

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：13904

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26630156

研究課題名(和文) CCDイオンイメージセンサを用いたチャネルタンパク質スクリーニングアレイの開発

研究課題名(英文) Development of ion channel screening array applying CCD ion image sensor

研究代表者

手老 龍吾 (Tero, Ryugo)

豊橋技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40390679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：チャネルタンパク質は細胞内外での物質・情報のやり取りに直接関わる膜タンパク質であり、創薬ターゲットとしても重要視されている。本研究課題では特定のカチオンに選択的に応答する半導体イオンイメージセンサ(CCD-IIS)を、チャネルタンパク質の活性計測へ応用するための要素技術を開発することを目的とした。CCD-IIS上に人工細胞膜モデル系である脂質二重膜を作製し、その構造と物性を評価した。脂質二重膜形成前後でのイオン応答を計測し、センサ上に形成された脂質膜にイオン遮蔽効果があることを示した。

研究成果の概要(英文)：Ion channels are one of membrane proteins crucial for the transportation of materials and information into and out of cells, therefore are important target of drug discovery. In this research we aimed to apply semiconductor-based ion imaging sensor (CCD-IIS) which selectively response to a specific cation to the detection of the activity of ion channels, and established the fundamental techniques for this purpose. We fabricated an artificial lipid bilayer membrane on CCD-IIS, and evaluated the structure and physical properties. We measured the ionic response before and after the formation of the bilayer formation using CCD-IIS. The artificial lipid bilayer showed sufficient ion screening effect under the exchange of buffer solutions.

研究分野：界面物理化学

キーワード：脂質二重膜 CCDイオンセンサ イオン感応膜

1. 研究開始当初の背景

細胞膜は細胞の内と外とを隔てる膜であり、細胞内外での物質・情報・エネルギーの全ては細胞膜を通してやり取りされている。細胞膜内に存在してこれらの働きを担う膜タンパク質の1種がチャンネルタンパク質である。チャンネルタンパク質は創薬ターゲットとして主要な位置を占めており、チャンネルタンパク質に対する薬剤スクリーニング手法が待望されている。一般的にチャンネルタンパク質研究では、タンパク質を通過するイオン流量を電流として計測するが、高価な電流増幅器や、実験技術の習熟が必要である。そのため大規模な並列化が難しく、スループットの向上が課題とされている。本課題では人工細胞膜モデル系の1つである支持平面脂質二重膜(supported lipid bilayer: SLB)を CCD イオンイメージングセンサ(CCD-IIS)上に形成することで、チャンネルタンパク質の活動をイオン濃度変化として計測することを着想した。化合物ベースでの成功率が3万分の1と言われる現在の新薬開発に対して、多画素の CCD-IIS をチャンネルタンパク質計測用アレイとして応用することにより薬剤スクリーニングの新規技術開発に繋がると期待した。

2. 研究の目的

本研究では特定のカチオンに選択的に応答する CCD-IIS をチャンネルタンパク質の活性計測へ応用するための要素技術を開発することを目的とした。チャンネルタンパク質を含めて膜タンパク質は両親性分子の自己組織化構造である脂質二重膜内に包埋されることで正しい構造と機能を保持することができる。CCD-IIS 上に均一かつ適正な構造と物性を持つ脂質二重膜を形成する手法を確立することが必要である。

本研究課題で用いる CCD-IIS は、イオン感応膜としてイオノフォアを混ぜたポリビニルクロライド(PVC)膜によって被覆されている。これまでに PVC 膜上で SLB を作製した例は無かったため、PVC 膜上への SLB 形成について、実験条件の最適化を行うことを最初の目標とした。

また、CCD-IIS では、溶液中のカチオン濃度に依存してイオノフォアが捕らえるカチオン量を、表面ポテンシャルの変化として検出している。溶液と PVC 膜が平衡状態に達することが原則である。チャンネルタンパク質の働きによるイオンの濃度上昇(open 時)、および、その後の拡散による濃度減少(close 時)にどの程度追従できるかは、PVC 膜内のイオン拡散速度や膜厚に依存する可能性があることが予想された。そこで、SLB を形成した CCD-IIS 素子上での溶液交換における時間応答を確認し、必要に応じて PVC 膜の膜厚、イオノフォア濃度、可塑剤との配合比などを改善することを次の目標とした。

