

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23710146

研究課題名(和文) マイクロ流路のプラグ流集積による脂質二分子膜アレイの形成と計測

研究課題名(英文) Formation and measurement of arrayed lipid bilayer membranes via accumulation of aqueous plugs in a microfluidic device

研究代表者

西迫 貴志(Nisisako, Takasi)

東京工業大学・精密工学研究所・助教

研究者番号：10431983

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、基板上に作製した微細な流路(マイクロ流路)の分岐構造を利用した、脂質二分子平面膜の作製および電気生理計測に関する研究を行った。マイクロ流路のT字、十字といった分岐構造を利用して、ナノリットルオーダーの電解質水溶液の液滴を脂質を含む有機相中に連続生成し、流路下流域において有機相のみを選択的に吸引・除去することで、水滴同士を互いに接触させ、脂質平面膜の並列構造を作製することができた。さらにマイクロ流路に組み込んだ微細電極を用い、脂質膜および膜に組み込まれたチャンネル形成物質に対する電気生理計測を行うことができた。

研究成果の概要(英文)：We studied formation of planar lipid bilayer membranes and their electrophysiological analysis by using microfluidic channels fabricated on a chip. Nanoliter-sized aqueous droplets were produced at T- or cross-junctions into an organic stream containing lipid molecules. At the downstream, the organic phase was selectively aspirated and removed, and those aqueous droplets were brought into contact, forming arrayed droplet interface bilayers (DIBs). Furthermore, electrical measurement on the formed DIBs and incorporated channels was also demonstrated.

研究分野：複合新領域

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：ナノバイオ マイクロ・ナノデバイス 流体工学

1. 研究開始当初の背景

(1)

細胞膜に特異的に組み込まれ、膜内外の物質輸送やエネルギー変換を司る「膜蛋白質」の機能解析が、さまざまな病気のメカニズムの解明や創薬につながるとして近年注目されている。しかし、そうした機能解析をハイスループットに行える汎用的手法は未だ確立されていない。

(2)

従来の膜蛋白質の機能解析法としては、細胞にガラス管微小電極を挿入し電気生理計測を行うパッチクランプ法が一般的であり、近年では1日あたり数千のデータポイントを得られるハイスループットスクリーニング (HTS) 用自動化装置も商品化されている。しかしパッチクランプ法は、例えば細胞内小器官のようにガラス管微小電極のアクセスが困難な場所にあるチャンネルには適用できず、また単純且つコントロールされた系でチャンネル解析を行いたい場合には不向きである。一方、そのような膜蛋白質を純粋な系で解析できる手法として、人工的に作製した脂質二分子平面膜に、精製した膜蛋白質を再構築して電気生理計測を行う手法 (脂質平面膜法) がある。しかしこの手法は作業者の熟練を要する極めてスループットの低い手法であり、ハイスループット (HT) 化を目的とした研究事例はあるものの、現状で多数の脂質二分子平面膜を迅速に作製でき、且つ脂質膜に対し迅速に電気計測を行える手法の開発には至っていない。

(3)

従来の脂質二分子平面膜の作製法として、水面に脂質分子の単分子膜を展開し、直径数十～数百 μm の微小孔をもつ平板を上下させる方法があるが、再現性の良い膜形成には作業者の高い熟練度が必要とされ、HT 化は困難である。一方、予め2つの油水界面に脂質分子の単分子膜を作製しておき、それらを貼り合わせる手法が近年数多く報告されている (Funakoshi *et al.*, *Anal. Chem.* 2006; Malmstadt *et al.*, *Nano Lett.* 2006; Holden *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 2007)。しかし膜形成の HT 化の報告はわずかであり、また電気計測の HT 化は実現されていない。例えば Schmidt らは、ロボティクスにより 96well プレーットの油水界面に順次水滴を滴下し、2200 個以上の脂質二分子膜を約 3 時間で作製している (Poulos *et al.*, *Biosens. Bioelectron.* 2009) が、電気計測の HT 化には至っていない。一方、竹内らは微細孔 (直径 15–50 μm) を加工したパリレン薄膜 (厚さ 20 μm) とマイクロ流路を用い、1well 内への 25 個 (5×5) の脂質膜の同時形成に加えて複数ウェル間の同時並行電気計測を報告しているが、その個数は 2–3 個にとどまっている (Pioufle *et al.*, *Anal. Chem.*

2008)。

2. 研究の目的

(1)

そこで本研究では、(a)マイクロ流路を用いた微小液滴生成法、(b)マイクロ流路への微細平面電極の多数並列配置、の2つを組み合わせ、膜蛋白質を固定化した脂質平面膜アレイの作製と電気生理計測の両方をハイスループットに行うことのできる手法の確立を目指す。

(2)

