

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15153

研究課題名(和文) AFMおよびイオン電流計測の統合に基づく創薬標的イオンチャネル解析システムの開拓

研究課題名(英文) Development of the ion channel screening system by the hybrid use of AFM and Galvanometer

研究代表者

杉浦 広峻 (Sugiura, Hirotaka)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・助教

研究者番号：10844805

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、イオンチャネルの創薬スクリーニングに向けて、脂質二重膜を有するマイクロ流体デバイスに膜タンパクを導入し、特異的な電流検出器でイオンチャネルの特性とデバイス上の空間位置を検出、AFMでイオンチャネルの状態を同時スキャンできるようなデバイスの要素技術検討を行った。マイクロ流体デバイスは、脂質二重膜を有機溶媒の汚染がない状態で安定的に形成する手段を実現した。また、誘電泳動を用いた膜タンパクの強制的な導入手法を実現した。イオンチャネルの特性と空間位置検出デバイスについては、原理的な実証が完了した。イオンチャネルをスキャンするAFMについては高感度カンチレバーを実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、AFMおよびイオン電流計測の統合にもとづく創薬標的イオンチャネルの解析システムを開拓する。近年、in-vitro系に細胞膜環境を再現することで、創薬標的となるイオンチャネルを評価するスクリーニング手法が発達している。しかしながら、実験プロトコルやイオンチャネルの動態そのものに不確実性が大きく、光学顕微鏡による観察も難しいことから、実験の正確性、再現性の向上が課題となっている。本研究より、偽陽性検出リスクの抑制や、複雑なイオンチャネルの動態解析が可能となる。これは、とりわけ化学受容性評価に正確性を要するイオンチャネル創薬の領域で必要不可欠な基盤技術となる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we introduced ion channels such as membrane proteins into a microfluidic device with a lipid bilayer membrane for drug screening of ion channels, detected the characteristics of ion channels and their spatial location on the device with a specific current detector, and investigated the elemental technology of the device that enables simultaneous scanning of ion channel states with AFM. For the microfluidic device, we realized a stable means of forming lipid bilayers without organic solvent contamination. We have also realized a method for the forced introduction of membrane proteins using dielectrophoresis. A proof-of-principle demonstration of the ion channel characterization and spatial position sensing device was completed. A highly sensitive cantilever for AFM scanning of ion channels was realized.

研究分野：マイクロナノ計測デバイス

キーワード：MEMS microfluidics force sensor micro-TAS 水晶振動子

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞膜に存在するイオンチャネル (図 1) は、創薬ターゲットとしての潜在的価値が大きく、その特性を評価する手法に大きな関心が集まっている。これは、イオンチャネルの化学受容性により、細胞の代謝を変調できるからである。たとえば、細胞内膜系の transient receptor potential (TRP) cation channel はアルツハイマー、免疫不全、難聴など、Ryanodine Receptor (RyR) は悪性高熱症、神経変性疾患、不整脈などの創薬標的であることが知られている。細胞内膜系には、このようなチャネルが無数に存在するとされており、イオンチャネル創薬の本質は、これらのチャネルのリガンド受容性を検証することである。近年、膜タンパク合成、改変技術が急速に発達したことで、パッチクランプ法の自動多チャンネル化による高効率創薬スクリーニングの市場が、加速度的に拡大している。一方で、計測対象外であるチャネルの偽陽性信号を原理的に排除できないため、計測結果の信頼性は十分ではない。そこで、細胞膜環境を再現したマイクロデバイスを用いて、特定のイオンチャネルを計測するスクリーニング手法が発達してきた。しかしながら、電気特性計測に基づく手法のみでは精製したイオンチャネルの人工膜上の状態を観測することが難しく、計測結果の定性的理解を困難にする原因となっていた。そこで本研究では、環状配置電極、液中 AFM をシステム統合することで、電気特性計測の対象のイオンチャネルを素早く探索し、その状態を観察可能とする、イオンチャネル解析システムを開拓する。

