

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究(B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19310087  
 研究課題名（和文） 脂質二重膜マイクロチャンバアレイを用いた生体膜輸送計測システム  
 研究課題名（英文） MEASUREMENT SYSTEM FOR BIOMEMBRANE TRANSPORT USING LIPID BILAYER MICROCHAMBER ARRAY  
 研究代表者  
 鈴木 宏明 (SUZUKI HIROAKI)  
 大阪大学・大学院情報科学研究科・准教授  
 研究者番号：20372427

## 研究成果の概要：

マイクロチャンバアレイを利用して、生体の膜輸送タンパク質の輸送効率を評価する実験系の構築を行った。膜タンパク質を再構成するためには、人工脂質二重膜を高効率で形成する必要があり、その基盤技術を確立した。最終的に、人工脂質二重膜にABC輸送膜タンパク質を再構成し、それらにより輸送基質分子を微小空間（マイクロチャンバ）中に蓄積させ、蛍光顕微鏡による検出を試みた。本課題では、解決すべき課題が残るものの、膜輸送タンパク質の輸送を定量評価するための有力な技術基盤を確立した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	11,900,000	3,570,000	15,470,000
2008 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
年度			
総計	15,500,000	4,650,000	20,150,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：マイクロ・ナノデバイス

キーワード：膜蛋白質、マイクロチャンバ、脂質二重膜、アレイ技術、膜輸送

## 1. 研究開始当初の背景

細胞膜などの生体膜上で機能する様々な膜タンパク質は、物質輸送、情報伝達、エネルギー変換など多彩で重要な役割を果たしており、処方薬の6割以上は膜タンパク質をターゲットとしている。膜タンパク質は脂質二重膜構造の中に組み込まれた状態で存在しており、可溶性のタ

ンパク質に比べて取り扱いが非常に難しく、いまだに構造や機能解明はあまり進展していないため、早急な機能解明が急務となっている。特に、膜輸送や信号伝達に関連するタンパク質の機能を、タンパク質一分子レベルで定量評価することは現在の計測技術では非常に困難である。通常は生細胞に発現したタンパクを用いて評価されるが、細胞膜上には多種雑多な膜

タンパク質が混在しており、目的のタンパク質の発現量も不明であるため、タンパク質一分子あたりの機能を定量することは不可能である。

一方、生体組織や培養細胞を用いた実験系とは対照的に、精製脂質から人工脂質二重膜(いわゆる黒膜)を再構成し、そこに精製タンパク質を組み込んで機能解析を行う、ボトムアップ的なアプローチも存在する。この系では組み込んだ目的タンパク質のみに注目して実験を行うことが可能で、脂質や溶液の組成も自由に制御できるため、一分子計測および生理的条件の範囲外での挙動の網羅的計測も可能となる。人工脂質膜を利用した膜タンパク質一分子レベルでの機能解析は、イオンチャンネルを中心に行われてきた。代表者らは、解析の効率化を図るため、微細加工技術により作製したマイクロ流体制御チップにより、人工脂質二重膜を再現性良く再構成する技術を開発し、このような膜タンパク質一分子レベルでの高ハイスループット電気生理計測システムを開発してきた。イオンチャンネルを透過するイオンは電流として検出できるため、専用の信号増幅器(パッチアンプ)を用いることにより1pA程度の解像度で検出することができる。しかし、イオン分子以外の物質(核酸や糖、タンパクなどの高分子量物質、また化学物質や薬剤)の輸送は、この方法では計測できないため、全く新しい実験手法が必要であった。

## 2. 研究の目的

本課題では、微細加工技術を生かし、非イオン性物質の膜輸送を計測するための実験システムの構築を目的とした。人工脂質二重膜に輸送膜タンパク質を再構成し、それらにより輸送された分子(基質分子、あらかじめ蛍光ラベルを付加しておく)を微小空間(マイク

ロチャンパー)中に蓄積させることができれば、蛍光検出により検出することが可能となる。微小空間中に蓄積するため、輸送量が微量でも濃度が急上昇し、超高感度での検出が期待できる。