3. 研究の方法

SLB 形成はベシクル融合法によって行った。球殻状の脂質二重膜である脂質ベシクル(=リポソーム)の懸濁液を CCD-IIS 表面に滴下し、ベシクルの吸着・開裂・融合過程を経て平面状の脂質二重膜である SLB を作製する手法である。ベシクル融合法に一般的に用いられる直径 30 nm - 200 nm 程度のベシクルのほか、本課題では 1 μ m - 20 μ m 程度の直径を持つ巨大単層膜ベシクル(GUV)も用いた。真核生物の細胞膜の最も主要な成分は phosphatidylcholine であるため、1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC)を用いた。SLB 形成の有無および、構造や均一性については、原子間力顕微鏡(AFM)および蛍光顕微鏡による観察によって調べた。

CCD-IIS 上へのイオン感応膜形成は、PVC、K⁺イオノフォアである valinomycin と、可塑剤などを溶解した tetrahydrofran 溶液を滴下して溶媒を揮発させることで作製した。イオン応答計測には KCl 緩衝液(100 mM KCl, 25 mM HEPES, pH7.4, NaOH)と NaCl 緩衝液(100 mM NaCl, 25 mM HEPES, pH7.4, NaOH)を用い、両者を混合して K⁺濃度を調整した。参照電極には Ag/AgCl 電極を使用した。

4. 研究成果

PVC イオン感応膜上への SLB 作製

まず PVC 膜上へベシクル融合法による SLB 形成を行った。CCD-IIS のセンサ最表面の材料である Si₃N₄を Si 基板上にスパッタ蒸着し、その上に PVC 膜を形成して実験条件の検討を行った。脂質ベシクル懸濁液中で保持した PVC/Si₃N₄/Si 基板を蛍光顕微鏡および AFM で観察したところ、蛍光顕微鏡では 100 μ m オーダーの視野範囲で均一な輝度を持つ SLB が形成されたことが確認できた。しかし、AFM による 1 μ m オーダーの視野範囲での観察では、SLB に幅数十 nm 程度の欠陥が存在していることが確認された。また、レーザー走査型蛍光顕微鏡を用いて fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)法による SLB の流動性計測を行ったところ、標準試料である SiO₂/Si 基板上の DOPC-SLB と比較して、PVC 膜上の DOPC-SLB は拡散係数が小さく、また流動性成分が小さいことが明らかになった。

PVC 膜自体の詳細な AFM 観察から、PVC 膜は組成成分がサブナノメートルのスケールでは均一に混合しておらず、その表面上では主に親水性領域が占める中に数十~数百 nm の疎水性領域が混在していることを見出した。ベシクル融合法による DOPC-SLB 形成では固体基板表面の構造と性質が平面膜形成に関わる要因の1つである。PVC 膜上に露出する疎水性領域が SLB の欠陥形成に関与していると考えた。平面膜形成に使うベシク

ルの大きさが表面の疎水性領域の大きさと同程度か小さいため、疎水性領域に吸着したベシクルからの SLB 形成が進行しない。そこで、巨大単層膜ベシクル(GUV)の展開による SLB 形成を試みた。Electroformation 法によって形成した GUV を基板上で展開して SLB 形成を行うことで、欠陥がほとんど存在しなくなり、また FRAP 計測での拡散係数と流動性成分が大幅に改善した。これらの結果から、PVC 表面に欠陥の無い SLB を形成する方法を確立したといえる。

CCD-IIS 上に形成した SLB のイオン遮蔽効果とイオン濃度変化への応答の計測

K^+ イオン感応膜として valinomycin 含有 PVC 膜で被覆した CCD-IIS 素子上で、 K^+ 濃度の異なる緩衝液を交換して時間応答を調べることにより、平面脂質膜によるイオン遮蔽効果を検証した。平面脂質二重膜形成前の CCD-IIS 上で電位計測を行いながら、100 mM KCl 緩衝液と 1 mM KCl 緩衝液(99 mM NaCl を含む)をペリスタポンプを用いて交換した。Ag/AgCl 電極を用いているため溶液の Cl 濃度を一定に保つ必要があり、また、溶質濃度の異なる溶液では浸透圧が SLB に影響を及ぼす可能性がある。Valinomycin の K^+ 選択性は Na^+ に比べ 1 万倍であるため、100 倍程度の NaCl/KCl 濃度比による計測への影響は無視して良い範囲であるといえる。

