

総説

ドロップレット型人工細胞膜によるチャネルタンパク質計測

川野竜司 東京農工大学工学研究院生命機能科学部門

This review describes recent our studies on artificial cell membranes (lipid bilayers) and their applications using microfabrication technologies. The stable and reproducible lipid bilayer formation can be achieved by “droplet contact method” which is readily created the lipid bilayer by contacting two lipid monolayers at the interface of the droplets. This method will be a powerful tool for the high-throughput ion channel measurements and biomimetic sensors.

Planar lipid bilayer / Droplets / Ion channel / Nanopore sensing / Microfluidics / Single molecule detection

1. はじめに

自然物を人工的に再現する。これまで人類は生物や環境から学び、その機能を模倣してきた。古くは空を飛ぶ鳥に憧れ飛行機を発明し、最近では蜘蛛の糸を模倣した強靱な糸や、魚の体表面の構造を模倣した水着が作られてきている。では生物の最小構成単位である細胞も一から人工的に作れないだろうか？ 細胞は主にタンパク質、塩基、脂質などから構成され、これらを別々に合成し組み立てることができれば、最終的に人工の細胞を創ることも夢ではない¹⁾。また人工細胞を創る過程で、それぞれのパーツが持つ細胞機能を取り出し、人工的に利用する試みも行われている。その中で人工細胞膜は細胞を構成する物質と外界とのインターフェースとして研究が行われており、例えば脂質二分子膜で構成された球状のカプセル（リポソーム）を用いて、膜タンパク質、膜成分に関する研究や、リポソーム内でのタンパク質合成を行うことができる。

球状膜に対し、平面脂質二分子膜と呼ばれるものもある。平面膜実験系では～0.2 mm程度の穴に平面状の脂質膜を形成し、その両側に電極を配置しイオンチャネルのチャネル電流計測や脂質膜の膜透過、膜容量の計測を行う。イオンチャネルの電気生理学的性質に関してはパッチクランプ法という細胞から直接計測する方法があるが、平面膜法ではパッチクランプ法には無い以下の様なメリットがある。1) 精製したチャネルの使用が可能であり脂質組成を任意に選択できるので、構造機能相関に関する研究に有利。2) 細胞小

器官上のチャネルなど、パッチクランプ法では測定不可能なチャネルの測定が可能。このような利点を活かしてイオンチャネルをはじめとする膜タンパク質の基礎的な研究だけでなく、近年では膜タンパク質創薬や、嗅覚や味覚の膜受容体を利用した新規バイオセンサへの応用が期待されている。しかしながら、これまで平面膜形成技術の習熟が必要となること、形成した膜の安定性が低いことが課題であった。本稿ではマイクロ加工、マイクロ流体技術を用いた安定で再現性の高い平面膜形成法、その膜を用いた創薬、バイオセンサへの応用に関して筆者らの研究を中心に紹介する。

2. 安定性・再現性の高い平面脂質膜形成法

平面脂質膜形成法に関しては、1972年にTakagiらによって報告された方法をMontalとMuellerが改良したMontal-Mueller (MM) 法²⁾が報告されて以降その研究が発展してきた。MM法による膜形成実験を図1に示す。MM法は脂質単分子膜貼り合わせ法とも呼ばれており、水相の気液界面に脂質溶液を展開し脂質単分子膜を形成させ、水面をゆっくりと上下させることにより界面の脂質単分子膜を穴中で貼り合わせ二分子膜とする。他にもpainting法と呼ばれる方法があり、脂質溶液を直接穴に塗ることにより比較的簡便に脂質二分子膜を形成させることができる。これらの方法はどちらも脂質膜を形成するのに習熟が必要になり、また形成した平面膜は機械的振動や印加電圧の切り替えなどにより容易に破壊される。実用的な応用を考えた場

Planar Lipid Bilayer Formation Using Droplet Contact Method and Its Applications
Ryuji KAWANO
Tokyo University of Agriculture and Technology

