

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：92704

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14107

研究課題名(和文) ISFETを利用した細胞型膜タンパク質機能解析プラットフォームの提案

研究課題名(英文) Proposal of cell-mimetic platform for membrane protein function analysis using ISFET

研究代表者

櫻村 吉晃 (Kashimura, Yoshiaki)

日本電信電話株式会社 NTT 物性科学基礎研究所・機能物質科学研究部・主任研究員

研究者番号：90393751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はイオンチャネルなどの膜タンパク質の機能をパッチクランプ法に代表されるチャネル電流の直接計測ではなく、細胞サイズの微小井戸に備えられたイオン感受性電界効果トランジスタ (ISFET) 部で計測可能な新たなプラットフォームを提供することが目的である。本研究期間において、シリコン基板上にFETを作製し、その上部に本研究の根幹となるSiN/SiO<sub>2</sub>からなる微小井戸構造の作製の作製を行った。さらに、脂質膜でシールされた微小井戸構造について理論計算を行い、本デバイス構造における基板表面と脂質膜組成の最適な組み合わせについて有益な知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research is to provide a platform for the membrane protein analysis, where the function of membrane proteins is detected not directly by measuring the ion channel current, but by utilizing cell-mimetic microwells equipped with ion sensitive field effect transistors. In this research period, FET was fabricated on silicon substrate, and fabrication of microwell structure consisting of SiN/SiO<sub>2</sub>, which has the same size as a cell, was made on top of FET. Furthermore, theoretical calculations were performed on the microwell structure sealed with the lipid membrane. We obtained useful knowledge about the optimal combination of the substrate surface and the lipid membrane composition in this device structure.

研究分野：ナノバイオテクノロジー

キーワード：ナノバイオ 生体機能利用 タンパク質 人工生体膜 ISFET

### 1. 研究開始当初の背景

細胞膜中に存在する膜タンパク質は、様々な病気の発生や薬剤応答・免疫反応などの生理的機能に大きく関連した生体分子であり、現在では市販医薬品の約 60%以上が膜タンパク質をターゲットとしている。しかしながら、膜タンパク質は多種多様であり、しかも取り扱いが難しいため、機能解析には膨大な時間と費用がかかるという問題がある。そのため、膜タンパク質を半導体基板上にアレイ化したバイオチップが実現できれば、多くの膜タンパク質の機能を同時かつ高速に解析することが可能となるため、その技術を開拓することは急務である。

膜タンパク質の機能を解析する方法としては、細胞にガラスピペット電極をあててチャンネル電流を計測するパッチクランプ法がゴールドスタンダードとして認知されている。しかしながら、通常細胞膜上には目的とする膜タンパク質以外の膜タンパク質も複数存在しており、ある薬剤で刺激しても得られた応答が目的の膜タンパク質によるものなのかが不明瞭であるという問題がある。そのため、精製した膜タンパク質を用いた *in vitro* 測定系の必要性が高まってきている。

*in vitro* 系で膜タンパク質の機能を解析する方法としては、基板上に膜タンパク質を再構成し、チャンネルを流れるイオン電流を直接計測するのが現在の主流である(例えば平面膜法など)。しかしながら、この方法は、チャンネル電流が非常に小さく(数 pA 程度)、またウェット系での計測であるために、ノイズや再現性の問題など課題が多い。

本研究の提案に至ったのは、膜タンパク質の機能解析においてチャンネル電流を検出するという従来の常識を破り、細胞サイズ以下に制御された微小井戸を利用すれば、膜タンパク質の機能による井戸内環境の変化を、ISFET 構造により定量的に捉えることができる考えたためである。

### 2. 研究の目的

人工脂質膜中に膜タンパク質を再構築した系(人工再構成系)で膜タンパク質の機能を解析する新たなプラットフォームを提供することが本提案の大目標である。本提案では、従来のようにチャンネル電流を直接計測するのではなく、イオン感受性電界効果トランジスタ(ISFET)構造を備えた人工的な細胞環境をシリコン基板上に構築し、チャンネル機能によって変化する人工細胞内部の変化を界面ポテンシャルの変化として FET 部で検知することを機能計測の原理とする。この目標の実現のために、膜タンパク質の機能と ISFET 応答特性の相関を検討するとともに、基板-脂質膜の界面構造の理解をする必要があり、本研究を通じてその知識の獲得をすることも視野に入れている。

