

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 1 日現在

機関番号：92704

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23310088

研究課題名(和文) 膜タンパク質を用いたメカノセンサーアレイによる膜ストレス評価

研究課題名(英文) Evaluation of the membrane stress by mechano sensor array that works with membrane protein

研究代表者

住友 弘二 (Sumitomo, Koji)

日本電信電話株式会社 NTT 物性科学基礎研究所・機能物質科学研究部・主幹研究員

研究者番号：30393747

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：シリコン基板上の微小井戸アレイを脂質二分子膜でシールすることで、膜タンパク質の機能する場を構築した。微小井戸内にイオン濃度に反応する蛍光色素を封入することで、脂質二分子膜に導入したイオンチャネルの機能計測を可能にした。微小井戸の容量を非常に小さくすることで、高感度な検出を実現した。微小井戸をシールする脂質二分子膜は、内外の浸透圧差など機械刺激に非常に敏感に反応することが分かった。高感度なメカノセンサーの可能性を示した。また、実際の神経細胞の成長制御を通して、ナノバイオデバイスと精細胞の連携の可能性も示した。

研究成果の概要(英文)：We succeeded to fabricate nano-biodevices that consist of artificial lipid membranes containing functional membrane proteins; the membrane is suspended over a microwell containing "cytoplasmic" fluid. First, we introduced model proteins such as α -Hemolysin into the lipid membrane and observed Ca^{2+} ion transport through them from the change in the intensity of a fluorescent probe. Second, we also tried to control the growth of neurons on the nanobiodevice by modifying the substrate surface (morphology, coating, and/or electrostatic charges). The confinement of hydrogels in the microwells was proposed to improve the stability of the lipid membrane during neuron culture. The lipid membrane suspended over microwells was very sensitive for the mechanical stress induced by controlling the osmotic pressure. Our nanobiodevice will be a promising platform for analysis and control of mechanical stress on the living cells.

研究分野：ナノバイオ，表面科学

キーワード：バイオセンサー 膜タンパク質 脂質二分子膜 イオンチャネル

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞は周囲の細胞やその他の生体高分子と複雑に相互作用をして機能している。化学的・電氣的刺激と並んで、機械刺激が重要な役割を果たしていることは広く認知されている。例えば、心筋の伸展による心臓の拍動、血管拡張、聴覚や触覚等の物理的な外部刺激等、機械刺激により様々な生体の応答が惹起される。細胞レベルでの機械刺激とその応答測定的手段として、マイクロ/ナノピラー基板を用いる方法がある (J. L. Tan et al.; PNAS 100 (2003)1484)。細胞の足場における力の大きさや方向を正確に計測することが可能である。しかし、この場合にはピラーを足場に成長した細胞に対する観察に限定されてしまうという問題がある。我々は、細胞において機械刺激を受けて応答するチャネルタンパク質に注目する。機械刺激応答性のタンパク質を利用して、生体適合性の良い高感度なメカノセンサー構築を目指す。タンパク質レベルで配置・制御を行い、刺激に応答する機能を測定する。アレイ化により、自然な状態の細胞の膜ストレス評価を実現する。

(2) 我々は、シリコンナノ加工技術を用いたナノバイオデバイス構築に向けた基本技術の一つとして、シリコン基板上に作製した微小な井戸を人工脂質膜で覆った構造を作製してきた。本構造は、人工的に模倣した細胞の一部に相当する。膜タンパク質を人工脂質膜に埋め込むことで、細胞内と同じように膜タンパク質が機能する場を構築し、その機能を利用したナノバイオデバイスの基本構造となりうることを提唱した。

2. 研究の目的

(1) 機械刺激応答性タンパク質の機能と構造の相関、外界からの信号への応答メカニズムに関する知見、またそれらを解明するためのデバイス構築のための基礎技術の獲得を目指す。シリコン基板上の微小井戸をシールする人工脂質膜に、膜タンパク質を導入する事で、膜タンパク質の機能を利用したナノバイオデバイスの構築を目的とする。

(2) ナノバイオデバイスを利用し、実細胞(生細胞)の機能や特性の計測を目的とし、その連携を目指す。ナノバイオデバイス基本構造に対して、実細胞を誘導し、接着・結合等の連携のための基本技術の獲得を目指す。