細胞膜を対象としたパッチクランプ法の HTS 装置は既に製品化されているが、脂質平面膜法を対象とした HTS は実現されていない。その理由として、脂質平面膜作製の HT 化の事例が少なく、電気計測の HT 化の事例が無いことがあげられる。

(3)

これに対し本研究は、熟練を要する手作業や高価なロボティクスを要する従来手法と異なり、誰でも容易に使用でき低コストで導入可能な、脂質二分子膜の作製と電気計測の両方を HT 化可能な手法を開発する、前例のない試みである。本技術が確立された暁には、例えば未知の機能を有するイオンチャンネルの脂質平面膜法による HTS 解析が可能となるのみならず、例えば複数の細胞組織による活動 (例えば心臓組織の電気信号伝搬) をシミュレートするための強力なツールとしても、新しいサイエンスの分野を展開する可能性を秘めていると考えられる。

3. 研究の方法

(1)

【疑似ポアラス構造を有するマイクロ流路の製作】

マイクロ流路の材料と加工法として、シリコン樹脂 (PDMS) のソフトリソグラフィ、またはアクリル樹脂 (PMMA) のレーザ加工を検討し、主流路幅 20–400 μm 、副流路幅 10–100 μm 、深さを全域一様に 10–200 μm 程度とした流路を作製する。電気計測用の微小電極はリソグラフィとスパッタ処理を介して Ag/AgCl 電極の微細パターンを平面基板上に設けて微細溝基板と貼合せて用いるか、あるいは微細針状電極を流路内に挿入して用いることを検討する。

(2)

【脂質二分子平面膜アレイの作製】

マイクロ流路内で作製した脂質平面膜の膜厚を電気計測し、二分子膜の作製を確認する。一例として水相として電解質バッファ (KCl 水溶液等)、脂質溶液としてデカン、ヘキサデカン等の有機溶媒にリン脂質 (ホスフ

ァチジルコリン, ホスファチジルセリン等)を添加して用いる等, 安定した脂質二分子膜をより早く形成するための脂質, 有機相, 水相の好適な組合せについて検討する.

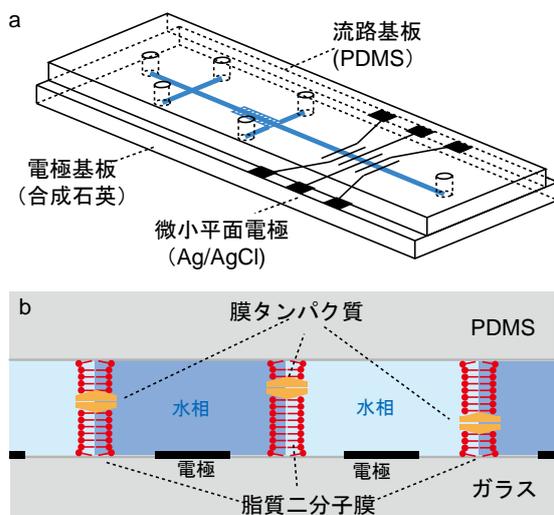


図 1. 本研究で作製する脂質平面膜作製・計測用マイクロ流路デバイスの例. (a)マイクロ流路チップ. (b)流路内側面図.

(3) 【脂質二分子平面膜アレイへの膜蛋白質の組込と電気生理計測】

イオンチャネルを組み込んだ脂質二分子平面膜アレイを作製し, 単一あるいは複数の膜を対象としたチャネル活性の電気測定を行う. グラミシジン, α -ヘモリシン等のバクテリア由来のチャネルを主に用い, 組込過程や組込後の単一チャネルあるいは複数チャネルの挙動をイオン電流の計測によって確認する.

(4) 【ハイスループット計測の試験】

マイクロ流路内での電気計測手法に関し, 流路内で静止した脂質平面膜に対して行う計測と, 流路内で二分子平面膜を緩やかに流動させた状態での計測 (シーケンシャル処理) が可能かについて検討を行う. また膜形成と電気計測の基本サイクルの所要時間を短縮するための諸条件の最適化を検討する. 単分子膜形成および二分子膜の形成・安定化に要する時間の短縮, マイクロ流路の長さや断面サイズ, 水相と脂質溶液の体積比率の最適化を行う.

以上の試験を, 1 サイクルに作製および電気計測を行う膜数を①単一, ②2-10 個, ③10 個以上と増加させて実施する. 流路の圧力損失や有機溶媒による壁面の膨潤のため多数の脂質膜を単一流路に直列配置することが困難な場合, チップ上に分岐・並列化した構造の利用を検討する.

(5)

【取り扱い対象の膜蛋白質の拡張】

前年度に用いたバクテリア由来の膜蛋白質に加え, 解析ターゲットとして有望な他の膜蛋白質 (例えば, ヒト由来の膜蛋白質) を取り扱えるように各種検討を行う. 具体的には, 脂質二分子膜への膜蛋白質の組込手法として, 直接挿入法以外の手法 (例えばリポソームを用いた膜融合法) の利用を検討する.

4. 研究成果

(1)

【擬似ポーラス構造を有するマイクロ流路の製作】

脂質二分子平面膜アレイの作製および膜を隔てた物質輸送の計測を行うためのマイクロ流路デバイス (図 1) として, 既存の合成石英流路に加え, 新たにアクリル樹脂 (PMMA) への機械加工あるいはレーザー加工の適用, または PDMS へのソフトリソグラフィの適用により, 主流路幅 100-200 μm , 副流路幅 20-50 μm , 深さを全域一様に 20-100 μm 程度とした微細溝を作製した. 電気計測用の微小電極として, Ag/AgCl ワイヤ電極を流路内に挿入した装置, およびガラス基板への Ag スパッタリングおよびリフトオフ工程による微細電極パターンの作製検討を行った.

(2)

【脂質二分子平面膜アレイの作製】

マイクロ流路内にて約 5 nL の水相液滴を連続的に生成して互いに接触させ, 脂質二分子膜の並列構造の作製を行った (図 2). 水相として電解質バッファ (例: 350mM KCl, 10mM HEPES, pH 7.4), 脂質溶液としてデカンあるいはヘキサデカンにリン脂質 (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) or 1,2-diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPhPC)) を添加して用いた.

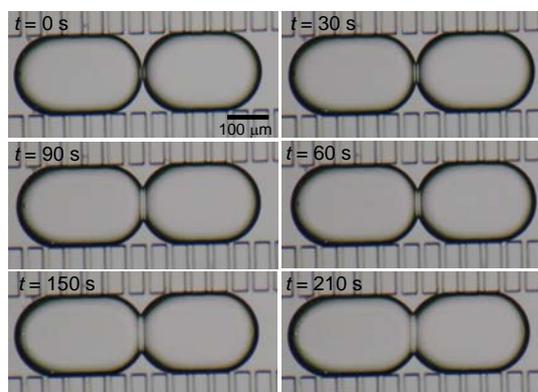


図 2. ナノリットル液滴間における脂質平面膜の形成および成長の様子. 脂質: DOPC (5 mg/mL in hexadecane).

(3)

【脂質二分子平面膜アレイへの膜蛋白質の

組込と電気生理計測】

イオンチャンネルとして α -hemolysin(α HL)を組み込んだ脂質二分子平面膜アレイを作製し、脂質膜を隔てた蛍光分子（カルセイン：Calcein, Mw = 622.55）の輸送を光学的に確認した。 α HL はモノマーをバッファ溶液（350 mM KCl, 10mM HEPES, pH 7.4）に添加して 10 nM–50 mM の濃度とし、カルセインを加えて 250 μ M としたものをドナー相、加えないものをアクセプタ相として用いた。脂質として DPhPC をヘキサデカンに添加して 20 mg/mL としたものを有機相として用いた。流路内で液滴を生成してドナー滴とアクセプタ滴を接触させて約 10 分放置したところ、アクセプタ滴側の膜近傍に蛍光強度の増大が見られ、 α HL によるナノ孔を介したカルセイン分子の脂質膜通過を確認した（図 3）。

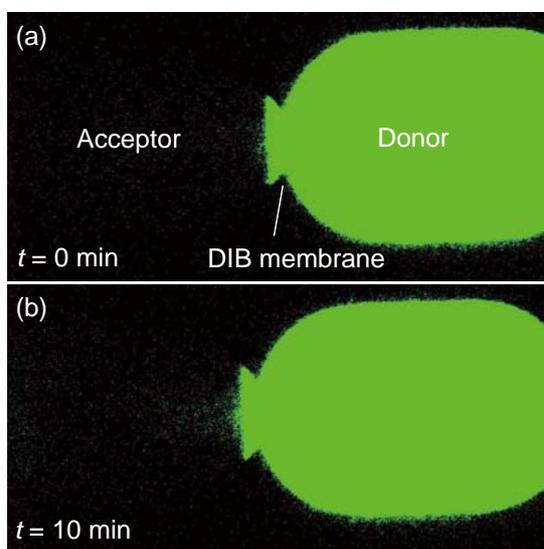


図 3. カルセイン分子の α HL ナノポアを介した脂質膜透過の蛍光観察. (a) 脂質平面膜形成直後 ($t = 0$) のドナー液滴およびアクセプタ滴の様子. (b) 10 分経過した際の様子.