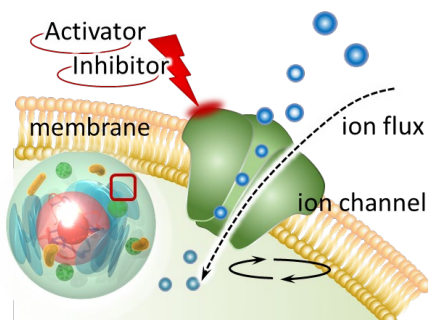


Fig. 1 イオンチャネルの化学受容

本研究の核心は「イオンチャネルの化学受容性評価において、チャネルの構造可視化を伴う電気特性計測は実現可能か」という計測工学的知見の探求である。従来手法では、イオンチャネルの再構成状態を確認できないため、理想的条件を盲信した実験、解釈が進められてきた。また、複雑な動態を評価するため、多数の比較実験を必要とした。以上のことから、より直接的で信頼性の高い解釈を得るには、計測対象のイオンチャネルを精度良く探索し、状態を可視化する技術の開拓が急務である。

2. 研究の目的

本研究は、創薬標的となるイオンチャネルの化学受容特性を評価するため、電気化学計測技術と AFM による動態のイメージング技術を併用したシステム統合技術を開拓し、不確定要素が少なく、信頼性の高いイオンチャネルの評価を実現することを目的とする。より具体的には、(I) 微細加工技術によって形成した環状配置電極アレイと自動平衡ブリッジによる位置検出機能(位置検出精度 10 nm) を実装したイオンチャネル解析デバイスを実現すること、(II) 液中 AFM 技術を実装したイオンチャネル解析システムによって、電気化学計測中のイオンチャネルの状態(タンパクの大きさ、結合数、咬合状態、開口径) を撮像可能とすること、(III) 理想状態で脂質膜に再構成された計測対象のイオンチャネルの化学受容性を選択的に計測すること、以上の 3 項目を達成する。これにより、計測対象外チャネル由来の偽陽性を検出するリスクを排除し、さらに電気化学的な信号だけでは推し量れない複雑な動態(たとえば、複数のサブステート物理的解釈、突然の活性化、不活性化の要因など) を解明することを目的とする。また、計測対象とするイオンチャネルは、細胞内膜系に存在するチャネル(たとえば、TRPML, RyR, そのサブファミリー) を想定している。これらは生化学、薬理学的に未だ特性が十分に解明されていないためである。

3. 研究の方法

前述の研究目的を遂行するため、以下に示す 3 つの項目を遂行する。

- ・微細加工技術を用いたイオンチャネル解析チップの実現
- ・環状配置電極を用いたイオンチャネルの脂質膜上の位置探索技術の実現
- ・液中 AFM の実装によるイオンチャネルの構造、動態の可視化の実現

4. 研究成果

【 微細加工技術を用いたイオンチャネル解析チップの実現 】

イオンチャネルと AFM のようなスキニングプローブ顕微鏡を統合する場合において、基礎的な原理検証を行った結果、従来の脂質二重膜形成手法では、脂質分散溶媒となるデカンが、人工脂質二重膜形成領域において局在化しているため、凝着力が大きいことがわかった。これは SPM の介入が非常に難しいことを示している。また、膜ドメインをスキャンするプローブ顕微鏡が膜を観察できないという状況に直面した。そこで、まずはこの問題を早急に解決する必要があった。

そこで下記のような実験デバイスを作製した。図 2 に計測システムの概要を示す。脂質二重膜を形成する機構は、アクリル板を切削した 2 対の円筒形のマイクロウェルになっており、互いに

