

生体膜における輸送現象の解明に向けたデバイスの開発

外岡 大志*
tonooka@kit.ac.jp

1 はじめに

私は2018年3月に本学に着任しました。専門分野は、マイクロ加工学と合成生物学です。一見かけ離れたように見える分野かもしれませんが、これら二つの分野を組み合わせることにより、これまでに見えなかったものが見えてきたり、これまででできなかったことができるようになったりします。合成生物学は一言で言うと、「細胞を創って理解する」ということを目指す学問です。細胞は様々なナノサイズの分子から構成されるマイクロサイズのシステムです。このような目では見えないようなサイズの細胞や細胞内のシステムについて詳しく調べたり、あるいは、ナノ・マイクロサイズの材料から何か細胞のような微小なシステムを組み上げたりする実験を進める際には、マイクロ・ナノ加工を利用して作製したデバイスを用いると飛躍的に操作性が向上します。このような背景のもと、私はこれまで、マイクロ加工技術を用いて、生物学分野の研究に役立つデバイスを作製してきました。本稿では、進めてきたいくつかの研究の中で、私が大学院生の頃から続けている、生体膜における輸送現象の解明に向けたデバイスの開発について紹介させて頂きたいと思っております。

2 生体膜における輸送現象

生体膜とは、細胞膜や、細胞内に存在する細胞内小器官（ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体等）の膜のことです。生体膜は、主に図1のように、脂質二重膜と、その脂質二重膜中に存在する膜タンパク質から構成されます。また、生体膜の役割には、細胞や細胞内小器官の内側と外側を仕切る役割と、細胞内外および細胞内小器官内外の物質輸送の役割とが挙げられます。

まず、仕切りとしての役割を持つのは、脂質二重膜です。脂質二重膜は、図1のような脂質二重膜の構造となっている厚さ5 nm程の膜です。脂質分子は、親水性部分と疎水性部分の両方を持つ両親媒性の性質の分子であるため、エネルギー的に最も安定な状態である脂質二重膜構造をとります。脂質二重膜は、電気的に中性で小さな分子や疎水性の分子は透過することができますが、それ以外の大きな分子、親水性の分子、イオン等は透過することができません。このため、細胞膜は、これらの物質を輸送する手段として、膜タンパク質というタンパク質の一種を生体膜中に有しています。膜タンパク質に

