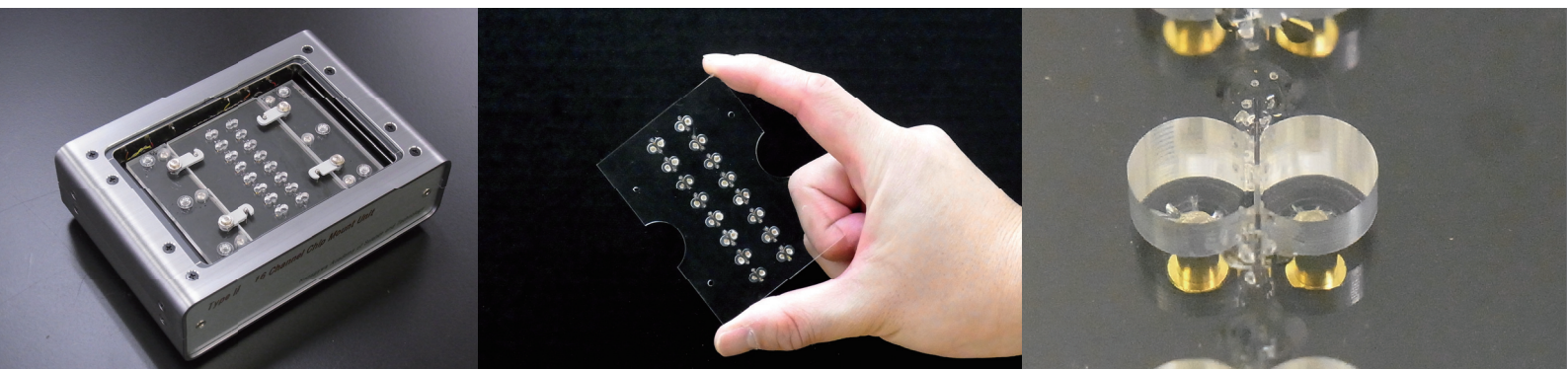


APPLICATION NOTES

人工細胞膜上に再構成した
イオンチャネルの電気生理学的計測事例



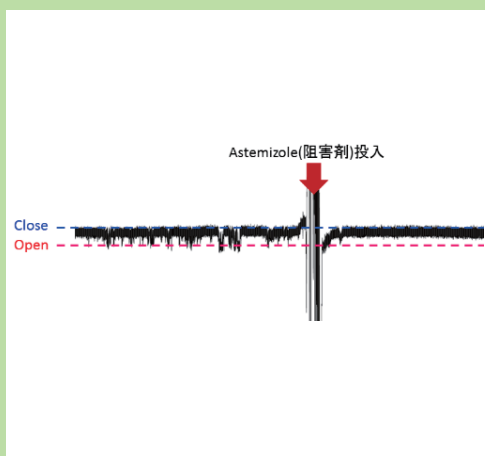
- 電位依存型イオンチャネル
- リガンド依存型イオンチャネル
- 細胞内小器官に存在するイオンチャネル
- ナノポアタンパク質/人工ナノポア

INDEX

■ 電位依存型イオンチャンネル	1~2
hERGチャンネル	1
Ca依存型カリウムチャンネル(hBK)	1
カリウムチャンネル(KcsA)	1
コネキシン(Connexin43-eGFP)	2
■ リガンド依存型イオンチャンネル	3~4
グルタミン酸受容体(NMDA)	3
リガンド依存型Ca ²⁺ チャンネル(TRPV1)	3
酸感受性イオンチャンネル(ASIC1)	3
内向き整流性K ⁺ チャンネル(Kir2.1)	4
■ 細胞内小器官に存在するイオンチャンネル	5
リアノジン受容体チャンネル(RyR)	5
TRPML1チャンネル	5
■ ナノポアタンパク質/人工ナノポア	6~7
αヘモリシン(αhemolysin)	6
アラメチシン(Alamethicin)	6
有機金属錯体	6
ストレプトリジンO	7
マガイニンII	7

