

平成21年 4月28日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19750056
 研究課題名（和文） シリコン微細加工技術を用いたレセプターイオンチャンネル
 アレイの開発
 研究課題名（英文） Development of Receptor Ion Channel Arrays Based on Silicon
 Microfabrication Techniques
 研究代表者
 平野 愛弓（HIRANO AYUMI）
 東北大学・大学院医工学研究科・准教授
 研究者番号：80339241

研究成果の概要：

本研究では、半導体の微細加工によって作成したナノスケールの孔やナノテクノロジーにより作成したナノ構造体を用いて脂質二分子膜の安定化を行った。モデルチャンネルを包埋した二分子膜において機械的強度を評価し、多数回にわたる溶液交換にも耐えるという結果を得た。また、膜形成の再現性の向上を目指し、シリコン基板上にアガロース支持二分子膜が形成していく過程を、多重内部反射型赤外分光法を用いて観察することに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	0	2,400,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	270,000	3,570,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：チップ分析，イオンチャンネル，半導体基板，神経伝達物質，バイオセンサー，脂質二分子膜

1. 研究開始当初の背景

平面脂質二分子膜にレセプターイオンチャンネル蛋白質を包埋したイオンチャンネルセンサーは、レセプターチャンネルのもつ nM レベルの高感度なりガンド認識能や高い選択性、ms オーダーの応答速度を活用した、高感度・高選択的かつ速い応答速度を有する優れたセンサーである。しかし、レセプターチャンネルがその機能を発現できる唯一のマトリクスである脂質二分子膜は、振動や溶液交換などですぐに破れてしまう物理的脆弱さがあり、イオンチャンネルセンサーの一般化への障害となってきた。

平面脂質二分子膜は、電気生理学者らによってイオンチャンネルの再構成の場として開発された。細胞膜を直接つかむパッチクランプ法では調べることのできない細胞内チャンネルの機能評価ができる等の長所があったが、パッチクランプ法と比べても、膜の安定性が著しく低く、また蛋白質の精製時にチャンネル機能が変性する可能性もあるという問題もあり、アフリカツメガエルの卵母細胞のような発現系の登場とともに生理学の分野ではあまり使われなくなった。

一方、平面脂質二分子膜にイオンチャンネル蛋白質を包埋したセンサーは、例えばグル

タミン酸レセプターチャンネルの場合で 100 pM L-グルタミン酸の検出を達成するなど、極めて高感度なセンサーの設計を可能とする魅力的な系である。しかし、チャンネル機能の発現のための必須環境である脂質二分子膜は不安定であり、イオンチャンネルセンサー汎用への障害となっていた。

2. 研究の目的

本研究では、①研究代表者のもつ、レセプターチャンネルを包埋した脂質二分子膜センサーの経験と、申請時に所属していた庭野研究室のもつシリコン基板の微細加工技術を融合して、平面脂質二分子膜作成の様々な実験条件（膜作成場となる孔のサイズ、シリコンの表面状態、脂質組成）を検討することにより、より安定性の高いチャンネル包埋二分子膜を作成する条件を探索する。さらに、②グルタミン酸レセプターのような神経伝達物質受容体チャンネルを、形成した脂質二分子膜中に包埋してイオンチャンネルセンサーアレイを作製し、イオンチャンネルタンパク質に作用する薬物のスクリーニング法として提案する。また、③分光学的測定との組み合わせが容易という平面脂質二分子膜の特徴を活かし、シリコン基板上に作成したアガロース支持二分子膜にイオンチャンネルを包埋し、本研究室のもつ多重内部反射赤外分光法と電流測定とを組み合わせた赤外吸収スペクトル-膜電流同時測定法の開発についても検討を行う。本研究のイオンチャンネルアレイにより、興奮性伝達物質レセプターチャンネルに作用する薬物の高効率かつ高精度の評価法が開発されれば、創薬のための high throughput screening が可能になると期待される。

