

LECTURES

生理学実験講座「1分子生理学」 「単一チャネルの電気・光学的同時計測」

科学技術振興事業団・戦略創造

井出 徹, 青木 高明, 竹内 裕子

要 旨

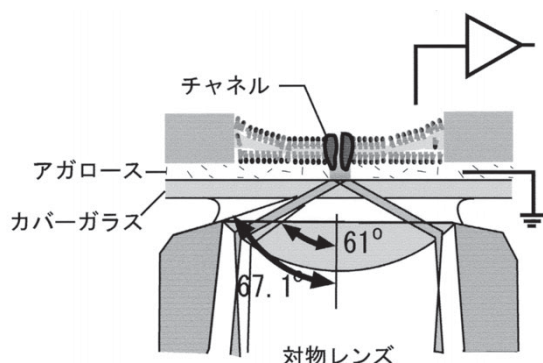
光学的1分子計測法が開発された当初より, この技術と単一チャネル電流記録法とを組み合わせた「電気・光学的単一チャネル記録法」の開発が望まれてきた。我々は, 人工脂質平面膜法と1分子蛍光観察用の蛍光顕微鏡を組み合わせることにより, 人工膜に組み込まれたチャネル蛋白1分子からの蛍光信号と単一チャネル電流を同時に記録可能な実験系を開発した。この実験系では, 人工膜の形成法が従来型の平面膜法とは大きく異なる。本稿では, 装置の構成法も含めた人工膜の形成法を中心に, 同時計測実験の方法を解説する。また, この装置を用いた脂質分子1分子の熱運動観察, Ca依存性Kチャネルの1分子同時計測の結果についても紹介する。

1. はじめに

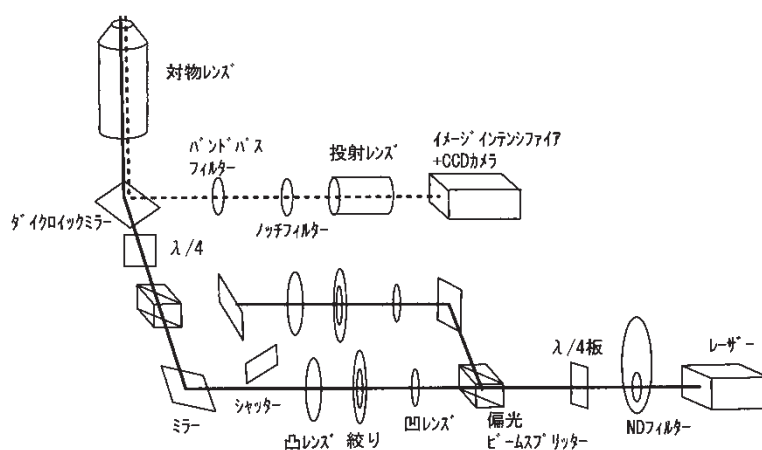
近年の光学顕微鏡法の著しい進歩によって, 蛍光分子1分子を観察することが可能になり, これらの方法を用いて, 種々の蛋白質, あるいは核酸分子1分子の直接観察が行われている [1]。これらの方法は, 生きた細胞中の情報伝達分子系の解析等にも利用され始めており, 「1分子生理学」と呼べる分野が形成されつつある。

周知のように, 「1分子計測」と呼び得るものが初めて行われたのは, チャネル蛋白の研究においてであり, それは, 光学的1分子計測法の開発に20年近くも先行する。即ち, 1976年に, Neherらによって, パッチクランプ法が開発され, チャネル蛋白1分子を透過するイオン電流が計測されることにより, 初めて1個の蛋白質分子の活動が実時間計測されたのである。勿論, パッチクランプ等の単一チャネル電流記録法は, チャネル蛋白の構造変化を直視するものではなく, 構造変化を膨大な数のイオンの流れに「増幅」し検出するものであるが, 蛋白分子「1分子」の挙動を実時間で捉えたという点においては, まさに, 1分子計測法の先駆けである。

パッチクランプ法や脂質平面膜法による単一チャネル電流記録法は, 今や一般的な方法となり, 市販の装置を組み合わせることにより, 比較的容易にチャネル蛋白1分子の挙動を観察することが可能である。これら単一チャネル電流記録法と, 前述の光学顕微鏡による1分子計測法を組み合わせることが出来れば, チャネル蛋白のゲーティングに伴う構造変化や, 薬物や制御蛋白との相互作用等を1分子レベルで直視することが可能となり, 生物物理学的, 生理学的に大変強力な手段と成り得る。このような理由で, 光学的1分子計測法が開発された当初より, 単一チャネル蛋白の電気・光学的同時計測系の開発は強く求められ, 装置に関する様々なアイデアが提出されてきた [2]。本稿では, 筆者らが開発した人工脂質平面膜法と光学顕微鏡の組み合わせによる, 単一チャネル分子の電流・蛍光同時計測実験系の紹介を行う。本法は, 細かい技術的な点を除けば, 脂質平面膜法装置を顕微鏡ステージ上に「置いただけ」の実験系であるので, 特別な予備知識なしに作製することが可能である。



a



b

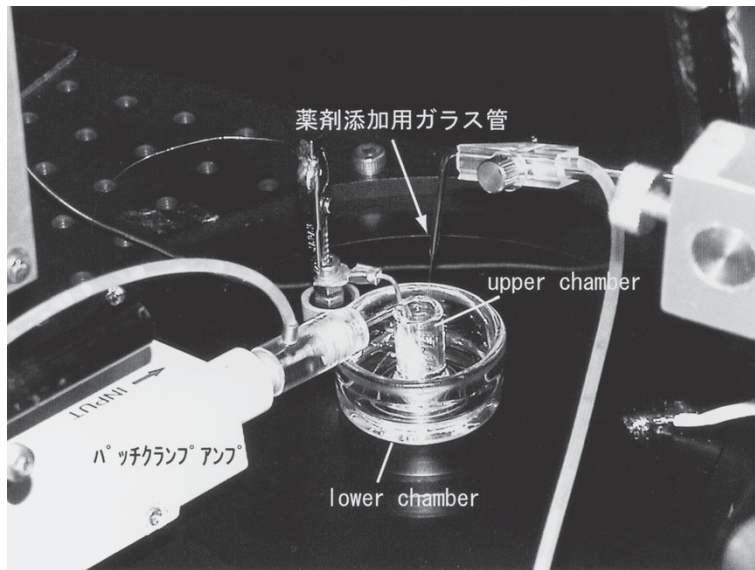
図1. (a) 人工膜観察用対物レンズ型全反射顕微鏡 (b) 顕微鏡概略図

II. 実験装置

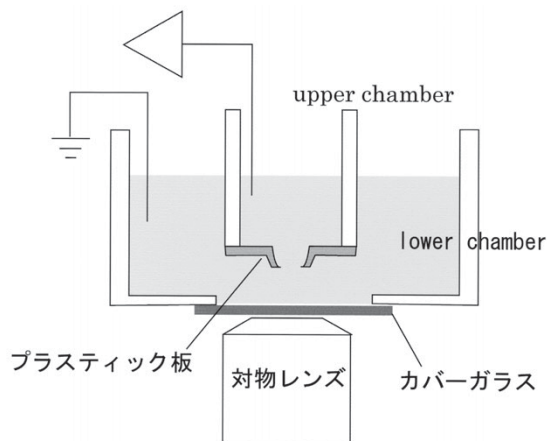
A. 顕微鏡

最近の市販の光学顕微鏡やカメラは、数年前と比べても著しく性能が向上しているので、一般の生物顕微鏡を用いても、強い光源（レーザー光源等）と感度のよいカメラがあれば、比較的簡単に蛍光1分子を観察できるようである。1分子蛍光観察に於いて最も注意を要するのは、背景光の除去であるが、水溶性蛋白と異なり、我々が対象としているチャンネル蛋白の並進運動は膜内に限定されているので、水溶液相に浮遊している蛋白からの背景ノイズを考慮する必要がない。よって、通常の落射照明でも十分に1分子の観察が可能である。勿論、蛍光分子が溶液中にも存在する場合、例えば、チャンネル蛋白と蛍光性リガンドとの相互

作用を観測する場合などには、溶液中の蛍光色素からの背景光を抑える工夫が必要である。このために、筆者らは、いわゆる対物レンズ型の全反射顕微鏡（TIRFM：Total Internal Reflection Fluorescence Microscope, 図1a）を用いている[3-5]。図1bに我々が使用している装置の光学系の概略を示す。我々が作製した装置では、図中のシャッターを切り替えることにより、落射照明と全反射照明が簡単に切り替えられるようになっている。また、ミラーを平行移動させることにより、レーザー光の入射角（即ちエバネッセント場の浸み出し深さ）を変えることが可能である。得られた蛍光像は、イメージインテンシファイアーで増幅、CCDカメラで撮像している（実際に使用している装置では、2色の光で観察が可能なよ



a



b

図2. 脂質平面膜用チャンバー (a) 実体写真 (b) 断面図

うに、蛍光励起には532nmと633nmのレーザーを用い、蛍光像はW-View光学系（浜松ホトニクス）で2分割した後撮像している）。対物レンズ型TIRFMは、簡単な光学系を用いて著しく背景光を減じることが出来る反面、方向によって照明強度が異なること、波長によっては対物レンズ自身が生じる背景光の影響が大きくなることなどの特徴があり、注意が必要である。最近は、複数の顕微鏡メーカーから光ファイバーを用いた

TIRFMが市販されている。

B. 脂質平面膜法

単一チャンネル電流記録は、脂質平面膜法を用いて行う。市販の生物顕微鏡を用いて人工膜を観察するために人工膜を水平方向に形成する以外は、概ね通常の平面膜法に同じであるので、文献 [6] 等も参照されたい。

人工膜は、いわゆるペインティング法により、ポリプロピレン等のプラスチックシート上に開

けた細孔（直径100—200 μm ）に形成する。この開口部の作成には、「削り取り法」を用いている。

図2aに、チャンバーの実体写真を示す（図bに模式図）。Upper chamberは、小孔をあけたプラスチックシートを底面に貼り付けたガラス管（直径8mm）、lower chamberは、35mmのガラスディッシュで、底面に約10mmの孔を開け、下方よりスライドガラスをマニキュアで接着する。写真にあるように、チャンバーは、倒立型生物顕微鏡のステージ上に固定され、upper chamberは、微動マニピュレーターによって上下方向に移動可能である。また、薬物や生体試料を膜に直接添加することが可能なように、図中の矢印で示すように、細く引いたガラス管（先端径10—20 μm ）を微動マニピュレーターによって、膜に十分近づけることができるように配置している。

人工膜上の蛍光分子1分子を観察する上で特に工夫する必要があるのは、如何にして、安定な人工膜を対物レンズの近傍に形成するかということである。筆者らの経験では、蛍光1分子が安定して観察されるのは、分子がカバーガラスの表面から高々数十 μm 程度の距離にあるときである（1分子からの微弱な蛍光信号を検出するためには、開口数の大きな対物レンズの使用が必須である。筆者らは、オリンパス製 PlanApo 100X、開口数1.4の油浸レンズを使用しているが、この場合、膜上の1分子が安定に観測されるのは、20 μm 程度までである）。ところが、人工膜には、脂質二重層膜とそれを取り囲む環状バルク相が存在し、後者の厚さは、おおよそ二重膜部分の直径に匹敵する。このため、直径100 μm の人工膜を安定に形成しようとすれば、厚さ100 μm の環状バルク相の存在が必要であり、ガラス表面との間に、最低でも50 μm 程度の距離が必要である。この困難を克服するために筆者らは、カバーガラスをアガロース等の親水性の高分子でコートし、これらの高分子をクッションとして、人工膜をカバーガラス上に押しつけることで、人工膜上の蛍光分子1分子の観察に成功した。ここで筆者らが用いている方法では、いわゆるLB膜の形成に際して行われているように、高分子を介して脂質膜と固体

表面を結合させ、「固体支持膜」を形成しているのではない。むしろ、脂質膜とガラス表面との相互作用を抑えることにより、脂質二重膜が壊れることを防いでいると考えている。従って、ガラス表面をコートする高分子層は、自家蛍光を発せず、親水的なものであれば、どのような種類のものであっても使用できるようである。筆者らが試したところでは、アガロースの他に、アクリルアミドゲルやデキストランでも同様な結果が得られている。

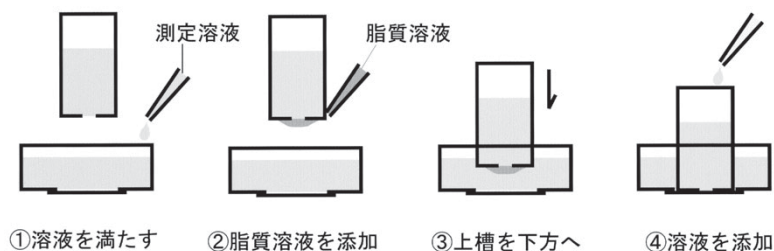
C. 実験法（水平人工膜の形成、図3a）

①カバーガラス（Matsunami：micro cover glass No.1）を表面の汚れと、コートを取り除くために以下の手順で洗浄する。0.1M KOH中で20分超音波洗浄→そのまま1晩放置→再度20分超音波洗浄→蒸留水で洗浄→エタノール中で20分超音波洗浄→1—2時間放置→再度20分超音波洗浄→蒸留水で洗浄→蒸留水中に保存。

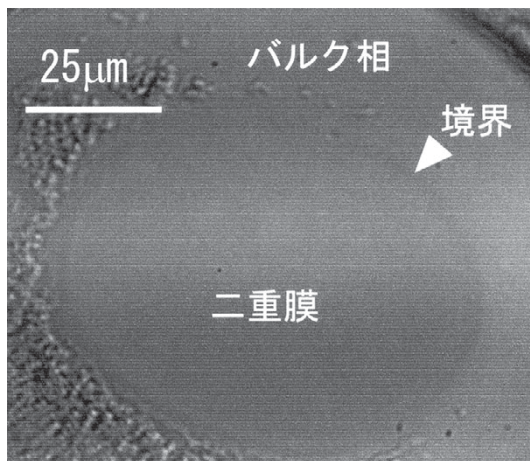
②上記カバーガラスを乾燥させた後、0.2—0.5%アガロース（typeVII, Sigma）を加熱融解し、清浄なプラスチック棒（ピペットチップ等）でカバーガラス上に塗布する。形成されたアガロース層は大変薄いので、塗布後すぐに乾燥して肉眼では見えなくなる。この際、カバーガラスが①の手順で洗浄されていれば、塗布されたアガロースは、必ずガラス表面に付着するので、視認できるほど厚く塗りつける必要はない（厚すぎるとエバネッセント場を用いての観察が不可能となる）。筆者らは、このようにして塗布したアガロース層の厚さを正確に計測はしていない。しかし、アガロース層上に形成した膜中の蛍光分子が、エバネッセント場（浸み出し深さ150—200nm）で観察可能なことから、アガロース層の厚さは数百nm以下であると予想される。また、当然のことながら、アガロース表面には凹凸があることが予想されるが、膜中を熱運動する蛍光分子の蛍光強度が場所によって著しくは変化しないことから、脂質膜自体には、大きな凹凸は生じていないものと考えられる。

③アガロースコートしたカバーガラスをlower chamberの下方から接着した後、顕微鏡上にセットし、適当な測定溶液で満たす。

④upper chamberをセットし、底面の側方か



a



b

図3. (a) アガロース上への水平人工脂質二重層膜形成法 (b) 人工膜の透過光像

ラリン脂質溶液（例えば、ジフィタノイルホスファチジルコリン 20mg/ml n-デカン）を添加する。リン脂質溶液は底面に沿って流れ、開口部を塞ぐ。この際、いわゆる「前塗り」は必要ではないが、脂質溶液が、開口部辺縁の両面に行き渡ると電気的に安定な膜が形成されるようである。

⑤ upper chamber に溶液を満たし、upper chamber を静かに降下させ、lower chamber 底面（即ちアガロース層）に接触するまで移動させる。この時点で、人工膜が形成されず、開口部が脂質溶液で覆われていない場合には、upper chamber を溶液から引き上げ、再度、溶液に浸けてやれば、簡単に人工膜が形成される。

⑥ upper chamber 内の溶液量を調整し、下方に僅かに静水圧を生じさせる。直径 $150\mu\text{m}$ 程度の開口に対して、 $5\text{mm H}_2\text{O}$ 程度の水圧差を生じさせることで、良好な結果を得ている。

⑦この状態で放置することにより、余剰の脂質はプラスチック表面に沿って排除され、膜が薄化し、中心部分が二重層膜となる。二重膜の形成は、透過照明観察で容易に判断可能で、図3bのように中心部分と辺縁部分にはっきりとした境界が現れたら、境界内部は二重層膜になっていると考えてよい。膜電位を数十mV程度変化させると、それに伴って、この「境界」も移動するので分かりやすい。

