

機関番号：12601

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006 ～ 2010

課題番号：18074001

研究課題名（和文） マイクロナノ加工技術を用いた膜タンパク質機能解明のためのプラットフォーム

研究課題名（英文） An experimental platform for membrane protein analysis by using micro/nano machining technologies

研究代表者

竹内 昌治 (TAKEUCHI SHOJI)

東京大学・生産技術研究所・准教授

研究者番号：90343110

研究成果の概要（和文）：

本研究では、膜超分子モータの機能解明の効率化を可能とする実験プラットフォームを、マイクロ・ナノ加工技術を利用して実現することを目的とした。まず、マイクロ・ナノ加工技術を利用して、小型チップ上に再現性よく、安定して脂質膜を再構成できる計測プラットフォームの実現を試みた。マイクロ加工により、小孔のサイズを調整し、平面膜の安定化に挑戦した。さらに、小孔を独立にアレイ化し、異種の膜タンパク質の膜電流計測、物質輸送イメージングを選択的に行えるシステムを開発した。加えて、マイクロ流体デバイス技術の特長をいかし、マイクロチャンバと人工膜を組み合わせた実験系の構築についても検討した。さらに、10 ミクロンサイズのマイクロビーズを流路中でハンドリングするダイナミックマイクロアレイや、ピコリットルオーダーの液滴内の溶液を交換するシステムなど、マイクロデバイス中で微小物体や分子を効率的に操作するための基本的なデバイスを実現した。また、水、有機溶媒を交互に流し、微小孔に再現性良く脂質 2 重膜（平面膜）を形成する方法を開発し、マイクロデバイス中でアレイ化することに成功した。これらの平面膜変形させ、均一直径のリポソーム膜を生成する方法を開発した。

研究成果の概要（英文）：

Membrane proteins play very important roles in cells. Here, I will propose our microfluidic technologies to form lipid bilayer membrane and vesicles. These technologies are useful for producing a membrane protein chip: an array of single-species-specific membrane proteins reconstituted into (1) planar lipid bilayers formed in microfabricated holes and channels and (2) giant vesicles (giant liposomes) Planar lipid bilayers are formed at apertures, 100 micron in diameter, by flowing lipid organic solution and buffer alternately into an integrated microfluidic channel. Using this technique, multiple lipid bilayers are formed simultaneously in a single chip, and channel currents through peptide ion channels was recorded in parallel. Regarding giant vesicles, "blowing" a planar lipid bilayer and deforming it into vesicles (like blowing soap bubbles). We have also developed a simple method to make an array of the vesicles on a microfluidic chip. We believe that these devices are useful for an efficient and rapid analysis of single-species-specific membrane proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	23,200,000	0	23,200,000
2007 年度	31,900,000	0	31,900,000
2008 年度	25,100,000	0	25,100,000
2009 年度	18,400,000	0	18,400,000
2010 年度	12,900,000	0	12,900,000

総計	111,500,000	0	111,500,000
----	-------------	---	-------------

研究分野： **ナノバイオテクノロジー**

科研費の分科・細目：**ナノ・マイクロ科学**、マイクロナノデバイス

キーワード：膜タンパク質、MEMS、マイクロ流体デバイス

## 1. 研究開始当初の背景

膜構造の再構成技術は、各種の膜タンパク質の機能や特性の解明に必要不可欠なプラットフォームとである。また、本研究で注目する膜分子モータに限らず、イオンチャンネルや、薬剤排出とトランスポータなどへの応用も期待できる。これまでの国内外で発表されている人工平面膜法は、一分子の機能解析が可能で、膜電流が計測不能なトランスポータなどの活性計測にも有効であるが、脂質2重膜の再構成プロセスは運まかせで、再構成膜の再現性、安定性は極めて低いという問題があった。また、複数の脂質膜を同時に再構成するのは至難の業であった。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、膜超分子モータの機能解明の効率化を可能とする実験プラットフォームを、マイクロ・ナノ加工技術を利用して実現することを目的とした。