合、形成する膜の安定性の向上と再現良く膜形成する方法の開発が強く望まれていた^{3),4)}。

筆者らは液滴同士を接触することで膜形成を行う液滴接触法を用いて、脂質膜の安定性・再現性向上を試みた。液滴接触法は、前述の貼り合わせ法を発展させた方法で2006年にTakeuchiらによって初めて報告され、その後Bayleyらも同様の手法による膜形成を報告している^{5),6)}。この方法では図2aに示すような「∞」型のウェルに脂質溶液、水滴を順に滴下する。この時水滴の表面には脂質の単分子膜が形成され、この2つの水滴が接触することで、脂質単分子膜同士が貼り合わされ脂質二分子膜を形成する(図2b)。この方法では溶液をピペットで滴下するだけで、簡単に誰でも脂質二分子膜形成が可能である。しかし膜形成の再現性は高かったが、形成した脂質膜の安定性に問題があった。そこで脂質膜の面積を小さくすると膜が安定するという知見を活かし、液滴が接触する部分を直径

100 μm の穴を有す疎水性フィルムで仕切ることによって、膜形成面積を小さくした(図2c)。その結果、脂質膜の安定性が飛躍的に向上し、およそ2週間膜を保持し続けることが可能であった⁷⁾。また「∞」型のウェルの底部に電極を配線(図2a, 2d)することで、ペプチドチャンネルや、イオンチャンネルの電流計測が可能になった。この液滴接触法による脂質二分子膜形成は、再現性、安定性の面で現在最も優れた方法であると考えている。

3. ハイスループットイオンチャンネル計測

創薬標的になっている遺伝子約6,500個の中で、イオンチャンネルをコードしている遺伝子は約15%の1,000個程度あると考えられている。しかしながら実際に用いられている薬剤の中で、イオンチャンネルを標的としているものはわずか5%ほどしかない⁸⁾。その1つの原因として、イオンチャンネルの薬理機構の解明に必要な測定法が限られていることがあげられる。そこでイオンチャンネルのハイスループット(High Throughput, HT)計測のため、液滴接触法を行う「∞」型のウェルを配列し脂質二分子膜アレイデバイスを作製した。脂質膜はピペット操作のみで形成可能であるため、インジェクションロボットを用い自動で脂質膜形成を行うシステムを構築した(図3a)。このシステムを用い、人の平滑筋や神

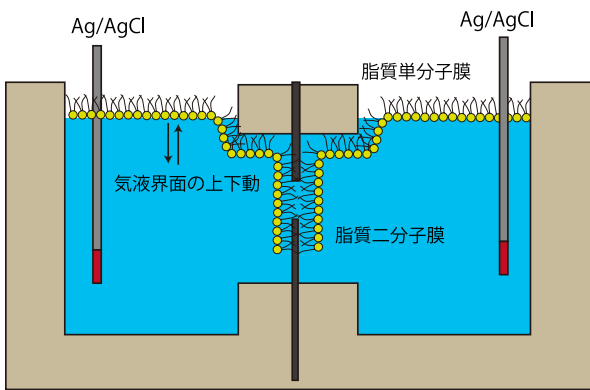


図1 一般的な平面脂質膜形成法 (Montal-Mueller 法)。

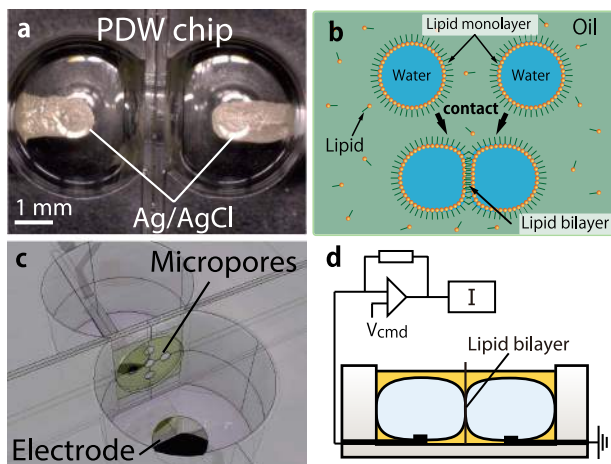


図2 液滴接触法とそのデバイス。a) デバイス写真 (top view)。b) 液滴接触による脂質二分子膜形成。c) 液滴接触面の面積を小さくする。d) 測定系の模式図。(文献7から改変)

