

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22650103

研究課題名（和文） 膜タンパク質を利用した生体電気刺激デバイスの研究開発

研究課題名（英文） Development of Bio-stimulation Electrode Using Membrane Protein

研究代表者

八木 透 (YAGI TOHRU)

東京工業大学・大学院情報理工学研究科・准教授

研究者番号：90291096

### 研究成果の概要（和文）：

管状膜タンパク質は細胞膜中に小孔を形成する管状のタンパク質であり、それが持つイオン透過性は細胞刺激デバイス等への利用が期待できる。膜タンパク質を利用したデバイスは高い生体適合性と空間分解能を持つことが期待でき、多数の細胞を個別に同時刺激する使用方法が想定される。しかし、それぞれの細胞に対する膜タンパク質のイオン透過を同時に計測することは現在利用されている電気計測では難しい。そこで我々は、この課題を解決する手法として細胞内シグナル計測に利用される蛍光イオンセンサを用い、その蛍光強度から膜タンパク質のイオン透過性を評価することを提案している。本研究では、イオン濃度勾配が存在する人工的な脂質二重膜中に評価対象となる管状膜タンパク質を導入し、それによって生じるイオン透過の推移を蛍光画像によって観測した。その結果、時間の経過とともにイオンが拡散していくことが確認でき、イオン透過性が定性的に評価可能であることが示唆された。

### 研究成果の概要（英文）：

Tubular membrane protein's ion permeation function is available for biomedical applications such as cell stimulation devices. However, when considering that those proteins stimulate the multiple cells in parallel, it is not easy to evaluate each function to the cell at the same time by electrical measurements. Therefore, we propose the use of ion sensor to evaluate the protein's electrical properties on the basis of its fluorescence images. In this study, we introduced target proteins into an artificial lipid bilayer membrane where the ion concentration gradient exists. Then, we observe fluorescence images and record electrical properties of the membrane.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	0	1,100,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			0
年度			0
総計	2,900,000	540,000	3,440,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：医用マイクロ・ナノマシン ギャップジャンクション，人工脂質二重層

## 1. 研究開始当初の背景

体内埋植型の生体電気刺激デバイス（ペースメーカー、脳深部刺激（DBS）、機能的電気刺激（FES）、人工内耳、人工視覚等）が注目されるにつれ、その中核技術である刺激電極の開発がますます重要となっている。より高性能なデバイスの開発には電極の微細化と多点化・高集積化が必要であるが、生体組織を最適かつ安全な条件で電気刺激することは容易ではなく、高性能化は80年代後半から大きく進展していない。第一に、生体組織への電気刺激は電気化学的反応であり、電極を微細化すると電気二重層の面積が減るため注入できる電荷量も減る。もし過剰な電荷を注入すれば電気分解が生じて電極やリード線の金属部分が溶解し、電極周囲から発生する気体（水素・酸素）が生体組織を損傷する。また電気刺激が一定レベルの電荷密度を超えると生体組織を損傷する。以上の問題は、既存のデバイスでは細胞膜の外から電気刺激する細胞外刺激を採用していることに起因している。電荷を細胞内へ直接注入することができれば、細胞外刺激に比べて閾値を大きく下げることができるが、従来手法は細胞膜に物理的・機械的な損傷を与えるため、生体適合性の面から大いに問題があり、新たなブレークスルーが待ち望まれている。

## 2. 研究の目的

上記課題を解決するために、当研究グループは、生体の細胞膜上に存在する管状膜タンパク質を介して電極と細胞を分子レベルで結合させ、細胞を傷つけずに細胞内部へ電荷を注入する細胞内刺激電極を提案する。管状膜タンパク質は細胞膜中に小孔を形成する管状のタンパク質であり、それが持つイオン透過の機能は細胞刺激用デバイス等への医用生体的な利用が期待できる。管状膜タンパク質を細胞刺激等に利用するには、デバイス内に導入された管状膜タンパク質のイオン透過機能をリアルタイムで評価する手法が必要となる。現在、管状膜タンパク質のイオン透過機能を評価する手法としては電気的パラメータの電気計測が一般的である。しかし、将来的に細胞刺激用デバイス等への管状膜タンパク質の利用を考えた場合、複数個の細胞を同時刺激することが想定されるが、それぞれの細胞に対するイオン透過機能を同時に電気計測によって評価することは容易ではない。