3. 研究の方法

(1) シリコン基板を用いた安定化脂質二分子膜の作製

厚さナノメートルスケールの窒化膜を堆積したシリコン基板を用いて、リソグラフィ技術によって微細孔を作製し、その微細孔の中で脂質二分子膜を形成することにより、二分子膜センサーの安定化について検討を行った。作製した微細孔の中で二分子膜を単分子膜貼り合せ法によって形成し、モデルチャンネルのグラミシジンを包埋した後、機械的強度を評価し、従来の二分子膜系の機械的安定性と比較・検討した。また、ポーラスアルミナナノ構造体を支持体として用い、その上での脂質二分子膜形成についても検討を行った。

(2) 神経伝達物質センサーの開発

前述(1)において構築した脂質二分子膜系に、ラット大脳より抽出した神経伝達物質の受容体チャンネルを包埋し、神経伝達物質センサーを構築した。実際に、神経伝達物質グルタミン酸を投与した際の電流応答を記録し、

センサーとしての機能について評価した。

(3) 多重内部反射赤外分光法とチャンネル電流の同時測定法の開発

安定化脂質二分子膜形成の基礎知見を得るために、表面赤外分光を用いた分光学的検討も行った。シリコン基板上に、エバネッセント波の有効しみだし領域に相当する厚さ数 100 nm のアガロースゲルをコートし、その上に脂質溶液を塗布した。この溶液から脂質二分子膜が自発的に形成する過程を半導体表面赤外分光法と膜電流計測によって追跡し、膜形成の再現性向上のための指標について検討した。

4. 研究成果

半導体基板上に堆積した窒化ケイ素ナノ薄膜中に微細孔をリソグラフィ技術によって作製し、その微細孔の中で脂質二分子膜を形成することにより、二分子膜センサーの安定化を試みた。作製した微細孔の中で二分子膜を単分子膜貼り合せ法によって形成した結果、二分子膜に高い機械的強度を付与することに成功した。モデルチャンネルのグラミシジンを包埋した二分子膜において機械的強度を評価し、多数回にわたる溶液交換にも耐えるという結果を得た（論文投稿中）。現在、構築した脂質二分子膜系に、ラット大脳より抽出した神経伝達物質受容体チャンネルを包埋して、神経伝達物質を投与した際のチャンネル電流を記録し、神経伝達物質センサーとしての機能について評価している。

また、脂質二分子膜形成の再現性の向上を目指し、脂質二分子膜の形成過程を、赤外吸収スペクトルと膜電流の同時計測によって追跡した（図）。その結果、膜形成に伴って脂質分子に由来する吸収ピークが増大すること、またそれと同時に、脂質の溶媒である n-デカンに由来する吸収ピークが減少していくことを観測した（論文投稿中）。

その他、シリコン基板上における種々の生体分子反応（DNA のハイブリダイゼーションや抗原抗体反応）や細胞の動的応答過程を、表面赤外分光法を用いて非標識その場観察することに成功した。

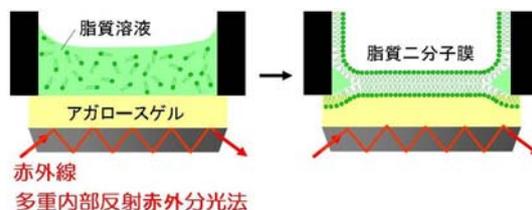


図 多重内部反射赤外分光法を用いた脂質二分子膜形成過程の非標識観察

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 13 件)