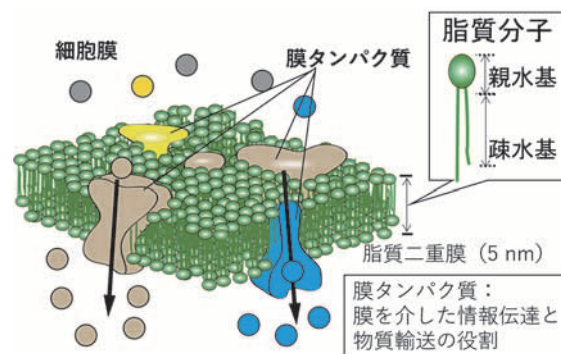


図1 生体膜の構造と物質輸送

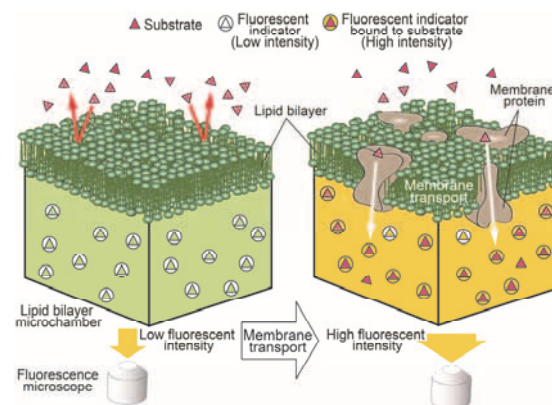


図2 人工脂質二重膜を用いた膜タンパク質を介した物質輸送の計測原理

* 機械工学系 助教

は様々な種類があり、例えば、細胞外から細胞内へのエネルギー源の輸送や、細胞内から細胞外への老廃物の除去等の細胞の維持に関わるものがあります。また、細胞が外部環境を検知するためのセンサとして機能する膜タンパク質も存在し、我々が匂いを検知できたり、痛みを感じたりできるのは、これらセンサとなる膜タンパク質のお陰です。また、膜タンパク質は創薬ターゲットとしても非常に重要です。これは膜タンパク質が、薬剤の細胞内への輸送にも関係しているからです。このように膜タンパク質による生体膜を介した物質輸送は、細胞を理解したり、薬剤を作ったりする上で、重要な要素であることから、膜タンパク質の物質輸送機能の計測が重要な研究課題となっています。

3 脂質二重膜チャンバを用いた膜輸送計測の原理

膜タンパク質は、脂質二重膜の中で機能する分子構造になっているため、その計測には、膜タンパク質を脂質二重膜に埋め込んだ状態を作る必要があります。近年の人工脂質二重膜作製技術の進展により、人工的に作製した脂質二重膜に計測対象となる膜タンパク質を埋め込み、膜タンパク質を介した物質輸送機能を計測することが可能となっています。人工脂質二重膜を介した物質輸送の計測方法にはいくつかの方法がありますが、本稿では、私が長年携わってきた蛍光計測について説明します。ちなみに、蛍光計測は、他の電気計測や放射性同位体を用いた方法に比べて、電氣的に中性の物質の輸送を計測できることや、放射性物質を扱える特別な実験環境を必要としないという特長があります。

蛍光計測による膜タンパク質の輸送機能の計測は、脂質二重膜で覆われた微小空間（脂質二重膜チャンバ）が用いられます。輸送される物質（基質）と結合することにより蛍光強度が変化する蛍光指示薬を脂質二重膜マイクチャンバ内に予め封入しておき、脂質二重膜に導入した膜タンパク質を介して脂質二重膜チャンバ内に輸送された基質が蛍光指示薬と結合した際の蛍光強度の変化を蛍光顕微鏡により検出します（図2）。この他、輸送される物質すなわち計測すべき物質が蛍光基質の場合は、脂質二重

膜チャンバ内外のいずれかに蛍光基質を封入し、蛍光基質を含まない側に膜タンパク質を介して蛍光基質が輸送される過程を、蛍光顕微鏡で蛍光強度をモニタリングすることにより計測します。いずれの方法を用いる場合にも、膜タンパク質の輸送機能を蛍光計測するためには、膜タンパク質が脂質二重膜に導入されることと、その膜タンパク質によって輸送された物質がチャンバ内で蛍光強度の変化が検出できる程度に濃度変化を引き起こすことが必要となります。脂質二重膜に導入される膜タンパク質の数が多いほど輸送される物質の量も多くなることから、脂質二重膜の面積（ S ）をできる限り大きく設計し、膜タンパク質の導入効率を高めることが求められます。また、脂質二重膜を介した物質移動により脂質二重膜チャンバ内の基質濃度変化を大きくするためには、チャンバ体積（ V ）が小さいことが求められます。従って脂質二重膜の面積（ S ）とチャンバ体積（ V ）の比（ S/V ）が大きいことが膜タンパク質の物質輸送機能を蛍光計測する上で重要であるということになります。