3. 研究の方法

(1) 膜タンパク質の機能計測を可能とするナノバイオデバイスの構築を行う。特に、以下の課題解決に努める。

①微小井戸をシールする人工脂質膜の安定化
膜タンパク質の機能を安定に計測するために、そして、将来的に生細胞との連携を図るためには、微小井戸をシールする人工脂質膜

の安定化や、デバイスのライフタイムの長期化が必須となる。人工脂質膜を長期間安定に保てるようなデバイス構造の最適化を行う。
②ナノバイオデバイスへの膜タンパク質の導入制御

目的の機能を有する膜タンパク質を抽出・精製し、微小井戸をシールする人工脂質膜への導入を行う。導入場所、導入量、向きの制御を行うとともに、その機能制御を目指す。

③膜タンパク質の機能計測の高精度化
膜タンパク質の機能計測を、蛍光観察と電気生理計測の両面から実施する。微小井戸内にイオン濃度に反応する蛍光プローブを封入する事で、膜タンパク質のイオン透過を計測する。微小井戸のサイズや形状を最適化する事で、高感度計測を実現する。一方で、微小井戸内に電極を配置する事で電気生理計測を行う。SNを向上し、高感度は計測を可能とするようなデバイスの構造最適化を行う。

④脂質膜への機械刺激

脂質膜に外部刺激を与えることで、その形状変化と膜タンパク質の機能変化を計測する。AFMによる機械刺激とともに、SICM(走査イオンコンダクタンス顕微鏡)を併用することで、機械刺激を与えない条件でのイメージングを実現し、機械刺激の影響について検討する。また、浸透圧変化による人工脂質膜への機械刺激と形状変化の付与も検討する。

(2) ナノバイオデバイスと生細胞の連携を試みる。神経細胞に狙いを定めて、その成長制御を試みる。成長の足場となる基板表面の構造や化学修飾を制御することで、目的の場所に神経細胞(特に軸索)を誘導する事を目指す。

4. 研究成果

(1) α -ヘモリシンのイオン透過計測

微小井戸をシールした人工脂質膜に、 α -ヘモリシンを導入する事で、そのイオン透過を計測した。微小井戸内にCaイオン指示薬(Fluo-4)を封入しておくことで、微小井戸内に向かってCaイオンの流入があると、蛍光強度の増大が観察される。微小井戸のポリ

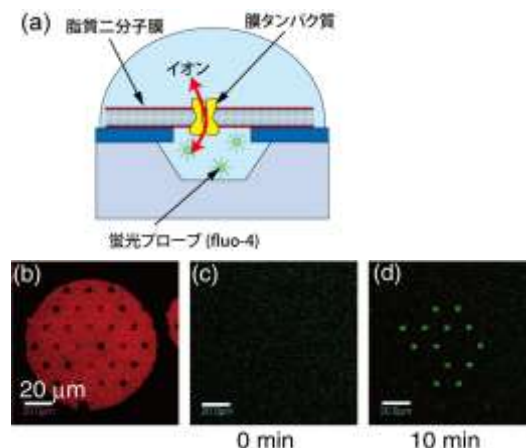


図1 蛍光プローブによるイオン透過計測

ュームが十分に小さいことから、わずかなイオンの流入でも、高感度に検出する事が可能である。

(2) 微小井戸へのゲル封入による脂質膜の安定化

微小井戸内に、ハイドロゲルを封入する事で、人工脂質膜をハイドロゲルで支持できるようになった。人工脂質膜は、その指示により安定化され、長期間安定に保持される。通常の架橋膜では、AFM 探針による機械刺激により、膜は簡単に破れ、そのイメージングは困難であったが、ハイドロゲルの指示により、その上での AFM 観察も可能となった。さらにハイドロゲルは、その構造や化学修飾により、実際の細胞の細胞質や細胞骨格のような役割を果たすことが期待できる。

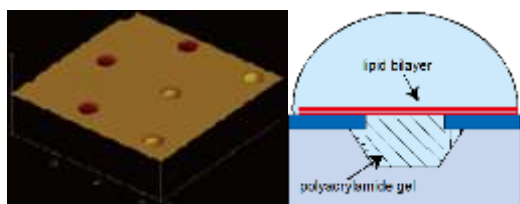


図2 ハイドロゲルによる人工脂質膜の支持

(3) ナノホールアレイによる人工脂質膜支持
電子ビームリソグラフィによりナノホールアレイを薄膜層（熱酸化膜）に形成し、その下の Si 基板を選択的にエッチングすることにより、微小井戸構造を形成した。エッチング条件を選ぶことで、開口径に関係なく微小井戸の容量を生体内のシナプスと同程度にできる。また、ナノホールの開口径（100 nm）は、実際の細胞膜において細胞骨格で囲まれたドメインサイズと同程度に設計した。架橋膜の開口径を小さくすることでその安定性が向上し、ほとんどの微小井戸で脂質膜シールが成功している。さらにナノホールをアレイ化する事で、一つ一つの架橋膜の開口径は小さくしながら、脂質二分子膜の架橋部の総面積を十分に維持し、ナノバイオデバイスの構築に必要な膜タンパク質の導入を可能に