- ① Ayumi Hirano-Iwata, Ryo-taro Yamaguchi, Ko-ichiro Miyamoto, Yasuo Kimura, and Michio Niwano, In situ real-time monitoring of biomolecular interactions by using surface infrared spectroscopy, *J. Appl. Phys.*, in press. (査読有)
- ② Kohki Tanaka, Ayumi Hirano-Iwata, Ko-ichiro Miyamoto, Yasuo Kimura, and Michio Niwano, *In situ* Surface Infrared Study of DNA Hybridization on Au Island Films Evaporated on Silicon Surfaces, *Jpn. J. Appl. Phys.*, in press. (査読有)
- ③ Ryo-taro Yamaguchi, Ayumi Hirano-Iwata, Yasuo Kimura, Michio Niwano, Ko-ichiro Miyamoto, Hiroko Isoda and Hitoshi Miyazaki, *In situ* real-time monitoring of apoptosis on leukemia cells by surface infrared spectroscopy, *J. Appl. Phys.*, 105, 024701 (2009). (査読有)
- ④ Wataru Okumura, Nobukatsu Moridera, Ena Kanazawa, Atushi Shoji, Ayumi Hirano-Iwata, and Masao Sugawara, Visualizing L-Glutamate Fluxes in Acute Brain Slices with Glutamate Oxidase-Immobilized Slips, *Anal. Biochem.* 385, 326-333 (2009). (査読有)
- ⑤ Ken-ichi Ishibashi, Kohki Tanaka, Ayumi Hirano-Iwata, Ko-ichiro Miyamoto, Yasuo Kimura, and Michio Niwano, *In situ* study of DNA Attachment and Hybridization at Silicon Surfaces by IR Absorption Spectroscopy, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 47, 3204-3208 (2008). (査読有)
- ⑥ Hiromi Osanai, Akiyoshi Suzuki, Yoshimasa Komatsuzaki, Ayumi Hirano-Iwata, Suguru Kawato and Minoru Saito, Components of NMDA-Induced Ca^{2+} Signal in Mouse Hippocampal Slices and Acute Effects of Corticosterone on Each Component, *Bioimages*, 16, 31-37 (2008). (査読有)
- ⑦ Ayumi Hirano, Kota Onodera, Ko-ichiro Miyamoto, Yasuo Kimura, Masatoshi Kataoka, Yasuo Shinohara, and Michio Niwano, Peptide Immobilization on GaAs Surfaces and the Application to Label-Free Detection of Antigen-Antibody Interactions Using Multiple Internal Reflection Infrared Spectroscopy, *Sensor Letters*, 6, 613-617 (2008). (査読有)
- ⑧ 平野愛弓, 小野寺恒太, 宮本浩一郎, 片岡正俊, 篠原康雄, 木村康男, 庭野道夫, 表面赤外分光法を用いた抗原抗体反応の非標識検出: 二次構造解析による特異・非特異信号の識別, *表面科学 (研究紹介)*, 29, 558-563 (2008). (査読有)
- ⑨ Ayumi Hirano-Iwata, Michio Niwano, and Masao Sugawara, The Design of Molecular Sensing Interfaces with Lipid Bilayer Assemblies, *Trends in Anal. Chem.*, 27, 512-520 (2008). (査読有)
- ⑩ Ko-ichiro Miyamoto, Parida Yamada, Ryo-taro Yamaguchi, Takami Muto, Ayumi Hirano, Yasuo Kimura, Michio Niwano, and Hiroko Isoda, In-situ Observation of a Cell Adhesion and Metabolism using Surface Infrared Spectroscopy, *Cytotechnology*, 55, 143-149 (2007). (査読有)
- ⑪ Ryo-taro Yamaguchi, Ayumi Hirano-Iwata, Yasuo Kimura, Michio Niwano, Ko-ichiro Miyamoto, Hiroko Isoda, and Hitoshi Miyazaki, Real Time Monitoring of Cell Death by Surface Infrared Spectroscopy, *Appl. Phys. Lett.*, 91, 203902-1-3 (2007). (査読有)
- ⑫ Kota Onodera, Ayumi Hirano-Iwata, Ko-ichiro Miyamoto, Yasuo Kimura, Masatoshi Kataoka, Yasuo Shinohara, and Michio Niwano, Label-Free Detection of Protein-Protein Interactions at the GaAs/Water Interface through Surface Infrared Spectroscopy: Discrimination between Specific and Nonspecific Interactions by Using Secondary Structure Analysis, *Langmuir*, 23, 12287-12292 (2007). (査読有)
- ⑬ Ryo-taro Yamaguchi, Ko-ichiro Miyamoto, Ken-ichi Ishibashi, Ayumi Hirano, Suhana M. Said, Yasuo Kimura, and Michio Niwano, DNA Hybridization Detection by Porous Silicon-Based DNA Microarray in Conjugation with Infrared Microspectroscopy, *J. Appl. Phys.*, 102, 014303-1-7 (2007). (査読有)