### 3. 研究の方法

#### (1) ISFET と微小井戸構造の融合

まず、本提案の根幹をなす ISFET を底部に持つ図 1 に示す微小井戸構造を作製する。ISFET はデプレッション型とし、p 型シリコン基板上に作製する。イオン注入によってソース(S)、ドレイン(D)電極を形成するが、最適な構造を検討するために、チャンネル長およびチャンネル幅を  $1 \mu\text{m}$  以上のスケールで変化させた構造を複数同一基板上に作製する。この構造の上にゲート絶縁膜として  $\text{SiO}_2$  を形成する。微細加工によって ISFET 構造の上部にオーバーハング構造のついた微小井戸を作製する。オーバーハング構造は脂質膜で井戸をシールする際の脂質膜の安定性を大幅に増す効果がある。井戸の径は  $500 \text{ nm}$ ,  $1 \mu\text{m}$ ,  $2 \mu\text{m}$  とし、検出感度と井戸径との相関を検討する。このように作製したデバイスにおいて、井戸底部で剥き出しになったゲート絶縁膜( $\text{SiO}_2$ )表面がゲートとなり、電荷を検出するイオン感応部として働くことになる。

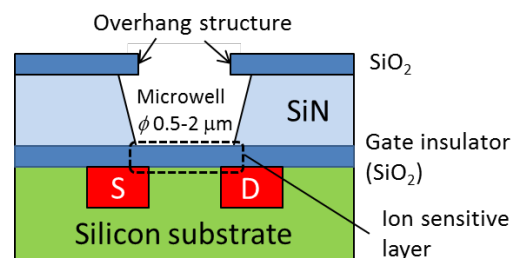


図 1 デバイス構造の模式図

#### (2) イオン種・濃度に対するデバイス応答特性の検討

作製したデバイスについて、 $\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ などの生理活性に代表的なイオン種について、様々な濃度におけるデバイス応答特性を調べる。デバイスを電解質溶液中に浸漬し、溶液中にゲート電極( $\text{Ag}/\text{AgCl}$ )を挿入する。具体的な特性評価方法としては、ISFET の伝達特性( $V_G$ - $I_D$  特性)を計測し、ドレイン電流( $I_D$ )一定の条件下での閾値電圧の変化をイオンによる界面ポテンシャルの変化分として評価する。この際に、イオン種ごとに濃度と閾値電圧の間の検量線を作成するのと並行して、ISFET のチャンネル長・チャンネル幅依存性や微小井戸の径に対する依存性も検討し、計測条件の最適化を図る。

#### (3) 微小井戸における基板-脂質膜界面構造の検討

基板支持脂質二分子膜において、基板と脂質膜の間にはナノメートルスケールの薄い水層があることが知られている。我々はこの水層を通したイオンリークがあることを報告した[R. Forbes et al., Appl. Phys. Express 8, 117201 (2015)]. 膜タンパク質の微小なチャンネル信号の検出へ向けて、基板-脂質膜間の薄い水層からのイオンリーク現象を解明することが現在大きな課題となっている。この

ような基板支持脂質膜の界面構造の解明には、ファンデルワールス力、電気二重層力、水和力を考慮した、いわゆる拡張 DLVO 理論に基づく相互作用解析の有効性が報告されている[例えば、R. Tero et al., *Langmuir*, **24**, 11576 (2008).]。本研究では、様々な組み合わせの基板、脂質組成を持つ基板支持脂質膜について、拡張 DLVO 理論を用いた全相互作用エネルギー計算を行い、界面状態の評価およびイオンリーク現象との関連性について検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) ISFET を底部に備えた微小井戸の作製

