

ProCube™ アプリケーションノート

No.24 NanoDisc を用いた GPCR のリガンド結合解析②(凍結融解後の解析)

NanoDiscは、不溶性の膜タンパク質をMembrane Scaffold Proteins (MSP) のベルトによって抱合し、リン脂質二重膜構造を形成させることによって可溶化します(図1)。NanoDiscを利用することによって、膜タンパク質を生体に近い状態で機能評価することが可能となります。

今回、G蛋白質共役型受容体(GPCR)であるヒトエンドセリン受容体(EDNRA)をカイコバキュロウイルス発現系を利用して調製し、NanoDiscに再構成しました。凍結融解後のNanoDisc化EDNRAを用いて、リガンドであるエンドセリンへの結合評価を行いました(図2, 表1)。

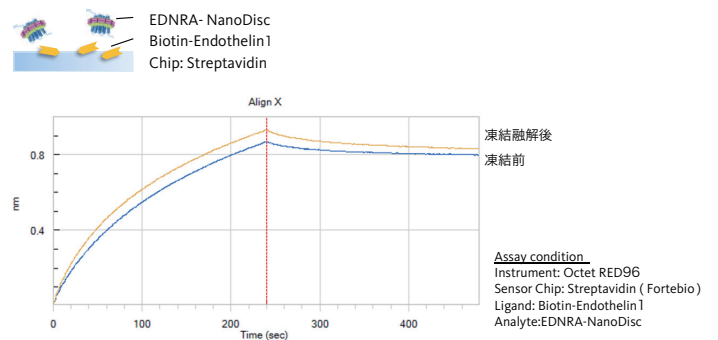
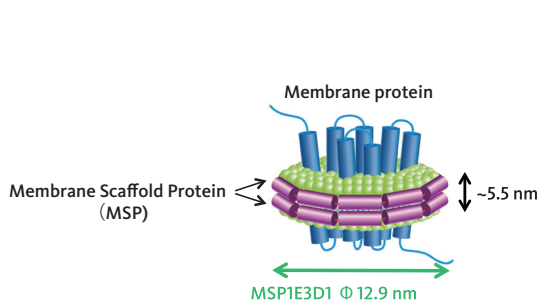


図1 NanoDiscによる膜タンパク質の再構成

図2 エンドセリン受容体の結合解析

	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
凍結前	2.46E-09 ±5.16E-11	2.11E+05 ±1.74E+03	5.18E-04 ±9.99E-06
凍結融解後	2.25E-09 ±3.54E-11	2.66E+05 ±1.77E+03	5.99E-04 ±8.53E-06

※EDNRA-NanoDisc 4濃度について図2と同様に結合解析を実施し、膜タンパク質を含まない空のNanoDiscの反応を差し引いて算出した。

表1 エンドセリン受容体のカインेटックス解析結果

Biotin化エンドセリンをStreptavidinセンサーに固定し、NanoDisc化したエンドセリン受容体との相互作用を測定した。NanoDisc化したエンドセリン受容体は凍結融解後も凍結前と同等にリガンドに結合することが確認できた。

ProCube™ についてのお問い合わせ : <http://procube.sysmex.co.jp>

E-mail procube.japan@sysmex.co.jp



製造販売元

シスメックス株式会社

本 社 神戸市中央区脇浜海岸通1-5-1 〒651-0073

(お問い合わせ先)

クリニカルインベション本部 神戸市西区高塚台4-4-4 〒651-2271 Tel 078-991-2367 Fax 078-992-3284

www.sysmex.co.jp