

研究報告書

「ナノ形状設計に基づく人工神経細胞膜センサーの創製と機能発現」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 平野 愛弓

1. 研究のねらい

細胞膜は厚さ 4-5 nm の自然界のナノ薄膜であり、また、化学的、電気的、機械的刺激に対して非常に高感度なバイオセンサーでもある。その構造は、脂質分子が二層向かい合って並んだ脂質二分子膜と、イオンチャネルをはじめとする種々の膜タンパク質から成り立っている。細胞膜の高感度な刺激感受性は、膜タンパク質によって発現されており、例えば神経細胞の軸索部分では、電位依存性のイオンチャネルの開閉によって活動電位が伝搬されていく。一方、基本構造となる脂質二分子膜は超薄膜の絶縁体であり、イオンチャネルを透過するイオン流のような微小信号に基づく細胞膜情報伝達の基礎となっている。

本研究では、このような神経細胞膜の優れた機能を、半導体微細加工によるトップダウンプロセスとボトムアップ的な脂質分子の自己集合プロセスとを融合して人工的に再構築することにより、人工神経細胞膜センサーを開発することを目的とした。従来の人工細胞膜はその機械的強度に問題があり、センサー開発の障害となっていたが、本研究では、nm スケールで形状を制御した微細孔を作製し、その中で脂質二分子膜を形成することにより、人工脂質二分子膜系の大きな問題であった機械的脆弱性の問題を解決する。さらに、その膜中に電位依存性チャンネルやレセプターチャンネルを埋め込むことにより、細胞膜構造を人工的に再構築した人工神経細胞膜センサーを開発することを目指す。また、アレイ化が容易という半導体加工技術の特徴を活かしてイオンチャンネルアレイを作製し、創薬のためのハイスループットな薬物スクリーニングへと展開する。特に、薬物候補化合物の副作用評価が必須となった電位依存性のカリウムチャンネルや、脳疾患の創薬ターゲットとして重要なセプターチャンネルを対象としたイオンチャンネルアレイを構築することにより、新しい薬物スクリーニング法の開発を目指した。

一方で、ナノ構造と人工神経細胞膜とを融合した本センサデバイスは、実際の神経細胞との人工的シナプス形成が可能となれば神経細胞と集積回路の接合部ともなりうるため、薬物スクリーニングのみならず、様々な分野での発展が期待される次世代ナノバイオデバイスとなると期待される。

2. 研究成果

(1) 概要

細胞膜構造を模した人工脂質二分子膜にイオンチャンネルを埋め込んだ人工細胞膜は薬物スクリーニングや高感度センサーの観点から期待されてきたが、イオンチャンネルの機能発現にとって必須の環境である脂質二分子膜は機械的強度が低く、その発展の障壁となってきた。本研究では、テーパーの付いた滑らかなエッジを持つように作製した微細孔の中で膜形成を行えば、膜保持体と脂質二分子膜の接合部の歪みが減少して膜安定性が向上するのではないかとの考えから、滑らかなエッジを持つ微細孔を $\text{Si}_3\text{N}_4/\text{Si}$ 基板中に作製し、このチップ中での膜形成と膜安定性の評価を試みた。その結果、膜寿命、耐電圧特性とともに従来の10倍程度の向上が観測され、これまで不可能であったイオンチャンネルを含んだ状態での溶液交換を可能にする、機械的強度の高い二分子膜を構築することに成功した。さらに、多数のチップの同時作製が容易という半導体微細加工の特徴を活かし、上述のチップを多数個並列に並べたイオンチャンネルアレイの構築を行った。プロトタイプとして9つの膜の同時形成を行った結果、各チップに対して60%以上の確率で脂質二分子膜を形成することができた。この脂質二分子膜アレイにモデルチャンネルのグラミシジンを含めた結果、グラミシジンチャンネル電流を複数チップから同時に測定することに成功した。一方で、これらの脂質二分子膜には、膜安定性は高いものの、二分子膜とチップの総電気容量が大きく、ノイズ電流や過渡応答が大きくなってしまいう問題もあることが判明した。そこで、作製したSiチップを SiO_2 熱酸化膜とテフロン層で被覆することにより総電気容量を下げ、ノイズ電流値を1-2 pA(ピーク電流幅)、過渡応答を1 ms以下にまで抑制した。さらに、このようにして構築した二分子膜系に、副作用評価の対象タンパク質であるhuman *ether-a-go-go-related gene* (hERG)チャンネルを抽出して包埋した結果、hERGチャンネルの単一チャンネル電流を記録することに成功した。観測されたhERGチャンネル電流は特異的阻害剤や、hERGへの副作用のために使用停止となった薬物によっても阻害され、生体膜中と同様の薬物反応性をSiチップ中で示した。今後は、上述のアレイにhERGチャンネルを包埋し、新薬候補化合物のためのhigh throughput副作用評価チップへと展開したい。