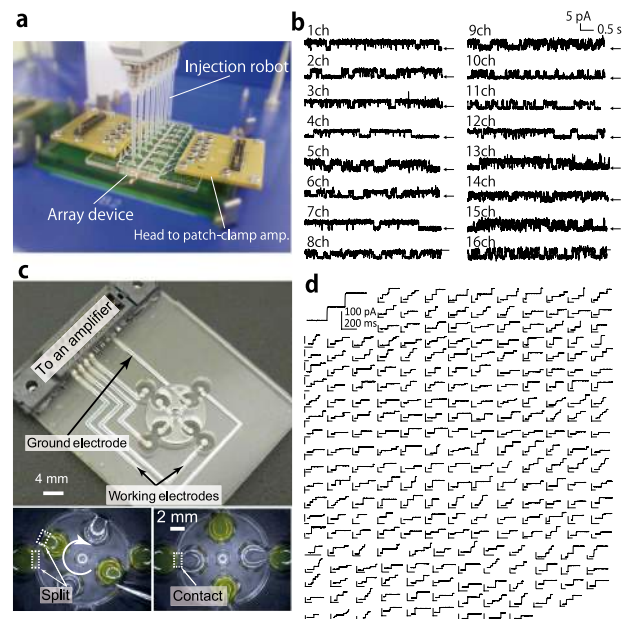


図3 ハイスループット計測系。a) インジェクションロボットによる自動脂質膜形成。b) 16chアレイを用いたhBKシングルチャンネル計測。c) 液滴の機械的動きによる連続脂質膜形成。d) 30分間で273個のチャンネルシグナル取得に成功。(文献7, 10から改変)

経細胞に発現している Ca^{2+} -dependent potassium channel (hBK) チャンネルについて計測を行った。アレイデバイスには 16ch 同時計測可能なものを使用し、発現細胞から精製した hBK チャンネルを平面脂質二分子膜に再構成することで hBK 再構成膜を得た。この再構成膜アレイデバイスを用い hBK チャンネルのチャンネル電流を計測したところ、9 割以上のウェルからシングルチャンネル応答を 2 時間で得ることができた (図 3b)。細胞を用いたパッチクランプ法では、およそ 1 日に 4 つ程度のデータしか取れないことから、HT での計測ができたといえる。またチャンネル阻害剤を用いてカリウムイオン透過の阻害実験を行ったところ、50% 阻害濃度 (IC_{50}) を短時間で決定することができた。人工膜の利点として細胞内側・外側に対する実験が容易に可能であることがあげられる。アルツハイマー病モデルマウスにおいて、神経細胞の hBK チャンネルが不活性化していることが最近報告されたが、アミロイド β がチャンネルを直接阻害しているのか、また細胞の内・外どちらから阻害が起こっているのかなど詳細なメカニズムは不明であった⁹⁾。そこで本システムを用いて阻害実験を行ったところ、このアミロイド β が hBK チャンネル自身を細胞の内・外どちら側からも直接阻害することを実験的に確認できた⁷⁾。

HT 計測は、前述のように測定要素 (ウェル) を並列化する以外にも、繰り返し計測を行うことでも可能であると考えた。そこで液滴を機械的に動かすことにより、脂質膜を形成させるシステムの開発を試みた。液滴接触法では、液滴表面の脂質単分子膜同士が接触して二分子膜になり、液滴同士が離れると元の単分子膜に戻る。ローター部分に滴下した 4 つの液滴を回転させ (図 3c)、外側の液滴と接触・分離を繰り返すことで脂質二分子膜形成、単分子膜分離するデバイスを構築した。実際にデバイスのローター部分を回転させ、4 つのウェルから後述する α ヘモリシン (α HL) のチャンネル電流計測を行ったところ、30 分間で 273 回のチャンネルシグナルの計測に成功した (図 3d)。このような動的な機構と、接触法での安定性の高い膜形成機構を組み合わせることで、HT 計測が実現できた¹⁰⁾。

4. バイオセンサへの応用

膜タンパク質の中には受容体など、外界物質を感知するセンサの役割を担うものが数多く存在する。この受容体を人工細胞膜に埋め込むことで、例えば昆虫のフェロモンを感知するセンサができるかもしれない。またチャンネルを形成する膜タンパク質を用い、その

