

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659114

研究課題名(和文)細胞内小器官イオン膜輸送の新しい機能解析法

研究課題名(英文)A new functional analysis of intracellular ion-transporting proteins

研究代表者

金子 周司(Kaneko, Shuji)

京都大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60177516

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：パッチクランプ法をはじめとするconventionalな電気生理学的手法は、主としてイオンチャネルの機能や生理的役割の理解に大きく貢献してきた。しかしトランスポーターや細胞内小器官への応用に関しては依然多くの困難を抱えている。それに対して近年、固体支持膜SSMに基づいた新しい測定技術が開発されてきた。細胞や組織から精製した膜標本を用いるcell-freeなこの技術は、トランスポーターの電気生理学的評価を可能とするとともに、細胞内小器官への広い応用の可能性を秘めている。本研究では、SSM技術の細胞内小器官への応用を拡大すべく、精製シナプス小胞およびリソソーム膜からの電流応答の記録に取り組んだ。

研究成果の概要(英文)：A novel electrophysiological assay technique based on solid supported membranes (SSM) has been shown to be useful for analysis of channels and transporters. We tried to apply this technique to synaptic vesicles (SVs) and lysosomal membranes (LMs), purified from rat brains and mouse livers, respectively. Application of ATP to the sensors with SVs triggered current responses dependent on Mg<sup>2+</sup> and sensitive to bafilomycin A1 (Baf), which are thought to be V-ATPase specific currents. On the other hand, though LMs are also embedded with V-ATPases, the sensors evoked current responses with different characteristics. They were independent of Mg<sup>2+</sup>, only partially sensitive to Baf and even triggered by application of ADP. These features suggest that the currents are not attributed to V-ATPases but any other lysosomal protein. The present study shows the utility and potential of SSM-based electrophysiology especially for analyzing native organellar membrane proteins.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：イオン輸送 トランスポーター 細胞内小器官 シナプス小胞

1. 研究開始当初の背景

貴金属である金 (Gold) は、機能性デバイス素材としても広く注目されている。特に、Gold 基盤上に形成されるアルカンチオール自己組織化単分子層 (self-assembled monolayer, SAM) は、センシング素子への応用を目指して盛んに研究されている。近年、SAM 上に生体膜脂質をコートし、その上へ生化学的に調製した細胞膜断片を付着させた SSM を用いて、細胞膜輸送、特に起電性のトランスポータ電流応答をリアルタイムで記録する方法が発表され (J. Biomol. Screen. 11: 262, 2006)、ドイツのベンチャー企業が研究用機器 Surfe2r システムとして販売を開始した。この手法は、細胞膜と脂質コート間の高い親和性によって電気抵抗が正常な細胞膜と同等にまで高められるため、それらに囲まれた微小空間があたかも細胞のように独立し、密着した Gold 電極からは細胞膜上のトランスポータを透過するイオン電流を「細胞外記録」することが可能になる (図 1)。この手法は、従来、膜輸送研究に多大な貢献をしてきたパッチクランプや Xenopus 卵母細胞といった電気生理学的測定を、現代の新素材との融合によって新しい形で実現する画期的な手法であり、国内で応用した報告はまだない。

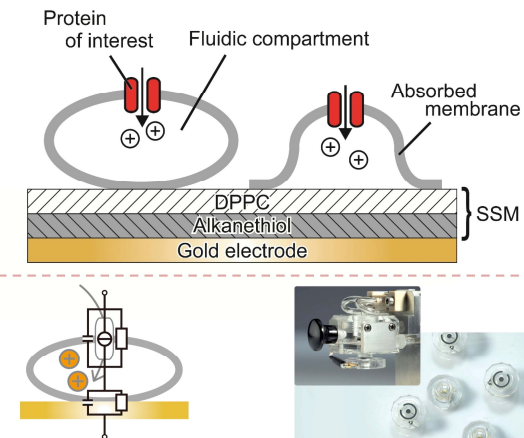


図 1 SSM によるトランスポータ電流記録

2. 研究の目的

本研究では、シナプス小胞の神経伝達物質取り込みに伴うイオン輸送、ミトコンドリアの ATP 消費に伴うプロトン輸送、リソソーム膜に貯蔵された各種イオンチャネルの輸送活性を手がかりとして、これらのリアルタイム記録を従来法と比較しつつ評価する。この手法を発明した Dr. Klaus Fendler、およびシナプス小胞研究を先駆けられたミシガン大学 Dr. Tetsufumi Ueda を研究協力者に据えて緊密な連携を取りつつ、この手法の利点、限界を明らかにし、生体膜研究や創薬に最大に活用できる解析理論と応用例を開拓する。従来法によって秒～分単位のマクロな時間軸で解析されてきた輸送を高速度に解析することにより輸送サイクルの詳細が明

