

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：82704

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25246017

研究課題名(和文)人工細胞膜によるイオンチャネルの高速並列機能解析プラットフォームの構築

研究課題名(英文) Development of High-throughput Platform for Ion Channel Analysis Using Artificial Cell Membrane Systems

研究代表者

竹内 昌治 (Takeuchi, Shoji)

公益財団法人神奈川科学技術アカデミー・人工細胞膜システムグループ・プロジェクトリーダー

研究者番号：90343110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 26,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、イオンチャネルの機能を効率良く解析できるプラットフォームを構築することを目的とした。まず、マイクロチップ上で人工的に細胞膜を形成する技術を基盤とした膜プラットフォームの製作・集積化を行い、次にその膜の中に効率良く標的となるイオンチャネルを再構成する手法開発に取り組んだ。開発プラットフォームの実用性を検証するため、創薬で重要とされるイオンチャネルについて阻害剤・亢進剤を用いた機能評価を行い、特に一分子計測においてその有用性を示すことができた。本成果を受けて、提案システムを新規のイオンチャネル解析プラットフォームとして実用化することを目指している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a high-throughput platform for analyses of ion channel functions. A cell membrane model was artificially reconstructed on a microchip, in which we optimized the efficiency and reproducibility of the membrane formation and integrated the number of the membrane on a single chip. Accordingly, we examined reconstitution techniques of ion channels into the membrane on the chip, and finally verified the developed platform using functional assays of drug-target ion channels. The results demonstrated the feasibility of our platform, especially for precise ion channel analyses with a single-molecule level. Based on the developed technologies, we continuously improve the performance of the platform, hoping for practical use in drug screening of ion channels.

研究分野：生体融合MEMS、膜タンパク質チップ、構成的組織形成工学

キーワード：膜タンパク質(イオンチャネル) 薬剤スクリーニング 脂質膜 マイクロ・ナノデバイス

1. 研究開始当初の背景

イオンチャンネルは細胞膜上に存在する膜タンパク質であり、 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Cl^- 等のイオンを選択的に透過させ、膜電位の維持・変化を担っている。神経伝達系や感覚受容機構、心筋拍動周期などに関与し、生命維持に重要な膜タンパク質群である。創薬においては薬効(薬剤の標的として効用があるか)と薬害(副作用を及ぼさないか)の両面で重要とされ、中でも hERG チャンネルは心拍制御に深く関わっており、全ての新薬に対する安全性薬理試験が日・米・欧の各国において省令で定められている。その一方で、イオンチャンネルの機能計測に欠かせない電気生理技術は、訓練された技術者がガラス細管を細胞に押し当てて計測する古典的パッチクランプ法が今も主流であり、一日当たりを取得できるデータ数も極めて少ない。こうした計測技術革新の空白はイオンチャンネルを標的とした創薬の発展を遅らせている一因と考えられる。

人工的に形成した脂質二重膜 (Bilayer Lipid Membranes, BLMs) に膜タンパク質を再構成する人工細胞膜システムは、こうした従来の培養細胞を用いた研究手法に比べ、標的膜タンパク質の純粋な機能 (例えば、薬剤応答性など) を観測できるほか、低コスト化や短時間化の面でも利点を持つと考えられており、学術研究のみならず、創薬やバイオセンサ開発においても活用が期待される技術である。1960 年代の刷毛塗り法による脂質二重膜 (黒膜) 形成法に始まり、近年では、安定で再現性の良い BLM 形成技術を目指してマイクロ流体技術を応用した膜デバイスが多く開発されている。

2006 年に我々が発明した接触法 (Droplet Contact Method, DCM) は、簡単に再現良くかつ迅速に BLM を作成することができる。接触法は、脂質分子を分散させた有機溶媒中に水滴が存在すると、その表面に両親媒性の脂質の単分子膜が自己組織化によって形成され、この水滴 2 つが接触する界面では単分子膜が重なり合って脂質二重膜となることを利用している (図 1)。2006 年の初報以降、様々な研究グループで接触法を応用した研究が行われるようになった。我々はこの接触法を応用したこれまでの研究を通して、イオンチャンネル機能を一分子レベルで効率的に計測できるデバイスの基盤技術を研究・開発してきた。将来的にはこれらの成果を更に展開し、イオンチャンネルを標的とした新規薬剤開発を効率化する評価システムを構築すること、すなわち薬剤候補物質に対するイオンチャンネルの活性を高感度・高再現性・高速に機能評価するシステムを創ることを目指している。