III. 脂質分子1分子の熱運動の直視

人工脂質平面膜は、生体膜の裏打ち構造のような特殊な構造をもたないために、膜上の分子は自由に2次元の熱運動をすると考えられる。このような2次元熱運動を1分子レベルで、直接観察することが出来る。図4aは、ジフィタノイルホスファチジルコリンにごく少量の蛍光標識脂質

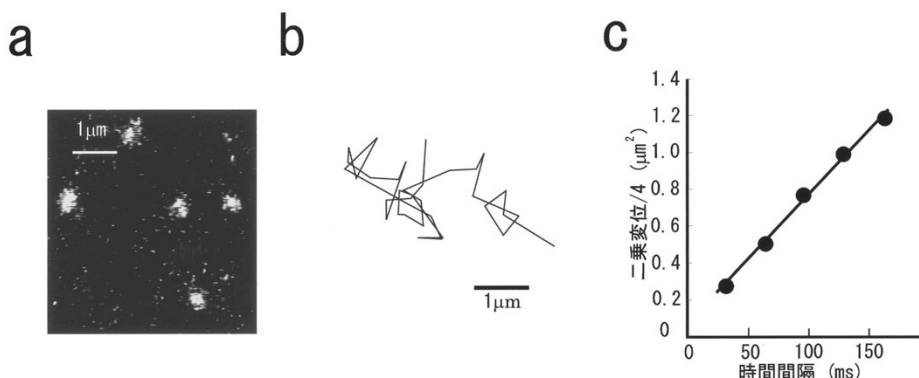


図4. (a) 脂質分子の1分子蛍光像. 各々の輝点が脂質分子1分子に対応する. (b) 脂質分子1分子の軌跡. ビデオフレーム (33ms) 毎に輝点の重心の動きを記録した. (c) 時間間隔—平均二乗変位. 図bの軌跡から, 時間間隔に対して平均二乗変位をプロットした. 直線近似できることから, 脂質分子は自由に熱運動していると予想される. 直線の傾きから求めた拡散定数Dは, $D = 6.8 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ であった.

(Bodipy 530/550 HPC, Molecular Probes) を添加した脂質溶液を用いて形成した平面膜の蛍光像である. 図中に見える各々のスポットが, 1分子脂質分子に対応している (蛍光の褪色が1段階で起こるので, 1個の蛍光分子に対応することが分かる). 1個の脂質分子の軌跡をビデオフレーム毎に描いた例が図4bであり, この様な軌跡の平均二乗変位と時間の関係から (図4c), 脂質分子の拡散定数Dを求めることが出来る. 1分子解析によって得られたDの値は, 水溶液中に形成した (自立型) 人工脂質平面膜に対して巨視的な方法 (FRAP法など) によって得られた値とよく一致しており, また, 軌跡上で特定の領域に運動が限局される様子が見られないことから, 脂質分子とアガロース層との間には強い相互作用はなく, 脂質は全く自由に膜上を運動していると考えてよさそうである. つまり, 固体表面に形成されたLB膜の場合のように, 脂質分子と固体表面との間に相互作用がはたらき膜が保持されているのではなく, 膜は静水圧差によってアガロース層に押しつけられているのみであって, 脂質分子とアガロース層とは殆ど相互作用をしていないと考えられる.

IV. BK チャネルの同時計測

次に, チャネル蛋白の1分子同時計測の例を示

す. 筆者らは, チャネル蛋白をアガロース上に形成した脂質二重膜に組み込むために, いわゆるベシクル融合法を用いている. 即ち, チャネル蛋白を含むベシクル懸濁液を用意し, 適当な条件を整えることにより, ベシクル膜と平面膜を融合させ, チャネル蛋白を人工脂質膜に再構成している. Ca依存性Kチャネル (BKチャネル) は, ゲーティングがCa依存性と電位依存性を併せ持ち, 単一チャネルコンダクタンスが大きい (200pS以上), 分布密度が低いいため単一チャネル記録をとり易い等の特徴を持っている. このため, 生物物理学的に興味ある対象で, かつ扱いやすいチャネル蛋白である. 我々は, ウシの気管平滑筋から調製した細胞膜ベシクルに存在するBKチャネルを, 特異的モノクローナル抗体を介して蛍光標識し, ベシクル融合をもって人工膜に再構成した [7].

