

平成 21 年 4 月 21 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2009

課題番号：18074001

研究課題名（和文）：マイクロナノ加工技術を用いた膜タンパク質機能解明のためのプラットフォーム

研究課題名（英文）：An experimental platform for membrane protein analysis by using micro/nano machining technologies

研究代表者

竹内 昌治

東京大学・生産技術研究所・准教授

研究者番号：90343110

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：膜タンパク質，マイクロデバイス，マイクロチャンバ，MEMS，MicroTAS，Lab on a Chip

1. 研究計画の概要

本研究では、膜超分子モータの機能解明の効率化を可能とする実験プラットフォームを、マイクロ・ナノ加工技術を利用して実現することを目的とする。具体的には、マイクロ・ナノ加工技術を利用して、膜形成のための小孔を作製し、再現性や安定性の向上を図る。

膜構造の再構成技術は、各種の膜タンパク質の機能や特性の解明に必要な不可欠なプラットフォームとである。また、本研究で注目する膜分子モータに限らず、イオンチャンネルや、薬剤排出とトランスポータなどへの応用も期待できる。これまでの国内外で発表されている人工平面膜法は、一分子の機能解析が可能で、膜電流が計測不能なトランスポータなどの活性計測にも有効であるが、脂質二重膜の再構成プロセスは運まかせで、再構成膜の再現性、安定性は極めて低いという問題があった。また、複数の脂質膜を同時に再構成するのは至難の業であった。そこで、ここではマイクロ・ナノ加工技術を利用して、小型チップ上に再現性よく、安定して脂質膜を再構成できる計測プラットフォームを実現する。マイクロ加工により、小孔のサイズを調整し、平面膜の安定化を図る。また、微小流路と組合せ、脂質の量や液体導入圧力を制御し、再現性を向上させる。さらに、小孔を独立にアレイ化し、異種の膜タンパク質の膜電流計測、物質輸送イメージングを選択的に行えるシステムを世界初で開発する。さらにここでは、マイクロ流体デバイス技術の特長をいかし、マイクロチャンバと人工膜を組み合わせた実験系の構築についても検討する。

2. 研究の進捗状況

平面膜チップの研究に関しては、マイクロ・ナノ加工技術を利用して、微小孔のアレイを作製し、その孔に膜を形成することで、再現性、安定の問題に取り組んでいる。複数同時に膜形成が行なえれば、そこに複数種の膜タンパク質を導入し、同時に多くの機能解析を行なうことができる。膜タンパク質の機能計測のうち、イオンチャンネル電流計測は比較的簡単に行うことができる。これまでに我々は、脂質を溶解させた有機溶媒中に2つの液滴を用意し、それらの界面に形成された脂質の単分子膜を接触させる方法によって脂質二重膜を効率的に形成する方法（接触法と名づけた）を確立している。この接触法により形成した膜に、チャンネル性の膜タンパク質などを導入し、膜の両端にかかる電圧を固定した条件でのイオンチャンネル電流の計測に成功した。

また、マイクロ流路を作成し、ここに水層と油層を交互に流すことによって、チャンバを作成する方法を考案した。本方式は、長時間大量のチャンバを観察する実験に適していることが分かってきた。また、このデバイスに脂質を混入させた有機溶媒を用いることによって、チャンバの開口部を脂質二重膜で覆うこともできるようになってきた。

分担者の宗行は、誘電泳動の原理を用いて回転分子モーターである F1-ATPase に時間・空間的にほぼ均一な外部トルクをかけて、その応答を観察する研究を行っている。

3. 現在までの達成度...

膜の実験では、膜タンパク質の中でも、比較的分子量が小さく、扱いの容易なチャンネルタンパク(グラミシジン A や -ヘモリシンなどのペプチドやタンパク質)を利用した。これらは、多量体化によりナノポアを形成し、チャンネル電流を発生させる。実際の膜タンパク質の再構成は、一般的に膜融合法が用いられる。これは、膜画分やリボソーム中に精製した膜タンパク質を平面膜上にばら撒くことによって融合をさせる方法である。この融合により、スパイク状のチャンネル電流を計測できることが分かってきた。また、これらの方法を利用して多チャンネル膜形成用のデバイスを試作し、実際に各部に再構成した膜から、ペプチドなどからのイオンチャンネル電流を複数同時に計測できるようになってきた。また、マイクロチャンバを利用した実験システムの構築においては、マイクロ流路を組み合わせることで一層の効率化を図っている。

誘電泳動の実験系では溶液のイオン強度を下げなければならないため、実験条件下での ATPMg と ATP、Mg の平衡関係や F1-ATPase の活性等を検討し、最適と考えられる実験条件を模索した。さらに実験手順を洗練して外部トルクの校正を全ての実験について個別に行うことにより、データのばらつきをある程度減らすことに成功し、外部トルク存在下でのステップ回転の挙動を論文として発表した。この時点では、電場をかけることによる発熱が問題となっており、定性的な考察しかできなかったがその後、回転電場法による温度上昇の問題を溶液条件、セルの構造、回転観察用ビーズの大きさなどを検討することで問題をならない程度まで軽減した。また録画系、データ処理系に関しても改良を行い、1000fps で撮影した動画を撮影と同時に重心解析をしながらハードディスクに取り込むシステムを構築した。このことにより以前に比べると飛躍的に実験が楽になり、順調にデータがとれるようになった。

4. 今後の研究の推進方策

おのこの要素技術が確立してきたので、さらにシステムとしての完成度を高める研究を推進していく。さらに、今後は領域内の他の研究者との共同研究を進め、実際に膜サインエスに利用可能なマイクロデバイスを実現する。

5. 代表的な研究成果

(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 11 件)

1. H. Suzuki, B. Lepioufle, and Shoji Takeuchi: 96-well Parallel Ion

Channel Recording Chip Fabricated by Hybrid Stereolithography, Biomedical Microdevices (online)

〔学会発表〕(計 64 件)

【口頭発表：国外】

1. Sadao Ota, Wei-Heong Tan, Hiroaki Suzuki, and Shoji Takeuchi: Microfluidic Formation of Lipid Bilayer Array for Membrane Transport Analysis, MEMS2008, pp.18-21, 2008

【ポスター発表：国外】

1. Yuya Morimoto, Wei-Heong Tan, Shoji Takeuchi: "Housing" for Cells in Monodisperse Microcages, MEMS2008, pp.304-307, 2008

【口頭発表：国内】

1. Yuya Morimoto, Wei-Heong Tan and Shoji Takeuchi, "Formation of Monodisperse Hydrogel Capsules using Three-Dimensional Microfluidic Channel", 第 24 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, pp. 325-328, 2007.

【ポスター発表：国内】

1. 栗林香織, 竹内昌治, "パレンパターンニング法を用いた均一径ジャイアントリポソーム", 「細胞を創る」研究会 0.0, pp. 15, 2007.