具体的には、図1に示すような実験系を構築し評価を行った。カバーガラス基板上に直径数~数十 $\mu\text{m}$ 、深さ数 $\mu\text{m}$ の微小チャンパーアレイを設け、その上に別途上側チャンパーの開口部(直径100 $\mu\text{m}$ 程度)に形成した人工脂質二重膜を下降させ密着させる(図1左)。すると、体積フェムトリットルからピコリットルオーダーの微小空間が脂質二重膜の蓋で密閉された状態が形成される(図1右)。膜タンパク質の脂質二重膜への組み込みは、リポソーム(プロテオリポソーム)融合法によって行う(図2)。

膜タンパク質によって、輸送された基質は微小空間中に蓄積されるため、これを蛍光イメージングにより検出することができる。通常の開放系(例えば空間の体積1mL程度)では輸送基質はバッファ中に拡散してしまうため高感度での検出が不可能であるが、この系では超微小空間(1pL)に物質が蓄積し、濃度が急速に上昇するため、 $10^8$ 倍以上の超高感度で輸送基質が検出可能となる。高感度のCCDカメラを用いて行った試験的な評価では、1000~10000個程度の蛍光分子がチャンパー内に蓄積すれば定量的に検出できる。

さらに、本研究では、マイクロチャンパーアレイが通常の生物サンプル観察に用いられるカバーガラス上に形成されているため、様々な顕微鏡観察手法(暗視野観察、微分干渉観察、蛍光観察、共焦点顕微鏡、全反射顕微鏡など)をそのまま用いることができる。特に、カバーガラス表面(マイクロチャンパーの底面)から数百nmの領域のみを励起できる全反射顕微鏡を用いることにより(図1右)、輸送基質を分子レベルで計測することも可能となる。

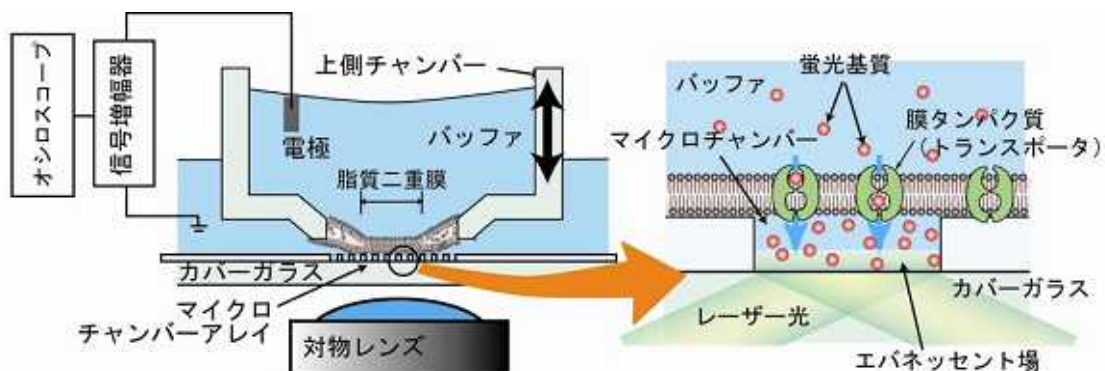


図1: マイクロチャンパーアレイを用いた輸送膜タンパク質の定量計測システム(膜チャンパーアレイ)。ガラス基板上に加工したマイクロチャンパー群に脂質平面膜を密着させ蓋をする。膜に導入された膜タンパク質が基質を輸送すると、マイクロチャンパー内に蓄積し濃度が上昇するため、超高感度で検出可能となる。

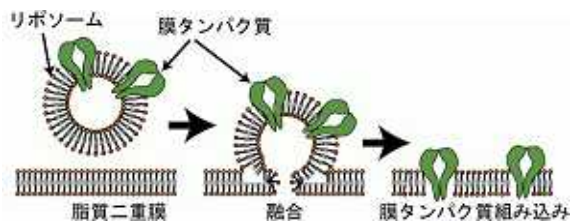


図2 リポソーム融合法による膜タンパク質の平面膜への組み込み

最終的には、本システムを用いて、薬剤排出 ATP binding cassette(ABC)トランスポーターの基質輸送効率を定量的に計測することを目的とした。ABCトランスポーターは、基質特異性が低く様々な分子を細胞外に排出するタンパク質であり、がん細胞に大量に発現しがん薬剤耐性に大きく関与している。そのため、医療・創薬の分野において大きく注目されており、実用的な意義も大きい。

