

膜輸送体のための先端計測技術の開発

東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻
渡邊 力也

1. はじめに

現在、マイクロチップを利用したバイオ計測は、従来の生化学計測の感度や効率を大幅に高めるだけでなく、digital PCR、次世代DNAシーケンサーに代表される革新的な先端計測技術へと発展している。従来、マイクロチップによる生化学計測は、取り扱いのしやすさから、主として水溶性生体分子を標的としてきたが、生理的および薬理的な重要性を考えると、膜タンパク質に代表される脂溶性生体分子への汎用性の拡張は必要不可欠であると考えられている。近年、私たちは、マイクロチップの汎用性を拡張すべく、膜タンパク質の一種である膜輸送体のターゲットとしたマイクロチップ(生体膜マイクロチップ)を新規開発し、従来法と比較して、膜輸送体の活性計測感度を約100万倍向上させることに成功した[1,2,3,4]。本研究では、生体膜マイクロチップの汎用性を更に拡張すべく、微小電極[5]および膜透過検出機構[6]を実装したマイクロチップを新規開発したので報告する。

2. 方法

• 微小電極を実装したマイクロチップ(eI-ALBiC)の作成

真空蒸着装置を利用してガラス基板表面に金とフッ素樹脂の2層構造の薄膜(各膜厚:500 nm)を形成し、フォトリソグラフィにより薄膜を貫通する形で微小試験管(容積:4 fL)の並列アレイを造形する(図1a)。そして、1)水溶液、2)脂質溶液、3)水溶液の順番で溶液を順次導入することで、各試験管の開口部に脂質2重膜を形成する(図1b)。ガラス表面に形成した金の薄膜は、膜電位を制御するための微小電極として利用する。

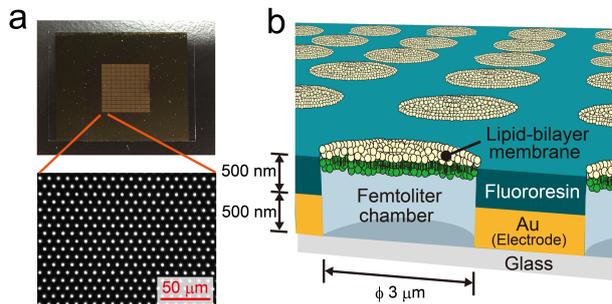


図1 微小電極を実装したマイクロチップ
(a) eI-ALBiCの写真、(b) eI-ALBiCの模式図

• 膜透過検出機構を実装したマイクロチップ(di-ALBiC)の作成

分子が生体膜を透過する様子を高感度に検出するため、生体膜の両側に微小試験管を配置したマイクロチップを作成した。具体的には、ガラス基板表面にフッ素樹脂の薄膜(膜厚:500 nm)を形成し、薄膜を貫通する形で微小試験管の並列アレイを造形する。そして、水溶液と脂質溶液を順次導入することで、各試験管の開口部に脂質1重膜を形成する(図2)。

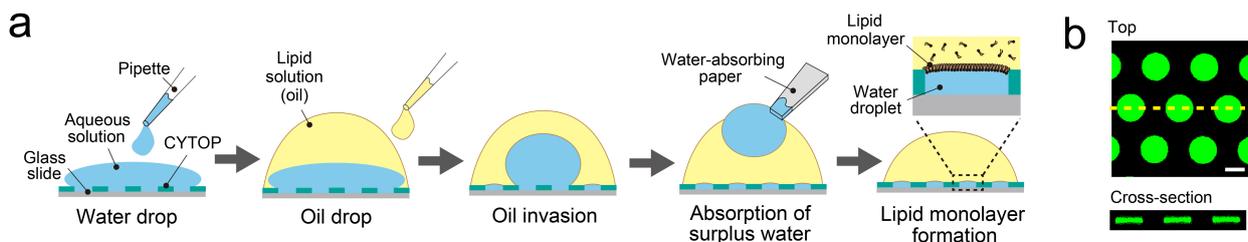


図2 マイクロチップ上での脂質1重層の形成

(a) 脂質1重層の形成方法: i) 微小試験管を水溶液で充填, ii) 脂質溶液を滴下, iii) 余分な水溶液を除去
(b) マイクロチップの共焦点画像: 微小試験管の開口部に対して水平に脂質1重層が形成される

上述の手法で形成された、脂質1重膜で覆われた微小試験管の並列アレイを2つ用意し、それらの表面が向かいあう形で密着させる(図3a)。すると、脂質1重膜同士が張り合わされることで脂質2重膜(生体膜)が形成し、生

体膜の両側に微小試験管が配置されることとなる(図3b)。

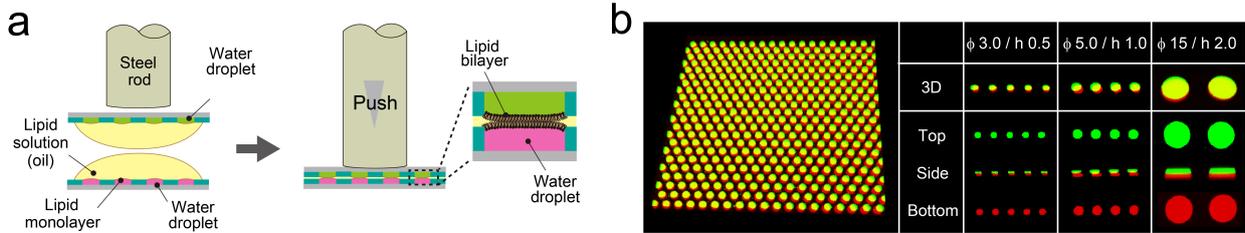


図3 マイクロチップ上での液滴界面脂質2重膜(di-ALBiC)の形成

(a) 脂質2重膜の形成方法：脂質1重層が形成されたマイクロチップを表面が向きあう形で密着させる
 (b) マイクロチップの共焦点画像：生体膜の両側に微小試験管(赤or緑)が配置されている

3. 結果

• el-ALBiCを利用した膜輸送体の高感度機能解析

el-ALBiCによる膜電位の制御仕様を調べるため、蛍光性の膜電位指示薬(DiBAC₄)を利用して、微小電極から出力される電圧と蛍光強度の相関関係を調べた(図4a)。微小電極を用いて正弦波電圧を出力したところ、電圧波形に応じて膜電位指示薬の蛍光強度が変化することから、微小電極により膜電位が定量的に制御できていることが判明した(図4b)。

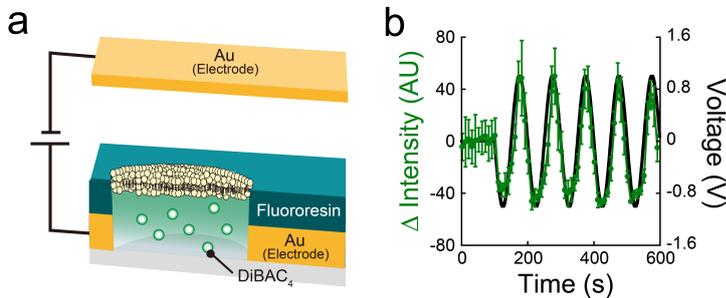


図4 el-ALBiCによる膜電位の制御

(a) 膜電位の制御計測系
 (b) 微小電極からの電圧出力と蛍光指示薬の蛍光強度変化

el-ALBiCを利用して、膜電位による膜輸送体の物質輸送活性を計測した。具体的には、el-ALBiC上の脂質膜に膜輸送体であるF型ATP合成酵素(F₀F₁)を再構成し、微小反応容器に蛍光性のpH指示薬(Fluorescein)を内包する(図5a,b)。F₀F₁は膜電位を駆動力としプロトンを輸送する膜輸送体であり、膜電位の印加によりプロトンは微小試験管の内部から外部へ輸送され、試験管内部のプロトン濃度は劇的に減少する。そのため、F₀F₁のプロトン輸送活性を微小試験管に内包したFluoresceinの蛍光強度変化として検出することができる。実際に膜電位を印加したところFluoresceinの蛍光強度が増加したことから、試験管内部のプロトン濃度が減少し、すなわち、F₀F₁によってプロトンが試験管外部へと輸送されたことが判明した(図5c,d)。よって、el-ALBiCが、膜電位によって駆動される膜輸送体の活性計測に利用できることが示された。

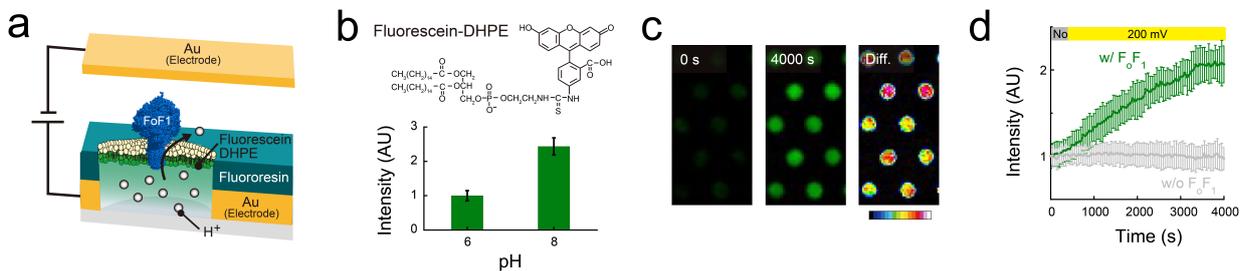


図5 el-ALBiCによる膜輸送体の物質輸送活性計測

(a) 膜電位による物質輸送活性計測の模式図, (b) Fluoresceinの蛍光強度とpHの関係
 (c) 膜電位印加後のFluoresceinの蛍光画像, (d) 膜電位印加後のFluoresceinの蛍光強度変化

• di-ALBiCを利用した生体膜透過性の高感度解析

低分子化合物の生体膜透過性を調べるため、蛍光性の低分子化合物であるFluorescein(緑色蛍光色素)とAlexa647(赤色蛍光色素)を上部、下部の微小試験管に個別に内包し、共焦点顕微鏡を利用して、各蛍光色素の局在の経時変化を計測した(図6)。

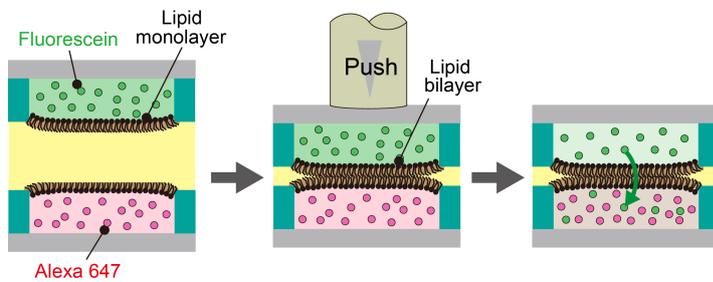


図6 di-ALBiCによる膜透過計測
上部試験管にはFluorescein
下部試験管にはAlexa647

時間の経過と共に、下部の微小試験管内のFluorescein(緑色)の蛍光強度が特異的に上昇した(図7a)。これは、生体膜透過性の高いFluoresceinが生体膜を透過し下部の微小試験管に流入したことを意味し、一方、生体膜透過性の低いAlexa647は、膜を透過することなく、下部の微小試験管内に滞留したことを意味する。また、Fluoresceinの経時変化から生体膜透過係数を求めたところ、 $2.0 \times 10^{-8} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ となった(図7b)。これは、人工生体膜では最も小さな値であり、また、細胞膜とほぼ同等の大きさであることから、低分子化合物の生体膜透過性をin vitroで検証する上で最適なプラットフォームであることが示された。

