

リポソームアレイによる膜タンパク質の機能解析法

竹内 昌治

東京大学生産技術研究所

1. 研究のねらい

本研究の目的は、マイクロ流体デバイスを利用して、膜タンパク質の導入された単一直径の巨大リポソームを基板上にアレイ化し、膜タンパク質の機能解析を効率的に行う方法を確立することである。単一直径リポソームは、医薬品、食品、化粧品など多くの産業分野への活躍が期待されているため、大量の単一直径リポソームを効率的に生産する方法が渴望されている。また、膜タンパク質は、細胞の内外の物質輸送・排出に重要な役割を果たしているため、各種の膜タンパク質の機能や特性を一つ一つ解明することが、次世代の治療、創薬法、あるいは超高感度生体イオンセンサーの実現に重要な研究課題となっている。ここでは、マイクロ流体デバイスを利用して単一直径の巨大リポソームを作成する方法を検討し、一種類の膜タンパク質が導入されたリポソームをアレイ状に固定化する方法を探る。これにより、狙った膜タンパク質の物質輸送効率を定量的かつ効率的に評価するシステムへの展開を図る。

2. 研究成果

(1) リポソーム生成法

(i) エレクトロフォーメーション法

エレクトロフォーメーション法とは、リン脂質膜で覆われた基板に電圧を印加することによって、膜を剥離させ、一層の脂質2重膜で構成されたリポソームを得る方法である。他の一般的な方法に比べ、数ミクロン以上の巨大リポソームが作れる、一枚膜構造を得られやすい、比較的大きさが揃っているなどの特長があるが、一方で、サイズの制御は課題であった。そこで、ここでは、まず、脂質を基板上にパターンすることから検討した。あらかじめITO基板にパリレン樹脂を蒸着し、部分的にエッチングすることで、ITOが一部露出したパターンを用意する。次に、この基板上へ脂質が分散した有機溶媒を垂らし、乾燥させる。すると基板が脂質で覆われる。その後、パリレンを引き剥がすことで、ITOの露出した部分にのみ、脂質をパターンニングできた。この状態で、水溶液を加え、電圧を印加しエレクトロフォーメーションを行った。その結果、図1のように脂質膜が膨潤してリポソーム形状が現れた。ばらつきは約7%程度（小径のリポソームは除く）でリポソームの直径を制御することができることが分かった。

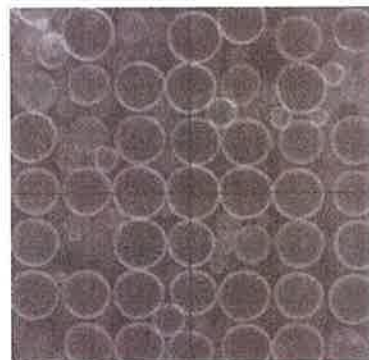


図1：脂質膜のパターンニング後にエレクトロフォーメーションを行った様子。

(ii) 接触法による脂質2重膜の形成

ここでは、リポソーム形成の初段階として重要な脂質2重平面膜を安定して再現性良く形成する方法について検討した。脂質2重平面膜の形成法の歴史は長い。テフロンシートに100ミクロン程度の孔を針で開け、そこに膜を形成する「はけ塗り法」などは一般的である。その一方で、膜形成は熟練したノウハウによるものが多く、自動化が困難であった。そこで、ここでは微小溶液の操作や並列化が得意なマイクロ流体デバイス技術を利用した方法を考案した。すなわち、水と油（有機溶媒）の界面にできる脂質の単分子膜を接触させて2分子膜を形成する「接触法」である。この方法の概要を図2に示した。まず、有機溶媒中に脂質を分散させる。そこに水滴を導入する。脂質は、親水基と疎水基からなるため、水と有機溶媒との界面には脂質の単分子膜が形成される（図2左）。こうした水滴を2つ用意

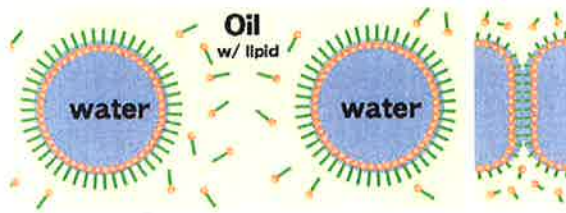


図2：接触法による脂質二重膜形成の概念図。形成前（左）と後（右）。

し、双方をマイクロ流体デバイス内で動かし接触させることで、脂質 2 重膜を再構成できる (図 2 右)。実際、交差する 2 つのマイクロ流路の上下方向に脂質を含む有機溶媒、左右の流路に水溶液を導入し、それらをシリンジポンプで中心部に押し出すことによって、左右の水溶液が接触し 2 重膜が安定してできることが分かった。