電位依存型イオンチャンネル

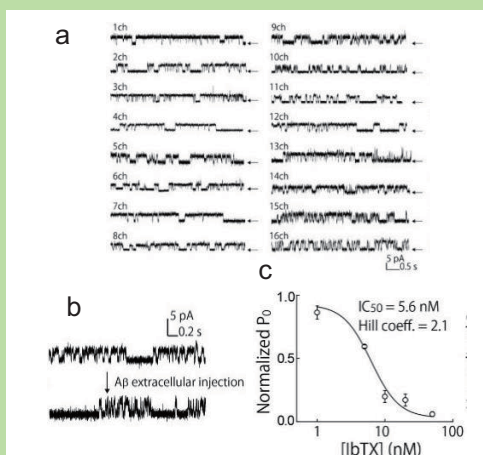
hERGチャンネル



hERGチャンネルは6回膜貫通タンパク質が4量体を形成している。hERGチャンネルは、電位依存性のカリウムイオンチャンネルである。hERGチャンネルが阻害されると、QT間延長による不整脈が引き起こされることが知られている。そのため、新規薬剤開発時は、hERGチャンネルに悪影響を与えないことを試験することが義務付けられている。本シグナルは、16chデバイスで測定したものである。チャンネルの活性化が観察された後に、阻害剤であるastemizoleを投入した。そして、hERGチャンネル由来のシグナルが消失した。これらの結果は、Scientific Reports(2018)にて発表した。

K. Kamiya et al. *Scientific Reports* Vol.8 (2018) 17498.

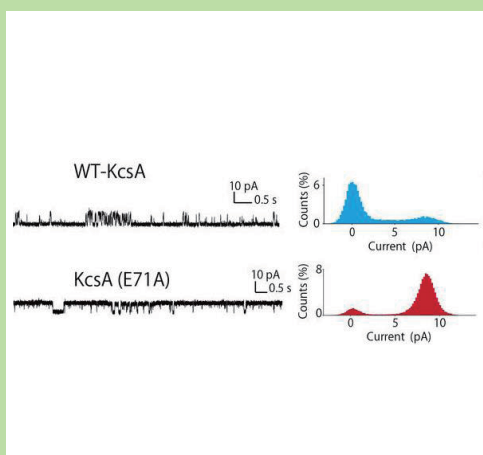
Ca依存型カリウムチャンネル (hBK)



hBKチャンネルは6回膜貫通タンパク質で4量体を形成する、カルシウム依存型カリウムチャンネルである。hBKの細胞内ドメインにカルシウム結合サイトが存在する。左上(a)のシグナルは、1度の実験で16chすべてにhBKの1分子チャンネルが観察された。このデバイスは、ウェルが開放系であるため細胞内外どちらにも阻害剤を加えられる利点を持つ。hBKの細胞内側・外側どちらもアルツハイマーの原因物質のアミロイドβによる阻害を起こすことが分かった(b)。また、薬理評価にも成功している(c)。これらの結果は、Scientific Reports(2013)にて発表した。

R. Kawano et al. *Scientific Reports* Vol.3 (2013) 1995.

カリウムチャンネル (KcsA)

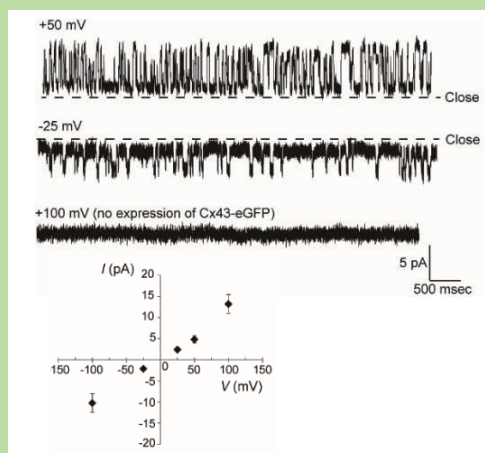


KcsAチャンネルは、2回膜貫通タンパク質で4量体を形成する。KcsAチャンネルは最も構造や機能解析が進んだイオンチャンネルである。カリウムチャンネルのイオンが通過するポアドメインの構造は保存されていることが知られている。今回は中性条件で、野生型のKcsAチャンネルと改変型のKcsAチャンネルの開閉頻度を比較した。これらの結果は、Scientific Reports(2013)にて発表した。

R. Kawano et al. *Scientific Reports* Vol.3 (2013) 1995.

電位依存型イオンチャネル

コネクシン (Connexin43-eGFP)