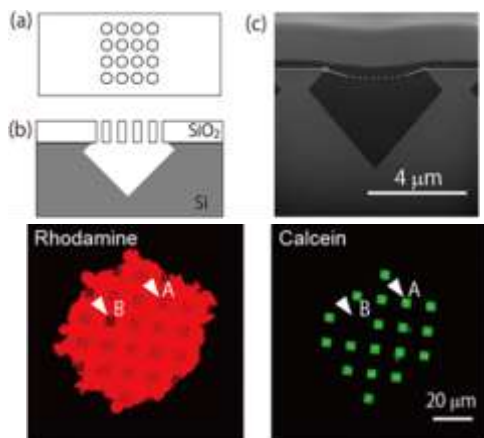


図3 ナノホールアレイを有するシリコン酸化薄膜による人工脂質膜の支持

している。脂質膜のシール効率の向上と同時に、ナノバイオデバイスの寿命の延長にも効果があり、10 日後にもほとんどの微小井戸で封入したプローブからの蛍光が観察された。

(4) 金リングと自己組織化膜によるシール性能の向上

基板と脂質膜の間に存在する薄い水層からのイオンリークがあり、単一タンパク分子レベルの微小なチャネル電流を検出するような高感度センシング実現のためには、解決すべき課題となっていた。微小井戸を囲む金リング構造を新たに設け、その上に自己組織化膜 (SAM) を作製することによってイオン拡散のブロック層とし、高ギガオームシーリングの形成、デバイスの低ノイズ化を実現した。

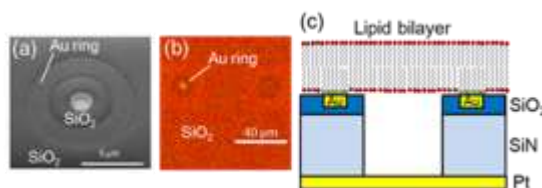


図4 金リング構造によるシール性能の向上

(5) 走査イオンコンダクタンス顕微鏡 (SICM)によるライブセルイメージング

細胞に機械刺激を全く与える事無く、生きた細胞を、SICM を用いて観察した。観察する事による影響を、細胞に与える事無く、アポトーシス（細胞死）前後のイメージングに成功した。

通常の AFM と異なり、機械刺激を全く与える事無く生きた細胞をイメージングする技術は、機械刺激を評価する上で今後その適用範囲の拡大が期待される。

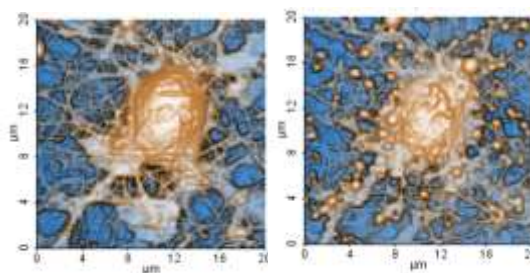


図5 アポトーシス前後の神経細胞

(6) ナノピラーを足場とした神経細胞成長制御

神経細胞が成長するためには、それに適した足場が必要である。人工脂質膜で覆われたナノバイオデバイスの上に神経細胞を誘導するためには、適した足場を構築してやる必要がある。ナノピラーを足場とする事で、人工脂質膜との間隔を適度に保ちながら、神経細胞の成長を制御することを提案した。神経細胞は、ナノピラーを感知し選択的に成長する事を明らかにした。ナノピラーをパターンニングする事で、望みの位置に神経細胞を成長さ

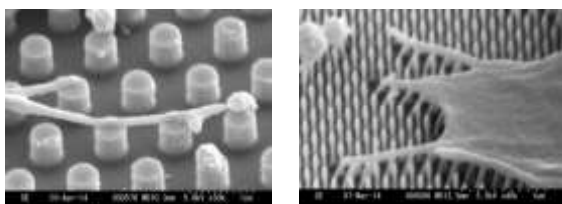


図6 ナノピラーを足場とする神経細胞成長

せることに成功した。

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 9 件)

