

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19890086

研究課題名（和文） 脂質平面膜法とパッチクランプ法を融合した新しい電気生理測定チェンバーの開発

研究課題名（英文） Development of a novel chamber applicable to various electrophysiological measurements

研究代表者

岩本 真幸（IWAMOTO MASAYUKI）

福井大学・医学部・助教

研究者番号：40452122

研究成果の概要：本研究ではイオンチャンネル蛋白質の機能を調べるための新しい電気生理測定系の開発を目指した。従来、測定対象とするイオンチャンネルの存在環境（人工脂質膜中または細胞膜中など）によって異なる測定系を用いる必要があったが、新たに開発した測定方法ではこの制約を無くす事ができた。従って、多種多様なイオンチャンネルに対し共通のプラットフォーム上での機能評価、およびイオンチャンネルを標的とした創薬研究への応用が期待される。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,320,000	0	1,320,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	405,000	3,075,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：イオンチャンネル, 脂質平面膜, パッチクランプ

1. 研究開始当初の背景

イオンチャンネルは全ての細胞に普遍的に存在する膜蛋白質である。電氣的、化学的、あるいは機械的な刺激を受容し、自身を介し膜を横切る受動的なイオンの流れをコントロールしている。その結果、細胞の電氣的応答をはじめ、細胞内イオン濃度や細胞体積のコントロールなど、多くの生理現象を司っている。また、種々の薬物の作用点となる得ることから、イオンチャンネルは創薬における重要なターゲット分子でもある。

イオンチャンネルの機能は膜を流れる電流

として比較的容易に観測することができる。従って、電気生理学的手法を用いたチャンネル電流測定がイオンチャンネル研究の常套手段である。電気生理学的測定には、人工膜上に再構成したチャンネルを測定する脂質平面膜法、そして、細胞膜上のチャンネルを直接測定するパッチクランプ法などがある。脂質平面膜法は、機能を保持したまま単離できるチャンネルのみへの適用となるが、溶液のみならず脂質組成も自由にコントロールすることができる。またパッチクランプ法は、バクテリアなどの小さな細胞やウイルスに存在する

チャンネルの測定は困難であるが、細胞膜上に発現したチャンネルの電流を直接測定することができる。このように各手法には特色があるが、測定対象となり得るチャンネルの種類や用いる装置・技術が異なり、全てのイオンチャンネルを対象とする電気生理学的測定系は存在しない。測定対象の発現・存在環境に依存しない電気生理学的手法の開発は、創薬におけるハイスループットスクリーニングという観点からも待ち望まれる。

本研究代表者は脂質平面膜法とパッチクランプ法の両測定を日常的に行う中で、脂質平面膜法の測定技術を改変し、細胞の測定にも応用できる電気生理測定チェンバーを開発する発想を得た。このような測定系が実現すれば、多種多様なイオンチャンネルの機能評価を共通のプラットフォーム上で行うことができ、網羅的な解析へ応用できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、人工脂質平面膜から細胞膜まで、イオンチャンネルの存在環境に依存しない電気生理学測定プラットフォームの開発を目指す。また、実際のイオンチャンネルの測定を通して、開発した測定系の有効性を実証する。

3. 研究の方法

(1) 電気生理測定チェンバーの開発

新しい電気生理測定プラットフォームを開発するにあたり、次の点を考慮した。

- ① 最小限の変更で様々な膜系に対応できること
脂質平面膜法をベースに、膜を保持する小孔のみを専用のものに取り替えるだけで、各種膜系での電気生理測定が行えるようにした。
- ② イオンチャンネルを含む膜の両側の溶液かん流が行えること
一般的にパッチクランプ法ではピペット内の溶液灌流には特殊な技術が必要な上、かん流の効率も良くはない。本研究では膜の両側の溶液かん流を効率よく行えるチェンバーの形状の工夫、および送液システムとの組み合わせを試みた。また通常人工脂質膜は振動に弱く、溶液かん流を行うと容易に破裂する。本研究では人工脂質膜を保持する小孔の形状等を最適化し、溶液かん流に耐え得る強度を持った人工膜の調製を試みた。
- ③ 倒立顕微鏡上での観察、および分光学的測定の適用が可能であること

電流の測定のみならず、分光学的な手法との同時計測が可能なプラットフォームを目指した。膜を保持する小孔を有するチェンバー隔壁には通常テフロンを用いるが、本研究では光の透過性の高いガラス製の隔壁を用いた。

