

博士論文（要約）

微小液滴上に形成した脂質二重膜
による膜輸送計測

外岡 大志

本論文はインターネット公表のための要約版であり、著作権等の関係により非公開部分を含む。
これに伴い、博士論文全文に対して図表番号が一部異なる。

目次

第 1 章	序論	4
	1.1 目的	4
	1.2 背景	5
	1.2.1 人工脂質二重膜を用いた膜タンパク質の輸送機能計測	5
	1.2.2 脂質膜チャンバの従来技術と課題	9
	1.3 本研究で提案する脂質膜チャンバ	12
	1.4 意義	13
	1.5 本論文の構成	15
第 2 章	膜輸送の理論モデルと脂質膜チャンバの構築	16
	2.1 緒言	16
	2.2 膜輸送の蛍光検出モデルの構築	16
	2.2.1 膜輸送の蛍光検出の原理	16
	2.2.2 膜輸送の蛍光検出モデルの構築	17
	2.2.3 理論モデルを用いた脂質膜チャンバの比蛍光強度のシミュレーション	19
	2.2.4 モデルを用いた膜輸送の蛍光検出のシミュレーション	20
	2.2.5 膜タンパク質の導入過程の蛍光検出への影響	24
	2.2.6 キレート剤を用いた蛍光検出の理論モデルの構築	24
	2.2.7 蛍光検出の理論モデルにおける拡散の影響	25
	2.3 デバイス作製	27
	2.3.1 デバイス作製概要	27
	2.3.2 ガラス基板表面への金電極のパターニング	28
	2.3.3 ガラス基板表面への親水・疎水パターニング	28
	2.3.4 金電極上への銀 - 塩化銀電極の形成	28
	2.3.5 サイトップ層の形成における条件検討	28
	2.4 脂質膜チャンバの形成	28
	2.5 脂質膜チャンバの膜面積制御	31
	2.6 結言	32
第 3 章	脂質膜チャンバの評価	34
	3.1 緒言	34
	3.2 脂質膜チャンバの体積と膜面積の測定	34
	3.2.1 チャンバ体積と膜面積の測定方法	34
	3.2.2 計測結果	35
	3.2.3 体積と膜面積に関する評価	37
	3.3 脂質膜の安定性の評価	38
	3.3.1 時間に対する安定性の評価	38
	3.3.2 電圧印加に対する安定性の評価	38

3.4	脂質膜チャンバの物質透過性の評価	39
3.5	膜容量・膜抵抗の測定	41
3.5.1	膜容量・膜抵抗の測定の概要	41
3.5.2	膜容量の計測結果	41
3.5.3	膜抵抗の計測結果	41
3.6	膜電位の計測	41
3.6.1	膜電位計測の概要	41
3.6.2	膜電位の計測結果	41
3.7	結言	41
第 4 章	膜輸送の計測	43
4.1	緒言	43
4.2	膜輸送の蛍光計測	43
4.2.1	概要	43
4.2.2	カルシウムイオンの膜輸送の蛍光検出結果	44
4.2.3	カリウムイオンの膜輸送の蛍光検出結果	45
4.3	膜輸送の蛍光検出における膜面積体積比の影響	49
4.3.1	概要	49
4.3.2	異なる膜面積体積比を有する膜チャンバによる膜輸送の蛍光検出	49
4.4	膜輸送の蛍光検出結果の理論モデルを用いた考察	51
4.5	膜輸送の電気計測	51
4.5.1	概要	51
4.5.2	膜輸送の電気計測結果	51
4.6	膜電位存在下での膜輸送の蛍光計測	52
4.6.1	概要	52
4.6.2	膜電位を固定した状態での膜輸送計測の方法	52
4.6.3	膜電位を固定した状態での膜輸送計測の結果	52
4.6.4	蛍光計測時における膜電位の変更	52
4.7	結言	52
第 5 章	結論	54
5.1	結論	54
5.2	展望	55
Appendix A	PBFI 溶液の特性評価	58
A.1	PBFI 溶液の比蛍光強度のカリウム濃度依存性	58
A.2	PBFI 溶液の蛍光強度のスクロース依存性	59
Appendix B	親水・疎水パターン基板の作製プロセス	60

目次

Appendix C 装置・薬品・材料	61
Appendix D 拡散方程式の解法	64
参考文献	68
謝辞	75

第 1 章 序論

1.1 目的

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。

膜タンパク質は細胞内外の物質輸送を担っており生命科学の基礎研究や薬剤開発において輸送機能を解析することが重要である。膜タンパク質は細胞や細胞内小器官の膜中に存在しているため、常に膜電位の存在下で機能しており、膜電位依存的に機能が変化する膜タンパク質も数多く報告されている^{[1][2]}。特に膜電位依存のポンプやトランスポータは生体内におけるエネルギー生産や薬剤排出などの生命の根幹を成す現象に関わっており、これらの膜タンパク質の機能活性やメカニズムを詳細に調べるニーズがあるが、従来の人工脂質膜を用いた方法では、膜電位存在下での膜タンパク質の物質輸送の計測において課題があった。従来の人工脂質膜を用いた膜タンパク質の輸送機能計測は、電気計測による方法と蛍光計測による方法に大別される。電気計測においては、コンダクタンスの大きい電位依存性のチャンネルタンパク質の電位依存性の輸送計測に制限されていた。これは電気計測においては、人工脂質膜中の膜タンパク質が膜を介して輸送する荷電物質の移動を電流として計測しており、その感度に限界があるためである。チャンネルタンパク質以外にも前述した電位依存性のトランスポータやポンプが存在し、これらの膜タンパク質のコンダクタンスは一般にチャンネルタンパク質の千分の一以下であるため計測が困難である。一方で、蛍光計測においては、コンダクタンスの小さい膜タンパク質の輸送を検出するだけの感度を実現できるが、膜電位の制御

の面で制限があった。蛍光計測用のシステムには電極が設置されていないため、脂質膜の両側のイオンの組成を調製することにより、電極を用いずに膜電位を印加する方法が用いられてきた。しかし、この方法による電圧印加は現在でもその電圧値について様々な議論が行われており、正確な膜電位を印加することが困難である。また、原理上膜電位は時間の経過と共に減衰していくため、安定した計測環境を構築することや、計測中に膜電位を意図的に変化させることも困難である。そこで、本研究では内部に電極を設置した人工脂質膜チャンバを作製し、膜電位を電極により印加し、膜タンパク質の輸送を蛍光により計測するシステムを構築する。

一般に蛍光計測システムとして用いられる脂質二重膜チャンバはピコリットルオーダー以下の体積であり、従来技術の単なる組み合わせではそのような微小な脂質膜チャンバの内部に蛍光計測可能な状態で電極を組み込むことは困難であった。本論文では基板上に設置された銀 - 塩化銀微小電極上にピコリットルオーダーの体積の液滴を形成し、さらにその液滴上に脂質二重膜を形成する手法を考案することにより、チャンバ内部に電極を有する脂質膜チャンバを構築する。さらに構築した脂質膜チャンバを用いて、膜電位を固定した状態で膜タンパク質の輸送を蛍光計測可能であることを示す。

1.2 背景

1.2.1 人工脂質二重膜を用いた膜タンパク質の輸送機能計測

細胞表面や細胞内器官の膜上に存在する膜タンパク質は、膜を介した物質の輸送やシグナルの伝達・変換といった細胞にとって不可欠な働きを行っている。一方で、膜タンパク質機能の不調は疾患に結びつき、創薬の重要なターゲットとなっている。しかしながら、水溶性のタンパク質に比べ、脂質膜中で構造・活性を保持する膜タンパク質群は構造が不安定なために結晶化を行うことが難しく、大多数の膜タンパク質は未だに 3 次元構造の決定ができていない。構造はその膜タンパク質と特異的に相互作用する基質の形やその膜タンパク質の輸送機能に直接つながるものだが、こうした理由により膜タンパク質はその機能に関わる研究も発展途上にある。このように、膜タンパク質の輸送機能を詳細に解析することは膜タンパク質の基礎研究のみならず、薬剤開発にも必要不可欠である。例えば、膜タンパク質の基質となる物質を探索することは薬剤候補物質の探索にとって必要であり、また、ある膜タンパク質に対する薬剤候補物質が他の膜タンパク質の機能に与える影響を検証することも重要となる。実際、現在開発されている薬剤の標的物質のおよそ 6 割が膜タンパク質であると言われている^{[3][4]}。研究対象となっていない膜タンパク質や、基質が同定されていない膜タンパ

ク質も数多く存在し、今後さらに薬剤ターゲットとされる膜タンパク質の数は増加していくと予想される。以上のように、基礎研究・創薬の両面において、スループット性の高い輸送機能解析手法が必要とされている。

従来、膜タンパク質の薬剤応答をはじめとした膜タンパク質の輸送機能の解析は、培養細胞に目的の膜タンパク質を大量に発現させ、細胞の薬剤に対する応答を蛍光計測法や電気計測法（パッチクランプ法）を用いて行われてきた^[5]。この方法により多くの膜タンパク質の輸送機能が明らかにされたが、細胞を使用することによる問題点も指摘されている。まず、細胞が元来発現・代謝している膜タンパク質をはじめとする様々な物質はそのまま細胞膜および細胞内部に残っているために、計測対象のタンパク質のみからのシグナルが見えていたとは限らず、実験そのものの信頼性や S/N 比に関する問題が常に存在する。特に、計測対象とする膜タンパク質の発現量が十分に得られない場合や、膜タンパク質の輸送能力が小さい場合にはこうした問題は顕著に表れ、計測が不可能な場合もある。また、細胞に対して毒性を示す膜タンパク質は計測する以前に細胞自身が死滅してしまうため、そもそも計測することは難しい。細胞小器官上の膜に存在する膜タンパク質の機能計測も困難な状況にあった。これらの問題点を解決するために、計測対象の膜タンパク質以外を排除した系により膜タンパク質の輸送機能を計測することが求められていた。

人工脂質二重膜を用いた計測系は、計測対象の膜タンパク質以外の影響を排除できる系すなわち純粋な系として研究が進められてきた^[6]。本計測系は、人工的に形成した脂質二重膜に目的とする膜タンパク質のみを再構成し、計測することにより、計測対象のタンパク質以外の雑多な物質からのノイズを排除でき、計測の信頼性や S/N 比の向上が期待できる。また、細胞に対して毒性を示すような膜タンパク質や条件での計測も可能であり、細胞小器官上の膜タンパク質も計測対象とできる。さらに、従来の細胞を用いた計測系では不可能であった脂質二重膜の組成を任意に変更することも可能であるため、輸送機能の脂質膜内物質依存性についても計測が可能となった。最近では、脂質分子が膜タンパク質の機能発現に大きく影響を与えるということが明らかになりつつあり、この分野において、人工脂質膜を用いた計測系のさらなる貢献が期待される。これまでに人工脂質二重膜を用いた数々の計測系が提案され、様々な膜タンパク質の輸送機能を計測できるまでに至っている。

人工脂質二重膜を用いた膜タンパク質の輸送機能の計測方法は、蛍光計測による方法と電気計測による方法の二つに大別できる。それぞれ膜タンパク質の輸送機能を計測する上で利点と欠点を有するため、計測対象となる膜タンパク質の種類に応じていずれかの方法が選択されている。この他、放射性同位体を用いた計測方法も存在するが、蛍光検出や電気計測に

比べて一般的ではないため、ここでは説明を省略し、以下では、蛍光計測による方法と電気計測による方法の計測原理について簡単に説明する。

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チャンバ(脂質二重膜チャンバ、lipid bilayer chamber)が用いられる。基本的には輸送される物質(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(fluorescent indicator)を脂質二重膜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する。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する。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である。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望ましいと考えられる。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)が小さいことが望ましい^{[7][8]}。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輸送機能を蛍光計測する上で重要であると考えられる^[9]。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輸送機能を計測するためには、概して系が小さいことが必要であり、一般にピコリットル(pL)からフェムトリットル(fL)のオーダーの脂質二重膜チャンバが用いられている。

電気計測による膜タンパク質の輸送機能の計測には脂質二重膜を挟んで電極を設置したシステムが用いられる^{[10][11][12][13]}。脂質二重膜を挟んで電圧を印加し、脂質二重膜を介して流れる電流値を計測することにより、膜タンパク質を介したイオンの輸送を計測することができる。膜タンパク質を介して移動する電荷はピコアンペア(pA)のオーダーであるため、一般にアンプを用いて電流シグナルを増幅する必要がある。また、正確に電位を固定するために、一般に銀-塩化銀電極が不分極電極として使用される。

蛍光計測および電気計測による膜タンパク質の輸送機能の計測には、それぞれの計測原理によってもたらされる特徴があり(Fig. 1.1)、それによって膜タンパク質の性質に適した計測手法がとられる。蛍光計測は、計測対象の基質と結合する蛍光指示薬があれば、電荷に関

係なく物質輸送を伴う膜輸送を計測することができる。また、蛍光シグナルは時間積分されるため、輸送能力の小さい膜タンパク質や電荷の小さい基質を輸送する膜タンパク質の計測に有利である^{[14][15]}。実際、輸送能力の比較的小さいトランスポーター（ 10^3 分子 / 秒の輸送速度と言われる）を人工脂質膜を用いて計測する場合、蛍光検出による方法を用いて計測されるのが一般的である^{[16][17][18][19][20]}。一方で、電気計測は電荷の移動を伴わない輸送を計測することは計測原理上不可能であるが、一般に 1 pA 以上の電荷の移動を伴う輸送（ $\sim 10^7$ イオン / 秒）に関しては膜タンパク質 1 分子による輸送ですら検出することが可能である。これは、電気計測が 1 pA 程度以上の電荷の移動をミリ秒（ms）オーダーの時間分解能を持って検出できることに起因している。また、蛍光計測法では困難な膜タンパク質の輸送機能として、膜電位の存在下での計測が挙げられる。膜電位は生細胞では常に発生しており、膜電位の変化の応答して細胞内で無数のシグナル伝達・代謝などが引き起こされている。膜タンパク質には数多くの種類があり、その中には膜電位に依存して物質輸送を行う膜タンパク質も多い^{[21][22]}。例えばヒト由来カルシウム依存型カリウムイオンチャネル（hBK channel）は、ヒトの心筋や平滑筋に広く発現しているイオンチャネル膜タンパク質であり^[23]、細胞内部のカルシウムイオン濃度に応じてチャネルを開閉させるだけでなく、膜電位にも依存してチャネルの開閉を行う。このような膜タンパク質の解析を行う場合には、膜電位を任意に印加できるシステムが必須であるために、電気計測が主に使用されている。電極を用いずに、脂質二重膜チャンバ内外のイオンの濃度差により電圧を印加（ネルンスト電位）することもできるが、この方法による電圧印加は正確に電位を固定することが困難であるために電位依存性を計測するには不適切である。また、脂質二重膜チャンバが蛍光検出により輸送機能を計測できる程小さい場合、ネルンスト電位は変化し易く、意図した膜電位を維持できる時間は短時間となってしまう^[17]。すなわち、意図した膜電位を長時間維持するには電極による電圧印加が必要なのである。膜タンパク質の輸送機能を計測するためには、膜電位が変化してしまうことおよび膜電位を長時間維持できないことは、正確な実験結果を得る上で大きな課題となる。これまでに挙げたそれぞれの計測方法の特徴をまとめると、蛍光計測は輸送能力の小さい膜タンパク質の輸送機能の計測に適しているが膜電位を印加する目的には適しておらず、一方、電気計測は輸送能力の小さい膜タンパク質の輸送機能の計測には適していないが膜電位を印加する目的には適している。このような理由から、これまで蛍光計測は主にトランスポーターなど輸送能力の小さい膜タンパク質の輸送機能の計測に、一方、電気計測は主に輸送能力の比較的大きいイオンチャネルの 1 分子計測に利用されてきた。すなわち、これまで膜電位を印加した状態で電荷の移動の少ない膜タンパク質の輸送機能を計測することは困難であっ

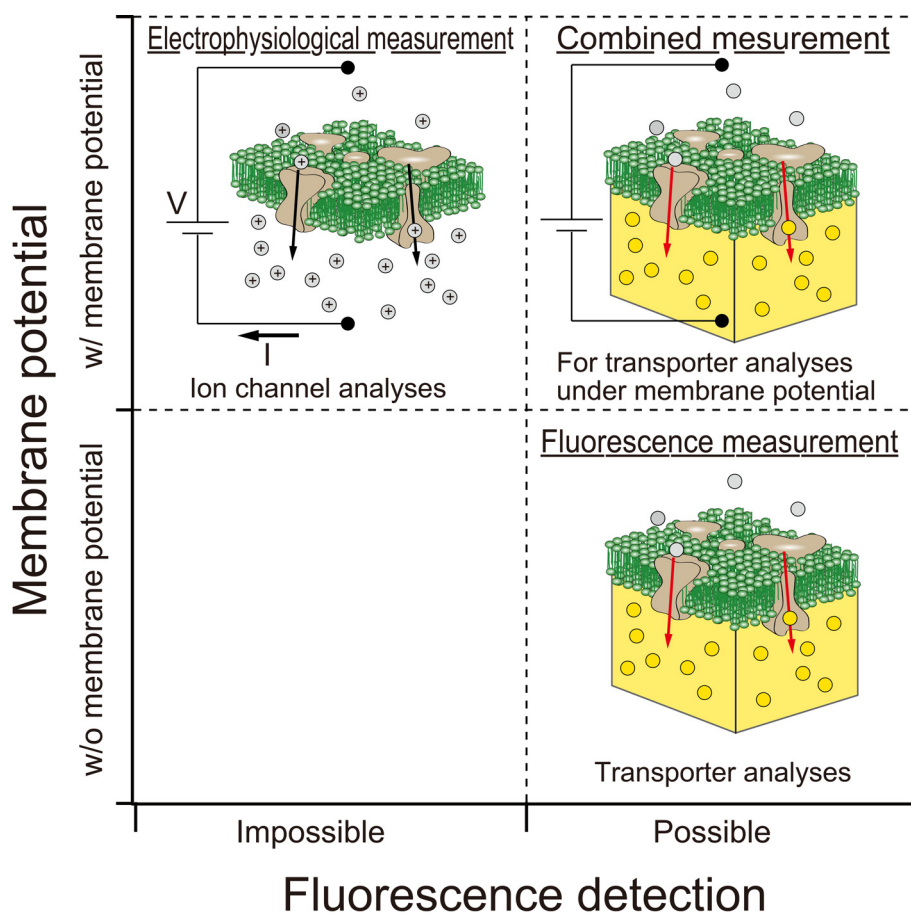


Fig. 1.1 膜電位印加の可否と蛍光計測の可否による膜タンパク質の輸送機能の計測方法の分類

た。このような電荷の移動の少ない膜タンパク質の電位依存性の計測ために必要とされるものが、膜電位を固定した状態で蛍光計測により膜タンパク質の輸送機能を計測できるシステムである (Fig. 1.1)。

1.2.2 脂質膜チャンバの従来技術と課題

ここでは、膜タンパク質の輸送機能の計測に用いられる人工脂質膜チャンバの形成方法についてまとめておく。これまでに様々な人工脂質膜チャンバの形成方法が提案されており、それぞれに利点と欠点があるため、目的に応じて形成方法も検討する必要がある。人工脂質膜チャンバの形態は大きく分けて、リポソーム、ソリッドチャンバ、液滴チャンバの3つである。

リポソームは最も古くから脂質二重膜チャンバとして膜タンパク質による輸送の蛍光計測をはじめ、脂質二重膜の物質透過性や脂質二重膜の流動性などの物理的挙動を調べるためのプラットフォームとして用いられてきた。作製法は、クロロホルムに溶かした脂質を容器に入れ溶媒を蒸発させてフィルム状にした後に水和させる静置水和法などがある。乾燥した両親媒性の脂質分子が水和する過程で、疎水性相互作用によって自発的に脂質分子の疎水性炭化水素部分が整列し脂質二重膜のカプセル、すなわちリポソームとなる。この方法は、容易に微小な脂質二重膜チャンバを作製できるため膜タンパク質の蛍光計測で重要となる S/V 値を大きく確保できるが、一般に大きさの制御が困難なため、チャンバ径の分布は大きくなってしまう。また、リポソームは通常溶液中に浮遊して存在するため、多数の特定のリポソームを長時間に渡って観察するために適したアレイにすることは難しい。最近ではリポソームの直径をある程度制御する方法^[24]や、リポソームを固定化する技術も開発されている^{[25][26]}ため、膜タンパク質関連の研究にも利用し易くなりつつあるが、依然として実施するために必要な技術的なハードルは高く、一般的に利用されるまでには至っていない。

ソリッドチャンバ^{[27][28][29][30][31]}は、基板となるシリコンやガラス上に作製した微小なウェルに脂質二重膜を橋渡しした形態をとる脂質二重膜チャンバと本論文で定義する。ソリッドチャンバは、基板をマイクロ加工することによって作製された微小ウェルがチャンバとして利用されることから、チャンバの径を精密に指定しアレイ化することが可能である。また、その体積は μL オーダーまで小さくすることができるため、膜タンパク質の蛍光計測に必要な十分に大きい S/V 値を確保することができる上に、それぞれの脂質膜チャンバは基板に固定されているために観察が容易である。しかし、ソリッドチャンバはその構造上、脂質二重膜が基板となる固体材料と接触しており（または接触する可能性があり）、その部分に脂質二重膜の欠陥が生じることにより、チャンバのシーリングの再現性に課題があることが報告されている^{[32][33]}。基板となる材料の種類を変更したり、基板となる固体材料と脂質二重膜の間に新たなサポーターを導入することにより、この問題の解決が試みられている^[34]が、依然として完全な解決には至っていない。

液滴チャンバ^{[32][35][36][37][38][39]}は、液滴と液滴の界面の一部に形成された脂質二重膜によって構成される脂質二重膜チャンバと本論文で定義する。このような脂質二重膜チャンバは、基本的には、脂質の分散した有機溶媒中で水溶液からなる液滴同士を接触させることにより作製される^[40]。この方法は、再現性良く安定な脂質二重膜を容易に形成することができる上に、シーリングの性能も安定して得ることができる^{[32][35]}。これは、基板となる材料などの個体と脂質二重膜は一切接触せず、シーリングに優れた有機溶媒に包まれているという構造上の特徴に起因するものと考えられる。しかしながら、液滴が小さいほどその操作が難しくな

る^[42]ことから、S/V 値を大きくするために液滴チャンバをスケールダウンすることは困難であり、これまでに最小で 10 nL 程度の脂質二重膜チャンバが報告されているに過ぎない^[36]。このように他のリポソームやソリッドチャンバと比較して脂質二重膜チャンバが大きいいため、膜タンパク質の蛍光計測の目的においては、検出に時間がかかるという問題点があり、微小化を可能にする方法が求められている。

ここまでで、一般的な人工脂質膜チャンバを用いた膜タンパク質の輸送機能の計測についての従来研究と課題について述べた。次に、本研究で目的としている膜電位存在下での膜タンパク質の輸送機能の蛍光計測に向けた従来研究の課題について述べる。膜電位存在下での膜タンパク質の輸送機能の蛍光計測した例はこれまでに報告がなく、1.2.2 項に挙げた従来技術は以下に述べる理由からその実現に向けて課題が存在する。リポソーム (Liposome ; Fig. 1. 2a) は、その内部に電極を導入することが極めて困難である。唯一、リポソームパッチクランプ法^[54]によりリポソーム内部に電氣的にアクセス可能となるが、この方法は熟練した技術が必要な上に再現性も悪い。また、ソリッドチャンバ (Solid chamber ; Fig. 1. 2b) はチャンバのシーリングの再現性が悪いことが報告されており^{[32][33]}、計測の信頼性・再現性の面から膜タンパク質の輸送機能の計測には適していないと考えられる。液滴チャンバ (Droplet chamber ; Fig. 1. 2cd) は μL オーダーのチャンバでは電極の導入に成功しているが^[37]、この大きさの系

下図は他社の著作物からの引用であるため公表できない。

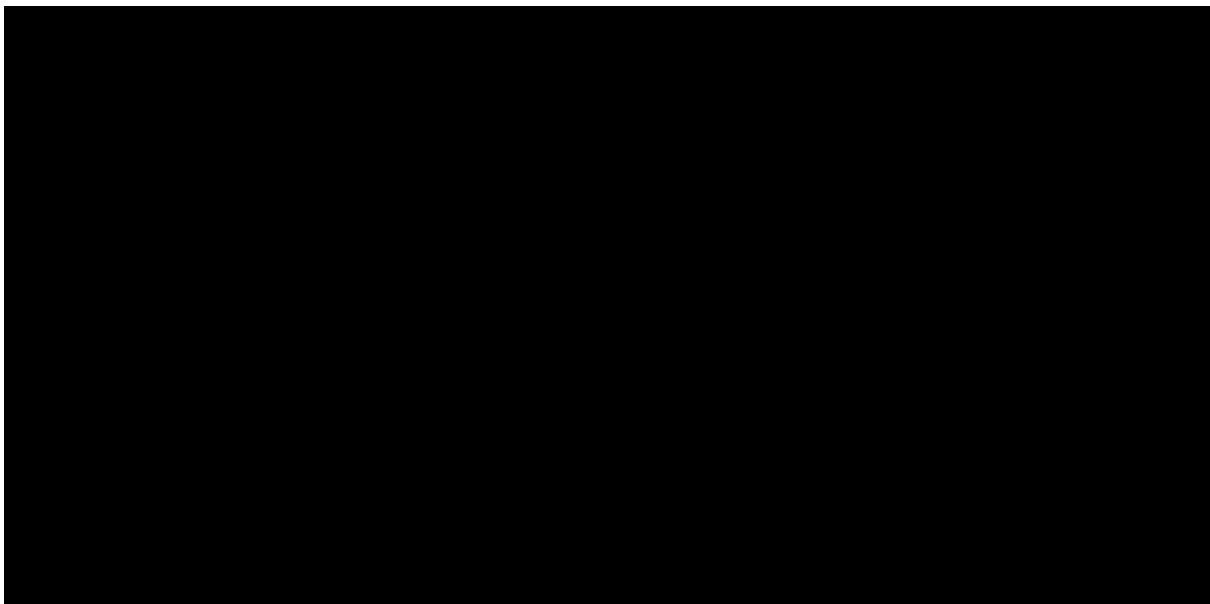


Fig. 1. 2 脂質膜チャンバの従来技術

では物質濃度が検出できるまでに時間がかかるので膜タンパク質の蛍光検出を目的とした場合には現実的ではない (Fig. 1. 2c)。液滴チャンバ形成の際に用いる液滴を 10 nL 程度まで小さくすると膜タンパク質の蛍光計測は可能となり^[36]、その内部に電極を導入した例は存在するが、膜電位を印加した状態で膜タンパク質の蛍光計測が可能であるかは示されていない。また、液滴内部にマニピュレータにより電極を導入する方法であったため、電極導入が困難である上に、蛍光計測の高感度化に向けてさらにチャンバを微小化することは現実的ではない (Fig. 1. 2d)。

そこで本研究では膜電位を固定した状態で膜タンパク質の輸送機能を蛍光計測可能な脂質膜チャンバを構築する。本研究で提案する方法の詳細については第 1.3 節で述べる。

1.3 本研究で提案する脂質膜チャンバ

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。これを達成するために、1. 内部に電極を有すること、2. ピコリットルオーダーの体積であること、の 2 点を満たす脂質膜チャンバを作製する。本研究では、このような脂質膜チャンバを作製するために、以下の方法を提案する。

< 本研究で提案する脂質膜チャンバ形成方法 >

1. 透明な基板の上に銀 - 塩化銀微小電極を配置し、脂質を分散した有機溶媒中でその電極を覆うようにピコリットルオーダーの体積の微小液滴を形成する。

2. その微小液滴の上に別の液滴を接触させることにより、微小液滴上に脂質二重膜を形成する。

このようにして作製された脂質膜チャンバ (Fig. 1. 3) は、従来の脂質膜チャンバと比較して以下のような利点を有する。まず、液滴チャンバの形態をとるため、チャンバのシーリングに関しては膜タンパク質の輸送機能を計測する上で問題がなく、安定した脂質膜が再現性良く形成できると考えられる。さらに、体積が従来の液滴チャンバと比較して小さいため、蛍光検出を高速・高感度に行うことが可能であると考えられる。また、電極を予め基板上に設置し、その上に微小液滴が自発的に形成される手法を用いることにより、電極を容易に液滴チャンバ内に導入することが可能である。さらに、電極には電気生理の実験で不分極電極

として用いられる銀 - 塩化銀電極を採用しているため、意図した膜電位を正確に安定して形成できると考えられる。また、基板が透明であるため、脂質膜チャンバを倒立顕微鏡を用いて観察が可能である。

1.4 意義

第 1.2 節で電位依存性膜タンパク質の計測には電極を用いた電圧印加が必要であることと、従来の電極を用いた電位依存性膜タンパク質の計測手法では輸送能力の小さい膜タンパク質を計測することは困難であると述べた。ここでは、具体的な膜タンパク質を例に挙げて電位依存性の膜タンパク質を蛍光計測する意義について述べる。

従来の電極を用いた電位依存性膜タンパク質の計測では、計測対象はイオンチャンネルに限られていた。一般的に受動輸送を行う膜タンパク質は輸送量が比較的多く、イオンチャンネルはイオンを一秒間に 10^7 から 10^8 個通すと言われている。一方で、能動輸送を行う膜タンパク質、例えばトランスポータやポンプは一秒間に基質を 10^3 から 10^4 個輸送すると言われている。このような膜タンパク質の中で、ここでは ATP 合成とプロトン輸送の機能を担う F_0F_1 について考える。 F_0F_1 は生体内においてエネルギーを生産する酵素であり、詳細な解析が必要とされている。電位依存性があると言われているが、人工脂質膜に大量に導入することも困難であるため従来の電氣的な計測手法では解析が難しく、 F_0F_1 の電位依存性は未だ謎に包

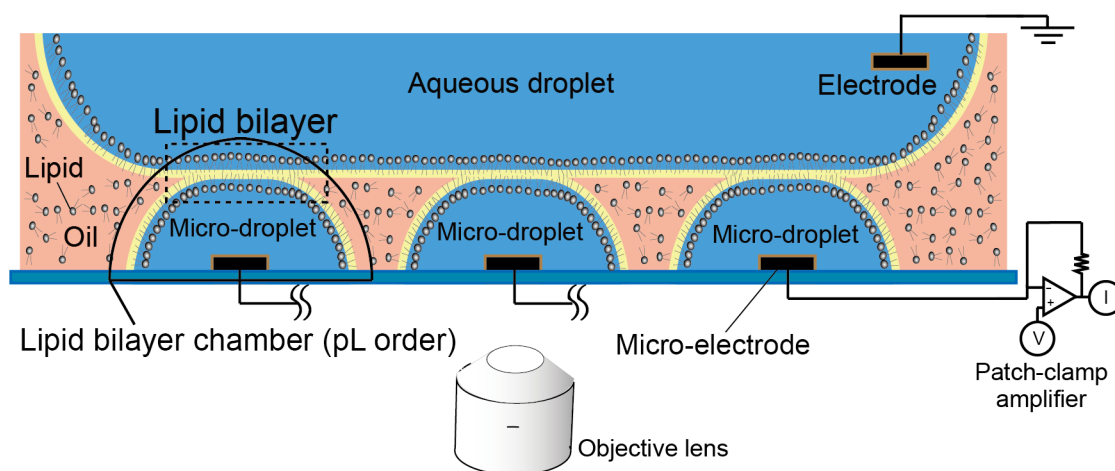


Fig. 1.3 本研究で提案する脂質膜チャンバ

まれている。F₀F₁ は脂質膜中に存在し、回転しながら、水素イオンの濃度勾配を利用し ATP を合成している。F₀F₁ は 1 回転毎に、9 個の水素イオンを膜外に排出し、3 個の ATP を合成しながら、約 100 Hz で回転している^[41]。よってこの膜タンパク質は、潜在的には電気計測も蛍光計測も可能である。ここでは水素イオンの移動を電気計測し、ATP の合成を蛍光計測する場合を想定して計算を進める。F₀F₁ 分子あたりの水素イオンの輸送速度と ATP の合成速度はそれぞれ、900 個/s と 300 個/s である。物質換算にするとそれぞれ、 1.5×10^{-21} mol/s と 0.5×10^{-21} mol/s となる。ここで、脂質膜中に 10^4 分子が存在すると仮定すると、チャンバ全体で見た水素イオンの移動速度と ATP の合成速度はそれぞれ、 1.5×10^{-18} mol/s と 0.5×10^{-18} mol/s となる。水素イオンの移動が生じる電流は、 1.5×10^{-18} (mol/s) \times 96500 (C/s) = 約 0.15 (pA) となる。0.15 pA の変化を計測することは従来の電氣的に輸送を計測する手法では捉えることが困難である。一方、ATP が蛍光検出されるためには、ATP に特異的に結合する蛍光指示薬を用いる。例えば ATeam という蛍光指示薬が考えられる。ATeam は ATP の検出限界が約 1 μ M であるので、ATP がチャンバ内で検出されるためにはチャンバ内で ATP が 1 μ M に到達する必要がある。脂質膜チャンバの体積を、本研究で構築する脂質膜チャンバと同等の 150 pL と仮定すると、検出に必要なチャンバ内で合成される ATP の総量は、 1 (μ M) \times 150 (pL) = 1.5×10^{-16} (mol) となる。この量の ATP が合成されるために必要な時間は、 $(1.5 \times 10^{-16} \text{ mol}) / (0.5 \times 10^{-18} \text{ mol/s}) = 300 \text{ s}$ と求められる。従って、300 s 程度で F₀F₁ の機能を蛍光計測できることになる。このように、従来の電気計測では困難である膜タンパク質の機能も蛍光計測を行えば十分に計測することが可能となる。従って、電極により膜電位を印加可能な、膜タンパク質の輸送機能の蛍光計測システムを構築する意義は、これまで計測が困難であった輸送能力の小さい電位依存性膜タンパク質の輸送機能の計測可能とする点である。これらの膜タンパク質の計測が可能となれば、新薬の開発にも繋がると考えられ、生命科学の基礎研究のみならず創薬などの産業分野においても意義は大きいと考えられる。

また、本研究で構築する脂質膜チャンバは、脂質二重膜を直接顕微鏡で観察することが可能であるため、近年の一分子イメージングで用いられる手法により膜タンパク質を蛍光ラベルすれば、チャンネル膜タンパク質一分子の位置を観察しながら電気計測を行うことや^{[43][44][45]}、膜電位の印加を行いながら脂質のラフト構造の変化を観察する^{[46][47][48]} などの応用も可能である。また、最近では膜タンパク質の構造変化を蛍光でイメージングする技術が開発されている^{[49][50][51][52][53]} ので、これらの手法を適用することにより、膜タンパク質の構造変化と機能の関係性を調べることも可能であると考えられる。

このように、本研究で構築する電極を導入した膜タンパク質の蛍光計測が可能な脂質膜チャンバは様々な実験に応用が可能であり、広く膜タンパク質に関する研究に貢献すると期待される。

1.5 本論文の構成

第1章 序論

本研究の目的と本研究に関連する各分野の背景および従来の研究についてまとめた。また、本研究で提案する膜タンパク質の輸送機能の計測方法の特徴について説明し、その意義について述べた。また、それを実現するために本研究で採用する手法について説明し、その手法のもたらす利点について言及した。

第2章 膜輸送の理論モデルと脂質膜チャンバの構築

脂質二重膜チャンバを用いた膜輸送の蛍光検出をモデル化し、膜輸送の蛍光検出の高速化・高感度化のためには、脂質膜面積 (S) とチャンバ体積 (V) の比 (S/V) が大きいことが重要であることを確認し、その比と検出時間に関して考察することにより、脂質膜チャンバを用いた膜タンパク質の輸送機能の蛍光計測に必要な条件を検討する。また、微小なチャンバ内に電極を導入した脂質膜チャンバを構築するための方法について検討する。

第3章 脂質膜チャンバの評価

第2章で構築した脂質膜チャンバを膜タンパク質の輸送機能の蛍光計測に関連する特性と膜電位の印加に関連する特性に分けて評価し、実際に膜タンパク質の輸送機能の計測に適用可能であるか検証する。

第4章 膜輸送の計測

蛍光検出により膜タンパク質の輸送機能を計測可能であることを検証し、さらに第2章で構築した膜輸送の理論モデルの妥当性を検証する。最後に、電極により膜電位を印加した状態で膜タンパク質の輸送機能を蛍光計測可能であることを実証する。

第5章 結論

本研究で得られた成果についてまとめ、今後の展望について述べる。

第2章 膜輸送の理論モデルと脂質膜チャンバの構築

2.1 緒言

脂質膜チャンバを用いた膜タンパク質の輸送機能の蛍光検出において、脂質膜面積 (S) とチャンバ体積 (V) が重要なパラメータであり^[9]、その比 (S/V) が大きいほど高速・高感度に輸送を検出できることが推測された。しかし、これまでに脂質膜チャンバを用いた膜輸送の蛍光検出をモデル化し理論的に検証した例はなく、また、 S/V が変化した場合に、検出までの時間がどのように変化するかを示した例はない。本研究では、電極を導入するためにチャンバ体積をある程度大きく設計する必要があるが、その制限が膜タンパク質の蛍光検出に影響することが考えられた。そのため、本章では、脂質膜チャンバの形状や寸法がどのように蛍光検出に影響を与えるかを検討すると共に、蛍光検出の高速・高感度化に向けた脂質膜チャンバの条件を検討する。また、その蛍光検出による膜タンパク質の輸送機能の計測が可能である条件を満たすシステムの構築方法を検討し、実際に電極を導入した脂質膜チャンバを構築する。

2.2 膜輸送の蛍光検出モデルの構築

2.2.1 膜輸送の蛍光検出の原理

一般的に膜輸送の蛍光検出は、脂質膜で覆われた微小空間（脂質膜チャンバ）と蛍光物質を用いて行われる。脂質膜に導入された膜タンパク質によって輸送された物質（基質）がチャンバ内に流入し、予め脂質膜チャンバ内に封入した基質に特異的に結合し蛍光を発するよう