2. 研究の目的

本研究では、我々がこれまでに研究を行ってきた人工脂質二重膜形成方法を発展させ、より汎用的なマイクロデバイスを作製し、そのデバイスにイオンチャンネルを再構成することで、イオンチャンネルの機能を高速・並列に解析可能なプラットフォームの基盤技術を構築することを目的とした。

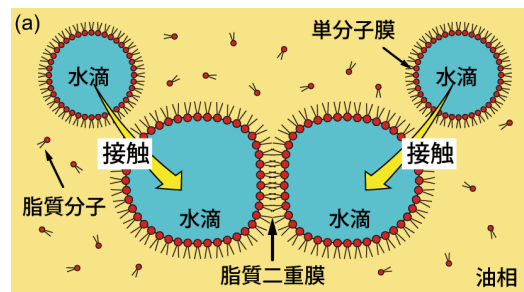


図 1. 液滴接触法による脂質二重膜の形成原理。

3. 研究の方法

(1) イオンチャンネル機能解析デバイスの作製

脂質二重膜を簡便・迅速かつ再現良く形成できるマイクロデバイスの研究を行った。評価デバイスには、イオンチャンネルを再構成し機能計測を行うため、脂質二重膜を安定的に形成できなければならない。また、微小電流 (ピコアンペアレベル) を高い時間解像度 (マイクロ～ミリ秒) で計測するため、脂質二重膜およびデバイスに良好な電気的特性が求められる。これらを目的としたデバイスの作製と評価を行った。

(2) イオンチャンネル機能解析デバイスの評価

マイクロデバイス上に形成された脂質二重膜に対して、イオンチャンネルを再構成し機能計測を行うことで、デバイスの評価を行った。まず、標的となるイオンチャンネルを効率良くデバイス中の脂質二重膜に再構成するための条件について検討した。その後、イオンチャンネルの機能観測を通してデバイスの性能評価を行い、デバイスの構造等の最適化のためのフィードバックを行った。

4. 研究成果

(1) イオンチャンネル機能解析デバイスの作製

接触法による脂質二重膜は、当初、液滴同士が直接接触した全面に形成していた。しかしながら、脂質二重膜はおよそ 5 nm と薄く、膜面積の増大と共に容易に不安定化し破裂する。そこで、液滴間にセパレータ (隔壁) を設置し、セパレータに設けたマイクロ孔で液滴が接触するようにすることで膜面積の制限を行った。膜面積の制限により、脂質二重膜の固有振動数は高周波数側に変化し、生活周波数域 (~50 Hz) での安定性が向上することを実験的に明らかにした。

また、膜面積の制限は電気的特性にも貢献することが知られている。脂質二重膜は、コンデンサとしての性質を持つ。このため、イオンチャンネル (膜タンパク質) の開閉に伴う速いイオン電流変化に対して充電を起こし、イオンチャンネル本来の機能を隠してしまう。静電容量は膜面積に比例するため、膜面積が小さいほどイオンチャンネルの機能解析に適する。

一方で、脂質二重膜の形成率は、膜が形成されるマイクロ孔の直径とセパレータの厚みに関係することも実験的に分かってきた。すなわち、セパレータの厚みに対してマイクロ孔の直径が

小さくなりすぎると、マイクロ孔で液滴同士が接触できなくなるためと考えられる。マイクロ孔の径を微細化し、膜面積を小さくするためには、セパレータの薄膜化も必要であることが明らかとなった。このため、マイクロ孔を設ける部分の材料として5 μm 厚のポリレン (poly(chloro-*p*-xylylene)) を用い、さらに液滴接触部の近傍を除いてアクリルフィルムで補強することで、自立性を有するセパレータを作製した。マイクロ孔の直径は100 μm として、脂質二重膜の形成位置の不確定性を補うために複数のマイクロ孔を設けた。

