

イオンチャネルスクリーニングのための 平面脂質二重膜マイクロアレイチップ

研究ノート

鈴木 宏 明*

Planar Lipid Bilayer Micro-array Chip for
Screening of Ion Channel Proteins

Key Words : Lipid Bilayer, Ion Channel Recording, Array Chip, Microtechnology

1. はじめに

近年、Micro Total Analysis Systems (μ TAS) または Lab-on-a-Chip と呼ばれる技術が急速に発達している[1,2]。チップ上に微細な流路や反応容器を加工し、そのような微小空間中で化学分析や生化学反応を行うことにより、従来のアッセイ法に比べて必要な試薬量が大幅に削減できる、反応・分析時間が短縮される、反応から検出までをひとつのチップ上で効率的に行うことができるなどの利点が提唱されている。この技術を用いることにより、薬剤スクリーニングのハイスループット化が期待されている。創薬ターゲットとして、膜タンパク質（イオンチャネル、トランスポータ等）の重要性は広く認識されているが[3-5]、その扱いの困難さから、汎用的・標準的なハイスループットアッセイ系の確立が遅れている。同様に、膜タンパク質を扱う μ TAS 技術についても報告例が比較的少ないのが現状である。膜タンパク質には様々な種類が存在するが、中でもイオンチャネルはパッチクランプ法 (Fig. 1a) の発展によりその機能がよく知られている[6]。しかし、従来のパッチクランプ法は職人的技術を要するため、ハイスループット化に向かない。最近ではマイクロ加工技術によって多数の均一径孔を基板上に形成し、そこにイオンチャネルを発現させた細胞を吸引させ多数の細胞パッチクランプ計測を実現する装置が市

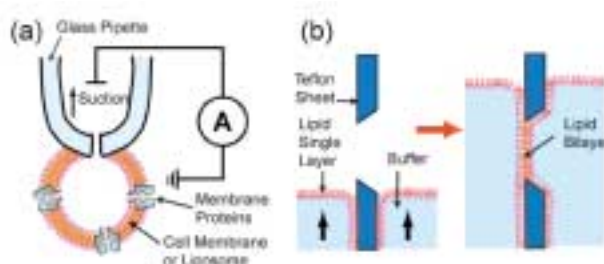


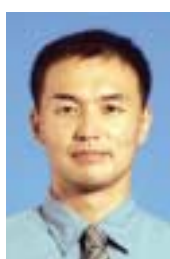
Fig. 1 (a) パッチクランプ法の模式図。ガラス細管に細胞を吸引し、細胞膜に発現したイオンチャネルを通過する電流を計測する。
(b) Langmuir-Blodgett 法による平面脂質二重膜形成法。

販されているが、ギガオームシール形成の再現性に難が残るようである[7-10]。一方、精製または合成したリン脂質分子から、細胞膜モデルとしての平面脂質二重膜を人工的に形成し、そこにイオンチャネルを再構成して電気生理計測を行うという手法が存在する (Fig. 1b) [6]。この手法では、究極的には一分子レベルの少ないタンパク質量でアッセイができる、実験条件を任意に設定可能、目的タンパク質の機能のみを純粋に調べることができる、など細胞のパッチクランプ法を補完する様々な利点が見られる。しかし、従来の平面人工脂質二重膜形成法は再現性が悪く、一般に広く用いられてこなかった。

筆者らは、マイクロチップ上に平面人工脂質二重膜のアレイを形成し、イオンチャネル電流計測をハイスループットで行うためのプラットフォーム開発を継続して行ってきた[11-14]。マイクロ孔に制御して脂質溶液を分配することにより、平面脂質二重膜形成の再現性を大幅に向上させることに成功している。本報では、その最新の成果を報告する。

2. 平面脂質二重膜マイクロチップの構造および脂質膜形成原理

脂質平面膜形成の従来法では、テフロン膜に直径



*Hiroaki SUZUKI

1973年8月生
東京大学大学院 工学系研究科 機械工学専攻 (2003年)
現在、大阪大学大学院 情報科学研究科 バイオ情報工学専攻 准教授 博士 (工学) バイオMEMS
TEL : 06-6879-4151
FAX : 06-6879-7433
E-mail : suzuki@ist.osaka-u.ac.jp

