

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 5月17日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22656010

研究課題名（和文） 自立型脂質二分子膜に基づくシングルチャンネル操作法の開発

研究課題名（英文） Single-channel manipulation based on free-standing lipid bilayers

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

本課題では、我々が提案した高い安定化自立型脂質二分子膜と原子間力顕微鏡(AFM)を組み合わせることにより、イオンチャンネルの単離から脂質二分子膜への包埋までの全工程を AFM で行うチャンネル操作法の開発を目指した。まず、測定チャンパーの設計とチャンネル発現細胞の構築について検討を行った。また、安定化脂質二分子膜の更なる改良についても検討し、作製したシリコンチップを熱酸化膜(SiO₂層)およびテフロン層で被覆することにより、ノイズ電流および過渡電流を抑制することに成功した。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。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is development of an atomic force microscopy (AFM)-based method for manipulating single ion-channels through the combination of AFM and recently reported stable bilayer lipid membranes (BLMs). The final goal is that isolation of ion channels from cell membranes and subsequent incorporation of the channel into free-standing bilayer lipid membranes is made by AFM. We started with design of a solution cell and construction of cell lines expressing ion channel proteins. In addition, further improvement of stable BLMs was also achieved by coating the microfabricated silicon chips with insulator layers. We succeeded in formation of stable BLMs with electrical properties suitable for recording single-channel activities of biological ion channels.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,500,000	0	2,500,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	210,000	3,410,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：応用物理学・工学基礎，薄膜・表面界面物性

キーワード：脂質二分子膜・イオンチャンネル・原子間力顕微鏡・チャンネル電流

1. 研究開始当初の背景

イオンチャンネルタンパク質の開閉機構を解明

することは、生理的機能の理解や、疾患治療、創薬の観点から重要である。従来、チャンネル機

能の評価にはパッチクランプ法が、構造解析には結晶構造解析が用いられてきた。しかし、これらの手法の融合は不可能であり、機能と構造とを同時に評価できる手法の開発が求められてきた。そのアプローチとして、人工膜再構成系を用いてチャンネルの AFM 観察を行う試みが盛んであるが、基板上に形成した支持二分子膜に基づいており、基板との接触によりチャンネルタンパク質が失活するという問題を抱えていた。一方、チャンネル機能が保持される水|膜|水構造の自立型二分子膜では、膜強度の低いことが課題であったが、2010年に我々は、半導体微細加工により作製した微細孔中で膜形成を行うことにより二分子膜の安定性が著しく向上することを見出した。

2. 研究の目的

本研究では、我々が報告した機械的強度の高い自立型二分子膜(水|膜|水構造)を用いて、その膜中にイオンチャンネルタンパク質を組み込み、チャンネルタンパク質の AFM 観察を行うことを最終目的とする。さらに、リガンド修飾探針を用いて細胞膜から所望のチャンネルを単離し、脂質二分子膜へと包埋するシングルチャンネル操作法の開発も目指す。

3. 研究の方法

二分子膜形成と AFM 測定を両立可能な測定用チャンバーの設計から着手する。また、チャンネルタンパク質の操作に必要なチャンネル発現細胞の構築についても検討する。安定化脂質二分子膜へ発現チャンネルを組み込み、そのチャンネル電流を記録するのが最終目標となるが、現行の安定化脂質二分子膜ではシリコンチップ由来のノイズ電流が大きく、また、過渡電流応答も見られるため、絶縁層被覆による電気特性の改善についても検討を行う。

4. 研究成果

形成した二分子膜を AFM 溶液セルにトランスファーできるようなチャンバーの設計と創薬分野への応用を目指した high throughput 測定のためのアレイチャンバーの設計について検討を行い、モデルチャンネルを用いて、複数の二分子膜から同時にチャンネル電流を記録することに成功した(投稿中)。また、チャンネルタンパク質の操作に必要なチャンネル発現細胞の構築についても検討を開始し、創薬に重要なイオンチャンネルタンパク質を対象に発現細胞系の立ち上げを行った。一方、安定化脂質二分子膜の更なる改良についても検討を行った。シリコン微細加工に基づく安定化脂質二分子膜では、シリコン由来の大きな電気容量のためノイズ電流と過渡電流が大きという問題があったが、熱酸化膜(SiO₂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で、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。

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) A. Oshima, A. Hirano-Iwata, T. Nasu, Y. Kimura, and M. 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) K. Nozawa, A. Oshima, T. Nasu, A. Shoji, A. Hirano-Iwata, M. Niwano and M. 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) R. Yamaguchi, A. Hirano-Iwata, Y. Aonuma, Y. Yoshimura, Y. Shinohara, Y. Kimura and M. Niwano, “Real-time monitoring of mitochondrial adenosine 5'-triphosphate synthesis and hydrolysis by surface infrared spectroscopy”, Appl. Phys. Lett., 98, Issue 13, 133703-1-3 (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) 桜井伊知郎, 佐藤憲一, 庭野道夫, “基底核の脳神経回路における薬理作用のシミュレーション(I)—眼球運動の遅れと神経細胞活動度の振動現象—”, 日本神経回路学会誌, 18, No. 4, 182-193 (2011). (査読有)
- (7) M. M. Rahman, R. Kojima, M. El F. Fihry, D. Tadaki, T. Ma, Y. Kimura, and M. Niwano, “Effect of Porous Counter Electrode with Highly Conductive Layer on Dye-Sensitized Solar Cells”, Jpn. J. Appl. Phys., 50, 082303 (2011). (査読有)
- (8) A. Hirano-Iwata, T. Taira, A. Oshima, Y. Kimura, and M. Niwano, “Improved

- stability of free-standing lipid bilayers based on nanoporous alumina films”, Appl. Phys. Lett., 96, 213706 (2010). (査読有)
- (9) A. Hirano-Iwata, K. Aoto, A. Oshima, T. Taira, R. Yamaguchi, Y. Kimura, and M. 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)
- (10) A. Hirano-Iwata, A. Oshima, T. Nasu, T. Taira, Y. Kimura, and M. Niwano, “Stable Lipid Bilayers Based on Micro- and Nano-Fabrication”, Supramolecular Chemistry, 22, 405-411 (2010). (査読有)
- (11) T. Nagahiro, K. Ishibashi, Y. Kimura, M. Niwano, T. Hayashi, Y. Ikezoe, M. Hara, T. Tatsuma and K. Tamada, “Ag nanoparticle sheet as a marker of lateral remote photocatalytic reactions”, Nanoscale, 2, 107-113 (2010). (査読有)
- (12) M. M. Rahman, R. Kojima, M. El F. Fihry, Y. Kimura, and M. Niwano, “Formation of porous titanium film and its application to a counter electrode for a dye-sensitized solar cell”, Jpn. J. Appl. Phys., 49, 122302 (2010). (査読有)
- [学会発表] (計 25 件)
- (1) 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
- (2) 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
- (3) 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)
- (4) 桜井伊知郎, 佐藤憲一, 庭野道夫, “Simulations of pharmacological actions in the basal ganglia circuit: 大脳基底核に対する薬理作用のシミュレーション”, 日本神経回路学会第 21 回全国大会, 沖縄, 2011年12月15日
- (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), 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), 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) Ichiro Sakurai, Ken-ichi Sato, Michio Niwano, “MPTP injection yields oscillating pattern of neuronal activity through the loop circuit formation in the basal ganglia”, 30th JSST Annual Conference, Tokai University, October, 23, 2011.
- (10) 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)
- (11) 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 回応用物理学学会学術講演会, 山形, 2011年9月2日
- (12) 青沼有紀, 近藤康彦, 平野愛弓, 木村康男, 篠原康雄, 庭野道夫, “表面赤外分光法に基づく細胞分化過程の非標識観測”, 第 72 回応用物理学学会学術講演会, 山形, 2011年8月31日
- (13) 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
- (14) 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.
- (15) 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
- (16) 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
- (17) 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）
- (18) 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
- (19) 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.
- (20) 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 23, 2010.
- (21) 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
- (22) 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ソポー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
- (23) 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 23rd Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2010), Sapporo, September 4, 2010. (招待講演)
- (24) 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
- (25) 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

[図書] (計1件)

- (1) A. Hirano-Iwata，A. Oshima，Y. Kimura，M. 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.niwano.riec.tohoku.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

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