(2) 種々の膜系にあるイオンチャンネル電流測定への応用

① 人工脂質平面膜を用いた実験

直径約 $50\mu\text{m}$ の小孔を持つガラス製の基板をチェンバー隔壁に用いた。測定対象には精製した KcsA カリウムイオンチャンネルおよびペプチド型陽イオンチャンネルを用いた。脂質は 20mg/mL デカン溶液とし、パスツールピペット先端に少量付け小孔に吹きかけて平面膜を調製した。

② リポソームを用いた実験

直径約 $1\sim 5\mu\text{m}$ の小孔を持つガラス基板をチェンバー隔壁に用いた。KcsA チャンネルを組み込んだ直径 $20\mu\text{m}$ 以上の巨大一枚膜リポソーム (GUV) を調製し、測定に用いた。GUVを上部チェンバーに添加し、顕微鏡下で操作のマイクロガラスピペットを用いて小孔の直上に移動させた。続いて下部チェンバーを陰圧にしてGUVを小孔辺縁部に密着させた。

③ 培養細胞を用いた実験

直径約 $1\mu\text{m}$ の小孔を持つガラス基板をチェンバー隔壁に用いた。HERG カリウムイオンチャンネルを安定に発現する HEK293 細胞を測定対象に用いた。細胞を上部チェンバーに添加し、ガラス隔壁上に沈殿した細胞を顕微鏡下で観察した。適当な形状の細胞を選定し、操作のマイクロガラスピペットを用いて小孔の直上まで移動させた。続いて下部チェンバーを陰圧にして細胞を小孔に密着させた。

4. 研究成果

(1) 新しい電気生理測定プラットフォーム

作製した測定チェンバーは上下2層から成り、両チェンバー間に測定対象に応じたサイズ・形状の小孔を有するガラス製基板 (隔壁) を挟む構造とした。上部チェンバーは外部からのアクセスが容易な構造、下部チェンバーは底面から倒立顕微鏡対物レンズで観察可能な構造とした。また、下部チェンバーには溶液かん流および圧力制御に用いる流路を3本設け、マイクロシリンジポンプや圧力制御装置に繋いだ。

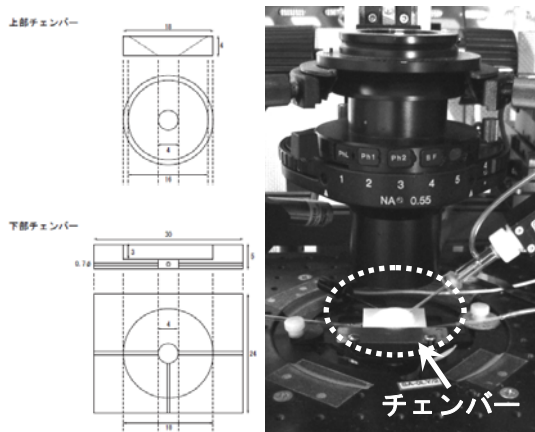


図1. 本研究で作製した測定チェンバーの設計図(左)と実際に倒立顕微鏡ステージに設置した様子(右)。

(2) 人工脂質平面膜系での電流測定への応用

通常の脂質平面膜法ではテフロン製の隔壁を用いるところをガラス製としたので、安定な膜を得るために加工・表面処理を検討する必要があった。まず、小孔の立体的な形状をテーパ状に加工した。小孔に高電圧放電を行ってガラス表面を熔融させ、辺縁部を平滑化させた。さらに使用直前、ピラニア溶液(濃硫酸:過酸化水素水=7:3)で化学的洗浄し、ガラス表面の疎水化処理(トリオクチルシラン)を行った。その結果、溶液かん流に耐える非常に安定な人工脂質二重膜を小孔に形成させることができた。実際に低ノイズの単一チャンネル電流測定を行うことができ、8時間以上にわたる長時間のチャンネル電流記録を行うことも可能であった。

(3) リポソーム系での電流測定への応用

GUVに組み込んだイオンチャンネルのマイクロスコピック電流を測定することができた。GUVは不安定な構造であるため、小孔に密着させる際の下部チェンバーへの陰圧付加により破裂することが頻繁に起こった。この問題は、陰圧付加をごく短時間の瞬間的なものにする程度改善されたが、実験の成功率を高めることが今後の課題である。