他方、脂質二重膜を多量に形成する手法として、液滴同士を物理的に接触させるデバイスを開発した。これまでの接触法では、液滴の滴下と同時に液滴同士が接触するようにウェル形状を規定していた。一方で、油中液滴をひとつずつ別個に作成しておき、続いてそれらを接触させることで、迅速に膜形成が行われることを明らかにした。4対のウェルを設けたデバイスにおいて、30分間で250以上の膜形成が可能であることを示した。この手法を更に発展させることで、イオンチャンネルの機能解析を高速化するデバイスの開発につながるものと考えられる。

イオンチャンネルを用いたデバイスの評価を通して、デバイスの使用回数には制限があることが分かった。これは、実験で使用するタンパク質などによるデバイスの汚濁が原因の一つと考えられた。イオンチャンネルの機能解析を行う際には、複数のデバイスを製作・使用する必要があるため、製作デバイスの再現性や、製作工程の簡略化も重要な研究課題となった。

デバイスは、基材となるアクリル板と電極材料(銀、アルミなど)、セパレータからなる。研究開始当初は、アクリル部品の点数も多く、また真空蒸着を用いた電極配線や部品の接着工程が複数存在していたため、製作工数がかかり、デバイスの再現性も低いものとなっていた。そこで、デバイスの設計要件は保存しつつ、製作工程を簡略化するための設計変更を行った。図2aに示すように、ウェルを設けた基板を主部品として、ウェル底面にスルーホール電極を埋設した。これにより、配線作業が不要となった。部品の接着についてもセパレータ以外の接着工程を不要となるよう変更した。セパレータ作製工程においても治具を導入し、均一な部品を効率良く得られるように見直した。

ウェル底面の銀塩化銀電極は、イオンチャンネルを介したイオン電流をパッチクランプ増幅器によって観測するために使用する。改良したデバイスでは配線をなくしたため、増幅器と接続するための専用マウンタを新たに製作した(図2b,c)。マウンタは、デバイス設置部分にコンタクトピンを配列させた構造とした。コンタクトピンを採用することで、デバイス底面の電極との接触・通電の信頼性を確保した。デバイスで得られたイオンチャンネル電流は、マウンタ上のコンタクトピン、出力端子を介して増幅器において観測される。デバイスに直接リード線を接続する必要がなくなったことで、作業性の向上のみでなく、電気的・物理的要因のノイズ低減効果も得ることができた。