(iii) マイクロジェット法 (シャボン玉法)

次に、上で紹介した接触法で形成した脂質 2 重膜にジェット流を当て、膜を球状に変形させる方法 (シャボン玉法) を検討した。接触法では、大きな水滴を用いると、数ミリ程度の大きさまで膜を形成することができる。このシャボン玉法では、まず先端直径を約 60 ミクロン程度に加工した微小ガラス管を近づける。ガラス管は電磁弁を介して圧縮空気ポンプに接続した。ガラス管の先端から数センチの部分は、ベシクルに内包したい水溶液を満たしておく。膜の近くで一気に電磁弁を数 ms 幅で開くことで、ポンプの圧力により水溶液が押し出されジェット流を発生させた。この流れによって、膜が変形し、ちょうどシャボン玉ができるように球状の膜を作成することに成功した (図 3)。た、電磁弁の開閉幅、ノズルと平面膜との距離、および、ジェット圧などを制御することによって、直径を揃えることができるようになった。

(iv) 脂質膜チャンバ形成法

ここでは、上に提案した接触法を利用して並列に脂質 2 重膜を形成し、マイクロ流路内に設計したマイクロチャンバを脂質膜で閉じる実験を行った。そもそもリポソームは、脂質膜で閉じられた閉空間であるため、チャンバの上を脂質膜で覆うことでリポソームと同様の実験が行えることに注目した。実際、図 4 のような流路を作成し、メイン流路に水溶液、有機溶媒、水溶液を導入することで、凹部を脂質膜で覆うことができた。これが 2 重膜であることは、(3) で述べる、透過実験によって明らかになった。

(2) リポソームのハンドリングおよび固定化法

上記のマイクロジェット法で、所望の物質が内包された均一直径のベシクルが形成できるようになれば、次の段階として、マイクロアレイ化し、ベシクルを介した輸送や、内部でのタンパク質発現機構の解析などを高速で行なうハイスループットスクリーニングへの展開が期待できる。たとえば、まずランダムに配列を調製した DNA をベシクルに内包し、そこから膜タンパク質を発現させる。それらのベシクルをアレイ状に配置し、薬剤を導入する。その結果、いくつかのベシクルの薬剤輸送が観察された場合、

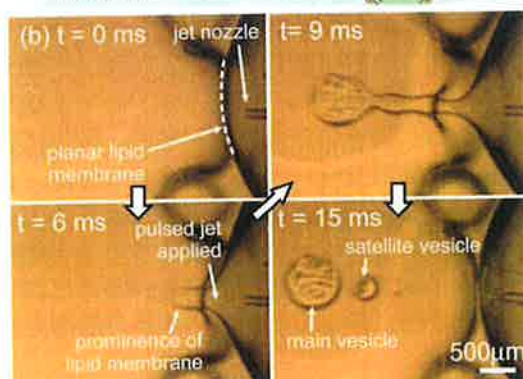
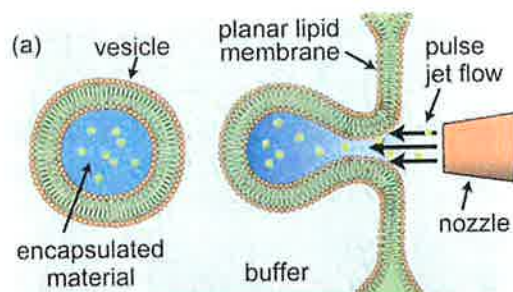


図 3: マイクロジェット法によるベシクル形成の様子。シャボン玉のように平面膜を変形させ球状の膜にすることによって、均一直径ベシクルによる効率的なカプセル化を行なえることを示した。