このような測定原理ゆえに、蛍光計測により膜タンパク質の物質輸送機能を計測するために

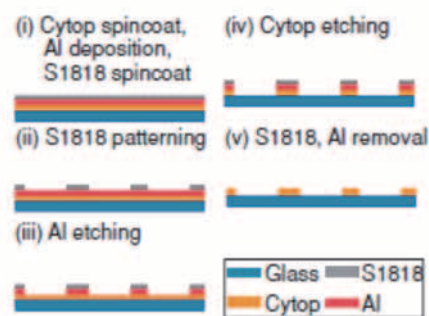


図3 親水・疎水パターン基板の作製プロセス

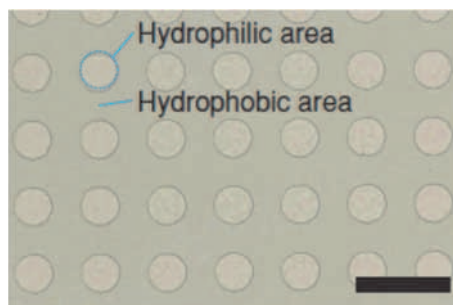


図4 親水・疎水パターン基板の明視野顕微鏡写真（スケールバー：100 μm ）

は、概して系が小さいことが必要であり、私は、容易に脂質二重膜を形成できる液滴接触法 [1] を、後に説明するマイクロ加工を施した基板を用いて実施することにより、従来の液滴接触法を用いて作製できる脂質二重膜チャンバよりも、脂質二重膜の面積 (S) とチャンバ体積 (V) の比 (S/V) の大きな脂質二重膜チャンバを作製しました [2]。また、その脂質二重膜チャンバを用いて、実際に *a* ヘモリシンという膜タンパク質を介したカルシウムイオンの輸送を蛍光観察しました [2]。以下に、マイクロ加工を施した基板の作製、作製した基板を用いた脂質二重膜マイクロチャンバの作製、実際に計測されたカルシウムイオンの輸送の計測結果について述べていきたいと思います。

4 人工脂質二重膜マイクロチャンバの開発

微小な脂質二重膜チャンバを形成するために、まずは表面を親水性と疎水性でマイクロメートルのオーダーでパターンニングしたガラス基板を作製しました。このような精密なパターンニングは半導体を製造する際に使われているフォトリソグラフィ技術を用いて実現することができます。図3に示すプロセスを経て、円形の親水性部分が疎水性部分に囲まれた親水・疎水パターン基板を得ました (図4)。この基板は、親水性部分はガラス、疎水性部分はサイトップと呼ばれるフッ素系材料で構成されています。ほとんど無色透明であるため、基板越しに光学顕微鏡で観察することが可能です。

親水・疎水パターン基板を用いた脂質二重膜チャンバの形成は以下に示す手順に従って行いました (図5)。まず脂質二重膜の成分である脂質分子を分散させた有機溶媒で親水・疎水パターン基板上を満たします。次に、先の細いガラス管を用いて、親水性パターン上に微小水滴をパターンニングします。マイクロポンプを用いてガラス管から微量の水溶液を排出しながらマイクロマニピュレータを用いて親水・疎水パターン基板上を移動させることにより、自発的にガラス管から排出された水溶液が親水性パターン内に配置され、微小水滴アレイが形成されます (図6 (a))。この時、微小水滴と有機溶媒の界面に脂質分子が親水基を水滴側に疎水

基を有機溶媒側に向けて整列することにより、脂質の単層膜を形成します。次に、ガラス管を用いて微小水滴を覆う程度の大きさを持つ上側の水滴を形成し、マイクロマニピュレータを操作することにより、親水性パターン上にパターンニングされた微小水滴アレイの上から接触させます。上側の水滴と有機溶媒の界面にも脂質の単層膜が形成されており、それら単層膜が有機溶媒を介して接触することにより、脂質単層膜/有機溶媒/脂質単層膜の有機溶媒膜が形成されます。この膜は、上下の水滴から圧力を受け時間と共に薄くなり、ある時、脂質の単層膜同士が接触し脂質二重膜が形成されます (図6 (b))。この脂質二重膜部分は時間と共に広がっていき、1分程度でそれ以上変化しなくなります。

図7 (a) は形成された脂質二重膜チャンバアレイの明視野顕微鏡写真です。20 倍の対物

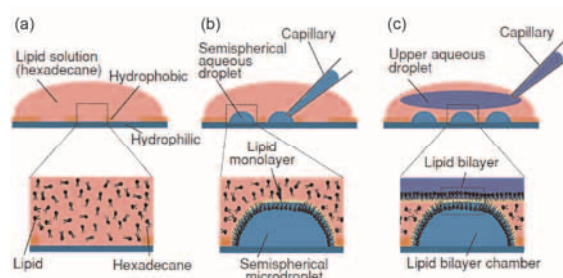


図5 脂質二重膜チャンバの形成手順

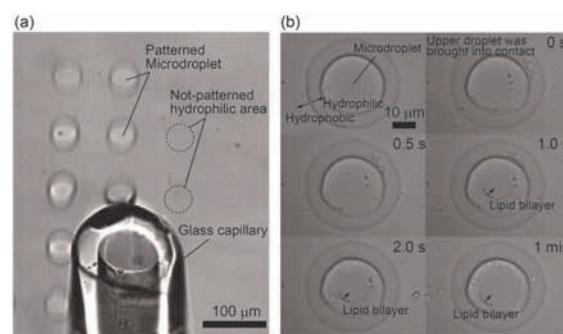


図6 微小水滴上への脂質二重膜形成

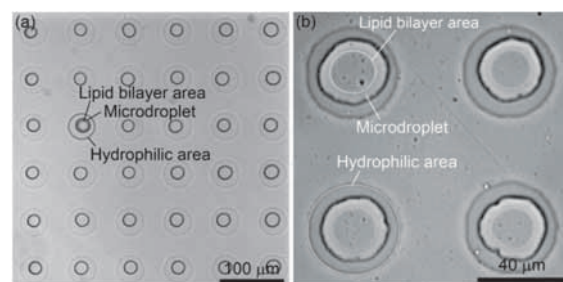


図7 形成された脂質二重膜チャンバ

レンズを用いて視野内に36個の脂質膜チャンバを一度に観察することができます。拡大図を見ると、微小水滴上に形成された脂質二重膜部分の境界を観察することができます(図7(b))。

膜輸送の蛍光計測においては、既に述べたように、チャンバ体積と膜面積が重要なパラメータとなります。そこで、構築した脂質二重膜チャンバを共焦点レーザー顕微鏡および明視野顕微鏡を用いて観察し(図8)、その画像データから脂質二重膜チャンバの体積と膜面積を測定しました。

図8(b)および図8(c)は、それぞれ40 μm の直径の親水性パターンをもつ基板を用いて形成した脂質膜チャンバ(40- μm チャンバ)のxy断面図とxz断面図です。また、図8(e)および図8(f)は200 μm の直径の親水性パターンをもつ基板を用いて形成した脂質膜チャンバ(200- μm チャンバ)のxy断面図とxz断面図です。40- μm チャンバと200- μm チャンバの体積と膜面積は表1に示した通りで、40- μm チャンバの膜面積体積比(S/V)は100 $\mu\text{m}^2/\text{pL}$ であることがわかりました[1]。この値は、従来の液滴接触法で作製される脂質二重膜チャンバ[3, 4]に比べて約25倍であり、本手法で作製された脂質二重膜チャンバは膜輸送の蛍光計測に有利な構造であることが示されました。

5 人工脂質二重膜マイクロチャンバを用いた膜輸送の蛍光計測

構築した脂質二重膜チャンバを用いて膜タンパク質による物質輸送の蛍光計測が可能であるか検証を行いました。モデル膜タンパク質として α ヘモリシンという脂質二重膜に貫通孔を形成する膜タンパク質を使用しました。膜タンパク質の物質輸送機能の蛍光計測のデモンストレーションとして、この α ヘモリシンが形成する貫通孔を介して脂質二重膜チャンバ内に拡散するカルシウムイオンをカルシウム蛍光指示薬によって検出しました。脂質二重膜チャンバを形成する際に、微小水滴となる溶液中にカルシウム蛍光指示薬(Fluo-4)を、また、上側の溶液に塩化カルシウムを予め溶解することにより、