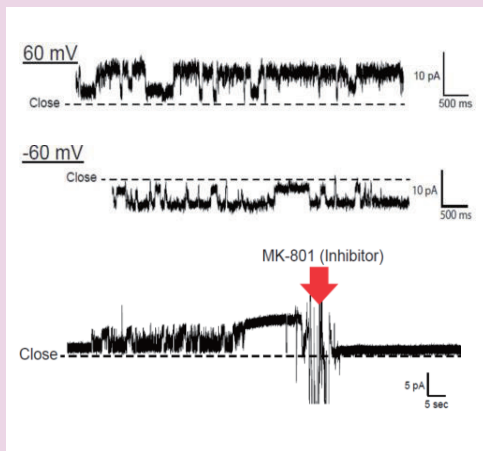


コネクシンは、4回膜貫通タンパク質でコネクソンと呼ばれる6量体を形成する。コネクソン同士が結合することにより、ギャップジャンクションを形成し、細胞質内の小分子(分子量約1500以下)の物質交換を行っている。今回は、無細胞タンパク質合成系にてコネクシンを発現させ、リポソーム再構成した。上のシグナルは、コネクソン1分子の各固定電位における応答である。細胞で発現したコネクソンと同様な電位依存性が示されたことから、無細胞タンパク質合成系による発現においてチャネル形成がされることが分かった。これらの結果は、*Nature Chemistry*(2016)にて発表した。

K. Kamiya et al. *Nature Chemistry* Vol. 8 (2016) pp.881-889.

リガンド依存型イオンチャネル

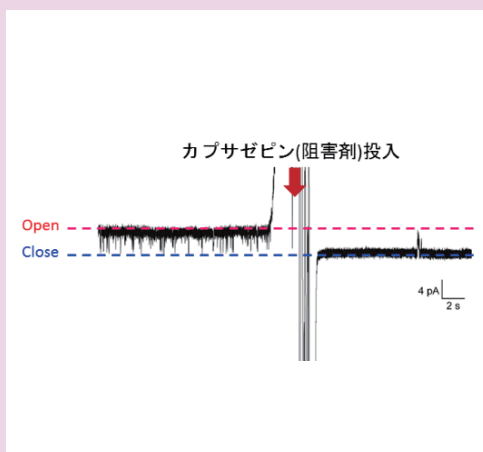
グルタミン酸受容体 (NMDA)



グルタミン酸受容体はヘテロ4量体(NR1,NR2)を形成する陽イオンチャネルであり、主に神経細胞に発現している。グルタミン酸受容体の細胞外ドメインにグリシンとグルタミン酸の結合し、活性化される。上のシグナルは、グルタミン酸受容体1分子の各固定電位における応答である。また、細胞外に相当するウェルに阻害剤であるMK-801を添加したところ、NMDAの開閉パターンのシグナルが消失し、チャネルが閉じた。これらの結果は、Scientific Reports(2018)にて発表した。

K. Kamiya et al. *Scientific Reports* Vol.8 (2018) 17498.

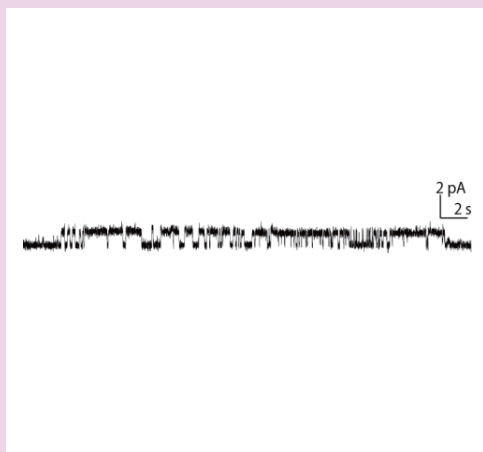
リガンド依存型Ca²⁺チャネル(TRPV1)



Transient receptor potential (TRP) チャネルのV1(TRPV1)は、辛さ、熱や痛みに関係する陽イオンチャネルである。TRPV1チャネルの構造は、6回膜貫通タンパク質で4量体を形成することにより、チャネル構造を形成する。TRPV1は、辛さの成分であるカプサイシンにより機能が活性化される。本シグナルは、16chデバイスで測定したものである。カプサイシン存在下では、TRPV1チャネルの活性化が観察された。阻害剤であるカプサゼピンを投入後は、TRPV1は非活性になった。これらの結果は、Scientific Reports(2018)にて発表した。

