2P225

新規人工膜法の開発: バイオセンサーの開発に向けて

○井出 徹 (科学技術振興機構)

前年度に引き続き、新しい人工膜法の開発を行った。本研究は、人工膜法、即ち人工脂質二重層膜に組み込んだ単一チャネル電流の測定を利用して、高感度のセンサーを作成することを目的としている。人工平面膜は非常に脆弱で、僅かな機械的、あるいは電気的刺激で破壊されてしまう。このことが、人工膜法の効率を著しく下げ、実験室外での応用の道を閉ざしている。そのため、膜の強度(寿命)を高めるために多くの試みがなされてきたが、高い膜抵抗を保持しつつ(つまり単一チャネル測定を可能にした状態で)人工膜の機械的強度を十分に上げることは困難であった。我々は視点を変えて、簡便にかつ迅速に人工脂質二重相膜を形成する方法を開発することにより、測定の効率を上げることを試みた。我々の開発した測定系を用いれば、人工膜形成には数秒間を要するのみであり、しかも、1 μ l程度の測定溶液で十分に単一チャネル電流測定が可能である。これにより、単一チャネル電流計測の自動化への道も開けると期待される。また、1分子観察用蛍光顕微鏡と組み合わせれば、電気・光学的1分子センサーの構築が可能である。平滑筋BKチャネルの電気光学的同時計測に関しても報告する予定である。

T. Ide : A novel method for forming bilayer membranes: An approach to development of biosensors

2P227

筋小胞体ベシクルの有機イオンの透過性

○葛西 道生、小林 進哉、藤井 理絵、塚越 寛之、兼川 裕 (龍谷大・理工・物質化学)

リアノジン受容体カルシウムチャネルの酸化還元状態が筋小胞体からのカルシウム遊離の制御において重要な役割を演じていると考えられている(1)。この酸化還元状態はグルタチオンによって制御されていると言われていた(1)。最近、筋小胞体ベシクルを使って、光散乱法による測定によって、還元状態のグルタチオン(GSH)と酸化状態のグルタチオン(GSSG)がリアノジン受容体カルシウムチャネルを透過するという報告がなされた(2)。その報告では光散乱強度変化の測定には蛍光分光器が用いられていた。この結果は大変興味深いので、われわれはより正確なデータを得るために、ウサギ骨格筋から単離した筋小胞体ベシクルを用いて、ストップフロー分光光度計を用いて追試した。その結果、choline, lysine, arginineなどの有機カチオンやglucose, glycineのような中性分子の透過は、カルシウム濃度依存性やcaffeineとATPによって活性化されること、ruthenium redやマグネシウムによって抑制されること、さらにDIDSによる活性化、ランタンによる抑制、などからリアノジン受容体を透過していると考えられることが確認された。しかし、GSHは上記のリアノジン受容体の透過に影響を及ぼす試薬によっては影響されなかった。GSHの透過はglutamic acidやaspartic acidの透過と同じように筋小胞体のアニオンチャネルに影響を及ぼすDIDSやSITSによって抑制された(3)。これらの結果は、GSHやGSSGはリアノジン受容体を通るのではなく、アニオンチャネルを通っていると考えられる。(1) T. Oba, T. Murayama, and Y. Ogawa. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 282, C684 (2002) (2) M. Csala et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 287, 696 (2001) (3) M. Kasai and T. Taguchi. Biochim. Biophys. Acta 643, 213 (1981)

M.Kasai, S.Kobayashi, R.Fujii, H.Tsukagoshi and Y.Kanekawa : Permeation of organic ions through sarcoplasmic reticulum vesicles

2P226

機械受容チャネル・ゲーティング機構の1分子解析法の開発

○町山 裕亮¹、辰巳 仁史^{1,2}、曾我部 正博^{1,3,4} (¹名大院・医・細胞情報医学、²CREST・JST、³生理研、⁴ICORP・「細胞力覚」・JST)

