

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K13725

研究課題名(和文)新しい人工脂質膜法を用いた1分子センサーの開発

研究課題名(英文)Development of a single molecule sensor with a novel method for artificial bilayer measurements.

研究代表者

井出 徹(Ide, Toru)

岡山大学・自然科学研究科・教授

研究者番号：60231148

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):本研究では、金属電極表面に固定したチャネル蛋白の活性を迅速に測定可能となる装置の開発を目指した。

()膜形成法の改良:人工膜を金属電極と水溶液の界面に効率よく形成することが可能となった。電解研磨した金電極の表面を親水性高分子で修飾し、脂質溶液層を通過させるのみで安定な膜形成が見られ、チャネル形成ペプチドによる単一チャネル電流計測も可能となった。()チャネル蛋白組み込み:上記電極表面にチャネル蛋白を固定し人工膜に再構成した。電極表面に脂質二重層膜が形成されるのとほぼ同時にチャネル蛋白が膜中に組み込まれた。数種のヒトチャネル蛋白の組込に成功しており、阻害剤による活性の制御も可能となった。

研究成果の概要(英文):The purpose of this study was to make a novel bio-sensor using artificial bilayers formed on the surface of a gold electrode.

(1) Improvements of conventional method for bilayer formation: We have developed the method for bilayer formation at water/metal interface. The surface of a gold electrode was modified with hydrophilic polymers. A stable artificial bilayer was formed just by moving the tip through a lipid solution layer. Using this bilayer, we measured single channel current fluctuations of channel forming peptides such as gramicidin.(2) Protein incorporation: Ion channel proteins were immobilized on the surface of the gold electrode and these were inserted into the bilayer. The channels were incorporated into the bilayer almost simultaneously with bilayer formation at the interface. We measured single channel currents of several types of human channel proteins using this method.

研究分野:生物物理学

キーワード:単一チャネル計測 センサー 1分子計測 人工膜

1. 研究開始当初の背景

チャンネルタンパクは、広範囲に渡る細胞活動に関係するタンパクで、チャンネルタンパクの欠陥が原因である多くの疾患群（チャンネル病）が知られており、早急な治療薬開発が求められている。ところが、好適なセンサーデバイスが無いことから、創薬スクリーニングを動物実験等の時間がかかる方法に頼らざるを得ず、治療薬の開発が遅れている。チャンネル病治療薬の創薬支援のための高感度、高効率（ハイスループットスクリーニング、HTS）、コンパクトなセンサーの開発が望まれる。

チャンネルタンパクの多くは、特定の薬剤刺激、電位刺激等で開き、 $0.1 \sim 1 \text{pA}$ (10^{-12}A) 程度のイオン性電流を生じさせる。この1分子による電流は容易に測定可能であり、この方法は単一チャンネル電流記録法と呼ばれている。これを用いた薬理計測は、感度、精度ともに非常に高く、チャンネル薬理の計測においては標準的な方法として用いられている。しかし、現在の一般的な方法（人工平面膜法、パッチクランプ法）は、測定効率が低く、 $10 \sim 20$ 検体/日が上限である。そこで、測定の高効率化を目指して、様々な試みがなされているが、これまでのところ上記の創薬支援装置として十分な機能を有するものは開発されていない (Terstappen et al. Future Med. Chem. (2010), 715)。我々も、人工膜を用いた装置の高効率化に努めてきたが (Kawano et al. Sci. Rep. 3: 1995)、実用に耐える装置とするには、自動化も含めた測定効率の更なる向上、即ち新しい技術の開発が求められている。

従来法の測定効率を下げているのは、人工膜形成、及びチャンネルタンパクの人工膜への組込に時間を要することにある。最近我々は、新しい人工膜の形成法、チャンネルタンパクの組込法を開発した (Kitta et al. Small 7 (2011) 2379) が、これによれば、単一チャ

ネル電流測定の効率を従来法の100倍以上に上げることが可能と考えられる。

2. 研究の目的

チャンネル病治療薬の創薬支援のための高感度、高効率、コンパクトなセンサー開発を行う。即ち、疾患の原因となるチャンネルタンパク1分子からの電流信号を用いた、治療用薬剤のスクリーニング装置を開発する。装置開発には、我々が開発した新しい人工膜形成法、及びチャンネルタンパクの人工膜への組込法を用いる。これらを用いることにより、チャンネル電流の測定効率を従来法に比較して著しく引き上げることができるものと期待される。これらの技術とマイクロタス技術を組み合わせることにより、チャンネル電流計測の自動化が可能となり、実際の創薬スクリーニングに耐え得る、ハイスループットな装置の作製に繋がるものと考えられる。