ここで示す実験では, チャネル蛋白と薬物との相互作用計測を目的としているので, チャネル蛋白の人工膜上での位置のみが検出されれば十分である. そこで, 検出を容易にするために, 抗体分子を多数の蛍光分子で標識している. 図5に示す例では, 抗体分子1分子当たり, 6—7個の蛍光分子が結合しており, また, BKチャネルがホモ四量体であることを考えると, チャネル1分子当たり約25個の蛍光色素で標識されていると考え

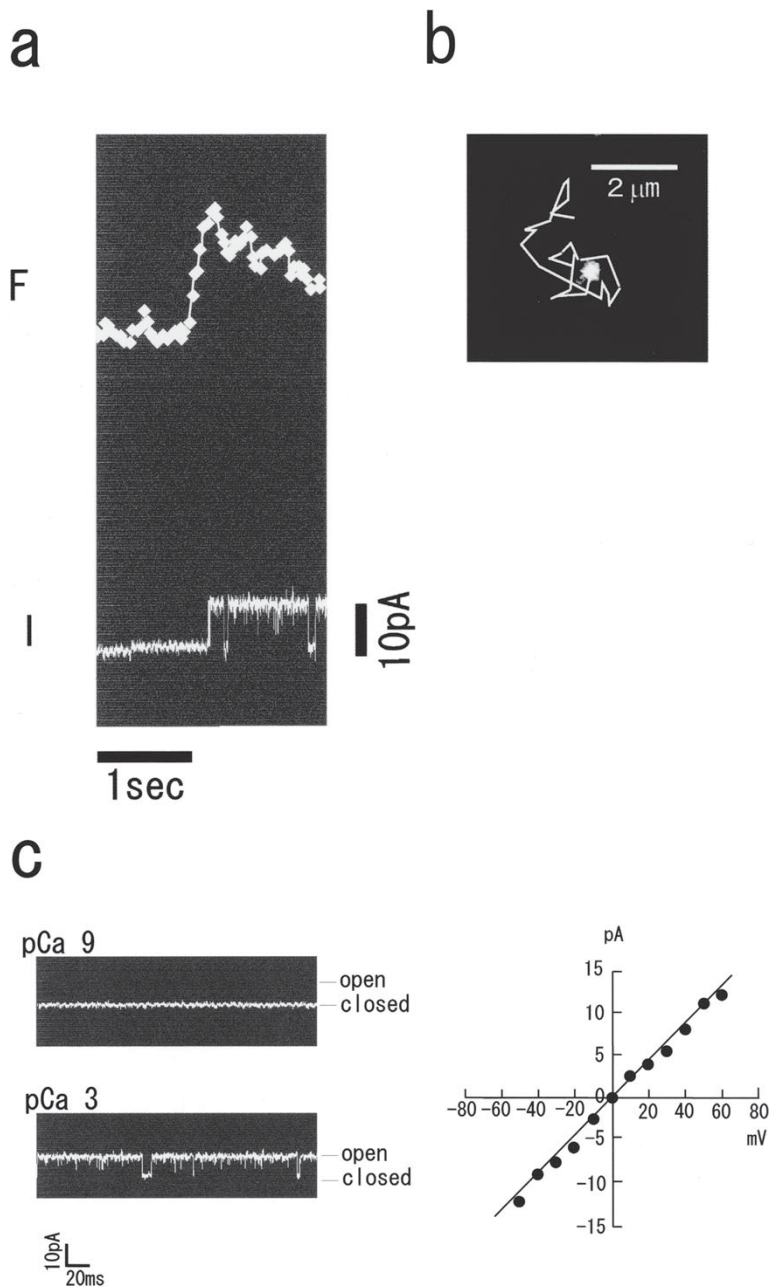


図5. 単一BKチャネルの電気・光学的同時計測. (a) Cy5標識したチャネル分子が膜に組み込まれた瞬間の記録. Fは蛍光, Iは電流記録を示す. 溶液は上下槽ともに, 100mM KCl, 1mM CaCl_2 , and 10mM Hepes/Tris (pH 7.4) (b) チャネル蛋白は再構成後, 膜上を熱運動した ($D = 4.0 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$). (c) 単一チャネル特性. 開確率はpCa3で0.95以上, pCa9では0であった. I-V直線から求めた単一チャネルコンダクタンスは, 225pSであった.