### 3. 研究の方法

申請前までの成果で、マイクロ流路システムを用いて脂質二重膜を高効率に再構成し、ピコアンペアレベルのイオンチャンネル性膜電流を検出可能とするチップおよび周辺計測システムを開発している(図3,4)。本課題では、この人工脂質二重膜形成の知見を応用・発展させ、トランスポーターやポンプといった非イオン性の基質を輸送する膜タンパク質の機能をイメージングにより定量評価するためのシステムを実現するために、以下の課題点を検討した。

#### 脂質二重膜アレイ生成のさらなる高効率化、安定化

平面脂質二重膜を輸送膜タンパク質の活性計測に用いるためには、その形成をさらに高効率化し、安定化させる必要があった。代表者らが開発してきた方法の特徴は、マイクロ流路を通して脂質溶液やバッファを微細孔部分に送液することにより、分配される溶液量が均一化されたことである。また、脂質溶液層の薄膜化は自発的に進行するが、脂質層の初期厚さが薄いほど薄膜化が迅速に進む。これを実現するためには、より膜厚の薄い絶縁材料に微細孔を加工し、かつマイクロ流路構造を集積化する必要があった。本課題では、ポリパラキシレン(poly-para-xylylene)という高分子材料に微細孔構造をドライエッチング加工し、脂質平面膜形成の再現性、安定性に関する評価を行った。

#### 膜チャンバーアレイ設計の最適化

先行実験により、ABCトランスポーター分子あたりの輸送ターンオーバーは比較的小さいことが予想される。このように微量な

輸送物質を検出するためには、検出系のバックグラウンドノイズを極力抑える必要がある。本研究では、図1右のように基板の下側から励起光を照射しマイクロチャンバー底部のみにエバネッセント野を形成、チャンバー内に蓄積した蛍光ラベル基質分子の検出を行う。このとき、チャンバーを形成している材料は脂質膜に親和性があり、かつ自家蛍光を最小限に抑えなければならないため、その材料・加工法を検討した。

#### 膜チャンバーの密閉性の詳細な評価

マイクロチャンバーと脂質二重膜は物理的に接触するが、親水性高分子膜のクッションが間に存在するため、水分子やイオンなど小さな分子は密閉されない。輸送基質(数~数十 nm)がマイクロチャンバー内に確実に蓄積されるかを評価するため、どの程度の大きさの分子が二重膜の接触面を通過せずトラップされるかを検討した。

#### ABCトランスポータータンパク質の平面膜への導入、タンパク質活性の確認

従来研究で、扱いが比較的容易なペプチドイオンチャンネルを平面膜に導入し、平面膜システムの電気生理計測への有効性を示した。しかし、前述のように、輸送膜タンパク質のターンオーバー数が小さいため、その活性を確認するためには、膜タンパク質再構成効率をより向上させる必要があり、その検討を行った。

