トピックス
新進気鋭
シリーズマイクロ技術による人工脂質膜の再構築と
機能計測

鈴木宏明 大阪大学大学院情報科学研究科

1. はじめに

細胞膜の構造や機能を人工的に再構成する試みは、1960年代のリポソームの発見から1970年代の脂質平面膜を用いたイオンチャネル研究を経て、以後さまざまな方法論が確立されてきた。モデル生体膜で実験をする利点として、生細胞では存在しえない条件を設定可能で、目的の特徴を純粹に再現・抽出して調べられるということがあげられる。脂質2重膜は、脂質分子が水中で自己組織化して再構成されるが、精密な制御機構が存在しないため、通常は大きさや形状に大きな多様性が生じる。したがって、人工脂質膜を用いて精密な定量機能計測を行う際に、それらをいかに「再現性よく」構築できるか、という点は非常にクリティカルである。

フォトリソグラフィを基本とする微細加工技術により、マイクロメートルサイズの構造や金属配線などを任意のデザインに加工できる。細胞や細胞組織の大きさと同程度の構造ができるため、前述の分子自己組織化過程において精密な物理的環境を提供することにより、比較的均一な脂質膜構造が得られる。以下、微細加工技術を利用した人工脂質平面膜の再構成技術に関する筆者らの取組みを紹介する^{1), 2)}。

2. 平面脂質膜の高効率再構成法および電気生理計測

イオンチャネルを脂質平面膜に再構成し、生理的機能を計測する方法は1970年代に確立された。平面膜は、容易に膜の両側へ電極を配置できるため、電気生理計測に適している。この方法により、アセチルコリン受容体や K^+ チャネルなど、さまざまなチャネルの機能が研究された。これらの報告では、先端を尖らせた棒をテフロン膜に押し付け反対側の膨らみを剃刀で削り取って作製した直径50-150 μm 程度の微小穴に、バッファ浴中で脂質分子を溶解させた有機溶媒（脂質溶液）を塗布して脂質平面膜を形成していた（刷毛塗り法）。しかし、脂質膜は厚さが5-10 nm程度で非常

に壊れやすく、再現性の面で問題があった。微細加工技術で形成した直径数十マイクロメートル以下の精密な微細孔に脂質平面膜を形成する研究は2000年前後からはじまった³⁾。膜面積をより小さくすれば、機械的安定性が増し、かつ電気的膜容量によるノイズも低減できる⁴⁾。それでもなお、平面膜形成は前述の刷毛塗り法やLangmuir-Blodgett法を踏襲しており、再現性の大幅な向上は報告されていなかった。

筆者らは、2003年から微細加工孔とマイクロ流路システムを組み合わせた脂質平面膜の形成に関する研究を開始し⁵⁾、ハイスループット化に向けた技術開発に取り組んだ。システムの模式図および平面膜形成手順を図1aに示す。この方法の特徴は、マイクロ流路を通して脂質溶液やバッファを微細孔部分に送液することにより、分配される溶液量が均一化されることである。脂質溶液分配後に薄膜化が自発的に進行するが⁶⁾、脂質層の初期厚さが薄いほど薄膜化が迅速に進む。これを実現するためには、より膜厚の薄い絶縁材料に微細孔を加工し、かつマイクロ流路構造を集積化

図 1

(a) マイクロ流路を利用した平面脂質2重膜形成法。まず、上側のチャンバをバッファで満たす。次に、脂質溶液およびバッファを順番に下側流路に流す。微細孔が脂質溶液で覆われるが、孔の形状が均一であるため、脂質溶液の分配量が一定となる。薄膜化が進むと、平面脂質膜が形成される。(b) パリレンシートに形成した直径30 μm の微細孔。(c) アラメチンチャネルの1分子計測⁷⁾。(本図は、冊子体ではモノクロ、電子ジャーナル <http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/> ではカラーで掲載)

Reconstruction and Functional Measurement of Artificial Lipid Membranes using Micro-Technologies

Hiroaki SUZUKI

Graduate School of Information Science and Technology, Osaka University

する必要があった。筆者らは、パリレン (poly-para-xylylene) という高分子材料に微細孔構造をドライエッチング加工し、直径 20-30 μm 、深さ 10 μm 程度の貫通孔構造を実現した⁷⁾。最新の成果では、このポリマーシートを光造形樹脂で挟み込むハイブリッド光造形法により、96 ウェルフォーマットの脂質 2 重膜チップを試作・テストしたところ、44 個の計測ウェルでモデルイオンチャネルの 1 分子レベルの開閉を確認できた⁸⁾。これは、脂質平面膜を用いた膜タンパク質関連薬剤ハイスループットスクリーニングシステムの実現へ向けて、大きな一歩であると考えている。