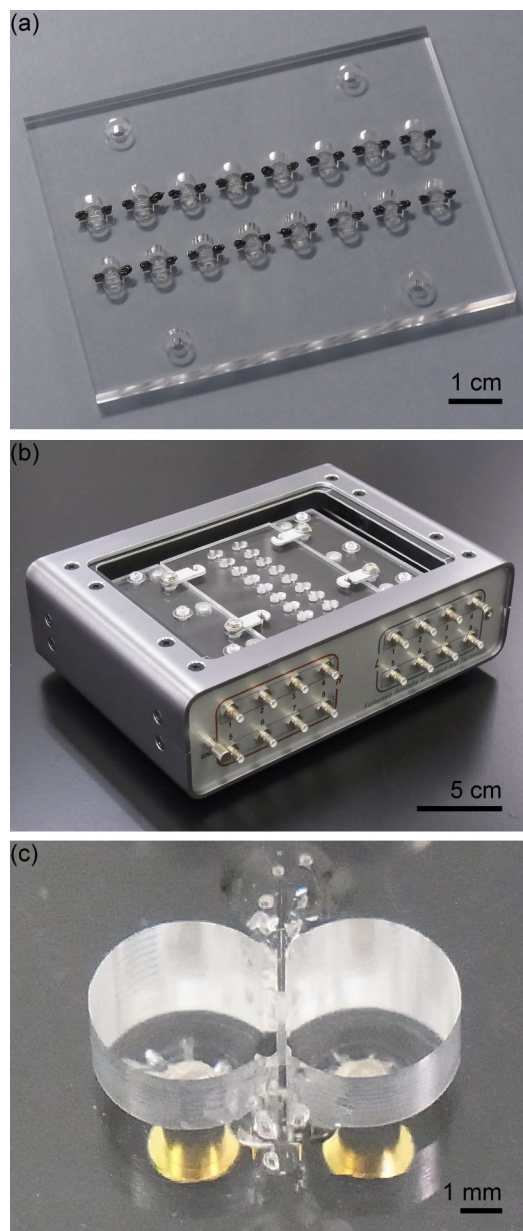


図2. (a, b) 製作した脂質二重膜デバイスと増幅器に接続するためのマウンタ。(c) デバイスのウェルに設けたスルーホール型の銀塩化銀電極にマウンタのコンタクトピン(金色)が接触し、通電する構造となっている。

上記の研究開発により、製作の再現性が高く、工数も十分に短いイオンチャンネル機能計測デバイスのプロトタイプをつくることができたと考えている。しかしながら、製作するマイクロデバイスの実用化においては、セパレータの材料費・製作過程が高額であることから、特にセパレータの材料や製作工程について更に検討を進めている。

(2)イオンチャンネル機能解析デバイスの評価
機能解析の標的となるイオンチャンネルを、デバイス中の脂質二重膜に再構成する条件について検討を行った。一般的に、標的イオンチャンネルは、培養細胞で発現した後、直径100 nm程度の微小な脂質膜小胞(リポソーム)に再構成

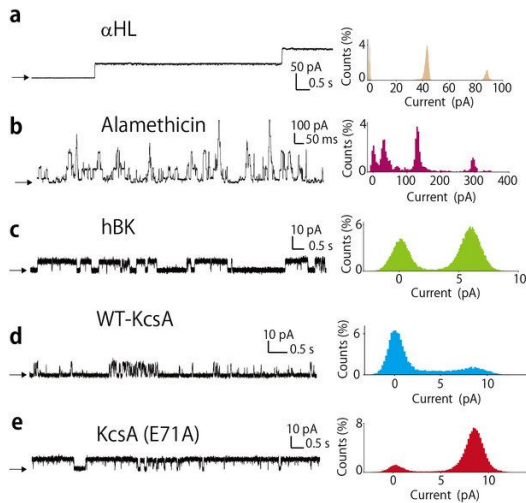


図 3. (a-e) 製作したデバイスを用いたイオンチャネルシグナル計測例。Sci. Rep. 2013, 3, 1995. Copyright 2013 Nature Publishing Group.

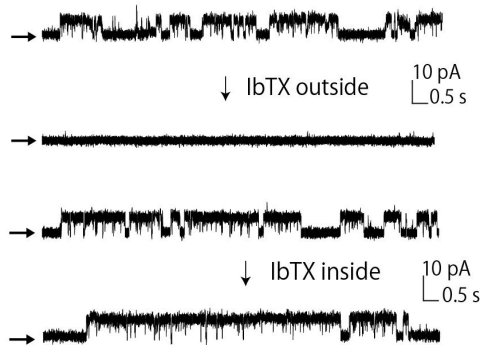


図 4. hBK チャンネルに対する阻害剤イベリオトキシン (IbTX) の影響。イオンチャネルの細胞外側 (上) 細胞内側 (下) からそれぞれ作用させたときのシグナル変化の様子を示している。細胞外側のドメインにイベリオトキシンが作用しイオンチャネルの阻害が起こることが分かる。Sci. Rep. 2013, 3, 1995. Copyright 2013 Nature Publishing Group.

したプロテオリポソームをサンプルとして用いる。液滴中にプロテオリポソームを混合することで、デバイス中の脂質二重膜とプロテオリポソームは自発的に融合し、脂質二重膜にイオンチャネルが再構成される。この再構成を効率化するため、プロテオリポソーム内部の浸透圧を調整した。プロテオリポソーム内部の浸透圧が高いほど、脂質二重膜との融合が促進される。その一方で、融合頻度が高くなりすぎると脂質二重膜が破壊されることも分かった。液滴中のプロテオリポソーム濃度についても同様にイオンチャネル 1 分子のシグナルを得るための最適条件があることを明らかにした。

本研究では、従来使用していたペプチドやバクテリア由来タンパク質 (いずれもシグナル取得が容易とされる) を離れ、創薬の標的となるようなヒト由来イオンチャネルを用いたデバイス評価を



図 5. 携帯型のセンサを目的とした試作チップ・計測システム。現在、チップの簡易化や計測器の無線化を進めている。

実施した。製作したデバイスやマウンタの性能評価をイオンチャネルの機能解析を通して行った。イオンチャネルの再構成効率や取得した電気的シグナルの品質など、計測結果をフィードバックすることで、プラットフォームの設計・最適化に反映させた。

上記のデバイス改良・評価の流れの中で、培養細胞からの標的イオンチャネルを含むプロテオリポソームの調製法、導入法の検討についても継続して検討した。これは、デバイス中の脂質二重膜に対するイオンチャネルの導入条件が個々のイオンチャネルに依存することが分かってきたからである。その要因として、イオンチャネル固有の構造による場合や、発現効率の度合い、あるいは脂質分子が関係する場合などが考えられた。これらについて深い知見を得るには多くのイオンチャネルについて検討を重ねることが不可欠であるため、共同研究先などから提供を受けたイオンチャネルについて広範に再構成条件を探索した。

本研究の成果として、創薬スクリーニングにおいて不可欠な hERG カリウムイオンチャネルのシグナル取得の成功が挙げられる。その他にも、共同研究先から薬剤標的となるイオンチャネルの提供を受け、それらの 1 分子レベルの機能観測に成功している。本プラットフォームの特長は、膜タンパク質 1 分子レベルの精密機能解析が可能である点、また培養細胞系では困難なイオンチャネルの評価や評価条件を設定できる点にある。こうした特長を示すイオンチャネル機能解析結果の蓄積を行い、本プラットフォームのアプリケーションノートの作成・拡充を進めている。

(3) センサへの成果展開

本研究を通してデバイスにおける脂質二重膜形成の確実性や迅速性が高くなったことで、創薬支援技術としてのイオンチャネル機能解析プラットフォームに留まらない成果の展開を考えることができるようになってきている。その一つとして進めているのがセンサへの応用である。

我々は、本研究以前に DNA アプタマーとナノポアタンパク質を組み合わせた人工細胞膜コカ

インセンサを提案した。DNA アプタマーとは、特定の配列を持つことで標的分子に対して特異的に結合し、複合体となる DNA である。脂質二重膜に再構成したナノポアタンパク質において、標的となる分子がない場合はナノポアを通過するイオン電流が観測できるが、標的分子の存在により複合体が形成されるとナノポアを閉塞し、電流が観測できなくなる。この差異から標的分子を検出できる。このアプタマーとナノポアを利用した標的分子検出原理を、本研究で最適化したデバイスと組み合わせ、匂い分子(揮発性有機分子)検出デバイスを開発している。また、屋外利用や携帯可能なデバイス・計測システムの開発も行っており、試作機を製作した(図 5)。これら成果をもとに、住友化学株式会社と連携し、災害時の人検知を目的とした匂いセンサ研究開発(NEDO 委託事業)へと成果展開している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

Toshihisa Osaki and Shoji Takeuchi: Artificial Cell Membrane Systems for Biosensing Applications, *Anal. Chem.* 2017, 89, 216-231. 総説(査読無)
DOI: 10.1021/acs.analchem.6b04744

Koki Kamiya, Ryuji Kawano, Toshihisa Osaki, Kazunari Akiyoshi, and Shoji Takeuchi: Cell-Sized Asymmetric Lipid Vesicles Facilitate the Investigation of Asymmetric Membranes, *Nat. Chem.* 2016, 8, 881-889. 査読有
DOI: 10.1038/nchem.2537