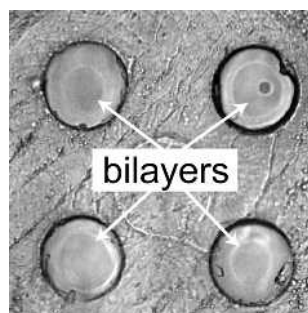


図3 4つの脂質二重膜のオンチップ同時形成

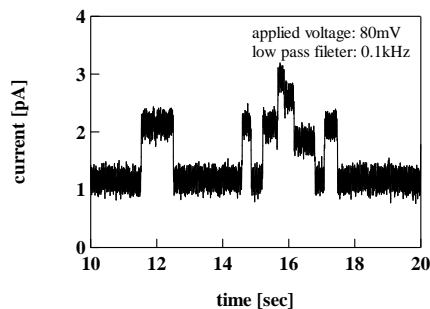


図4 グラムジシンチャンネル分子の膜電流シグナル



#### 4. 研究成果

前述の検討課題に関する実験結果を述べる。

##### 脂質二重膜アレイ生成のさらなる高効率化、安定化

脂質平面膜形成の従来法では、テフロン膜に直径 50-200 $\mu\text{m}$  程度の孔を手作りで形成し、そこにリン脂質の単分子膜を張り合わせる、またはリン脂質を溶解させた溶媒をはけで塗布する、といった方法が使われていた。筆者らは、微細加工により形成したより微細かつ形状の揃った貫通孔と、マイクロ流路システムを利用して、脂質平面膜形成の再現性の向上を試みた。再現性の向上により、多数の脂質平面膜を同時形成し、計測のスループットを大幅に上げることが可能になる。Fig. 5(a)に、本課題で開発した 96 ウェルの平面脂質二重膜チップの概観を示す。4 $\times$ 3 $\text{cm}^2$  のチップ上に、96 個(12 $\times$ 8)の計測ウェル(直径 2mm、深さ 3mm)が配置されている。Fig. 5(b)に単一ウェルの断面模式図を示す。マイクロチップは三層構造で構成されており、上側のウェル、平面脂質膜を形成するためのマイクロ孔構造を持つ薄膜ポリマー(ポリパラキシリレン)シート(シート厚 20 $\mu\text{m}$ 、孔直径 30 $\mu\text{m}$ )、そして下側の流路から成っている。計測時には、上側ウェルと下側流路がバッファで満たされた状態で、それらを隔ている薄膜シートに形成されたマイクロ孔に平面脂質二重膜が形成される。膜タンパク質は、上側のウェルにプロテオリポソーム(膜タンパク質を再構成したりポソーム)の懸濁液を添加すると、自発的に平面膜に融合して再構成される。イオンチャンネルを通過する膜電流は通常ピコアンペア~ナノアンペアと小さいため、計測はパッチクランプ用の電流増幅器を用いて行う。増幅器の計測ヘッドに接続した電極をウェルに挿入し、グラウンド電極を下側流路の導入口に挿入することにより、定電圧下での膜電流を計測する(電圧

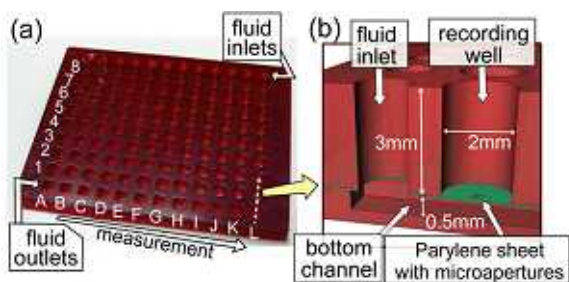


Fig. 5 (a) 96 ウェルの平面脂質二重膜チップの概観写真。チップのサイズは 4 $\times$ 3 $\text{cm}^2$ 。(b)単一ウェルの断面模式図。上側ウェル、マイクロ貫通孔を持つパリレン膜、および下側流路から構成される。

クランプ)。ウェルは電気的に絶縁されているため、個々のウェルで独立な計測を平行に行うことが可能である。

デバイスの作製は、市販のステレオリソグラフィ装置を用いた。マイクロ孔を有するポリマーシートはフォトリソグラフィ技術により別途作製し、樹脂の積層の中間にサンドイッチする方法を開発した(ハイブリッド光造形技術)。この方法により、ステレオリソグラフィ装置の空間解像度を補って、直径数十マイクロメートルの孔構造を組み込むことができる。

平面脂質膜の形成は以下のような手順で行った(すべてピペットマンによる操作)。まず、上側ウェルにバッファ(300 mM KClを含む、pH=7.0)を注入する。その後、下側流路の注入口から少量(~ 5  $\mu\text{L}$ )の脂質溶液(10 mg リン脂質/1 mL n-デカン)を、続けてバッファを注入する。この操作により、脂質溶液がマイクロ孔部分を通過した後、下側流路がバッファで満たされる。このとき、マイクロ孔部分を覆うように脂質溶液の薄膜