この課題を解決する手法として細胞内シグナル計測に利用される蛍光イオンセンサを用い、その蛍光画像から管状膜タンパク質のイオン透過機能を評価することが考えられる。しかし、イオン透過性機能の計測において、蛍光イオンセンサ利用は計測を容易にするメリットがあるが、その計測結果の精度

がまだ明確化されていない。

本研究では、イオン濃度勾配が存在する人工的な脂質二重膜中に評価対象となる管状膜タンパク質を導入し、それによって生じるイオン透過の推移を蛍光画像によって観測する実験を行い、蛍光イオンセンサを用いたイオン透過機能に対する評価の有効性を調べた。さらに、蛍光観察と同時に、膜を隔てた2つの領域間での電気的計測を実施する実験を行い、蛍光観測と電気的計測のそれぞれから得られた結果の比較を試みた。

## 3. 研究の方法

液滴を利用した人工脂質二重膜生成法を参考にして、人工脂質二重膜中に導入された管状膜タンパク質のイオン透過機能の蛍光観測を行った（図1）。

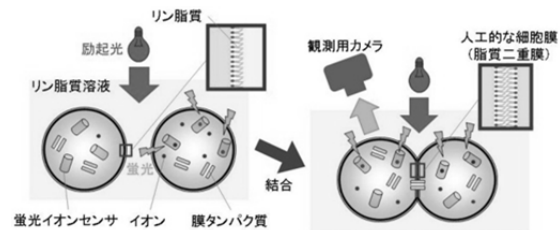


図1 実験の概略

アクリル製チャンバに、リン脂質（DPhPC : Diphytanoyl Phosphatidylcholine, Avanti 社）を溶かした Hexadecane 溶液（20mM, DPhPC）を用意する。次に、表1に示す溶質組成の水溶液 500nl を Hexadecane 溶液に注入し、溶液1の液滴を2個、溶液2の液滴を1個作成する（図2A）。その後、溶液2の液滴を溶液1の液滴に押し付け、結合させることで脂質二重膜を形成する（図2B,C）。膜が形成されると液滴内の管状膜タンパク質が膜中に導入される（図2D）。管状膜タンパク質が導入されれば、濃度勾配にしたがってイオンが移動して、結合した2つの液滴のうち、溶液1の輝度値が上昇、溶液2の輝度値が減少すると考えられる。

表1 液滴の組成

Table 1. Contents and concentration.

Contents	Concentration	
	Solution-1	Solution-2
NaCl	20mM	100mM
KCl	980mM	900mM
HEPES	10mM	10mM
Sodium Green	1.2 $\mu$ M	1.2 $\mu$ M
$\alpha$ -Hemolysin	5 $\mu$ g/ml	5 $\mu$ g/ml