- ① Aya Tanaka, Hiroshi Nakashima, Yoshiaki Kashimura, Koji Sumitomo, “Fabrication of a gel-supported lipid membrane array on a silicon substrate”, *Jpn. J. Appl. Phys.* **53**, 01AF02 (2014). 査読有
DOI: 10.7567/JJAP.53.01AF02
- ② Aya Tanaka, Yoshiaki Kashimura, Eiichi Kuramochi, Koji Sumitomo “Formation of a suspended lipid membrane on a microcavity covered by a thin SiO₂ layer with a nanohole array”, *Applied Physics Express* **7**, 017001 (2014). 査読有
DOI:10.7567/APEX.7.017001
- ③ Youichi Shinozaki, Aya Tanaka, Nahoko Kasai, Keiichi Torimitsu, Koji Sumitomo “Ligand-induced structural changes in a membrane-reconstituted ion channel observed with atomic force microscopy”, *Applied Physics Express* **7**, 027001 (2014). 査読有
DOI:10.7567/APEX.7.027001
- ④ Nahoko Kasai, Rick Lu, Toichiro Goto, Aya Tanaka, Shingo Tsukada, Yuichi Harada, Koji Sumitomo “Observation of Neuronal Death *In Vitro* by SEM and Optical Microscopy”, *e-Journal of Surface Science and Nanotechnology* **12**, 179-184 (2014). 査読有
DOI:10.1380/ejssnt.2014.179
- ⑤ Toichiro Goto, Yuichi Harada, David Cox, Koji Sumitomo “Fabrication of a Ring Structure at the Aperture of a Hole for the efficient Suspension of Lipid Bilayer”, *Jpn. J. Appl. Phys.* **53**, 096503 (2014). 査読有
DOI:10.7567/JJAP.53.096503
- ⑥ Yoshiaki Kashimura, Koji Sumitomo, Kazuaki Furukawa “Electrostatic control of the dynamics of lipid bilayer self-spreading using a

nanogap gate”, *Materials Research Express* **1**, 035404 (2014). 査読有
DOI: 10.1088/2053-1591/1/3/035404

- ⑦ Aya Tanaka, Hiroshi Nakashima, Yoshiaki Kashimura, Koji Sumitomo “Electrostatically Induced Planar Lipid Membrane Formation on a Cationic Hydrogel Array by the Fusion of Small Negatively Charged Unilamellar Vesicles”, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **477**, 63 (2015). 査読有
DOI: 10.1016/j.colsurfa.2015.03.049
- ⑧ Toichiro Goto, Nahoko Kasai, Rick Lu, Roxana Filip, and Koji Sumitomo “SEM observation of interface between single neurons”, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* (Accepted). 査読有
- ⑨ 水谷祐輔, 田中良昌, 田中あや, 住友弘三, 岡嶋孝治
「イオンコンダクタンス顕微鏡：細胞表面の揺らぎを計測する」*光学* Vol. 44, No. 6 (2015)

[学会発表] (計 58 件)

- ① Koji Sumitomo, Yukihiro Tamba, Aya Tanaka, Keiichi Torimitsu “Localization of Liquid-ordered/Liquid-crystalline phase separation at a lipid bilayer suspended over microwells” 56th Biophysical Society Meeting (2012.2.25-29), San Diego, USA.
- ② Nahoko Kasai, Akiyoshi Shimada, Shingo Tsukada, Aya Tanaka, Yoshiaki Kashimura, Koji Sumitomo, Keiichi Torimitsu “Micro/nano-fabrication for biological interface”, The 7th International Symposium on Organic Molecular Electronics, June 7-8, 2012, Musashino, Tokyo (招待講演)
- ③ Yoshiaki Kashimura, Koji Sumitomo, Kazuaki Furukawa “Controlling the dynamics of lipid bilayer self-spreading electrostatically using nanogap gate”, *Molecular and Bio Electronics-7*, March 17-19, 2013, Fukuoka
- ④ Aya Tanaka, Hiroshi Nakashima, Yoshiaki Kashimura, Koji Sumitomo “Fabrication of a cytoskeleton-mimetic structure array on a silicon substrate”, *Molecular and Bio Electronics-7*, March 17-19, 2013, Fukuoka
- ⑤ Yoshiaki Kashimura, Ruaridh Forbes, Yukihiro Tamba, Koji Sumitomo, Keiichi Torimitsu “Controlling Manipulation, Stimulation, and Rupture of Giant