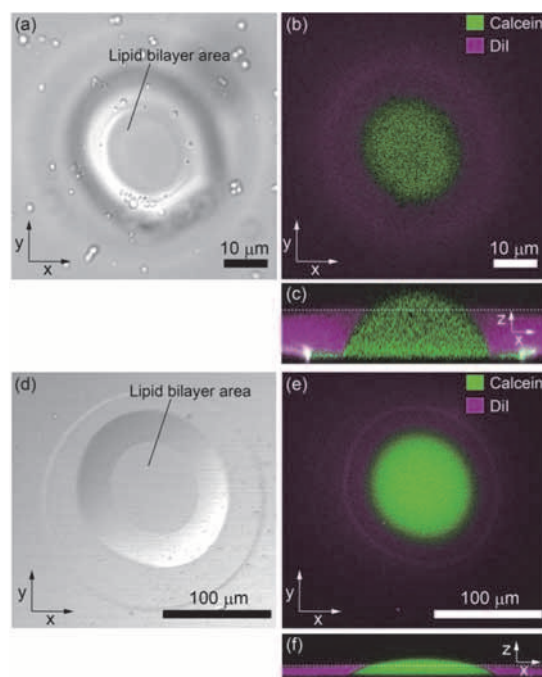


図8 脂質二重膜チャンバの断面形状観察

表1 脂質二重膜チャンバの膜面積と体積と膜面積体積比

	40 μm chamber	200 μm chamber
Lipid bilayer area (S)	$136 \pm 24 \mu\text{m}^2$	$4760 \pm 1257 \mu\text{m}^2$
Chamber volume (V)	$1.4 \pm 0.1 \text{ pL}$	$158 \pm 25 \text{ pL}$
Ratio of S to V (S/V)	$100 \pm 10 \mu\text{m}^2/\text{pL}$	$30 \pm 3 \mu\text{m}^2/\text{pL}$

脂質二重膜チャンバ内にFluo-4、チャンバ外にカルシウムイオンが存在する実験系を構築しました(図9)。 α ヘモリシンは水溶性のタンパク質であるため、 α ヘモリシンを脂質二重膜に導入する際には、予め α ヘモリシンの分子を上側の溶液に混合すればよく、 α ヘモリシンの単量体は脂質二重膜に自発的に入り込み、膜内で拡散しながら会合し七量体となることで直径1.5 nm程度の貫通孔を形成します。図10(a)は α ヘモリシン存在下での脂質膜チャンバアレイ(40- μm チャンバ)を用いたカルシウムイオン輸送計測における蛍光強度の経時変化を示しています。図10(a)のそれぞれの画像において、視野内には6 \times 6の合計36箇所の親水性部分がパターンされています。脂質二重膜チャンバは、図10(a)の0 minの画像において、白い枠で囲った30箇所に形成されています。

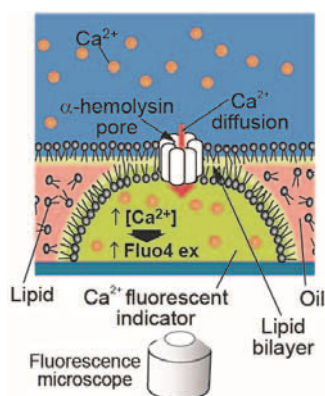


図9 α ヘモリシン由来の貫通孔を介したカルシウムイオン流入の可視化方法

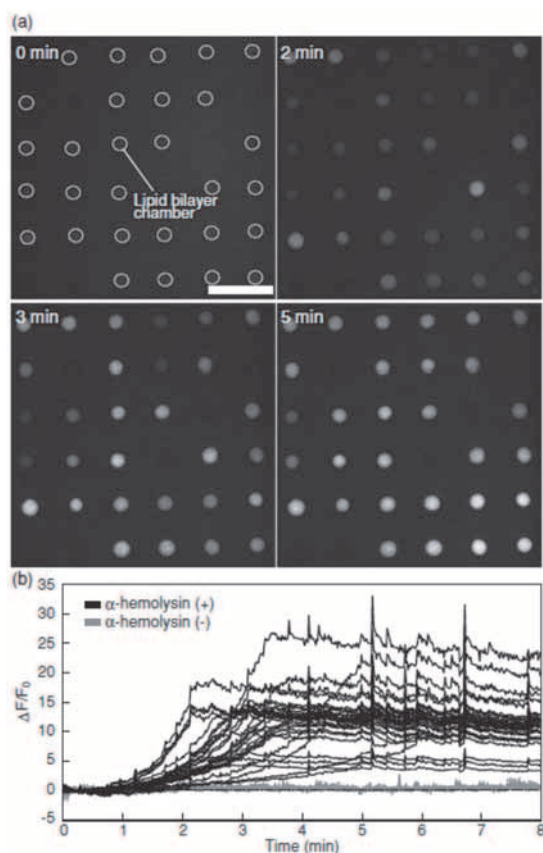


図10 α ヘモリシン由来の貫通孔を介したカルシウムイオン流入の可視化結果

す。それぞれの脂質二重膜チャンバ内の蛍光強度は計測開始後に徐々に上昇を始め、計測開始3～5分後には明らかな蛍光強度の上昇が確認できるようになりました。 α ヘモリシン存在下と α ヘモリシン非存在下での脂質二重膜チャンバ内の比蛍光強度の経時変化を図10(b)に示します。グラフから、 α ヘモリシンが存在しない場合には比蛍光強度は上昇せず、 α ヘモリシンが存在する場合にのみ比蛍光強度が上昇したことがわかります。この結果から、構築した脂

質二重膜チャンバを用いて、実際に膜タンパク質を介した物質輸送を蛍光検出できることが示されました。

6 おわりに

本稿では、マイクロ加工を施した親水・疎水パターン基板を用いた脂質二重膜チャンバの形成方法と、それを用いた α ヘモリシンの貫通孔を介したカルシウムイオン輸送の蛍光計測について報告させて頂きました。紙面の関係で、本稿では割愛することになってしまいましたが、現在はこの手法をさらに進化させ、脂質二重膜チャンバの中にマイクロ電極を導入することができるようになってきました [5]。生体膜には常時、膜電位と呼ばれる膜内外の電位差が発生しており、この膜電位の変化が膜電位依存性膜タンパク質と呼ばれる膜タンパク質の物質輸送機能に影響を与えることが知られています。電極を導入することにより、膜電位を印加した状態で、生体膜を介した物質輸送を観察できるようになりました。今後、開発したこれらのデバイスを用いて、まだ物質輸送機能が解明されていない膜タンパク質の計測を行い、細胞の理解や、創薬に役立てていきたいと考えております。

参考文献

- [1] K. Funakoshi, H. Suzuki, S. Takeuchi, *Anal. Chem.*, 78, 8169–8174, 2006.
- [2] T. Tonooka, K. Sato, T. Osaki, R. Kawano, S. Takeuchi, *Small*, 10, 3275–3282, 2014.
- [3] O. K. Castell, J. Berridge, M. I. Wallace, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 51, 3134–3138, 2012.
- [4] S. Leptihn, O. K. Castell, B. Cronin, E. H. Lee, L. C. M. Gross, D. P. Marshall, J. R. Thompson, M. Holden, M. I. Wallace, *Nat. Protoc.*, 8, 1048–1057, 2013.
- [5] T. Tonooka, T. Osaki, K. Sato, R. Kawano, S. Takeuchi, *Sens. Actuators B Chem.*, 334, 129643, 2021.