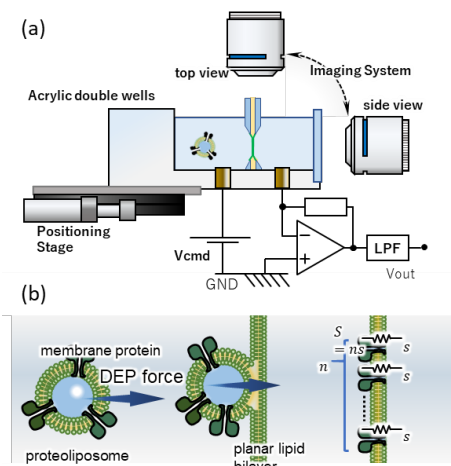


Fig. 2 (a) Overview of the membrane protein analysis and (b) conceptual of the membrane protein introduction

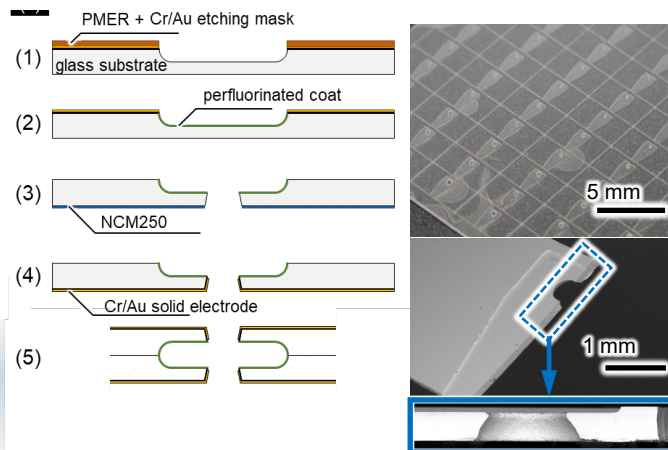


Fig. 3 Fabrication process of the separator using micromachining technique.

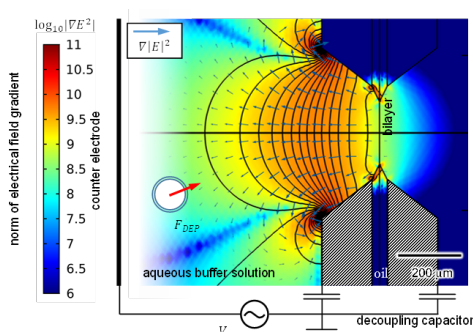
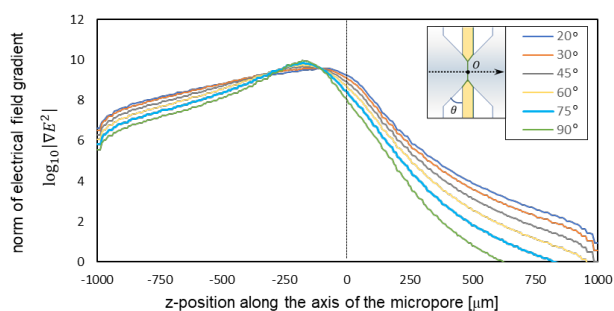


Fig. 4 Exerted electrical field to introduce the proteoliposome quickly into the lipid bilayer



交錯した状態で配置されている。このマイクロウェルに図 3 のような、特異的な脂質二重膜形成器具を作製した。この脂質二重膜形成器具は、脂質分子が接する生研用バッファ溶液と脂質分散有機溶媒を完全に独立に供給できる構造になっており、界面のメニスカスをコントロールすることで、脂質分散有機溶媒をバッファの存在するチャンバに供給することなく、安定的に膜を形成することができる。脂質を分散させた有機溶媒を滴下し、続けて電解質を含むバッファ水溶液をそれぞれのウェルに滴下することで、これにより、水溶液の液滴が接触した領域に脂質二重膜が形成される。この脂質二重膜は、液滴に供給した膜タンパクを取り込むことができ、細胞膜と同様の環境をデバイス上に構成することができる。

以上の方法によって、脂質分散有機溶媒を分析デバイスに供給することのない、即ち、凝着力の高い脂質分散液を SPM が介入する領域にリークさせない分析デバイス機構が実現できた。