50-200 μm 程度の孔を手作りで形成し、そこにリン脂質の単分子膜を張り合わせる (Fig. 1b)、またはリン脂質を溶解させた溶媒をはけで塗布する、といった方法が使われていた[6]。筆者らは、微細加工により形成したより微細かつ形状の揃った貫通孔と、マイクロ流路システムを利用して、脂質平面膜形成の再現性の向上を試みた。再現性の向上により、多数の脂質平面膜を同時形成し、計測のスループットを大幅に上げることが可能になる。Fig. 2(a)に、我々が開発した96ウェルの平面脂質二重膜チップの概観を示す。4×3 cm²のチップ上に、96個 (12×8) の計測ウェル (直径2mm、深さ3mm) が配置されている。Fig. 2(b)に単一ウェルの断面模式図を示す。マイクロチップは三層構造で構成されており、上側のウェル、平面脂質膜を形成するためのマイクロ孔構造を持つ薄膜ポリマー (ポリパラキシリレン) シート (シート厚20 μm 、孔直径30 μm)、そして下側の流路から成っている。計測時には、上側ウェルと下側流路がバッファで満たされた状態で、それらを隔てている薄膜シートに形成されたマイクロ孔に平面脂質二重膜が形成される。膜タンパク質は、上側のウェルに例えばプロテオリポソーム (膜タンパク質を再構成したリポソーム) の懸濁液を添加すると、自発的に平面膜に融合して再構成される。イオンチャンネルを通過する膜電流は通常ピコアンペア～ナノアンペアと小さいため、計測はパッチクランプ用の電流増幅器を用いて行う。増幅器の計測ヘッドに接続した電極をウェルに挿入し、グラウンド電極を下側流路の導入口に挿入することにより、定電圧下での膜電流を計測する (電圧クランプ)。ウェルは電気的に絶縁されているため、個々のウェルで独立な計測を平行に行うことが可能である。

デバイスの作製は、市販のステレオリソグラフィ装置 (Perfactory, envisiontec 社, ドイツ製) を用いた。製作するデバイスをCADソフトウェア上でデザインすると、z方向に25 μm または50 μm 毎の層に分割した平面データを作成し、そのプロジェクト像をガラス基板上の光硬化性樹脂に照射して積層する。マイクロ孔を有するポリマーシートはフォトリソグラフィ技術により別途作製し、樹脂の積層の間にサンドイッチする方法を開発した (ハイブリッド光造形技術)。この方法により、ステレオリソグラフィ装置の空間解像度を補って、直径数十マ

イクロメートルの孔構造を組み込むことができる。

平面脂質膜の形成は以下のような手順で行った (すべてピペットマンによる操作)。まず、上側ウェルにバッファ (300 mM KClを含む。pH=7.0) を注入する。その後、下側流路の注入口から少量 (~5 μL) の脂質溶液 (10 mg リン脂質/1 mL n-デカン) を、続けてバッファを注入する。この操作により、脂質溶液がマイクロ孔部分を通過した後、下側流路がバッファで満たされる。このとき、マイクロ孔部分を覆うように脂質溶液の薄膜層が形成される。時間の経過によってこの脂質層がさらに薄膜化し、脂質二重膜が形成される。

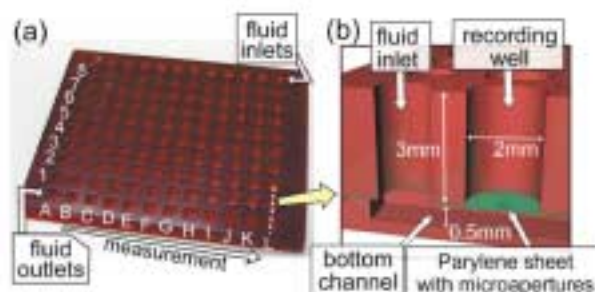


Fig. 2 (a) 96ウェルの平面脂質二重膜チップの概観写真。チップのサイズは4×3 cm²。

(b)単一ウェルの断面模式図。上側ウェル、マイクロ貫通孔を持つパリレン膜、および下側流路から構成される。

3. 96ウェルチップでのイオンチャンネル計測再現性実験

上記の手順で脂質二重膜を形成し、モデルイオンチャンネルであるグラミシジンAを用いて電気生理計測の再現性を評価した。グラミシジンは水層から脂質二重膜に自発的に挿入し、一価のイオンを透過するチャンネルを形成する。グラミシジンは、0.5 mg/mLの濃度であらかじめ上側に注入するバッファに溶解させた。計測は、計測電極を96個のウェルに対して順番に移動させる方法で行った。Fig. 2(a)中のアドレスで計測されたイオンチャンネル電流の例をFig. 3に示す。Fig. 3(a)は、脂質膜形成後約20分後に計測されたシグナルであり、イオンチャンネル1～2分子の開閉がステップ様の電流の変化として観測される。(b)では、別のウェルで計測開始から約35分後に計測されたものであり、シグナルのステップの変化から複数のイオンチャンネルが再構

成されていることがわかる。(c) および (b) は計測開始からそれぞれ約 45 分後および 60 分後に観測されたものである。多数のイオンチャンネルの重ね合わせにより、個々のチャンネルの開閉（ステップ様の信号）はもはやみられず、電流の大きな揺動が観測されている。

Fig. 3 のようなイオンチャンネル電流は、再現性の問題から、全てのウェルで観測されるわけではない。リン脂質二重膜は、厚さ 5-10 nm の薄膜であるため、形成されにくく、また壊れやすい。本デバイスにおける、脂質二重膜形成及びイオンチャンネル電流計測の再現性を評価するため、全 96 ウェルにおけるイオンチャンネル電流計測の結果を Fig. 4 にまとめた。前述のように、平面膜の形成及びイオンチャンネルの再構成は経時的に変化するが、計測システムの制限から、全てのウェルを同時計測することは不可能である。電極を順番に移動させ全ウェルを計測したが、1 回目の計測後に薄膜化が進行し、イオンチャンネルが再構成される可能性が否定できない。従って、脂質膜形成の操作を行った後、全ウェルの順次電気計測を 2 回行った。（ここで、1 ウェルの計測に 30-60 秒を要するため、96 ウェルをスイープするのに約 1 時間を要した。従って、2 回の全計測には、約 2 時間を要した。）Fig. 4 中、(i), (ii), および (iii) で表されるウェルでは、2 回の計測においてどちらもイオンチャンネル電流が観測されなかった。一方、(iv), (v), および (vi) で表されるウェルでは、2 回の計測のうち両方、またはどちらか 1 回においてイオンチャンネル電流が観測された。96 ウェルのうち、少なくとも 1 回の計測においてイオンチャンネル電流が観測された割合を求めると、約 46 % であった。

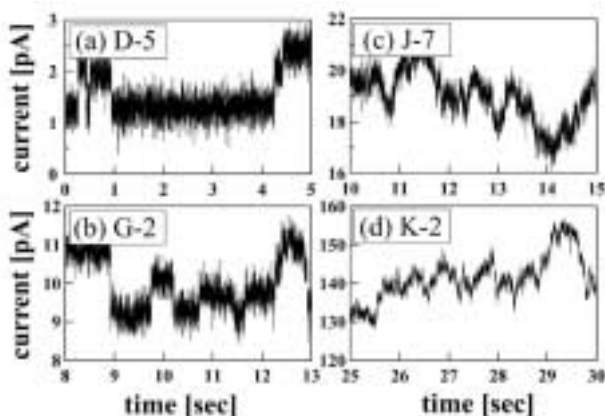


Fig. 3 個々のウェルで計測されたグラミシジンAを通過するイオン透過に伴う電流信号の例。

従来の方法では、このような再現率を算出することが困難なほど、平面脂質膜形成およびイオンチャンネル再構成の再現性がばらつくため、ここで得られた再現率は非常に良好であり、今後のハイスループット化に大いに期待が持てる結果であるといえる。

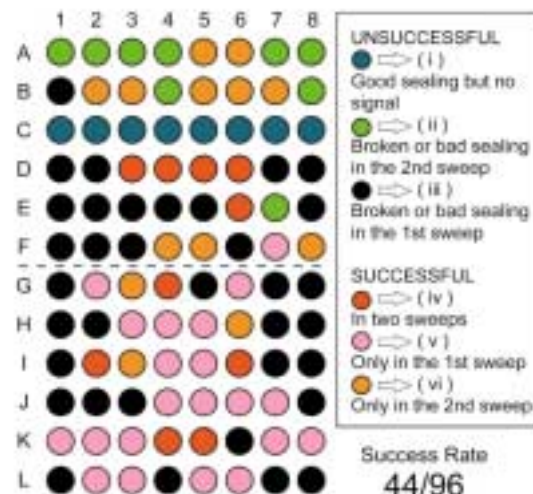


Fig. 4 全 96 ウェルにおけるイオンチャンネル電流計測の結果。一度の平面膜再構成に対して 2 回計測を行った。

4. まとめと展望

バイオチップ技術の発展により、様々な生化学アッセイ法やその装置が小型化され、検出効率の向上やアッセイ時間短縮などが具現化されている。その中で、膜タンパク質の簡便かつ効率的なアッセイ手法の開発は急務である。我々が提案する平面脂質二重膜をプラットフォームとするハイスループットスクリーニング法が、ひとつの解法となることを願っている。

5. 謝辞

本研究は、筆者が東京大学生産技術研究所竹内研究室に在籍時、竹内昌治博士および B. Le Pioufle 博士との共同研究により行った。また、本プロジェクト立ち上げの段階で、大阪大学の井出徹博士および野地博行博士に脂質二重膜の形成法およびイオンチャンネル計測法を教わった。そのほかにも、多くの共同研究者の協力が本プロジェクトの進展を支えた。謹んで感謝いたします。

参考文献

- [1] P. S. Dittrich et al., “Micro Total Analysis Systems. Latest Advancements and Trends,” *Anal. Chem.*, 78 (2006) 3887-3908.
- [2] 北森・庄子・馬場・藤田編、「マイクロ化学チップの技術と応用」、丸善、2004.
- [3] J. T. Groves, “Membrane array technology for drug discovery,” *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, 5 (2002), 606-612.
- [4] E. Sackmann and M. Tanaka, “Supported membranes on soft polymer cushions: fabrication, characterization and applications,” *Trends Biotechnol.*, 18 (2000), 58-64.
- [5] H. Suzuki and S. Takeuchi, “Microtechnologies for membrane protein studies,” *Anal. Bioanal. Chem.*, Online First, 2008.
- [6] 岡田編、「新パッチクランプ実験技術法」、吉岡書店、2001.
- [7] A. Brueggemann et al., “Ion channel drug discovery and research: the automated Nano-Patch-Clamp technology,” *Curr Drug Discov Technol.*, 1 (2004), 91-96.
- [8] A. Finkel et al., “Characterization of a MEMS BioChip for planar patch-clamp recording,” *J. Biomol. Screening*, 11 (2006), 488-496.
- [9] 澤田光平ら、「電位依存性イオンチャネル探索研究における蛍光および電気生理学的高速スクリーニング(HTS)法」、*日薬理誌* 126 (2005), 321-327.
- [10] 小林力、「不可能が可能になった自動パッチクランプ装置」、*日薬理誌*, 128 (2006), 374-390.
- [11] H. Suzuki et al., “Planar lipid bilayer reconstitution with a micro-fluidic system,” *Lab Chip*, 4 (2004), 502-505.
- [12] H. Suzuki et al., “Highly reproducible method for planar lipid bilayer reconstituted using a micro Fluidic Chip,” *Langmuir*, 22 (2006), 1937-1942.
- [13] H. Suzuki et al., “Electrophysiological recordings of single ion channels in planar lipid bilayers using a polymethyl methacrylate microfluidic chip,” *Biosens. Bioelect.*, 22 (2007), 1111-1115.
- [14] B. Le Pioufle et al., “Lipid bilayer microarray for parallel recording of transmembrane ion currents,” *Anal. Chem.*, 80 (2008), 328-332.