られる。勿論、蛍光分子1分子で標識されたチャネルに関しても、全く同じ方法で観察することが可能である。チャネル蛋白の内部構造変化を検出する場合などには、組み替え体を用いるなどして、蛋白に直接蛍光標識をする必要があるが、この場合にも全く同様にして、ベシクル融合法を用いて標識チャネル蛋白を平面膜に再構成することが可能である。チャネル蛋白の平面膜への再構成に用いられる条件は、各々の蛋白によるが、従来型の平面膜法で用いられてきた方法をそのまま使うことが可能であるので、それぞれの蛋白に関する文献を参照されたい。

本実験では、ウシ気管平滑筋表面膜ベシクルをCy5標識した抗BKチャネルモノクローナルと反応させ、未反応の抗体を遠心分離した後、標識されたBKチャネルを含むベシクルを細いガラスピペットを通して膜に直接吹きつけることによって、チャネルを脂質平面膜に再構成した。BKチャネルが人工膜に組み込まれる瞬間を電気・光学的とらえた実験結果が図5aである。平面膜を介した電流が大きく揺らぎ始めるのと同時に、(ビデオフレームで2—3フレーム先行して)強い蛍光信号が現れているのが分かる。実験溶液中にはmM程度のCa²⁺が添加されているので、チャネルは融合前にベシクル膜上に存在するときから、開状態にあると考えられ、融合の瞬間には既にゲートが開いていると予想される。よって、図は、Cy5で標識されたチャネルを含むベシクルが膜に接近し、エバネッセント場によって色素が励起され、そのベシクルが融合することにより開状態にあったチャネルが人工膜に組み込まれた様子を示していると考えてよいだろう。蛍光信号が、時間とともに徐々に減少しているのは、蛍光の褪色過程を表している。前述のように、チャネル蛋白は20分子以上の蛍光分子で標識されているので、緩やかな褪色過程が観察されている。このような方法で再構成されたBKチャネル分子は、図5bにあるように脂質平面膜内を2次元熱運動していることが分かる。また、図5cに示すように、本法を用いて得られたチャネルの電気的特性は、パッチクランプ法や従来型の平面膜法を用いて得られた結果と全く同様であり、本法を用いて正常な単一チャネル電流記録を行えると判断してよいで

あろう。

V. おわりに

単一チャネル電流記録法を用いて、種々のチャネル蛋白の電気生理学的、薬理学的機能が詳細に解析されているにもかかわらず、その機能変化に伴う構造変化は、殆どの部分が不明のままである。その一つの原因は、チャネル蛋白の結晶構造解析が難しく、微細な構造情報が得られていないということがあった。しかしながら、最近、ある種のKチャネルをはじめ、幾つかのチャネル蛋白に対するX-線結晶構造解析がなされ、その構造が詳細に知られるようになった。即ち、蛋白の機能変化に伴う微細な構造変化モデルを考えることが出来る段階に至っており、いよいよ1分子レベルでの機能・構造同時計測に対する要求が高まってくるものと思われる。

文 献

1. Yanagida T, Tanaka H, Kitamura K, Wazawa T, Nishiyama M, Esaki S, Sako Y, Ide T, Iwane AH & Ishii Y : Single molecule techniques in biophysics. In : Na/K-ATPase and Related ATPases, Ed. Taniguchi K & Kaya S, Elsevier Publ Co, Amsterdam, pp 71–85, 2000.
2. MacDonald AG. & Wraight PC : Combined spectroscopic and electrical recording techniques in membrane research : prospects for single channel studies. *Prog Biophys Mol Biol*. 63 (1) : 1–29, 1995.
3. Tokunaga M, Kitamura K, Saito K, Iwane AH, and Yanagida T : Single molecule imaging of fluorophores and enzymatic reactions achieved by objective-type total internal reflection fluorescence microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235 : 47–53, 1997.
4. Ide T and Yanagida T : An artificial lipid bilayer formed on an agarose-coated glass for simultaneous electrical and optical measurement of single ion channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265 : 595–599, 1999.
5. Ide T, Takeuchi Y, and Yanagida T : Development of an experimental apparatus for simultaneous observation of optical and electrical signals from single ion channels. *Single Molecules* 3 : 33–42, 2002.
6. 老木成稔 : チャネル研究のための脂質平面膜法。新パッチクランプ実験技術法, 岡田泰伸編, 吉岡書店, pp 208–244, 2001.
7. Ide T, Takeuchi Y, Aoki T, and Yanagida T : Simultaneous optical and electrical recording of a single ion-channel. *Jpn J Physiol* 52 : 429–434, 2000