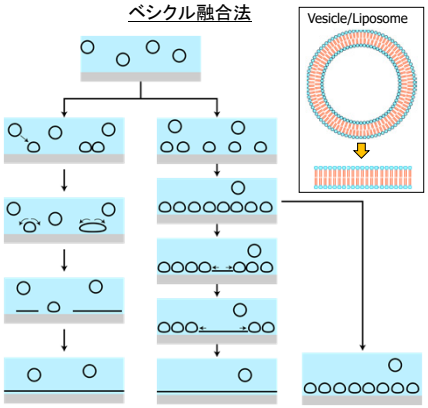
iii 再度 Ca^{2+}を添加
$t_{1/2max}$: 0.55 s → 1.15 s GAが阻害された.

Ca^{2+} : X mM KCl, 100−X mM NaCl, **10 mM $CaCl_2$**, 25 mM HEPES (pH 7.4)
EGTA : 100 mM KCl, **12 mM EGTA**, 25 mM HEPES (pH 7.4)

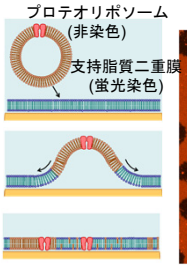
イオンセンサ上で脂質二重膜によるイオン遮閉とチャネル活性計測を実証した.

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

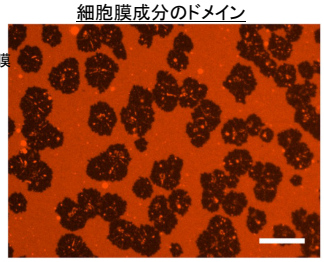
ベシクル融合法

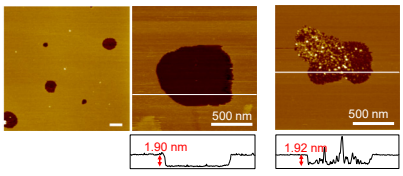


[R. Tero, *Materials*, **5** (2012) 2658.]

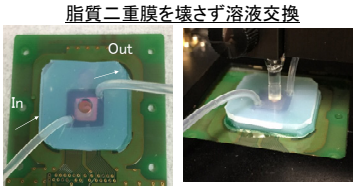


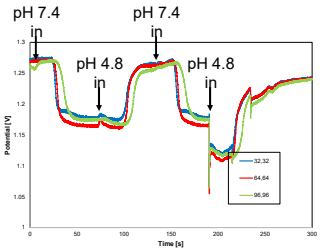
細胞膜成分のドメイン





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), 天野工業技術研究所助成金, 永井科学技術財団奨励金およびEIIRISプロジェクトの支援を受けて行われた.