酸化膜(40 nm)付き p 型シリコン基板上にデプレッション型の FET を作製した。イオン注入 (イオン種: P) によってソース(S)、ドレイン(D)電極を形成したが、最適な構造を検討するために、チャンネル長およびチャンネル幅を 1  $\mu\text{m}$  以上のスケールで変化させた構造を複数同一基板上に作製した。この構造の上に Ti/SiN/SiO<sub>2</sub> (100 nm/ 1000 nm/ 200 nm) を成膜した。ドライエッチング (SiO<sub>2</sub> の加工に C<sub>2</sub>F<sub>6</sub> ガス、SiN の加工に SF<sub>6</sub> ガス) によって ISFET 構造の上部にオーバーハング構造のついた微小井戸を作製した。オーバーハング構造は脂質膜で井戸をシールする際の脂質膜の安定性を大幅に増す効果がある。検出感度と井戸径との相関を検討するために井戸の径は 500 nm, 1  $\mu\text{m}$ , 2  $\mu\text{m}$ , 4  $\mu\text{m}$  とした。次に、アンモニア過酸化水素水処理により、エッチングのストッパー層として用いた Ti 層を除去した。このプロセスにより、井戸径 500 nm ~ 1  $\mu\text{m}$  において所望の ISFET 付き微小井戸を作製することができた。エッチングプロセスが井戸径に大きく依存するため、井戸径 2  $\mu\text{m}$  以上では条件の再検討が必要である。

このように作製したデバイスにおいて、井戸底部で剥き出しになったゲート絶縁膜 (SiO<sub>2</sub>) 表面がゲートとなり、電荷を検出するイオン感応部として働くことになる。

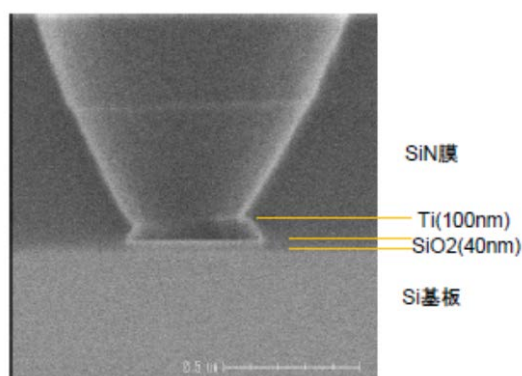


図 2: 底部に FET を備えた井戸構造

(2) 拡張 DLVO 理論を用いた脂質膜で覆われた微小井戸におけるイオン拡散メカニズ

#### ム解析

基板支持脂質膜の界面構造を評価するために、ファンデルワールス力、電気二重層力、水和力を考慮した、拡張 DLVO 理論に基づく全相互作用エネルギー計算を行った。

図 3(a) に、中性脂質膜と SiO<sub>2</sub> 基板の組み合わせにおける、基板と脂質膜間の距離 ( $D$ ) に対する全相互作用エネルギーのプロットを示す。中性脂質膜では電解質 (KCl) 濃度にはほぼ依存せず、 $D = 1.9 \text{ nm}$  で最安定構造をとることがわかった。これは、すでに報告されている脂質膜-基板間の水層の厚さの実測値 ( $D \approx 2 \text{ nm}$ ) とよく一致している。アニオン性およびカチオン性脂質膜でも同様に計算したところ、最安定構造はそれぞれ  $D = 3.8$