また、本デバイスで、もう一点非常に重要な検討項目があることが判明した。従来、イオンチャンネルなどの膜タンパクの導入は、膜画分の直接導入、もしくはプロテオリポソームなどの小胞を拡散現象に頼って確率的に供給するという手法が取られていた、しかしながら、この手法では、SPM を始めとするさまざまな機会構造が存在する本手法において、非親水性の領域に集中的に検出対象の膜タンパクがトラップされてしまい、後工程の計測がうまく機能できないということがわかった。

そこで、プロテオリポソームの形態で供給した供給した膜タンパクを、誘電泳動力を用いて脂質二重膜に迅速に供給する方法を開発した。誘電泳動によって液中の物体を操作するためには、操作対象の物体は、環境と異なる複素誘電率を有する必要がある。本システムでは、膜タンパクをリポソームと呼ばれる球殻形状の脂質二重膜に再構成した状態で供給するため、リポソームの複素誘電率を調整する必要がある。リポソームの複素誘電率は、通常の場合内部が水溶液のため、環境とほぼ同一の値となる。そこで、複素誘電率調整のために、遠心式のリポソーム形成手法によって、リポソームの内部に高濃度のスクロス溶液を内包させる方法と、そのスクロス溶液に更にポリスチレンビーズを内包させる方法を利用する。これは、遠心チューブにガラスキャピラリを把持し、遠心チューブに貯められた脂質分散オイル、緩衝液に向けて水滴を打ち込む方法である。したがって、ガラスキャピラリに蓄えられた液体が、最終的に形成されたリポソームの内水層になる。図 4 に、形成したリポソームの位相差画像と蛍光画像を示す。位相差画像では、内水層のスクロスの屈折率が大きいため、リポソームは暗色を呈する。蛍光画像では、蛍光染色した表層の脂質が赤く見るとともに、内水層に染色したカルセインが緑に見える。ビーズの入ったものでは、内水層の染色に変えて、100 nm と 500 nm の蛍光ビーズを使用したため、高濃度の緑色の輝点が観察できる。作製できたリポソームは単分散ではないが、およそ 10

□m オーダであった。平板電極で誘電泳動の極性を調べたところ、いずれも 1MHz までは負の誘電泳動を示し、10MHz で誘電泳動は抑制された。高周波における正の誘電泳動は装置の性能限界から、本研究では観測できなかった。誘電泳動力を形成するもう一つの要素は、対象物に対して与える電解の強度の勾配である。本研究では、非対称な電場を形成するため、液滴を分断し、脂質二重膜を形成するセパレータに傾斜付きの穴を形成する方法を採用した。これにより、負の誘電泳動によって、リポソームが脂質二重膜に向かって引き寄せられるようにした。セパレータの両表面には、クロム、金のベタ電極を形成した。上記の機構を用いて、誘電泳動を用いたリポソームの脂質二重膜に向けた導入の実証実験を行った。実験に用いた機構と、実験動画を図 5 に示す。実験動画より、リポソームが脂質膜の存在する領域に向けて引き寄せられるのがわかる。例えば図 3(c-1)の軌道で導入されたリポソームは、図示した移動区間を 6.3 秒で動いており、これは従来の自己拡散を期待する導入手法より、非常に高速である。

以上の方法によって、微細加工技術を用いたイオンチャネル解析チップの要素技術を実現することができた。

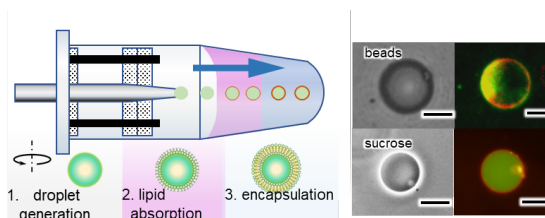


Fig. 7 Overview and results of the liposome formation using a centrifugal device.

