

電位依存性イオンチャネルの動作機構解明を目指した 人工細胞膜内電界の蛍光イメージング系の構築

Construction of an Imaging Platform for Electric Fields in Artificial Cell Membranes for the Functional Analysis of Voltage-Gated Ion Channels

東北大院医工¹, 東北大通研², 東北大院工³, 東北大 AIMR⁴

○(M1)陰山 弘典^{1,2}, (M1)安藤 大貴^{2,3}, (M2)渡辺 恭也^{1,2}, 小宮 麻希², 馬 騰⁴, 平野 愛弓^{1,2,3,4}

Tohoku Univ., [○]Hironori Kageyama, Daiki Ando, Takaya Watanabe, Maki Komiya, Teng Ma,

Ayumi Hirano-Iwata

E-mail: hironori.kageyama.p1@dc.tohoku.ac.jp

1. 緒言

細胞膜中に存在する膜タンパク質は生命活動の根幹を担う主要な物質の一つである。我々は生体内の細胞膜を模した人工細胞膜を安定形成する技術を開発し、様々な膜タンパク質の反応機構評価系として提案してきた。その代表例としては、心筋のイオンチャネルに対する副作用検出デバイスが挙げられる。また、最近では、従来の膜貫通方向の電圧に加えて、膜に平行な方向に電圧を印加できる膜系を構築し、電位依存性 Na⁺チャネル (Nav1.5) の活性が膜平行電圧によって変調されることを見出した^[1]。このように、イオンチャネルの様々な挙動を報告してきたが、従来の電気生理学的手法のみではその機構解明は困難であった。そこで本研究では、電位依存性イオンチャネルの動作機構解明のための新たなプラットフォームとして、従来の電気生理学的測定と膜電位蛍光イメージング法を組み合わせた独自の実験系を構築したので、ここに報告する。

2. 方法

テフロンフィルム（厚さ 12.5 μm）中に微細孔（φ: 80-150 μm）を形成し、これを支持体として人工細胞膜を単分子膜貼り合わせ法によって形成した。この膜系に対して、励起光照射用 LED と蛍光画像取得用カメラを組み合わせた実験系を構築した（Fig. 1）。この人工細胞膜の片側の水層から膜電位感受性色素である di-4-ANEPPS を導入し、蛍光強度を測定した。

3. 結果

膜電位感受性色素 di-4-ANEPPS は膜中への分配が遅く、染色ムラが見られた。そこで染色ムラや退色によるアーチファクトを低減するために、2 波長の励起光（435 nm, 500 nm）を交互に照射して蛍光強度比（ $R_{ex} = F_{435} / F_{500}$ ）で評価する、二波長比イメージング法^[2]を導入した。さらに、励起光照射と蛍光画像の取得、膜貫通電位の制御を全て自動化し、定量性の向上を図った。この膜系に膜貫通電位を印加すると、膜部分の蛍光強度比は一樣で、膜貫通電位に対して直線的に変化した。一方、膜周りに円環状に存在するヘキサデカン部分の蛍光強度比は膜貫通電位依存性を示さなかった。以上より、膜部分の蛍光強度比によって膜貫通電界を評価できることが示された。今後は実際に様々な膜タンパク質を包埋し、生体内シグナル伝達のメカニズム解明に役立てたいと考えている。

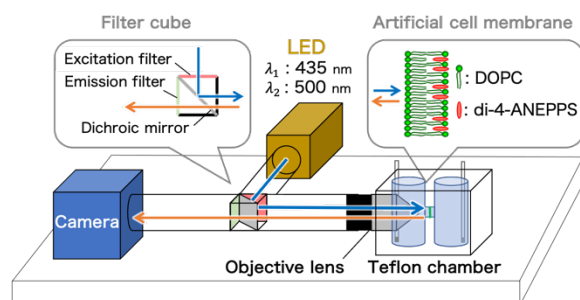


Fig.1: Schematic diagram of the constructed imaging platform for artificial cell membranes

[1] T. Ma, et al., *Faraday Discuss.*, in press.

[2] V.Montana, et al., *Biochem.*, **28**, 4536-4539 (1989).