K. Kamiya et al. *Scientific Reports* Vol.8 (2018) 17498.

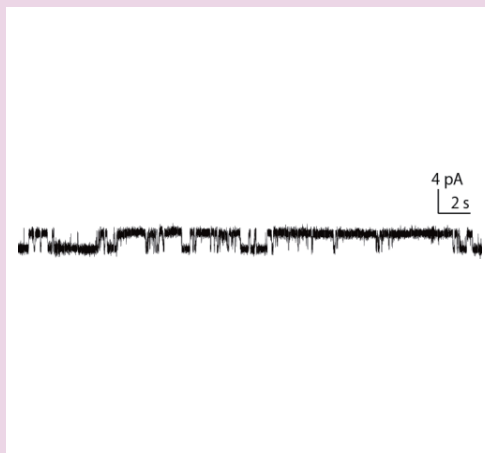
酸感受性イオンチャネル (ASIC1)



酸感受性イオンチャネル(acid-sensing ion channel: ASIC)は陽イオン系のイオンチャネルである。感覚器(舌)や神経等に発現している。ASIC1は、2回膜貫通タンパク質でヘテロ3量体を形成し、イオンチャネルを形成している。水素イオンがASIC1のリガンドであることが明らかになっており、酸味受容体や痛覚受容体として注目されている。16chデバイスを用い、ASIC1特異的な電気シグナル取得に成功している。

リガンド依存型イオンチャネル

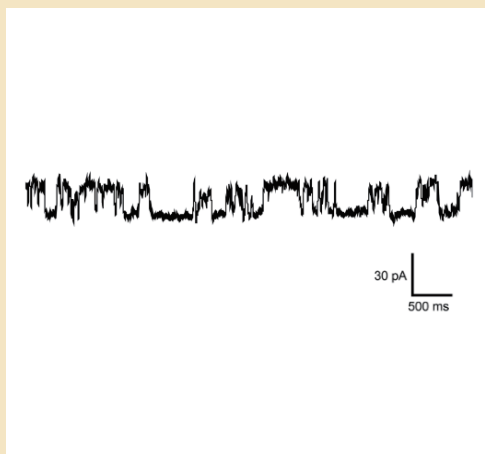
内向き整流性K⁺チャネル (Kir2.1)



内向き整流性カリウムチャネル(Kir2.1)は、2回膜貫通タンパク質で4量体を形成し、イオンチャネルを形成する。Kir2.1は心筋に多く発現し、静止膜電位形成を担っている。16chデバイスを用い、Kir2.1特異的な電気シグナル取得に成功している。

細胞内小器官に存在するイオンチャネル

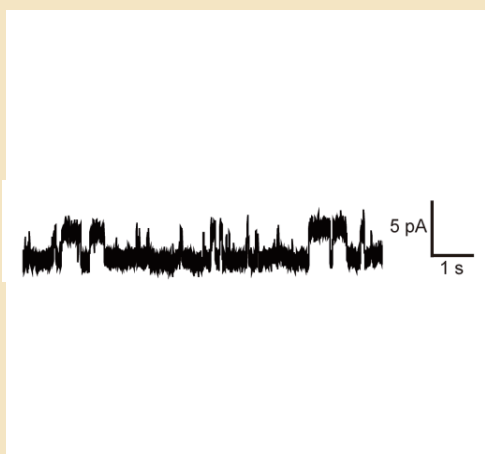
リアノジン受容体チャネル(RyR)



筋小胞体に多く存在するリアノジン受容体は4量体を形成し、カルシウムイオンを輸送するイオンチャネルである。RyR特有のシグナルの計測に成功し、RyRの機能阻害剤のルテニウムレッドを添加するとRyRシグナルが消失した。細胞内小胞上のイオンチャネルのシグナルも取得可能である。これらの結果は、*Scientific Reports*(2018)にて発表した。

