# 研究報告 2018 (KISTEC Annual Research Report, 2018)

## 【研究開発部】

## 実用化実証事業

「人工細胞膜システム」グループ	
◆総括·····	151
グループリーダー 竹内 昌治	
◆携帯型センサを目指した液滴利用人工細胞膜形成デバイスの開発・・・・・・・・・・・・・・・・	153
大崎寿久、伊沢友佑、神谷厚輝、藤井聡志、三澤宣雄、三木則尚、竹内昌治	
◆嗅覚受容体を用いた匂いセンサのための水相-気相界面が露出した系による脂質二重膜の形成	
	156
三澤宣雄、藤井聡志、神谷厚輝、大崎寿久、竹内昌治	
◆無細胞翻訳系を用いた人工脂質膜上の膜タンパク質解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	159
藤井聡志、三澤宣雄、神谷厚輝、大崎寿久、早川正俊、竹内昌治	
◆多種類のリン脂質組成非対称膜リポソーム作製デバイスの開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	162
神谷厚輝、五反田政秀、大崎寿久、藤井聡志、三澤宣雄、三木則尚、竹内昌治	
◆業績·····	165

人工細胞膜システムグループ

グループリーダー 竹内 昌治

#### 【基本構想】

膜タンパク質は細胞膜中に存在し、細胞の内外への物質輸送・排出、シグナル伝達・変換などにおいて 重要な役割を果たしており、1兆ドル余り(2011年)の医薬品の世界市場において、薬剤の標的の半数以上 がこれら膜タンパク質や膜表在性物質だと言われている。リガンド同定済みのGタンパク質共役型受容体 (GPCR)に関するだけでも約600億ドル(2009年)に上り、リガンド未同定のGPCRをはじめ、イオンチャネルや トランスポータなど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創薬・ 医療分野における重要な課題である。しかし細胞膜中に存在する膜タンパク質は単離が困難なため、機能 解析は難しいとされてきた。

創造展開プロジェクト(2009-2012年度)では、細胞膜のモデルとなる脂質二重膜を人工的に再構成した後、 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する戦略にもとづ いて研究を行い、膜タンパク質を再構成するための2つの人工脂質二重膜システムを確立した。(1)電気的 計測技術に適する平面膜システムでは、ヒト由来イオンチャネルの並列同時シグナル計測に適する自動 化・集積化チップ、小型化チップをそれぞれ研究・開発した。(2)光学的計測技術に適するリポソーム膜シ ステムでは、細胞サイズリポソームの形成手法を確立し、トランスポータの輸送現象やGPCRの基質結合を 蛍光により観測することに成功している。

2013年度にスタートした実用化実証事業および地域イノベーション戦略支援プログラムでは、創造展開 プロジェクトで得られた研究成果を展開し、標的膜タンパク質の生体外での創薬解析支援システムを確立 すべく研究開発を行っている。具体的には、 効率的膜システム要素技術の開発では、人工脂質二重膜の 集積化や薬剤スクリーニングに適したデバイスとするためのシステム全体の基盤研究開発を実施する。一 方、 膜タンパク質の調製・導入法の開発では、イオンチャネルやGPCR、トランスポータなどを人工脂質 二重膜に効率的・体系的に導入できる手法の研究開発を実施する。また、膜タンパク質機能計測システム については、量産化技術の開発を企業との共同で行う。最終的に、大学・研究機関や製薬企業、受託試験 機関などで使用できる評価法およびシステムの開発も目標としている。

#### 1. 平成 29 年度の研究目的

実用化実証事業5年目となる29年度は、下記研究課題 を設定し、特に、地域イノベーション戦略支援プログラム 成果物として、イオンチャネル計測システムのプロトタイ プ機の製作およびシステムを利用した評価事例のデータ ベース化を行うことを目標とした。

#### (1)【システム開発】

#### 効率的膜システム要素技術の開発

我々の目指す人工細胞膜プラットフォームは、細胞膜の モデルとなる脂質二重膜を簡便に再現良く形成すること でそこに再構成する膜タンパク質の活性を保持し、機能解 析を可能とするシステムである。

創造展開プロジェクトにおいては、こうしたプラットフ ォームに適する人工脂質二重膜の形成手法について研究 を行い、新たに平面状および球面上の脂質二重膜形成デバ イスを提案し、その基盤技術について確立した。

実用化実証事業においては、これらの人工脂質二重膜デ バイスを膜タンパク質の機能解析や創薬スクリーニング といった場面において実用的なプラットフォームとして 拡張していくための要素技術、あるいは量産化に必要とな

#### る技術の開発を目標としている。

平成29年度は、イオンチャネル計測システム(平面膜 デバイス)については、量産可能な膜タンパク質機能計測 システムを地域イノベーション戦略支援プログラム成果 物として製作することを、膜輸送体計測システム(球面膜 デバイス)については、これまでの成果を引き継いで細胞 膜の生理的機能を明らかにするためのデバイス開発を進 めることを目的とした。

#### (2)【膜タンパク質再構成】

膜タンパク質の調製・導入法の開発

従来、膜タンパク質の機能解析は、培養細胞を用いた電 気生理学的手法(パッチクランプ法)や蛍光イメージング 法によって行なわれるのが一般的である。しかしながらこ れらの手法では、培養中の汚染対策や個体差の均一化処理 が煩雑であるほか、標的以外の雑多なタンパク質からの影 響が避けられず、一つの標的タンパク質に限定して機能を 探ることは難しかった。我々が開発している人工脂質二重 膜プラットフォームでは、標的タンパク質のみ融合・再構 成することを目指しており、これらの課題は解決できる。 すでに、創造展開プロジェクトにおいて人工脂質二重膜に 対して標的膜タンパク質を再構成する手法について検討 を行ってきた。

実用化実証事業においては、効率的・体系的な膜タンパ ク質の再構成を目指し、これまでに得られた実験条件の再 検討を行いながら、最適化を進めている。平成29年度は、 これまでの評価事例をまとめ、データベースを作成するこ とを目的とした。

平成 29 年度の研究成果

### (1)効率的膜システム要素技術の開発

イオンチャネル計測システム(平面膜デバイス)につい て、量産可能な膜タンパク質機能計測システムを地域イノ ベーション戦略支援プログラムの成果物として製作し、今 後の外部研究機関での活用に道筋をつけた。

開発しているイオンチャネル計測システムの脂質二重 膜を担持する部品(セパレータ部品)について、従来は手 作業による微細・薄膜材料部品の組み立て工程を要したこ とから、量産のための課題として挙げられていた。このセ パレータ部品について、東レエンジニアリングと共同で開 発を行った。新たに考案した材料・製作工程は、組み立て 工程を省略でき、実用化技術として期待される。作製した セパレータを実装した平面膜デバイスを用いて、モデル膜 タンパク質の計測を行い、得られたデータの解析を行った ところ、従来のセパレータとほぼ遜色のない性能を有する ことも確認できた。以上により、平面膜デバイスに関して、 量産性に対する課題は概ね解決できたものと考えられる。 今後、量産型デバイスの性能評価をより詳細に行う予定で ある。

一方で、我々の有する膜形成技術の普及・展開も目的として様々な膜機能評価に対応できるデバイスの研究開発も進めた。基礎研究における簡便な膜形成技術・デバイスの需要は高い。国内外の大学等の研究機関との共同研究を通して、液滴接触法のノウハウを活用したデバイス開発を進めている。また、これら開発を通して、特別の知識がなくとも簡便・安全に脂質二重膜を作製できるデバイスの開発も進め、大学講義でのデモを行った。この他、中高生向けの講義・講演や市民向けの科学展示会への展示物提供を行うなど、アウトリーチ活動も積極的に行った。

膜輸送体計測システム(球面膜デバイス)については、リ ン脂質非対称二重膜を有する細胞サイズの球面膜(リポソ ーム)の作製法に関して16年度に学術論文の発表を行っ た。液滴接触法により作製したリン脂質非対称性をもつ平 面脂質二重膜に対して、パルスジェット流を吹き付けるこ とで平面脂質二重膜をチューブ状に変形させる。このチュ ーブが断裂する際に目的とするリポソーム(球面膜)が形 成される。29年度はこの成果を発展させ、様々な非対称 膜リポソームを大量に作製できるデバイスについて開発 を行った。また、ナノサイズの非対称膜リポソーム作製な どへも発展させており、膜の生理的機能を明らかにするた めのデバイス開発を継続して行っている。

#### (2) 膜タンパク質の調製・導入法の開発

イオンチャネル計測システム(平面膜デバイス)につい て、プロトタイプシステムの性能評価を膜タンパク質の機 能解析を通して継続して行った。また企業等から依頼を受 けて、イオンチャネルの機能評価を実施している。本シス テムの特長は、膜タンパク質一分子レベルの精密機能解析 が可能である点、また培養細胞系では困難な膜タンパク質 の評価や自由度の高い評価系が設定できる点にある。こう した薬剤標的を含む膜タンパク質の機能解析例について、 地域イノベーション戦略支援プログラムの成果としてデ ータベース化を行った。

また、大学等研究機関から試料を入手し評価するだけで なく、それら機関へ計測チップを貸与し、膜タンパク質機 能計測への利用および開発チップの外部での評価を行っ ている。この他、海外の研究機関との連携、学生の受け入 れなども例年通り、積極的に行った。

### (3)共同研究による成果

化学量センサ開発の一環として、東京大学、住友化学株 式会社と共同で、新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NED0)の次世代ロボット中核技術開発事業を受託し、ヒ トの匂いを検知するセンサの研究開発を行っている。昆虫 の嗅覚受容体を用いて、ヒトの汗の匂いに特異的に反応す るセンサの開発を目指している。イオンチャネル計測シス テムで培った人工細胞膜の形成および計測技術と、揮発性 分子の検出デバイスを組み合わせた匂いセンサ開発への 応用展開である。これまでの研究において、匂いセンサと して利用するためのデバイス構造などの改良を行い、ヒト の汗の匂いを特異的に検知することに成功している。

また、日本医療研究開発機構(AMED)の革新的先端研究 開発支援事業(CREST)に関しても、東京大学医学部・薬 学部の浦野泰照教授とともに臨床検体における代謝活性 を網羅的に調べるためのスタンプ型デバイスの開発を行 っている。29 年度は、臨床検体を対象としたスクリーニ ングを前年度に継続して実施した。

その他、人工細胞創製に関する内閣府革新的研究開発推 進プログラム(ImPACT)に関しても、東京大学生産技術研 究所と連携した技術開発を行っている。

上記のそれぞれの研究成果は、業績一覧に示す通り、国 際会議・国内学会での発表、学術論文、記者発表などとし て積極的に公開している。

## 携帯型センサを目指した

## 液滴利用人工細胞膜形成デバイスの開発

大崎寿久、伊沢友佑、神谷厚輝、藤井聡志、三澤宣雄、三木則尚、竹内昌治

#### 1. はじめに

細胞を覆う細胞膜は、脂質二重膜と膜タンパク質を主な 構成成分として形成されている。脂質二重膜は、両親媒性 の脂質分子が疎水性の炭化水素鎖を向かい合わせるよう にして膜構造を形成する。膜タンパク質は脂質二重膜に存 在し、細胞内外の情報伝達や物質輸送を担っている。膜タ ンパク質のひとつであるイオンチャネルには、リガンド (基質)1分子と結合し、毎秒1千万個のイオン電流へと 増幅する機能を持つものも存在する。これらは細胞中では 生理的な働きをするものであるが、基質1分子と選択性高 く結合(検知)し、その入力信号を1千万倍まで増幅でき る人工的なトランスデューサを作ることは難しい。そこで 近年、人工的に形成した脂質二重膜上にイオンチャネルの ひとつである生体ナノポアを再構成し、この増幅器として の機能を生体物質や化学物質のセンサとして応用しよう とする研究が盛んに行われるようになってきている[1,2]。

細胞外での脂質二重膜形成法として、脂質単分子膜に覆 われた液滴同士を接触させる液滴接触法や、ガラスキャピ ラリ先端に刷毛塗り法によって形成する方法、マイクロ流 路中で形成する方法等が報告されている[3,4]。一方で、 センサ応用を検討した研究例では、生体ナノポアを用いた 次世代 DNA シークエンシングや、ナノポアと DNA アプタマ ーを用いた違法薬物の迅速検知技術が注目を集めている [5,6]。しかしながら、このようなセンサデバイスの携帯 化を目的とした報告は少ない。持ち運びを可能にするには、 シグナル計測機器の小型化と共に、脂質二重膜の機械的安 定性が大きな課題となる。

そこで我々は、人工細胞膜をポータブルセンサとするた めの研究開発を進めている。本研究では、ガラスキャピラ リ先端に脂質二重膜を形成する従来のデバイスを核とし、 そのキャピラリ先端に微小液滴を把持するカップ状のリ ザーバを設ける構造を検討した(図1)。脂質二重膜は、 ガラスキャピラリ先端に100 µmの孔が設けられた高分 子フィルムを貼り付け、そこに形成する。リザーバは、表 面張力によって溶液を保持でき、一方で外部からのアクセ スも可能とすることから、デバイスの携帯性に寄与する。

#### 2. 実験と結果

### 2.1 デバイス作製

図 2 に溶液把持機構を有する脂質二重膜デバイスを示



図1 携帯型センサのための液滴を利用した人工細胞膜形成デバ イス模式図。従来のガラスキャピラリ先端に脂質二重膜を形成す るデバイスに対して、キャピラリ先端を液滴で保護するカップ状 のリザーバを有することを特徴とする。

す。リザーバはアクリルを切削し作製した。リザーバは、 高さ4mm、直径4mmの円筒に深さ2mm、直径3mmのウ ェル形状であり、ウェル壁面に中心角80度の爪を3つ等 間隔に並べる加工を施した。この爪構造により表面張力に よる溶液把持を可能にすると同時に、スリットの存在によ リ外部からの溶液の交換が可能となる。底面にはガラスキ ャピラリを挿入する直径1mmの穴を設けた。100 µmの 孔が設けられたパリレンフィルムは一般的フォトリソグ ラフィプロセスによって作製した。フィルムをガラスキャ ピラリに貼り付け後、リザーバの穴に挿入しボンドで固定 した。さらに、電気計測のためにガラスキャピラリ内およ びリザーバ内にAg/AgCI 電極を取り付けた(図1)。

## 2.2 脂質二重膜形成

本実験では、パリレンフィルム上に膜を形成する手法と して刷毛塗り法を用いた[4]。まず、パリレンフィルム上 に脂質を分散した有機溶媒(10 mg/mL, DPhPC in *n*-decane) を1 µL塗布し、乾燥させた。次に、キャピラリ内をバッ



図 2 作製したデバイス写真。円筒状ウェルに爪とスリットを 3 つずつ等間隔に設けている(左 2 枚の写真)。ウェル底面の孔に ガラスキャピラリを挿入し、キャピラリ先端には脂質二重膜を担 持するためのマイクロ孔をもつ高分子フィルムを貼付している (右 2 枚の写真)。





図3 脂質二重膜に対するナノポア再構成によるステップ状のイ オン電流増加の様子。

ファ(1 M KCI)で満たした。コネクタ(図1参照)にデバ イスを接続後、脂質二重膜にナノポアを形成する膜タンパ ク質である -Hemolysinを含むバッファ13 µLをリザー バ内に滴下した。最後にリザーバ側からマイクロピペット を用いて脂質溶液1 µLをキャピラリ先端付近に注入し た。以上の行程の後、自発的に脂質二重膜が形成され、 -Hemolysin が膜上に再構成されることでナノポアが形成 される。

## 2.3 微小電流計測

イオンチャネルやナノポアをセンサ素子とする場合、標 的物質の有無により変化するイオン透過性を電流として 捉えることが一般的である。本デバイスでは、脂質二重膜 によって電気的に隔絶されたキャピラリとリザーバ間に 定電圧を印加し、そこに形成されたナノポアを透過する微 小なイオン電流を小型アンプによって計測した。1 M KCI 中、電圧 50 mV 印加下の電流値は、ナノポア1つにつき約



図4 一本鎖 DNA の通過により阻害されるナノポア透過電流。膜間に電圧を印加することで、負電荷を持つ一本鎖 DNA はアノード 側へ流れる。DNA がナノポアを通過する際に見かけのポア面積が 著しく小さくなるため、イオン電流の一時的な低下が起こる。



図 5 爪-スリット構造を持つリザーバにおける溶液交換効率の 検討。(上)溶液交換(横軸の時間、純水に浸す)操作により、 リザーバに満たしたローダミン B 溶液の蛍光輝度が低下する様 子。(下)純水で満たしたリザーバを青色インクに 30 秒間浸漬す る前後の様子。

50 pA となることが知られる。電流計測では 50 pA のステ ップを確認することでナノポアが膜上に再構成されたこ とがわかり、間接的に脂質二重膜が形成されたことを確認 できる。本実験では、計測時のサンプリング周波数を 5 kHz、 ローパスフィルタ1 kHz と設定した。また、センサとして の機能を確かめるために -Hemolysin バッファに一本鎖 DNA を加えることで、一本鎖 DNA のナノポア通過時に生じ る阻害シグナルも観察した。

#### 考察および今後の展望

溶液把持機構を有する脂質二重膜デバイスを用いたナ ノポア電気計測の結果を図3に示す。約100 pA の電流上 昇が観測され、この階段状の上昇のタイミングで脂質二重 膜上にナノポアが1つ形成されたと考えられる。このこと から溶液把持機構を用いた生体ナノポア電気計測デバイ スにおいて、ガラスキャピラリ先端に脂質二重膜を形成で きていることがわかった。

次に、リザーバに把持されている溶液に一本鎖 DNA を加 えた場合の微小電流計測結果を図4に示す。 -hemolysin が形成する生体ナノポアの最狭部はおよそ1.5 nm であり、 一本鎖 DNA が丁度通過できるサイズである。一本鎖 DNA が ナノポアを通過するとイオン電流が阻害され、ナノポアシ グナルがおよそ8割低下することが知られている[]。図4 に見られるスパイク状の電流低下はナノポアを通過する DNA によるイオン電流の阻害によるものと考えられる。

溶液の交換は、リザーバ先端の開口部(溶液が露出して いる部分)を交換したい溶液を満たしたプールに浸漬する ことで行うことができる。図5に示すように、約10秒間 プールに1回浸漬することで溶液交換が行われ、リザーバ 内の濃度が半減した。また、交換操作を5回繰り返すこと で、90%以上交換されることが分かった。リザーバにはス リット構造を持たせているが、スリットがない場合は対流 が起こりにくく、交換が限定的となることも明らかにした。

本研究では、溶液把持機構(リザーバ)を有する脂質二重 膜デバイスを用いた生体ナノポア電気計測を行った。また、 微小液滴の把持およびキャピラリ先端に微小孔を設けた パリレンフィルムを用いることで、脂質二重膜を形成でき ることがわかった。また一本鎖 DNA を用いた実験では、ナ ノポアを通過する DNA シグナルを検出できた。今後、ポー タブルセンサとして、溶液交換の簡便性など、デバイスの 検討を継続していく。

#### 【謝辞】

本研究内容の一部は、文部科学省地域イノベーション戦略支援プログラム、日本学術振興会科研費基盤研究 B 17H02758の助成、および国立研究開発法人新エネルギー・ 産業技術総合開発機構次世代人工知能・ロボット中核技 術開発委託事業により行われました。ここに感謝申し上げ ます。

#### 【参考文献】

- T. Osaki and S. Takeuchi, "Artificial Cell Membrane Systems for Biosensing Applications," Anal. Chem., vol. 89, no. 1, pp. 216–231, 2017.
- [2] N. Misawa, T. Osaki, and S. Takeuchi, "Membrane Protein-based Biosensors," J. R. Soc. Interface, vol. 15, 20170952, 2018.
- [3] K. Funakoshi, H. Suzuki, and S. Takeuchi, "Lipid Bilayer Formation by Contacting Monolayers in a Microfluidic Device for Membrane Protein Analysis," Anal. Chem., vol. 78, no. 24, pp. 8169–8174, 2006.
- [4] L. K. Bright, C. A. Baker, M. T. Agasid, L. Ma, and C. A. Aspinwall, "Decreased aperture surface energy enhances electrical, mechanical, and temporal stability of suspended lipid membranes," ACS Appl. Mater. Interface, vol. 5, pp. 11918–11926, 2013.

- [5] R. Kawano, T. Osaki, H. Sasaki, M. Takinoue, S. Yoshizawa, and S. Takeuchi, "Rapid Detection of a Cocaine-Binding Aptamer Using Biological Nanopores on a Chip," J. Am. Chem. Soc., vol. 133, no. 22, pp. 8474– 8477, 2011.
- [6] S. Fujii, A. Nobukawa, T. Osaki, Y. Morimoto, K. Kamiya, N. Misawa, and S. Takeuchi, "Pesticide Vapor Sensing Using an Aptamer, Nanopore, and Agarose Gel on a Chip," Lab Chip, vol. 17, pp. 2421–2425, 2017.
- [7] M. Akeson, D. Branton, J. J. Kasianowicz, E. Brandin, D. W. Deamer, "Microsecond Time-Scale Discrimination Among Polycytidylic Acid, Polyadenylic Acid, and Polyuridylic Acid as Homopolymers or as Segments within Single RNA Molecules," Biophys. J. vol. 77, pp. 3227–3233.

## 嗅覚受容体を用いた匂いセンサのための

## 水相-気相界面が露出した系による脂質二重膜の形成

三澤宣雄、藤井聡志、神谷厚輝、大崎寿久、竹内昌治

### 1. はじめに

化学物質を同定・定量検出する装置にはクロマトグラフ ィーや質量分析機器、各種分光装置が存在するが、据え置 き型の大型装置であるため、小型のセンサとしての活用は 難しいのが現状である。一方、可搬性・携帯性の高い化学 センサには、材料として有機感応膜や金属酸化物半導体、 水晶振動子を用いたもの、また、物理現象として表面プラ ズモン共鳴や表面弾性波、各種薄膜の応力変化に伴った電 気的特性変化を応用したものが挙げられる[1-5]。しかしな がら、感度や標的化学物質への特異性の点において、いま だに改善の余地がある。現在の撮像素子や触覚センサのよ うに小型かつ高感度化を達成するには化学センサは発展 途上にあり、多くの研究者が小型で高感度・高特異性・長 寿命の化学センサの研究開発に取り組んでいる。特に揮発 性化学物質の特異的検出は非侵襲な系での違法薬物検出、 爆薬検知、ヒト探索、疾病診断を含めたヘルスケア、食品 管理等への応用が期待され、大きな市場を生じることが予 想されている。

近年では、小型・高感度・高特異性の三要素を満たす可 能性のある化学センサとして、生物由来の化学受容体を用 いる系が盛んに研究されており、次世代の生物機能利用型 センサとして注目を浴びている。前述の揮発性化学物質の 検出には生物の嗅覚受容体を用いたいわゆる「匂いセン サ」がタンパク質レベルから細胞、組織、生物個体まで幅 広く応用が検討されてきた。生物個体として、大を用いた 匂い探知は古くから行われており、現在でも非常に有効な 手段であるが、訓練に費やす時間や費用の面が課題である。

我々は膜タンパク質である嗅覚受容体そのものに着目 し、電子デバイス中で人工的な細胞膜(脂質二重膜)に嗅 覚受容体を再構成して匂いセンサとする研究に取り組ん できた<sup>[6]</sup>。脂質二重膜を得るには簡便に膜形成が可能な液 滴接触法を採用している。通常、液滴接触法では脂質分子 が分散した有機溶媒中の二つの水滴を接触させて脂質二 重膜を得るため、水相は油相に囲まれた系となる。そのた め、空気中の一般的に疎水性の高い多くの匂い分子は有機 溶媒中に留まり、嗅覚受容体の水相に露出した匂い分子結 合部位には匂い分子が到達しにくいという難点があった (図1A)。そこで、片方の水滴の代りに空気に露出したか さ高いハイドロゲルを設定することで、空気中の匂い分子 を取り込みやすくする系が報告されている(図 1B)<sup>[7]</sup>。 この系ではゲルと水溶液という性質の異なるヘテロな界 面での膜形成のため、通常の液滴接触法に比べると膜形成 率が低いことが課題であった。そこで、本来の液滴接触法 と同様に水滴同士の界面にて脂質二重膜の形成が可能で あり、且つ有機溶媒中に埋没しない系を検討した(図1C)。 本概要では、はじめに脂質二重膜形成デバイスの作製方法 および、形成膜の観察結果と形成膜の絶縁性について述べ、 後半では匂い分子の取り込み効果について報告する。

#### 2. デバイス作製

本研究ではアクリル材料を高精度なエンドミル装置に て切削加工することで上面から観察した際に∞型の形状 をした微小なチャンバーや二つの液滴の間に挿入する有 孔隔壁を作製した。隔壁の厚さは75 µm、貫通孔の直径は 600 µm である。図2に示す通り、T字型の隔壁を水溶液 を溜めたチャンバー内に挿入する系である。アクリル製の 有孔隔壁には予め脂質を有機溶媒(デカン)に分散させた 溶液を塗布し、ピンセット等を用いて手動にて水溶液中へ 浸漬することで脂質二重膜を形成した。溶媒がデカンであ ることと、脂質分子が両親媒性であることから、比較的疎 水性の高いアクリル表面においても濡れ性が高く、脂質溶 液が拡がりやすい。そのため、貫通孔を被覆するように局







図2 貫通孔を有する隔壁に脂質溶液を配置し、水溶液に挿入して脂質二重膜を形成する操作手順

所的に脂質溶液を設定するために周囲にフッ素コートを 施した。また、チャンバーの底部は500 μmの幅でスリッ ト状に開口しており、隔壁の底辺がチャンバーの下部を突 き抜ける形状で設計した。T字型の形状のため、隔壁がチ ャンバーから抜け落ちることが無く、隔壁が一定の位置に 保持される構造とした。用いたデカンは1μ1であり、脂質 濃度は20 mg/mlである。また、隔壁挿入後にチャンバー デバイスの外側からの観察が可能なように側壁を研磨し た。さらに、嗅覚受容体を再構成した後に匂い分子結合に 伴うイオン電流計測を行うため、電極を併設した構造のデ バイスを作製した(図3)。有孔隔壁の作製は前述と同様 であるが、チャンバー形状を変更した。特に隔壁で仕切ら れる二つの溶液の絶縁性が確保されるようにチャンバー 下部にフルオロカーボン液が溜められる部分を設けた。フ ルオロカーボン液は水溶液とも有機溶媒とも混ざらず、且 つ電気的な絶縁性が高いため、適した流体として採用した。 電極には銀/塩化銀電極を用いて外付けの増幅器を図3に 示すように接続した。前述の∞型チャンバーとは異なり、 側壁に開口部を設けたチャンバーであるため、比重の関係 でデカンが水溶液の上側に留まることから横穴の水溶液 は気液界面が確保された系となっている。

### 3. 膜形成と絶縁性の確認

有孔隔壁に脂質を塗布して水溶液に挿入した結果、図 4A に示すように液滴接触法で形成される脂質二重膜と同 様の形状が観察された。脂質二重膜にナノポアを形成する 膜タンパク質であるα-ヘモリシンを用いた電気計測にお いて、ステップ状の電流値変化が計測できたことから脂質 二重膜が形成されていることと、二つの溶液間の電気的な 絶縁性が保たれていることが確認できた。

従来の液滴接触法による脂質二重膜の形成には疎水的 な表面を有する器具で貫通孔近傍をなぞる操作が頻用さ れてきた。これは余剰の有機溶媒層を積極的に取り除くこ とにで、デカン層の薄層化を促進し、油-水界面に生じた 脂質単分子膜同士を接触させやすくするためである。一方、 本手法では脂質を塗布した有孔隔壁を挿入するのみで不 自発的に 100%の確率で脂質二重膜を形成するに至った。 また、チャンバー全体をフッ素コーティングすることが、 膜形成率の向上に寄与していることが示唆された。

## 4. 匂い分子の取り込み

本研究で用いた嗅覚受容体はシマカ(Aedes aegypti)に 由来し、オクテノールと呼ばれる揮発性の有機分子に特異 的に応答する種類の嗅覚受容体である。オクテノールはヒ トの汗の成分に由来する匂いの一つとされているため、将 来的には匂いセンシングによる不明者探索等に役立てた いと考えている。オクテノール分子は分子内に水酸基を有 するため、水溶液に対して完全な不溶性ではないと考えら れる。しかしながら、相対的に有機溶媒に溶けやすいため、 デカン層に被覆されない構造である前述の側壁に開口部 がある系でオクテノールガスの水相への取り込みの確認 を行った。





図 4B に示すようにオクテノールガスを十分に飽和させ た密閉容器内に気液界面が露出した系と緩衝溶液がデカ ンに被覆された系の二種類を設置した。室温にて 10 分間 放置後、各緩衝溶液のみをガスクロマトグラフィーにかけ、 オクテノールの含有を評価した結果、気液界面が露出した 系の方(図 4Bb) が緩衝溶液中により多くのオクテノール を含むことが明らかとなった。

細胞に発現させた前述の嗅覚受容体を精製し、当該脂質 二重膜に再構成してオクテノールの検出を検討したとこ ころ、オクテノール分子と嗅覚受容体の結合に起因したと 考えられるイオン電流の計測に成功した。この電流値変化 は嗅覚受容体とオクテノールの両者が存在する時のみに 観測されたため、オクテノールの検出ができていると判断 した。



図4 (A) 形成した脂質二重膜の観察模式図と観察写真。(B) オクテノールガス吸収試験模式図とガスクロマトグラフィー による分析結果。

#### 5. 展望

本概要では嗅覚受容体を人工細胞膜に再構成し、匂いセ ンサに役立てる上で匂い取り込みに有効と思われる系を 報告した。これまでの液滴接触法やハイドロゲルを用いた 脂質二重膜形成とは異なり、有機溶媒に被覆されない水相 が確保でき、且つより簡便な系である。水溶液が空気に露 出するため、水分の蒸発を防ぐ系の構築も必要になるが、 水分を供給する仕組み等により蒸散を防ぐ手法が考えら れる。また、電極の位置を工夫すれば、水溶液の層をさら に薄くすることが可能であるため、空気中の匂い分子がよ り迅速に溶け込む系も期待できる。本研究が嗅覚受容体を 用いた匂いセンサの応答速度の向上や高感度化に寄与す ることを期待している。

### 【謝辞】

本研究概要は国立研究開発法人新エネルギー・産業技術 総合開発機構(NEDO)の委託事業である「次世代人工知 能・ロボット中核技術開発/革新的ロボット要素技術分野 /人検知ロボットのための嗅覚受容体を用いた匂いセン サの開発」の研究開発期間(H29年度~)の実験結果に基 づきました。ここに深謝申し上げます。

### 【参考文献】

- Y. Mizuta, T. Onodera, P. Singh, K. Matsumoto, N. Miura, and K.Toko, *Biosens Bioelectron*, 2008, 24, 191-197.
- [2] JY. Lee, HJ. Ko, SH. Lee, and TH. Park, *Enzyme Microb Tech*, 2006, 39, 375-380.
- [3] D. Kohl, L. Heinert, J. Bock, T. Hofmann, and P. Schieberle, Sensor Actuat B-Chem, 2000, 70, 43-50.
- [4] K. Yano, UT. Bornscheuer, RD.Schmid, H. Yoshitake, HS. Ji, K. Ikebukuro, Y. Masuda, and I. Karube, *Biosens Bioelectron*, 1998, 37, 397–405.
- [5] H. Wohltjen, and R. Dessy, 1979, Anal Chem, 51, 1458–1464.
- [6] N. Misawa, S. Fujii, K. Kamiya, T. Osaki, Y. Miyama, T. Takaku, Y. Takahashi, K. Saito and S. Takeuchi, μTAS2016, 37-38.
- [7] S. Fujii, A. Nobukawa, T. Osaki, Y. Morimoto, K. Kamiya, N. Misawa, S. Takeuchi, 2017, *Lab Chip*, 17, 2421–2425.

## 無細胞翻訳系を用いた人工脂質膜上の膜タンパク質解析

藤井聡志、三澤宣雄、神谷厚輝、大崎寿久、早川正俊、竹内昌治

### 1. はじめに

膜タンパク質の詳細な機能解析をする為には生物組織 や培養細胞の細胞膜から膜タンパク質を精製し、夾雑す る他の膜タンパク質を除去する必要がある。しかし、そ のためには高度な技術が要求されるため、水溶性のタン パク質に比べると基礎研究、応用研究の両面において大 きく遅れを取っている。

膜タンパク質はその疎水的性質ゆえに、親水性の溶媒 下では凝集してしまう。凝集した膜タンパク質は本来の 構造を保持しておらず、活性も失われている。そこで生 細胞からは界面活性剤を用いて溶出される。これにより、 膜タンパク質は界面活性剤の疎水基に守られるようにな り(ミセル構造に包まれる)、可溶性の膜タンパク質溶液 として種々の精製技術に供され、最終的に機能解析のた めの試料として調製される。このとき、多種類の界面活 性剤の中から目的の膜タンパク質を可溶化するのに最適 な界面活性剤を選択する必要がある。残念ながら、全て の膜タンパク質を可溶化できる万能な界面活性剤はなく、 界面活性剤の構造と最適な膜タンパク質配列との相関も 明確ではないため多くの試行錯誤を要する部分である[1]。 次に、無事に精製できた場合でも界面活性剤の存在下で は機能が微弱なために、脂質膜に膜タンパク質を組み込 む必要が生じることも多い。脂質膜に組み込むと生細胞 中の膜タンパク質の環境を模倣できるために膜タンパク 質の機能が検出されやすくなる。それだけでなく、電気 生理学の技術を用いたイオン電流計測、リポソームを用 いた内外物質の輸送アッセイなど、幅広い機能解析技術 を利用できるようになるため脂質膜に膜タンパク質を組 み込む利点は多い。ところが膜タンパク質を脂質膜に組 み込むのは容易ではなく、界面活性剤の除去と脂質膜の 形成を同時に進行させる透析法やバイオビーズ法など各 種プロトコルの条件検討が必要となる。このようにして、 膜タンパク質機能解析には多くの技術と試行錯誤が必要 なため、より簡便に膜タンパク質を脂質膜上の機能解析 に供する技術の開発が期待されている。

我々は、無細胞翻訳系を用いて膜タンパク質をアクリ ルデバイス上の人工脂質膜上に簡易的に組み込み、電気 生理学手法により機能解析する事に成功した。本技術で は、生細胞から界面活性剤を用いて膜タンパク質を精製 する必要がない。加えて当グループが有するチップ上の 人工脂質膜形成技術を活用することにより、従来よりも 簡便に1分子レベルで膜タンパク質の機能解析が可能に なった。以下より使用する技術について順次、概説する。

### 2. 無細胞翻訳系を用いた液滴接触法

無細胞翻訳系とは、試験管内で DNA/RNA からタンパ ク質を合成する技術のことである。DNA にコードされた 遺伝情報は転写酵素によって RNA に転写され、リボソー ムとその他翻訳にかかわる酵素群によりタンパク質が合 成される(翻訳)。従来は培養細胞に DNA を導入して細 胞内でタンパク質合成を行い、その後に細胞から精製し ていたのに対し、試験管内でタンパク質合成を行える本 システムは精製の作業が不要であり、DNA と無細胞翻訳 系を混合して加温するだけで試験管内に目的の膜タンパ ク質を得ることができる。無細胞翻訳系にはさまざまな 生物種由来のものが市販されているため、目的に応じて 選択可能である。我々は PURE system と呼ばれる大腸菌 由来の無細胞翻訳系を使用した<sup>[2,3]</sup>。本システムは、無細 胞翻訳系の中で唯一タンパク質合成に不要なタンパク質 が全て除去されているという特徴がある。そのため、夾 雑する膜タンパク質が含まれないため、膜タンパク質研 究には有用である。

無細胞翻訳系を用いてタンパク質合成を行う場合、界 面活性剤や脂質膜を混在させて合成する必要がある。こ れは前述のとおり膜タンパク質が疎水的性質を持つため である。生細胞での膜タンパク質の挙動を模倣できるた めに界面活性剤よりは脂質膜を用いて合成した方が好ま しい。我々はアクリルデバイス上に形成した脂質膜を用 いて無細胞翻訳系による膜タンパク質を合成することに した。デバイス上の脂質膜形成には当グループが開発し た液滴接触法を用いた<sup>[4]</sup>。液滴接触法は、脂質が混和した オイルの中に水滴を2個作成して接触させた界面に脂質 膜を形成する技術である。無細胞翻訳系により合成され た膜タンパク質は脂質膜上に自発的に組み込まれる(図 1)。これは膜タンパク質が親水性の溶媒より脂質膜の疎 水環境との親和性が高いために確率的に起こる現象であ る。この仕組みを用いると、界面活性剤を使用すること なく目的の膜タンパク質のみを脂質膜に組み込むことが 可能となる。必要に応じて、脂質膜に膜タンパク質が組 み込まれる頻度を向上させる因子を混在させることも可 能である<sup>[5]</sup>。我々は液滴接触法で形成した脂質膜上の膜タ ンパク質に由来する微弱なイオン電流を計測するシステ ムをデバイスに組み込んでいる。脂質膜はその疎水的性 質により、イオン透過性が低い。しかしナノポアやイオ ンチャネル、トランスポーターなどの膜タンパク質が脂 質膜上で機能を発現するとイオンが透過する。このイオ ン透過を電流値の変化として捕捉する。



図1 無細胞翻訳系による液滴接触法。インキュベーショ ンにより、液滴の中ではタンパク質が合成され、脂質膜に 挿入される。

デバイスとハロゲンランプヒーターの作成 3. 液滴接触法に用いるデバイスは従来の当グループの技 術に基づき、アクリル切削により加工した<sup>[4]</sup>。2本の円柱 状の窪みを接するように配置し、それぞれの窪みの底部 に電極を設置した。この電極間を流れる電流を計測する ことにより、膜タンパク質によって発生・変化するイオ ン電流を測定する。ただし、脂質膜が破裂した場合は電 極間電流が極端に上がり、膜タンパク質の機能を解析す るに至らない。そこでイオン電流を十分に遮蔽する安定 した脂質膜を形成する必要がある。我々は形成した脂質 膜の安定性を高めるため、デバイスの中央部に小さな隔 壁を設けることで形成される脂質膜面積を最大でも直径 0.6 mmの円形状に制限した<sup>[6]</sup>。これによりノイズレベル も低減し、一分子レベルの膜タンパク質機能解析が可能 になった。構築したデバイスには脂質が混和したオイル をはじめに滴下する。脂質組成は用いる膜タンパク質の 種類に応じて選別する。次に、目的の膜タンパク質遺伝 子を混合した無細胞翻訳系をオイルの中に滴下し、液滴 を形成する。このようにして形成した油中液滴が隔壁内 で接触することで脂質膜が形成され、目的の膜タンパク 質が組み込まれる足場として機能する。

無細胞翻訳系は37度に加温することでタンパク質合成 が進行する。そのため、デバイスを直接加温するシステ ムを構築する必要がある。インキュベーターなどの市販 の装置で加温すると電気計測時にノイズが発生する、大 きな加温空間ではデバイス中の溶液の乾燥速度が高いな どの懸念があるため、我々はデバイスを小型のランプヒ ーターで加熱する仕組みを構築した(図2)。ハロゲンラ ンプをアクリル製のパイプに組み込み、外環境空気との 混和を抑制した。また、温度センサを設置してランプヒ ーターのスイッチング機構と連動することで常に1度以 上の温度変動内で目的温度に制御するヒーターシステム を構築した。



図 2 (a) デバイスの写真。(b) ランプヒーターでデバイスを 加温している様子。(c) ランプヒーター下部に収納されたデ バイスの拡大写真(ヒーター電源 OFF 時)。デバイスの左上 の棒状の構造は温度センサ。

### 4. 電気計測による膜タンパク質機能解析

我々はアルファヘモリシンと呼ばれる膜タンパク質の 遺伝子を調製し、無細胞翻訳系とともにデバイスに滴下 し、ランプヒーターで加温した。アルファヘモリシンは 黄色ブドウ球菌由来の毒タンパク質であり、赤血球の脂 質膜を傷害して溶血反応を引き起こす作用を有する<sup>[7]</sup>。ア ルファヘモリシンは電気計測でよく用いられるモデルタ ンパク質であり、脂質膜上に7量体を形成し最狭部で1.5 nm 直径の小孔を形成するために大きなイオン電流を発 生させることが知られている。我々はアルファヘモリシ ンの遺伝子を無細胞翻訳系と混和して液滴接触法の液滴 組成として用い、デバイス上で脂質膜を形成した。ラン プヒーターを用いて加温したところ、計測電流に階段状 の変化が見られた(図3)。これはイオン電流が発生して いることを示しており、脂質膜上にアルファヘモリシン に由来する小孔が形成されたことを示している。アルフ ァヘモリシンが脂質膜状で小孔を形成するたびに階段状 の信号が1つ観察されるため、本研究では3個の小孔の 形成が確認されたと考察される。図3に示すとおり、順 に、38、13、26pAの電流値変化を伴う多様な信号が観察 された。これはアルファヘモリシンによる小孔構造のバ ラつきを示しており、一分子レベルの機能計測が出来て 初めて明らかになる特徴である。このようなバラつきは 市販のアルファヘモリシンタンパク質でも報告されてお り、本研究に特異的な現象ではないと考えられる<sup>[8]</sup>。特に 2段目の信号変化(13pA)以降は電流値の向上が観察さ れることから、不完全な小孔が経時的に完全な小孔構造 に変遷する様子を示すものと考察される。一方で遺伝子 を用いずに同様の実験を行ったところ、階段状の信号変 化は見られなかった。これにより、アルファヘモリシン が無細胞翻訳系により合成されたこと、そのアルファヘ モリシンが脂質膜に組み込まれたことが確認された。



図3 アルファヘモリシンの遺伝子を用いて無細胞翻訳系 によるデバイスでの電気計測で得られた電気信号例。

## 5. 展望

本研究では、膜タンパク質を簡便に脂質膜上に組み込 み、電気生理学技術により機能計測する技術を紹介した。 無細胞翻訳系は、目的の遺伝子を設計すればすぐに膜タ ンパク質が合成できる簡便性が利点である。液滴接触法 による脂質膜形成も従来技術と比較すると簡便に脂質膜 を形成する技術として知られており、当グループが開発 して以来、世界で広く使われている技術である<sup>[9]</sup>。本研究 はこれらの簡便な技術同士が組み合わさることにより、 膜タンパク質を脂質膜に組み込む技術的障害を大幅に削 減したといえる。本技術が広く活用され、膜タンパク質 研究が加速することが期待される。

#### 【謝辞】

本研究内容の一部は、文部科学省の地域イノベーション 戦略支援プログラムの助成を受け行われました。ここに 感謝申し上げます。

## 【参考文献】

- [1] A. M. Seddon, P. Curnow, P. J. Booth, Biochim Biophys Acta 1666(1-2), 105-117, 2004
- [2] T. Matsuura, N. Tanimura, K. Hosoda, T. Yomo, Y. Shimizu, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 114(8), E1336-E1344, 2017
- [3] Y. Shimizu, T. Kanamori, T. Ueda, Methods 36(3), 299-304, 2005
- [4] K. Funakoshi, H. Suzuki, S. Takeuchi, Anal. Chem. 78(24), 8169-8174, 2006
- [5] K. Nishiyama, M. Maeda, K. Yanagisawa, R. Nagase, H. Komura, T. Iwashita, T. Yamagaki, S. Kusumoto, H. Tokuda, K. Shimamoto, Nat Commun 3, 1260, 2012
- [6] R. Kawano, Y. Tsuji, K. Sato, T. Osaki, K. Kamiya, M. Hirano, T. Ide, N. Miki, S. Takeuchi, Sci. Rep. 3, 1995, 2013
- [7] L. Song, M. R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley, J. E. Gouaux, Science 274(5294), 1859-1866, 1996
- [8] Y. Tsuji, R. Kawano, T. Osaki, K. Kamiya, N. Miki, S. Takeuchi, Anal. Chem. 85(22), 10913-10919, 2013
- [9] T. Osaki, S. Takeuchi, Anal. Chem. 89(1), 216-231, 2017

## 多種類のリン脂質組成非対称膜リポソーム作製デバイスの

開発

神谷厚輝、五反田政秀、大崎寿久、藤井聡志、三澤宣雄、三木則尚、竹内昌治

#### 1. はじめに

細胞膜は両親媒性のリン脂質分子がリン脂質 2 分子膜 を構成し形成されている。特に、真核細胞の形質膜は内膜 と外膜を構成しているリン脂質種が非対称に分布してい る(リン脂質組成非対称膜)。哺乳細胞の形質膜の場合、外 膜には、フォスファチジルコリン(PC)やスフィンゴミエリ ン(SM)が多く存在し、内膜には、フォスファチジルセリン (PS)やフォスファチジルエタノールアミン(PE)が多く存在 している<sup>1</sup>。このリン脂質の非対称性は、細胞死(アポトー シス)やシグナル伝達等に重要な役割を果たしていると言 われている。また、細胞膜には様々な膜タンパク質が存在 し、非対称膜組成が膜タンパク質機能に大きな影響を与え ているとも言われている。近年、人工脂質膜であるリポソ ームは、膜タンパク質の機能観察<sup>2,3</sup>やリン脂質膜の生物物 理的特性4や人工細胞モデル研究にされている。リポソー ムは、大きさによって名称や作製法が異なる。例えば、ド ラッグデリバリーの担体に用いられる直径約 100-300 nm のリポソームは、ボルテックス法や逆相蒸発法といった方



有機溶媒層が存在しないリポソーム

図1 有機溶媒が極めて少ないリン脂質非対称膜リポソームの 作製の模式図。ジェット水流を印加すると、マイクロ脂質チ ューブが形成される。そして、脂質チューブが変形するとき に、曲率の高い部分に残留有機溶媒が多く存在すると考える。 そして、マイクロチューブの分裂により、細胞サイズの有機 溶媒層が存在しないリポソームを得る。 法で作製される。一方、光学顕微鏡で容易に観察可能な細胞サイズリポソームは、主に静置水和法<sup>5</sup>やエレクトロフ オーメーション法<sup>6,7</sup>で作製される。静置水和法は以下の方 法でリポソームが形成される。クロロホルム溶液に溶解さ れたリン脂質をガラス板上に垂らしアルゴンガス気流下 で乾燥させ、リン脂質フィルムを作製する。そして、この リン脂質フィルムに緩衝溶液等を加え、静置することによ り自己組織的に直径 5-100 µm 程度のリポソームが形成さ れる。この方法は、簡単かつ大量にリポソームが形成でき るが、作製法の原理上リン脂質非対称膜を持つリポソーム の形成は不可能である。また、作製されるポソームの大多 数は、多重膜リポソームであり、リポソーム内への物質封 入効率も良くない。

このような問題点を解決するために、マイクロ流体デバ イスを利用した細胞サイズリポソーム作製法が国内外で 開発されている。例えば、フローフォーカシング法などで、 リン脂質から構成される油中水滴が形成可能である。そし て、油相から水相へこの油中水滴を透過させる際、リン脂 質単分子膜が油中水滴に張り合わせられることからポソ ームが形成され 8-10。マイクロ流体デバイスを用いたリポ ソーム作製法は、単分散なリポソーム形成、リポソーム内 への物質の高封入やリン脂質非対称膜の形成といった利 点をもつ。マイクロ流体デバイスを利用するリポソーム作 製法の多くは、n-デカン等の有機溶媒にリン脂質を溶解し てリポソーム形成を行っている。形成時の n-デカンがリ ポソーム膜内に残留しリポソームの安定性に影響を及ぼ すと考えられている。そこで、我々は残留有機溶媒がほぼ ないリン脂質非対称膜リポソームが形成可能な作製法を 考案した。このリン脂質非対称膜リポソームの作製は下記 の通りである。本研究室で開発された平面リン脂質膜形成 法(接触法)を用いて、平面リン脂質非対称膜を形成した。 そして、この平面リン脂質非対称膜に対して、ジェット水 流を印加するとリン脂質のマイクロチューブが形成され る。このマイクロチューブが徐々に変形し大きなリポソー ム(直径約 100-200 µm)と細胞サイズのリポソーム(直径約 5-20 µm) が形成される (図 1)<sup>11</sup>。この細胞サイズのリポソ ームを回収し、ラマン分光法によりリポソームに含まれる 残留有機溶媒が非常に少ないことが分かった(有機溶媒層 が形成不可能な量)。さらに、このリン脂質非対称膜リポ ソームを用いて、リン脂質の分子運動(フリップ-フロッ プ)やペプチドとリン脂質非対称膜との相互作用観察に成

功している。さらに、あるリン脂質非対称膜組成であると 膜タンパク質の取込みが増大することがわかった。これは、 細胞膜がなぜ非対称膜であるかという問の1つになりう ると考える。タンパク質等の生体分子とリン脂質膜との相 互作用を同定するためには、多種類の組成をもったリン脂 質非対称膜が必要になってくる。そこで、本研究では、1 つのデバイスで複数種類のリン脂質非対称膜リポソーム 作製が可能なデバイスを作製する。

#### 2. 実験と結果

## 2.1 複数組成のリン脂質非対称膜リポソーム作 製デバイスとリポソーム作製

以前に、我々の研究室で、リン脂質に覆われた液滴を ちぎり、接触されることにより平面リン脂質2重膜が形成 される。この機構を元にして、複数種類のリン脂質非対称 膜リポソーム作製デバイスを構築した。デバイスは、リポ ソーム膜の外膜に相当する6つのウェルを持つ回転デバ イスと、リポソーム膜の内膜に相当する固定ウェルから構 成されている(図2)。



# 図2 複数種類のリン脂質非対称膜リポソーム作製デバイス。スケールバー,5 mm。文献[12]を改変。

このデバイスの性能を評価するために、1回転でリポソ ームの外膜に対応する6つのウェルで、制御された組成で リポソームが形成されるかを検証した。各ウェルにベース のリン脂質として DOPC を加え、蛍光色素が標識された リン脂質として、Rhodamine-DOPE, BODIPY-DHPE を加え た液滴を用意した。そして、平面リン脂質非対称膜を形成 し、その平面膜にジェット水流を印加することにより、リ ポソームを作製した。そして、回転デバイスを回転させ、 新たに平面膜を形成させ、同様にリポソームを形成させた。 その結果、Rhodamine-DOPE が含まれている平面膜から形 成されたリポソームからは、Rhodamineの蛍光のみが観察 された。また、BODIPY-DHPE が含まれる平面膜から形成 されたリポソームからは、BODIPY の蛍光のみ観察された。 一方、蛍光脂質が入っていない平面膜からは、Rhodamine、 BODIPY の両蛍光は観察されなかった。したがって、回転 によるリン脂質の混和が起きず、本デバイスで目的のリン 脂質非対称膜リポソームが形成されることがわかった(図 3)。



図3 それそれのウェルで加えた脂質の組成。それぞれの回転ウェルから形成されたリポソームの蛍光輝度のグラフ。 文献[12]を改変。

## 2.2.リン脂質組成が異なったリン脂質非対称膜 リポソームのペプチドとの相互作用

この実験では、抗菌活性をもつペプチドのシンナマイシ ンを用いた。このシンナマイシンは、フォスファチジルエ タノールアミン(PE)と特異的に結合し、細胞膜のリン脂質 分子を攪乱される働きをもつ。この回転デバイスを用いて、 リポソームに含まれる PE の濃度を変化させることにより、 リポソーム膜の撹乱の限界を観察した。リポソームの内膜 は、DOPC/DOPS (1:1 molar ratio)で固定し、リポソームの 外膜は、DOPC/DOPE (100:0, 90:10, 80;20, 75:25 molar ratio) の濃度を変化された。実験系は下記のようにおこなった。 非対称膜リポソームの外液に Alexa Fluor 546 で蛍光標識 されたシンナマイシンと Alexa Fluor 546 で蛍光標識 されたシンナマイシンと Alexa Fluor 488 で標識された AnnexinV を加えた。AnnexinV はリン脂質の PS と特異的 に結合するタンパク質である。したがって、はじめ非対称 膜リポソームの内膜に存在している PS が、シンナマイシ ンの影響で PS の外膜への露出するようすを観察した。

外膜に DOPE が存在しない場合は、シンナマイシン存在 下においても DOPS の露出が観察されなかった。しかし、 リポソームの外膜の DOPE 濃度が上昇するにつれて、PS の外膜への露出量も上昇した。この結果は、シンナマイシ ンは PE と結合し、リポソーム膜に存在している他のリン 脂質の分子運動を促進することがわかった。また、外膜に 25 mol%の DOPE が存在下で、14 mol%の DOPS が内膜か ら外膜へ移動したことがわかった(図 4)。



図4 a.シンナマイシンアッセイの概略図。b.シンナマイシ ン存在下での AnnexinV 結合実験の顕微鏡画像。スケールバ ー、5µm。c. DOPE 濃度を変化させたリポソームにおける AnnecinV 由来の蛍光輝度。文献[12]を改変。

### 3. 考察及び今後の展望

本デバイスにより、複数組成をもったリン脂質非対称膜 リポソーム作製に成功した。様々な組成のリン脂質非対称 膜リポソームでアッセイを行うことにより、ペプチドやタ ンパク質の未知機能や活性条件の発見が期待される。

#### 【謝辞】

本研究内容の一部は、文部科学省の地域イノベーション 戦略支援プログラムの助成を受け行われた。また、科学研 究費補助金若手研究 A の助成によって行われた。

#### 【参考文献】

- van Meer, G., Voelker, D. R. & Feigenson, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 112–124 (2008).
- [2] Kamiya, K. *et al.* Preparation of connexin43-integrated giant Liposomes by a baculovirus expression-liposome fusion method. *Biotechnol. Bioeng.* **107**, 836–843 (2010).
- [3] Kamiya, K., Tsumoto, K., Yoshimura, T. & Akiyoshi, K. Cadherin-integrated liposomes with potential application in a drug delivery system. *Biomaterials* 32, 9899–9907 (2011).
- [4] Lopez, S. *et al.* Membrane composition and dynamics: A target of bioactive virgin olive oil constituents. *BBA* -*Biomembr.* 1838, 1638–1656 (2014).
- [5] Bangham, A. D. & Horne, R. W. Negative Staining of Phospholipids and their Structural Modification by Surface-active Agents as observed in the Electron Microscope. J. Mol. Biol. 8, 660–668, (1964).
- [6] Angelava, M. I. & Dimitrov, D. S. Swelling of Charged Lipids and Formation of Liposomes on Electrode Surfaces. *Mol. Cryst. Liq. Cryst. Inc. Nonlinear Opt.* **152**, 89–104

(1987).

- [7] Weinberger, A. et al. Gel-Assisted Formation of Giant Unilamellar Vesicles. Biophys. J. 105, 154–164 (2013).
- [8] Matosevic, S. & Paegel, B. M. Stepwise synthesis of giant unilamellar vesicles on a microfluidic assembly line. J. Am. Chem. Soc. 133, 2798–2800 (2011).
- [9] Hu, P. C., Li, S. & Malmstadt, N. Microfluidic Fabrication of Asymmetric Giant Lipid Vesicles. ACS Appl. Mater. Interfaces 3, 1434–1440 (2011).
- [10] Kamiya, K., & Takeuchi S. Giant liposome formation toward the synthesis of well-defined artifical cells. J. Mater. Chem. 5, 5911-5923 (2017).
- [11] Kamiya, K., Kawano, R., Osaki, T., Akiyoshi, K. & Takeuchi, S. Cell-sized asymmetric lipid vesicles facilitate the investigation of asymmetric membranes. *Nat. Chem.* 8, 881-889 (2016).
- [12] Gotanda, M. et al., Sequential generation of asymmetric lipid vesicles using a pulsed-jetting method in rotational wells. *Sen. Actuators B Chem.* 261, 392-397 (2018).

業 綪

## 【原著論文】

- Naoko Ueno, Taisuke Banno, Arisa Asami, Yuki Kazayama, Yuya Morimoto, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi, Hiroyuki Kitahata, and Taro Toyota Self-Propelled Motion of Monodisperse Underwater Oil Droplets Formed by a Microfluidic Device Langmuir, Vol.33, pp.5393-5397 (2017)
- Hiroki Yasuga, Kosuke Inoue, Ryuji Kawano, Masahiro Takinoue, Toshihisa Osaki, Koki Kamiya, Norihisa Miki, Shoji Takeuchi Serial DNA relay in DNA logic gates by electrical fusion and mechanical splitting of droplets PLOS ONE, Vol.12, No.7, e0180876 (2017)
- Satoshi Fujii, Aiko Nobukawa, Toshihisa Osaki, Yuya Morimoto, Koki Kamiya, Nobuo Misawa and Shoji Takeuchi Pesticide vapor sensing using an aptamer, nanopore, and agarose gel on a chip Lab on a Chip, Vol.17, pp.2421-2425 (2017)
- Koki Kamiya, Yuta Abe, Kosuke Inoue, Toshihisa Osaki, Ryuji Kawano, Norihisa Miki, and Shoji Takeuchi Well-Controlled Cell-Trapping Systems for Investigating Heterogeneous Cell-Cell Interactions Advanced Healthcare Materials, Vol.7, 1701208 (2018)
- Yusuke Izawa, Toshihisa Osaki, Koki Kamiya, Satoshi Fujii, Nobuo Misawa, Shoji Takeuchi, Norihisa Miki Suppression of sloshing by utilizing surface energy and geometry in microliter cylindrical well Sensors and Actuators B: Chemical, Vol.258, p.1036-1041 (2018)
- Masahide Gotanda, Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, Satoshi Fujii, Nobuo Misawa, Norihisa Miki, Shoji Takeuchi Sequential generation of asymmetric lipid vesicles using a pulsed-jetting method in rotational wells Sensors and Actuators B: Chemical, Vol.261, pp.392-397 (2018)

## 【総説】

 Koki Kamiya and Shoji Takeuchi Giant liposome formation toward the synthesis of well-defined artificial cells Journal of Materials Chemistry B, Vol.5, pp.5911-5923 (2017)

- 三澤宣雄、竹内昌治 昆虫の嗅覚をロボットの匂いセンサへ AROMA RESEARCH,第18巻第2号, pp.110-115 (2017)
- 藤井聡志、神谷厚輝、大崎寿久、三澤宣雄、竹内昌治 夾雑物存在下でマイクロ RNA を検出する技術の開発 化学とマイクロ・ナノシステム,第16巻第2号,pp.46-49 (2017)

## 【口頭発表】

- 五反田真秀、神谷厚輝、大崎寿久、藤井聡志、三澤宣 雄、三木則尚、竹内昌治 人工細胞膜内の生体分子運動を観察可能とする非対 称膜リポソームの連続的作製法の開発 ロボティクス・メカトロニクス講演会 2017 2017 年 5 月,郡山
- 五反田真秀、神谷厚輝、大崎寿久、藤井聡志、三澤宣 雄、三木則尚、竹内昌治 脂質膜組成交換デバイスによる非対称人工細胞膜間 の分子運動観察 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 35 回研究会 2017 年 5 月,東京
- 3. 神谷厚輝、大崎寿久、川野竜司、竹内昌治 細胞膜相互作用観察可能なジェット水流印加による リン脂質非対称膜リポソームの作製 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 35 回研究会 2017 年 5 月,東京
- 藤井 聡志、神谷厚輝、大崎寿久、三澤宣雄、竹内昌 治 マイクロ RNA を夾雑物存在下で検出する手法の開発 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 35 回研究会 2017 年 5 月,東京
- Koki Kamiya Artificial Cell Assembly Using Bottom-Up Approach 23rd iCeMS International Symposium"Emerging Science for Unlocking Cell's Secrets" 2017 年 5 月,京都
- 藤井聡志 人工細胞とその応用 理研 - 産総研「チャレンジ研究」セミナー 2017 年 5 月,和光

 Masahide Gotanda, Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, Satoshi Fujii, Nobuo Misawa, Norihisa Miki and Shoji Takeuchi SEQUENTIAL PRODUCTION OF VARIOUS TYPES OF ASYMMETRIC LIPID VESICLES USING PULSE JET FLOW TRANSDUCERS 2017

2017年6月,中国(台湾)

- 竹内昌治 異分野融合研究によるバイオハイブリッドシステム の創出 オープンイノベーションによる次世代ものづくりラ イフ・シンポジウム 2017 年 6 月,横浜
- 9. 伊沢 友佑、大崎 寿久、神谷 厚輝、藤井 聡志、三澤 宣雄、竹内 昌治、三木 則尚 微小円筒ウェルのスロッシングに対する表面性状及 び寸法の効果
   平成 29 年度電気学会センサ・マイクロマシン部門バ イオ・マイクロシステム研究会 2017 年 6 月, 姫路
- 藤井聡志
   人工細胞膜を用いたバイオセンシング技術 第 16 回バイオ・ライフサイエンス研究展 (BIOtech 2017)
   2017 年 6 月,東京
- 杉山博紀,風山祐輝,大崎寿久,竹内昌治,豊田太郎 マイクロ流体デバイスを用いた広域円形空間内への ベシクル捕捉と並列配置
   平成29年度日本分析化学会関東支部若手交流会 2017年7月,那須塩原
- Nobuo Misawa Odor Detection using an Insect Olfactory Receptor Reconstructed in Bilayer Lipid Membrane 2017 ISCE/APACE 2017 年 8 月, 京都
- 三澤宣雄
   人工細胞膜と膜タンパク質の応用研究
   2017 バイオセンサ夏季合同セミナー
   2017年9月,京都
- 14. 竹内昌治
   生体機能を直接利用するバイオハイブリッドデバイス
   ス
   豊田中央研究所講演会
   2017年9月,長久手

- Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, Ryuji Kawano, Shoji Takeuchi
   Reconstitution amount of membrane proteins was controlled by components of asymmetric lipid vesicles
   第 55 回日本生物物理学会年会 2017 年 9 月, 熊本
- Satoshi Fujii, Nobuo Misawa, Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi Detection of target microRNA in a crude sample by electrical measurement 第 55 回日本生物物理学会年会 2017 年 9 月, 熊本
- 17. 竹内昌治
   いきものづくりへの挑戦
   東進ハイスクール講演会 第7回フロンティアサロン
   永瀬賞授賞式
   2017年9月,東京
- 18. 大崎寿久
   マイクロデバイスを利用して、細胞膜を創る・測る・
   使う
   東京工業大学物理工学院 学術講演会
   2017年9月,東京
- 神谷厚輝、井上晃佑、大崎寿久、三木則尚、竹内昌治 細胞形状の模倣を目的とした非球体リポソーム作製 「細胞を創る」研究会 10.0 2017 年 10 月, 京都
- 20. 藤井聡志、信川亜衣子、大崎寿久、森本雄矢、神谷厚 輝、三澤宣雄、竹内昌治 揮発農薬を DNA アプタマーとナノポアで検知する 「細胞を創る」研究会 10.0 2017 年 10 月, 京都
- 21. Toshihisa Osaki, Satoshi Fujii, Koki Kamiya, Nobuo Misawa, and Shoji Takeuchi READY-TO-USE LIPID BILAYER DEVICE FOR SENSOR APPLICATIONS MicroTAS 2017 2017 年 10 月, アメリカ
- 22. Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, Satoshi Fujii, Nobuo Misawa, and Shoji Takeuchi FORMATION OF A GIANT LIPID VESICLE CONTAINING TWO TYPES OF LIQUID SOLUTIONS USING A THETA-GLASS CAPILLARY MicroTAS 2017 2017 年 10 月, アメリカ

- 23. Nobuo Misawa, Satoshi Fujii, Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, Atsufumi Ozoe, Yasuhiko Takahashi, and Shoji Takeuchi FORMATION OF DROPLET INTERFACE BILAYERS EQUIPPED WITH OPEN WATER SURFACE FOR ODORANT DETECTION USING OLFACTORY RECEPTORS MicroTAS 2017 2017 年 10 月, アメリカ
- 24. Michael McGlone, Alessandra Armetta, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi, Sunghee Lee CHARACTERIZATION OF MONOOLEIN BILAYER THICKNESS USING SPECIFIC MEMBRANE CAPACITANCE MicroTAS 2017 2017 年 10 月、アメリカ
- 25. Satoshi Fujii, Nobuo Misawa, Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, and Shoji Takeuchi HYDROGEL-BASED LIPID BILAYER SYSTEM FOR CONTINUOUS VAPOR DETECTION MicroTAS 2017 2017 年 10 月, アメリカ
- 26. DongChel Shin, Yuya Morimoto, Koki Kamiya and Shoji Takeuchi THREE-DIMENSIONAL LIPOSOME ASSEMBLY TOWARD SYNTHETIC TISSUE MicroTAS 2017 2017 年 10 月, アメリカ
- 27. 竹内昌治
  生体機能を直接利用するバイオハイブリッドシステム
  平成 29 年度 NEDO『TSC Foresight』セミナー(第2回)
  2017 年 11 月, 東京
- 三澤宣雄、藤井聡志、神谷厚輝、大崎寿久、竹内昌治 脂質が塗布された有孔隔壁の浸漬よる脂質二重膜の 形成
   第 34 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」
   シンポジウム
   2017 年 11 月、広島
- 29. 五反田真秀、神谷厚輝、大崎寿久、藤井聡志、三澤宣 な、三木則尚、竹内昌治 非対称人工細胞膜間における生体分子の拡散運動観 察のための手法開発 第8回マイクロ・ナノ工学シンポジウム 2017年11月,広島

- 30. 申東哲、森本雄矢、神谷厚輝、竹内昌治 遠心力を用いた3次元集積リポソームの形成 第8回マイクロ・ナノ工学シンポジウム 2017年11月,広島
- 31. 五反田真秀、神谷厚輝、井上晃佑、大崎寿久、藤井聡志、三澤宣雄、三木則尚、竹内昌治 多光子リソグラフィによって作製されたマイクロサイズ人工細胞骨格によるリポソーム変形 第8回マイクロ・ナノ工学シンポジウム 2017年11月,広島
- 72. 伊沢友佑、大崎寿久、神谷厚輝、藤井聡志、三澤宣雄、 三木則尚、竹内昌治
   溶液把持機構を有するポータブル生体ナノポア電気
   計測デバイスの開発
   第8回マイクロ・ナノ工学シンポジウム
   2017年11月、広島
- 33. 竹内昌治
   生体機能を直接利用したバイオハイブリッドデバイス
   ス第7回次世代フレキシブルエレクトロニクスシンポジウム
   2017年12月,東京
- 34. Shoji Takeuchi
  Lipid bilayer on a chip for biohybrid sensors
  6th Bioscience and Biotechnology International
  Symposium
  2018 年 1 月, 横浜
- 35. Yusuke Izawa, Toshihisa Osaki, Koki Kamiya, Satoshi Fujii, Nobuo Misawa, Norihisa Miki, and Shoji Takeuchi HANDHELD NANOPORE-BASED BIOSENSING DEVICE MEMS 2018 2018 年 1 月, イギリス
- 36. Toshihisa Osaki, Miharu Kaneko, Katsufumi Araki, Hideo Uehara, Toshiyuki Ura, Hajime Hirata,Koki Kamiya, Satoshi Fujii, Nobuo Misawa, and Shoji Takeuchi MONOLITHICALLY FABRICATED PERFORATED POLYIMIDE SEPARATOR FOR A PLANAR LIPID BILAYER DEVICE MEMS 2018 2018 年 1 月, イギリス
- Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, Satoshi Fujii, Nobuo Misawa, and Shoji Takeuchi

NANO-SIZED ASYMMETRIC LIPID VESICLES FOR DRUG CARRIER APPLICATIONS MEMS 2018 2018 年 1 月, イギリス

- 38. Satoshi Fujii, Nobuo Misawa, Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, and Shoji Takeuchi BREATHABLE FABRIC MEETS A LIPID BILAYER SYSTEM FOR RAPID VAPOR DETECTION MEMS 2018 2018 年 1 月, イギリス
- 39. Nobuo Misawa, Satoshi Fujii, Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, and Shoji Takeuchi SIDEWALL ELECTRODE-CHAMBER FOR LIPID BILAYER FORMATION SUITABLE FOR RAPID ACCESS OF ODORS TO LIPID MEMBRANEAN MEMS 2018 2018 年 1 月, イギリス
- 40. 竹内昌治
   細胞をつかうモノづくり
   山梨県立甲府南高等学校 サイエンスフォーラム
   2018 年 2 月, 甲府
- 41. 竹内昌治
   分子・細胞ハイブリッドロボティクス
   第1回分子ロボティクス年次大会(併催・分子ロボット倫理シンポジウム)
   2018年3月,仙台
- 42. 神谷厚輝、大崎寿久、藤井聡志、三澤宣雄、竹内昌治
   マイクロデバイスを用いたリポソーム作製
   第1回分子ロボティクス年次大会(併催・分子ロボット倫理シンポジウム)
   2018年3月,仙台
- 43. Nobuo Misawa, Satoshi Fujii, Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, Atsufumi Ozoe, Yasuhiko Takahashi, and Shoji Takeuchi
  Odorant sensing based on an artificial cell membranes and membrane proteins
  応用物理学会有機分子・バイオエレクトロニクス分科会
  2018 年 3 月,東京
- 44. 三澤宣雄
  IEEE MEMS2018, BioMEMS 関連
  有機機能材料のリソグラフィ加工コンソーシアム第
  27 回定例会
  2018 年 3 月, 京都

【記者発表、取材】

- 藤井聡志、竹内昌治
   「東大など、揮発した残留農薬を迅速・特異的に空気
   中から直接検地可能なセンサーを開発」
   日本経済新聞電子版, 2017 年 6 月 16 日
- 藤井聡志、竹内昌治
   「揮発した残留農薬を空気中から検地できる、非破壊
   検査可能なセンサを開発」
   マイナビニュース (Web), 2017年6月20日
- 藤井聡志、竹内昌治
   「センサー、食品傷つけず 残留農薬、高精度で検出
   東大など」
   日経産業新聞, 2017 年 6 月 30 日
- 4. 神奈川科学技術アカデミー(KAST)
   「生命の神秘に迫る「人工細胞膜」研究」
   選択出版,2017年12月1日
- 5. 竹内昌治、「"超嗅覚"驚異の生物センサー」(再放送) NHK World(Web), 2018 年 1 月 31 日

## 【特許】

- (1) 国内特許出願 4件
- (2) 国外特許出願 1件