

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月25日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21350038

研究課題名（和文） ナノ構造設計に基づくイオンチャンネルチップの開発

研究課題名（英文） Ion channel chips based on nano-scale design

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（和文）：

細胞膜構造を人工的に構築した人工細胞膜は、高感度バイオセンサーや薬物スクリーニング系として期待されてきたが、脂質二分子膜は機械的強度が極めて低く、その発展の障害となっていた。本研究課題では、半導体微細加工技術や陽極酸化を用いて作製したナノ構造体と、バイオナノ薄膜である脂質二分子膜とを融合させることにより、人工脂質二分子膜の最大の問題であったその機械的脆弱性の問題を解決し、従来比約10倍の膜寿命と耐電圧特性をもち、かつ溶液交換耐性も兼ね備えた機械的強度の高い人工細胞膜系を構築することに成功した。これにより、人工細胞膜センサーの飛躍的発展のための基礎をつくった。

研究成果の概要（英文）：

Artificial bilayer lipid membranes (BLMs) have attracted attention as a platform for highly sensitive biosensor and drug screening systems. However, the instability of BLMs hinders their wide range of applications. In the present study, we have succeeded in preparation of stable free-standing BLMs through the combination of silicon microfabrication and BLM formation. The BLMs were not broken by applying a constant voltage of  $\pm 1$  V. The membrane lifetime was 15-45 h with and without incorporated gramicidin channel. The BLMs with incorporated channel showed tolerance to repetitive solution exchanges. Such stable membranes enable analysis of channel functions under various solution conditions from the same BLM, which will open up variety of applications including a high throughput drug screening for ion channels.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2010年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2011年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

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：イオンチャンネル・チップ分析・脂質二分子膜・ナノ構造

## 1. 研究開始当初の背景

イオンチャンネルは、重要な創薬ターゲットの1種であり、イオンチャンネルの薬物応答やチャネ

ル機能の高効率的な評価法 (high throughput screening) の開発は重要である。そのアプローチとして、細胞膜構造を模した人工平面脂質二

分子膜にイオンチャンネルを包埋した再構成系を構築することは、化学的に制御された系におけるイオンチャンネルの機能や薬物応答の評価を可能にする点で特に優れている。また、レセプター機能も併せ持つチャンネルでは、高感度なリガンド認識能や高い選択性、ms オーダーの応答速度をもつため、高機能センサーの設計にも有用である。しかし、チャンネルタンパク質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機械的脆弱さがあり、人工膜センサーの発展の障害となってきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、半導体微細加工や陽極酸化を用いて作製したナノ構造体とバイオナノ薄膜である脂質二分子膜とを結合させることにより、二分子膜系の最大の問題であったその機械的脆弱性の問題を解決し、チャンネルタンパク質に基づくバイオチップやバイオセンサーの構築を目指す。さらに、アレイ化が容易という半導体微細加工の特徴を生かし、チャンネルタンパク質包埋二分子膜をアレイ状に並べたイオンチャンネルアレイを構築し、チャンネルタンパク質の薬物応答の高効率な評価系として提案する。

## 3. 研究の方法

絶縁特性をもつ窒化珪素を nm オーダーで堆積したシリコン基板に滑らかなエッジをもつ微細孔をウェットエッチングで作製し、その微細孔中で脂質分子の単分子膜を貼り合せて二分子膜を形成する。また、ポーラスアルミナのようなナノ構造体を保持体として脂質二分子膜を形成し、その膜強度について、寿命、耐電圧特性、溶液交換耐性の観点から評価を行う。さらに、この二分子膜系にイオンチャンネルを組み込んだイオンチャンネルセンサーを構築する。また、多数のチップの同時作製が可能というシリコン微細加工の特徴をいかし、イオンチャンネルセンサーを多数個配列させたイオンチャンネルアレイを構築し、創薬のための薬物スクリーニング法のプラットフォームとして提案する。

## 4. 研究成果

はじめに、ナノポーラスアルミナ薄膜を支持体として用いた脂質二分子膜の安定化について検討した。ナノポーラス構造を用いることにより、個々の膜面積をナノスケールに下げることによる膜安定性の向上と、同時に、大きな総膜面積を保つことによるチャンネル包埋確率の向上の2つを兼ね備えた膜系の構築を目指している。その結果、構築した膜系は、耐電圧 $\pm 1$  V 以上、最長寿命30時間であり、従来の二分子膜に比べて強度の高い二分子膜の形成に成功した (Applied Physics Letters 2010, 96, 213706.)。しかし、high throughput スクリーニング応用へと展開するには膜強度が十分ではなく、