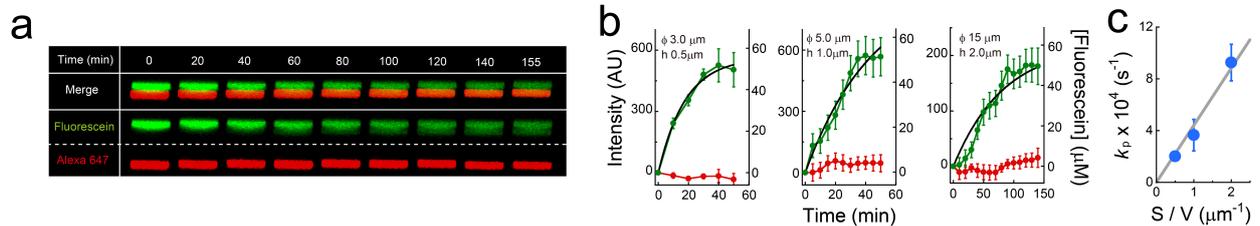


図7 di-ALBiCによる低分子化合物の生体膜透過計測
(a) FluoresceinおよびAlexa647の共焦点蛍光画像, (b) FluoresceinおよびAlexa647の蛍光強度変化
(c) Fluoresceinの生体膜透過速度

4. 考察

本研究では、微小電極および膜透過検出機構を実装したマイクロチップを新規開発し、生体膜マイクロチップの汎用性の拡張に成功した。微小電極を実装した生体膜マイクロチップ(el-ALBiC)に関しては、従来の生体膜マイクロチップでは計測が困難であった、膜電位駆動型の膜輸送体の高感度活性計測が実現され、それらの作動機構の解明への道筋が拓かれた。また、膜透過検出機構を実装した生体膜マイクロチップ(di-ALBiC)に関しては、細胞環境に近い状態で、低分子化合物の生体膜透過性をin vitroで解析できるようになった。薬物の生体膜透過性は創薬において重要な指標であるため、di-ALBiCの集積化された微小試験管を並列に利用することができれば、創薬への貢献が強く期待される。

今後の課題としては、技術の汎用性を更に高めるため、ロボティクス技術やAIなどと組み合わせることにより、計測の自動化および最適化が必要不可欠であると考えている。また、創薬への応用のため、創薬標的を利用した物質輸送解析などにも挑戦したいと考えている。

5. 参考文献および発表論文

- 参考文献

- [1] *Watanabe, R., Soga, N., Fujita, D., Tabata, K. V., Yamauchi, L., Kim, SH., Asanuma, D., Kamiya, M., Urano, Y., *Suga, H., & *Noji, H. "Arrayed lipid bilayer chambers allow single-molecule analysis of membrane transporter activity" *Nature Communications* (2014b) 5, 4519
- [2] *Watanabe, R., Soga, N., Yamanaka, T., & *Noji, H. "High-throughput formation of lipid bilayer membrane arrays with an asymmetric lipid composition" *Scientific Reports* (2014) 4, 7076
- [3] Soga, N., *Watanabe, R., & *Noji, H. "Attolitre-sized lipid bilayer chamber array for rapid detection of single transporters" *Scientific Reports* (2015) 5, 11025

- 発表論文

- [4] *Watanabe, R., Soga, N., Ohdate, S., & *Noji, H. "Single molecule analysis of membrane transporter activity by using a microsystem" *Methods in Molecular Biology* (in press)
- [5] *Watanabe, R., Soga, N., Hara, M., & *Noji, H. "Arrayed water-in-oil droplet bilayers for membrane transport analysis" *Lab on a Chip* (2016) 16, 3043-3048
- [6] *Watanabe, R., Soga, N., & *Noji, H. "Novel nano-device to measure voltage-driven membrane transporter activity" *IEEE Transactions on Nanotechnology* (2016) 15, 70-73