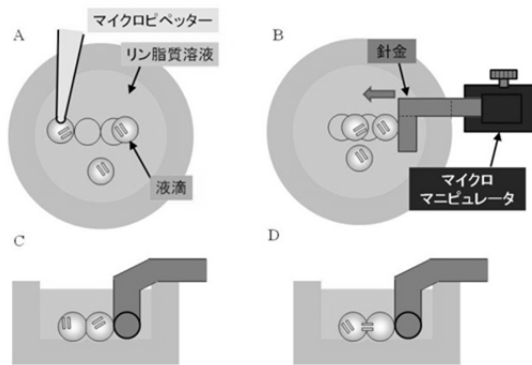


図2 人工脂質二重膜の作成プロトコル. (A) 液滴の作成. (B) 液滴の移動. (C) 液滴の結合. (D) 管状膜タンパク質の膜への導入

今回の実験では、主に  $\text{Na}^+$  イオンの移動に着目し、管状膜タンパク質に  $\alpha$ -Hemolysin (Sigma-Aldrich 社)、蛍光イオンセンサには Sodium Green (Invitrogen 社, S6900) を用いた。なお、Sodium Green の励起光波長は 507nm、蛍光観察波長は 532nm であるため、IB フィルタを取り付けた倒立型落射蛍光顕微鏡 (OLYMPUS 製 IMT-2) に市販のデジタルカメラ (Nikon 製 COOLPIX990) を装着して、蛍光強度の変化を観測した。

観測では、結合時刻を 0 分とし、顕微鏡蛍光画像を  $2048 \times 1536$  pixel, 8bit でカラー撮影し、JPEG 形式で PC に保存した。得られた画像から輝度値の算出の際は、まず各液滴中心部  $200 \times 200$  pixel を切り出し、MATLAB の画像変換関数 (rgb2gray) を用いてグレースケール画像を作成する。そして、それらの画像の全ピクセルの輝度値の平均値を 8bit (255) で正規化した値を、切り出してきた各液滴の輝度値とした。

#### 4. 研究成果

撮影した画像から算出したそれぞれの液滴の輝度値の変化を図 3 に示す。3 つの輝度値は、時間変化に対して同様な振れ方をして推移していた。溶液 2 の輝度値は溶液 1 の 2 つの液滴に比べ、大きな輝度値を取っており、 $\text{Na}^+$  イオン濃度が溶液 1 に比べ多いことと一致している。溶液 1 の結合した液滴と結合していない液滴の輝度の差は時間の経過とともに大きくなった。このことから、結合した溶液 1 の液滴内の  $\text{Na}^+$  イオン濃度が時間の経過とともに上昇していたと考えられる。

観測全体を通して 3 つの輝度値の変化にほぼ等しく生じた振れは、励起光ランプにおける発光の揺らぎや CCD カメラにおける電氣的なノイズ、外光のわずかな変化によるものだと考えられる。

今回の実験において、溶液 1 の結合していない液滴ではイオン濃度の変化は生じない。

そのため本来の輝度値は時間に依存せず、一定であるはずである。したがって、この液滴の輝度値の実測値と本来の真値との差は、外部因子による誤差と見なすことができ、この誤差を残りの 2 つの液滴の輝度値の推移から除くことでそれらの本来の輝度値の推移を知ることができると考えられる。そこで、各経過時間における結合していない液滴の輝度値の平均をその輝度値の真値と仮定して、その際に算出される誤差を残り 2 つの液滴から減算する補正を行った。補正後の輝度値のグラフを図 4 に示す。

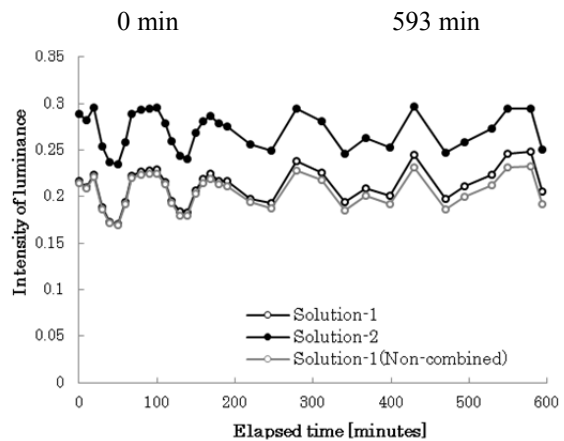
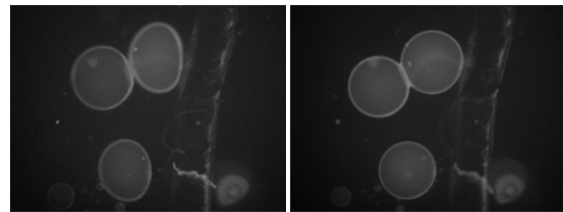


