マイクロ流体デバイスによる脂質 2 重膜の形成

竹 内 昌 治

東京大学生産技術研究所 ☎ 153-8505 東京都目黒区駒場 4-6-1

(2008 年 4 月 14 日受理)

Formation of Bilayer Lipid Membranes with Microfluidic Devices

Shoji TAKEUCHI

Institute of Industrial Science, The University of Tokyo
4-6-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8505

(Received April 14, 2008)

Membrane proteins play very important roles in cells. They are also useful in various industrial fields, including drug discovery, and highly sensitive ion-channel-based biosensors. Here, I describe our two approaches toward membrane protein chips: an array of membrane proteins on (1) planar lipid bilayers and (2) giant vesicles. First, a highly reproducible method was developed for planar lipid bilayer reconstitution. Planar lipid bilayers are formed at apertures by flowing lipid organic solution and buffer alternately into an integrated microfluidic channel. Using this technique, multiple lipid bilayers are formed simultaneously, and channel currents through peptide ion channels were recorded. Second, I describe a method for the preparation of lipid vesicles inspired by forming soap bubbles from a soap film. In our “blowing” method, lipid vesicles are blown out of the pre-formed bio-functional planar lipid membrane, directly encapsulating ejected materials. We believe that these devices are useful for an efficient and rapid analysis of single-species-specific membrane proteins.

KEYWORDS : membrane protein chip, blowing method, contact method, microfluidic devices, dynamic micro array

1. は じ め に

膜タンパク質は、細胞膜に存在し、細胞の内外の物質輸送や排出に重要な役割を果たしている。創薬の重要なターゲットであり、たとえば、G タンパク質レセプター (GPCR) に関わる薬の市場規模は年間数百億ドルに上る¹⁾。その他、イオンチャンネルやトランスポーターなど、各種の膜タンパク質の機能や特性を一つ一つ解明することが、基礎研究のみならず、次世代の治療、創薬産業における重要な課題である。また、膜タンパク質は、一分子レベルで物質を検出できるため、味や匂いなどのセンサとして、従来の酸化半導体に比べ、格段に優れたセンサが実現できると期待されている^{2,3)}。

これまでの機能解析法は、細胞を利用したパッチクランプ法やイメージング法が一般的であるが、培養細胞

は、培養中の汚染対策や個体差の均一化処理などの課題がある。また、雑多なタンパク質による影響があり、一種類の分子に限定した議論は難しかった。これに対して注目されているのが「人工平面膜法」である^{4,5)}。脂質 2 重膜を人工的に再構成した後に一種類の精製された膜タンパク質を導入することで、その膜タンパク質の特性を低ノイズで解析できる。理想的な方法であるが、これまで基盤となる脂質膜の形成には、熟練した経験と知識が必要であり、再現性、安定性は低かった。

そこで、我々は微小流体のハンドリングが得意なマイクロ流体デバイス技術を利用して、小型チップ上で効率良く、安定して脂質膜を再構成できる計測プラットフォームの実現を目指している。マイクロ流体デバイス技術は、90 年代からマイクロマシン技術 (MEMS: Micro Electro Mechanical Systems) とともに急速に発展してきた。MEMS は、主に半導体の電気回路を作る技術を応用して微細なセンサやアクチュエータを作る技術であっ

たが、この技術を利用して微細な孔や流路、容器などを形成し、一分子や一細胞レベルでのバイオ実験や分析化学実験への応用を目指したのがマイクロ流体デバイスである⁶⁾。脂質2重膜の形成に利用した場合、小さい孔は膜の安定に有利である。また、流路によって、異なる種類の物質を選択的に膜に導入できるため、高速スクリーニングも可能になる。我々は、これらの特徴をいかし、これまでに様々な膜形成法を提案してきた。また、平面膜だけでなく、リポソームなどの球状の膜も作製し、これらを効率的にアレイ化する研究も行ってきた。ここでは、それらの成果を紹介する。

2. 「接触法」による脂質2重平面膜の形成と多チャンネル同時イオンチャンネル電流計測

脂質2重平面膜の形成法の歴史は長い。テフロンシートに100ミクロン程度の孔を針で開け、そこに膜を形成する「はけ塗り法」などは一般的であり、これによって多くの生物学的な知見を得ることができた^{4,5,7)}。その一方で、膜形成法は熟練したノウハウによるものが多く、自動化が困難であったことから、多チャンネルで高速に機能解析を行う工学研究は進んでこなかった。最近になって、マイクロ加工を利用したアプローチが各地で試みられているが^{8~11)}、どれもが、単一膜形成にとどまり、多チャンネルの膜形成が実現可能な安定性と再現性、簡便性をもつ方法にはいたっていない。