(2) 詳細

研究テーマ A「ナノ形状設計に基づく脂質二分子膜の安定化」

人工脂質二分子膜にイオンチャンネルを埋め込んだ再構成系は薬物スクリーニングや高感度センサーとしての可能性を秘めているが、イオンチャンネルの機能発現にとって必須の環境である脂質二分子膜は機械的強度が低く、その発展の障壁となってきた。近年、微細加工と脂質二分子膜を融合し、二分子膜の形成場となる小孔を微小化することにより膜の安定化を目指す試みについて多くの報告がなされたものの、膜強度の向上には至っていなかった。また、その多くは、チャンネルに影響を与える有機溶媒を大量に用いており、適用可能なチャンネルタンパク質の範囲には限界があった。一方、本研究では、小孔のサイズよりも微細孔のエッジと二分子膜との接合部の形状に着目した。すなわち、テーパの付いた滑らかなエッジを持つように微細孔を作製すれば、膜保持体と脂質二分子膜の接合部の歪みが減少し、膜安定性を向上できるのではないかと考え、図1のような滑らかなエッジを持つ微細孔をSi₃N₄/Si基板中に作製し(孔径 20-40 nm、厚さ 200-240 nm)、このチップ中での膜形成と膜安定性の評価を試みた。その結果、膜寿命、耐電圧特性ともに従来の10倍程度の向上が観測され、従来の膜系では困難であったイオンチャンネルを含んだ状態での溶液交換を可能にする、機械的強度の高い二分子膜を構築することに成功した(図2)。薬物スクリーニング系への応用を考える際には、ターゲットチャンネルの同定に必要な薬物と、候補薬物の2つの薬物を投与する必要があるため、溶液交換が必須となるが、チャンネルを膜中に含む状態での溶液交換は極めて困難であった。本研究の二分子膜系では、イオンチャンネルを含む二分子膜の溶液交換耐性は90%を超えており(95%、膜の数n=20)、微細孔のエッジ形状をナノレベルで形状設計することにより、薬物スクリーニング応用も可能な二分子膜強度を獲得することに成功した。

研究テーマ B「イオンチャンネルアレイへの展開」

イオンチャンネルを対象とする薬物スクリーニング法や副作用評価法においては、対象となる候補化合物の数が膨大になることから、1度の実験で多

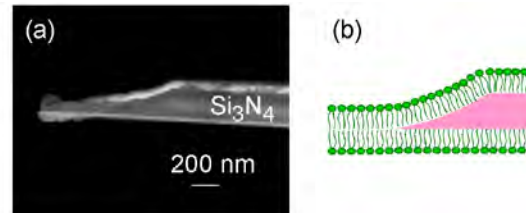


図1. 脂質二分子膜安定化へのアプローチ
(a) 微細孔縁部分の SEM 像, (b) 二分子膜-保持体接合部の模式図

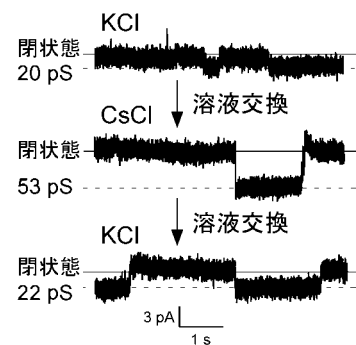


図2. グラムシジンチャンネル
電流と溶液交換耐性

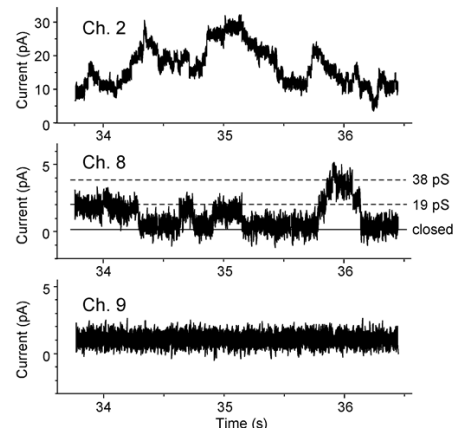


図3. 複数の膜からのチャンネル
電流測定例

サンプルを評価できるハイスループットな解析系が必要とされる。私は、多数のチップの同時作製が容易という半導体微細加工の特徴を活かし、A のチップを多数個並列に並べたイオンチャンネルアレイの構築を行った。プロトタイプとして9つの膜の同時形成を行った結果、各チップに対して 60%以上の確率で脂質二分子膜を形成することができた。この脂質二分子膜アレイにモデルチャンネルのグラミシジンを含ませた結果、グラミシジンチャンネル電流を複数チップから同時に測定することに成功した(図3)。