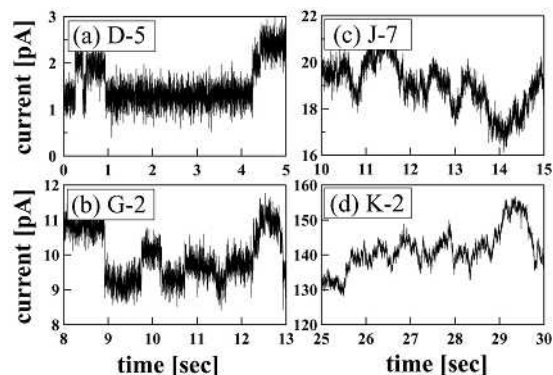


Fig. 6 個々のウェルで計測されたグラミジジン A を通過するイオン透過に伴う電流信号の例。



Fig. 7 全 96 ウェルにおけるイオンチャンネル電流計測の結果。一度の平面膜再構成に対して 2 回計測を行った。

層が形成される。時間の経過によってこの脂質層がさらに薄膜化し、脂質二重膜が形成される。

上記の手順で脂質二重膜を形成し、モデルイオンチャネルであるグラミシジン A を用いて電気生理計測の再現性を評価した。グラミシジンは水層から脂質二重膜に自発的に挿入し、一価のイオンを透過するチャネルを形成する。グラミシジンは、0.5 mg/mL の濃度であらかじめ上側に注入するバッファに溶解させた。計測は、計測電極を 96 個のウェルに対して順番に移動させる方法で行った。Fig. 5(a)中のアドレスで計測されたイオンチャネル電流の例を Fig. 6 に示す。このようなイオンチャネル電流は、再現性の問題で全てのウェルで観測されるわけではない。リン脂質二重膜は、厚さ 5-10nm の薄膜であるため、形成されにくく、また壊れやすい。本デバイスにおける、脂質二重膜形成及びイオンチャネル電流計測の再現性を評価するため、全 96 ウェルにおけるイオンチャネル電流計測の結果を Fig. 4 にまとめた。前述のように、平面膜の形成及びイオンチャネルの再構成は経時的に変化するが、計測システムの制限から、全てのウェルを同時計測することは不可能である。電極を順番に移動させ全ウェルを計測したが、1 回目の計測後にイオンチャネルが再構成される可能性が否定できない。従って、脂質膜形成の操作を行った後、全ウェルの順次電気計測を 2 回行った。(ここで、1 ウェルの計測に 30-60 秒を要するため、96 ウェルをスイープするのに約 1 時間を要した。従って、2 回の全計測には、約 2 時間を要した。) Fig. 4 中、(i), (ii), および(iii)で表されるウェルでは、2 回の計測においてどちらもイオンチャネル電流が観測されなかった。一方、(iv), (v), および(vi)で表されるウェルでは、2 回の計測のうち両方、またはどちらか 1 回においてイオンチャネル電流が観測された。96 ウェルのうち、少なくとも 1 回の計測においてイオンチャネル電流が観測された割合を求めると、約 46%であった。従来の方法では、このような再現率を算出することが困難なほど、平面脂質膜形成お

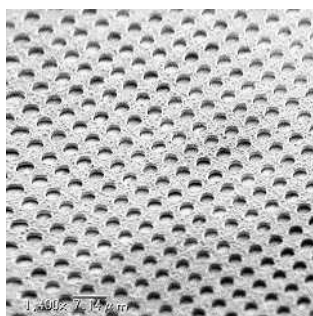


図 8 直径 5 $\mu$ m, 深さ 2 $\mu$ m のマイクロチャンパーアレイ

よびイオンチャネル再構成の再現性がばらつくため、ここで得られた再現率は非常に良好であり、今後のハイスループット化に大いに期待が持てる結果であるといえる。

#### 膜チャンパーアレイ設計の最適化

輸送基質を検出するためのマイクロチャンパーの電顕写真を図 8 に示す。脂質二重膜押し付け時に脂質膜が破壊されないように、チャンパー表面を親水的ポリマーでコーティングした。また、顕微鏡での全反射照明の漏れこみを防ぐため、ガラス表面にクロムおよび 500nm 程度のアルミを蒸着し、さらにその上にパリレン有機絶縁膜を蒸着したチャンパーを製作し比較的良好な結果を得た。

#### 膜チャンパーの密閉性の詳細な評価

脂質二重膜がマイクロチャンパーに押し付けられた状態(図 9)でも、電気的なコンダクタンスに変化がないことから、イオンなど小分子はチャンパーと膜の間隙を通過できる。一方、直径数百 nm のビーズは閉じ込めることができる(図 10)。トランスポーターの輸送基質の大きさはそれらの中間であり、その漏れだしは比較的小さいものであった。

#### ABC トランスポータータンパク質の平面膜への導入, タンパク質活性の確認

リポソーム融合法を用いて膜タンパク質を再構成する場合は、プロテオリポソーム内液の塩濃度を高張にすることにより融合効率が上昇することを確認した。横山謙氏(ERATO 吉田プロジェクトグループリーダー)から提供を受けている好熱菌由来の ABC トランスポーターを含む膜画分を平面膜システムに導入し、蛍光イメージングによって平面膜に融合することを確認した(図 11)。このタンパク質は、遺伝子操作によりシステインを導入し、Cy3 で蛍光ラベルした。