らかとなり、昨今明らかにされつつある構造生物学的知見とともに、リガンド結合やタンパク質間相互作用による輸送制御メカニズムが明らかになる。

3. 研究の方法

SSM の構成については、平らな金電極の表面にアルカンチオール溶液を処置することで、金とチオールの結合により単層の被膜が形成された。その上にリン脂質溶液を処置することで、アルキル基同士の相互作用により複合二重膜が形成された (この構造を SSM と呼ぶ)。さらに、SSM 上に膜断片や小胞を吸着させ、その結果、膜の間に液体区画が形成された。外側の灌流液を素早く切り替えることで形成される膜の内外での電気化学的勾配が輸送タンパクの駆動力となり、生じる電荷移動を一過性の電流応答として検出できた。この電極をシールドされたチャンバーに取り付けて実験を行った。

4. 研究成果

まずシナプス小胞からの電流記録を試みた。小胞外に ATP が存在すると、液胞型 ATP アーゼ: V-ATPase の働きにより小胞内にプロトンが輸送され、内向き電流が生ずると考えられる。

ラット全脳から精製したシナプス小胞を SSM に吸着させ、リン酸緩衝液中で測定を行ったところ、灌流液を ATP を含むものに急速に交換すると、内向き電流を表す正の電流応答が観察され、その大きさは ATP 濃度依存性であった。この応答は、輸送活性に不可欠な Mg<sup>2+</sup> をかん流液から除去すると、応答は 80% 以上抑制された。また、V-ATPase 特異的阻害薬として知られる bafilomycin A1 を加えると、やはり 80% 以上の抑制が見られた。以上より、この測定条件でみられる電流応答は V-ATPase によるプロトン輸送を表していることが示された (図 2)。

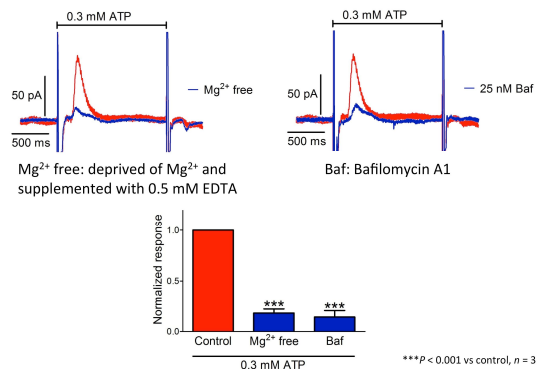


図 2 シナプス小胞 V-ATPase 応答

続いて、同様の測定条件下で、リソソーム膜に取り組んだ。シナプス小胞と同様、リソソームにも V-ATPase が発現しているため、同様の電流応答がみられると予想した。マウス肝臓から精製したリソソーム膜を SSM に吸

着させて ATP を適用したところ、小さいながらも正の電流応答が見られた。しかし、この応答は  $Mg^{2+}$  除去により抑制されず、また bafilomycin A1 による抑制は一部見られたものの、部分的なものに留まった (図 3)。