図 4: マイクロチャンバの出口付近に脂質膜を形成した様子。接触法を応用し、水、有機溶媒、水を交互に流すことよって、安定して大量に膜を形成できることがわかった。

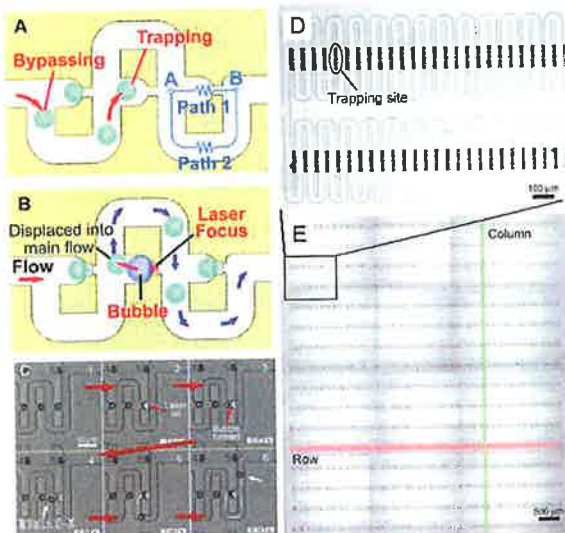


図 5: 均一直径の物体の固定および選択的に取り出しに適したダイナミックマイクロアレイ。

膜には、特異的なトランスポータが発現している可能性が高い。そこで、そのベシクルを実験後に取り出し、発現しているタンパク質や内包されていた DNA の配列を明らかにすることで、どのようなタンパク質が輸送に関わっていたのか知ることができる。このような実験を可能にするマイクロアレイとして、図 5 のようなデバイスを考案した。図 5AB のように直線の流路とそれを迂回するような流路が交差したマイクロ流路を設計し、それぞれの流路抵抗を調整することで、対象物を効率的に捕捉できる。すなわち、図 5A の Path 1 の流路抵抗よりも Path 2 のほうが大きく設計しているため、最初に粒子は、Path 1 を通るが、途中で狭窄しているため、トラップされる。Path 1 に粒子がトラップされると、抵抗は Path 2 の方が下がり、後続の粒子は、Path 2 を通過する。さらに、図 5B のようにトラップされている位置に、金属薄膜をパターンしておけば、この薄膜に光ピンセットのレーザを照射することによって泡を発生させ、対象物を押し出すことができる。流れが緩やかな場合は、光ピンセットで直接粒子を捕獲し、Path 2 の流れに押し出すことも可能である。こうして押し出された粒子は、下流で捕獲できる。これまでのマイクロアレイは、観察スポットが固定化されたものが一般的であったが、このアレイは、実験中にスポットの位置を変化できるため、「ダイナミックマイクロアレイ」と名づけた。実際、この流路を利用して、これまでに、1 万個レベルのビーズや細胞を高速でアレイ化し、生化学実験後に、アレイの中から一つだけビーズを回収できるようになった (図 5C, D, E)。

(3) 計測評価

(i) 脂質膜のチャンネル電位計測

接触法は、膜形成の再現性も良いため、多チャンネルの膜形成も可能になってきた。複数同時に膜形成が行なえれば、そこに複数種の膜タンパク質を導入し、同時に多くの機能解析を行なうことができる。膜タンパク質の機能計測のうち、イオンチャンネル電流計測は比較的簡単に行うことができる。実際、接触法により形成した膜に、チャンネル性の膜タンパク質などを導入し、膜の両端にかかる電圧を固定した条件でのイオンチャンネル電流の計測に成功した。実験では、膜タンパク質の中でも、比較的分子量が小さい α -ヘモリシンなどを利用した。これらは、多量体化によりナノポアを形成し、チャンネル電流を発生させる。実際の膜タンパク質の再構成は、一般的に膜融合法が用いられる。これは、膜面分子リポソーム中に精製した膜タンパク質を平面膜上にばら撒くことによって融合をさせる方法である。この融合により、スパイク状のチャンネル電流を計測できることが分かってきた。また、これらの方法を利用して多チャンネル膜形成用のデバイスを製作し、実際に接触法によって形成された膜から、図 6 ようにペプチドなどのイオンチャンネル電流を複数同時に計測できることが分かった。

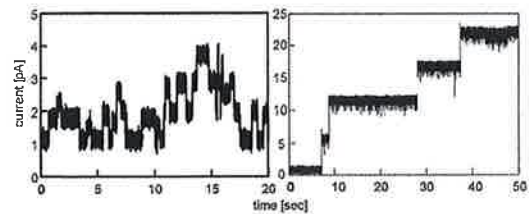


図 6: 再構成された脂質二重膜から計測されたイオンチャンネル電流。グラムジジン A (左) と α -ヘモリシン (右)。

(ii) 透過実験。

(1) の (iv) 作成した、膜チャンバに α -ヘモリシンを導入し、膜透過実験を行うことに成功した。カルセインを閉じ込めたチャンバに脂質膜を形成後、 α -ヘモリシンの混入した水溶液を導入した。すると、膜形成に成功した各チャンバから、膜を通してカルセインがメイン流路へと拡散する様子が観察された。図 7 は、各チャンバの輝度変化をグラフにしたものである。青線と赤線は、ヘモリシンの濃度を 1 mg/mL および 1 μ g/mL に変化させた場合の結果である。各々の条件で 2 つのチャンバから計測したものをグラフにした。濃度が濃くなるにつれ拡散速度が上がっている様子から、膜にヘモリシン (膜タンパク質) が再構成されたことがわかる。ここから、(1) の (iv) で考案した方法によって形成した膜は、確かに脂質 2 重膜であること、また膜チャンバ法がトランスポータなどの非イオンチャンネル型膜タンパク質の機能解析に有用であることが示唆された。

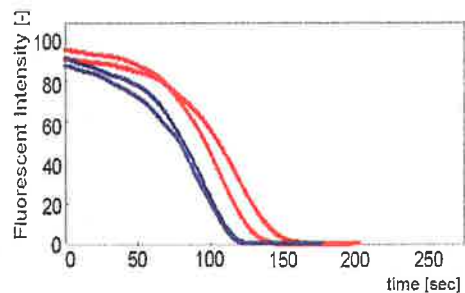


図 7: 膜チャンバによる膜を介した透過の評価実験結果。

(4) まとめ

本研究を通じて、均一直径のリボソームを生成する場合、微小流体の特性を活かすマイクロ流体デバイスを利用した方法が適していることを示せた。接触法による脂質2重膜の形成は、安定して再現性のよい膜形成法であった。また、そこからシャボン玉のように球体膜を形成する方法は、効率的なカプセル化を実現するための有効な手段であった。これらの方法によって生成したベシクルの直径は数百ミクロンと大きなものであったが、マイクロチャンバ中に形成した脂質2重膜を変形させて得られる膜は数十ミクロンと細胞サイズまで小さくできることが、最近の研究で分かってきた。また、ここで形成した脂質2重膜に簡単な膜タンパク質を導入し、機能活性を計測することができたことから、さらに本研究を発展させれば、創薬や匂いセンサーなどに有効な高次の膜タンパク質の機能解析への応用も期待できると考えている。

3. 主な発表

論文

1. Bruno Le Pioufle, Hiroaki Suzuki, Kazuhito Tabata, Hiroyuki Noji, and Shoji Takeuchi: Lipid Bilayer Microarray for Parallel recording of Transmembrane Ion Currents, **Analytical Chemistry**, vol. 80, no. 1, pp. 328-332, 2008
2. Kei Funakoshi, Hiroaki Suzuki, and Shoji Takeuchi: Formation of giant lipid vesicle-like compartments from a planar lipid membrane by a pulsed jet flow, **Journal of the American Chemical Society**, vol. 129, pp. 12608-12609, 2007
3. Wei-Heong Tan and Shoji Takeuchi: A Trap-and-Release Integrated Microfluidic System for Dynamic Microarray Applications, **Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.**, vol. 104, no. 4, pp. 1146-1151, 2007.
4. Hiroaki Suzuki, Kazuhito V. Tabata, Hiroyuki Noji and Shoji Takeuchi: Electrophysiological recordings of single ion channels in planar lipid bilayers using a polymethyl methacrylate microfluidic chip, **Biosensors and Bioelectronics**, vol. 22, no. 6, pp. 1111-1115, 2007.
5. Kei Funakoshi, Hiroaki Suzuki, and Shoji Takeuchi: Lipid bilayer formation by contacting monolayers in a microfluidic device for membrane protein analysis, **Analytical Chemistry**, vol. 78, pp. 8169-8174, 2006.

招待講演

1. Shoji Takeuchi: Dynamic Fluidic Microarray for Biological Cell Analysis, 3rd International Conference on SMART MATERIALS, STRUCTURES AND SYSTEMS (CIMTEC), Acireale, Italy, 2008/6/8-13
2. Shoji Takeuchi: Lipid Membrane Array for Membrane Protein Analysis, International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM), Atagawa, 2007/12/8
3. Shoji Takeuchi, MEMS technology for Artificial cells, IEEE International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS2007), Nagoya University, 2007/11/12
4. Shoji Takeuchi: Microfluidic technologies for membrane protein analysis, BioKOREA, Seoul, 2007/9/13

4. 受賞

1. 文部科学大臣表彰 若手科学者賞 (2008年4月)