K. Kamiya et al. *Scientific Reports* Vol.8 (2018) 17498.

TRPML1チャネル

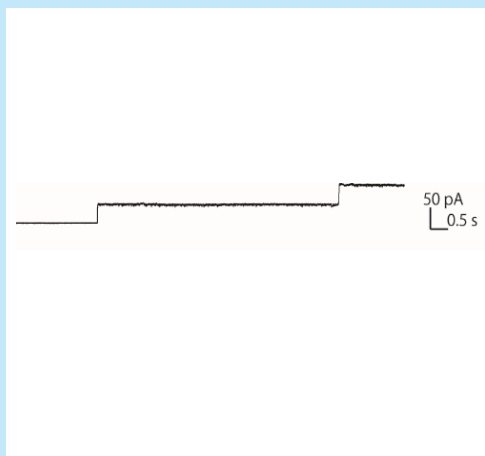


TRPML1チャネルは、6回膜貫通タンパク質で4量体を形成し、陽イオンを透過させる。TRPML1は、細胞内小胞の後期エンドソームやリソソームに発現している。ライソゾーム病の原因タンパク質になっている。TRPML1特有のシグナル計測に成功し、TRPML1の機能阻害剤のベラパミルを添加すると、シグナルが消失した。細胞内小胞上のイオンチャネルのシグナルも取得可能である。これらの結果は、*Scientific Reports*(2018)にて発表した。

K. Kamiya et al. *Scientific Reports* Vol.8 (2018) 17498.

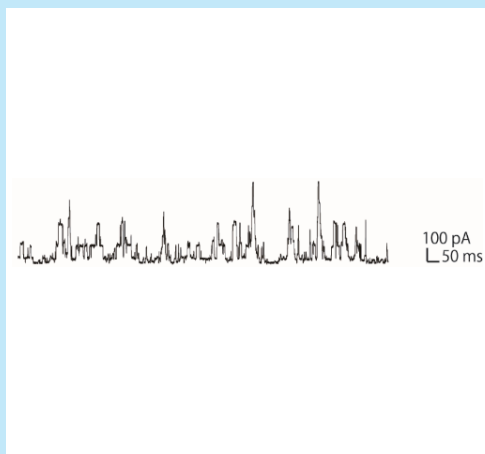
ナノポアタンパク質/人工ナノポア

α ヘモリシン (α hemolysin)



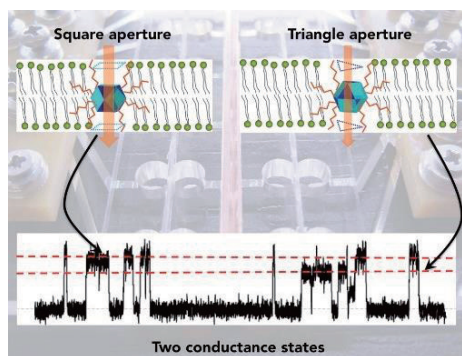
α ヘモリシンは、黄色ブドウ球菌の赤血球を破壊する溶血性をもつ毒素である。分子量36kDaで7量体を形成し、1.5 nmのポアを形成する。Aヘモリシンのナノポアは、ちょうど1本鎖DNAが通過する大きさであるため、生体分子を用いたDNAシーケンス研究にも使用されている。 α ヘモリシンのシグナルは、開閉を繰り返さずに開状態を保つ特徴的なシグナルである。

アラメチシン (Alamethicin)



アラメチシンは、*Trichoderma viride*由来のアミノ酸20残基からなる抗菌ペプチドである。アラメチシンは、 α ヘリックス構造を持つ両親媒性のペプチドで細胞膜へ入り込み、数個会合しナノポアを形成する。

有機金属錯体

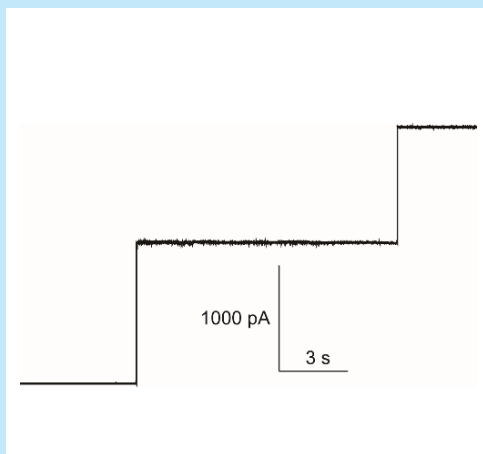


立方八面体という正三角形8つと正方形6つから形成される有機金属錯体を合成しました。そして、16chデバイスにより、この有機金属錯体の隙間を通るイオンの電流値を測定した。1分子の有機金属錯体から、2つの大きさの電流値が存在することが明らかになった。これは、脂質膜内でこの有機金属錯体が回転運動していることが分かりました。我々の人工膜デバイスにイオンチャンネル以外の人工物におけるイオンの流れも計測可能である。これらの結果は、*Chem*(2017)にて発表した。