溶液交換を行うと膜が破けてしまうという課題が残った。

上述のポーラスアルミナの経験により、二分子膜の微小化のみでは十分な膜安定性が得られないことが分かってきた。そこで我々は、微細孔のエッジと二分子膜との接合部の形状に注目し、滑らかなエッジを持つような微細孔を半導体微細加工により  $\text{Si}_3\text{N}_4/\text{Si}$  基板中に作製し(図1)、その中で脂質二分子膜形成について検討した。その結果、構築した膜系は、耐電圧 $\pm 1$  V 以上、最長寿命 45

時間であり、チャンネルを包埋した状態でも数回にわたる溶液交換に耐える膜安定性を示し、従来の二分子膜に比べ

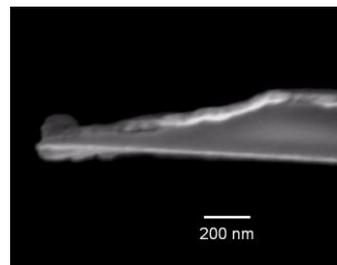


図1. 微細孔の縁部のSEM画像で著しく強度の高い二分子膜を形成することに成功した(Langmuir 2010, 26, 1949–1952.)。しかし、この膜系には、シリコン由来の大きな電気容量のためノイズ電流が大きく、また過渡電流があるという問題があることも分かってきた。そこで、熱酸化膜( $\text{SiO}_2$ 層)およびテフロン層を用いた絶縁層被覆を行いシリコンチップの電気容量を下げることにより、ノイズ電流幅を 1–2 pA (peak-to-peak)、過渡電流を 1 ms 以下にまで下げることに成功した(Micro and Nanosystems, 2012, 4, 2–7.)。これは、生体チャンネルの単一チャンネル電流記録に適した電気特性と機械的安定性とを兼ね備えた人工脂質二分子膜系の構築に成功したことを意味する。

この他、高効率な薬物スクリーニング法への展開を目指し、安定化脂質二分子膜を多数個並列させた脂質二分子膜アレイを構築し、モデルチャンネルのチャンネル電流について複数の二分子膜から同時記録をすることに成功した(投稿中)。また、二分子膜形成時における再現性の向上を目指し、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を行い、チャンネル電流測定には必須の  $\text{G}\Omega$ レベルの高い抵抗を持った二分子膜が形成される際には、リン脂質分子のC=O伸縮モードが現れることを見出した (Appl. Phys. Lett. 2009, 94, 243096–1–3.)。

## 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 16 件)

- (1) Azusa Oshima, Ayumi Hirano-Iwata, Tomohiro Nasu, Yasuo Kimura, and Michio Niwano, “Mechanically Stable