流路外において液滴同士を接触させて脂質膜を作製し、電気生理計測を行い、チャンネル (α HL) の挿入による電気応答を計測し、また脂質によって異なる応答が得られることを確認した（図 4）。

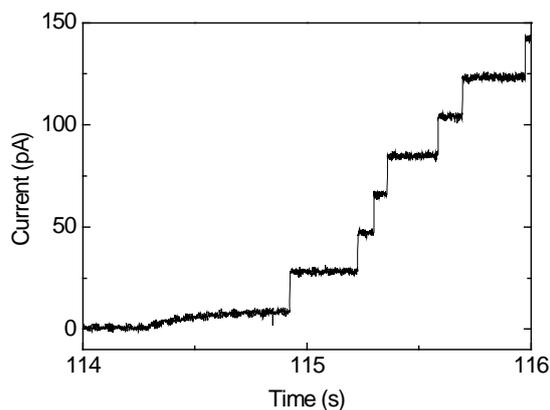


図 4. 単一の α -hemolysin の挿入によるステップ状電気応答（脂質：DPhPC）。

(4)

【ハイスループット計測の試験】

マイクロ流路内にて数ナノリットルサイズの水滴間に脂質二分子平面膜の並列構造を形成し、これらを介した物質移動の光学計測のハイスループット化のための諸条件の検討を行った。まず、流路内で静止した脂質平面膜（図 5a）に対して行う計測と、流路内で二分子平面膜を緩やかに流動させた状態での計測（シーケンシャル処理、図 5b）の試験を行った。さらに、油水界面への脂質単分子膜形成、および液滴間への脂質二分子平面膜の形成と安定化に要する時間の短縮化を目的とし、脂質分子の種類と濃度、液滴生成速度、液滴静置時間等の諸条件の検討を行った。

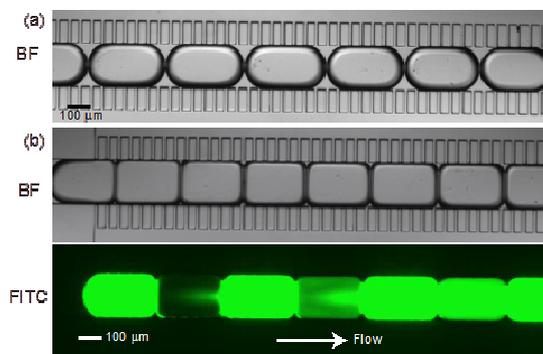


図 5. ナノリットル水滴間脂質平面膜アレイの形成. (a) 静止した水滴および脂質平面膜の並列構造. (b) 流動状態の液滴ならびに脂質平面膜アレイの光学顕微鏡観察ならびに蛍光観察.

(5)

【取り扱い対象の膜蛋白質の拡張】

前年度に用いた α -hemolysin に加えて、Magainin2, VDAC 等のチャンネル形成物質を使用し、蛍光分子カルセインの膜を介した輸送観察を試みた。また、脂質二分子膜への膜蛋白質の組込手法としてリポソームを用いた膜融合法を利用するため、水相にリポソーム（ ~ 200 nm）水溶液を用い、液滴間に脂質二分子膜を製作できるか試験を行った。

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 1 件）

- ① Takasi Nisisako, Shiva A. Portonovo, and Jacob J. Schmidt, Microfluidic passive permeability assay using nanoliter droplet interface bilayers, *Analyst*, 査読有, Vol.138, 2013, pp. 6793–6800, DOI:10.1039/c3an01314f.

〔学会発表〕（計 4 件）

- ① Takasi Nisisako, Microfluidic droplet-based drug permeability assay, 2013 International Conference on Small Science (ICSS2013), Las Vegas, NV, USA, Dec. 16, 2013.
- ② Takasi Nisisako, Shiva A. Portonovo, and Jacob J. Schmidt, Microfluidic passive permeability assay using nanoliter droplet interface lipid bilayers, Biophysical society 57th Annual Meeting, Philadelphia, PA, USA, Feb. 2–6, 2013.
- ③ Takasi Nisisako, Droplet microfluidics for manufacturing and analytical applications, 2012 International Conference on Small Science (ICSS), Orlando, FL, USA, Dec. 16–19, 2012.
- ④ Takasi Nisisako, Shiva A. Portonovo, and Jacob J. Schmidt, Microfluidic passive permeability assay using arrayed droplet interface membranes, The 16th international Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2012), Okinawa, Japan, Oct.28–31, 2012.

〔産業財産権〕

○取得状況（計 1 件）

名称：二分子膜の製造方法および二分子平面膜

発明者：西迫貴志，馬場崇弘

権利者：国立大学法人東京工業大学

種類：特許

番号：特許第 5057348 号

取得年月日：平成 24 年 8 月 10 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pme.pi.titech.ac.jp/staff/nisisako/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西迫 貴志 (NISISAKO, Takasi)

東京工業大学・精密工学研究所・助教

研究者番号： 1 0 4 3 1 9 8 3