

ヒト由来カリウムチャネルの水滴内合成の試み

研究代表者： 松木悠佳（医学系部門・助教）

共同研究者： 岩本真幸（医学系部門・教授）

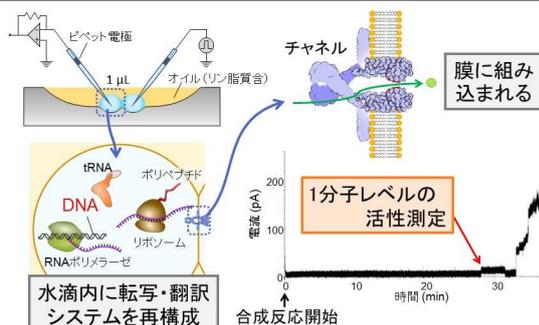
概 要	
無細胞タンパク質合成システムと CBB 法を用いて、麻酔薬と相互作用する TRAAK チャネルの合成を水滴内で行い、脂質二重膜に自発的にチャネルを挿入させ、1 分子レベルの活性測定を試みることを目指した。これまでにヒト由来 TRAAK チャネルを無細胞系で合成した報告はない。そのため、KcsA で実績のある方法も含め、いくつかの合成システムの中から TRAAK 合成に適するものを探した。合成条件を検討するため、まずは試験管内でタンパク質合成を試みた。また、様々な反応液 (PUREflex [®] 1.0, PUREflex [®] 2.0, TnT [®] T7) や合成されたチャネルを安定に保つためにリポソームの成分であるリン脂質 (アプレクチンと POPC, POPE 混合脂質) の検討も行った。活性を持った TRAAK チャネルの合成を 1 分子電流測定で確認できた。今後は、水滴内での合成を試みる。さらに、この系を用いて、実際に麻酔薬などの薬物を TRAAK チャネルに作用させ、分子レベルでの相互作用を検討したい。	
関連キーワード	TRAAK、CBB 法、無細胞タンパク質合成システム、1 分子

研究の背景および目的

生体膜は、様々な種類のイオンチャネルを含むリン脂質や膜蛋白質で構成されている。イオンチャネルの機能は、膜のリン脂質組成や膜張力などの物理的特性で変化することが報告されている。生体膜ではこのような膜環境が時々刻々と変化しており、チャネル分子自体の特性を調べるのが難しいため、構成要素を絞った再構成系での実験が必須である。当研究室で開発した液滴接触二重膜法 (Contact Babbler Bilayer 法; CBB 法) では、油中水滴表面の脂質単分子膜同士を接触させて脂質二重膜を作り、水滴中に分散させたチャネルをそこに組み込むことができる。また、当研究室では油中水滴内に無細胞タンパク質合成システムを構築し、合成した KcsA チャネルをそのまま膜に組み込み 1 分子チャネル電流測定に成功している (Iwamoto et al. ACS Synth Biol 2018, 右図)。

従来、チャネルの発現から精製、活性測定まで約 1 週間を要していたが、これが 30 分程度にまで短縮される画期的な方法である。

一方、TRAAK チャネルを含む 2 ポアドメインカリウムチャネルは、静止膜電位の形成に重要であり、揮発性麻酔薬の作用部位を有しているという報告



もある。麻酔薬とカリウムチャネルの相互作用に対する定量的な情報は少ないため、分子レベルでの実験が必要とされる。しかし TRAAK チャネルを遺伝子工学的に合成するには酵母を用いる必要があるが、方法が煩雑であり時間も要する。また TRAAK チャネルの電気生理学的実験は、ホールセル (全細胞) 法での報告はあるが、再構成系での実験報告はほとんどない。

本研究では、無細胞タンパク質合成システムを用いて、ヒト由来 TRAAK チャネルの合成を水滴内で行い、脂質二重膜に自発的にチャネルを挿入させ、1 分子レベルの活性測定を試みる。

研究の内容および成果

試験管内 TRAAK チャネルタンパク質合成の試み

ヒト由来 TRAAK チャネルは、無細胞系で合成を試みた報告はない。そのため、KcsA で実績のある方法も含め、いくつかの合成システムの中から TRAAK 合成に適するものを探すことにした。合成条

件を検討するため、まずは試験管内でタンパク質合成を試みた。試した無細胞タンパク質合成キットは、PUREflex[®] 1.0, PUREflex[®] 2.0, TnT[®] T7 Insect cell extract protein expression system の 3 つである。これらのキットを使用した理由は