- Lipid Bilayers in Teflon-Coated Silicon Chips for Single-Channel Recordings”, *Micro and Nanosystems*, 4, 2-7 (2012). (査読有)
- (2) 平野愛弓, 大嶋 梓, 木村康男, 庭野道夫, “ナノ・マイクロ加工に基づく人工細胞膜センサの研究”, *応用物理*, 81, 143-146 (2012). (査読有)
- (3) Keiichiro Nozawa, Azusa Oshima, Tomohiro Nasu, Atsushi Shoji, Ayumi Hirano-Iwata, Michio Niwano and Masao Sugawara, “*In situ* modification of lipid-loaded MCM-41 channels with bovine serum albumin at a planar lipid bilayer for biosensing”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 160, 139-144 (2011). (査読有)
- (4) Shizuko Hozumi, Kana Ikezawa, Atushi Shoji, Ayumi Hirano-Iwata, Tim Bliss and Masao Sugawara, “Simultaneous monitoring of excitatory postsynaptic potentials and extracellular L-glutamate in mouse hippocampal slices”, *Biosens. Bioelectron.*, 26, 2975–2980 (2011). (査読有)
- (5) 平野愛弓, “微細加工で創る人工細胞膜センサー—イオンチャンネルチップの実現へ向けて—”, *未来材料*, 11, 40-44 (2011). (査読無)
- (6) Ayumi Hirano-Iwata, Tasuku Taira, Azusa Oshima, Yasuo Kimura, and Michio Niwano, “Improved stability of free-standing lipid bilayers based on nanoporous alumina films”, *Appl. Phys. Lett.*, 96, 213706 (2010). (査読有)
- (7) Ayumi Hirano-Iwata, Kouji Aoto, Azusa Oshima, Tasuku Taira, Ryo-taro Yamaguchi, Yasuo Kimura, and Michio Niwano, “Free-Standing Lipid Bilayers in Silicon Chips – Membrane Stabilization Based on Microfabricated Apertures with a Nanometer-Scale Smoothness”, *Langmuir*, 26, 1949–1952 (2010). (査読有)
- (8) Ayumi Hirano-Iwata, Azusa Oshima, Tomohiro Nasu, Tasuku Taira, Yasuo Kimura, and Michio Niwano, “Stable Lipid Bilayers Based on Micro- and Nano-Fabrication”, *Supramolecular Chemistry*, 22, 405-411 (2010). (査読有)
- (9) 平野愛弓, “微細加工に基づく人工細胞膜センサー —イオンチャンネルチップへの展開—”, *化学と工業(支部発 話題欄)*, 63-3, 234-235 (2010). (査読有)
- (10) Ayumi Hirano-Iwata, Azusa Oshima, Kota Onodera, Kouji Aoto, Tasuku Taira, Ryo-taro Yamaguchi, Yasuo Kimura, and Michio Niwano, “Self-formation of bilayer lipid membranes on agarose-coated silicon surfaces studied by simultaneous electrophysiological and surface infrared spectroscopic measurements”, *Appl. Phys. Lett.*, 94, 243906-1-3 (2009). (査読有)
- (11) 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)
- [学会発表] (計 39 件)
- (1) 手塚竜太, 平野愛弓, 菅原正雄, 庭野道夫, “神経可塑性における放出グルタミン酸量の脳スライス内その場計測”, 第 59 回応用物理学関係連合講演会, 東京, 2012年3月18日
- (2) 大嶋 梓, 平野愛弓, 那須朋大, 木村康男, 庭野道夫, “半導体加工技術による人工脂質二分子膜センサの開発”, 第 59 回応用物理学関係連合講演会, 東京, 2012年3月16日
- (3) 青沼有紀, 近藤康彦, 平野愛弓, 木村康男, 篠原康雄, 庭野道夫, “表面赤外分光法を用いた脂肪細胞分化過程の非標識計測”, 平成23年度日本表面科学会東北・北海道支部学術講演会, 仙台, 2012年3月9日
- (4) 平野愛弓, “ナノ構造設計に基づくイオンチャンネルチップの開発”, 大阪府立大学 N2RC 拠点セミナー, 大阪, 2012年1月27日(招待講演)
- (5) Y. Aonuma, Y. Kondo, A. Hirano-Iwata, Y. Kimura, Y. Shinohara, M. Niwano, “Long-Term Monitoring of Cell Differentiation Using Surface Infrared Spectroscopy”, The 6th International Symposium on Surface Science (ISSS-6), 13PN-141, Tokyo, Japan, December 14, 2011.
- (6) A. Oshima, A. Hirano-Iwata, T. Nasu, Y. Kimura, M. Niwano, “Planar lipid bilayers formed in Teflon-coated silicon chips for single-channel recordings”, The 6th International Symposium on Surface Science (ISSS-6), 13PN-141, Tokyo, Japan, December 13, 2011.
- (7) A. Hirano-Iwata, A. Oshima, T. Nasu, Y. Kimura, M. Niwano, “Stable and Solvent-Less Lipid Bilayers Based on Nano- and Micro-Fabrication”, 2011 MRS Fall Meeting, Boston, December 1, 2011.
- (8) A. Oshima, A. Hirano-Iwata, T. Nasu, Y.

