

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560431

研究課題名(和文)バクテリア内膜を固定したデバイスによるトランスロコン解析

研究課題名(英文)Development of devices for observation of membrane protein

## 研究代表者

友池 史明(Tomoike, Fumiaki)

名古屋大学・物質科学国際研究センター・助教

研究者番号：70708586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：膜を介した輸送や膜の変化など脂質二重膜上で起きる現象を解析するためには、顕微鏡観察面と同一平面の脂質二重膜を繰り返し形成して解析する必要がある。しかし、顕微鏡観察面と同一平面で、かつ繰り返し形成するデバイスはこれまで報告されていなかった。そこで、本研究課題では、流路上に開口するチャンバを配置することで繰り返し観察可能な脂質二重膜を形成するデバイスを開発した。形成された脂質二重膜の膜厚および膜局在タンパク質との相互作用を調べたところ、形成された膜が脂質二重膜であることが示唆された。このことから、膜中のドメインや膜タンパク質などの定量的解析にこのデバイスが利用可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Lipid bilayer is one of the important cellular components and indispensable not only for separation between inner region and outer region of cells but also for the acute structures and functions of membrane proteins. Because the cellular membrane is composed of various lipids and protein, biophysical analyses of lipid and membrane protein function require to form artificial lipid bilayer easily. Whereas devices for formation of lipid bilayer have been proposed, these devices cannot form optically-observable lipid bilayer repeatedly. In this research project, we developed the rotational device for the repetitive formation of lipid bilayer by using MEMS technology. We confirmed the formation of lipid bilayer by measurement of bilayer thickness and observed the function of one of membrane protein, alpha-hemolysin. Because this device enables us to form the lipid bilayer repeatedly, it is thought to analyze the function of membrane and membrane protein statistically.

研究分野：マイクロデバイス

キーワード：脂質二重膜 微細加工

### 1. 研究開始当初の背景

脂質二重膜は細胞膜を構成する主成分であり、細胞内外および細胞小器官を区切り、分子の拡散の抑制を担っている。そのほかにも、脂質二重膜は膜タンパク質が正常な構造をとるために必要不可欠である。そのため、膜タンパク質の機能を調べるためには、脂質二重膜上で膜タンパク質を発現させ、機能を解析する必要がある。脂質二重膜を形成する脂質そのものも、その種類によってマイクロドメインを構成し、細胞膜の機能に関与していることも示唆されている。そのため、膜タンパク質を含め、細胞膜の機能を理解するためには、この脂質二重膜を調製し、膜表面および膜周辺で起こる現象を解析することが必要不可欠である。

細胞膜の機能を調べるために、細胞より細胞膜を単離した解析も盛んにおこなわれているが、細胞膜は様々な膜タンパク質や脂質が存在するため、注目した膜タンパク質や脂質の機能を調べるのは難しい。そこで、人工的に脂質二重膜を形成して、細胞膜モデルとして利用する方法が 1960 年代から提案されており、今なお新しい手法が提案されている。しかし、これまで提案されてきた手法の多くは安定して膜を形成することが困難であった。また、申請者が研究開始時に所属していた竹内研究室では、安定した脂質二重膜を形成する方法として、接触法を開発していたが、この手法で形成される膜は顕微鏡の観察面に対して、垂直であり、膜表面を観察することは難しかった。これらのことから、顕微鏡で観察が可能な人工脂質二重膜を簡便に形成させる方法が求められていた。

### 2. 研究の目的

本研究課題は、細胞膜モデルとして人工的に形成した脂質二重膜を用いた研究を行うために、まず、簡便に顕微鏡観察可能な人工脂質二重膜を形成するデバイスを開発することを目的とした。次に、開発したデバイスを用いて形成した人工脂質二重膜中に膜タンパク質を導入し、顕微鏡観察下で膜タンパク質の機能が計測できることを実証することを目的とした。デバイス開発は一般的なフォトリソグラフィ技術およびマシニング加工技術を利用することで、顕微鏡観察面に対して水平方向の脂質二重膜を人工的に形成する手法を開発する。この手法で形成された脂質二重膜の解析は、顕微鏡による膜形成の光学観察に加えて、電気計測による膜厚の変化や膜タンパク質の一種である  $\alpha$ -ヘモリンの機能発現を計測する。

### 3. 研究の方法

本研究課題では、安定した観察可能な脂質二重膜を容易に形成するために、フォトリソグラフィおよびマシニング加工技術を利用して、デバイスを設計・構築した。具体的には、アクリル加工機を利用することで流路と

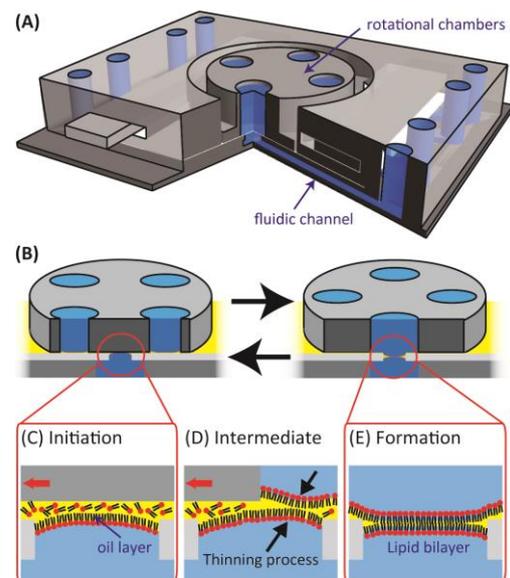


Figure 1 回転チャンバによる繰り返し膜形成

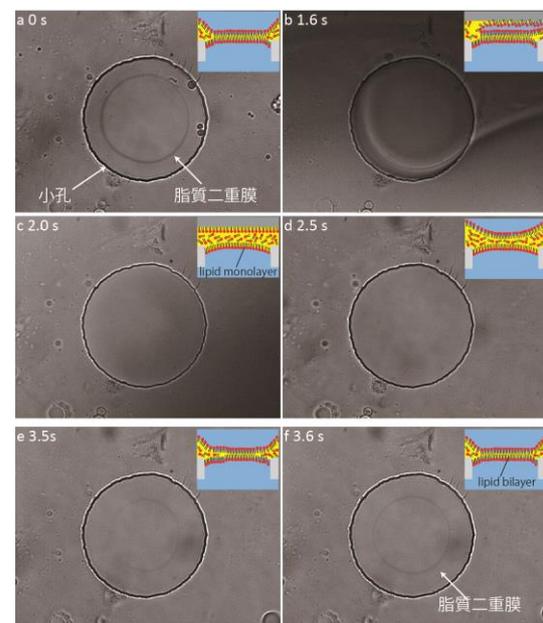


Figure 2 回転チャンバによる膜の再形成

チャンバ部分を形成した。膜が形成される部分は膜を安定化するために、フォトリソグラフィを利用して作製した小孔をもつパリレンシートを貼り付けた。以上の手法により、繰り返し観察可能な脂質二重膜を形成するデバイス、およびハイドロゲルを利用することで安定した脂質二重膜を形成するデバイスを開発した。また、ハイドロゲルを用いたマイクロデバイス技術の発展として開発したタンパク質結晶を保護するデバイスでは、3D プリンターを利用してデバイスを調製した。

脂質二重膜の脂質成分としては、diphytanoyl phosphatidylcholine を 10% のヘキサノールを含んだ n-デカン溶液に拡散させて用いた。また、形成された膜の検証および、膜タンパク質のモデルと

しては、自発的に脂質二重膜に局在化し、ナノポアを形成する、 $\alpha$ ヘモリシンを用いた。膜の観察は、一般的な光学顕微鏡を用いて光学観察を行い、電氣的計測は、デジタルオシロスコープに接続した塩化銀電極を用いて膜の電気容量および名のポアを介した電流値を計測した。

#### 4. 研究成果

膜表面を観察し、膜タンパク質の機能を調べるために、次のように二種類の観察可能な人工脂質二重膜を形成するためのデバイスを開発した。

##### 繰り返し膜形成可能な回転デバイスの開発

観察可能な脂質二重膜を容易に形成するために、我々は繰り返し脂質二重膜を形成する、回転チャンバデバイスを開発した。NC加工機を利用して、アクリル板を加工することで、流路と回転チャンバを作製した。また、フォトリソグラフィとプラズマエッチングを利用して、No.1 ガラス上のパイレックスに直径  $100\ \mu\text{m}$  の小孔をあけた。このパイレックスシートを、アクリルサンプラーを用いて流路上にあけた穴に転写することで、人工脂質二重膜が形成される領域を限定した。流路上に脂質溶液を添加し、回転するチャンバを載せて水溶液を充填させた。回転チャンバを回転させることにより、チャンバと流路の間的小孔に脂質二重膜を形成することに成功した (Figure 1)。また、再度回転させることにより、繰り返し膜を形成することにも成功した (Figure 2)。

脂質二重膜の形成を確認するため、膜領域の電気容量を顕微鏡観察の結果と電気計測の結果から測定したところ、これまで報告されている脂質二重膜と同様の  $0.73\ \mu\text{F cm}^{-1}$  の値が得られた。また、溶液にナノポア形成タンパク質である  $\alpha$ ヘモリシンを導入したところ、膜形成後に  $\alpha$ ヘモリシンで見られる階段状のシグナルが観測された。また、回転して、膜を消失させるとシグナルが消失し、膜が再形成されると再びシグナルが観測された。この結果から、本デバイスで顕微鏡観察可能な脂質二重膜を繰り返し形成できることが明らかになった。本成果は微細加工の主要国際会議である MEMS2015 において、上位 9% が選ばれる口頭発表に選出され、国内においては第 87 回日本生化学会大会において、優秀発表賞が授与された。また、マイクロデバイスの国際専門誌である Lab on a Chip に採択された。

##### 安定した膜形成デバイスの開発

回転デバイスで繰り返し膜を形成することに成功したが、形成された脂質二重膜は不安定であり、脂質二重膜形成後に流路中に試料を添加したところ、膜の破裂が見られた。そのため、ハイドロゲルを利用して、観察可能かつ安定な脂質二重膜形成 n デバイスを開発した。このデバイスは、ハイドロゲルを

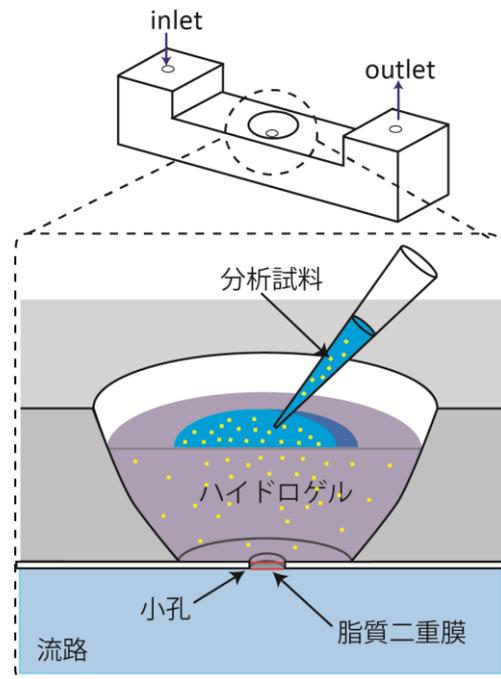


Figure 3 ハイドロゲル流路

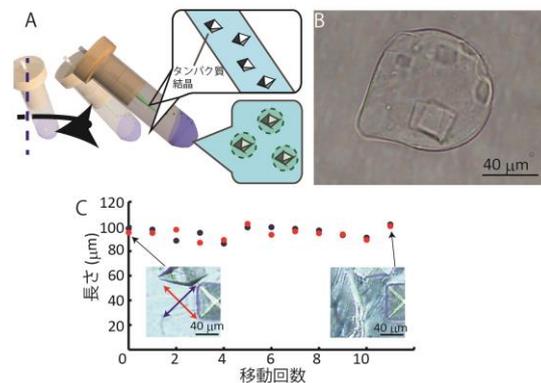


Figure 4 ハイドロゲルによるタンパク質結晶保護

(A) 概要図 (B) ハイドロゲルビーズ中の結晶 (C) マイクロピペッターによるハンドリングによる結晶のサイズ変化

充填する上部チャンバと、溶液を充填する下部の流路から構成した。上部のハイドロゲルは条件を検討したところ、0.7% のアガロースゲルが適していることが示唆された。ハイドロゲルを添加後、脂質を拡散させた溶液、次に水溶液を流したところ、脂質二重膜であることが示唆される領域が観察された。

以上の結果から、観察可能な脂質二重膜を形成するデバイスとして、韓国で開催されたマイクロデバイスの国際学会である MicroTAS2015 で発表した。本研究の発展として、バクテリアトランスロコンをはじめとした膜上で機能する膜タンパク質および膜タンパク質複合体を本デバイスで形成した膜に導入し、その機能を解析することを計画

している。

この研究の過程において、ハイドロゲル中でのタンパク質の挙動を調べた。その過程で、アルギン酸のハイドロゲル中でタンパク質の結晶化が困難であるが、ゲル化する前のアルギン酸中では、タンパク質の一種であるリゾチウムが結晶化可能であることが見出された。これに注目し、アルギン酸溶液中でリゾチウムを結晶化し、カルシウム溶液と混合することで、リゾチウム結晶をアルギン酸ゲルの中に包埋することに成功した。また、遠心力によってハイドロゲルのマイクロビーズを調製するデバイスを利用することで、結晶を包埋したハイドロゲルのマイクロビーズの作製にも成功した (Figure 4)。通常、タンパク質結晶は壊れやすく、ハンドリングが難しいが、ハイドロゲル中に包埋された結晶は、ゲルによって力学的刺激から保護されているため、ハンドリングが容易になった。具体的には、通常のタンパク質結晶は、マイクロピペッターによるピペッティングを行うと粉碎されるが、ハイドロゲルのマイクロビーズに包埋されたタンパク質結晶は、ピペッティング後も破碎は見られなかった。本成果は特許取得のため、米国仮出願中である。