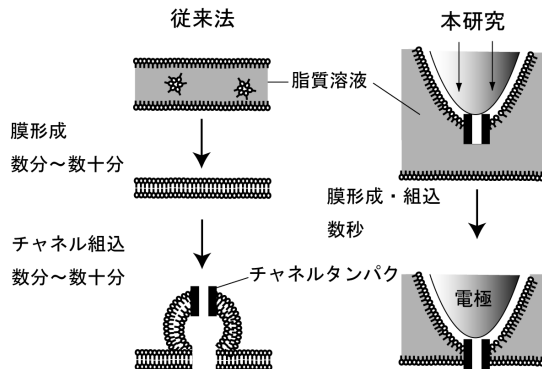


図1 従来法との比較

3. 研究の方法

従来の人工膜を用いたチャンネル電流計測法では、人工膜の形成、及びチャンネルタンパクの人工膜への組込を自発的な過程に委ねられている。つまり、膜が自然に形成され、チャンネルタンパクが自然に膜中に組み込まれるのを「待つ」必要がある。この過程は確率的に起こるので制御は難しく、通常、数分から数十分を要する。これがチャンネル電流計測全体の効率を著しく減じている。

そこで、膜形成過程、チャンネル組込過程を制御するために、図1のような方法を開発した。ここでは、親水修飾した金属電極を脂質

溶液層を通過させることによって、電極表面に人工膜を形成させる。力学的に脂質溶液を排除しているため、膜の形成に要する時間は制御可能であり、数秒以内にチャンネル電流を計測できる状態になる。電極先端を鋭利に加工しておけば、膜面積は非常に小さく、安定な人工膜が形成できる。従来法でしばしば問題となった膜の脆弱性も併せて解決可能である。

チャンネルタンパクの人工膜への組込も同様に力学的な方法で行う。従来法ではベシクル融合などの確率的な過程を経ていたが、本研究では電極表面に固定したチャンネルタンパクを人工膜に直接挿入する。

本研究開始時点で上記の要素技術の開発に成功していたので、それらの改良を主な目標とした。

(1) 膜形成法の改良

漏れ電流を減じ、かつ膜形成効率を上げるために、電極の素材、形状、修飾法を検討した。具体的には、金・銀・タングステン等の電極材料、電解研磨・機械研磨等の加工法、PEG、糖などによる表面修飾法を組み合わせ、人工脂質二重層膜を形成した。この時、各組合せによる膜形成効率を比較した。組合せの選択は網羅的に、電極形状は試行錯誤しながら決定した。

人工脂質二重層膜の形成は、グラミシジン、アラメチシン等のチャンネル形成ペプチドによるチャンネル電流の計測を以て行った。これらは二重層膜が形成されたときにのみ、水溶液相から膜中に入りイオン性電流を生じさせる。

(2) チャンネル組み込み法の改良

電極表面に固定したチャンネルタンパクを直接人工膜に組み込んだ。チャンネルの組込効率が最大となるように、電極の素材および形状、表面修飾法、チャンネルの固定法を検討した。装置のコンパクト化、チャンネル組込の迅速化を目指して、(1)で作製した電極にこの方法を応用した。(1)(2)は独立ではな

く、(2)の結果を踏まえて(1)の電極作製法を再検討した。

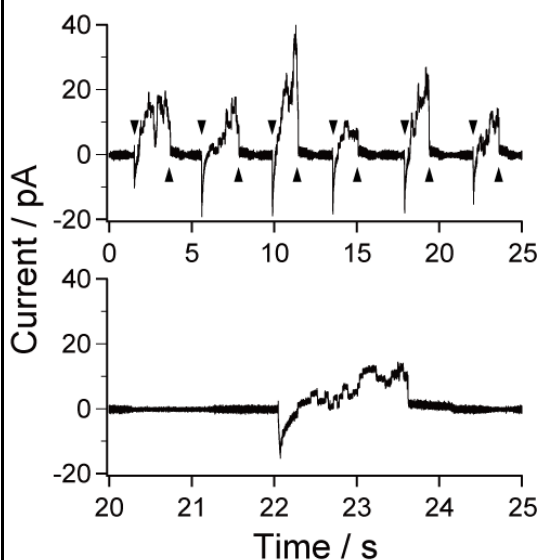
チャンネルタンパクの電極表面への固定法も、アミノ基、チオール基を介した固定、タンパクと支持体との間にスペーサーを挿入するなど、より組み込み効率の良い固定法を検討した。