細菌の機械受容チャネルMscLは細胞膜の張力に直接応答して開口する。MscLは膜2回貫通型サブユニットのホモ5量体で構成され、結核菌のMscLでは閉状態の立体構造も決定されている。しかし、開状態の構造が不明であるためにゲーティングにおける構造変化やメカニズムの詳細は不明である。Perozoら(2002, *Nature*, 418, 942)はEPRを用いた実験に基づいて、開状態に移移する際に膜貫通部位が周囲の細胞膜を押し広げながら膜に対する角度を傾斜させることで、チャネル口径を拡大するという分子モデルを報告した。しかし、EPR信号は多数の分子からの集合平均値であり、ゲーティングにおける詳細な構造変化を推定するには限界がある。構造の揺らぎを含む詳細な動的解析には、MscLの特定の部位にマーカーをつけ、そのマーカーの変化を1分子レベルでリアルタイム測定することが必要である。我々はFlAsH(Fluorescein Arsenical Hairpin binder)をマーカーに選択した。FlAsHはCCPGCCのアミノ酸配列(テトラシステインモチーフ)を特異的に認識し、結合時のみ蛍光を発する分子マーカーである。本研究では、大腸菌MscLのC末端側にテトラシステインモチーフを導入してIPTGで発現を誘導した。大腸菌を溶菌した後、FlAsHでラベルし、そのホモジネートを電気泳動すると、MscLに対応するバンドが特異的に蛍光ラベルされていた。また、このホモジネートをスライドガラスに塗布してエバネセント照明で蛍光観察すると、個々の蛍光スポットが観察され、そのスポットは一段階消光を示した。これらの結果は、FlAsHがMscLのテトラシステインモチーフに特異的に結合し、その蛍光強度が1分子イメージングするのに十分であることを示している。今後はチャネル分子のゲーティングに伴う挙動をFlAsHの蛍光特性を利用して解析していく予定である。

H.Machiyama, H.Tatsumi and M.Sokabe : Development of a novel method for analyzing gating mechanism of a single mechanosensitive channel

2P228

大腸菌機械刺激受容チャネルMscSのメカノセンサー部位の同定

○野村 健¹、吉村 建二郎^{1,2}、曾我部 正博^{1,3,4} (¹科技振・国際共同・細胞力覚、²筑波大院・生命環境・構造生物、³名大院・医・細胞生物物理、⁴生理研・細胞内代謝)

機械受容チャネルMscSは、細胞膜の張力を直接感知して開口することが分かっている。ごく最近、X線結晶構造解析によりMscSの開状態の3次元構造が明らかになった。MscSは3回膜貫通型のサブユニットのホモ7量体から形成されている。しかしながら、どの部位が膜の張力を感知してチャネルが開くかは不明である。バクテリアのもう一つの機械受容チャネルであるMscLでは、膜貫通部位の脂質に面している疎水的なアミノ酸のうちの特定の残基を親水的なアミノ酸に置換すると、機械刺激に対する感受性が失われることが分かっている。そこで本研究では、脂質と相互作用していると推定される膜貫通部位の全てのアミノ残基を逐一親水的なアミノ酸(アスパラギン)に置換した変異体を作成し、パッチクランプ法と低浸透圧ショックに対する生存率を測定することによりMscSの機能を検定した。その結果、1回目の膜貫通部位と2回目の膜貫通部位の両末端にある疎水的な残基をアスパラギンに置換すると機械刺激に対する感受性が下がることが分かった。これらの残基はそれぞれ脂質2重膜の外葉と内葉のグリセロール部位に位置しており、この2箇所では細胞膜の張力を感知していると考えられる。さらに、1ヶ所の変異では完全には機械受容能が失われず、機械受容能を悪くする変異は加算的に効果があることが判明した。

T. Nomura, K. Yoshimura and M. Sokabe : Identification of tension sensor of MscS, a mechanosensitive channel of E. coli