図3 輝度値の時間変化 1. 上の写真は結合時刻からの各経過時間に撮影された画像。上段の結合している液滴が溶液 1 (左) と溶液 2 (右) の液滴。

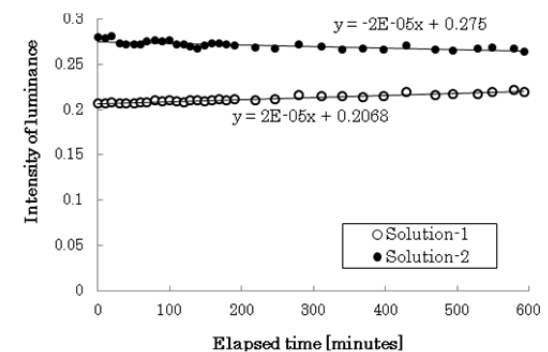


図4 補正後の輝度値の時間変化 1

図にはそれぞれの変化を一次近似した式も示した。この図から溶液 1 の液滴の輝度値の上昇だけでなく、溶液 2 の液滴の輝度値の減少も確認された。これは管状膜タンパク質

が導入されたことによって、濃度勾配に従った Na<sup>+</sup>イオンが拡散するという予想と一致する。したがって、この結果は溶液 2 から溶液 1 へと Na<sup>+</sup>イオンが拡散していることを示唆していると言える。

#### 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 2 件)

1. Yoshikazu Ishii, Tohru Yagi and Michiko Sugawara, Evaluation Method for Ion Transport via Nanopores: Toward a Neural Stimulation Electrode Using Membrane Protein, Proc. of 2011 Biomedical Engineering International Conference (BMEiCON 2011), 82-85, 2011. (査読有)
2. 菅原路子, 崔 源垓, 中西 淳, 山口 和夫, 横田 秀夫, 八木 透, 高精細な細胞運動制御および観察に向けた培養基板へのマイクロパターン形成手法の確立, 電気学会論文誌電子・情報・システム部門誌, 131, 4, 833-839, 2011. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

1. 服部篤志, 宮本義孝, 八木 透, 管状膜タンパク質に対する蛍光イオンセンサを用いたイオン透過性評価方法の検討, 平成 24 年電気学会電子情報システム部門大会, 弘前大学 (青森), 2012 年 9 月 5 日.
2. 服部篤志, 宮本義孝, 八木 透, 管状膜タンパク質のイオン透過機能に対する蛍光イオンセンサを用いた評価, 第 51 回日本生体医工学会大会, 福岡国際会議場 (福岡), 2012 年 5 月 12 日.
3. 服部篤志, 宮本義孝, 八木 透, 管状膜タンパク質のイオン透過機能に対する蛍光イオンセンサを用いた評価手法に向けた研究, 電気学会医用・生体工学研究会, 東京工業大学 (東京), 2012 年 3 月 20 日.
4. Yoshikazu Ishii, Tohru Yagi and Michiko Sugawara, Evaluation Method for Ion Transport via Nanopores: Toward a Neural Stimulation Electrode Using Membrane Protein, Proc. of 2011 Biomedical Engineering International Conference (BMEiCON 2011), Chiang Mai, Thailand, 2012 年 1 月 31 日.
5. 中島健治, Benjamin Knecht, 八木 透, 菅原路子, 画像処理による細胞運動の解析, 電子情報通信学会技術研究会, 東北大学 (仙台), 2010 年 11 月 18 日.

[その他]

ホームページ等

<http://www.io.mei.titech.ac.jp/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

八木 透 (YAGI TOHRU)

東京工業大学・大学院情報理工学研究科・准教授

研究者番号: 90291096

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし