

論文の内容の要旨

微小液滴上に形成した脂質二重膜による膜輸送計測

氏名 外 岡 大 志

1. 序論

本研究の目的は、内部に電極を導入したピコリットルの体積を有する脂質膜チャンバを構築し、膜電位を固定した状態で膜タンパク質の輸送機能の蛍光計測に応用可能であることを示すことである。このような脂質膜チャンバは輸送能力の小さい膜タンパク質や電荷の小さい物質を輸送する膜タンパク質の輸送機能の電位依存性の計測に有利である。

従来の人工脂質膜チャンバを用いた電位依存性膜タンパク質の輸送機能計測手法は、膜電位の形成方法と膜タンパク質の輸送機能の計測方法により二つの手法に大別される。第一に、脂質膜チャンバ内外のイオンの組成を変化させて膜電位を形成し、膜タンパク質の輸送機能を基質特異性を有する蛍光指示薬を用いて蛍光計測する手法が挙げられる。本手法は、輸送能力の小さい膜タンパク質や電荷の小さい物質を輸送する膜タンパク質の輸送機能計測が可能であるが、電位を固定することが困難であり電位依存性の計測には適当ではないと考えられる。第二に、脂質膜を挟んで設置した電極により膜電位を形成し、膜タンパク質の輸送機能を、基質輸送に起因した電荷の移動の電流計測により計測する手法が挙げられる。本手法は、電位を固定することが可能であるが、輸送能力の小さい膜タンパク質や電荷の小さい物質を輸送する膜タンパク質の輸送機能計測は困難であった。従って、いずれの方法を用いても、膜電位を固定した状態での、輸送能力の小さい膜タンパク質や電荷の小さい物質を輸送する膜タンパク質の輸送機能の電位依存性の計測は困難であり、電位依存性ポンプや電位依存性トランスポータの輸送機能計測は難しかった。このような電位依存性膜タンパク質の計測を実現するためには、電極による膜電位の形成と、膜タンパク質の輸送機能の蛍光計測の両立が必要である。

本論文では、内部に電極を導入したピコリットルの体積を有する脂質膜チャンバを構築し、膜

電位を固定した状態での膜タンパク質の輸送機能の蛍光計測に応用可能であることを示す (Fig. 1).

2. 膜輸送の理論モデルと脂質膜チャンバの構築

脂質膜チャンバを用いた膜タンパク質の蛍光計測の理論モデルを構築し、脂質膜チャンバの膜面積 (S) および体積 (V) が膜タンパク質の蛍光計測に与える影響について検証する。膜タンパク質を介した膜輸送の理論モデルを構築することにより、脂質膜チャンバ内の比蛍光強度のシミュレーションを行った結果 (Fig. 2a), 膜面積体積比 (S/V) が大きいほど膜タンパク質の輸送機能を高速に検出できることが示された。また、巨視的にはその検出時間は膜面積体積比に反比例して短くなることがわかった (Fig. 2b)。

次に、内部に電極を導入したピコリットルの体積を有する脂質膜チャンバの構築を行った。まずは、一般的なフォトリソグラフィと電気めっき法を用いることにより (Fig. 3), ガラス基板上に親水性のマイクロパターンが疎水性の領域の内部にアレイ状に配置され、さらにその親水性部分の一部に銀-塩化銀電極が設置された構造 (親水・疎水パターン基板) を作製した (Fig. 4)。作製した親水・疎水パターン基板と Fig. 5 に示した手法を用いて脂質膜チャンバを構築する。まず、脂質分子の分散した有機溶媒中で水溶液を前記基板に接した状態で表面上を移動させることにより、親水性のマイクロパターンの内部に微小液滴を配置することができる (Fig. 6a)。結果として、内部に銀-塩化銀電極を有し体積がピコリットルオーダーである微小液滴を形成することができる。さらに、その微小液滴の上部から別の微小液滴を接触させることにより、基板上にパターンされた微小液滴の上部に脂質二重膜を形成できる (Fig. 6b)。この微小液滴を微小な空間として捉えることにより、銀-塩化銀電極を内部に有する脂質膜チャンバとして利用できる。親水性のマイクロパターンの間隔を狭め、上部から接触させる液滴の直径を大きくすることにより、脂質膜チャンバをアレイ化することが可能である (Fig. 7a)。また、脂質二重膜の境界は明視野顕微鏡により微小液滴上に確認することができる (Fig. 7b) ため、脂質二重膜の形成を確認することや、脂質二重膜の面積をモニタリングすることも可能である。

3. 脂質膜チャンバの評価

膜電位を固定した状態での膜タンパク質の輸送機能の蛍光計測を行う上で重要となる、脂質膜チャンバの膜面積体積比、および形成される膜電位についての評価を行った。

まず、脂質膜チャンバの膜面積体積比の測定を以下に示す方法により行った。本論文では、親水性のマイクロパターンの直径が 40 μm および 200 μm の 2 種類の親水・疎水パターン基板を用いて構築した脂質膜チャンバ (それぞれ 40 μm チャンバおよび 200 μm チャンバと呼ぶこととする。) の測定を行った。チャンバ内部の溶液と有機溶媒をそれぞれ別々の蛍光色素で染め分けて共焦点顕微鏡で観察することにより (Fig. 8), S/V の値はそれぞれ $100 \pm 10 \mu\text{m}^2/\text{pL}$ および $30 \pm 3 \mu\text{m}^2/\text{pL}$ と求められた。膜タンパク質の輸送機能の蛍光計測を脂質膜チャンバを用いて行った従来研究との比較から、本研究で構築した脂質膜チャンバの膜面積体積比は膜タンパク質の輸送機

能の蛍光計測が可能な範囲にあることが示された。

次に、電極間に電圧を印加した状態で、ヘモリシン（脂質膜に自発的に貫通孔を形成する膜タンパク質）の貫通孔を通過し脂質膜チャンバ内に移動するイオンに起因した電流を測定した。印加電圧と得られた電流値からヘモリシンのコンダクタンスを正確に求めることができたことから、意図した通りの膜電位が形成されていることが示された。

4. 膜輸送の計測

構築した脂質膜チャンバを用いて膜タンパク質の輸送機能の蛍光計測が可能であるか検証し、膜電位を固定した状態での膜タンパク質の輸送機能の蛍光計測への応用可能性を示す。

まず、ヘモリシンの貫通孔を介した脂質膜チャンバ内へのカルシウムイオンの拡散を、カルシウムイオン蛍光指示薬と 40 μm チャンバを用いて蛍光計測した。ヘモリシンとカルシウムイオンを脂質膜チャンバ外に、カルシウム蛍光指示薬をチャンバ内部に混合して脂質膜チャンバを形成し、蛍光顕微鏡で観察した結果、脂質膜チャンバ内の蛍光強度が上昇する様子が確認された (Fig. 9a)。この上昇はヘモリシン存在下でのみ観察された (Fig. 9b) ことから、ヘモリシンを介したカルシウムの拡散を蛍光計測可能であることが示された。

次に、同様の蛍光計測を 200 μm チャンバを用いて行い、結果を比較したところ (Fig. 10a)、40 μm チャンバの方が 200 μm チャンバに比べて検出に必要な時間（検出時間）が短く、検出時間は 0.36 倍であった (Fig. 10b)。よって、膜面積体積比 (S/V) が大きいほど高速に膜輸送を検出可能であることが示された。膜面積体積比 (S/V) は 40 μm チャンバの方が 200 μm チャンバに比べて 3.3 倍であることから検出時間は膜面積体積比におよそ反比例しており、この結果は膜輸送のシミュレーション結果と定性的に一致したことから理論モデルの妥当性が示唆された。

以上の結果から、構築した脂質膜チャンバを用いて膜タンパク質の輸送機能の蛍光計測が可能であることが示された。

次に、膜電位を固定した状態での膜タンパク質の輸送機能の蛍光計測への応用可能性を示す。電位を印加せずに蛍光計測を行った実験と同様の条件で脂質膜チャンバを形成し (Fig. 11a)、脂質膜チャンバ内の電極に -50mV を印加しながら、脂質膜チャンバの蛍光強度と電流値を同時にモニタリングした。その結果、比蛍光強度の上昇が確認され (Fig. 11b 上段)、ステップ状の電流シグナルが観察された (Fig. 11b 下段)。これは膜電位が形成されている状態で、ヘモリシンの貫通孔を介したチャンバ内へのカルシウムイオンの移動を検出できたことを示している。また、ステップの間隔が一定であることから膜電位が固定されていることが示された。以上の結果から、本研究で構築した脂質膜チャンバは膜電位を固定した状態での膜タンパク質の輸送機能の蛍光計測に応用可能であることが示された。

5. 結論

本論文では、電極を組み込んだピコリットルの体積を有する脂質膜チャンバが、膜電位を固定した状態での膜タンパク質の輸送機能の蛍光計測に使用可能であることを示した。

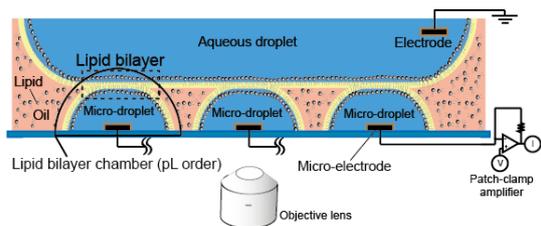


Figure 1. 本論文で提案する電極を導入したピコリットルの体積を有する脂質膜チャンバの概念図。電極による膜電位の印加と、膜タンパク質の輸送機能を蛍光計測を両立した計測システムである。

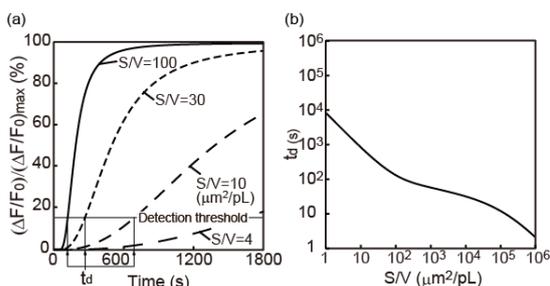


Figure 2. 膜輸送の蛍光計測のシミュレーション。(a) 様々な膜面積体積比 (S/N) におけるチャンバ内比蛍光強度 $((\Delta F/F_0)/(\Delta F/F_0)_{max})$ の経時変化。 t_d は検出時間を表す。(b) 検出時間の膜面積体積比依存性。

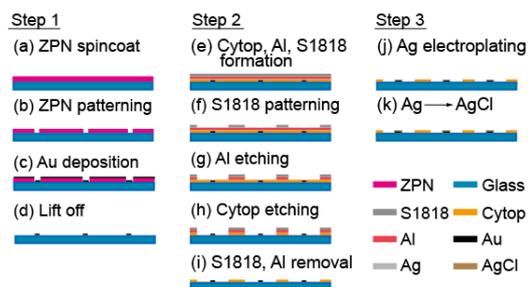


Figure 3. 親水・疎水パターン基板の作製プロセス。親水性部分はガラス表面を、疎水性部分には Cytop を用いる。プロセスは 3 つの Step から成る。(Step 1: 金電極パターンニング。Step 2: 親疎水パターンニング。Step 3: 銀 - 塩化銀電極形成。)

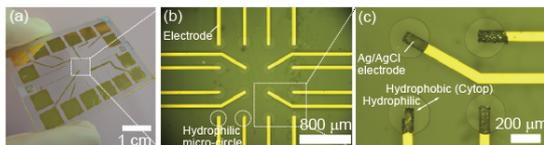


Figure 4. 作製した親水・疎水パターン基板。(a) 基板外観。(b) 親疎水パターンニング後 (Step 2 後) の親水性パターン。(c) 銀 - 塩化銀電極形成後 (Step 3 後) の親水性パターン部分の拡大図。

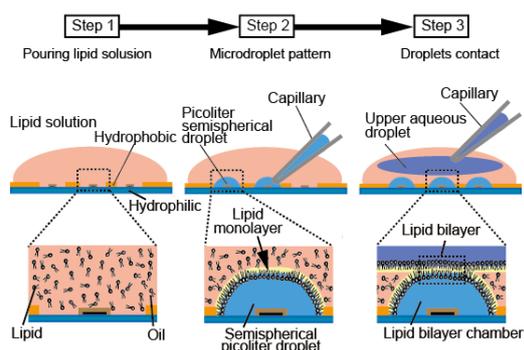


Figure 5. 脂質膜チャンバの形成方法。微小液滴上に脂質二重膜を形成し、その液滴を脂質二重膜チャンバとして用いる。脂質分子の分散した有機溶媒中を親水・疎水パターン基板上に滴下し (Step 1)、水溶液を排出しながら基板表面でキャピラリーを動かすことにより微小液滴を親水性パターン上に形成する (Step 2)。この時、微小液滴の表面には脂質の単層膜が形成される。次にパターンされた微小液滴の上から別の液滴を接触させることで脂質の単層膜同士が接触し、脂質二重膜が形成される (Step 3)。

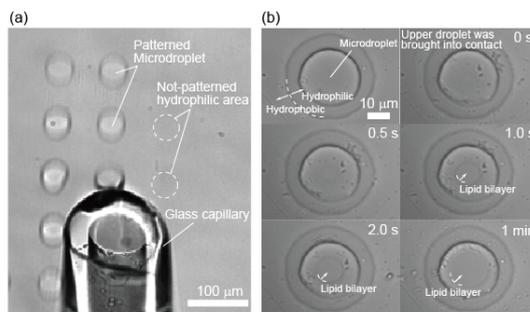


Figure 6. 脂質膜チャンバの形成。(直径 40 μm の親水性パターンを有する親水・疎水パターン基板を用いて形成: 40 μm チャンバ) (a) 脂質分子の分散した有機溶媒中での微小液滴のパターンニング。(b) 微小液滴の上から別の液滴を接触させた際のタイムラプス画像。脂質二重膜が形成される様子がわかる。膜形成過程の観察を容易にするため電極の設置されていない基板を用いて脂質膜チャンバを形成した。

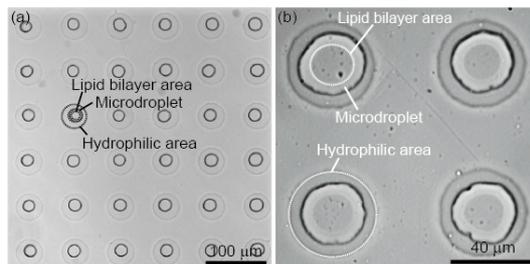


Figure 7. 脂質二重膜チャンバ (40 μm チャンバ)。(a) 36 個の脂質膜チャンバアレイ。(b) 拡大図。脂質二重膜の境界が確認できる。

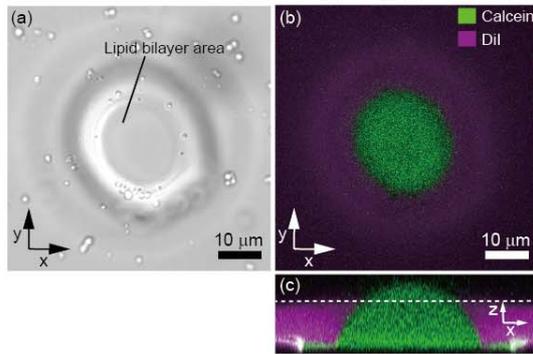


Figure 8. 脂質膜チャンバの共焦点画像（画像は40 μm チャンバのもの）。緑色（Calcein）は、脂質膜チャンバ内部を示す。マゼンタ（DiI）は有機溶媒を示す。(a) 明視野画像。(b) xy平面の共焦点画像。(c) xz平面の共焦点画像。点線は (b) の画像の取得位置。

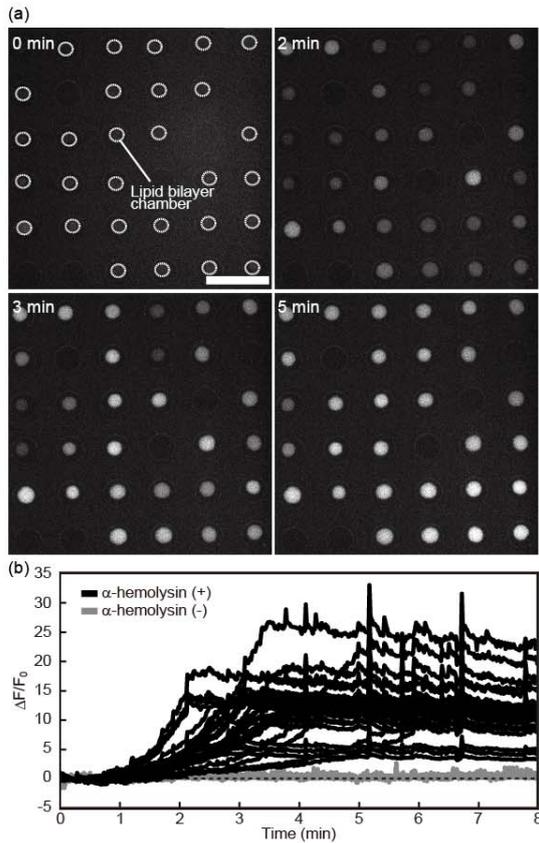


Figure 9. 膜タンパク質（ α ヘモリシン）を介したカルシウムイオンの輸送の蛍光計測。(a) α ヘモリシン存在下での脂質膜チャンバの蛍光タイムラプス画像。(b) α ヘモリシン存在下および非存在下での脂質膜チャンバ内比蛍光強度の経時変化。それぞれの曲線がひとつの脂質膜チャンバの比蛍光強度を表している。スケールバー：100 μm。

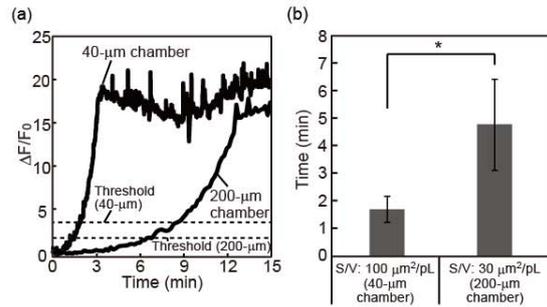


Figure 10. 異なる膜面積体積比を有する脂質膜チャンバを用いた膜輸送の蛍光計測。(a) 40 μm チャンバおよび200 μm チャンバを用いた際の、 α ヘモリシンの貫通孔を介してチャンバ内に拡散するカルシウムイオンによるチャンバ内比蛍光強度の経時変化。検出閾値は計測開始後30秒間の比蛍光強度の標準偏差の10倍とした。(b) 各脂質膜チャンバにおける検出時間の比較。* スチューデントT検定 ($P < 0.05$)。

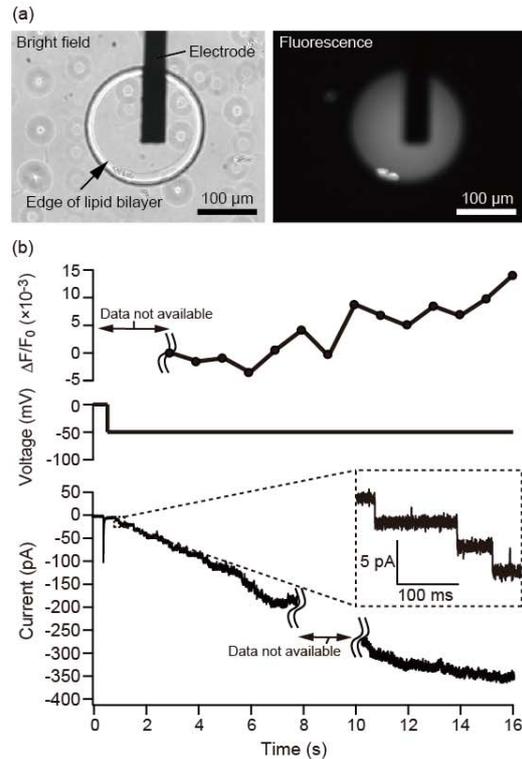


Figure 11. 膜電位を固定した状態での膜タンパク質（ α ヘモリシン）を介したカルシウムイオンの輸送の蛍光計測（200 μm チャンバを用いて計測）。(a) 電極を導入した200 μm チャンバの明視野画像および蛍光画像。(b) 脂質膜チャンバ内の比蛍光強度、印加電圧、および電流シグナルの経時変化。Data not availableは脂質膜チャンバの明視野観察およびパッチクランプアンプのゲイン操作に伴うものであり、計測への影響はない。