- Kimura, and M. Niwano, “Solvent-less planar lipid bilayers formed in microfabricated silicon chips”, 2011 MRS Fall Meeting, Boston, November 28, 2011.
- (9) 平野愛弓, “半導体微細加工に基づく安定化脂質イオンチャンネルチップの開発”, 平成23年度化学系学協会東北大会, 仙台, 2011年9月17日(招待講演)
- (10) 那須朋大, 大嶋 梓, 平野愛弓, 木村康男, 庭野道夫, “半導体微細加工に基づくイオンチャンネルアレイの開発”, 第72回応用物理学会学術講演会, 山形, 2011年9月2日
- (11) 平野愛弓, “半導体加工に基づくイオンチャンネルチップの開発”, 応用物理学会有機分子・バイオエレクトロニクス分科会研究会, 神戸, 2011年6月24日
- (12) A. Hirano-Iwata, A. Oshima, T. Nasu, Y. Kimura, and M. Niwano, “Improved Stability of Lipid Bilayers Based on Nano-Fabrication”, ICAS 2011, Kyoto, May 26, 2011.
- (13) 大嶋 梓, 平野愛弓, 那須朋大, 木村康男, 庭野道夫, “半導体加工に基づく脂質二分子膜イオンチャンネルセンサの開発”, 第58回応用物理学関係連合講演会, 神奈川, 2011年3月24日
- (14) 岡田健太, 平野愛弓, 青沼有紀, 木村康男, 庭野道夫, “表面赤外分光を用いた吸着水および水クラスターの脱離過程の観測”, 平成22年度日本表面科学会東北・北海道支部講演会, 仙台, 2011年3月10日
- (15) 青沼有紀, 山口僚太郎, 阿部真帆, 平野愛弓, 木村康男, 篠原康雄, 庭野道夫, “表面赤外分光法を用いたミトコンドリア内 ATP 合成過程のリアルタイム評価”, 第30回表面科学会講演会 第51回真空に関する連合講演会, 大阪, 2010年11月4日
- (16) 平野愛弓, “ナノ構造設計に基づく安定化脂質二分子膜センサーの開発”, 真空・表面科学合同講演会 第30回表面科学学術講演会 第51回真空に関する連合講演会, 大阪, 2010年11月4日(招待講演)
- (17) A. Hirano-Iwata, T. Taira, A. Oshima, Y. Kimura, and M. Niwano, “Free-Standing Lipid Bilayers Based on Nanoporous Alumina Films”, SSDM 2010, Tokyo, September 24, 2010.
- (18) Y. Aonuma, R. Yamaguchi, M. Abe, A. Hirano-Iwata, Y. Kimura, Y. Shinohara and M. Niwano, “Surface Infrared Spectroscopic Study of ATP Synthesis in Mitochondria”, SSDM 2010, Tokyo, September 24, 2010.
- (19) 那須朋大, 大嶋 梓, 平良 祐, 平野愛弓, 木村康男, 庭野道夫, “ナノ加工技術に基づく人工脂質二分子膜形成の安定化とセンサーの応用”, 日本分析化学会第59年会, 仙台, 2010年9月17日
- (20) 穂積志津子, 池澤香奈, 堀江未恵子, 東海林敦, 平野愛弓, Tim Bliss, 菅原正雄, “急性海馬スライスを電気刺激した際に放出されるグルタミン酸のリアルタイム計測”, 日本分析化学会第59年会, 仙台, 2010年9月16日
- (21) 野澤桂一郎, 那須朋大, 大嶋梓, 東海林敦, 平野愛弓, 庭野道夫, 菅原正雄, “平面脂質二分子膜中のメノポラスシリカへのレセプター修飾法”, 日本分析化学会第59年会, 仙台, 2010年9月15日
- (22) A. Hirano-Iwata, R. Yamaguchi, Y. Aonuma, Y. Kimura and M. Niwano, “*In situ* real-time monitoring of cell responses by using surface infrared spectroscopy”, The 23<sup>rd</sup> Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAAC2010), Sapporo, September 4, 2010. (招待講演)
- (23) 那須朋大, 大嶋 梓, 平野愛弓, 木村康男, 庭野道夫, “半導体加工に基づく安定化脂質二分子膜センサーの開発”, 平成22年度日本分析化学会東北支部若手交流会, 秋田, 2010年7月3日
- (24) 岡田健太, 近藤康彦, 平野愛弓, 木村康男, 庭野道夫, “表面赤外分光を用いた細胞分化過程の長期計測”, 平成22年度日本分析化学会東北支部若手交流会, 秋田, 2010年7月3日
- (25) 野澤桂一郎, 大嶋梓, 東海林敦, 平野愛弓, 庭野道夫, 菅原正雄, “平面脂質二分子膜中の MCM-41 チャンネルへのレセプターその場修飾法の検討”, 日本化学会第90春季年会, 東大阪, 2010年3月27日
- (26) 平野愛弓, “人工脂質二分子膜に基づく分子センシング”, 平成21年度奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学特別講演, 奈良, 2010年1月29日(招待講演)
- (27) 近藤康彦, 平野愛弓, 木村康男, 篠原康雄, 庭野道夫, “赤外吸収分光法を用いた細胞分化過程の長期観測”, 応用物理学会東北支部第64回学術講演会, 郡山, 2009年12月4日
- (28) 平野愛弓, 大嶋 梓, 青戸孝至, 平良祐, 木村康男, 庭野道夫, “ナノ構造を用いた自立型脂質二分子膜”, 第31回日本バイオマテリアル学会大会, 京都, 2009年11月16日(招待講演)
- (29) A. Oshima, A. Hirano-Iwata, K. Onodera,