R. Kawano et al. *Chem* Vol.2 (2017) pp.393-403.
(Copyright 2017, with permission from Elsevier)

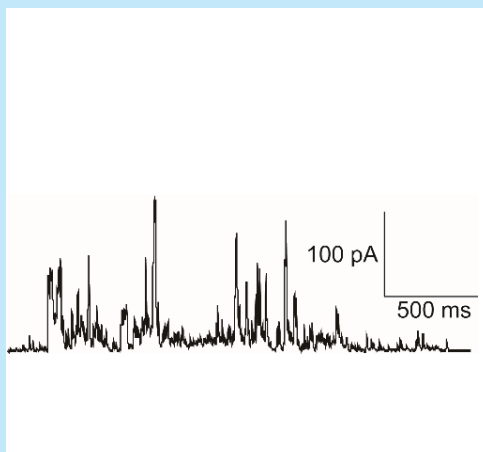
ナノポアタンパク質/人工ナノポア

ストレプトリジンO

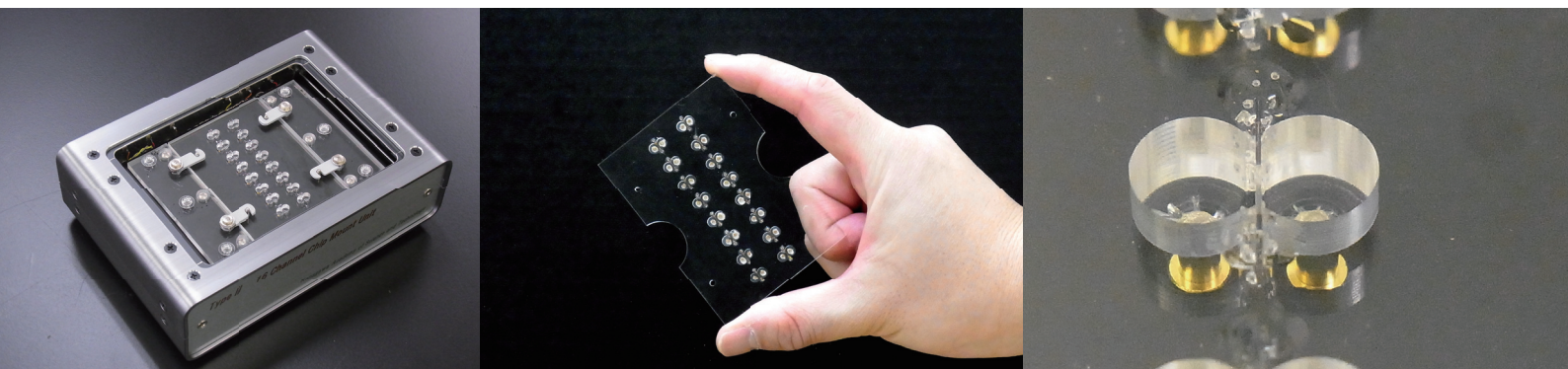


ストレプトリジンOは、レンザ球菌によって産生される分子量約6万のタンパク質である。コレステロールを含む細胞膜で、ストレプトリジン分子が会合し直径20-30 nmのナノポアを形成する。

マガイニンII



マガイニンは、アフリカツメガエルの皮膚由来の23アミノ残基の抗菌ペプチドとして単離された。マガイニンは、負電荷を持つ脂質と相互作用し、リン脂質膜のマガイニン濃度が高まるとポアを形成し、スパイク状のシグナルが検出される。



APPLICATION NOTES

人工細胞膜上に再構成したイオンチャンネルの電気生理学的計測事例

本冊子は、文部科学省地域イノベーション戦略支援プログラムによる研究成果の一部をまとめたものです。
無断転載・複製を禁じます。



地方独立行政法人
神奈川県立産業技術総合研究所 人工細胞膜システムグループ

溝の口支所：〒213-0012 神奈川県川崎市高津区坂戸 3-2-1 TEL 044-819-2031

E-mail : sks@newkast.or.jp URL : <https://www.kanagawa-iri.jp>

2019.2 発行