

機関番号：92704

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20310076

研究課題名 (和文) 人工生体膜を利用した固体表面上の動的な分子操作

研究課題名 (英文) Dynamic Manipulation of Molecules Embedded within Artificial Cell Membrane Supported on Solid Surface

研究代表者

古川 一暁 (FURUKAWA KAZUAKI)

日本電信電話株式会社 NTT 物性科学基礎研究所

研究者番号：40393748

研究成果の概要 (和文)：

本研究課題では、固体表面上に支持した人工生体膜内を自由に運動できる「2次元に束縛された分子系」を用い、膜内の分子を局所外部電場によって動的に操作する手法の確立を目的とした。重要な成果は2点ある。(1) 埋めこみ電極を備えた固体基板を用い、電圧印加によって膜内に埋めこんだ色素結合脂質分子の局所的な濃度勾配を形成することに成功した。これは局所電場が、側方拡散として知られる膜内の分子のブラウン運動に打ち勝ったことを意味する。

(2) ナノギャップ電極を備えた固体基板を用い、電圧印加のオンオフによって自発展開の停止・開始の制御に成功した。これはナノギャップ電極における分子捕捉が自発展開の駆動エネルギーに打ち勝ったことを意味する。ナノギャップを「分子ゲート」として機能させ、動的な分子操作を実現させた。

研究成果の概要 (英文)：

In this project, we aimed at establishing the technique for manipulating molecule(s) embedded within a supported lipid bilayer (SLB) using electric field locally applied to the bilayer. The supported lipid bilayer at solid-liquid interface maintains the lateral diffusion characteristics, thus can be regarded as a 2-dimensional molecule system for the embedded molecule(s). We reached to the following two significant achievements. (1) We have successfully formed the gradation of dye-conjugated lipid molecules within SLB using the solid substrate equipping the buried electrodes. This means that the force induced by the electric field overcomes the Brownian motion in the bilayer. (2) We have successfully controlled the self-spreading by switching on and off the voltage supplied to a pair of electrodes with nanogap distance. This means that the trapping force of molecules by an electric field at the nanogap position overcomes the energy for driving self-spreading. By using the nanogap as "molecule gate", we have achieved the dynamic control of the macroscopic structure of self-spreading lipid bilayer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
総計	11,300,000	3,390,000	14,690,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学 マイクロ・ナノデバイス

キーワード：マイクロ化学システム、脂質二分子膜、分子操作

1. 研究開始当初の背景

人工生体膜は、脂質分子と呼ばれる両親媒性分子が二分子ずつ対向した脂質二分子膜構造をもつ。水溶液中では、人工生体膜からなる球殻構造をもったベシクル（リポソームとも呼ばれる）が、自己組織化によって容易に形成されることが知られ、多くの研究がなされていた。溶液中のベシクルとは異なる形態として、固体表面に吸着した人工生体膜がある。これは、ベシクルの球殻構造と対照的に、平面膜とも呼ばれる。本提案中では、固体表面に支持した膜という意味で、この膜を「支持膜」と呼ぶ。固体表面に支持膜を形成することで、電子デバイスと融合することが可能となり、バイオセンサなどへの応用が期待されている。

支持膜の作製は 1980 年代から盛んに行われるようになり、その手法としては、Langmuir-Blodgett 法とベシクル融合法が主であった。作製された支持膜は、細胞膜が有する側方拡散を維持した流動性の膜であることが確認されていた。

1990 年代後半になって、本提案研究と関連の深い研究として、以下の二例が報告された。ひとつは、脂質分子の塊を表面に付着させた親水基板を緩衝液中に静置すると、塊の周辺部から一層のみの支持膜が自己組織化により形成され、固液界面に自発的に広がっていく、自発展開と呼ばれる現象の報告である [J. Rädler et al., *Langmuir* 11, 4539 (1995)]。この動的な自発展開特性と、側方拡散とをあわせて、本提案では基板に支持した人工生体膜のふたつの動的特性と呼ぶ。

もうひとつは、パターンを有する表面でベシクル融合を行うと、親水表面のみに支持膜が形成されるという報告である [J. T. Groves et al., *Science* 275, 651 (1997)]。これにより、区画化された支持膜の配列を固体表面に作製することが可能になった。この試料にさらに外部電場を印加すると、混合した色素結合脂質分子がこれに応答して、支持膜内で泳動することも確認されていた。