- T. Taira, Y. Kimura, and M. Niwano, "Simultaneous Electrophysiological and Infrared Spectroscopic Studies of Lipid Bilayer Formation", SSDM 2009, Sendai, October 9, 2009.
- (30) 大嶋 梓, 平野愛弓, 青戸孝至, 平良祐, 木村康男, 庭野道夫, "半導体微細加工技術を利用した人工脂質二分子膜センサーの開発", 日本分析化学会第58年会, 札幌, 2009年9月26日
- (31) 平良 祐, 大嶋 梓, 平野愛弓, 木村康男, 庭野道夫, "ナノポーラス構造を用いた人工脂質二分子膜センサーの開発", 日本分析化学会第58年会, 札幌, 2009年9月25日
- (32) 平野愛弓, "ナノ構造設計を用いた脂質二分子膜の安定化とそのセンサー応用", 平成21年度化学系学協会東北大会, 仙台, 2009年9月19日(招待講演)
- (33) 近藤康彦, 平野愛弓, 木村康男, 篠原康雄, 庭野道夫, "赤外吸収分光法に基づく細胞動態の長期間観測装置の開発", 第70回応用物理学会学術講演会, 富山, 2009年9月10日
- (34) A. Hirano-Iwata, A. Oshima, T. Taira, K. Aoto, Y. Kimura, and M. Niwano, "Planar Lipid Bilayers for L-Glutamate Sensing", International Symposium innovative Nanoscience of Supermolecular Motor Proteins Working in Biomembranes, Kyoto, September 10, 2009. (招待講演)
- (35) 小山内裕美, 鈴木章義, 小松崎良将, 平野愛弓, 川戸 佳, 斎藤 稔, "NMDA 刺激によるマウス脳海馬のカルシウム信号の成分とそれに対するコルチコステロンの急性作用", 第18回日本バイオイメーシング学会学術集会, 岡山, 2009年9月5日
- (36) 平野愛弓, 山口僚太郎, 宮本浩一郎, 木村康男, 庭野道夫, "表面赤外分光法を用いた細胞応答のリアルタイム計測", 日本動物細胞工学会 2009 年度大会, つくば, 2009年7月24日(招待講演)
- (37) 大嶋 梓, 平野愛弓, 小野寺恒太, 平良祐, 木村康男, 庭野道夫, "赤外吸収分光法を用いた脂質二分子膜形成過程の *in situ* 計測", 平成21年東日本分析若手交流会, 仙台, 2009年7月4日
- (38) 近藤康彦, 山口僚太郎, 平野愛弓, 磯田博子, 宮崎 均, 木村康男, 庭野道夫, "赤外吸収分光法による細胞死のその場計測", 平成21年東日本分析若手交流会, 仙台, 2009年7月4日
- (39) 平良 祐, 大嶋 梓, 平野愛弓, 木村康男, 庭野道夫, "ポーラスアルミナを用いた人工脂質二分子膜形成とセンサーへの応用", 平成21年東日本分析若手交

流会, 仙台, 2009年7月4日

[図書](計1件)

- (1) Ayumi Hirano-Iwata, Azusa Oshima, Yasuo Kimura, Michio Niwano, "Stable and Reproducible Bilayer Lipid Membranes Based on Silicon Microfabrication Techniques", *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, Vol.11, Eds. H. T. Tien and A. Ottova, Elsevier, pp. 71-86 (2010).

[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

<http://www.ecei.tohoku.ac.jp/hirano/>

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

庭野 道夫 (NIWANO MICHIO)

東北大学・電気通信研究所・教授

研究者番号:20134075

木村 康男 (KIMURA YASUO)

東北大学・電気通信研究所・准教授

研究者番号:40312673

青沼 有紀 (AONUMA YUKI)

東北大学・電気通信研究所・助教

研究者番号:80582262

(3) 連携研究者

菅原 正雄 (SUGAWARA MASAO)

日本大学・文理学部・教授

研究者番号:50002176