そこで、我々は、微小溶液の操作や並列化が得意なマイクロ流体デバイス技術を利用した多チャンネル同時膜

形成法を検討している。一例として、水と油（有機溶媒）の界面にできる脂質の単分子膜を接触させて2分子膜を形成する「接触法」を紹介する¹²⁾。この方法の概要を、Fig. 1に示した。まず、有機溶媒中に脂質を分散させる。そこに水滴を導入する。脂質は、親水基と疎水基からなるため、水と有機溶媒との界面には脂質の単分子膜が形成される（Fig. 1A）。こうした水滴を二つ用意し、双方をマイクロ流体デバイス内で動かし接触させることで、脂質2重膜を再構成できる（Fig. 1B）。Fig. 1Cは、交差する二つのマイクロ流路の上下方向に脂質を含む有機溶媒、左右の流路に水溶液を導入した実験の様子である。シリンジポンプを利用して水溶液を中心部に押し出すことによって、左右の水溶液が接触し2重膜ができる。接触した面が2重膜であることは、膜容量や、後に述べるイオンチャンネル電流の計測などによって確認された。

この方法は、膜形成の再現性も良いため、多チャンネルの膜形成も可能になってきた¹³⁾。複数同時に膜形成が行えれば、そこに複数種の膜タンパク質を導入し、同時に多くの機能解析を行うことができる。膜タンパク質の機能計測のうち、イオンチャンネル電流計測は比較的簡単に行うことができる。実際、接触法により形成した膜に、チャンネル性の膜タンパク質などを導入し、膜の両端にかかる電圧を固定した条件でのイオンチャンネル電流の計測に成功した¹⁴⁾。実験では、膜タンパク質の中でも、比較的分子量が小さく、扱いの容易なチャンネルタンパク（グラミシジンAや α -ヘモリシンなどのペプチドやタンパク質）を利用した。これらは、多量体化によ

Fig. 1. (color online). (A, B) Formation of a lipid bilayer with the contact method. (C) Photos of the bilayer formation through this method.

Fig. 2. (color online). (a, b) A schematic view of the membrane chip and (c, d) the photos of the chip. The lipid bilayers are reconstituted on the array of holes.

Fig. 3. The measurement results of ion channel recording with the microchip shown in Fig. 2. (a) The recording results from two kinds of peptides. (b) The simultaneous, three-channel recording of gramicidin A.

リナノポアを形成し、チャンネル電流を発生させる。実際の膜タンパク質の再構成は、一般的に膜融合法が用いられる⁴⁾。これは、膜画分やリポソーム中に精製した膜タンパク質を平面膜上にばら撒くことによって融合をさせる方法である。この融合により、スパイク状のチャンネル電流を計測できることがわかってきた。また、これらの方法を利用して Fig. 2 のような多チャンネル膜形成用のデバイスを製作し、実際に各部に再構成した膜から、Fig. 3 のようにペプチドなどのイオンチャンネル電流を複数同時に計測できるようになってきた¹⁵⁾。

3. 均一直径リポソーム膜作成のための「シャボン玉法」とアレイ化のためのダイナミックマイクロアレイ技術

上に述べた平面膜法に加え、球状の膜（リポソーム膜）も膜タンパク質の機能解析の有効なプラットフォームとなる。リポソーム膜は、一般に平面膜よりも安定に存在するため、長期間の膜タンパク質計測に適している。また、リポソームのように脂質2重膜で閉じられた空間を作れば、膜を介して取り込まれた物質の濃度変化

を解析することで、単位時間当たりの膜タンパク質の物質輸送効率を調べることができる。したがって、イオンチャンネル電流計測が不可能な、トランスポーターなどの機能解析のプラットフォームとしての利用が期待されている。

リポソーム膜の調整法も歴史が古く、水和法やエレクトロフォーメーション法などが有名である¹⁶⁾。しかし、これらの従来方法は手作業によるものが多く、形成されたりリポソームの大きさは多様であった。膜を介した輸送をリポソーム内部の物質濃度変化で調べる場合、大きさの異なるリポソームを用いるとばらつきの大きな結果になってしまう。大きさをそろえるために、何度もフィルタを利用する方法などがあるが、手間がかかり、結果も芳しくない。そこで我々は、体積の揃った（直径の揃った）リポソームを効率的に作製する方法に取り組んでいる¹⁷⁾。以下に例として、上で紹介した接触法で形成した脂質2重膜にジェット流を当て、膜を球状に変形させる方法（シャボン玉法）を紹介する¹⁸⁾。

接触法では、大きな水滴を用いると、数ミリ程度の大きさまで膜を形成することができる。このシャボン玉法では、まず先端直径を約 60 ミクロン程度に加工した微小ガラス管を近づける。ガラス管は、電磁弁を介して圧縮空気ポンプに接続されている。ガラス管の先端から数センチの部分は、ベシクルに内包したい水溶液を満たしておく。膜の近くで一気に電磁弁を数 msec の幅で開くと、ポンプの圧力により水溶液が押し出されジェット流が発生する。この流れによって、膜が変形し、ちょうどシャボン玉ができるように球状の膜を作成することに成功した (Fig. 4)。また、電磁弁の開閉幅、ノズルと平面膜との距離、および、ジェット圧などを制御することによって、直径を揃えることができるようになってきた (Fig. 5)。

これらの方法で、所望の物質が内包された均一直径のベシクルが形成できるようになれば、次の段階として、マイクロアレイ化し、ベシクルを介した輸送や、内部でのタンパク質発現機構の解析などを高速で行うハイスループットスクリーニングへの展開が期待できる。たとえば、まずランダムに配列を調製した DNA をベシクルに内包し、そこから膜タンパク質を発現させる。それらのベシクルをアレイ状に配置し、薬剤を導入する。その結果、いくつかのベシクルの薬剤輸送が観察された場合、膜には、特異的なトランスポーターが発現している可能性が高い。そこで、そのベシクルを実験後に取り出し、発現しているタンパク質や内包されていた DNA の配列を明らかにすることで、どのようなタンパク質が輸送に関わっていたのか知ることができる。このような実

Fig. 4. (color online). (a) A schematic view of the “blowing vesicles” method. The vesicles are formed by applying a jet flow to the planar lipid bilayer. (b) The high speed images of the formation of the vesicles.

Fig. 5. The “blowing vesicles” method were performed (a) with and (b) without satellite vesicles.

験を可能にするマイクロアレイとして、Fig. 6のようなデバイスを考案した¹⁹⁾。Fig. 6ABのように直線の流路とそれを迂回するような流路が交差したマイクロ流路を設計し、それぞれの流路抵抗を調整することで、対象物を効率的に捕捉できる。すなわち、Fig. 6AのPath1の流路抵抗よりもPath2のほうが大きく設計しているため、最初に粒子は、Path1を通るが、途中で狭窄しているため、トラップされる。Path1に粒子がトラップされると、抵抗はPath2の方が下がり、後続の粒子は、Path2を通過する。さらに、Fig. 6Bのようにトラップされている位置に、金属薄膜をパターンしておけば、この薄膜に光ピンセットのレーザを照射することによって泡を発生させ、対象物を押し出すことができる。流れが緩やかな場合は、光ピンセットで直接粒子を捕獲し、Path2の流れに押し出すことも可能である。こうして押し出された粒子は、下流で捕獲できる。これまでのマイクロアレイは、観察スポットが固定化されたものが一般的であったが、このアレイは、実験中にスポットの位置を変化できるため、「ダイナミックマイクロアレイ」と名づけた。

Fig. 6. (color online). The principle of (A) trapping and (B) releasing the microbeads. (C) the sequential photos of releasing the beads. (D, E) The photos of 10000 microbeads array and its close-up view.

実際、この流路を利用して、これまでに、1万個レベルのビーズや細胞を高速でアレイ化し、生化学実験後に、アレイの中から一つだけビーズを回収できるようになってきた (Fig. 6C, D, E)。これらのアレイ化技術と均一直径リボソーム形成技術を融合させることで、高速に膜タンパク質の機能解析ができるデバイスの実現を目指している。

4. おわりに

人工膜研究の歴史は古く、20世紀初頭のLangmuirの時代から固体表面に脂質2重膜を形成する様々な方法が提案されている。人工再構成膜は、細胞を利用する系に比べ、余分な成分が一切混入しないピュアな系で膜タンパク質の機能解析ができる理想的な方法である。しかし、これまでの膜形成は、熟練したノウハウに頼っており、脂質平面膜の再現性や安定性が経験任せで、ハイスループット解析には程遠い実験系であった。このような問題を解決する取り組みとして、ここではマイクロ流体デバイス技術を利用した研究例を紹介した。「接触法」は、MEMSに適した膜形成法であり、安定性、再現性とも容易に向上できるため、今では広く使われるようになってきた^{20,21)}。また「シャボン玉法」は均一直径のベシクルが再現性良く作製可能であるため、人工細胞やドラッグデリバリー研究の強力なツールになりうる。さらに、「ダイナミックマイクロアレイ」は膜アレイのみならず、細胞やタンパク質の吸着したマイクロビーズなど

を利用した生化学実験に広く応用が可能である。

ここで紹介した例は、昨今発展しているマイクロ流体デバイス技術の一例に過ぎない。続々と提案されているこのような最新の工学技術を有効に利用し、これまで難しかった実験を可能とすることで、新たな知見が次々に得られることを期待している。

謝 辞

本稿で紹介した研究は、当研究室に所属していたメンバー、特に鈴木宏明、富名腰敬、陳偉雄、Bruno Lepioufle の各氏の絶え間ない努力の成果である。また、脂質2重平面膜の形成法に関しては大阪大学の野地博行教授および井出徹特任准教授から貴重なご指導・ご助言をいただいた。ここに深く感謝申し上げる。

文 献

- 1) W.J. Thomsen et al.: Developing functional GPCR screens, *Current Drug Discovery* (2004) pp. 13-18.
- 2) H. Bayley and P.S. Cremer: *Nature* **413**, 226 (2001).
- 3) R. Robelek, E. Lemker, B. Wiltschi, V. Kirste, R. Naumann, D. Oesterheld and E. Sinner: *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 605 (2006).
- 4) 岡田泰伸編: “新パッチクランプ実験技術法” (吉岡書店, 2001).
- 5) C. Miller: “Ionchannel Reconstitution” (Plenum Press, 1986).
- 6) *Nature*, **442**: 367-418, 2006 (Nature Insight).
- 7) T. Ide and T. Ichikawa: *Biosens. Bioelectron.* **21**, 672 (2005).
- 8) N. Fertig, R.H. Blick and J.C. Behrends: *Biophys. J.* **82**, 3056 (2002).
- 9) M. Mayer, J.K. Kriebel, M.T. Tosteson and G.M. Whitesides: *Biophys. J.* **85**, 2684 (2003).
- 10) R. Pantoja, D. Sigg, R. Blunck, F. Bezanilla and J.R. Heath: *Biophys. J.* **81**, 2394 (2001).
- 11) C. Schmidt et al.: *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**, 3137 (2000).
- 12) F. Suzuki and S. Takeuchi: *Anal. Chem.* **78**, 8169 (2006).
- 13) H. Suzuki, K.V. Tabata, H. Noji and S. Takeuchi: *Biosens. Bioelectron.* **22**, 1111 (2007).
- 14) H. Suzuki, K.V. Tabata, H. Noji and S. Takeuchi: *Langmuir* **22**, 1937 (2006).
- 15) B. Le Pioufle, H. Suzuki, K. Tabata, H. Noji and S. Takeuchi: *Anal. Chem.* **80**, 328 (2008).
- 16) 秋吉一成, 辻井 薫: “リポソーム応用の新展開” (NTS, 2005).
- 17) K. Kuribayashi, B. le Pioufle and S. Takeuchi: *Proc. microTAS2006* (2006) pp. 1534-1536.
- 18) K. Funakoshi, H. Suzuki and S. Takeuchi: *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 12608 (2007).
- 19) W-H. Tan and S. Takeuchi: *Proc. Nat. Acad. Sci.* **104**, 1146 (2007).
- 20) M.A. Holden, D. Needham and H. Bayley: *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 8650 (2007).
- 21) J.R. Thompson, A.J. Heron, Y. Santoso and M.I. Wallace: *Nano Lett.* **7**, 3875 (2007).