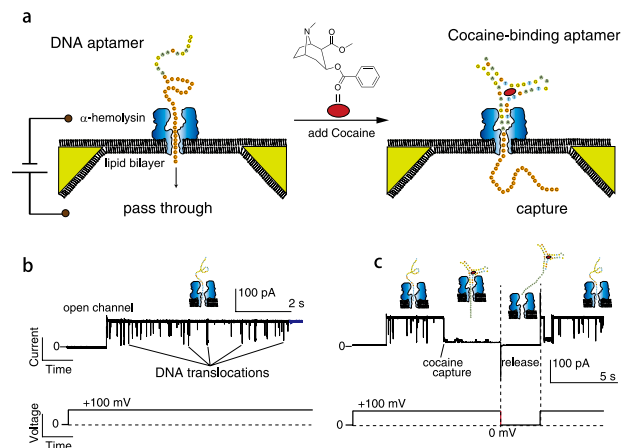


図 4 DNA アプタマーを用いた選択的ナノポア計測。a) 標的分子有無による体積差を利用しナノポアで検出。b) コカイン分子がないとき ssDNA はナノポアを通過。c) コカイン分子存在下では複合体を形成し、ポアを塞ぐ。(文献 11 から改変)

チャンネルを通過する分子を電氣的に検出するナノポア計測も新しい計測法として着目されている。ナノポア計測では、主に直径 1.4 nm のナノポアを作る α HL という toxin チャンネルが用いられている。この 1.4 nm という孔の大きさが single-stranded DNA (ssDNA) の直径 ~ 1 nm と近いことから、ssDNA の検出、シーケンスに向けて研究が広く展開している。しかしながら、これまでのナノポア計測では基質選択性が低く、孔を通過する分子を見分けることは難しかった。

そこで筆者らは DNA アプタマーを用いることで、ナノポアによる選択的一分子計測法を考案した¹¹⁾。実験ではコカインを標的とする DNA アプタマーを用い、標的分子非存在下では ssDNA が α HL ポアを通過、標的分子存在下ではアプタマー複合体を形成し α HL ポアを通過できずブロックする、という複合体形成前後における体積差を利用して一分子の選択的検出を行った (図 4a)。図 4b、4c に複合体形成前、形成後の電流一時間のグラフを示す。コカイン非存在下で DNA は複合体形成を行わず ssDNA の状態であり、ssDNA が α HL ポアを高速で通過するスパイク状の阻害電流が観測される (図 4b)。一方、コカイン分子存在下では、DNA とコカイン分子で複合体を形成し、 α HL ポアを塞ぐことで長時間の阻害電流を示す (図 4c)。このシグナルの違いを利用し、マイクロ流路デバイスを用いコカイン検出を行ったところ、300 ng/mL (検出下限推奨値) のコカイン分子をおよそ一分で検出できた。原理的には体積差を利用するので、アプタマー以外にも抗体を用いた選択的一分子検出が可能であると考える。

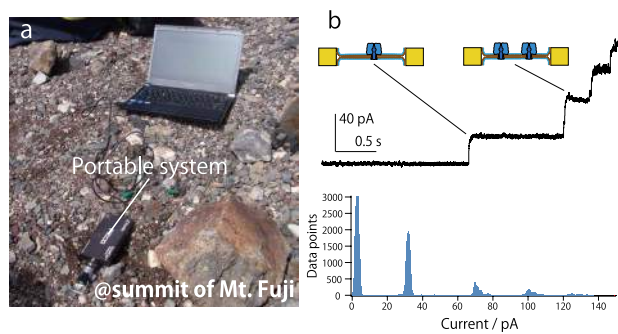


図5 ポータブルチャンネル電流計測システム。a) 富士山山頂での計測風景。b) 富士山山頂でのヘモリシンチャンネル電流計測結果。(文献10から改変)

