

研究成果概要

1. 研究課題

和文
イオンチャネル標的薬支援のための高効率・高精度なチャネル活性測定系の確立
英文
A highly efficient and accurate ion channel activity measurement methods for drug discovery

2. 申請者名(代表研究者)

氏名	ローマ字表記
平野 美奈子	Minako Hirano
所属大学・機関名	英訳表記
岡山大学	Okayama University
研究科専攻名・部課名等	英訳表記
学術研究院ヘルスシステム統合科学学域	Graduate School of Interdisciplinary Science and Engineering in Health System
役職名	英訳表記
准教授	Associate Professor

[研究目的]

本研究では、人工膜を用いた高効率・高精度なイオンチャネル標的治療薬・農薬のスクリーニング・評価系を確立することを目的とした。イオンチャネルは様々な疾患に関与している膜蛋白質であり、創薬の標的分子として注目されているほか、殺虫剤の作用分子としても重要視されている。しかしながら、その活性を簡便に精度よく高効率に測定する方法がない。我々はこれまでに、イオンチャネルの活性を測定する方法の一つである人工膜法を改良し、測定効率を高めた系を開発してきた。人工膜法は、人工的に作製した脂質二重層膜（人工膜）にイオンチャネル蛋白質を組み込み、人工膜中のイオンチャネルの働きを電氣的に測定する方法である。電氣的な計測のため得られる活性の情報の精度は高い上、細胞を扱わない単純な系であるため測定結果のばらつきが少ない。本研究では、以前改良した方法を発展させ、イオンチャネルの構造を保持して活性を保ったまま人工膜に組み込む方法を確立するとともに、微細加工の技術を取り入れることで、さらに測定効率を高めることを目的とした。

[成果]

- ・リポソームの膜融合によるイオンチャネルの人工膜への組み込み

イオンチャネルを膜ベシクルであるリポソームに再構成し、膜融合により人工膜へ能動的にイオンチャネルを組み込むことで、チャネル活性の測定効率を高めることに成功した。

我々が以前開発した方法では、予め脂質膜から単離したイオンチャネルを用いるため、迅速に測定を行わないとチャネルが失活してしまい、効率的に活性が測定できないという問題点があった。今回、リポソームに組み込んだチャネルを用いる3つの方法を検討した。具体的には、a)カリウムチャネルとビオチン化脂質を含むリポソームをビオチン-アビジン結合を介して担体に固定した方法、b)ヒスチジンタグ (His-tag) を持つカリウムチャネルを含むリポソームを AB-NTA を介して担体に固定した方法、c)His-tag を持つカリウムチャネルを担体に固定後、リポソームを作製させた方法である (図 1A)。その結果、リポソームに単純な構造のカリウムチャネル (KcsA チャネル) を組み込んだ場合には、どの方法でもリポソームを固定した担体を脂質層中で測定溶液に接触させると、数十秒以内にチャネル電流 (活性) が見られた (図 1B、C)。単離した状態の KcsA チャネルを用いた場合にはチャネル電流が見られるまでに数百秒かかっていたことから、今回開発した方法により効率を高めることに成功した。さらに c)の方法では、これまで膜から単離した状態では活性がほとんど捉えることができなかったヒト由来の7回膜貫通のカリウムチャネル (BK チャネル) の活性を 50%以上の測定で捉えることができた。

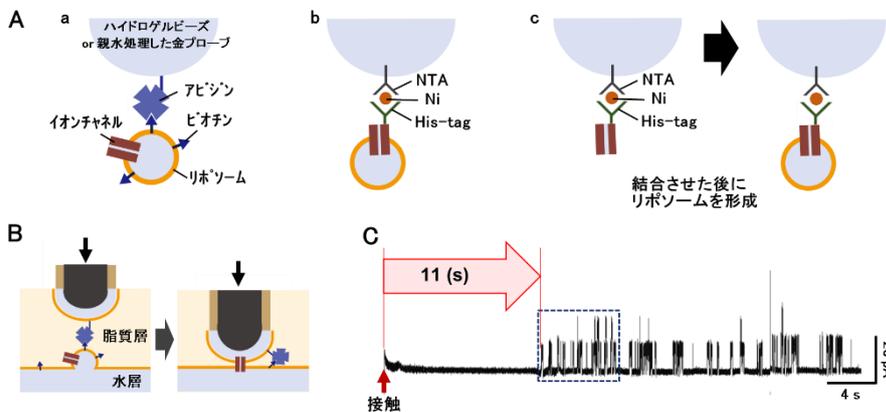


図 1 リポソームに組み込んだチャネルを用いたチャネル活性測定
A. チャネル入りリポソームを担体に固定する3つの方法 (a-c)。B. 測定の手順。C. 観察されたカリウムチャネルのチャネル電流。