Hiroki Yasuga, Ryuji Kawano, Masahiro Takinoue, Yutaro Tsuji, Toshihisa Osaki, Koki Kamiya, Norihisa Miki, and Shoji Takeuchi: Logic Gate Operation by DNA Translocation through Biological Nanopores, *PLOS ONE* 2016, 11, e0149667. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0149667

Yuta Abe, Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, Hirotaka Sasaki, Ryuji Kawano, Norihisa Miki, and Shoji Takeuchi: Nonlinear Concentration Gradients Regulated by the Width of Channels for Observation of Half Maximal Inhibitory Concentration of Transporter Proteins, *Analyst* 2015, 140, 5557-5562. 査読有
DOI: 10.1039/c4an02201g

Ryuji Kawano, Yutaro Tsuji, Koki Kamiya, Taiga Kodama, Toshihisa Osaki, Norihisa Miki, and Shoji Takeuchi: A Portable Lipid Bilayer System for Environmental Sensing with a Transmembrane Protein, *PLOS ONE* 2014, 9, e102427. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0102427

Yutaro Tsuji, Ryuji Kawano, Toshihisa Osaki, Koki Kamiya, Norihisa Miki, and Shoji Takeuchi: Droplet Split-and-Contact Method

for High-Throughput Transmembrane Electrical Recording, *Anal. Chem.* 2013, 85, 10913-10919. 査読有
DOI: 10.1021/ac402299z

Ryuji Kawano, Yutaro Tsuji, Koji Sato, Toshihisa Osaki, Koki Kamiya, Minako Hirano, Toru Ide, Norihisa Miki, and Shoji Takeuchi: Automated Parallel Recordings of Topologically Identified Single Ion Channels, *Sci. Rep.* 2013, 3, article number: 1995. 査読有
DOI: 10.1038/srep01995

ほか

〔学会発表〕(計 55 件)

Satoshi Fujii, Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, Nobuo Misawa, and Shoji Takeuchi: Lipid Bilayer-Based Noise-Free MicroRNA Detection, The 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 2016/10/11, Dublin, Ireland.

Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, Kenji Nakao, Satoshi Fujii, Nobuo Misawa, and Shoji Takeuchi: Crude Planar Cell Membrane on a Chip, The 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 2016/10/10, Dublin, Ireland.

大崎寿久, 細胞膜機能を利用したデバイスの創薬・センサ応用, 第 15 回国際バイオテクノロジー展, 2016/5/11-13, 東京ビッグサイト(東京・江東区).

Toshihisa Osaki: Microfluidics for Biosensing and Healthcare Applications, ISPlasma2016/IC-PLANT2016, 2016/3/8, 名古屋大学(愛知・名古屋)招待講演.

Shoji Takeuchi: Microfluidic Technology for Artificial Lipid Bilayer Membrane, The 19th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 2015/10/25, 慶州(韓国)招待講演.

Shoji Takeuchi: Microfluidic Technology for Biomedical Sensing, The International Symposium on Bio-Inspired Nanomaterials and Systems, 2015/6/30, 漢陽大(韓国)招待講演.

竹内昌治: ナノバイオデバイスが拓く次世代医療・創薬・環境センシング, Nano Tech 2015, 2015/1/30, 東京ビッグサイト(東京・江東区)招待講演.

Toshihisa Osaki, Koki Kamiya, Kosuke Shibasaki, and Shoji Takeuchi: Artificial Cell Membrane Devices for Pharmaceutical Applications, 8th International Symposium on Nanomedicine, 2014/12/5, 愛媛大学(愛媛・松山)招待講演.

Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, Ryuji

Kawano, Minato Akiyama, Kazunari Akiyoshi, and Shoji Takeuchi: Single-Channel Current Measurement of a Connexin Hemichannel Expressed Using an in vitro Protein Synthesis System, The 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 2014/10/27, San Antonio (USA).

竹内昌治: マイクロ流体デバイス技術を利用した創薬・医療応用, 第 86 回日本生化学会大会, 2013/9/11, パシフィコ横浜 (神奈川・横浜) 招待講演.

ほか

〔図書〕(計 6 件)

藤井聡志, 竹内昌治: 膜タンパク質と DNA を用いたバイオセンサの開発, 化学工業, 第 68 巻 2 号, pp. 55-62, 化学工業社, 2017.

神谷厚輝, 大崎寿久, 竹内昌治: 人工細胞膜作製とシングルイオンチャネル計測, Electrochemistry, 第 83 巻 12 号, pp. 1096-1100, 電気化学会, 2015.

Toshihisa Osaki, Koki Kamiya, and Shoji Takeuchi: Cell-Like Liposomes Integrated with Microfluidic Technology for Synthetic Biology, Synthetic Biology: Volume 1, pp. 275-291, Royal Society of Chemistry, 2014.

外岡大志, 大崎寿久, 竹内昌治: MEMS 技術を用いた膜輸送計測デバイス, 生体の科学, 第 65 巻 5 号, pp. 500-501, 医学書院, 2014.

大崎寿久, 竹内昌治: 脂質二重膜をあやつるマイクロデバイス, 1 分子ナノバイオ科学の新パラダイム(化学フロンティア 23), pp. 84-86, 化学同人, 2014.

川野竜司, 大崎寿久, 神谷厚輝, 竹内昌治: MEMS 技術を基盤とした人工細胞膜の大量作製とイオンチャネルスクリーニングへの展開, 超の世界, 自動車技術, 第 67 巻 10 号, pp.98-99, 自動車技術会, 2013.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称: イオン透過性脂質二重膜形成方法及びイオン透過性脂質二重膜形成のための電流計測装置

発明者: 早川正俊, 大崎寿久, 神谷厚輝, 藤井聡志, 竹内昌治

権利者: (公財)神奈川科学技術アカデミー

種類: 特許

番号: 特願 2016-044436

出願年月日: 2016/3/8

国内外の別: 国内

名称: 脂質二重膜形成器具

発明者: 矢菅浩規, 川野竜司, 三木則尚, 竹

内昌治, 大崎寿久, 神谷厚輝

権利者: (公財)神奈川科学技術アカデミー

種類: 特許

番号: 特願 2013-216009

出願年月日: 2013/10/17

国内外の別: 国内

〔その他〕

報道等

日経産業新聞(8面), 2013/7/26, 新薬候補選抜時間 1/10 に 人工細胞膜 ロボ使い作製

ほか

ホームページ等

[https://www.kanagawa-iri.jp/r_and_d/pro](https://www.kanagawa-iri.jp/r_and_d/project_res/labo_intro/takeuchi_project/)

[ject_res/labo_intro/takeuchi_project/](http://www.hybrid.iis.u-tokyo.ac.jp/)

<http://www.hybrid.iis.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹内 昌治 (TAKEUCHI, Shoji)

(公財)神奈川科学技術アカデミー・人工細胞膜システムグループ・プロジェクトリーダー

研究者番号: 9 0 3 4 3 1 1 0

(2)研究分担者

大崎 寿久 (OSAKI, Toshihisa)

(公財)神奈川科学技術アカデミー・人工細胞膜システムグループ・研究員

研究者番号: 5 0 5 3 3 6 5 0

川野 竜司 (KAWANO, Ryuji)

(公財)神奈川科学技術アカデミー・人工細胞膜システムグループ・研究員

研究者番号: 9 0 4 0 1 7 0 2

(平成 25 年度)

神谷 厚輝 (KAMIYA, Koki)

(公財)神奈川科学技術アカデミー・人工細胞膜システムグループ・研究員

研究者番号: 7 0 6 1 2 3 1 5

(3)連携研究者

佐藤 幸治 (SATO, Koji)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター・特任准教授

研究者番号: 2 0 4 4 4 1 0 1

井出 徹 (IDE, Toru)

岡山大学・自然科学研究科・教授

研究者番号: 6 0 2 3 1 1 4 8