これらの報告をふまえ、本研究の提案者は、構造を持った表面上での自発展開特性の研究を開始していた。提案時には、異種材料によるパターンを作製した表面における自発展開現象は、親水表面のみに進行することを明らかにした [K. Furukawa et al., *Lab Chip* 6, 1001 (2006)]。このときのパターンは直線的である必要はなく、曲線や折り返し構造があってもその構造どおりに自発展開が進行した。一方、同一組成物からなるナノ構造を有する表面においては、表面に凹凸（段差 100 nm）があっても、その凹凸表面に沿って成長することを明らかにしていた [K. Furukawa et al., *Langmuir* 23, 367 (2007)]。また、自発展開現象

は、10~200nm のギャップ構造が存在しても、大きな障害を受けることなくギャップ間を通過し、展開を継続することを明らかにしていた [Y. Kashimura et al., *SSDM* 2007, P-11-4 (2007)]。

さらに提案者はこれらの知見をもとに、新しい原理で動作するマイクロ流路デバイスを提案し、その動作を実証した [K. Furukawa et al., *Lab Chip* 6, 1001 (2006)]。これは、人工生体膜を分子の輸送担体に用いて、目的の分子を目的の場所に輸送し、他の分子と混合させ、分子間相互作用を検出する原理に基づく。相互作用として蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を選び、ドナー-アクセプタ比に依存した FRET 効率を精度高く決定した [K. Furukawa et al., 24, 921 (2008)]。この人工生体膜を用いるマイクロ流路デバイスは、自発展開を目的分子の輸送に、拡散を分子の混合にそれぞれ利用しており、ふたつの動的特性を巧みに活かしたデバイスであった。

人工生体膜の動的な性質を利用する他の報告例として、ナノ構造の配列中を自発展開する支持膜内に含まれる色素結合脂質分子が分別される現象 [Nabika et al., *J. Am. Chem. Soc.* 127,16786 (2005)] や、支持膜内の二種類の色素結合脂質分子を外部電場により分別する方法 [S. Daniel et al., *J. Am. Chem. Soc.* 129, 8072 (2007)] があつた。これらはいずれも人工生体膜のもつふたつの動的特性のうち、一方のみを利用したデバイスであった。前者は自発展開、後者は電場による拡散の制御、である。

そこで本提案研究では、「流動性を維持した支持膜に埋めこまれた分子は膜内を運動できるが、その運動は二次元に束縛されている」ことに着目した。そして、マイクロ・ナノ構造表面により人工生体膜の成長位置を制御し、外部電場により支持膜内での拡散を制御することによって、支持膜内の特定の場所に分子を集めたり、その場所を移動したり、そこから少数ずつの分子を取り出したりする、動的な操作技術の獲得を目的とする本研究の提案に至った。

2. 研究の目的

細胞膜のモデル物質である厚さ約 5 nm の人工生体膜は、固体表面上に安定に成長させることができ、得られた支持膜が流動性を維持しているという特長を持つ。本研究では、固体表面に支持した人工生体膜を分子の二次元束縛場として利用し、埋めこまれた分子を外部電場によって支持膜内で自在に動かす、動的な操作技術の開発を目的とした。本研究の特長は、マイクロ・ナノ構造表面により人工生体膜の成長位置を制御し、外部電場により支持膜内での拡散を制御する、ふたつの

手法を融合することにある。これによって、支持膜内の特定の場所に分子の溜めを作ったり、支持膜内を運動する分子を計数する技術を獲得する。この目的の実現のためには、いまだよく理解されていない、マイクロ・ナノ構造表面における人工生体膜の動的特性を理解する必要がある。本研究を通じて、固体表面上の人工生体膜の動的現象を、ナノ流体力学としてモデル化することも視野に入れた。

3. 研究の方法

研究を大きく三つにわけて、それぞれの研究計画・方法について述べる。なお、研究全体を通じて、人工生体膜には主に卵黄由来の L- α -PC を用い、この中に蛍光顕微鏡で観察する目的の色素結合脂質分子を数%混合する。緩衝液には 100 mM NaCl, 1 mM Tris+HCl (pH=7.6) を用いる。これらは研究代表者のグループで実績のある物質・条件であるが、研究の状況によってはこれらにこだわらない。動的操作の原理確認実験においては色素結合脂質分子を用いるが、あわせて操作対象分子の拡大をめざした検討も行う。