(4) 細胞膜系での電流測定への応用

当初、細胞と小孔辺縁部とをギガオーム以上の電気抵抗で密着(ギガシール)させることが困難であった。細胞測定用の直径 $1\mu\text{m}$ の小孔は、平面膜実験用の小孔($\phi 50\mu\text{m}$)と同様な高電圧放電による辺縁部の平滑化

が行えないためと考えられた。そこで濃アルカリ処理による平滑化を行ったところ、ギガシール形成に改善が見られた。しかし従来のパッチクランプ法と比較するとギガシール達成率は低かった(10~20%程度)。また、セルアタッチモードでの電流測定は可能であったものの、そこから細胞膜を破りホールセルモードにすることができなかった。従って、全細胞電流を測定するためには、穿孔パッチ法の適用などを今後検討する必要がある。

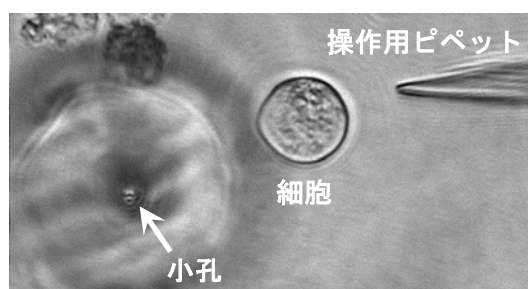


図2. 操作用マイクロピペット(右)で細胞(中央)を小孔付近(左)に移動させている様子。

(5) まとめと今後の展望

本研究では多様な膜系に対応できる電気生理測定チェンバーを開発した。上部チェンバーを外してガラス隔壁を替えるだけで、人工脂質平面膜、リポソーム膜、そして細胞膜など幅広い膜系の電気生理測定を行うことができた。このような電気生理測定系はこれまでに無く、今後更なる改良が必要ではあるが、多種多様なイオンチャンネルの機能評価を共通のプラットフォーム上で行えるようになると考えられる。従って、イオンチャンネルの網羅的な解析に応用し、イオンチャンネルをターゲットとした創薬研究にも貢献できるであろう。

また、本研究では当初の予想とは別の成果も得ることができた。本測定系での人工脂質平面膜実験の性能を従来のものより高めることができ、脂質平面膜法の応用可能性を広げた点である。単一チャンネル電流からマイクロスコピック電流まで長時間安定に記録できる本測定系の利点を生かし、チェンバー内にin vitro発現系を構築してイオンチャンネルの発現と機能を分光学的および電気生理学的にモニターするという新しい研究方法への発展も期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Iwamoto M, Shimizu H, Oiki S
“The water-ion coupling ratio for ion permeation through the KcsA potassium channel: Dependencies on concentration and species of permeating ions”
Biophys. J., **96 suppl.**, 179a (2009), 査読無
- ② Iwamoto M, Shimizu H, Oiki S
“Flux coupling between ion and water in the K⁺ selective pore”
J. Physiol. Sci. **58 suppl.**, s77 (2008), 査読無
- ③ 老木成稔, 安藤博之, 久野みゆき, 清水啓史, 岩本真幸
「K チャネルのイオン透過機構: 新しい流動電位測定法により明らかになったイオン-水流束比」
生物物理, **48**, 246-252 (2008), 査読有
- ④ Shimizu H, Iwamoto M, Konno T, Nihei A, Sasaki YC, Oiki S
“Global twisting motion of single molecular KcsA potassium channel upon gating”
Cell **132**, 67-78 (2008), 査読有

[学会発表] (計4件)

- ① Iwamoto M, Shimizu H, Oiki S
“The water-ion coupling ratio for ion permeation through the KcsA potassium channel: Dependencies on concentration and species of permeating ions”
Biophysical Society 53rd Annual Meeting, 2009.3.1, Boston, USA
- ② 岩本真幸, 清水啓史, 老木成稔
「流動電位測定による KcsA カリウムチャネルのイオン透過機構の検討」
日本生物物理学会第46回年会, 2008.12.5, 福岡
- ③ Iwamoto M, Shimizu H, Oiki S
“Flux coupling between ion and water in the K⁺ selective pore”
第85回日本生理学会大会, 2008.3.25, 東京
- ④ Iwamoto M, Shimizu H, Oiki S
“Water-ion coupling ratios for ion permeation through KcsA channel”
Biophysical Society 52nd Annual Meeting, 2008.2, Long Beach, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩本 真幸 (IWAMOTO MASAYUKI)

福井大学・医学部・助教

研究者番号: 40452122