3.研究目的、成果、今後の見通し 2/2

・微小流路のチャンネル活性測定系への組み込み

開発した方法を微細流路と融合させ、多チャンネル化し、測定効率を高めた。

2 mm 角のアクリルの流路に、流路に直交するように先端径約 50 μm のガラス管を 2 本接着して十字型のマイクロ流路を作製し、各流路に電極を設置した。カリウムチャンネル (KcsA チャンネル) または KcsA チャンネルを含むリポソームを化学修飾により結合させたハイドロゲルビーズを流路に流し込み、直交する一方の流路から吸引してビーズを十字部分に固定した。次に、流路に脂質溶液を流した後、ゲルビーズを吸引固定した側と対極する側から測定溶液を注入し、溶液をビーズに接触させた (図 2A、B)。接触後数十秒以内にチャンネル電流が観察され、その電流は弱い内向きの整流性を持ち、コンダクタンスは約 100 pS であった (図 2C)。これは報告されている KcsA チャンネルの特性とほぼ同じであったことから、作製した十字型流路で既存の方法と同様にイオンチャンネルの活性を測定できることがわかった。

また、2 つの十字部分がある十字型流路を作製し、人工膜が形成されると組み込まれる小孔形成ペプチド存在下で、同時に 2 つのビーズ (チャンネルなし) をトラップし測定溶液を接触させると、ペプチド由来のチャンネル電流がそれぞれ確認された。このことから、2 つのビーズ上にそれぞれ人工膜を同時に形成することが可能になった。今後イオンチャンネルを固定したビーズを用いることで、複数チャンネルの活性の同時計測が可能になると考えられる。

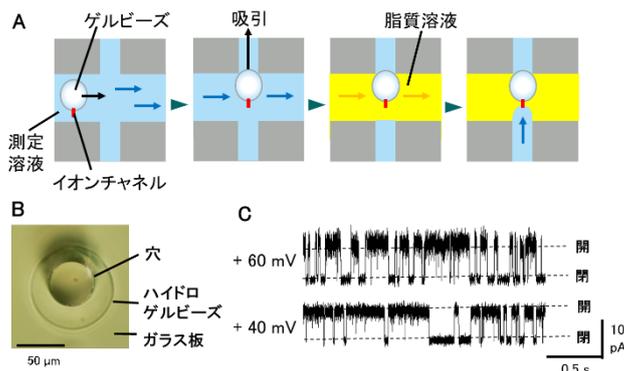


図 2 十字型流路を用いたチャンネル活性測定法

A. 方法の概要。十字型の微小流路にイオンチャンネルを固定したゲルビーズを流し込んで吸引固定し、流路を脂質溶液に置換後、測定溶液を接触させ、チャンネルが組み込まれた人工膜を作製した。B. 十字部分の流路に固定されたゲルビーズの像。C. 測定されたカリウムチャンネルのチャンネル電流。

今後の見通し

本研究で得られた結果をもとに、ヒト由来の創薬標的のイオンチャンネルの多チャンネル活性測定装置を開発する。そのために、下記の 3 点を計画している。

1. 今回の結果により、ヒト由来の創薬標的のイオンチャンネル (BK チャンネル) をリポソームに組み込んだ状態で担体に固定し、脂質層中で測定溶液に接触させると、50%の割合でチャンネル電流を捉えることができた。今後は、リポソームのチャンネルタンパク質と脂質の比率や脂質組成を検討し、測定効率をさらに高める。
2. 今回作製したマイクロ流路をさらに多チャンネル化する。8 チャンネル以上の測定ができるように、十字型部分を複数持つ流路を作製する。
3. 作製する流路に、最適化したリポソーム組み込みイオンチャンネルを固定したゲルビーズを適用し、流路の実証実験を行う。薬剤存在下でのチャンネル電流を測定し、既存の方法と比較した薬効の測定効率と測定の精度を評価する。