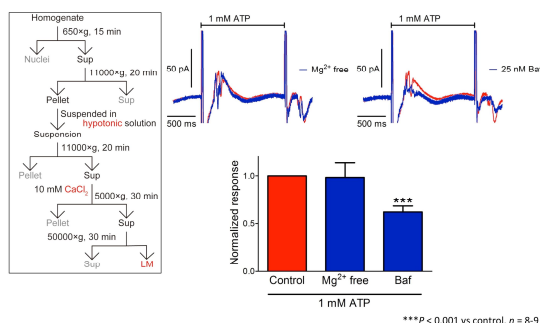


図 3 リソソーム膜 ATP 誘発電流

さらに ATP 濃度を上げて測定を行うと、電流応答の大きさは濃度依存的であった。ATP の代わりに ADP を用いたところ、濃度依存性、反応の大きさとも ATP と類似の結果となった。つまり、ATP 加水分解で得られるエネルギーを用いた輸送ではないことが示唆された。ここまでの結果から、今回リソソーム膜でみられている電流応答は V-ATPase 由来のものではなく、ヌクレオチドがその輸送に関与する何らかの異なる輸送タンパクによるものだと示唆される。その候補の一つとして、2008 年にクローニングされた小胞型ヌクレオチドトランスポーター VNUT が考えられた。しかし非特異的なアニオン輸送阻害薬である DIDS により阻害されなかったことから、VNUT の関与は裏付けられなかった (図 4)。

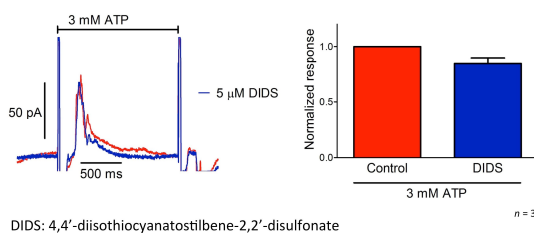


図 4 リソソーム ATP 電流への DIDS の効果

マウス心臓ミトコンドリア標本を用いて、ミトコンドリア  $Na^+/Ca^{2+}$  交換輸送体 (mtNCX) 電流の測定を SSM にて行った。 $Ca^{2+}$  を負荷した標本で灌流液を  $Na^+$  に高速置換する方法により、ON 時に正方向、OFF 時に逆方向の電流応答が観察された。しかしながら、観測された電流応答は予想されたのとは逆向きの電流応答であり、かつ mtNCX 阻害剤に対して感受性をもたなかった。したがって、ミトコンドリア膜に存在する mtNCX に由来する電流応答そのものではなく、何らかの副次的な応答を検出していると結論された (図 5, 6)。

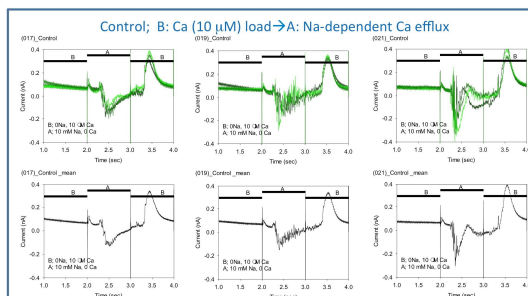


図 5 心臓ミトコンドリア NCX 関連応答

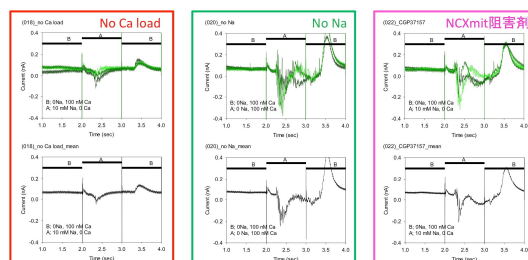


図 6 mtNCX 関連応答の薬理的感受性

このほか、他機関との共同研究により BASS2 や hCtr1 など各種の新しいトランスポータを発見する細胞を用いて記録に挑戦したが、残念ながら意味のある電流応答は検出されなかった。タンパク質としては十分量が発現していることは生化学的あるいは標識体の輸送活性で確認しており、電気的な応答が検出されない理由は今のところ不明である。

## 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 1 件)

Yu Sakamoto, Application of a novel electrophysiological assay technique to native lysosomal membranes, 京都大学薬学部卒業研究論文集、11 巻 1-6 頁、2013

〔学会発表〕(計 1 件)

金子周司、トランスポータ活性を電氣的に測定する自動化システム、第 34 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2012 年 11 月、京都。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/channel>

/ja/

6 . 研究組織

(1)研究代表者

金子 周司 (KANEKO, Shuji)  
京都大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号：6 0 1 7 7 5 1 6

(2)研究分担者

中川 貴之 (NAKAGAWA, Takayuki)  
京都大学・大学院薬学研究科・准教授  
研究者番号：3 0 3 0 3 8 4 5

(3)連携研究者

白川 久志 (SHIRAKAWA, Hisashi)  
京都大学・大学院薬学研究科・助教  
研究者番号：5 0 4 0 2 7 9 8