以下の通りである。PUREflex[®]1.0 は KcsA チャネルの合成に成功した実績がある。PUREflex[®]2.0 は PUREflex[®]1.0 より反応液当たりの合成量を高めたものであり、TnT[®]T7 は昆虫細胞由来の抽出液を用いており、DNA の転写・翻訳に必要な最低限の原料しか含まない PUREflex に比べ他の成分も含まれており、発現や精製が難しいタンパク質合成向けであるため使用した。また、チャネルの試験管内合成では、合成されたチャネルを安定に保つためにリポソームを添加する必要がある。そのため反応液と一緒に加えるリン脂質も検討する必要があり、アズレクチンと POPC, POPE 混合脂質を試した。チャネルの合成を電気泳動で確認し、チャネル活性を確認するために CBB 法で電流測定を行った(図 1)。チャンパーに油相としてヘキサデカンを満たし、先端径約 50 μ m の 2 本のガラスピペット電極先端にリポソーム膜に合成したチャネルを含む電解質溶液を満たし、油相内で先端から溶液を押し出し、ピペット先端に油中水滴 (バブル) を形成した。リポソームのリン脂質が油水界面に分配し、単分子層が形成されるため、2 つのバブルを接触させると脂質二重層が形成されその中に TRAAK チャネルが挿入される仕組みである。PUREflex[®]2.0 のキットは、チャネル測定ができなかった。

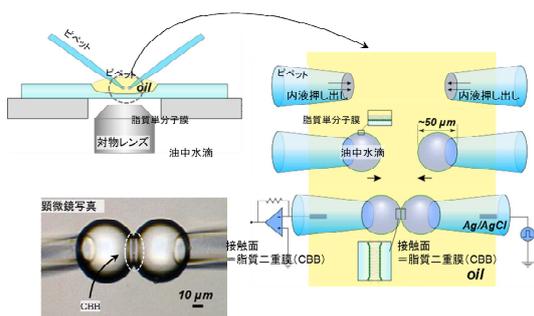


図 1. CBB 法

合成量が多すぎてリポソームに組み込まれる前に凝集した可能性があった。PUREflex[®]1.0 と TnT[®]T7 はチャネル測定が可能であった。また、リン脂質は、アズレクチンに比べ POPC, POPE 混合脂質の方がチャネルが開口しやすい傾向であった。界面活性剤 (DDM:Dodecyl maltoside) をあらかじめ反応液に加えおくと、チャネルが膜に挿入しやすかった。これは、界面活性剤がリン脂質の凝集を防いだと考えられた。

TRAAK チャネル電流測定

PUREflex[®]1.0 で合成したチャネルを 100mV の電位を与え、電流を測定した (図 2)。1 分子の電流を記録することに成功できた。無細胞系システムで合成したヒト由来 TRAAK チャネルでは初の試みである。

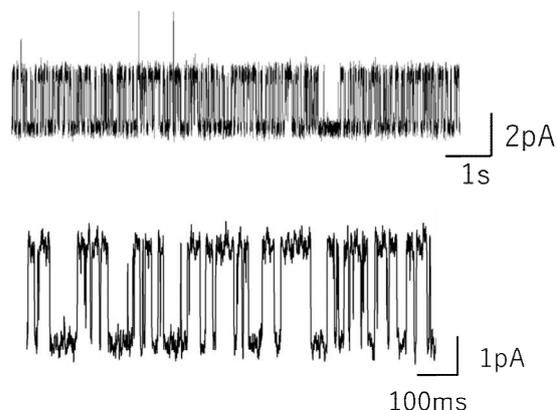


図 2. TRAAK チャネル一分子電流記録 (100mV)

今後は、水滴内で合成を試みる。また、この系を用いて、実際に麻酔薬などの薬物を TRAAK チャネルに作用させ、分子レベルでの相互作用を検討したい。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

Y Matsuki, M Iwamoto, M Yamatake, S Oiki. Dipole Potential Evaluated by Hydrophobic Ions using the Contact Bubble Bilayer Method. The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (FAOPS) & the 96th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. Kobe 2019. 3

Y Matsuki, M Iwamoto, M Yamatake, S Oiki. The dipole potential probed by hydrophobic ions using the contact bubble bilayer method 第 57 回日本生物物理学会学術集会・宮崎 2019. 9

「特記事項」
なし

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」
文部科学省科学研究費 基盤研究 (C) (2018-2020 年度)・CBB 法を用いたイオンチャネルに対する麻酔薬の作用機序の解明 代表 (松木) 採択額: 4,420 千円 採択

研究推進支援 (学術研究育成支援) (2020 年度)・アラキドン酸による TREK チャネル活性化機序の解明 代表 (松木) 採択額: 700 千円 採択

「ライフサイクル医学」推進学部長裁量経費 (2020 年度)・疎水性イオンの過渡的電流による膜双極子電位計測・代表 (松木) 採択額: 350 千円 採択