研究テーマ C「生体イオンチャンネルセンサへの展開」

A, Bで構築した脂質二分子膜は、膜安定性は高いが、二分子膜とチップの総電気容量が大きく、ノイズ電流および過渡応答が大きくなってしまいう問題もあることが判明した。そこで、作製したSiチップをSiO₂熱酸化膜とテフロン層で被覆することにより総電気容量を下げた結果、ノイズ電流値を1-2 pA(ピーク電流幅)(図4)、過渡応答を1 ms以下にまで抑制できた。次に、副作用評価の対象タンパク質である電位依存性のカリウムチャンネル、human *ether-a-go-go-related gene* (hERG)チャンネルを、その発現細胞から抽出し、この絶縁層被覆基板中の二分子膜に包埋した結果、図5のようにhERGチャンネルの単一チャンネル電流を記録することに成功した。観測された単一チャンネルコンダクタンスや内向き整流性は、パッチクランプ法で報告された値や整流性とよく一致していた。またhERGチャンネル電流は特異的阻害剤や、hERGへの副作用のために使用停止となった薬剤によっても阻害され、生体膜中と同様の薬物反応性をSiチップ中で再現することに成功した。このようなhERGチャンネルに対するブロッカーアッセイは、溶液交換の可能な膜系において初めて実現可能であり、強度の高い人工脂質二分子膜系の構築により達成することができた。今後は、Bの脂質二分子膜アレイにhERGチャンネルを包埋し、新薬候補化合物のためのハイスループットな副作用評価チップへと展開したい。

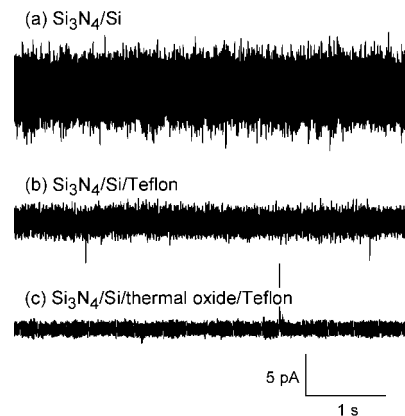


図4. 絶縁層被覆によるノイズ電流の抑制

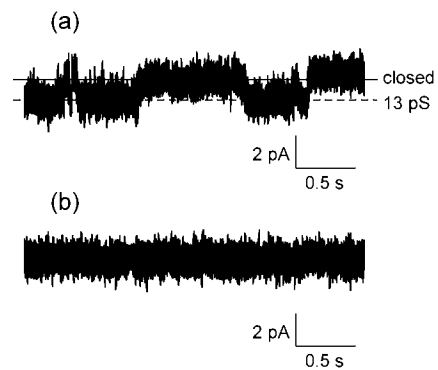


図5. hERG チャンネルの単一チャンネル電流
(a)コントロール, (b) 阻害剤の添加後

3. 今後の展開

現在の創薬におけるチャンネル電流の評価においては、生体膜中のチャンネル電流を記録するパッチクランプ法を high-throughput 化したオートパッチクランプが主流であるが、観測される電流が細胞の状態に依存することや、チップと細胞との間の高シール形成の歩留まりが低いことが課題となっている。本研究のイオンチャンネル包埋脂質二分子膜チップが構築されれば、ready to use な評価チップの出現であり、これにより副作用評価および薬物作用のスクリーニング効率が飛躍的に向上すると期待される。現状では、膜中へのチャンネル包埋確率は高くないが、包埋効率の向上については現在検討中であり、チャンネル包埋二分子膜チップが高効率に作製できるようになれば、創薬の現場に大きなブレークスルーをもたらす方法論となると期待される。

4. 自己評価

本さがけ研究では、人工脂質二分子膜の安定化とその膜中への hERG チャンネルの包埋に成功し、hERG チャンネルに基づく神経細胞膜センサーの構築に成功した。また、その展開としてのハイスループット薬物スクリーニングのためのイオンチャンネルアレイの構築については、アレイ実験系を構築するところまで進捗した。最終的な到達目標である生体イオンチャンネルアレイ(例えば hERG チャンネルアレイ)の構築には至らなかったが、その構築に必要な要素技術の開発は達成できたと考えている。一方で、安定化脂質二分子膜へのチャンネルの包埋という新たな課題も見出しており、この課題については今後も引き続き取り組み、薬物スクリーニングのためのイオンチャンネルアレイの実現を目指したい。