(3) 自動化

測定の高効率化を図るために装置の自動化を試みた。

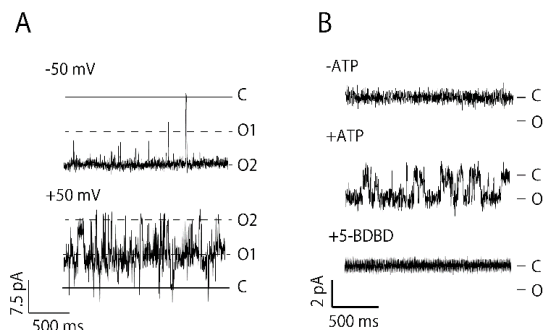
4. 研究成果

(1) 膜形成法の改良：人工膜を金属電極と水溶液の界面に形成するために、電極の素材、形状、修飾法を検討した。電解研磨した金電極の他に、金線先端をハサミで斜めに切断したものをを用いても良好な結果が得られた。何れの場合も安定な二重層膜形成が見られ、グラミシジン等のチャンネル形成ペプチドによる単一チャンネル電流計測も容易に行うことが出来た。下図は本法による人工膜形成の繰り返しを示している。数秒以内に人工膜形成が可能である。

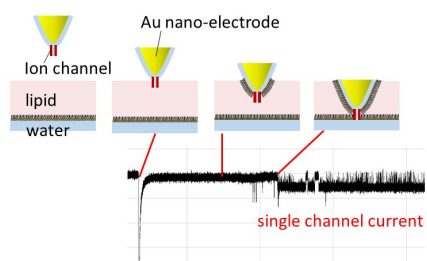


(2) チャンネル蛋白組み込み法の改良：上記電極表面に界面活性剤を用いて精製したチャンネル蛋白を His-tag を介して結合させ、人工膜に再構成した。電極表面に脂質二重層膜が形成されるのとほぼ同時にチャンネル蛋白が膜中に組み込まれることを確認した。BK、

P2X4 等のヒトチャネル蛋白の組込に成功しており、賦活剤、阻害剤による活性の制御も測定可能となった。下図 A,B は各々BK、P2X4 チャネルによる単一チャネル電流記録である。



(3)測定の自動化:マイクロ流路技術との融合に向けて、電極先端の形状検討を行った。ガラス管を用いた微小電極をモデルとして、水溶液の流動に耐え得る膜形成法(電極の形状)を検討した。これを用いて、チャネル形成ペプチドの活性測定が安定して行えるようになった。また、上記(1)(2)を自動化することに成功した。下図は自動計測装置によるKcsAチャネル電流の計測結果である。



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 2件)

Daichi Okuno, Minako Hirano, Hiroaki Yokota, Junya Ichinose, Takamitsu Kira, Taiki Hijiya, Chihiro Uozumi, Masahiro Yamakami and Toru Ide. A gold nano-electrode for single ion channel Recordings. *Nanoscale*, 2018, 10, 4036-4040. 査読有

Daichi OKUNO, Minako HIRANO, Hiroaki YOKOTA, Yukiko ONISHI, Junya ICHINOSE,

Toru Ide. A Simple Method for Ion Channel Recordings Using Fine Gold Electrode. *Analytical Sciences*, 32(12), 2016, 1353-1357. 査読有

[学会発表](計 8件)

Toru Ide, Minako Hirano. Artificial bilayers on a substrate for channel recordings. 9th International Workshop on Nanostructures & Nanoelectronics. Sendai (2018)

井出 徹, 山上 真弘, 平野 美奈子, 横田 浩章, 一ノ瀬 純也. Single channel recordings of ion channels immobilized on a solid substrate. The 55th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan. Kumamoto (2017)

平野 美奈子, 川島 信幸, 富田 正久, 井出 徹. Automated system for channel current measurements. The 55th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan. Kumamoto (2017)

Toru Ide, Minako Hirano. Single molecule measurement of ion-channel proteins. 8th International Workshop on Nanostructures & Nanoelectronics. Sendai (2017)

Minako Hirano, Toru Ide. Effects of the electrostatic state of the cytoplasmic domain in the KcsA channel on its gating. The 54th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan. Tsukuba (2016)

Toru Ide, Minako Hirano et al. Artificial bilayers formed on a solid substrate for ion-channel recordings. The 54th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan. Tsukuba (2016)

井出 徹. Single Molecule Study of Ion-Channel Proteins. ナノテクノロジー融合研究会. 名古屋大学(2016)

井出 徹. チャネル蛋白の電気・光学的1分子同時計測. 第1回バイオ単分子研究会. 福島いわき湯本(2015)

6. 研究組織

(1)研究代表者

井出 徹 (IDE, Toru)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授
研究者番号: 60231148