具体的には、マイクロ加工により、小孔のサイズを調整し、独立にアレイ化し、異種の膜タンパク質の膜電流計測、物質輸送イメージングを行えるシステムの開発を目指した。また、マイクロ流体デバイス技術の特長をいかし、マイクロチャンバと人工膜を組み合わせた実験系の構築についても検討した。分担者の宗行（中央大学）は、誘電泳動システムを利用して F1 の回転を制御し、回転分子モータの機能解明の一層の効率化を図った。

## 3. 研究の方法

以下の2項目に分けて、研究を進めた。

(1) 膜分子が再構成可能な脂質2重膜アレイの実現

(2) 一分子観察のための簡便なマイクロチャンバーの実現

ここでは、マイクロ・ナノ加工技術を利用して、膜形成のための小孔を作成することで、再現性、安定の問題に取り組んだ。続いて多チャンネル化を行い、最後にシステム全体を評価する実験を行った。また、分担者の宗行（中央大学）の誘電泳動システムを利用して F1 の回転を制御する方法も検討した。

## 4. 研究成果

(1) 膜超分子モーターが再構成可能な脂質二重膜アレイの実現

平面膜チップの研究に関しては、マイクロ・ナノ技術を利用して、膜を形成することで、再現性、安定の問題に取り組んだ。複数同時に膜形成が行なえれば、そこに複数種の膜タンパク質を導入し、同時に多くの機能解析を行なうことができる。膜タンパク質の機能計測のうち、イオンチャンネル電流計測は比較的簡単に行うことができる。これまでに我々は、脂質を溶解させた有機溶媒中に2つの液滴を用意し、それらの界面に形成された脂質の単分子膜を接触させる方法によって脂質二重膜を効率的に形成する方法（接触法と名づけた）を確立している。この接触法により形成した膜に、チャンネル性の膜タンパク質などを導入し、膜の両端にかかる電圧を固定した条件でのイオンチャンネル電流の計測に成功した。実験では、膜タンパク質の中でも、比較的分子量が小さく、扱いの容易なチャンネルタンパク（グラミシジンAや $\alpha$ -ヘモリシンなどのペプチドやタンパク質）を利用した。これらは、多量体化によりナノポアを形成し、チャンネル電流を発生させる。実際の膜タンパク質の再構成は、一般的に膜融合法が用いられる。これは、膜面分やリポソーム中に精製した膜タンパク質を平面膜上にばら撒くことによって融合をさせる方法である。この融合により、スパイク状のチャンネル電流を計測できた。また、これらの方法を利用して多チャンネル膜形成用のデバイスを試作し、実際に各部に再構成した膜から、ペプチドなどからのイオンチャンネル電流を複数同時に計測することに成功した。

(2) 一分子観察のための簡便なマイクロチャンバーの実現

ここではマイクロチャンバを利用した実験システムの構築においては、マイクロ流路を組み合わせることで一層の効率化を図った。マイクロ流路を作成し、ここに水層と油層を交互に流すことによって、チャンバを作成する方法を考案した。本方式は、長時間大量のチャンバを観察する実験に適していることが分かってきた。また、このデバイスに脂質を混入させた有機溶媒を用いることによって、チャンバの開口部を脂質二重膜で覆

うこともできた。

分担者の宗行は、誘電泳動の原理を用いて回転分子モーターである F1-ATPase に時間・空間的にほぼ均一な外部トルクをかけて、その応答を観察する研究を行った。この実験系では溶液のイオン強度を下げなければならないため、実験条件下での ATPMg と ATP、Mg の平衡関係や F1-ATPase の活性等を検討し、最適と考えられる実験条件を模索した。さらに実験手順を洗練して外部トルクの校正を全ての実験について個別に行うことにより、データのばらつきをある程度減らすことに成功し、外部トルク存在下でのステップ回転の挙動を論文として発表した。この時点では、電場をかけることによる発熱が問題となっており、定性的な考察しかできなかったが、その後、回転電場法による温度上昇の問題を溶液条件、セルの構造、回転観察用ビーズの大きさなどを検討することで問題にならない程度まで軽減した。また録画系、データ処理系についても改良を行い、1000fps で撮影した動画を撮影と同時に重心解析をしながらハードディスクに取り込むシステムを構築した。このことにより以前に比べると飛躍的に実験が楽になり、順調にデータがとれるようになった。