SLB 形成前の CCD-IIS ではセンサの基準性能通りの時間応答が得られ、溶液交換開始後 5 秒以内に濃度変化が完了した。ベシクル融合法によって DOPC-SLB を形成した後は、多くの画素において溶液交換から濃度変化が完了するまでに遅延が見られた。半減期で約 10 秒、90%以上の濃度変化到達までに 30 秒程度を要したことから、画素上を被覆した脂質二重膜によるイオン遮蔽が起きていることが示唆された。

CCD-IIS において K^+ イオンの濃度変化は Nernst の式に従って濃度 1 桁当たり 59 eV の表面電位変化として検出される。DOPC-SLB による被覆が確認された画素について、被覆前後でのイオン濃度への感度はそれぞれ 56 mV/decade、58 mV/decade であり、ほぼ理論通りの応答が得られていた。一方、同じ参照電位下でも CCD-IIS の出力電位自体は、同じ K^+ 濃度でも被覆前と比べて約 7%低下した。センサ面直上に絶縁膜の層が形成されたことによりセンシングエリア直下の電気容量が低下したことによると考えられる。また、画素間で濃度変化に対する時間応答および脂質膜形成による出力電位低下のばらつきが大きかった。これは画素を覆う SLB の被覆率や欠陥の密度にばらつきがあることを示唆している。多くの画素を高絶縁性の脂質二重膜で被覆するために、GUV 形成の効率化およびフィルタリングによるサイズ選別を行った。

本研究課題によって、半導体イオンセンサである CCD-IIS 上に人工細胞膜モデル系を製作し、イオン応答を計測するための要素技術を確立することができた。これらの萌芽的成果に立脚して、今後は SLB にチャネル機能を持つモデルペプチドや細胞から抽出したタンパク質を再構成することで新規チャネル計測技術の開発につなげる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

<全て査読有り>

1). **R. Tero**, R. Yamashita, H. Hashizume, Y. Suda, H. Takikawa, M. Hori and M. Ito, "Nanopore formation process in artificial cell membrane induced by plasma-generated reactive oxygen species", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, in press [10.1016/j.abb.2016.05.014].

2). Y. Suda, **R. Tero**, R. Yamashita, K. Yusa and H. Takikawa, "Reduction in lateral lipid mobility of lipid bilayer membrane by atmospheric pressure plasma irradiation", *Jpn. J. Appl. Phys.*, **55** (3S2), 03DF05 (2016).

3). Y. Okamoto, T. Motegi, S. Iwasa, A. Sandhu and **R. Tero**, "Fluidity Evaluation of Cell Membrane Model Formed on Graphene Oxide with Single Particle Tracking Using Qdot", *Jpn. J. Appl. Phys.*, **54** (4S), 04DL09 (6 pages) (2015) [10.7567/JJAP.54.04DL09].

[学会発表](計 39 件)

<招待講演>

1). **R. Tero**, K. Fukumoto, Y. Suzuki and Y. Niiyama "Observation of supported lipid bilayer membranes incorporated with membrane proteins.", *10th International Symposium on Medical, Bio- and Nano-Electronics*, Mar 02, 2015, Sendai, Japan.

2). **R. Tero**, "Artificial biomembrane system on inorganic oxides and graphene oxide", *2015 International Symposium for Advanced Materials Research (ISAMR 2015)*, Aug. 17, 2015, Sun Moon Lake, Taiwan.

3). **R. Tero**, "Fusion of channel-incorporated proteoliposomes into solid-supported lipid bilayer", *9th International Symposium on Medical, Bio- and Nano-Electronics*, Mar 04, 2015, Sendai, Japan.

4). **手考 龍吾**, "イノシトールリン脂質含有支持脂質二重膜内サブミクロドメインの構造・物性とタンパク質反応における役割", 第 33 回日本糖質学会, 2014 年 08 月 10 日, 名古屋・名古屋大学.

<一般講演>

国際会議 15 件, 国内会議 20 件.

〔図書〕(計 1 件)

1). 手老 龍吾, "脳の中の表面?", ブルーバックス すごいぞ! 身の回りの表面科学, 日本表面科学会編, 講談社, pp. 96-98, 2015

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

http://ens.tut.ac.jp/interface/index_jp.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

手老 龍吾 (TERO, Ryugo)
豊橋技術科学大学・環境・生命工学系・准教授
研究者番号: 40390679

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

澤田 和明 (SAWADA, Kazuaki)
豊橋技術科学大学・電気・電子情報工学系・教授
研究者番号: 40235461