3. 平面脂質膜を用いた膜輸送計測への取り組み

イオンチャネルの他にも、細胞膜には多様な分子 (生体高分子や薬剤など) を選択輸送する膜タンパク質があり、これらの機能を精密に計測するための汎用的技術が求められる。筆者らは、このような膜輸送計測プラットフォームとして、図 2 に示す平面脂質膜マイクロチャンバシステムを提案している⁹⁾。井出ら⁶⁾と同様の手法で形成した脂質 2 重膜 (直径 100-200 μm) を、基板上に形成したマイクロチャンバアレイ (直径 5-10 μm) に押し付けることにより、脂質膜で蓋をされた微小空間を形成する。たとえば膜タンパク質が基質分子を輸送し、チャンバ内に蓄積する

と、蛍光により検出できるという仕組みである。筆者らは、脂質膜の押し付けにより蛍光ビーズがチャンバ内に封入され蓋を形成できていること、また、エバネッセント励起光によってチャンバの内部のみを励起できることを示した。今後、分子膜輸送の高感度計測を実現するためには、輸送膜タンパク質の平面脂質膜への再構成法や、押し付けた膜の安定性、またチャンバからの基質分子の漏れだしの評価など多くの課題を解決する必要がある。

4. おわりに

分子の自己組織化による脂質 2 重膜の再構成過程を、再現性よくかつ自在に制御する技術は、生体膜に関連した基礎科学やバイオテクノロジーが発展するために必要不可欠である。これまでに、さまざまな方法論や Proof-of-Concept の報告 (われわれの研究も例に漏れないが) がなされている一方で、簡便な人工脂質膜制御技術が浸透していない。今後、汎用的なモデル生体膜プラットフォーム技術が発展し、また筆者らの研究がその一助となることを願っている。

謝 辞

本研究は、筆者が東京大学生産技術研究所に在籍時、竹内昌治博士、野地博行博士および B. Le Pioufle 博士との共同研究により行った。また、大阪大学の井出徹博士に脂質 2 重膜形成および電気生理計測法を教わった。謹んで感謝いたします。

文 献

- 1) 竹内昌治 (2007) 蛋白質 核酸 酵素 **52**, 323-328.
- 2) Suzuki, H. and Takeuchi, S. (2008) *Anal. Bioanal. Chem.* **391**, 2695-2702.
- 3) Schmidt, C. et al. (2000) *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**, 3137-3140.
- 4) Mayer, M. et al. (2003) *Biophys. J.* **85**, 2684-2695.
- 5) Suzuki, H. et al. (2004) *Lab Chip* **4**, 502-505.
- 6) 井出 徹ら (2005) 生物物理 **45**, 157-160.
- 7) Pioufle, B. L. et al. (2008) *Anal. Chem.* **80**, 328-332.
- 8) Suzuki, H. et al. (2008) *Biomed. Microdev.* **Online first**.
- 9) Suzuki, H. et al. (2006) *Proc. MEMS'06*, Istanbul, Turkey, pp. 482-485.

図 2

(a) 分子膜輸送計測のための平面脂質膜マイクロチャンバシステムの模式図。平面膜を通過して輸送された基質分子は反対側のマイクロチャンバ中に蓄積し、検出される。(b) マイクロチャンバに脂質 2 重膜を押し付けた際の透過顕微鏡写真。(c) 直径 200 nm の蛍光ビーズをマイクロチャンバ中に閉じ込めた。ビーズはチャンバ中に留まってブラウン運動をするため、脂質膜により蓋が形成されていることが確認できる。(本図は、冊子体ではモノクロ、電子ジャーナル <http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/> ではカラーで掲載)

鈴木宏明

鈴木宏明 (すずき ひろあき)

大阪大学大学院情報科学研究科准教授
2003 年東京大学大学院工学系研究科機械工学専攻博士課程修了。博士 (工学) 03-07 年東京大学生産技術研究所助手 (助教)。07 年より現職。
研究内容: マイクロ流体システム, バイオ MEMS, 脂質膜

連絡先: 〒 565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1

E-mail: suzuki@ist.osaka-u.ac.jp

URL: <http://www-symbio.ist.osaka-u.ac.jp/sbj.html>