本課題では、実際にトランスポーターの輸送活性を確認することはできなかった。一方で、本計測システムの有効性は、ペプチド性のモ

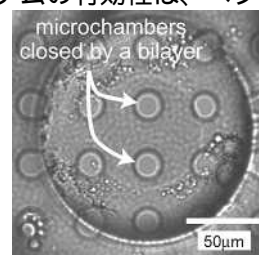


図 9 脂質平面膜のマイクロチャンパーへの押し付け。

デルチャンネルで a-hemolysin を蛍光色素(カルセイン)が通過することにより確かめている。

今後、分子膜輸送の高感度計測を実現するためには、膜輸送タンパク質の平面脂質膜への再構成法や、プラットフォームとしての脂質膜の改良(長炭素鎖のアルカンを使って脂質膜厚を実際の生体膜により近付けるなど)が必要となる。

平面脂質二重膜の生化学機能アッセイへの利用に関して、様々な方法論がなされている一方で、万人が簡便に使用できる人工脂質膜制御技術が一般に浸透していない。本課題で開発したモデル生体膜再構成プラットフォーム技術を今後さらに発展させていく所存である

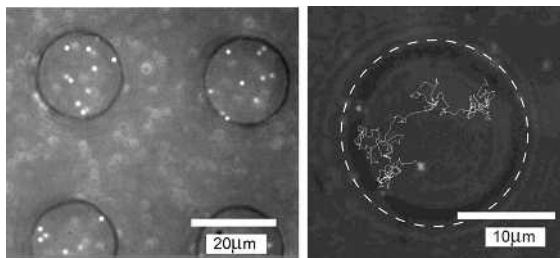


図 10 ナノビーズの膜マイクロチャンパーへの封入

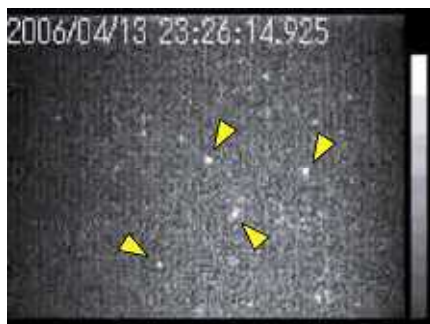


図 11 蛍光標識した ABC トランスポータの、人工脂質二重膜内での運動の蛍光イメージング。輝点がタンパク質分子。観察には全反射顕微鏡を用いた。

## 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 4 件)(全て査読有)

H. Suzuki, B. Le Pioufle, S. Takeuchi, Ninety-six-well planar lipid bilayer chip for ion channel recording Fabricated by hybrid stereolithography, *Biomed. Microdev.*, 24, 13540-13548, 2009.

Le Pioufle, B., Suzuki, H., Tabata, K. V., Noji, H., Takeuchi, S., "Lipid Bilayer Microarray for Parallel Recording of Transmembrane Ion Currents", *Anal. Chem.*, 80, 328-332, 2008.

H. Suzuki and S. Takeuchi, Microtechnologies for Membrane Protein Studies, *Anal. Bioanal. Chem.*, 391, 2625-2702, 2008.

鈴木宏明, 「イオンチャンネルスクリーニングのための平面脂質二重膜マイクロアレイチップ」、生産と技術、60, 66-69, 2008.

[学会発表](計 2 件)

鈴木(宏), Bruno Le Pioufle, 大崎寿久、竹内昌治、「ハイスループットイオンチャンネル解析のための脂質平面膜 96 ウェルチップ」、第17回化学とマイクロナノシステム研究会(2008.5.20)

Suzuki, H., Takeuchi, S., "3D Microfluidic Chip for Membrane Protein Analysis," The 11th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences ( $\mu$ TAS 2007), Paris, France, 2007. (査読有)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 宏明 (SUZUKI HIROAKI)  
大阪大学・大学院情報科学研究科・准教授  
研究者番号：20372427

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

竹内 昌治 (TAKEUCHI SHOJI)  
東京大学・生産技術研究所・准教授  
研究者番号：90343110

横山 謙 (YOKOYAMA KEN)  
東京工業大学・資源化学研究所・研究員  
研究者番号：70271377