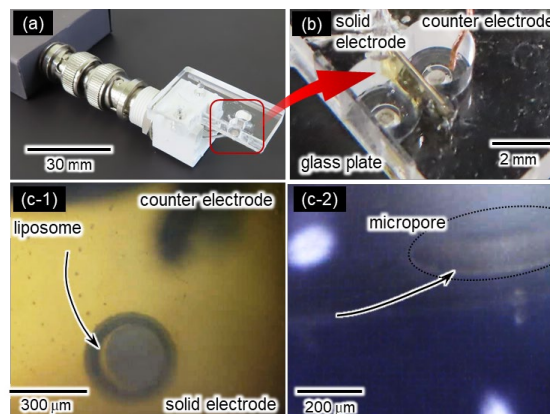


Fig. 5 (a) Experimental device configuration, (b) the composition of the electrode for DEP and (c) the result of the liposome introduction into the lipid bilayer.

【 ii), 環状配置電極を用いたイオンチャネルの脂質膜上の位置探索技術の実現 】

脂質二重膜上の膜タンパクの位置検出を伴う電気生理計測デバイスについて、その原理的な検証を行った。電気生理学的な計測を行うにあたって、膜タンパクに与える電氣的な摂動は、多くとも数十 mV 程度であるから、その信号を分割して空間的なバランスを検出できる程度に微小信号を安定的に検出する必要がある。市販の高額な電流検出器を複数並べるのが単純で簡潔なソリューションであるが、1台 200 万円以上というコストの面から非常に現実的ではない。そこで、電流検出器能の根幹となる、トランスインピーダンスアンプ、およびローパスフィルタ機構などを、本アプローチに向けて集積化し、同時マルチチャネルの電流検出器として使える手法を開拓した。また、外部の SPM の介在によって、電位レベルの微小に異なる機構が介在した際に、安定的にリファレンスを取れるように、従来の 2 電極膜電位固定の手法を変更し、3 電極式とした。

図 6 に作製した回路を示す。微小電極の電位を極低ノイズで検出できるように、トランスインピーダンスアンプには入力バイアス 3 fA の LMP 7721 / Texas Instruments を使い、DAC、ADC には低グリッチ、16bit 分解能のものを使用した。安定的な電位計測のために、リファレンスの電極は BAS の銀塩化銀参照電極の直後から同軸シールド機構を採用し、FB は実時間性能を重視して、アナログ FB 機構を搭載した。実装したデバイスを用いて、50 mVDC 印加の状態で α -ヘモリシンのナノポア計測を行った場合の結果を示す。本手法によって、1ch/¥5,000 程度の超高精度イオン電流検出器が実現できた。さらに、この機構を複数並べることで、抵抗ブリッジ、もしくはフェーズドアレイ検出のような手段が実現できる。

本手法を用いて、イオンチャネルの探索を行うことを目標としていたが、複数デバイスを集積化する部分については、未達成の状況で本研究の研究機関の終了を迎えてしまった。しかしながら、

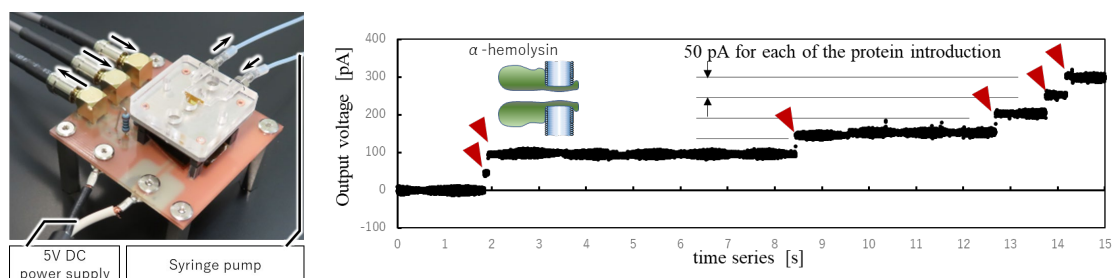


Fig. 6 Demonstration of the pA current detection for the position detector of the ion channel on the lipid bilayer on the microfluidic device

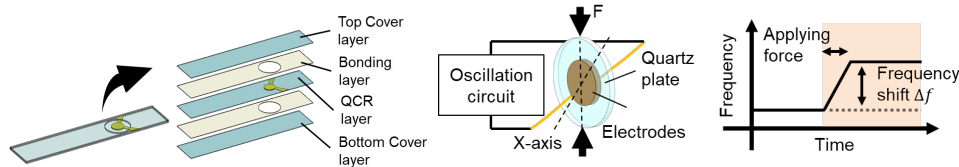


Fig. 7 Conceptual view of the fabricated quartz cantilever for the ion channel scanning.