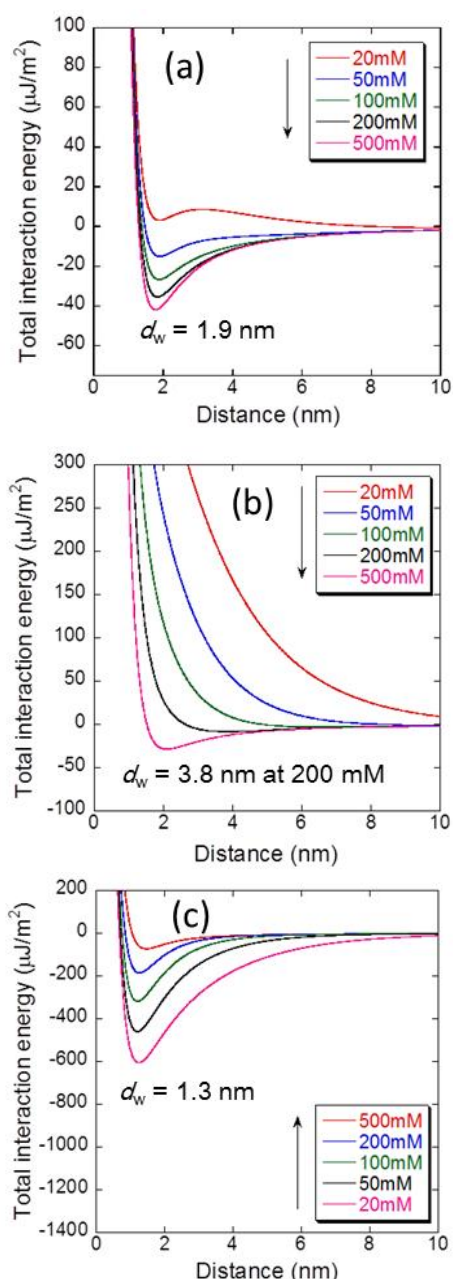


図 3: SiO<sub>2</sub> 基板上の脂質膜における全相互作用エネルギー (a) 中性脂質膜、(b) アニオン性脂質膜、(c) カチオン性脂質膜

nm、 $D = 1.3$  nm となった。負に荷電した  $\text{SiO}_2$  表面と荷電脂質膜との間の電気二重層力が界面における水層の厚さの変化に重要な寄与をしていることが示唆される。実際の系ではアニオン性脂質で最もイオンリークが大きく、中性になるに従いリークが減少する。また、カチオン性脂質濃度が増すと急激にリークが低減する。本計算で得られた  $D$  の荷電脂質依存性も同様な傾向を示し、脂質膜組成がアニオン性から中性になるに従い  $D$  値は減少し、カチオン性が増すと急激に減少する。この結果は、基板-脂質膜間の距離の荷電脂質依存性がイオンリークに大きく寄与していることを示唆している。

### (3) 脂質膜で覆われた微小井戸の特性評価：表面材質の影響

中性付近において負に帯電した  $\text{SiO}_2$  表面の代わりに、正に帯電した  $\text{Al}_2\text{O}_3$  表面を持つ基板を用いた時の全相互作用計算を行い、イオンリーク特性などの物性との関連を検討した。

アニオン性脂質膜と  $\text{Al}_2\text{O}_3$  表面の組み合わせにおける結果を図 4(a) に示す。電解質濃度によらず  $D$  の減少と共に負に発散しており、基板と脂質膜が物理的に接触をすることが予想される。これは、側方拡散特性は小さい

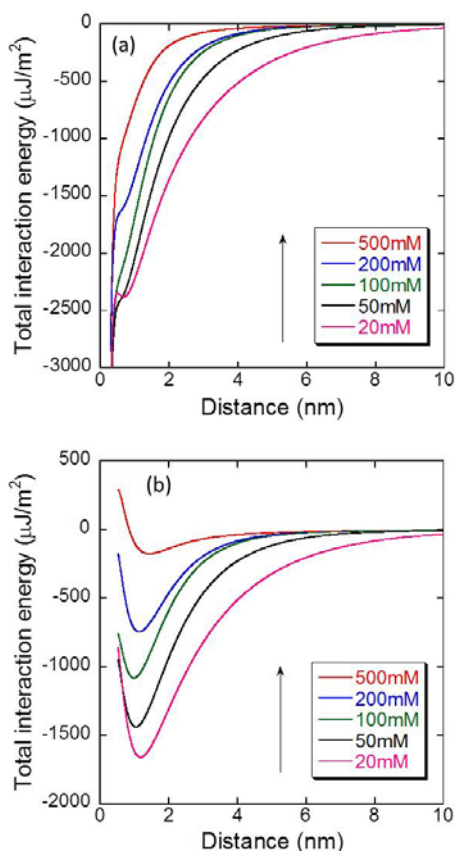


図 4:  $\text{Al}_2\text{O}_3$  基板上的のアニオン性脂質膜における全相互作用エネルギー (a)  $\lambda_0 = 0.26$  nm, (b)  $\lambda_0 = 0.36$  nm.

ながらも維持されているという実験結果(拡散定数  $0.33$   $\text{m}^2/\text{s}$ )と反している。一方、 $\text{Al}_2\text{O}_3$  表面における水和力は  $\text{SiO}_2$  表面における水和力よりも大きいことが指摘されている。そこで  $\text{Al}_2\text{O}_3$  表面の水和力の減衰長( $\lambda_0$ )を  $\text{SiO}_2$  表面における  $0.26$  nm から  $0.36$  nm として再評価した (図 4(b))。安定構造は  $D \sim 1.0$  nm となり、水和力の減衰長を考慮すると、 $D \leq 1.0$  nm 以下において水層はバルクではなく、流動性が低い水和水としての特性を示すと考えられる。この計算結果は、低い側方拡散定数や水層を通したイオンリークがないという実験結果とよく合致しており、表面材質により微小井戸の特性を制御可能であることが示唆される。