[学会発表] (計 2 2 件)

- ① 平良 祐, 青戸孝至, 大嶋 梓, 平野愛弓, 木村康男, 庭野道夫, ポーラスアルミナフィルムを用いた人工脂質二分子膜イオンチャネルセンサの開発, 第 56 回応用物理学関係連合講演会, 筑波, 2009年3月31日
- ② 平野愛弓, 青戸孝至, 平良 祐, 山口僚太郎, 木村康男, 庭野道夫, 半導体微細加工を利用した脂質二分子膜センサーの安定化, 日本化学会第 89 春季年会, 船橋, 2009年3月27日
- ③ A. Hirano-Iwata, K. Aoto, T. Taira, Y. Kimura, M. Sugawara, and M. Niwano, Ion Channel Sensors Based on Artificial Bilayer Lipid Membranes, 2nd International Symposium on Nanomedicine (ISNM2009) and Asian Core Symposium -Nano and

- Biomedical Molecular Science-, Okazaki, February 7, 2009.
- ④ A. Oshima, K. Onodera, A. Hirano, K. Aoto, T. Taira, R. Yamaguchi, Y. Kimura, and M. Niwano, *In Situ* Monitoring of Phospholipid-bilayer Formation Using Surface Infrared Spectroscopy, The International Union of Materials Research Societies - the International Conference in Asia 2008 (IUMRS-ICA 2008), Nagoya, December, 12, 2008.
 - ⑤ 平良 祐, 青戸孝至, 平野愛弓, 木村康男, 庭野道夫, 陽極酸化ポーラスアルミナフィルムを用いた人工脂質二分子膜センサの開発, 応用物理学会東北支部第63回学術講演会, 仙台, 2008年12月4日
 - ⑥ 青戸孝至, 平良 祐, 山口僚太郎, 平野愛弓, 木村康男, 庭野道夫, 半導体微細加工による安定化脂質二分子膜の開発, 応用物理学会東北支部第63回学術講演会, 仙台, 2008年12月4日
 - ⑦ 近藤康彦, 山口僚太郎, 平野愛弓, 木村康男, 庭野道夫, 表面赤外吸収分光法を用いた薬剤投与に対する細胞応答の非標識検出, 応用物理学会東北支部第63回学術講演会, 仙台, 2008年12月4日
 - ⑧ 平野愛弓, 山口僚太郎, 宮本浩一郎, 磯田博子, 宮崎均, 木村康男, 庭野道夫, 表面赤外分光法を用いた細胞死のリアルタイムモニタリング, 第28回表面科学講演大会, 東京, 2008年11月14日
 - ⑨ Y. Kondo, R. Yamaguchi, A. Hirano-Iwata, K. Miyamoto, Y. Kimura, H. Isoda, H. Miyazaki, and M. Niwano, In-situ monitoring of cell activities using surface infrared spectroscopy, The 5th International Symposium on Surface Science and Nanotechnology (ISSS-5), Tokyo, November, 12, 2008.
 - ⑩ A. Hirano-Iwata, A. Oshima, K. Onodera, K. Aoto, T. Taira², R. Yamaguchi, Y. Kimura, and M. Niwano, *In situ* surface infrared spectroscopic study of phospholipid-bilayer formation, 5th International Symposium on Surface Science and Nanotechnology (ISSS-5), Tokyo, November, 11, 2008.
 - ⑪ A. Hirano-Iwata, K. Tanaka, Y. Kimura, and M. Niwano, In-Situ Surface Infrared Study of DNA Hybridization on Au Island Films Deposited on Si Surfaces, SSDM 2008, Tsukuba, September 25, 2008.
