

局在表面プラズモン共鳴解析システム (QCM-D 同時測定仕様)

Insplorion Acoulyte(AC01) を用いた NPS + QCM-D の同時測定 ～表在性膜タンパク質と脂質二重膜の相互作用解明～



異なる測定原理に基づく、Insplorion NanoPlasmonic Sensing (NPS) と Q-Sense Quartz Crystal Microbalance with Dissipation monitoring (QCM-D) の二つのラベルフリー高感度の同時測定は、タンパク質と脂質二重膜の間の相互作用を詳細に解明します。本アプリケーションノートでは、脂質二重膜と cytochrome c の相互作用の測定事例をご紹介します。

Introduction

膜結合性タンパク質は、細胞が外部の刺激とどのように相互作用し、また、反応するかにおいて重要な役割を果たしています。例えば、物質が細胞および細胞小器官に入ったり出たりする動きをコントロールし、細胞接着および細胞内シグナル伝達に決定的な役割を持ちます。膜結合性タンパク質は、総膜質量の 50% 以上、細胞の総タンパク量の最大 20% に相当します。

脂質二重膜がどのようにタンパク質やその他の小さい分子と相互作用するかについての研究は、モデル膜の作成や生体膜の相互作用の研究において貴重な見識をもたらすだけでなく、診断およびドラッグデリバリーシステムの開発のための興味深いツールを提供します。脂質二重膜とタンパク質の相互作用の一つの重要な側面は、タンパク質および二重膜を形成する脂質のチャージです。異なる脂質組成が異なる総膜電荷を生成することは、帯電した分子がどのように膜と相互作用するかに影響すると予想されます。相互作用のメカニズムに影響を与えることによって直接的に、また、膜の表面に保持される水と塩の量を変えることによって間接的に捉えることが可能です。

NPS と QCM-D の組み合わせが、膜 - タンパク質の相互作用を研究するためにどのように用いられるかをここに示します。測定量の相補性 (『Dry』 (光学的) 対 『Wet』 の質量) は、脂質二重膜の異なる脂質組成および電荷、および膜結合性タンパク質である cytochrome c との相互作用の詳細情報を得るために使用されます。

実験手順

Insplorion Acoulyte (AC01) システムと最上層に SiO_2 をコートした Acoulyte センサーを使用しました。最初に、1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (18:1 phosphatidylcholine, DOPC)、牛肝臓由来の α phosphatidylinositol (Liver PI, アシル鎖長、飽和度、および二重結合の位置の異なる phosphatidylinositol 脂質の混合物) または 1',3'-bis[1,2-dioleoyl-snglycero-3-phospho]-snglycerol (18:1 cardiolipin, TOCL) の異なる比率で構成された脂質二重膜が、小さい単ラメラ小胞からセンサー表面に形成されます。NPS および QCM-D で計測しながら、ウマ心筋由来の cytochrome c (50 mg/L in 0.01 M NaCl pH 7.4 with 0.01 M HEPES バッファー) をセンサー上に流します (0.1 mL/分)。

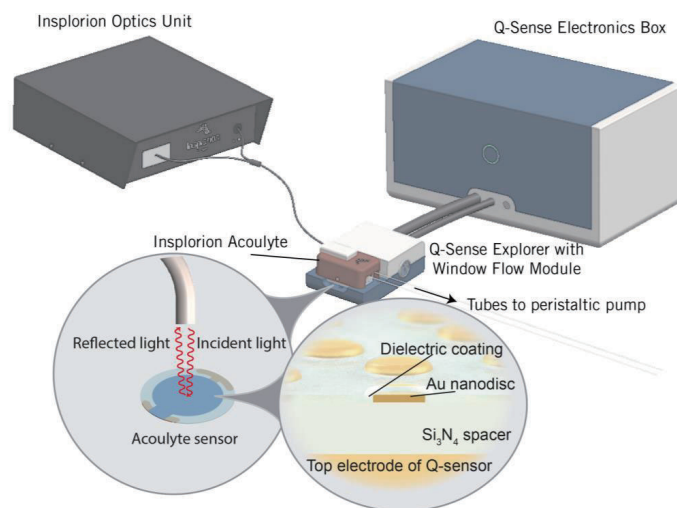


図.1 Q-Sense E1/Explorer に取付けた Acoulyte モジュール



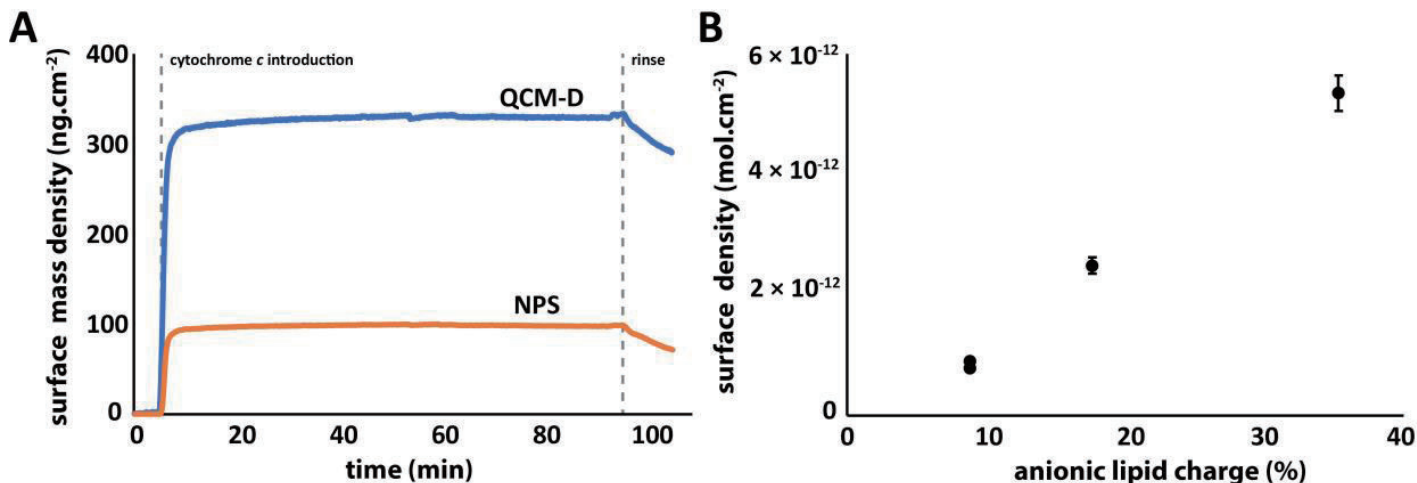


図.2 (A) DOPC と TOCL からなるモデル脂質二重膜への cytochrome c (0.01 M HEPES バッファー) の相互作用を質量 (ng/cm^2) で示しています。質量はそれぞれ Feijter 式を使用した NPS データ (オレンジ色の線) と Sauerbrey 式を使用した QCM-D データ (青色の線) から算出。(B) モデル膜中のアニオン性脂質電荷と cytochrome c 分子の分子密度の相関関係を示しています。エラーバーは 3 回測定標準偏差を示します。

結果

図.2 (A) は、17.6 mol% の TOCL を含む DOPC 脂質二重膜で覆われたセンサー表面上の cytochrome c 質量変化を表したものです。動的プロファイルは同じにもかかわらず、NPS および QCM-D 測定は計算された表面質量密度において大きな違いを示しています。これは脂質二重膜との相互作用中、cytochrome c の水分量が非常に多いことを意味します。

TOCL、Liver PI、アニオン (陰イオン) 性脂質電荷の量が異なった二層膜上の cytochrome c の分子密度を図.2 (B) に示します。cytochrome c の分子密度は飽和後、NPS データより算出しました。後者のイオン電荷と脂質二重層と関連のある cytochrome c の量の間には直接的な相関関係があります。これは、より高い負電荷の存在により、高い正電荷 cytochrome c 分子がより多く脂質二重層と相互作用したと言えます。

結論

InspIorion Acoulyte(ACO1) は膜結合性タンパク質と脂質二重層の相互作用を調べるために使用されました。NPS と QCM-D を組み合わせることで、この相互作用に関連する水分量の定量化が可能になりました。さらに、NPS は、cytochrome c と脂質二重層との相互作用におけるイオン電荷の評価を可能にしました。

この研究はウィスコンシン大学マディソン校、パシフィックノースウエスト国立研究所、イリノイ大学、およびジョンズホプキンス大学の同僚と共に Eric S. Melby、Joel A. Pedersen によって行われました。元々の研究は、持続可能なナノテクノロジーセンター (the Center for Sustainable Nanotechnology)、CHE-1503408 の元、国立科学財団 (NSF) によってサポートされた。本稿で表明された意見、調査結果、結論および推奨されているものは著者のものであり、必ずしも NSF の見解を反映するものではありません。このコンセプトは元々以下の文献で出版されています：

参考文献

[1] E.S. Melby et al. *Peripheral Membrane Proteins Facilitate Nanoparticle Binding at Lipid Bilayer Interfaces*.
DOI: 10.1021/acs.langmuir.8b02060