- (1) 表面パターンによる自発展開の制御：マイクロパターンによる人工生体膜の自発展開制御はこれまでの実績があり、本提案研究ではこれを利用する立場をとる。本研究ではとくにナノギャップ構造が自発展開に与える影響を調べることにする。ナノギャップの間隔、色素結合脂質分子の色素のサイズ、支持膜内濃度について、それぞれの関係を明らかにする。これに加え、パターン表面における厚さ 5 nm の人工生体膜の自発展開や拡散を含む流動現象を、微視的な機構を明らかにしつつ、ナノ流体力学としてモデル化を行う。
- (2) 外部電場による拡散の制御と操作対象分子の位置制御：電場の印加方法として、本研究独自の視点である埋めこみ型電極およびナノギャップ電極について以下の順に検討する。第1段階は、それぞれの電場印加法により支持膜内の操作対象分子が応答することの確認、第2段階は、局所電界集中を用いた分子操作の確認である。最終的には表面パターンによる自発展開制御と融合し、効果的な動的分子操作技術へ発展させる。
- (3) 操作対象分子の拡大：官能基を表面に有する支持膜を作製し、ここに特異的に結合する分子を反応させる。具体的にはビオチン結合脂質分子を支持膜に導入し、ここへアビジンを結合させる（一次結合の形成）反応、さらに抗原抗体を用いる（二次結合の形成）反応を実行する。結合した分子の電場応答を確認する。

4. 研究成果

本研究課題の期間を通じて、人工生体膜を

利用した固体表面上の動的な分子操作に関して、重要な成果が得られた。特に外部電場による局所的な分子操作の成功は、本研究が単一分子までを対象にする研究のプラットフォームになりうることを示している。

またパターン基板上での自発展開の現象論や従来法より 10^2 倍以上集積度が向上した人工生体膜マイクロアレイの作製への研究展開は、本課題の基礎から応用につながる幅広い発展性を明らかにした点で意義がある。

以下、研究の手法に示した三つの方法それぞれについて、簡単に成果を述べる。

- (1) 表面パターンによる自発展開の制御：自発展開によってナノギャップ電極部位を通過する脂質二分子膜中の色素結合脂質分子の挙動について、ナノギャップ間隔と色素の立体障害や結合位置との相関を明らかにした。

異種材料からなるパターンを有する表面において、自発展開膜とパターン壁とに引力的相互作用があることを実験的に明らかにした。また、自発展開膜が単一の脂質二分子膜であることを、原子間力顕微鏡による直接観察によって実証した。これらの成果は、これまで調べられていなかった自発展開膜の基礎的な現象を実験的に明らかにした点で重要である。

- (2) 外部電場による拡散の制御と操作対象分子の位置制御：本研究の中心的な課題であり、もともと精力的に取り組んだ部分である。重要な成果は2点ある。①埋めこみ電極を備えた固体基板を用い、電圧印加によって膜内に埋めこんだ色素結合脂質分子の局所的な濃度勾配を形成することに成功した。これは局所電場が、側方拡散として知られる膜内の分子のブラウン運動に打ち勝ったことを意味する。②ナノギャップ電極を備えた固体基板を用い、電圧印加のオンオフによって自発展開の停止・開始の制御に成功した。ナノギャップ間隔と電解質溶液濃度を変化させて行なった詳細な実験により、電気二重層がナノギャップ電極間を満たす条件下で、自発展開制御が可能であることを証明した。この制御は、ナノギャップ間での有効な電場形成による脂質分子の捕捉に起因し、ナノギャップが「分子ゲート」として機能していると結論した。自発展開の停止・開始の制御は、電圧のオンオフに敏感に反応し、本研究課題の目標である「動的な分子操作」技術を開発することに成功した。

- (3) 操作対象分子の拡大：Ni キレート型の構造を含む脂質分子と His タグを持ったタンパク質の組み合わせを選択し、自発展開によって緑色蛍光タンパク質 GFP を輸送すること

に成功した。本手法は、多くの His タグを持ったタンパク質に適用可能であるため、さらなるマテリアルの拡充に重要な貢献をもたらす。さらに本研究の特徴のひとつである、固体表面に作製したパターンによる自発展開の位置制御技術を利用して、人工細胞膜マイクロアレイの作製を行った。10 μm 幅の組成の異なる人工細胞膜を 5 μm のインターバルを置いて 9 列配列した構造の作製に成功した。この手法は、従来法に比べて集積度が 100 倍以上にできることを提案した。さらに一部にビオチンを含む人工細胞膜アレイを作製し、ストレプトアビジンの選択的結合を用いたバイオセンシングの検証を行なった。その結果、本研究のマイクロアレイが、高い S/N 比で生体分子の選択的検出に利用できることを実証した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Kazuaki Furukawa, Takashi Aiba, “Highly Integrative Supported Lipid Bilayer Composition Microarrays Fabricated by Pattern-guided Self-spreading” Langmuir (accepted). (査読あり)