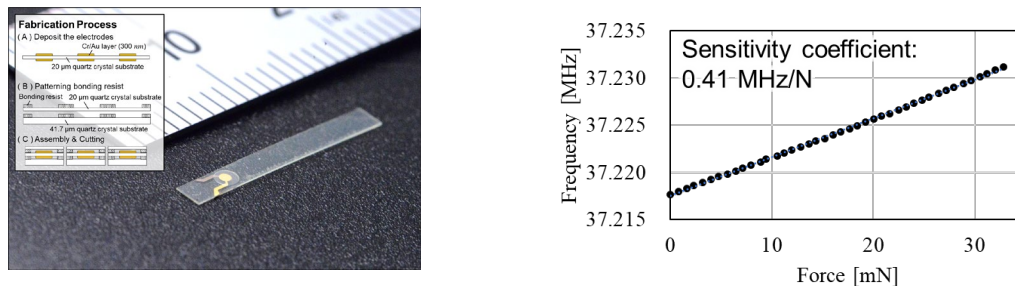


Fig. 8 Fabricated quartz cantilever and the characteristics of the force sensitivity.

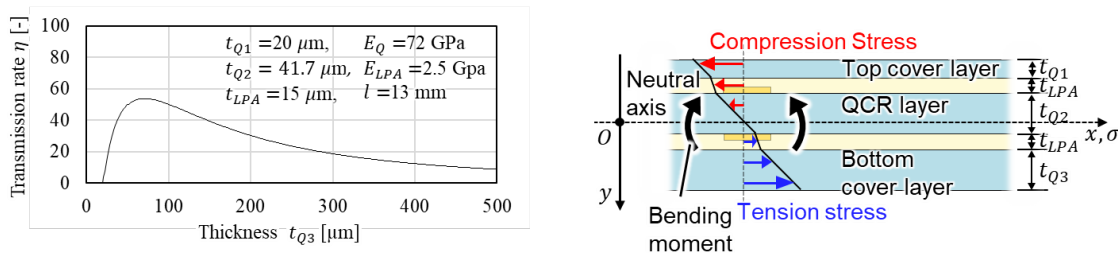


Fig. 9 Theoretical optimization of the fabricated quartz cantilever

研究は継続的に進めており、近く学術誌にてその成果を公表予定である。

以上のことから、環状配置電極を用いたイオンチャネルの脂質膜上の位置探索技術について、一定の将来への展望や技術水準の到達を示すことができた。

【 (iii), 液中 AFM の実装によるイオンチャネルの構造、動態の可視化の実現 】

イオンチャネルを可視化する高感度力計測プローブの開拓を行った。まず、既存の AFM の性能について文献等による調査を行った結果、AM-AFM によってイオンチャネルのダイナミックな応答をマイカ基板上で検出することがわかった。そこで所属研究室において、同様の市販型 AFM が存在するので、試用してみたところ、イオンチャネルの存在を検出するに十分な分解能がアられなかった。これは、一意に空間分解能が欠如している点が問題となっている。そこで、空間分解能をより高感度に引き出すための、FM 方式に変更を行った。通常、光てこ圧電励振式の FMAFM は、水溶液中で高い感度を出すことが難しい。これは、感知レバの Q ファクターが極端に低い環境だからである。この方法を打破する手法が様々提案されているが、申請者は所属研究室の水晶振動子を用いた力計測カンチレバーの作製に着手した。作製した水晶振動子のカンチレバーは通常のシリコン振動子の FM 方式と違い、フラッピングを必要とせず、厚み滑り方向のモードを励起できるため、水溶液中であっても MHz オーダの高い発振周波数を得ることができる。本研究機関では、カンチレバーを用いて直接イオンチャネルの検出を行うには至らなかったが、その高い力検出特性は今後研究対象としての高い可能性を見出すことができた。

図 7-9 に水晶振動子を用いたカンチレバーを示す。カンチレバーは水晶振動子の振動子層（円形電極の成膜済）と、防水カバー用の水晶振動子をパッケージした構造になっている。これにより、水溶液中でも、空気中と同等の HIGH-Q 振動子として仕様が可能である。AT-CUT 水晶は材料特性として、厚み滑り振動を励起している領域に引張もしくは圧縮応力が加わると、線形的に発振周波数が変動する。その歪感度はピエゾ抵抗式のシリコンセンサなどに比較して非常に大きく、また厚み滑り振動を使用した場合、高い発振周波数を使用可能である。これは即ち、周波数変調デバイスとして使用した際の信号検出感度を高くすることができることを意味する。我々が今回作製したカンチレバーでは、力計測感度が 0.41 MHz/N を達成することができた、またこの過程において、水晶の積層構造の最適化、即ち振動層の厚みの配置関係の最適化などを行った。現時点では、従来の液中 AFM にはまだ及ばないが、発振周波数としては従来手法の 10 倍以上の領域にあり、構造のさらなる小型化プロセスに着手すれば、その性能を大きく改善する見込みがある。本研究では 2 mm x 14 mm の矩形形状プローブとしているが、これは水晶の構造としての難加工に起因している。現在、ウェットエッチング、ドライエッチング双方のプロセス技術拡充によって、より複雑形状の水晶センサを作成可能な段階にあり、今後これらの手法を取り入れた劇的に感度の高いセンサを開発していく予定である。

以上のことから、イオンチャネルの探索とはいかなかったが、フォースプロービングによるチャネルの撮像のための機関技術として、一定の水準を達成することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shiro Watanabe, Hirotaka Sugiura and Fumihito Arai	4. 巻 7
2. 論文標題 Stiffness measurement of organoids using a wide-range force sensor probe fabricated using a quartz crystal resonator	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 IEEE Robotics and Automation Letter	6. 最初と最後の頁 2535-2540
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1109/LRA.2022.3144766	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 杉浦広峻, 大崎寿久, 三村久敏, 山田哲也, 竹内昌治
2. 発表標題 誘電泳動力を用いた平面脂質平面膜に対する高速リポソーム導入
3. 学会等名 日本機械学会 ロボティクスメカトロニクス講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hirotaka Sugiura, Toshihisa Osaki, Hisatoshi Mimura, Tetsuya Yamada, Shoji Takeuchi
2. 発表標題 Dielectrophoretic introduction of the membrane proteins into the BLM platforms for the electrophysiological analysis systems
3. 学会等名 International Conference on intelligent robotics and systems (IROS) 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉浦広峻, 渡邊史朗, 新井史人
2. 発表標題 3軸水晶振動式力センサの差動平衡化と電気生理学への応用
3. 学会等名 日本機械学会 ロボティクスメカトロニクス講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shiro Watanabe, Hirotaka Sugiura and Fumihito Arai
2. 発表標題 Wide-range force sensor probe using quartz crystal resonator
3. 学会等名 International Symposium on Micro/nano mechatronics and Human Science (MHS) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shiro Watanabe, Hirotaka Sugiura and Fumihito Arai
2. 発表標題 Stiffness measurement of organoids using a wide-range force sensor probe fabricated using a quartz crystal resonator
3. 学会等名 International Conference on Robotics and Automations(ICRA) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 脂質二重膜の形成方法並びにそのための隔壁及び器具	発明者 杉浦広峻, 大崎寿久, 三村久敏, 山田哲也, 竹内昌治	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-91099	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------