- Unilamellar Vesicles on Si Substrate for Lipid Bilayer Array”, Materials Research Society Spring Meeting (2013.4.1-5) San Francisco, USA.
- ⑥ Koji Sumitomo, Aya Tanaka, Nahoko Kasai, Yoshiaki Kashimura, Keiichi Torimitsu, John F. Ryan
“Nanobiodevice which consists of the artificial lipid membrane suspended over microwell array”, 9th European Biophysics Congress EBSA2013 (2013.7.13-17), Lisbon, Portugal.
- ⑦ Koji Sumitomo, Nahoko Kasai, Yoshiaki Kashimura, Aya Tanaka, Toichiro Goto, Azusa Oshima, Shingo Tsukada, Hiroshi Nakashima
“Nanobiodevice for mimicking synaptic connections”, ACSIN-12/ICSPM-21 (2013.11.4-8), Tsukuba, Japan.
- ⑧ Aya Tanaka, Azusa Oshima, Nahoko Kasai, Shingo Tsukada, Koji Sumitomo
“Time lapse imaging of living cells by scanning ion conductance microscopy”, ACSIN-12/ICSPM-21 (2013.11.4-8), Tsukuba, Japan.
- ⑨ Nahoko Kasai, Toichiro Goto, Aya Tanaka, Azusa Oshima, Shingo Tsukada, Yuichi Harada, Koji Sumitomo
“SEM Observation of Neurons Cultivated on a Substrate”, ACSIN-12/ICSPM-21 (2013.11.4-8), Tsukuba, Japan.
- ⑩ Yoshiaki Kashimura, Ruaridh Forbes, Koji Sumitomo
“A Platform for Low Noise Biosensors Using Microwells Sealed with Lipid Bilayers”, 26th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC 2013) (2013.11.5-8), Sapporo, Japan
- ⑪ Toichiro Goto, Yuichi Harada, David Cox, Koji Sumitomo
“Fabrication of Ring Structure at the Hole Aperture”, 26th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC 2013) (2013.11.5-8), Sapporo, Japan
- ⑫ Koji Sumitomo, Nahoko Kasai, Aya Tanaka, Yoshiaki Kashimura, Toichiro Goto, Azusa Oshima, Shingo Tsukada
“Nanobiodevice that consists of membrane proteins and an artificial lipid bilayer”, Energy Material Nanotechnology Fall Meeting (2013.12.7-10), Orland, USA. (招待講演)
- ⑬ Aya Tanaka, Hiroshi Nakashima, Yoshiaki Kashimura, Koji Sumitomo
” Formation of a gel-supported lipid membrane array on a micropatterned substrate”, Biophysical Society 58th Annual meeting, (2014.2.15-19), San Francisco, USA.
- ⑭ 住友弘二, 田中あや, 榎村吉晃, 河西奈保子, 大嶋梓, 後藤東一郎, 塚田信吾, 中島寛
「膜タンパク質で機能するナノバイオデバイスの構築」有機分子・バイオエレクトロニクス研究会, 2014.3.5 (東京) (招待講演)
- ⑮ Yoshiaki Kashimura, Ruaridh Forbes, Azusa Oshima, Koji Sumitomo
“Electrophysiological detection using microwells sealed with lipid bilayers”, The 8th International Symposium on Organic Molecular Electronics (2014.5.15-16) Koganei, Japan.
- ⑯ Aya Tanaka, Azusa Oshima, Nahoko Kasai, Toichiro Goto, Shingo Tsukada, Koji Sumitomo
“Live Cell Imaging of Neurons by Scanning Ion Conductance Microscopy”, 17th International Conference on non-contact Atomic Force Microscopy (2014.8.4-8), Tsukuba, Japan.
- ⑰ Nahoko Kasai, Rick Lu, Toichiro Goto, Yoshiaki Kashimura, Azusa Oshima, Koji Sumitomo
“Neuronal growth on nano-pillar substrates”, the 26th Annual Conference of the European Society for Biomaterials (ESB) (2014.8.31-9.3) Liverpool, UK
- ⑱ Koji Sumitomo, Nahoko Kasai, Yoshiaki Kashimura, Aya Tanaka, Azusa Oshima, Toichiro Goto, Tetsuhiko Teshima, Shingo Tsukada, Hiroshi Nakashima
“Nanobiodevice for mimicking synaptic connections with living neurons”, The 7th International Symposium on Surface Science (2014.11.2-6) Matsue, Japan.
- ⑲ Azusa Oshima, Aya Tanaka, Yoshiaki Kashimura, Koji Sumitomo
“Control of Vesicle Fusion into Bilayer Lipid Membranes by Using Electrostatic Interaction”, The 7th International Symposium on Surface Science (2014.11.2-6) Matsue, Japan.
- ⑳ Yoshiaki Kashimura, Ruaridh Forbes, Azusa Oshima, Koji Sumitomo
“Sealed microwells with lipid bilayers in a Si substrate for detecting ion channel activity”, The 7th International Symposium on Surface Science (2014.11.2-6) Matsue, Japan.
- 21 Azusa Oshima, Aya Tanaka, Yoshiaki Kashimura, Koji Sumitomo

- “Vesicle Fusion into Supported Lipid Bilayer on SiO₂ Substrates Observed by Atomic Force Microscopy”, The 22nd International Colloquium on Scanning Probe Microscope (2014.12.11-13), Izu-Atagawa, Japan
- 22 Toichiro Goto, Nahoko Kasai, Rick Lu, Roxana Filip, Koji Sumitomo
“SEM observation of interface between a neuron and a conductive surface”, 11th International Conference on Nano-Molecular Electronics (2014.12.17-19), Kobe, Japan.
- 23 住友弘二, 河西奈保子
「膜タンパク質で機能するナノバイオデバイス」日本学術振興会, 薄膜 131 委員会/半導体界面制御技術第 154 員会合同研究会, 2015.2. 24 (招待講演)
- 24 Koji Sumitomo
“Nanobio device for mimicking synaptic connections”, ISPlasma2015 /IC-PLANTS2015 (2015.3.26-31), Nagoya, Japan (招待講演)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 6 件)

名称: 脂質膜ベシクルの操作方法、及び基板支持脂質膜
発明者: 榎村吉晃, 住友弘二, 田中あや, 河西奈保子, 鳥光慶一
権利者: 日本電信電話株式会社
種類: 特許
番号: 特願 2012-178664
出願年月日: 2012 年 8 月 10 日
国内外の別: 国内

名称: 基板、前記基板を生体分子の機能測定に使用する方法、及び前記基板の製造方法
発明者: 田中あや, 住友弘二, 榎村吉晃, 倉持栄一
権利者: 日本電信電話株式会社
種類: 特許
番号: 特願 2013-012404
出願年月日: 2013 年 1 月 25 日
国内外の別: 国内

名称: 脂質二分子膜支持基板及びその製造方法
発明者: 後藤東一郎, 原田裕一, 住友弘二, David Cox
権利者: 日本電信電話株式会社, The secretary of state for business innovation and skills of her majesty's britannic government
種類: 特許
番号: 特願 2013-047338
出願年月日: 2013 年 3 月 8 日

名称: ハイドロゲルアレイ基板及び前記基板の製造方法、並びに脂質二分子膜アレイ基板及び前記基板の製造方法
発明者: 田中あや, 榎村吉晃, 住友弘二
権利者: 日本電信電話株式会社
種類: 特許
番号: 特願 2013-050364
出願年月日: 2013 年 3 月 13 日
国内外の別: 国内

名称: プロテインチップの製造方法およびプロテインチップ
発明者: 田中あや, 大嶋梓, 住友弘二, 手島哲彦
権利者: 日本電信電話株式会社
種類: 特許
番号: 特願 2014-260861
出願年月日: 2014 年 12 月 24 日
国内外の別: 国内

名称: 導電性ゲル、導電性ゲルの製造方法、並びに、細胞の観測及びハンドリングシステム
発明者: 手島哲彦, 住友弘二, 塚田信吾, 河西奈保子, 田中あや, 佐々木智, 中島寛
権利者: 日本電信電話株式会社
種類: 特許
番号: 特願 2015-012649
出願年月日: 2015 年 1 月 26 日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.brl.ntt.co.jp/people/sumitomo/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

住友弘二 (SUMITOMO, Koji)

日本電信電話株式会社・NTT 物性科学基礎研究所・主幹研究員
研究者番号: 30393747

(2) 研究分担者

鳥光慶一 (TORIMITSU, Keiichi)

東北大学・工学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号: 00393728

榎村吉晃 (KASHIMURA Yoshiaki)

日本電信電話株式会社・NTT 物性科学基礎研究所・研究主任
研究者番号: 90393751

(3) 連携研究者

なし