さらに最終年度までに、脂質膜で囲われたマイクロ油中水滴の電気融合・分裂現象をベースにした溶液交換チャンバーを実現することに成功した。このシステムにより、膜超分子モーターを含む生体高分子の構造変化や機能発現の様子を生体高分子の周囲の溶液を数十から数百ミリ秒オーダーの高速で交換しながら観察し解析することができるようになった。

以上のシステムを集積化することで、再現性・安定性・ハイスループット性の高いデバイスの構築が可能であり、膜超分子モーターの機能解明の一層の効率化が可能になるシステムを開発することができたと考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 19 件) すべて査読有り

1. Masahiro Takinoue, Hiroaki Onoe and Shoji Takeuchi: Fusion and fission control of picoliter-sized microdroplets for changing the solution concentration of microreactors, **Small**, 6(21): 2374-2377, 2010
2. Sadao Ota, Satoko Yoshizawa, and Shoji Takeuchi\*: "Microfluidic Formation of Monodisperse, Cell-sized and

Unilamellar Vesicles", **Angew. Chem. Int. Ed.**, 48: 6533-6537, 2009

3. Y. Hara, H. Noji, and S. Takeuchi: Single-Biomolecule Observation with Micro One-way Valves for Rapid Buffer Exchange **Journal of Applied Physics**, vol. 105, pp. 102016-1-6, 2009
4. Bruno Le Pioufle, Hiroaki Suzuki, Kazuhito Tabata, **Hiroyuki Noji**, and Shoji Takeuchi: Lipid Bilayer Microarray for Parallel recording of Transmembrane Ion Currents, **Analytical Chemistry**, 80: 328-332, 2008.
5. Watanabe-Nakayama T, Toyabe S, Kudo S, Sugiyama S, Yoshida M, Muneyuki E.: Effect of external torque on the ATP-driven rotation of F1-ATPase., **Biochem Biophys. Res. Commun.** 366(4):951-7, 2008
6. W-H. Tan and Shoji Takeuchi: A Trap-and-Release Integrated Microfluidic System for Dynamic Microarray Applications, **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 104(4): 1146-1151, 2007
7. Ariga T, Muneyuki E., Yoshida M.: F1-ATPase rotates by an asymmetric, sequential mechanism using all three catalytic subunits., **Nat. Struct. Mol. Biol.**, 14(9):841-6, 2007

[学会発表] (計 93 件)

1. Masahiro Takinoue, Hiroaki Onoe, Daisuke Kiriya, Shoji Takeuchi: Propelling Microobjects Using A Stationary DC Voltage, **MEMS2011**, 2011 年 1 月 26 日, メキシコ・カンクン
2. Masahiro Takinoue, Hiroaki Onoe, Shoji Takeuchi: Solution Concentration Change Of Picoliter-sized Microdroplet Reactors, **microTAS2010**, 2010 年 10 月 6 日, オランダ・フローニンゲン
3. Sadao Ota, Satoko Yoshizawa, and Shoji Takeuchi: Generation of Monodisperse Cell-sized and Unilamellar Vesicles from a Microfluidic T-junction, **MicroTAS2009**, 2009 年 11 月 2 日, 韓国・チェジュ

[図書] (計 4 件)

1. 竹内昌治: 「人工脂質二重膜デバイス, バイオ健康&医療デバイス」・CMC 出版・2009 年発行・385 ページ
2. 竹内昌治: 「リポソームアレイ, マイクロ・ナノ化学チップと医療・環境・バイオ分析」・技術教育出版社・2009 年発行・477 ページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者：

竹内 昌治 (TAKEUCHI SHOJI)  
東京大学・生産技術研究所・准教授  
研究者番号：90343110

(2) 研究分担者：

宗行 英朗 (MUNEYUKI EIRO)  
中央大学・理工学部・教授  
研究者番号：80219865