5. 研究総括の見解

半導体微細加工(トップダウンプロセス)と脂質分子の自己集合(ボトムアッププロセス)を融合して、人工神経細胞膜センサーを開発することが目的である。機械的脆弱性の問題を解決し、電位依存性チャンネルやレセプターチャンネルを埋め込んだイオンチャンネルアレイを作製し、薬物スクリーニングへと展開することを狙っている。そのため、①「ナノ形状設計に基づく脂質二分子膜の安定化」②「イオンチャンネルアレイへの展開」③「生体イオンチャンネルセンサーへの展開」という3つの課題を設定した。微細孔を $\text{Si}_3\text{N}_4/\text{Si}$ 中に作製し、このチップ中で膜形成すると、従来困難であったイオンチャンネルを含んだ状態で機械的強度の高い二分子膜を構築できた。さらに、チップを多数個並列に並べたイオンチャンネルアレイを構築し、この脂質二分子膜アレイにモデルチャンネルのグラミシジン包埋した結果、チャンネル電流を複数チップから同時に測定することに成功した。ナノ構造と人工神経細胞膜を融合したこのセンサデバイスは、神経細胞と集積回路の融合した立派な成果と評価でき、この手法をモデルとして今後、薬物スクリーニングのみならず、重要な次世代ナノバイオデバイスへ発展できるものと期待される。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. 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. <i>Langmuir</i> , 2010 , 26, No.3, 1949–1952.
2. Ayumi Hirano-Iwata, Tasuku Taira, Azusa Oshima, Yasuo Kimura, and Michio Niwano. Improved stability of free-standing lipid bilayers based on nanoporous alumina films. <i>Appl. Phys. Lett.</i> , 2010 , 96, Issue 21, 213706–1~3.
3. Keiichiro Nozawa, Azusa Oshima, Tomohiro Nasu, Atsushi Shoji, Ayumi Hirano-Iwata, Michio Niwano and Masao Sugawara. <i>In situ</i> modification of lipid-loaded MCM-41 channels with bovine serum albumin at a planar lipid bilayer for biosensing. <i>Sensors and Actuators B: Chemical</i> , 2011 , 160, Issue 1, 139–144.
4. 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. <i>Micro and Nanosystems</i> , 2012 , 4, No.1, 2–7.
5. Azusa Oshima, Ayumi Hirano-Iwata, Hideki Mozumi, Yutaka Ishinari, Yasuo Kimura, and Michio Niwano. Reconstitution of Human <i>Ether-a-go-go</i> -Related Gene Channels in Microfabricated Silicon Chips. <i>Anal. Chem.</i> , 85, Issue 9, 4363–4369 (2013).

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

・招待講演

1. ナノ構造を用いた自立型脂質二分子膜
平野愛弓, 大嶋 梓, 青戸孝至, 平良 祐, 木村康男, 庭野道夫
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
2. 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
平野愛弓
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
3. 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
平野愛弓
平成23年度化学系学協会東北大会, 仙台, 2011年9月17日
4. 半導体微細加工に基づくイオンチャンネルチップの開発
平野愛弓
第32回表面科学学術講演会, 仙台, 2012年11月20日
5. A Chip-Based Stable Lipid Bilayer for Recording Ion-Channel Activities



Ayumi Hirano-Iwata

Sendai Symposium on Analytical Sciences 2012, Sendai, November 9, 2012.

・総説・解説記事・著書

1. 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—
平野愛弓
化学と工業(支部発 話題欄), 63-3, 234-235 (2010).
2. Stable Lipid Bilayers Based on Micro- and Nano-Fabrication.
Ayumi Hirano-Iwata, Azusa Oshima, Tomohiro Nasu, Tasuku Taira, Yasuo Kimura, and Michio Niwano
Supramolecular Chemistry, 22, Nos. 7-8, 405-411 (2010).
3. ナノ・マイクロ加工に基づく人工細胞膜センサの研究
平野愛弓, 大嶋 梓, 木村康男, 庭野道夫
応用物理, 81 (2), 143-146 (2012).
4. Stable Lipid Bilayers Based on Micro- and Nano-Fabrication as a Platform for Recording Ion-Channel Activities.
Ayumi Hirano-Iwata, Azusa Oshima, Hideki Mozumi, Yasuo Kimura and Michio Niwano
Analytical Sciences, 28, No. 11, 1049-1057 (2012) .
5. Stable and Reproducible Bilayer Lipid Membranes Based on Silicon Microfabrication Techniques.
Ayumi Hirano-Iwata, Azusa Oshima, Yasuo Kimura, Michio Niwano
Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes, Vol.11, Eds. H. T. Tien and A. Ottova, Elsevier, pp. 71-86 (2010).