2. Yoshiaki Kashimura, Kazuaki Furukawa, Keiichi Torimitsu, “Electrostatic Control of Lipid Bilayer Self-Spreading Using a Nanogap Gate on a Solid Support”, J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 6118-6121. (査読あり)

3. Hiroshi Nakashima, Kazuaki Furukawa, Yoshiaki Kashimura, Koji Sumitomo, Youichi Shinozaki, Keiichi Torimitsu, “Pattern Formation and Molecular Transport of Histidine-tagged GFPs Using Supported Lipid Bilayers”, Langmuir 2010, 26, 12716-12721. (査読あり)

4. Kazuaki Furukawa, Yoshiaki Kashimura, “Self-spreading Lipid Bilayer as Nanofluidic Medium for Micro- and Nanostructured Biosurface Fabrication”, Mater. Res. Soc. Symp. Proc. 2010, 1236E SS 03-03. (査読あり)

5. Yoshiaki Kashimura, Kazuaki Furukawa, Keiichi Torimitsu, “Self-Spreading Supported Lipid Bilayer Passing through Single Nanogap Structure: Effect of Position of Dyes in Lipid Molecules”, Jpn. J. Appl. Phys. 2010, 49, 04DL15. (査読あり)

6. Yoshiaki Kashimura, Joana Durao, Kazuaki Furukawa, Keiichi Torimitsu, “Self-spreading Behavior of Supported Lipid Bilayer through Single Sub-100-nm Gap”, Jpn. J. Appl. Phys. 2008, 47, 3248-3252. (査読あり)

7. Hiroshi Nakashima, Kazuaki Furukawa, Yoshiaki Kashimura, Keiichi Torimitsu, “-Assembly of Gold Nanorods Induced by Intermolecular Interactions of Surface-Anchored Lipids”, Langmuir, 2008, 24, 5654-5658. (査読あり)

8. 古川一暎 「人工生体膜を分子の輸送に用いるマイクロ流路デバイス」 日本物理学会誌、2008、63、612-620. (査読あり)

[学会発表] (計 21 件)

1. Kazuaki Furukawa, Takashi Aiba, “Controlling self-spreading of lipid bilayer using surface pattern and its biosensing application”, 6th International Conference on Molecular and Bio Electronics.

2. Yoshiaki Kashimura, Kazuaki Furukawa, Keiichi Torimitsu, “Electrostatic control of lipid bilayer self-spreading using nanogap gate”, 5th International Meeting on Molecular Electronics.

3. Yoshiaki Kashimura, Kazuaki Furukawa, Keiichi Torimitsu, “Control of Supported Lipid Bilayer Self-Spreading through Nanogap by Local Electric Field” SSDM 2010.

4. Kazuaki Furukawa, “Supported Lipid Bilayer Microarray Fabricated by Self-spreading Technique”, Gordon Research Conference, Biointerface Science.

5. Kazuaki Furukawa, Yoshiaki Kashimura, “Self-spreading Lipid Bilayer as Nanofluidic Medium for Micro- and Nanostructured Biosurface Fabrication”, MRS 2009 Fall Meeting.

6. Kazuaki Furukawa, “Supported Lipid Bilayer Formation at Interface”, 3rd International Symposium on Nanomedicine (invited).

7. Hiroshi Nakashima, Kazuaki Furukawa, Keiichi Torimitsu, “Direct Observation of Self-Spreading Lipid Bilayer by AFM”, The 17th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy.

8. Yoshiaki Kashimura, Kazuaki Furukawa, Keiichi Torimitsu, “Effect of Nanogap Structure on Dynamics of Supported Lipid Bilayer”, SSDM 2009.

[図書] (計 3 件)

1. Kazuaki Furukawa

Supported Lipid Bilayer Formation Using
Self-spreading Phenomenon
In “Handbook of Biofunctional Surfaces”, Pan
Stanford Publishing (Singapore).

[その他]

ホームページ:

<http://www.brl.ntt.co.jp/J/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

古川 一暁 (FURUKAWA KAZUAKI)

日本電信電話株式会社NTT物性科学基
礎研究所・主任研究員

研究者番号: 40393748

(2)研究分担者

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