実用的なバイオセンサに応用するため、液滴接触法で形成した高い安定性を持つ脂質膜を利用し、持ち運び可能なチャンネル計測デバイスを開発した。共同研究先の Tecella 社が開発した小型アンプに、液滴接触法デバイスを組み込み、ノート PC と接続することで持ち運び可能なチャンネル計測システムを構築した (図5a)¹²⁾。この計測システムを用いて富士山の山頂でのチャンネル計測を試みた。これはシステムの有用性を示すとともに、一般の人へ膜タンパク質に関する興味を喚起できればと行った。学生を含む4名で本システムと試薬、ピペットを持って登山、八合目にて山小屋泊した後登頂した。実際に3,620 m 付近において実験を行ったところ、 α HL のチャンネル電流の計測に成功した (図5b)。屋外での計測はノイズ源となる電源がないので、予想以上に低ノイズで計測ができたが、風の影響でデバイスが揺れ振動ノイズとなるため、風よけを設置するなど実験条件の調整が必要であった。チャンネル電流に関しては大量のデータを得ることができなかったため、地上のデータと統計的な比較はできないが、得られたデータにおいてコンダクタンスやポア形成の様子に特に違いはみられなかった。

5. おわりに

マイクロ加工、マイクロ流体技術を用いた液滴接触法により、再現性・安定性の高い脂質二分子膜形成ができるようになった。しかしまだ課題も多い。イオンチャンネル創薬に展開する場合、標的となるタンパク質をいかに効率よく人工膜に再構成できるかが今後の課題である。また得られたデータが膨大な量になるので、データの自動解析技術の発展も望まれる。バイオ

センサに関しては実用的な使用を考えた場合、確立されたプロトコルが必要になる。今後創薬やバイオセンサ以外にも、人工細胞膜システムを様々な分野に展開することが期待される。最近筆者らは脂質膜液滴ネットワークを用いた DNA 演算システムの構築を試みている。

最後に、本研究の大部分は筆者の前所属である公益法人神奈川科学技術アカデミー竹内プロジェクト及び東京大学生産技術研究所の竹内昌治研究室での仕事である。本研究は、竹内昌治教授をはじめ、研究室の方々との共同成果でありここに謝意を記す。また科研費を始めとする研究助成により、これらの研究を推進できたことに深く感謝する。

文 献

- 1) Deamer, D. (2005) Trends Biotechnol. **23**, 336-338. DOI: 10.1016/j.tibtech.2005.05.008.
- 2) Montal, M. *et al.* (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **69**, 3561-3566. DOI: 10.1073/pnas.69.12.3561.
- 3) Ide, T. *et al.* (2008) Anal. Chem. **80**, 7792-7795. DOI: 10.1021/ac801224a.
- 4) Hirano-Iwata, A. *et al.* (2010) Langmuir **26**, 1949-1952. DOI: 10.1021/la902522j.
- 5) Funakoshi, K. *et al.* (2006) Anal. Chem. **78**, 8169-8174. DOI: 10.1021/ac0613479.
- 6) Bayley, H. *et al.* (2008) Mol. BioSyst. **4**, 1191-1208. DOI: 10.1039/b808893d.
- 7) Kawano, R. *et al.* (2013) Scientific Reports **3**. DOI: 10.1038/srep01995.
- 8) Terstappen, G. C. *et al.* (2001) Trends Pharmacol. Sci. **22**, 23-26. DOI: 10.1016/s0165-6147(00)01584-4.
- 9) Yamamoto, K. *et al.* (2011) J. Neurosci. **31**, 11100-11109. DOI: 10.1523/jneurosci.6752-10.2011.
- 10) Tsuji, Y. *et al.* (2013) Anal. Chem. **85**, 10913-10919. DOI: 10.1021/ac402299z.
- 11) Kawano, R. *et al.* (2011) J. Am. Chem. Soc. **133**, 8474-8477. DOI: 10.1021/ja2026085.
- 12) Kawano, R. *et al.* (2014) PLoS ONE **9**. DOI: 10.1371/journal.pone.0102427.



川野竜司

川野竜司 (かわの りゅうじ)

東京農工大学工学研究院生命機能科学部門テニュアトラック准教授

2005年横浜国立大学工学研究科博士課程修了, 博士(工学)。学振海外特別研究員(ユタ大学), KAST 竹内プロジェクト研究員を経て14年から東京農工大学工学研究院テニュアトラック准教授。

研究内容: ナノ空間化学, マイクロ加工

連絡先: 〒184-8588 東京都小金井市中町2-24-16

E-mail: rjkawano@cc.tuat.ac.jp

URL: <http://www.tuat.ac.jp/~rjkawano/>