#### 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 3 件)

- 1) Fumiaki Tomoike, Taishi Tonooka, Toshihisa Osaki and Shoji Takeuchi, "Repetitive formation of optically-observable planar lipid bilayers by rotating chambers on a microaperture", *Lab on a Chip, in press*, 2016
- 2) Wataru Tanaka, Mitsuo Shoji, Fumiaki Tomoike, Yuzuru Ujiie, Kyohei Hanaoka, Ryuhei Harada, Megumi Kayanuma, Katsumasa Kamiya, Toyokazu Ishida, Ryoji Masui, Seiki Kuramitsu, Yasuteru Shigeta, "Molecular Mechanisms of Substrate Specificities of Uridine-Cytidine Kinase", *Biophysics and Physicobiology, in press*, 2016 年
- 3) Fumiaki Tomoike, Noriko Nakagawa, Seiki Kuramitsu, Ryoji Masui, "Structural and Biochemical Studies on the Reaction Mechanism of Uridine-Cytidine Kinase.", *Protein Journal* **34** 411-420, 2015

[学会発表] (計 10 件)

- 1) Fumiaki Tomoike, Shoji Takeuchi, "Encapsulation of protein crystals in hydrogel microbeads for crystal

manipulation", 第 5 回 モデル生物学会, 大阪, 2015 年 12 月 19 日~20 日

- 2) 友池史明, 竹内昌治, "マイクロビーズによるタンパク質結晶の保護", CHEMINAS 32, 北九州, 2015 年 11 月 26 日~27 日
- 3) Fumiaki Tomoike, Florian Larramendy, Shoji Takeuchi, "Origami Microfluidics integrated with gold micropatterns" MHS2015, 名古屋, 2015 年 11 月 23 日~25 日
- 4) Fumiaki Tomoike, Shoji Takeuchi, "HYDROGEL ON A MICROPORE FOR A STABLE LIPID BILAYER" MicroTAS2015, 韓国・慶州市, 2015 年 10 月 25 日~29 日
- 5) Florian Larramendy, Fumiaki Tomoike, Shoji Takeuchi, Oliver Paul, "PARYLENE ORIGAMI MICROFLUIDICS: 3D MICROFLUIDIC DEVICES FABRICATED BY FOLDING A PARYLENE SHEET", MicroTAS2015, 韓国・慶州市, 2015 年 10 月 25 日~29 日
- 6) Fumiaki Tomoike, Taishi Tonooka, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi, "Rotational chambers on parylene micropores for the repetitive formation of optically observable lipid-bilayer membranes", MEMS2015, ポルトガル・エストリル, 2015 年 1 月 22 日
- 7) 友池史明, 外岡大志, 竹内昌治, "回転デバイスを用いた観察可能な脂質二重膜形成", CHEMINAS30, 北海道, 2014 年 10 月 2 日
- 8) 友池史明, 外岡大志, 竹内昌治, "スライドチップによる光学観察可能な脂質二重膜形成法", 第 87 回 日本生化学会大会, 京都, 2014 年 10 月 17 日
- 9) Fumiaki Tomoike, Taishi Tonooka, Shoji Takeuchi, "FORMATION OF OPTICALLY-OBSERVABLE LIPID BILAYER MEMBRANE BY SLIDING CHAMBERS ON A FLUIDIC CHANNEL" MicroTAS2014, アメリカ合衆国・テキサス, 2014 年 10 月 28 日
- 10) 友池史明, 外岡大志, 竹内昌治, "Slide device を用いた観察可能な脂質二重膜形成法", CHEMINAS29, 東京, 2014 年 5 月 22 日

[図書] (計 1 件)

バイオチップの基盤と応用・原理から最新の研究・開発動向まで, シーエムシー出版, 友池史明, 竹内昌治, 2015 年

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: PROTEIN CRYSTAL PROTECTION BY ALGINIC ACID

発明者: 竹内昌治, 友池史明

権利者: 国立大学法人東京大学

種類: 米国仮出願

番号：62/258,632  
出願年月日：2015/11/23  
国内外の別：米国

○取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

友池 史明 (TOMOIKE, Fumiaki)  
名古屋大学 物質科学国際研究センター  
助教

研究者番号：70708586

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：