### 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 2 件)

- ① Yoshiaki Kashimura, Azusa Oshima, Koji Sumitomo, “Fabrication of nanobiodevices that utilize the function of membrane proteins”, NTT Technical Review, **14**, 2016. 査読無
- ② 榎村吉晃、大嶋梓、住友弘二、「膜タンパク質の機能を利用した微小井戸型ナノバイオデバイスの創出」NTT技術ジャーナル、6月号 査読無

[学会発表] (計 10 件)

- ① Yoshiaki Kashimura, Azusa Oshima, Koji Sumitomo, Hiroshi Nakashima, “Mechanism of ion diffusion from/into microwells sealed with a lipid membrane”, KJF-ICOME2016, Sep. 4-7, 2016, Across Fukuoka (Fukuoka, Fukuoka).
- ② Koji Sumitomo, Azusa Oshima, Aya Tanaka, Yoshiaki Kashimura, Yukihiko Tamba, “Raft like domain at a lipid bilayer suspended over microwells”, KJF-ICOME2016, Sep. 4-7, 2016, Across Fukuoka (Fukuoka, Fukuoka).
- ③ 榎村吉晃、大嶋梓、住友弘二、中島寛、「脂質膜でシールした  $\text{Si}$  基板上的の微小井戸におけるイオン拡散メカニズム」第 77 回秋季応用物理学学会講演会、2016.9.13-16. 朱鷺メッセ (新潟県・新潟市)
- ④ 大嶋梓、榎村吉晃、住友弘二、中島寛、「人工脂質二分子膜の浸透圧による変形」第 77 回秋季応用物理学学会講演会、2016.9.13-16. 朱鷺メッセ (新潟県・新潟市)
- ⑤ 河西奈保子、Gonzalves、Watanabe、榎村吉晃、後藤東一郎、田中あや、塚田信吾、住友弘二、中島寛、「ナノピラーと脂質支持膜を用いた神経細胞のパターニング」第 39 回日本神経科学会、2016.7.20-22.

- パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- ⑥ Yoshiaki Kashimura, Azusa Oshima, Koji Sumitomo, Hiroshi Nakashima, “Formation of lipid bilayer suspended over microwells on Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> surface”, ICNME2016, Dec. 14-16, 2016, Kobe Convention Center (Kobe, Hyogo).
  - ⑦ 樫村吉晃、大嶋梓、中島寛、「脂質膜でシールした微小井戸における BSA コーティングの効果」第 6 4 回春季応用物理学会講演会、2017.3.14-17. パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
  - ⑧ 樫村吉晃、大嶋梓、中島寛、「拡張 DLVO 理論を用いた脂質膜で覆われた微小井戸におけるイオン拡散メカニズム解析」第 7 8 回秋季応用物理学会講演会、2017.9.5-8. 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)
  - ⑨ 上野祐子、樫村吉晃、古川一暁、「ベンケル内部から放出された化学物質の グラフエンアプタセンサによる検出」日本分析化学会第 6 6 年会、2017.9.9-12. 東京理科大葛飾キャンパス (東京都・葛飾区)
  - ⑩ 樫村吉晃、大嶋梓、住友弘二、中島寛、「拡張 DLVO 理論に基づく脂質膜で覆われた微小井戸の特性評価：表面材質の影響」第 6 5 回春季応用物理学会講演会、2018.3.17-20. 早稲田大学早稲田キャンパス (東京都・新宿区)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：脂質二分子膜基板  
発明者：樫村吉晃、大嶋梓、中島寛  
権利者：日本電信電話株式会社  
種類：特許  
番号：特願 2017-164364  
出願年月日：2017 年 8 月 29 日  
国内外の別： 国内

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

樫村 吉晃 (KASHIMURA, Yoshiaki)  
日本電信電話株式会社 NTT 物性科学基礎研究所・機能物質科学研究部・主任研究員  
研究者番号：90393751

### (2) 研究分担者

大嶋 梓 (OSHIMA, Azusa)  
日本電信電話株式会社 NTT 物性科学基礎研究所・機能物質科学研究部・研究員  
研究者番号：90751719