 - ⑫ 青戸孝至, 平良 祐, 山口僚太郎, 平野愛弓, 木村康男, 庭野道夫, 半導体微細加工を利用したイオンチャンネルセンサーの開発, 第69回応用物理学関係学術講演会, 春日井, 2008年9月3日
 - ⑬ 平野愛弓, 小野寺恒太, 大嶋 梓, 山口僚太郎, 木村康男, 庭野道夫, 表面赤外分光法を用いた脂質二分子膜形成過程のその場観察, 第69回応用物理学関係学術講演会, 春日井, 2008年9月3日
 - ⑭ 山口僚太郎, 平野愛弓, 宮本浩一郎, 磯田博子, 宮崎均, 木村康男, 庭野道夫, 表面赤外分光法を用いた細胞死の定量的・定性的評価, 第55回応用物理学関係連合講演会, 船橋, 2008年3月29日
 - ⑮ 平野愛弓, 田中公貴, 木村康男, 庭野道夫, Island 状金薄膜へのDNA固定化とハイブリダイゼーションの表面赤外分光法による検出, 第55回応用物理学関係連合講演会, 船橋, 2008年3月29日
 - ⑯ 平野愛弓, 小野寺恒太, 宮本浩一郎, 片岡正俊, 篠原康雄, 木村康男, 庭野道夫, 表面赤外分光法を用いる抗原抗体反応の非標識検出: 2次構造解析による特異・非特異信号の識別, 第27回表面科学講演大会, 東京, 2007年11月1日
 - ⑰ A. Hirano-Iwata, K. Onodera, K. Miyamoto, Y. Kimura, M. Kataoka, Y. Shinohara, and M. Niwano, Label-Free Detection of Antigen-Antibody Interactions at the GaAs/Water Interface through Surface Infrared Spectroscopy: Discrimination between Specific and Non-specific Interactions by Using Secondary Structure Analysis, China-Japan Symposium of Nano-Chemical Biology, Beijing, November 9, 2007.
 - ⑱ A. Hirano, K. Tanaka, K. Ishibashi, K. Miyamoto, Y. Kimura, M. Niwano, *In-Situ* Surface Infrared Study of DNA Attachment and Hybridization at Si Surfaces, SSDM 2007, Tsukuba, September 21, 2007.
 - ⑲ R. Yamaguchi, A. Hirano, K. Ishibashi, K. Miyamoto, Y. Kimura and M. Niwano, *In-Situ* Detection and Classification of DNA by Porous Alumina Filter in Conjugation with Infrared Absorption Spectroscopy, SSDM 2007, Tsukuba, September 21, 2007.
 - ⑳ 山口僚太郎, 宮本浩一郎, 磯田博子, 宮崎均, 木村康男, 平野愛弓, 庭野道夫, 赤外分光による細胞活動のその場観察のための装置内培養環境の構築, 第68回応用物理学会学術講演会, 札幌, 2007年9月5日
 - ㉑ K. Onodera, A. Hirano, K. Miyamoto, Y. Kimura, M. Kataoka, Y. Shinohara, and M. Niwano, Label-free detection of antigen-antibody interactions by infrared absorption spectroscopy, EMRS 2007

Spring Meeting, Strasbourg (France), May 28, 2007.

- ② 平野愛弓, 小野寺恒太, 宮本浩一郎, 木村康男, 片岡正俊, 篠原康雄, 庭野道夫, 表面赤外分光を用いた抗原抗体反応の非標識検出, 第68回分析化学討論会, 宇都宮, 2007年5月20日

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野 愛弓 (HIRANO AYUMI)

東北大学・大学院医工学研究科・准教授

研究者番号: 80339241

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号: