

研究報告 2020 (KISTEC Annual Research Report,2020)

【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.....	161
	グループリーダー 竹内 昌治
◆イオンチャネル機能評価システムを用いた細胞内イオンチャネルのイオン電流計測.....	163
	三村 久敏、杉浦 広峻、山田 哲也、大崎 寿久、竹内 昌治
◆確率論的バイオセンサの検出迅速化に関する研究.....	166
	大崎 寿久、伊藤 嘉玖、神谷 厚輝、山田 哲也、三木 則尚、竹内 昌治
◆難溶性の匂い物質検出に向けたガス導入機構開発.....	169
	山田 哲也、杉浦 広峻、三村 久敏、大崎 寿久、竹内 昌治
◆イオンチャネルの解析のための信号処理技術開発.....	173
	杉浦 広峻、大崎 寿久、山田 哲也、三村 久敏、竹内 昌治
◆業績.....	177

「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面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ー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)電氣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、トランスポーターの輸送現象や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として、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し、膜タンパク質の調製・導入法の開発として、イオンチャネルやGPCR、トランスポーター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している。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。2015年度から参画しているNEDO事業および2018年度に開始した地域イノベーション・エコシステム形成プログラムでは、膜タンパク質の機能利用による人工細胞膜センサに関わる研究開発を行っている。膜タンパク質である嗅覚受容体に代表されるように、生体のもつセンサは優れた感度・特異性をもつことが知られており、膜タンパク質をセンサ素子として活用するための研究開発を実施している。周辺技術も含め、小型・高性能センサの実用化技術の開発を目標としている。

1. 2019年度の研究目的

実用化実証事業7年目となる2019年度は、イオンチャネル機能評価システムの開発では、事業化に向けた研究開発を推進することを目的とした。一方で、膜タンパク質を利用したセンサ開発に関しては、開発を続けてきた匂いセンサ要素技術を統合し、プラットフォーム基盤技術として確立することを目指した。

(1) イオンチャネル機能評価システムの開発

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し、その膜に再構成する標的膜タンパク質の活性を保持したまま機能解析を可能とするシステムである。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な技術の開発を目標として研究開発を行っている。

2019年度は、創薬スクリーニングプラットフォームの事業化に向けた研究開発を推進するため、スクリーニングシステムの各部品について量産化技術の詳細な検討を行うことを目標とした。また、開発システムの実用性を評価するため、イオンチャネルに対する化合物の活性評価を確認する一連の実証試験を行うことを目標とした。

(2) 膜タンパク質を利用したセンサ開発

膜タンパク質は、匂いや味などの化学量センサとしての

役割を生体内で担っており、その感度や特異性は人工的なセンサに比べ非常に高いことが知られている。こうした膜タンパク質の機能を活用することができれば、小型で高性能のバイオセンサを実現できると考えられる。

これまでの研究成果を通じてマイクロチップ上での脂質二重膜の形成が再現良くできるようになり、膜タンパク質機能の解析技術が発展したことで、膜タンパク質機能を利用する研究が可能となりつつある。2019 年度が最終年度となった NEDO 事業では、昆虫の嗅覚受容体を利用したヒトの汗の匂いを検知するセンサの開発に取り組んできた。また、2018 年度からは人工細胞膜センサの要素技術開発を進めるため、地域イノベーション・エコシステム形成プログラムに参画している。

2019 年度は、標的物質を高感度・高確度で検出するための基盤技術および標的物質濃度を実時間検出するための要素技術開発を目的とした。

2. 2019 年度の研究成果

(1) イオンチャネル機能評価システムの開発

前年度、ベンチャーキャピタルであるウエルインベストメント社と共同で JST 大学発新産業創出プログラム（START）の採択を受けた。同プログラムでは、マイクロチップ上に細胞膜を簡便・再現良く形成するコア技術を利用し、細胞内イオンチャネルに対する薬剤候補物質の評価技術確立することを目標とする。細胞内イオンチャネルを標的とした創薬向けの高品質なスクリーニングサービスの実現によってベンチャーを設立し、新たな創薬市場の創出を目指している。

イオンチャネル計測チップの量産化技術に関しては、東レエンジニアリング社と共同開発を進めている。脂質二重膜を担持する部品（セパレータ部品）について、基礎性能評価を終了した。また、チップのベース部品に関しても量産化を目的とした大量試作を行った。電極材料に関しても設計・外注試作を行った。これら部品を組み立て、量産型の試作チップを完成させた。精製したイオンチャネルを用いて試作チップの性能評価を実施しているところである。

計測システムに関しても、計測の全自動化を目標として、装置試作を行った。イオンチャネルは、チップ上の脂質二重膜に再構成することで機能評価を行うが、脂質二重膜は液滴を滴下することで形成できる。計測チップに対して液滴分注操作を行うロボットにより、脂質二重膜を再現良く形成することを目標として条件検討を行っている。また、計測チップから計測装置に接続するためのマウンタユニットの開発も行った。

事業化においては、イオンチャネル計測システムの実用性について実証実験を行い、課題を把握する必要がある。2019 年度は、新たな標的イオンチャネルの選定と作製から始め、標的イオンチャネルの既知化合物を用いた基礎評価、未知化合物を用いた活性評価の、一連の実証試験を実施した。

成果展開として、外部研究期間との共同研究については 2019 年度も継続して実施している。また、アウトリーチ

活動として、大学院生向けの講義のほか、小中学生を対象とした理科実験室を開催し、細胞膜に関する実験や最先端研究の紹介を行った。

(2) 膜タンパク質を利用したセンサ開発

昆虫の嗅覚受容体を用いた匂いセンサの開発については、これまでの研究成果を受け、センサプラットフォームとしての基盤技術の確立に注力した。特に、標的物質の濃度変化を高感度・高確度・実時間検出するための研究開発を実施した。

まず、標的匂い物質の濃度変化を観測するためのデバイス開発を行った。匂い物質は、気中から嗅覚受容体が浸漬するバッファ溶液中に溶解しなければ検出されない。溶液中への溶解を迅速に効率良く行うため、嗅覚受容体が浸漬する液滴に接するように標的ガスを導入できるマイクロ流路を配置した。このマイクロ流路に匂い物質を混合したガスを導入すると、静置条件に比べて溶解速度が格段に向上した。また、匂い物質を含まない標準ガスを導入することで、液滴中の匂い物質を除去できることも明らかとなった。

次に、匂い物質の検出確度を向上させるため、上記デバイスの並列化を行った。脂質二重膜を形成するウェル 16 個と、各ウェルにガス導入を行うマイクロ流路を対称となるようにデバイスを設計・作製した。16 ウェル並列化により、1 ppm の標的匂い物質に対する 10 分以内の検出確率が 90% 超となり、劇的に向上させることができた。

また実時間検出を実現するため、センサの信号を匂い物質の濃度に変換する信号処理方法の開発を行った。センサ信号を連続的に匂い濃度に変換するには、信号を統計物理的なモデルに回帰させて、そのパラメータを推定していくアルゴリズムが必要となる。そこで、拡張カルマンフィルタのアルゴリズムに、ロジット分布を仮定したイオンチャネルの応答モデルを組み込むことで、実時間で定量的な匂い物質濃度の検出方法を実現した。

(3) 共同研究による成果

受託研究に関して、東京大学浦野泰照教授と行っている革新的先端研究開発支援事業（CREST）では疾患特異的代謝活性の探索を、開発したデバイスを用いて腹部大動脈瘤の臨床検体を対象として行った。また、2018 年度より東京大学白髭克彦教授の CREST 研究である機能的人工染色体の設計と利用のための革新的研究に参画している。人工細胞核を封入したリポソームを作製するため、東京大学大杉研究室と共同で細胞核を形成する予備実験を開始した。

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。

イオンチャネル機能評価システムを用いた 細胞内イオンチャネルのイオン電流計測

三村 久敏、杉浦 広峻、山田 哲也、大崎 寿久、竹内 昌治

1. はじめに

1. 1 創薬ターゲットとしてのイオンチャネル

イオンチャネルは全ての細胞の細胞膜と細胞小器官の膜に存在する膜タンパク質である。脂質二重膜を貫通することにより、特定の無機イオンだけを通すことが可能なイオン選択性のある小孔を形成する。生体内においては、膜で隔てられたコンパートメント間のイオンの流出入を制御し、細胞間や細胞内において電気的なシグナルを伝える役割を果たしている。すなわち、イオンチャネルは、膜電位（膜の片側とその反対側に存在する陽イオンと陰イオンの濃度差により生じる電位）の確立と調節を行う。これには、神経細胞や筋肉で電気的指令として利用される膜電位の変化（活動電位）や、感覚細胞で物理化学的刺激によって電気的シグナルとして生じる膜電位の変化（受容器電位）などが含まれる。イオンチャネルは生体機能の維持に基本的な役割を果たしているだけでなく、神経疾患、心血管疾患、代謝異常疾患、免疫疾患、癌といった様々な疾病の創薬ターゲットとしても重要であると考えられている[1]。タンパク質をコードするヒト遺伝子の数は 21,000 前後と推定されているが、そのうちイオンチャネルは少なくとも 400 種以上が存在し、膜タンパク質の中では GPCR (G protein-coupled receptor; 約 800 個) に次いで 2 番目に大きな創薬ターゲットとなっている[2]。創薬に関連したヒト遺伝子の調査結果によると、重要な創薬ターゲットであるヒト遺伝子ファミリーの 19% がイオンチャネルであり、12% が GPCR である[3]。しかし、これらのヒト遺伝子ファミリーをターゲットとした薬剤のうち、イオンチャネルをターゲットとしたものは 18% にとどまり、GPCR をターゲットとしたものは 33% に達する。このことは、イオンチャネルは様々な疾病に関わる重要な創薬ターゲットとして認識されているものの、その薬剤探索は期待通りには進んでおらず、今なお困難な研究対象であることを示している。

1. 2 イオンチャネル機能評価システム

イオンチャネルの研究が困難である理由の一つとして、その標準的活性測定法であるパッチクランプ法の実験難易度が高い点が挙げられる。この方法は、細胞膜に押し当

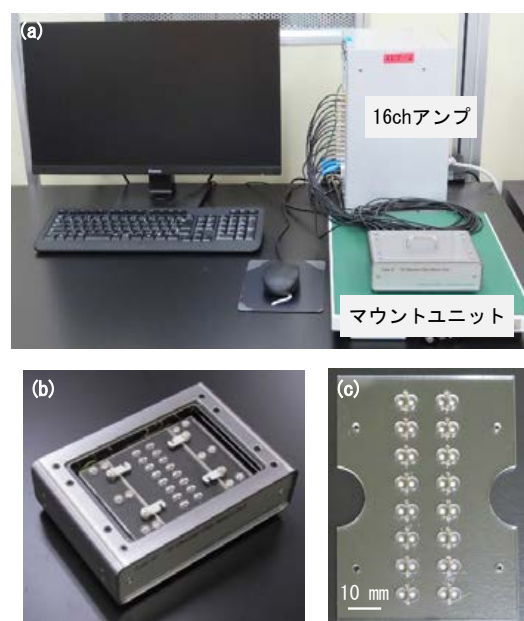


図 1 (a) イオンチャネル機能評価システムの概観。人工細胞膜チップのマウントユニット、増幅器（アンプ）、データ記録用 PC から構成される。(b) 人工細胞膜チップをセットしたマウントユニット。(c) 人工細胞膜チップ。16 のダブルウェルがあり、複数のイオン電流の同時計測が可能である。

てた微小ガラス管を高抵抗で密着させ、開口先端部の微小膜領域に含まれるイオンチャネルをイオンが透過することで生じる電流を計測する手法である。高度な技術と経験を要し、通常の生化学実験を行う研究室が導入するにはハードルの高い方法である。また、スループットも低い。

これまでに当研究室では、人工平面リン脂質二重膜を利用したイオンチャネル機能評価システムを開発してきた(図 1) [4-5]。複数のイオン電流の同時計測が可能な人工細胞膜チップとその計測システムを用いることにより、イオンチャネルのイオン電流計測と薬剤スリーニングを効率的に行うことを目指している。人工細胞膜チップのフォーマットは、通常の生化学実験で用いられるサイズとボリ

ュームに対応し、サンプルを加えるウェルには上方からアクセスできる。パッチクランプ法に比べて実験操作は簡便であり、通常の生化学実験を行う研究室でも容易に導入可能であるほか、ウェルへの薬剤の添加など、汎用性も高い。さらに、構造がシンプルであるので、ロボットインジェクションシステムを適用した全自動化も期待できる。

1. 3 液滴接触法

イオンチャネルを組み込むために必要となる人工平面リン脂質二重膜は、当研究室で考案された液滴接触法[6]を利用し、人工細胞膜チップ上に形成可能である。液滴接触法では、リン脂質二重膜は2つの液滴の界面に形成される。リン脂質を分散した有機溶媒中に水滴を滴下し、油中水滴（液滴）を形成させると、両親媒性であるリン脂質は、リン酸を含む親水性部分を水滴に向け、脂肪酸を含む疎水性部分を有機溶媒に向ける。これにより、有機溶媒と水滴の界面には、リン脂質が向きを揃えて並んだ単分子膜が形成される。このような液滴を2個形成し、適切な距離で接触させることにより、液滴表面にある単分子膜の脂肪酸同士の間で疎水性相互作用を通して、液滴間の界面にリン脂質二重膜が形成される。液滴接触法を利用した人工細胞膜チップを用いることにより、貼り合わせ法やペインティング法といった従来法に比べ、人工平面リン脂質二重膜を容易に再現性よく形成できる。

1. 4 細胞内イオンチャネル

前述のパッチクランプ法は、細胞膜に局在するイオンチャネルのイオン電流計測を得意とするが、微小ガラス管を細胞内にある細胞小器官へ到達させるには高度な技術を要するため、これらの膜に局在する細胞内イオンチャネルのイオン電流計測は容易ではない。そのため、細胞内イオンチャネルもまた重要な創薬ターゲットであるものの、イオン電流の計測を指標として薬剤スクリーニングを行うことは難しかった。細胞内イオンチャネルの薬剤探索は、細胞膜に局在するイオンチャネルほどは進んでおらず、今後その需要は大きく拡大するものと考えられる。そこで本研究では、当研究室で開発されたイオンチャネル機能評価システムについて細胞内イオンチャネルへの適用を検討した。

1. 5 ヒト TRPML1 チャンネル

今回、イオン電流の計測対象とする細胞内イオンチャネルには、ヒトの TRPML1 (transient receptor potential mucolipin 1) を選んだ。これは、ヒトでは27個のイオンチャネルを含む TRP チャンネルファミリーに属する。これらのイオンチャネルは、いずれも陽イオンチャネルであり、痛みや温度の感受、Ca²⁺を介した細胞応答、カルシウムやマグネシウムの恒常性維持といった役割を担い、様々な刺激や生理学的リガンドによって活性化される。TRPML1 は分子量約 65,000 の単量体が4量体を形成し、Ca²⁺、K⁺、Na⁺を含む多様な陽イオンを透過できる[7]。主に細胞内のリソソームと後期エンドソームに局在し、これらのオルガ

ネラの正常な機能に必須である。TRP チャンネルファミリーは様々な疾患に関連しており、ヒトの TRPML1 の遺伝子の変異もまた、重篤な疾患のムコ多糖症 IV 型を引き起こす[8]。これは、指定難病のライソゾーム病の一種であり、精神運動発達遅滞、視覚障害を伴う。TRPML1 はまた、同じくライソゾーム病であるニーマン・ピック病 C 型のほか[9]、アルツハイマー病への関与も示唆されている[10]。

本研究ではまず、ヒトの TRPML1 の発現を培養細胞で行い、単離・精製を行った。次に、精製した TRPML1 を人工細胞膜チップ上に形成した平面リン脂質二重膜に導入し、そのイオン電流を計測した。その際、TRPML1 のリン脂質二重膜への導入と、本システムによる薬剤スクリーニングへの適用を確認するため、TRPML1 の特異的活性化剤である ML-SA1 (Mucolipin synthetic agonist 1) を添加し、その効果を確認した。

2. 実験方法

2. 1 ヒト TRPML1 チャンネルの調製

ヒトの TRPML1 の発現には、ヒト浮遊性培養細胞 (FreeStyle 293-F) を用いた。哺乳類発現ベクターには pcDNA3.1 を用い、化学合成したヒトの TRPML1 の遺伝子を組み込んだ。アフィニティー精製に利用するため、TRPML1 の N 末端に FLAG タグを付加するための配列を加えた。培養細胞は、完成した発現ベクターを用いて一過性トランスフェクションを行い、一定時間培養して TRPML1 を発現させた。細胞は回収後、超音波処理または窒素ガス細胞破碎器を用いて粉砕し、低速遠心で未粉砕細胞や細胞核を含む沈殿を除き、細胞膜や細胞小器官の膜を含む膜画分を上清に回収した。膜画分には界面活性剤を加え、TRPML1 を含む膜タンパク質を可溶化し、超遠心後の上清に回収した。可溶化画分からの TRPML1 の精製は、Anti-FLAG M2 アフィニティーゲルを用いて行った。可溶化画分にアフィニティーゲルを加えてインキュベートし、カラムにパックして回収した。バッファーで洗浄後、FLAG ペプチドを含むバッファーで TRPML1 を溶出した。TRPML1 は、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いてさらに精製し、イオン電流計測のサンプルとした。

2. 2 ヒト TRPML1 チャンネルのイオン電流計測

ヒトの TRPML1 のイオン電流は、人工細胞膜チップとその電気計測システムを用いて計測した。まず、人工細胞膜チップをマウンターにセットし、リン脂質 (20 mg/ml) を分散したオイル (*n*-Decane) を8の字型ウェルの両方に滴下した。次に、精製した TRPML1 を希釈して加えた水溶液を両方のウェルに滴下した。これにより、2つの液滴間の界面にリン脂質二重膜の形成が可能となる。リン脂質二重膜に TRPML1 分子が導入されると、イオンチャネル電流の計測が開始される。計測を開始してから一定時間後に、TRPML1 の特異的活性化剤である ML-SA1 を両ウェルの液滴の水溶液中に加えた。

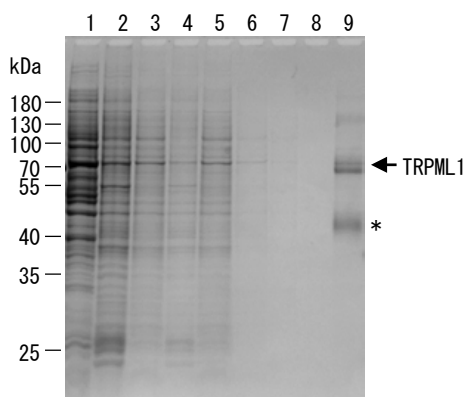


図2 精製したヒトの TRPML1 の SDS-PAGE 解析。電気泳動後、CBB (Coomassie Brilliant Blue) でタンパク質を染色した。1 細胞全体, 2 膜画分, 3-4 膜画分を界面活性剤で可溶化した上清 (3) と沈殿 (4), 5-9 FLAG タグ精製のフロースルー (5), 洗浄 (6-8), 溶出画分 (9)。アスタリスク (*) は、TRPML1 の分解産物を示す。

3. 結果と考察

本研究で調製した TRPML1 を SDS-PAGE (SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動) で分析した結果を図2に示す。精製操作の各ステップのサンプルに含まれるタンパク質を分子量によって分画し、色素で染色することによって検出している。バンドパターンから、TRPML1 のタンパク質を培養細胞から高純度に精製できたことがわかる。ゲル中には TRPML1 のバンドが複数本見える。動物細胞で発現されたタンパク質は不均一な糖鎖修飾を受けることが多く、TRPML1 もまた糖鎖修飾を受け、分子量が僅かに異なるイオンチャネルが合成されたことを示している。50 kDa 付近に見えるバンドは、TRPML1 の分解産物である。TRPML1 は、細胞内の消化器官であるリソソームに局在するため、精製の過程で一部が分解されたものが含まれることが知られている[11]。

精製した TRPML1 のイオン電流を、人工細胞膜チップとその電気計測システムを用いて計測した結果を図3に示す。TRPML1 の特異的活性化剤である ML-SA1 を加えることにより、計測されたイオン電流が変化していることがわかる。ML-SA1 の添加前は、電気信号は closed の位置を多く占め、イオン電流の流れる頻度は低くなっている。このとき、TRPML1 のイオン透過孔は閉じている確率が高いと考えられる。ML-SA1 の添加後は、電気信号は open の位置を多く占めるようになり、イオン電流の流れる頻度は高くなっている。このとき、TRPML1 は ML-SA1 によって活性化され、イオン透過孔は開いている確率が高くなったと考えられる。以上の結果から、観察されたイオン電流はヒトの TRPML1 に由来するものであり、創薬スクリーニングで重要となる薬剤添加の効果も確認可能であると考えられる。

本研究では、当研究室で開発されたイオンチャネル機能評価システムを用い、ヒトの TRPML1 をモデルタンパク質として、細胞内イオンチャネルのイオン電流計測を行っ

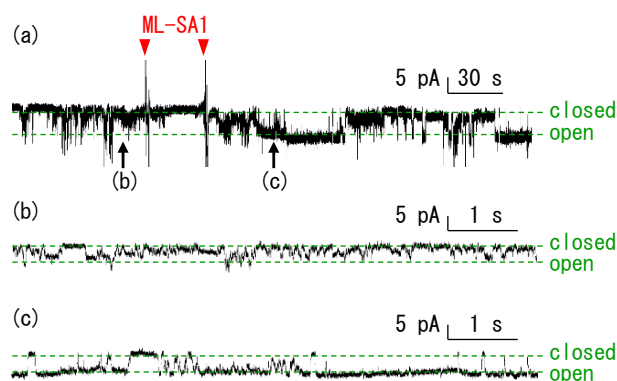


図3 (a) イオンチャネル機能評価システムを用いて計測したヒトの TRPML1 のイオン電流。TRPML1 の特異的活性化剤である ML-SA1 を計測の途中で加えている。(b, c) (a) の (b) と (c) 部分の拡大図。ML-SA1 の添加前 (b) に比べ、添加後 (c) では、イオンチャネルが開いていることを示す電気信号 (open) が、閉じていることを示す電気信号 (closed) に比べて増えていることがわかる。

た。ヒト浮遊培養細胞で発現し、単離・精製した TRPML1 は、人工細胞膜チップ上に形成された平面リン脂質二重膜に導入され、特異的活性化剤 ML-SA1 によって活性化されるイオン電流が観察された。今後は、ヒトの TRPML1 のより詳細な解析を進めるとともに、解析対象とする細胞内イオンチャネルの探索及び拡充を図ることにより、イオンチャネル機能評価システムの実用化並びにこれを用いた事業化に向けて検討を進めていく。

【謝辞】

本研究は、国立研究開発法人科学技術振興機構 大学発新産業創出プログラム (JPMJST1811) による支援、日本学術振興会 科研費基盤研究 B (17H02758) の助成を受けて行われました。ここに記して感謝申し上げます。

【参考文献】

- [1] Wulff H, et al., *Nat Rev Drug Discov* 2019, 18, 339-357.
- [2] Hutchings C J, et al., *mAbs* 2019, 11, 265-296.
- [3] Santos R, et al., *Nat Rev Drug Discov* 2017, 16, 19-34.
- [4] Kawano R, et al., *Sci Rep* 2013, 3, 1995.
- [5] Kamiya K, et al., *Sci Rep* 2018, 8, 17498.
- [6] Funakoshi K, et al., *Anal Chem* 2006, 78, 8169-8174.
- [7] Waller-Evans H, et al., *Biochem Soc Trans* 2015, 43, 442-446.
- [8] Bargal R, et al., *Nature genetics* 2000, 26, 118-123.
- [9] Shen D, et al., *Nat Commun* 2012, 3, 731.
- [10] Zhang L, et al., *Cell Physiol Biochem* 2017, 43, 2446-2456.
- [11] Schmiede P, et al., *Nature* 2017, 550, 366-370.

確率論的バイオセンサの検出迅速化に関する研究

大崎 寿久、伊藤 嘉玖、神谷 厚輝、山田 哲也、三木 則尚、竹内 昌治

1. はじめに

1. 1 細胞膜を用いたバイオセンサ

細胞膜は、脂質二重膜と膜タンパク質から構成されており、その厚さはわずか5 nmほどである。脂質二重膜は細胞内外を隔てる役割を果たしている。一方、膜タンパク質は細胞内外への物質輸送や情報の伝達に関与しており、細胞の生理学的機能に対する寄与は大きい。そのため、膜タンパク質の機能評価は創薬においても不可欠になっている。そうした中で、膜タンパク質の機能を細胞外で評価するための方法として、マイクロチップ上で脂質二重膜を形成し、細胞膜を人工的に再現する人工膜法の研究開発が行われてきた。

膜タンパク質の中で、リガンド結合型のイオンチャネルはリガンド（基質分子）の結合によりイオンチャネルを通過するイオン電流の調節を行っている。近年、このリガンド結合型イオンチャネルを極小のセンサとして利用する研究が注目されている。リガンド1分子の結合を検出する感度、リガンド分子に対する高い特異性、リガンドの結合を毎秒1千万個のイオン電流に変換する高い変換・増幅効率といった優れた特長により、次世代のバイオセンサ素子への応用を期待されている[1,2]。

1. 2 液滴接触法

細胞外で脂質二重膜を形成する方法は、ガラスキャピラリー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など、従来、多数報告がある[1,3]。

液滴接触法は、2つの油中水滴の界面に脂質二重膜を形成する手法である。脂質を分散した油中に、水滴を滴下するとその表面に脂質分子の単分子膜が自発的に形成する。この水滴を2つ接触させることで、接触界面が脂質二重膜となる[4]。液滴滴下操作のみの単純な手順で、液滴サイズと距離を規定することで迅速に再現良く脂質二重膜を形成できる。本方法は他の方法に比べてマイクロチップの構造も比較的単純であり、またポンプなどの周辺機器も不要であることから小型化や携帯化、使い捨てが重要なセンサ用途に適すると考えられる。

1. 3 確率論的バイオセンサの課題

上述の通り、人工細胞膜を用いたセンサは、物質に対する特異的な相互作用を利用するため、標的特異性に優れる。また、電気的な計測と組み合わせることで、標的物質1分子の結合を検出することも可能である。分子レベルの大き

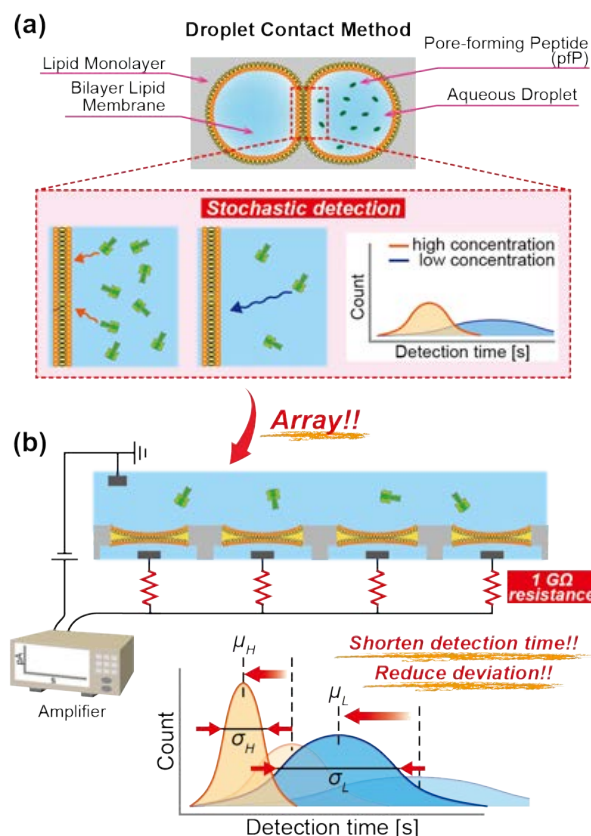


図1 並列化センサによる確率論的センサの検出時間の迅速化。(a) 人工細胞膜センサにおいて、低濃度の標的物質の検出には時間を要するという課題がある。(b) 並列化により、検出時間やそのバラツキを抑えられると考えられる。

さのセンサが有する高い特異性と感度は、健康診断や環境計測など、その場で迅速・簡便・正確に計測結果を示すことが必要な分野での応用が期待される。

しかしながら、人工細胞膜を利用したセンサにおいては、検出時間が一定しないという課題がある。これは標的物質の検出において、1分子の確率論的な現象に依存しているためである。検出過程はデジタルに0または1として捉えられる一方で、1度の検出過程からは定量的な濃度を導くことはできない[5-7]。そこで本研究では、人工細胞膜センサの課題である迅速検出の課題について、並列化に関する研究を行った。

2. 実験方法

2. 1 並列化のための脂質二重膜モジュール

人工細胞膜の並列化において、本研究では脂質二重膜に対して直列に $1\text{ G}\Omega$ の抵抗器を接続した。人工細胞膜センサでは、膜に対して定電圧を印加し、電流変化を観測することで標的物質の検出を行う。例えばイオンチャネルやナノポアの場合、標的物質との相互作用によりイオン電流に変化が生じる。一方で、脂質二重膜が破壊されると、ピコアンペアレベルの観測電流に比べて大電流が発生するため、計測器（増幅器）の計測可能な電流上限値を超え、観測ができなくなってしまう。並列化を行う場合も、膜破壊が並列化した膜の 1 つで生じると観測ができなくなるため、膜 1 つに対して 1 つの計測器を配置する必要があった。抵抗器を挿入することにより、脂質二重膜が破壊された場合でも電流を抑制できる。並列した場合でも、膜破壊により計測不能とならず、1 つの計測器で観測することができる。そこで、本研究では脂質二重膜ウェルと $1\text{ G}\Omega$ の直列抵抗器を合わせてモジュール化し、これを並列化したセンサシステムを構築した。

本研究で使用した並列化デバイスを図 2 に示す。デバイスは、16 個のマイクロ孔を有する回転プレートと 16 ウェルの固定プレートとからなる。固定ウェルの底面には銀/塩化銀電極が挿入されており、回転プレートにはグランド電極を設置した。固定ウェル側の電極には、直列して $1\text{ G}\Omega$ の抵抗器を配置している。ここでは、脂質二重膜モジュールを 4 つ並列化した場合と、個別に計測器に接続した場合とで比較実験を行った。

2. 2 ポア形成ペプチドの検出

脂質二重膜は下記の手順で形成した。まず、固定プレートのウェルそれぞれに 1 M KCl バッファ溶液を滴下し、その上に脂質溶液を滴下した。次に、回転プレートを固定プ

レート上に静置し、バッファ溶液を添加した。固定プレートと回転プレートのマイクロ孔が一致するように、回転プレートを回転することで脂質二重膜が形成される。膜破壊が起こった場合、回転プレートを回転することで膜の再形成を行うことができる。

本研究では、ポア形成ペプチド (pFP) を標的物質として、並列化による検出時間の迅速化について検証した。ここでは、pFP が形成するポアは $1\text{ G}\Omega$ の抵抗値を示す。脂質二重膜にポアが一つ形成されると、 100 mV に対して 100 pA の電流が観測される。

図 2b は、直列抵抗器の有無による電流変化の例を示している。抵抗器がない場合、膜の破壊によりモジュールの抵抗値はほぼゼロと見なされる。並列化デバイスにおいて、計測器 1 つで観測する場合、電流値は各モジュールの和として表れるため、脂質二重膜のいずれか一つが破壊されると電流のオーバーフローが生じる。一方で、抵抗器が挿入されている場合、電流のオーバーフローを防ぎ、観測を継続することが可能となる。

3. 結果と考察

図 3a に 4ch 並列化デバイスにおける電流の観測結果を示す。 100 mV の印加電圧に対して、 100 pA のステップ電流 (ii) と、 50 pA のステップ電流 (iii および iv) が観測された。iii および iv は、 $1\text{ G}\Omega$ のポア形成と $1\text{ G}\Omega$ の直列抵抗の和 ($2\text{ G}\Omega$) による電流上昇値と一致していることから、pFP の検出を示している。一方で、ii については、膜破壊が 4ch のいずれかで生じたためと考えられる。

並列化による検出時間の迅速化について、図 3b に示す。検出時間は、脂質二重膜形成後に最初の pFP 検出までに要した時間とした。図は、30 秒までに検出できた結果についてヒストグラムとしてまとめたものである。4ch 並列化デバイスと、1ch デバイスの検出時間の平均値と標準偏差

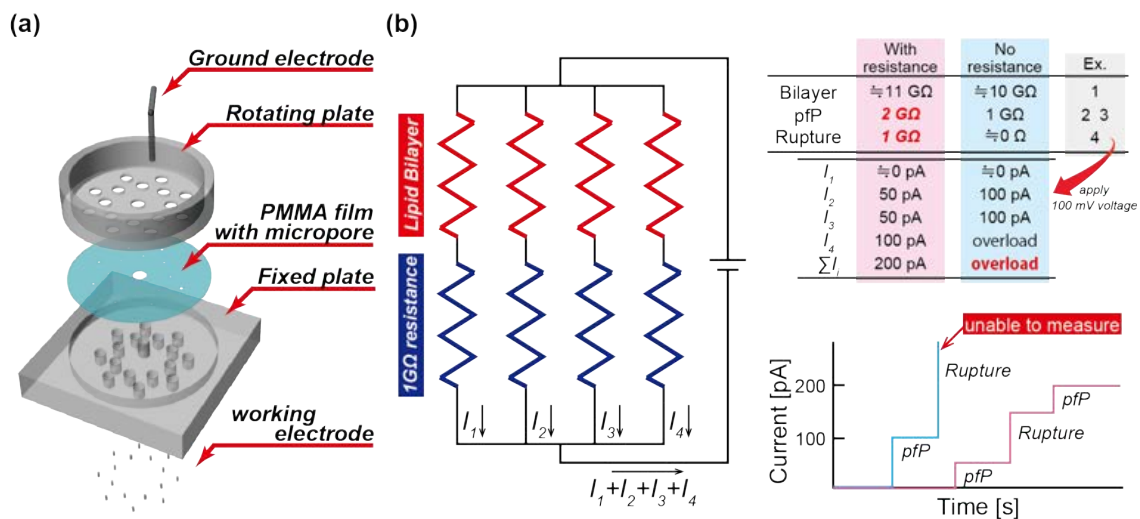


図 2 (a) 並列化デバイスの分解図。(b) 脂質二重膜と直列抵抗器のモジュールを 4 つ並列化した場合の回路図。計測器では、4 つのモジュールの和として電流を観測する。右図は、pFP の検出や膜破壊が 4 つのモジュールで起こった場合の、電流値の変化。直流抵抗器が挿入されている場合（ピンク）と挿入されていない場合（青）。

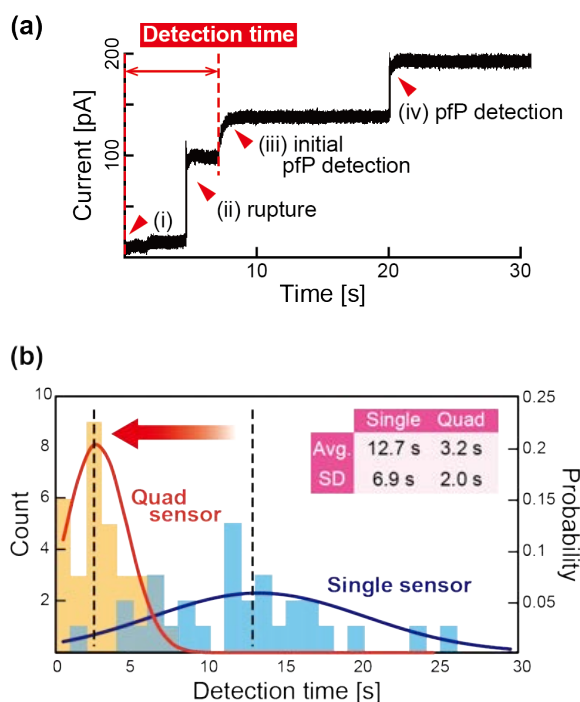


図3 (a) 4ch 並列デバイスによる pfP 検出結果の代表例。赤矢尻 (ii~iv それぞれ) において、4 つの脂質二重膜のいずれか一つで変化が生じたことを示している。(b) pfP 検出時間に関するヒストグラム。1ch デバイス (青) に比べ、4ch 並列化デバイス (オレンジ) で検出時間の短縮化が実現できた。

の結果を示す。並列化により検出時間は短縮化され、また分散についても抑制されることが分かる。並列化が pfP の検出確率を高め、限られた時間内での検出に対して有効であることが示された。

本研究では、脂質二重膜に直列抵抗器を挿入するモジュール化によって並列化デバイスを作製し、並列化による確率論的センサの迅速化に関する研究を行った。このモジュール化により、計測器のリソースを増やすことなく、迅速化を達成できることが明らかとなった。検出時間の短縮は、センサの定量性獲得にも寄与すると考えている。

【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・エコシステム形成プログラム、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】

- [1] 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] 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.
- [4] 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.
- [5] M. Wanunu, W. Morrison, Y. Rabin, A. Y. Grosberg, and A. Meller, "Electrostatic focusing of unlabelled DNA into nanoscale pores using a salt gradient", *Nat. Nanotechnol.*, vol. 5, pp. 160–165, 2010.
- [6] J. Ivica, P. T. F. Williamson, and M. R. R. de Planque, "Salt Gradient Modulation of MicroRNA Translocation through a Biological Nanopore", *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 17, pp. 8822–8829, 2017.
- [7] K. J. Freedman, L. M. Otto, A. P. Ivanov, A. Barik, S-H. Oh, and J. B. Edel, "Nanopore sensing at ultra-low concentrations using single-molecule dielectrophoretic trapping", *Nat. Commun.*, vol. 7, p. 10217, 2016.
- [8] F. Tomoike, T. Tonooka, T. Osaki, and S. Takeuchi, "Repetitive formation of optically-observable planar lipid bilayers by rotating chambers on a microaperture", *Lab Chip*, vol. 16, pp. 2423–2426, 2016.

難溶性の匂い物質検出に向けたガス導入機構開発

山田 哲也、杉浦 広峻、三村 久敏、大崎 寿久、竹内 昌治

1. はじめに

自然界に目を向けてみると生物はフェロモンといった匂いを嗅覚受容体により識別し一種の情報として検出し処理している[1]。その匂いを検出するメカニズムは哺乳類と昆虫では異なる[2]。哺乳類においては匂い分子が嗅覚受容体と結合することで G タンパク質が活性化され、アデニル酸シクラーゼを動かし ATP を環状 AMP へと反応させる。作られた環状 AMP がイオンチャンネルに作用し、細胞質へのイオン流入が起こり、脱分極化による電気シグナルが脳に送られる。

上記の通り、哺乳類の匂い検知メカニズムは複数の反応過程が含まれており極めて複雑である。一方で、昆虫などの無脊椎動物の嗅覚受容機構は哺乳類の検知メカニズムと比べ反応プロセスが少なく、匂い分子が嗅覚受容体と結合するとそれに伴いイオンチャンネルが開く仕組みになっているとされる。上記の通り、嗅覚受容体は特定の匂いに応答しイオン電流を流すゲートの役割を果たしており、工学的な観点からは嗅覚受容体は高い感度と選択性の両方を兼ね備えた優れたセンサ素子といえる。これまで開発されてきた酸化半導体型を利用した匂いセンサと比べ、嗅覚受容体を利用するセンサは高い感度と選択性が期待されており、従来の匂いセンサでは難しかった匂い診断や爆発物・麻薬検知、食品の品質管理、環境評価などの幅広い分野への応用が期待できる[1], [3]。

我々は人工細胞膜を容易に形成できる液滴接触法を基盤技術とし、NEDO 次世代人工知能・ロボット中核技術開発のプロジェクトの一つとして、人検知に向けた嗅覚受容体を用いた匂いセンサの開発を進めてきた（図 1）。液滴接触法の特徴は簡便かつ再現性高くにハイスループットで人工細胞膜を形成させることである[4]。汗の匂い成分の一つであるオクテノールに特異的かつ高感度に応答する嗅覚受容体を脂質二重膜に再構成させることで人工細胞膜センサを開発してきた[5]。ここで利用した嗅覚受容体は蚊（*Aedes albopictus*）[6]の嗅細胞で発現し、人の汗に応答することが知られている。この嗅覚受容体を合成するための方法は二つあり、その一つは細胞内に嗅覚受容体を発現させる方法と細胞を使わない無細胞発現系で合成する方法である[7]。

人工細胞膜を利用した匂いセンサ開発における課題は、多段階の匂い濃度変化を検出すること、そして、センサとしての感度と応答性を向上させることであった。これらの課題の根底には難溶性の匂い物質をいかに効率的に液滴へ導入するかという問題があった。これは液滴接触法によ

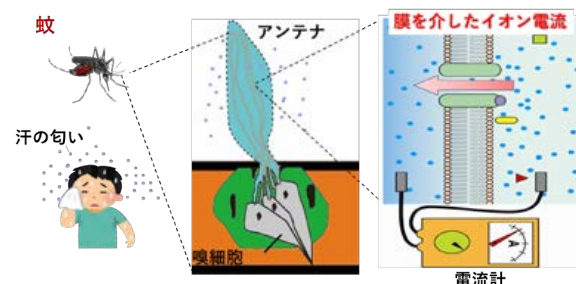


図 1. 蚊の嗅覚受容体を利用した人工細胞膜匂いセンサ。蚊は汗の匂い成分であるオクテノールを検知できる。蚊の嗅覚受容体を人工膜に再構成させてセンサとして利用する。

り人工細胞膜を形成させた場合には、嗅覚受容体は 2 つの溶液に挟まれた状態になり、水に対して難溶性の匂い物質は嗅覚受容体に到達するのが難しくなる。さらには、人工細胞膜を構成するためにデカンなどの油に使用し、匂い物質はその油に溶解してしまい、嗅覚受容体に到達するのが難しくなる。

上記の難溶性の匂い物質を嗅覚受容体に到達させるためのアプローチの一つとして、液滴をアガロースゲルで作った。これにより、一方の液滴に油を入れることなく人工細胞膜の形成を可能にし、残留農薬を検出することができるようになった[8]。また、多段階の匂いの濃度変化を検出するための機構として溶液に溶けた基質を吸水性ポリマーの駆動力により洗い流し溶液交換ができる機構を開発した。これまでに外部ポンプを利用した溶液交換機構はすでに存在したが[9], [10]、これらの機構では外部電力が必要であり可搬性が低いことが問題点であった。我々は吸水性ポリマーの駆動力に着目し、液滴を駆動させることにより小型で外部電力を必要としない溶液交換機構を実現させた[11]。

上記のようにアガロースゲルや吸水性ポリマーを利用した匂い検出機構を検討したが、多段階の匂い物質濃度を高感度で検出することは難しかった。そこで着手したのが匂いを能動的に取り込み、液滴に送り込むためのガス導入機構である[11]（図 2）。このガス導入機構では、疎水化したマイクロスリットを配置することで、液滴を滴下したときにマイクロスリットが液滴を撥水する。これにより、マイクロスリット内にガスが通る流路が形成され、液滴近傍に匂い物質を送り届けることが可能になる。この機構により比較的短い時間で匂い物質を嗅覚受容体に送り届ける

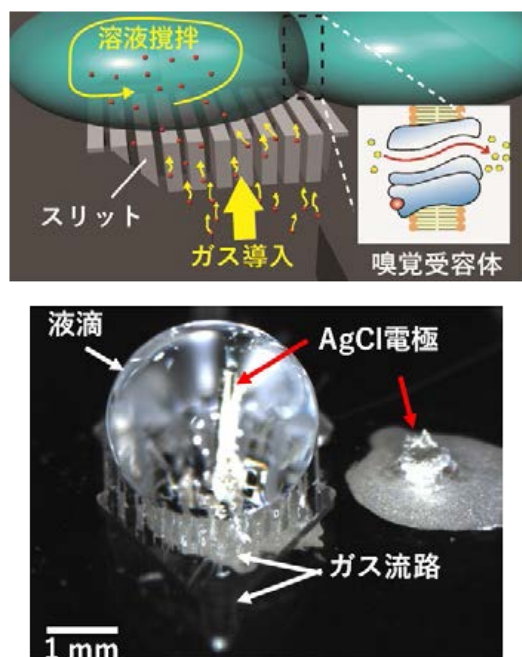


図 2. 難水溶性のガスを導入するための機構を搭載した液滴接触法模式図（上）。疎水化したマイクロスリットに液滴を滴下した時の写真（下）。

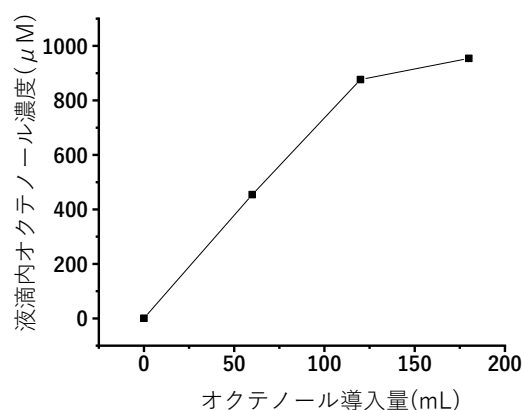
ことができる。また、気液界面ではせん断力が発生し、液滴内が攪拌され、より効率的に匂い物質を嗅覚受容体へ送り届けることができる。さらには、気液平衡を利用することで液滴に溶け込んだ匂い物質を取り出すことができ、多段階の匂い濃度検出を実現できる。ここではガス導入機構と我々の基盤技術である液滴接触法を組み合わせた匂いセンサ開発について記述する。

2. 実験方法

2. 1 ガス導入機構を搭載した人工細胞膜センサの作製方法

我々が提案するガス導入機構の模式図を図 2 に示す。この機構にはガスを吸引するためのインレットとガスを排出するためのアウトレットが搭載されている。インレットとアウトレットはマイクロ流路で繋がれており、その途中に液滴を載せられる疎水化したマイクロスリットが配置されている。液滴部位では従来の並列化したダブルウェルを使い人工細胞膜を形成できる構造となっている[12], [13]。マイクロスリットとマイクロ流路は厚さ 1 mm のアクリル板に切削し、液滴を入れるダブルウェルは 3 mm のアクリル板に切削した。これら 2 つのアクリル板を熱圧着機により接合し、デバイスを組み立てた。マイクロスリットに疎水化剤 (SFCOAT) を塗布することで、液滴を撥水するようにした (図 3)。ダブルウェルの下部に銀線を差し込み、液滴が触れる電極表面に Ag/AgCl ペーストを塗布した。また、2 つの液滴が接触する界面に直径 100 μm の

A) オクテノール導入



B) オクテノール脱離

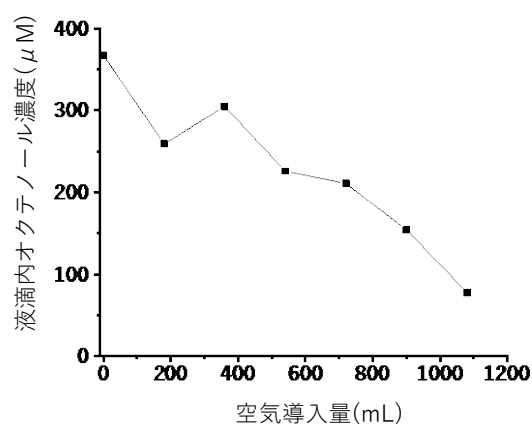


図 3. ガス導入機構によるオクテノールの液滴への導入及び脱離。A) オクテノールガスの導入量と液滴内オクテノール濃度の関係。B) 空気導入量と液滴内オクテノール濃度の関係。

孔を 11 個設けたセパレーターを設置し、人工細胞膜が安定的に形成できるようにした。

2. 2 液滴接触法による人工細胞膜の形成

液滴接触法は、簡便に平面リン脂質二重膜を作製する方法であり、その原理はリン脂質を分散した有機溶媒液中に液滴を滴下し、その表面に脂質の単分子層が形成されることを利用している。このような方法で形成した単分子膜を接触させることで脂質二重膜を形成することができる。このように通常の液滴接触法では、脂質を含んだ有機溶媒の中に 2 つの液滴を入れる。今回のガス導入機構では有機溶媒をスリットがあるウェルに滴下すると有機溶媒がスリット内に侵入する。そのため、スリットがないウェルのみに脂質が分散した有機溶媒を滴下した (DOPC:DOPE = 3:1 の混合脂質 20 mg/ml, 溶媒はデカン)。液滴には塩化カリウムを溶解させたリン酸緩衝溶液を使用し、2 つの液滴が接触すると脂質二重膜が自己組織化されて形成される。

3. 結果と考察

3. 1 ガス導入機構を利用したオクテノールの導入とその特性評価

オクテノールガスが導入できるかを検証するために、5 ppm のオクテノールガスをマイクロ流路に導入し、このとき液滴内に取り込まれたオクテノール濃度をガスクロマトグラフィー（島津製作所 GC-2010 Plus, 検出器は水素炎イオン化検出器）により分析した。液滴には塩化カリウムを溶解させたリン酸緩衝溶液を利用し、脂質溶液は DOPC:DOPE=3:1 の混合脂質 20 mg/ml をデカンに溶解させた。オクテノールはガス発生装置（パーミューター, DP-1B-2）を利用し、一定濃度のオクテノールガスを発生させ、デバイス内に導入した。

オクテノールガス 100 ppm をデバイス内に導入した場合に、液滴内に導入されるオクテノール濃度をプロットした結果を図 3 に示す。図 3A よりオクテノール導入量に応じて液滴内オクテノール濃度が上昇することがわかる。さらにオクテノール導入後に、オクテノールを含まない空気を導入した場合の結果を図 3B に示す。空気導入量に対して、液滴内オクテノール濃度は減少し、液滴内のオクテノールの脱離が起こったことがわかる。すなわち、この図 3 よりガス導入機構により、液滴内に難溶性のオクテノールを導入し、更には空気を入れることで液滴内からオクテノールを取り除くことができることがわかった。このように匂い物質を導入し、脱離できる特性は多段階の匂い濃度を識別し、繰り返し計測を行うために必要不可欠な要素である。

3. 2 ガス導入機構を搭載した並列デバイスによるオクテノールの高感度・高確率検出

人工細胞膜センサの特徴はセンサ素子となる膜タンパク質を数分子で導入し、一分子レベルの応答挙動を観察できることである。そのため、高い感度と選択性を実現できる。一分子レベルの応答は基質の低濃度領域では、離散化し、膜タンパク質と基質の結合は確率的な挙動になる[14], [15]。そのため、短時間でかつ再現性高く匂い物質を検出するためには、人工細胞膜の並列化が最も有効かつ確実な方法となる[12], [13]。

今回開発したガス導入機構はマイクロ流路でガスを導入するので、これまで我々が開発した 16 ch 並列装置に搭載できる（図 4）。オクテノールを検出するための受容体は無細胞合成により作り出し、人工細胞膜に再構成させた。その後、人工細胞膜に電圧を 60 mV 印加し、電気計測を開始した。はじめに窒素ガスを導入した場合には、大きな電流値の変化は見られなかった。一方で、オクテノールガスを導入した場合には、嗅覚受容体由来と考えられステップ状の矩形が見られた。この矩形シグナルは嗅覚受容体のイオンチャンネルが開閉するときに流れるイオン電流由来であると考えられる[16]。オクテノール導入により矩形波シグナルが観測されたあと、窒素ガスを流すことでそのシグナルは消失した。この結果は、窒素ガスにより液滴内

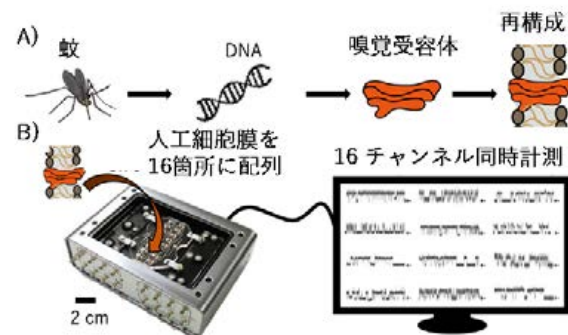


図 4 蚊の嗅覚受容体を人工細胞膜に再構成させオクテノールを検出。A) 無細胞合成により蚊の嗅覚受容体を人工細胞膜に再構成させる模式図。B) 16 箇所人工細胞膜を並列化し、オクテノール由来のシグナルを検出する模式図。

のオクテノールが脱離し、嗅覚受容体とオクテノールの結合が減少したためであると推察される。

オクテノールは、ヒトの汗の成分として含まれているため、災害時における行方不明者の探索への応用が期待できる。また、がん等の疾患と関連して呼気から検出されることが分かってきており、バイオマーカーとして計測を行うことで健康状態の把握に利用できる可能性も示唆されている[17], [18]。

4. 今後の展望

本研究では、疎水化したマイクロスリットにより難溶性の匂い物質を液滴に導入する機構を開発し、人工細胞膜匂いセンサに搭載した。このガス導入機構によりこれまで難しかった連続計測や低濃度の匂い物質の検知が可能になった。

嗅覚受容体を利用した人工細胞膜匂いセンサの特徴は、小型化が可能であり、高い感度と選択性を実現できることである。そのため、可搬性を持つ高性能な匂いセンサを開発しロボットなどに搭載することも可能になるだろう。今後の展望としては、複数の嗅覚受容体をセンサ素子として並列化し、あらゆる匂いを検出することである。今回開発したガス導入機構は複数の嗅覚受容体をセンサ素子として並列化するための要素技術になるだろう。例えば人間は約 400 種類の嗅覚受容体が存在し、複雑な匂いを数種類の嗅覚受容体を利用し認識する[19]。このように複数の嗅覚受容体を並列化することで、呼気や体臭に含まれる数千種類もの代謝物を一度に分析することができ、ガンなどの診断に応用できるだろう。そのためには、まず嗅覚受容体ライブラリを構築するとともに、人工知能を活用した匂いとシグナルを結びつけるような研究が必要になると考えられる。

【謝辞】

本研究の一部は（国研）新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）の委託事業 次世代人工知能・ロボット中核技術開発委託事業、および、文部科学省 地域イノベーション・エコシステム形成プログラムにより支援された。ここに感謝申し上げます。

【参考文献】

- [1] 渋谷達明、外池光雄, においの受容. フレグランスジャーナル社, 2002.
- [2] 三澤宣雄、竹内昌治, “AROMA RESEARCH: Journal of aroma science technology and safety,” vol. 18, pp. 110–115, 2017.
- [3] T. Hirotsu *et al.*, “A highly accurate inclusive cancer screening test using *Caenorhabditis elegans* scent detection,” *PLoS One*, vol. 10, no. 3, pp. 1–15, 2015.
- [4] 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.
- [5] N. Misawa *et al.*, “Construction of a Biohybrid Odorant Sensor Using Biological Olfactory Receptors Embedded into Bilayer Lipid Membrane on a Chip,” *ACS Sensors*, vol. 4, no. 3, pp. 711–716, 2019.
- [6] J. D. Bohbot, N. F. Durand, B. T. Vinyard, and J. C. Dickens, “Functional development of the octenol response in *Aedes aegypti*,” *Front. Physiol.*, vol. 4, no. March, pp. 1–8, 2013.
- [7] Y. Lu, “Cell-free synthetic biology: Engineering in an open world,” *Synth. Syst. Biotechnol.*, vol. 2, no. 1, pp. 23–27, 2017.
- [8] S. Fujii *et al.*, “Pesticide vapor sensing using an aptamer, nanopore, and agarose gel on a chip,” *Lab Chip*, vol. 17, no. 14, pp. 2421–2425, 2017.
- [9] Y. Tsuji, R. Kawano, T. Osaki, K. Kamiya, N. Miki, and S. Takeuchi, “Droplet-based lipid bilayer system integrated with microfluidic channels for solution exchange,” *Lab Chip*, vol. 13, no. 8, p. 1476, 2013.
- [10] R. Kawano, T. Osaki, H. Sasaki, and S. Takeuchi, “A Polymer-Based Nanopore-Integrated Microfluidic Device for Generating Stable Bilayer Lipid Membranes,” *Small*, vol. 6, no. 19, pp. 2100–2104, 2010.
- [11] T. Yamada, K. Kamiya, T. Osaki, and S. Takeuchi, “A pumpless solution exchange system for nanopore sensors,” *Biomicrofluidics*, vol. 13, no. 6, p. 064104, 2019.
- [12] R. Kawano *et al.*, “Automated Parallel Recordings of Topologically Identified Single Ion Channels,” *Sci. Rep.*, vol. 3, no. 1, p. 1995, 2013.
- [13] K. Kamiya *et al.*, “Electrophysiological measurement of ion channels on plasma/organelle membranes using an on-chip lipid bilayer system,” *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, p. 17498, 2018.
- [14] 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.
- [15] T. Osaki and S. Takeuchi, “Artificial Cell Membrane Systems for Biosensing Applications,” *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 1, pp. 216–231, 2017.
- [16] P. L. Jones, G. M. Pask, D. C. Rinker, and L. J. Zwiebel, “Functional agonism of insect odorant receptor ion channels,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, no. 21, pp. 8821–8825, 2011.
- [17] R. Xue *et al.*, “Investigation of volatile biomarkers in liver cancer blood using solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry,” *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 22, no. 8, pp. 1181–1186, 2008.
- [18] H. Haick, Y. Y. Broza, P. Mochalski, V. Ruzsanyi, and A. Amann, “Assessment, origin, and implementation of breath volatile cancer markers,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 43, no. 5, pp. 1423–1449, 2014.
- [19] N. Horio, K. Murata, K. Yoshikawa, Y. Yoshihara, and K. Touhara, “Contribution of individual olfactory receptors to odor-induced attractive or aversive behavior in mice,” *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–9, 2019.

イオンチャネルの解析のための信号処理技術開発

人工細胞膜システムグループ

杉浦広峻、大崎寿久、山田哲也、三村久敏、竹内昌治

1. はじめに

近年、環境中の揮発性有機化合物を、イオンチャネルのリガンド依存性を用いて計測する研究が進められている。膜受容体の機能を示すイオンチャネルは、微量の化学種を検出する素子として機能し、生体内の反応を律する重要な要素として機能している。我々の研究グループでは、人工的に再現した細胞膜に、精製したイオンチャネルを導入し、パッチクランプ法と同様の計測をデバイス上で再現することで、イオンチャネルの機能評価や、イオンチャネルの機能を活用するセンサデバイスとしての研究開発を進めてきた。この人工細胞膜を用いたセンサデバイスは、従来のパッチクランプ法によるイオンチャネルの解析では難しかった、システムの操作性、定量性、選択性、計測感度を総合的に達成可能であるという大きな可能性を秘めている技術である[1]。とりわけ、極微量の標的化学物质に対する応答を観測できるという計測感度については、他のセンサデバイスには追従できない大きな特徴であり、次世代の匂いセンサデバイスとして大きな注目を集めている[2][3]。人工細胞膜デバイスの基盤技術には、リガンド依存性イオンチャネルの精製など生化学的研究要素もさることながら、実用的な膜デバイスを開発し、現場環境で計測する技術や、イオンチャネルの信号のみを精度良く抽出する技術、イオンチャネルの信号をもとに、化学種を定量する技術などが重要である。

2. 実験方法、結果

2. 1 イオンチャネル計測プラットフォームの概要

Fig. 1 にイオンチャネルの特性計測システムの概要を示す。計測系は、膜タンパクの足場となるアクリルウェルチップと、一定の電圧を印加した、微弱な電流信号を計測する回路によって構成されている。アクリルウェルに、脂質を溶かした有機溶媒と KCl などを含む緩衝溶液を滴下すると、ウェルの隔壁の微小孔に脂質の平面膜が形成される。ここに、精製したタンパクを再構成することで、細胞膜上の環境を人為的に再現できる。イオンチャネルの検出標的となる化合物は緩衝溶液を介して脂質膜上の膜タンパクに到達し、匂いの分子が検出される。電流検出回路は、IV 変換アンプ、ローパスフィルタなどで構成される。出力電圧はイオンチャネルを流れるイオン電流であり、イオンチ

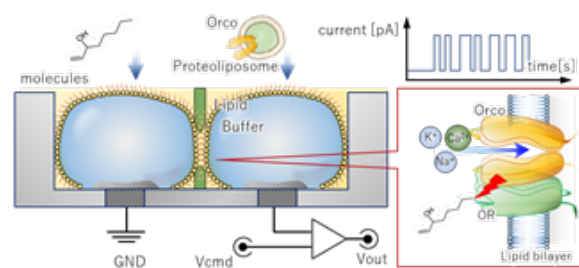


Fig. 1 イオンチャネル解析プラットフォームの概要図。液滴接触法で形成した脂質二重膜に、イオンチャネルを導入し、検出対象の化学種の作用を電氣的に評価する。

ャネルの開閉に対応した矩形波の信号が観測される。

2. 1 ウェーブレット変換を用いた、イオンチャネルの時間軸スペクトル解析

イオンチャネルを IV 変換アンプで計測した信号は、計測回路に起因するノイズに加えて、様々の不要な外乱を含んでいる。これらの外乱は、イオンチャネルの信号と同程度以上の S/N 比をもっていることが多いため、単純なローパスフィルタだけでは、イオンチャネルに相当する信号を選択的に抽出することは難しい。とりわけ、イオンチャネルを利用するために、冷凍状態から常温に戻した直後は、イオンチャネルの応答は鋭敏な信号をえることができるが、時間が経つにつれて、イオンチャネルの応答が鈍化してくるが、従来研究の傾向として要られていた。適応的なフィルタアルゴリズムを利用して、これらの外乱を排除するためには、ある時刻におけるイオンチャネルの応答を正確に計測信号から抽出することが必要である。そこで、連続時間ウェーブレット変換で、基底関数をメキシカンハットウェーブレット（ガウシアン of 2 階微分）とし、変換後の係数の実部が正であるものを抽出することで、矩形波の時系列的なスカログラム（周波数スペクトル図）を得た。これにより、周波数ドメインでイオンチャネルに該当する信号の特性周波数を評価した。Fig. 2 に今回用いたイオンチャネルである Orfactory-receptor-coreceptor は、蚊の嗅覚受容体由来のものであるが、特性周波数は初期状態で 1 Hz から 10 Hz であることがわかった。また、計測を進めて時間が経つにつれて、応答の特性スペクトルは、1 Hz

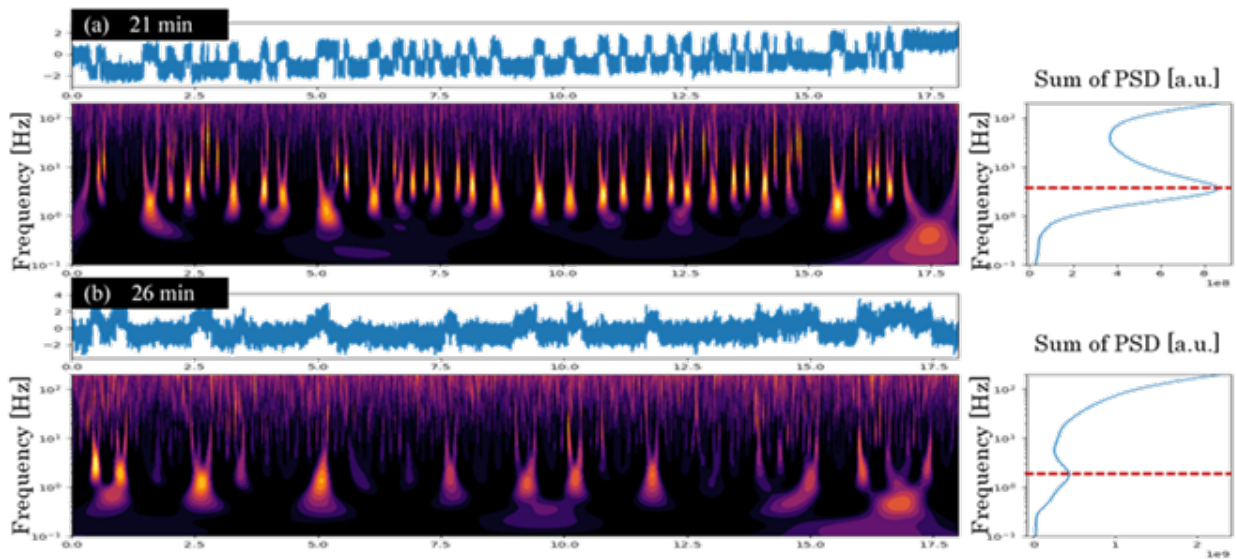


Fig. 2 イオンチャネルの出力をウェーブレット変換したもの。検出初期状態において、1~10Hz に特異的なイオンチャネルのスペクトルを確認することができる。時間が経つにつれて、波形が鈍化しても、特性スペクトルは安定して検出できる。

以下のドメインに遷移することが確認された。Wavelet 変換による周波数ドメインの信号検出は、時系列信号ではノイズに埋もれている信号や、信号の形状が鈍化しているものにたいしても適応可能であることから、イオンチャネルをセンサ素子として利用するさいに、ロバストな検出を期待する事ができる。また、イオンチャネルのノミナルの特性を評価することができるほか、スペクトルの異なる外乱信号が入った際に、その影響を明示的に可視化する事ができる。センサの研究を進める過程では、外乱となる電磁ノイズ、電源ノイズや、イオンチャネルや、実験に用いる溶媒が発生させる偽信号の影響などを評価、確認することができた。

2. 2 拡張カルマンフィルタによる、イオンチャネルと化学種濃度量化

イオンチャネルの応答に基づくリガンドの作用濃度依存性の定量化を行うため、以下のモデルベース逐次推定アルゴリズムを構築する。これは、従来のイオンチャネルの信号を事後解析する手法ではない、実時間逐次推定が可能な方法である。逐次推定アルゴリズムとして、カルマンフィルタに基づく手法の構築を目指す。まず、システムのモデル化の指針を Fig. 2 に示す。モデル化すべき要素は2箇所あり、1つ目は検出対象である化学種が緩衝液に溶存平衡を維持しているモデルである。これはウィナー過程に基づくランダムウォークモデルを利用して表現する。すなわち、濃度 x_c と変動量成分を含む状態変数 $x = [x_c \quad \dot{x}_c]^T$ に関して、

$$x_{k+1} = Ax_k + w_i \quad (1)$$

なる状態方程式を構成する。もう一つは、イオンチャネルが化学種を検知して出力を変化させるモデルであり、観測

方程式に相当するものである。イオンチャネルは、化学種の結合状態に応じて開閉の2値選択的な値を出力するためには、例えば、

$$y^* = \beta_0 + \beta_1 x_c \quad (2)$$

$$y = \begin{cases} 1 & \text{for } y^* > 0 \\ 0 & \text{Otherwise} \end{cases} \quad (3)$$

なる条件を満たすモデルを適応できれば良い。ここで、イオンチャネルの応答を化学ポテンシャルと反応速度の観点から考える。Fig. 3 に示すように、イオンチャネルの開閉状態は、ともにギブスエネルギーの鞍点であり、そのポテンシャルの差分、ならびにポテンシャル障壁から速度定数が決定されると考えられる[4]。ボルツマンの法則によると、平衡時の化学エネルギーは

$$\frac{P_{open}}{P_{close}} = \exp\left\{-\frac{\Delta G}{k_B T}\right\} \quad (4)$$

となる。ここで、 ΔG はイオンチャネルのギブスエネルギー、 k_B はボルツマン定数、 T は温度である。従来研究から、化学種の対数濃度が ΔG に作用する影響が線形であると仮定すると、イオンチャネルの開確率 P_{open} は

$$P_{open} = \frac{\exp\{\beta_0 + \beta_1 x_c\}}{1 + \exp\{\beta_0 + \beta_1 x_c\}} \quad (5)$$

として与えられる。これは、Eq. (2)、(3)を満たすロジット分布の累積分布関数となるから、Eq. 5 をあらためて $h(x)$ と置くことで、観測方程式

$$y = h(x) + v_i \quad (6)$$

が得られる。ここで、 w_i, v_i はそれぞれプロセスノイズと観測ノイズであり、正規分布を仮定する。Eq. 6 は非線形

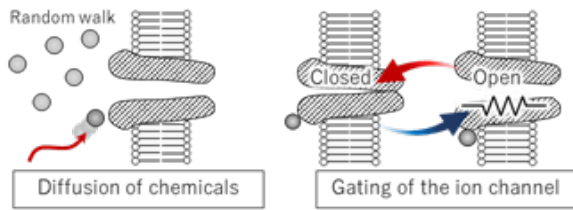


Fig. 3 実時間逐次濃度推定のために使用した物理モデル.

方程式であるから、動点周りで線形化を行うと

$$C = \begin{bmatrix} \frac{\beta_1 \exp\{\beta_0 + \beta_1 x_c\}}{(1 + \exp\{\beta_0 + \beta_1 x_c\})^2} & 0 \end{bmatrix}_{x=x_k} \quad (7)$$

なる観測行列が得られる。以上の Eq. 1, 6, 7 より、拡張カルマンフィルタは以下のように構築される [5]。

• Estimation Step

$$x_{k+1|k} = Ax_{k|k} \quad (8)$$

$$P_{k+1|k} = AP_{k|k}A^T + Q \quad (9)$$

• Innovation Step

$$K_k = P_{k|k-1}C^T(CP_{k|k-1}C^T + R)^{-1} \quad (10)$$

$$x_{k|k} = x_{k|k-1} - K_k(y_k - h(x_k)) \quad (11)$$

$$P_{k|k} = (I - K_kC)P_{k|k-1} \quad (12)$$

ここで Q、R はノイズの共分散行列である。初期値には事前にサンプリングした値を用いて、 $x_{0|0} = 0$ 、 $P_{0|0} = AA^T + Q$ とした。係数 β_0, β_1 はイオンチャネルの特性を表現するパラメータであり、イオンチャネルの種類に応じて実験的に求める必要がある。そこで、既知の化学種濃度におけるイオンチャネルの応答を利用して、最尤推定値を利用することを考える。Eq. 5 をもとに得られる対数尤度関数 $\mathcal{L}$ は、

$$\mathcal{L}(\beta_0, \beta_1) \sim \sum_{i=0}^n y_i \log h(x_i) + (1 - y_i) \log\{1 - h(x_i)\} \quad (13)$$

である。最尤推定値をあたえるとき、 $\partial \mathcal{L} / \partial \beta_i = 0$ であることから、ニュートン法を利用すると、

$$\begin{bmatrix} \beta_0 \\ \beta_1 \end{bmatrix}_{k+1} = \begin{bmatrix} \beta_0 \\ \beta_1 \end{bmatrix}_k + \begin{bmatrix} \Sigma l(x_i) & \Sigma x_i l(x_i) \\ \Sigma x_i l(x_i) & \Sigma x_i^2 l(x_i) \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} \Sigma y_i - h(x_i) \\ \Sigma x_i (y_i - h(x_i)) \end{bmatrix} \quad (14)$$

として、 β_i を計算することができる。以上のアルゴリズムを、実環境で実証した。Fig. 4 に実験系の構成を示す。サンプルとなるガスは、パーミエータという飽和ガスを供給する手法によって、デバイスの底面から連続的に供給された。また、リファレンスとして窒素ガスも供給できるようにした。まず、既知の濃度情報とイオンチャネルの応答から、モデルの係数 β_0, β_1 を同定する。収束の絶対許容差を

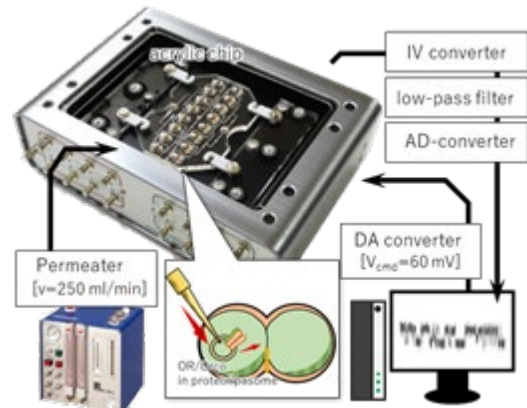


Fig. 4 実験に用いたオクテノール計測システム.

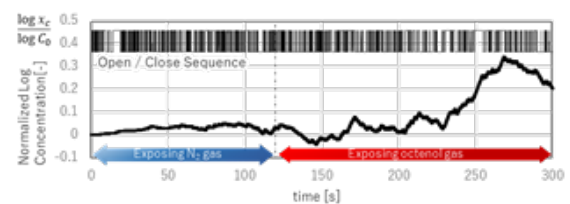


Fig. 5 イオンチャネルを用いたオクテノール濃度推定結果.

10^{-5} として Eq. 14 を解くと、係数 β_0, β_1 は -0.6236, 1.1135 と推定された。推定されたパラメータをもとに OR/Orco の開確率とガス濃度の関係を同定し、この係数をもとに拡張カルマンフィルタを構築し、ガスの濃度を計測した結果を Fig. 5 に示す。この実験では時間軸の 120 s の点において、デバイスに供給するガスを N_2 からオクテノールに切り替えた。ガスの変化をイオンチャネルが感知し開確率が変化したことを利用して、オクテノール分子の検出ができていたことがわかる。今回の実験では、オクテノールのガス検出にはおよそ 2 分程度を要することも示された。本手法は、時系列データからタンパクの特性を同定し、状態空間で信号をフィルタリングするため、ノイズレベルや共分散行列などの直感的に設定しやすい値で、実時間計測センサとしての機能を容易に実現できる。そのため、より実用的かつ汎用的な匂いセンサの情報処理設計の指針として、今後幅広い応用が期待できる。

2. 3 高精度信号処理を実現可能な、新規人工細胞膜形成手法の実現

イオンチャネルの信号を適切に処理する方法に加えて、従来の膜タンパク解析プラットフォームのハードウェアの改善も重要になってくる。従来の脂質二重膜形成方法である液滴接触法は、脂質二重膜を作製する、微細加工によって形成されたセパレータの口径をある程度の大きさ (100 mm 程度) で作製する必要があった。しかしながら、膜タンパクの応答をパッチクランプと同程度の時間スケール (100ms オーダ) で解析するためには、脂質二重膜の

大きさは、むしろ小さくすることが望まれる。これは、電流—電圧変換を行うトランスインピーダンス・アンプのノイズゲインの周波数特性が、脂質二重膜の静電容量に依存しているからである。

液滴接触法は、膜を保持する領域の脂質分散溶媒である *n*-decane などの制御性を担保していないため、膜の大きさは実験条件による安定化が難しい。すなわち、膜の大きさを小さくしようと、セパレータの穴系を絞ると、脂質二重膜の中間層の溶媒が邪魔をして、真に二重膜をえることができない。この問題を解決するため、新たな膜の形成方法を提案、実証した。これは、従来脂質を含む有機溶媒をアクリルウェルに直接滴下していたものを、脂質膜形成部位に新たに設計した、微細なスリットに脂質分散液を与え、メニスカス力の釣り合いをうまくバランスすることで脂質二重膜を得る方法である。膜を形成するためのセパレータは、強度、化学的安定性、表面特性を調整しながら、微細加工美術によって、珪酸ガラス基盤を加工することによって実現した。実際に作製したセパレータデバイスと、膜の様子を Fig. 6 に示す。この膜は、前述の通りメニスカス力によって保持され、また膜の内部の有機溶媒を、外部に強制的に排出することができる。そのため、従来手法より小型の膜を作成できる可能性を秘めている。この技術によって小型の膜を形成し、膜受容体機能を示すイオンチャネルを解析できれば、安定した信号処理を実現することを見込むことができ、今後の発展が期待される。

3. 今後の展望

本研究は、イオンチャネルを用いた標的化合物検出デバイスに適用可能な実時間信号処理技術を開発した。本研究が更に進むと、たとえば高精度生物の機能に匹敵する嗅覚機能をロボットに付与することができる。本研究は、計測のデバイス技術と信号処理を相補的にさらに改良することで、さらなる進展を期待する事ができる。

また、本技術は、創薬スクリーニングなどの応用において、イオンチャネルの化合物に対する応答を評価する場合においては、無数の標的化合物の種類や条件、リガンドの作用部位などの評価を実時間で効率よく実現することを可能にする。すでに我々は、この目標を達成すべく、イオンチャネル解析プラットフォームのための、96ch同時計測システムを立ち上げた。今後、本研究の技術はマルチウェル解析プラットフォームの基盤技術としても利用が見込まれる。

【謝辞】

本研究の一部は、(国研) 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委託事業、および文部科学省の地域イノベーション・エコシステム形成プログラム、JSPS 科研費 研究活動スタート支援 (JP19K23505) により支援されました。ここに感謝申し上げます。

【参考文献】

- [1] 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, pp. 8169–8174, 2006.
- [2] N. Misawa, S. Fujii, K. Kamiya, T. Osaki, T. Takaku, Y. Takahashi, and S. Takeuchi, "Construction of a Biohybrid Odorant Sensor Using Biological Olfactory Receptors Embedded into Bilayer Lipid Membrane on a Chip," *ACS Sensors*, vol. 4, pp. 711–716, 2019.
- [3] R. Kawano, Y. Tsuji, K. Kamiya, T. Kodama, T. Osaki, N. Miki, and S. Takeuchi, "A Portable Lipid Bilayer System for Environmental Sensing with a Transmembrane Protein," *PLOS ONE*, vol. 9, e102427, 2014.
- [4] J. Zheng and M. C. Trudeau, "Handbook of Ion Channels," *CRC Press*, 2015.
- [5] R. Schneider and C. Georgakis, "How To NOT Make the Extended Kalman Filter Fail," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 52, pp. 3354–3362, 2013.

業 績

【原著論文】

1. Masahide Gotanda, Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, Norihisa Miki, and Shoji Takeuchi
Automatic Generation System of Cell-Sized Liposomes
Sensors & Actuators: B Chemical, Vol.292, pp.57-63 (2019).
2. Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, and Shoji Takeuchi
Formation of Vesicles-in-a-Vesicle with Asymmetric Lipid Components Using a Pulsed-Jet Flow Method
RSC Advances, Vol.9, pp.30071-30075 (2019).
3. Tetsuya Yamada, Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, and Shoji Takeuchi
A Pumpless Solution Exchange System for Nanopore Sensors
Biomicrofluidics, Vol.13, 064104 (2019).
4. Hironori Sugiyama, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi, and Taro Toyota
Hydrodynamic Accumulation of Small Molecules and Ions into Cell-Sized Liposomes against a Concentration Gradient
Communications Chemistry, Vol.3, 32 (2020).
5. Saori Nonaka, Emil Salim, Koki Kamiya, Aki Hori, Firzan Nainu, Takumi Nishiuchi, Shoji Takeuchi, Noriyuki Kadera, Takayuki Kuraishi
Molecular and Functional Analysis of Pore-Forming Toxin Monalysin from Entomopathogenic Bacterium *Pseudomonas entomophila*
Frontiers in Immunology, Vol.11, 520 (2020).

【口頭発表】

1. 竹内昌治
バイオハイブリッドが拓く新たな機械工学
機械工学の将来展望－イノベーション創出にむけた次の一手－
2019年4月、東京
2. Takami Maekawa, Koki Kamiya, Tooru Takahashi, Kentaro Kaji, Yukio Tezuka, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi, and Takashi Kondoh
TMC6 : A Novel Salt Taste Receptor in Mice
ACChemS XLI
2019年4月、アメリカ
3. Tetsuya Yamada, Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, Shoji

Takeuchi

Artificial Cell Membrane System for Odorant Sensor:
Development of Solution Exchange Driven by
Superabsorbent Polymer for Repeatable Detection
18th International Symposium on Olfaction and Electronic
Nose (ISOEN 2019)
2019年5月、福岡

4. 竹内昌治
バイオハイブリッドデバイスのすすめ
応用電子物性分科会 研究例会
2019年6月、東京
5. Shoji Takeuchi
Emerging Technologies for Biohybrid Machines
SELECTBIO - Lab-on-a-Chip & Microfluidics Europe
2019
2019年6月、オランダ
6. Yoshihisa Ito, Toshihisa Osaki, Koki Kamiya, Tetsuya Yamada, Norihisa Miki, and Shoji Takeuchi
Quad Lipid Bilayer Module with 1-GΩ Series Resistors
Transducers 2019 – EUROSENSORS XXXIII
2019年6月、ドイツ
7. Toshihisa Osaki
Artificial Cell Membrane Platforms for Drug Discovery and Super Sensors
Leibniz Institute of Polymer Research Dresden
2019年6月、ドイツ
8. 竹内昌治
細胞や生体分子を使った"やわらかい"モノづくり
「バイオハイブリッド」研究が変える医療と食の未来
第8回 First Penguin Salon
2019年7月、東京
9. Hironori Sugiyama, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi, and Taro Toyota
Microfluidic Trapping and Observation of Size-Sorted Liposomes Prepared by Water-in-Oil Emulsion Transfer Method
ACS Fall 2019 National Meeting & Expo
2019年8月、アメリカ
10. 竹内昌治
"バイオハイブリッド"が拓く工学と医学の融合研究

令和元年度東京大学医学部医学科 基礎臨床社会医学
統合講義

2019年8月、東京

11. 竹内昌治

バイオハイブリッドロボティクス

第37回日本ロボット学会学術講演会

2019年9月、東京

12. 杉浦広峻

におい計測のための脂質二重膜デバイス技術について
日本機械学会 情報・知能・精密機器部門 未来技術ワ
ークショップ

2019年9月、秋田

13. 杉山博紀、大崎寿久、竹内昌治、豊田太郎

フィードバック制御環境下での細胞サイズのリポソー
ムの自動観測

日本分析化学会第68年会

2019年9月、千葉

14. Shoji Takeuchi

Emerging Technologies for Biohybrid Devices

45th International Conference on Micro & Nano
Engineering

2019年9月、ギリシャ

15. 瀬尾明彦、赤木大輔、保科克行、栗木優五、小松徹、
神谷真子、大崎寿久、浦野泰照

腹部大動脈瘤（AAA）開腹手術への応用を目的とした
蛍光ペプチターゼプローベライブラリーを用いた正常
血管の客観的評価方法

第60回日本脈管学会総会

2019年10月、東京

16. 山田哲也、杉浦広峻、三村久敏、大崎寿久、竹内昌治

蚊の嗅覚受容体を利用した匂いセンサの開発

「細胞を創る」研究会 12.0

2019年10月、松山

17. 神谷厚輝、大崎寿久、竹内昌治

リン脂質非対称膜小胞封入リポソームによる小胞の膜
融合観察

「細胞を創る」研究会 12.0

2019年10月、松山

18. 竹内昌治

バイオハイブリッドが拓く異分野融合イノベーション
東レ研究本部研修会

2019年10月、三島

19. Hironori Sugiyama, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi, and

Taro Toyota

Automated Observation of Cell-Sized Liposome with
Feedback Control of Outer Environment

The 23rd International Conference on Miniaturized
Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2019)

2019年10月、スイス

20. Tetsuya Yamada, Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, and Shoji
Takeuchi

Volatile Odorant Detection by Olfactory Receptors Formed
in a Lipid Bilayer Membrane

The 23rd International Conference on Miniaturized
Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2019)

2019年10月、スイス

21. Toshihisa Osaki

Artificial Cell Membrane Platforms for Functional
Analyses and Drug Screenings of Ion Channels

Ion Channel Modulation Symposium (ICMS) 2019 Boston

2019年10月、アメリカ

22. Shoji Takeuchi

Biohybrid Micro/Nano Devices

The Japan-US Science Forum in Boston 2019

2019年11月、アメリカ

23. 竹内昌治

バイオハイブリッドデバイスの新展開

JACI 公益社団法人新化学技術推進協会 電子情報技
術部会 マイクロナノシステムと材料・加工分科会
講演会

2019年11月、東京

24. Hatsuhi Kato, Hironori Sugiyama, Toshihisa Osaki, Shoji
Takeuchi, and Taro Toyota

Observation of Self-Propelled Giant Multilamellar Vesicles
Driven by Surfactant Addition in a Microfluidic Device

The Okinawa Colloids 2019 (An International Conference
on Colloid & Surface Science)

2019年11月、那覇

25. 竹内昌治

Microfluidics for Biohybrid Devices

化学とマイクロ・ナノシステム学会第40回研究会
CHEMINAS 二十周年記念シンポジウム

2019年11月、浜松

26. 杉浦広峻、山田哲也、大崎寿久、三村久敏、竹内昌治

Point-of-care 応用のための膜タンパクを用いた微小に
おいセンサ

化学とマイクロ・ナノシステム学会第40回研究会
2019年11月、浜松

27. 山田哲也、杉浦広峻、三村久敏、大崎寿久、竹内昌治
匂いセンサ開発に向けたガス導入システムの構築
化学とマイクロ・ナノシステム学会第40回研究会
2019年11月、浜松

28. 橋本和泉、杉浦広峻、大崎寿久、山田哲也、三村久敏、
三木則尚、竹内昌治
微小バブルによる脂質二重膜の再形成
第10回マイクロ・ナノ工学シンポジウム
2019年11月、浜松

29. 三村久敏、杉浦広峻、山田哲也、神谷厚輝、三浦重徳、
大崎寿久、竹内昌治
人工細胞膜システムによる細胞内イオンチャネルのスクリーニング
化学とマイクロ・ナノシステム学会第40回研究会
2019年11月、浜松

30. Hirotaka Sugiura, Tetsuya Yamada, Atsufumi Ozoe, Yuki Kodama, Yasuhiko Takahashi, Toshihisa Osaki, and Shoji Takeuchi
Quantitative Signal Analysis of a Ligand-Gated Ion Channel on a Lipid Bilayer Using Continuous-Time Wavelet Transformation
30th 2019 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (From Micro & Nano Scale Systems to Robotics & Mechatronics Systems)
2019年12月、名古屋

31. 三村久敏、杉浦広峻、山田哲也、神谷厚輝、三浦重徳、
大崎寿久、竹内昌治
平面脂質二重膜を利用した細胞内イオンチャネルのスクリーニングシステム
第42回日本分子生物学会年会
2019年12月、福岡

32. Shoji Takeuchi
Lipid Bilayer on a Chip for Highly Parallel Ion Channel Screening
SMMIL-E Workshop on BioMENS and Cancer Research in Lille
2019年12月、フランス

33. 杉浦広峻、山田哲也、大崎寿久、三村久敏、竹内昌治
2値選択モデルを内包する拡張カルマンフィルタを用いたイオンチャネルの実時間状態推定
第20回計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会
2019年12月、高松

34. Shoji Takeuchi

Emerging Technology for Biohybrid Robotics
Smart Materials, Fabrication and Biohybrid Systems for Robotics
2020年1月、アメリカ

35. Tetsuya Yamada, Hirotaka Sugiura, Hisatoshi Mimura, Koki Kamiya, Toshihisa Osaki and Shoji Takeuchi
Odorant Sensor Using Olfactory Receptor Reconstituted in a Lipid Bilayer Membrane with Gas Flow System
The 33rd International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (IEEE MEMS 2020)
2020年1月、カナダ

36. Izumi Hashimoto, Hirotaka Sugiura, Toshihisa Osaki, Tetsuya Yamada, Hisatoshi Mimura, Norihisa Miki, and Shoji Takeuchi
Bubble-Assisted in situ Re-Formation of Artificial Bilayer
The 33rd International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (IEEE MEMS 2020)
2020年1月、カナダ

37. 竹内昌治
バイオハイブリッドが拓く新産業創出に向けて
MEMS SENSING & NETWORK SYSTEM 展 2020
2020年1月、東京

38. 大崎寿久
細胞膜作製技術を利用した創薬・センサ開発
九州工業大学 生命体工学セミナー
2020年1月、北九州

39. 竹内昌治
バイオハイブリッド技術が拓く次世代医療デバイス
札幌医科大学先端医学研究セミナー
2020年2月、札幌

40. Hisatoshi Mimura, Hirotaka Sugiura, Tetsuya Yamada, Koki Kamiya, Shigenori Miura, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi
A Planar Lipid Bilayer Array for Drug Screening of Intracellular Ion Channels
64th Annual Meeting of the Biophysical Society
2020年2月、アメリカ

【記者発表、取材】

1. 大崎寿久,
「東大など、原始細胞のモデルが特性の分子を内部に溜め込む新現象を発見」
日本経済新聞 (Web) , 2020年3月9日

【研究開発部】人工細胞膜システム

【特許】

- (1) 国内特許出願 2 件
- (2) 国外特許出願 2 件