な蛍光指示薬と結合することで蛍光を発する。この蛍光を蛍光顕微鏡により観察し、蛍光強度を計測することで輸送機能の解析が行われている。

このような脂質膜チャンバを用いた膜輸送の蛍光検出において、脂質膜面積 (S) とチャンバ体積 (V) が重要な要素である。膜輸送の蛍光検出には、脂質膜に膜タンパク質が導入されることと、その膜タンパク質が基質を輸送し、チャンバ内の基質が検出できるレベルまで濃度上昇する必要がある。脂質膜面積が大きいほど、脂質膜に効率良く膜タンパク質が導入されるため、脂質膜チャンバ当たりに導入される膜タンパク質の数が多くなる。結果としてチャンバ内に多くの基質が輸送されるため、より早くチャンバ内の基質濃度が検出できるレベルに達すると考えられる。また、より低濃度の膜タンパク質溶液でも輸送機能を計測できる可能性もある。チャンバ体積に関しては、同じ数の基質が膜タンパク質を介してチャンバ内に流入した際に、一定時間後においてはチャンバ体積が小さいほどチャンバ内の基質濃度は高くなる^{[7][8]}。そのため、より早くチャンバ内の基質濃度が検出できるレベルに達すると考えられる。これらを検証し、また、 S/V がどの程度蛍光検出に影響を与えるのかを検証するために、以下のモデルを構築する。

2.2.2 膜輸送の蛍光検出モデルの構築

本研究では、蛍光検出の指標として一般に蛍光検出の指標として用いられる比蛍光強度 ($\Delta F/F_0$) を用いた。これは、時間 0 のときの蛍光強度 (F_0) に対する蛍光強度の増分 ($\Delta F = F - F_0$) を時間 0 のときの蛍光強度 (F_0) で規格化したものである。蛍光強度の増加は脂質膜チャンバ内の蛍光指示薬がチャンバ内に輸送された基質と結合することにより引き起こされ、その際の解離定数は K_d と表される。脂質膜に導入される膜タンパク質の数は、時間と共にシグモイド関数に従って増加すると仮定した^[55]。(本研究においては基本的に先行研究を参考にシグモイド関数を仮定して理論モデルの構築を進めたが、膜タンパク質の人工脂質膜への導入過程に関しては先行研究が少ないため、考え得る他の膜タンパク質の導入過程に関しても 2.2.5 項に後述する。) これにより、脂質二重膜形成後 (時間 0) に増加が始まり、一定時間後に最大の膜タンパク質密度に達するというモデルとなる。一般に、生化学反応のようなある値とある値の間をなめらかに変化していく反応はシグモイド関数でモデル化できるため、この仮定は妥当であると考えられる。このような仮定のもとで、ある時刻 t での単位膜面積当たりの膜タンパク質の数 $N(t)$ は次のように表せる。

$$N(t) = \frac{N_{\max}}{1 + \exp(-G_n(t - t_s))} \quad (2.1)$$

ここで、 t [s] は時間、 N_{\max} [proteins/m²] は単位膜面積あたりに導入される最大の膜タンパク質数、 t_s [s] と G_n はそれぞれ単位膜面積当たりの膜タンパク質の数を示すシグモイド関数を決定するためのパラメータである。

$N(t)$ を用いると、脂質膜チャンバ内の基質濃度 $C(t)$ は次のように表せる。

$$C(t) = \frac{\int_0^t N(t)STdt}{V} \quad (2.2)$$

ここで、 T [mol/s] は一個の膜タンパク質の単位時間当たりの基質輸送量、 S [m²] は脂質膜面積、 V [m³] はチャンバ体積である。

このモデルにおいては、 T は時間によらず変化しないと仮定した。比蛍光強度は蛍光指示薬と基質の結合解離平衡により、それぞれの濃度に依存したシグモイド関数となる。そのため、比蛍光強度の経時変化は以下のように表せる。

$$\left(\frac{\Delta F}{F_0}\right)(t) = \frac{\left(\frac{\Delta F}{F_0}\right)_{\max}}{1 + \exp\left(-G_i \cdot \ln\left(\frac{C(t)}{K_d}\right)\right)} \quad (2.3)$$

ここで $\left(\frac{\Delta F}{F_0}\right)_{\max}$ は蛍光指示薬の比蛍光強度の最大値、 G_i は比蛍光強度を示すシグモイド関数の

ゲインであり、個々の蛍光指示薬に特異的な値となる。さらに、 $\left(\frac{\Delta F}{F_0}\right)_{\max}$ を 100% として比

蛍光強度を規格化すると、規格化後の比蛍光強度 $\left(\frac{\Delta F}{F_0}\right)_p$ [%] は以下のように表せる。

$$\left(\frac{\Delta F}{F_0}\right)_p(t) = \frac{100}{1 + \exp\left(-G_i \cdot \ln\left(\frac{C(t)}{K_d}\right)\right)} \quad (2.4)$$

また、式 (2.1)、式 (2.2)、式 (2.4) により規格化後の比蛍光強度 $\left(\frac{\Delta F}{F_0}\right)_p$ を G_i 、 G_n 、 t_s 、 N_{\max} 、 T 、

K_d 、 S 、 V を用いて表すと以下のように表せる。

$$\left(\frac{\Delta F}{F_0}\right)_P(t) = \frac{100}{1 + \exp\left(-G_i \cdot \ln\left(\frac{(G_n t - \ln(1 + \exp(G_n t_s))) + \ln(1 + \exp(G_n(-t + t_s)))N_{\max}T}{G_n K_d} \cdot \frac{S}{V}\right)\right)} \quad (2.5)$$

次に、比蛍光強度の経時変化から膜タンパク質の基質の輸送活性があるかを判断する場合を考える。現実のシステムには必ず検出限界が存在するために、検出閾値が存在する。そこで、蛍光検出が可能となる時間 (t_d [s]) を定義するために、蛍光検出の閾値を F_t [%] とする。式 (2.5) の左辺を F_t として t について解くことにより、 t_d は以下のように表される。

$$t_d = \frac{1}{G_n} \cdot \ln \left(-\exp(G_n t_s) + \exp \left(\frac{G_n \left(-K_d \left(-G_i + 100 \frac{K_d}{F_t} \right) \right)}{N_{\max} T} \cdot \frac{S}{V} \right) + \exp \left(G_n t_s + \frac{G_n \left(-K_d \left(-G_i + 100 \frac{K_d}{F_t} \right) \right)}{N_{\max} T} \cdot \frac{S}{V} \right) \right) \quad (2.6)$$

2.2.3 理論モデルを用いた脂質膜チャンバの比蛍光強度のシミュレーション

2.2.2 項で得られた理論モデルにおいて各パラメータを変化させた時に、膜タンパク質の物質輸送による脂質膜チャンバ内の比蛍光強度が経時的にどのように変化するかをシミュレーションすることにより、膜輸送の蛍光イメージングの定性的な理解を試みる。具体的には、式 (2.5) にパラメータを一種類ずつ変化させた時の、脂質膜チャンバ内の比蛍光強度 $\left(\frac{\Delta F}{F_0}\right)_P$ の経時変化をプロットする。この際に、基準値となるパラメータは Table 2.1 のように設定し

Table 2.1 シミュレーションにおいて基準値として用いたパラメータ

S/V	100 ($\mu\text{m}^2/\text{pL}$)
G_i	1
K_d	1 (mol/m^3)
$N_{\max}T$	10^{-7} ($\text{mol}/\text{s}/\text{m}^2$)
G_n	0.01
t_s	1000 (s)

た。Fig. 2. 1 はそれぞれ順に、 S/V 、 G_i 、 K_d 、 $N_{\max}T$ 、 G_n 、 t_s を変化させた際の時間 t に対する比蛍光強度 $\left(\frac{\Delta F}{F_0}\right)_p$ を示している。Fig. 2. 1a において、 S/V が大きいほどグラフは左におよそ平行に移動していることから、 S/V を大きくする効果は、計測中のどの時間においても検出される比蛍光強度を上昇させることがわかる。Fig. 2. 1b および c において、 G_i が小さいほど、または K_d が大きいほどグラフの傾きが緩やかになっていることから、時間をかけて計測したい場合すなわち時間の解像度を上げて計測したい場合には、 G_i の小さい蛍光指示薬、または K_d の大きな蛍光指示薬を使用することが有効であることが伺える。また、Fig. 2. 1d のグラフは Fig. 2. 1a と同一のグラフとなっている。これは、式 (2.5) において、 S/V と $N_{\max}T$ は全く同一の項に存在し、 $N_{\max}T$ が変化することと S/V が変化することは等しい意味を持つからである。よって、 N_{\max} を増加させるための技術、例えば、目的とする膜タンパク質を含んだりポソームを効率的に人工脂質膜チャンバに融合させる技術^{[56][57]}の開発も、膜タンパク質を蛍光検出する上で、 S/V を増加させることと同様に重要であるといえる。Fig. 2. 1e および f は膜タンパク質の脂質膜への導入過程の違いにより生じる比蛍光強度の経時変化の違いを表している。膜タンパク質の脂質膜への導入が急激なほど (G_n が大きくなるに従って)、比蛍光強度の立ち上がりが急になっていることから、仮に数分子の輸送を検出できた場合には、導入の初期段階において膜タンパク質が一つ脂質膜に導入される度に比蛍光強度の増加の傾きが不連続に (急激に) 変化する様子が観察されるであろうと予測される。また、膜タンパク質が導入されるタイミングが遅いと (t_s が大きくなるに従って)、グラフは右におよそ平行に移動することから、 t_s を小さくするための技術^{[56][57]}も膜タンパク質を高速に蛍光検出する上で、重要な課題であると言える。

2.2.4 モデルを用いた膜輸送の蛍光検出のシミュレーション

本項では構築したモデルを用いて膜輸送の蛍光検出のシミュレーションを行う。シミュレーションに必要なパラメータとして、 G_i を 2.34 に、また、 K_d を 0.662 とした。これらの値は蛍光計測に使用する蛍光指示薬の性質により決定され、ここでは一般的な蛍光検出を定性的に理解するために、基質濃度を 100 μM から 10 mM 程度までが検出される (蛍光強度が変化する) 条件としてこれらの値を設定した。Fig. 2. 2a は式 (2.1) を用いて 4 種類のパラメータを

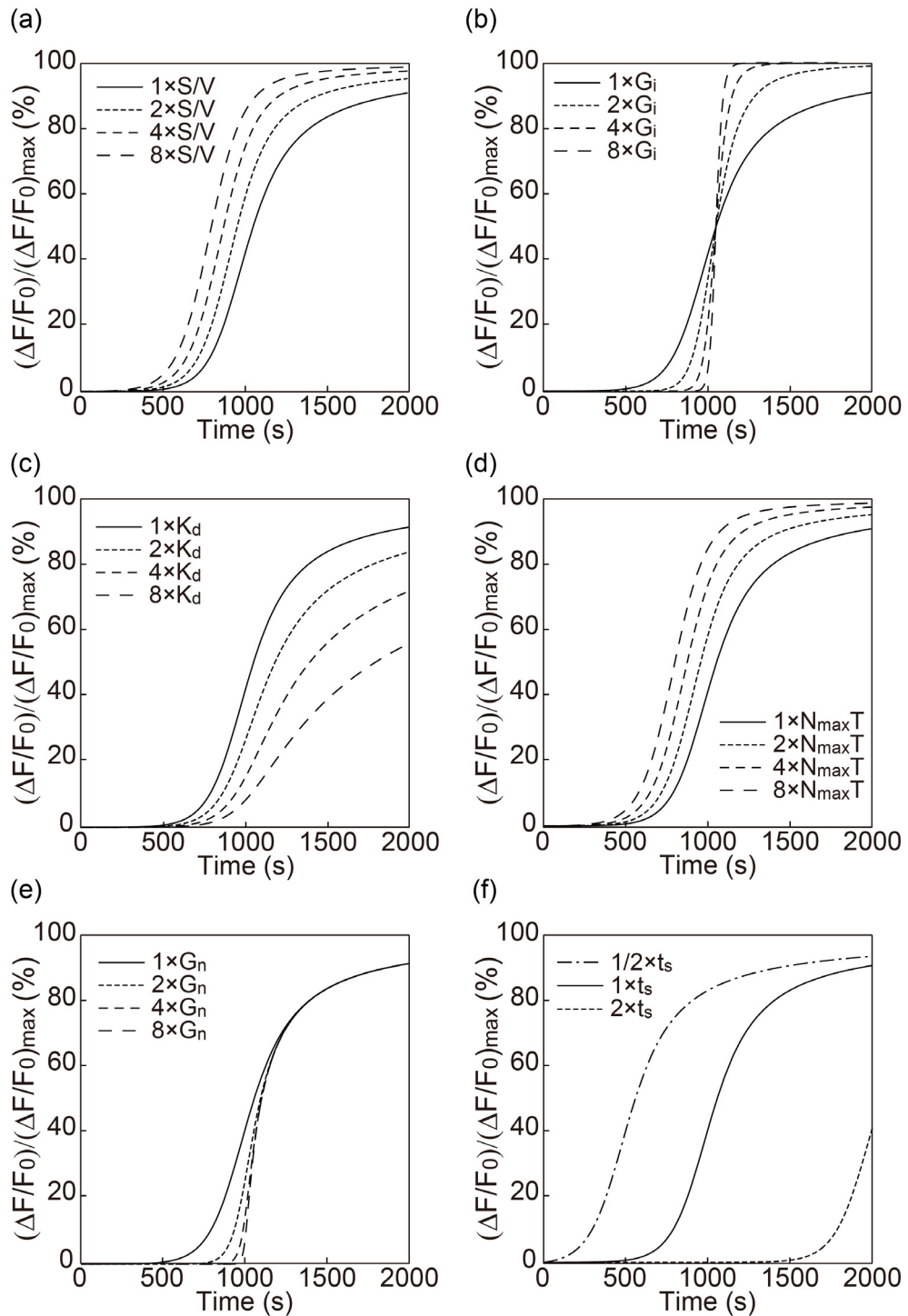


Fig. 2.1 膜輸送の理論モデルにおいて各パラメータを変化させた際の比蛍光強度の経時変化 (a) S/V を変化 (b) G_i を変化 (c) K_d を変化 (d) $N_{\max} T$ を変化 (e) G_n を変化 (f) t_s を変化

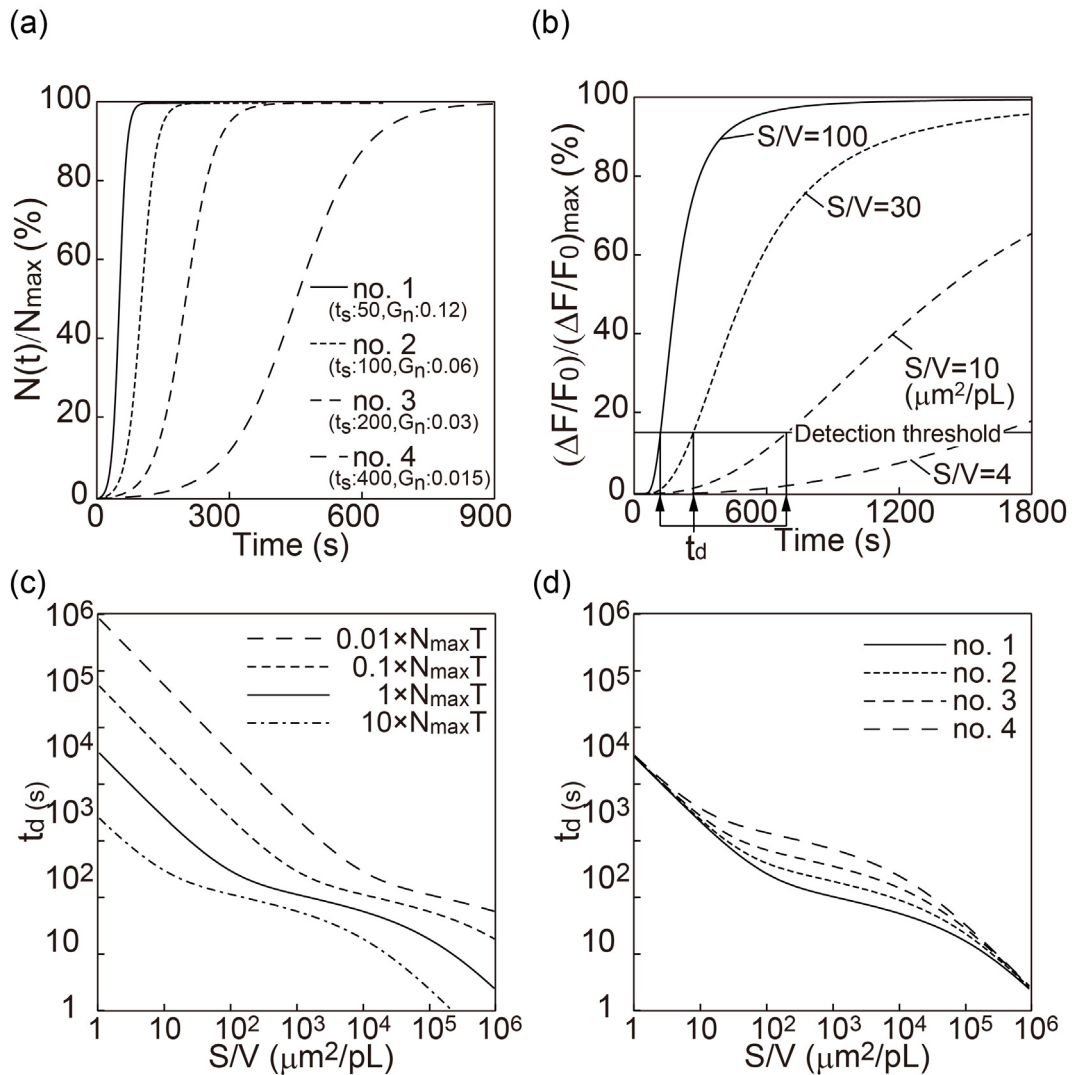


Fig. 2.2 膜輸送検出のシミュレーション結果 (a) t_s および G_n の変化に対する $(N(t))/(N_{max})$ の経時変化 (b) S/V の変化に対する $(\frac{\Delta F}{F_0})_p$ の経時変化 (c) $N_{max} T$ の変化に対する t_d の S/V 依存性 (d) $N(t)$ の変化に対する t_d の S/V 依存性 (© 2014 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim)

仮定してプロットした単位面積あたりに含まれる膜タンパク質数の経時変化を表したグラフである。それぞれが異なる膜タンパク質の導入過程モデルであり、no. 1 は急な膜タンパク質数の増加を、no. 4 は緩やかな膜タンパク質数の増加を表している。膜タンパク質の導入の過程は、導入される時間が早いほどそのグラフの傾きは急になると考えられることから、ここ

では t_s が小さいほど G_n が大きくなるように4種類のパラメータの組み合わせを任意に設定した。Fig. 2. 2bは膜タンパク質の導入過程モデルのno.1において、式(2.5)を用いて得られた $\left(\frac{\Delta F}{F_0}\right)_p$ の経時変化を表している。それぞれの曲線は異なる S/V を持つ脂質膜チャンバを表す。本研究において、蛍光を検出できる時刻を t_d と定義する。蛍光シグナルが増加したことを判別するためには、特定の比蛍光強度を閾値として設定し、その閾値を超えた時刻を t_d とすることが必要である。通常、このような蛍光検出においては、バックグラウンドとなる蛍光強度のばらつき(ノイズ)から閾値を設定するが、このノイズを計算することは困難であるため、本シミュレーションにおいては単純化のために $\left(\frac{\Delta F}{F_0}\right)_p$ 15%を閾値 F_t と定義した。Fig. 2. 2bに示すように、比蛍光強度の経時変化の曲線は S/V を大きくするに従って左に移動する結果となった。この結果は S/V が大きいほど膜輸送を早く検出できることを示している。Fig. 2. 2cとFig. 2. 2dはどちらも S/V と t_d の関係を表したグラフである。これらの結果は S/V が大きくなるに従って t_d が短くなることを示している。また、これらの両対数グラフにおいて傾きが最大でも-1の直線であることから、 t_d は S/V に対して最大で反比例して小さくなることがわかる。例えば、 S/V が3倍になれば、 t_d は1/3となる。これらのグラフには、傾きが直線から徐々に変化する部分、すなわち t_d が S/V に反比例しない部分が存在する。この部分について、パラメータとシミュレーション結果を詳細に検証したところ、膜タンパク質の脂質膜への導入が時間依存であることに起因していることがわかった。Fig. 2. 2aのグラフにおいて、傾きに変化する部分に蛍光検出時刻 t_d が位置しているとき、 t_d を小さくするために S/V を大きくすることはあまり有効に働かない。これは、脂質膜に導入された膜タンパク質の数が、 t_d が減少するに従い急激に減少してしまうことに由来する。少ない膜タンパク質数では S/V が大きいとはいえ検出時間は短くはならない。さらに、これらの曲線は $N_{\max} T$ (単位膜面積当たりの輸送量)が小さくなると、主に右方向に移動し(Fig. 2. 2c)膜タンパク質の導入が緩やかになると主に上側に移動することがわかった(Fig. 2. 2d)。これらの特徴は、脂質膜チャンバを用いて膜タンパク質の蛍光検出を行う際に、脂質膜チャンバの形状や寸法の設計に指針を与えるものである。繰り返しになるが、 S/V の t_d に対する効果は単に一定ではなく、膜タンパク質の導入過程の影響を受けて変化する。

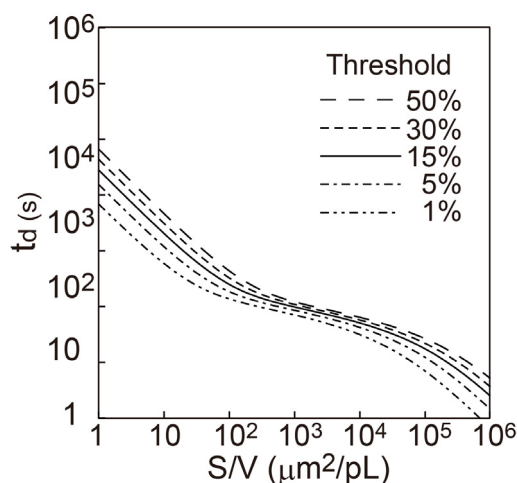


Fig. 2.3 検出閾値の変化に対する t_d の S/V 依存性

次に、検出閾値が変化した場合に、 S/V に対して t_d がどのように変化するかを、Fig. 2. 2a における no. 1 の条件下でプロットしたところ Fig. 2. 3 のようになった。検出の閾値が減少するに従い、グラフは左に移動しているため、 t_d の値は減少する。しかしながらその減少率は条件により変化しており、 t_d が t_s 付近であるときに、検出閾値の変化が t_d に与える影響は最も小さくなっていることがわかる (S/V が 10^3 付近)。これは前述した通り、 t_d 付近において、脂質膜中の膜タンパク質の数が急激に変化しており、 S/V を小さくする操作は、脂質膜面合積の減少に比例した膜タンパク質の数の減少以上に、急激に膜タンパク質の数が減少するためである。膜タンパク質の数がほとんど変化しない部分に検出時間 (t_d) が位置している場合には、グラフの傾きが -1 であることから、 t_d は S/V に反比例して減少することがわかる。

2.2.5 膜タンパク質の導入過程の蛍光検出への影響

本項の内容は雑誌掲載の予定であるため現時点では公表できない。

2.2.6 キレート剤を用いた蛍光検出の理論モデルの構築

本項の内容は雑誌掲載の予定であるため現時点では公表できない。

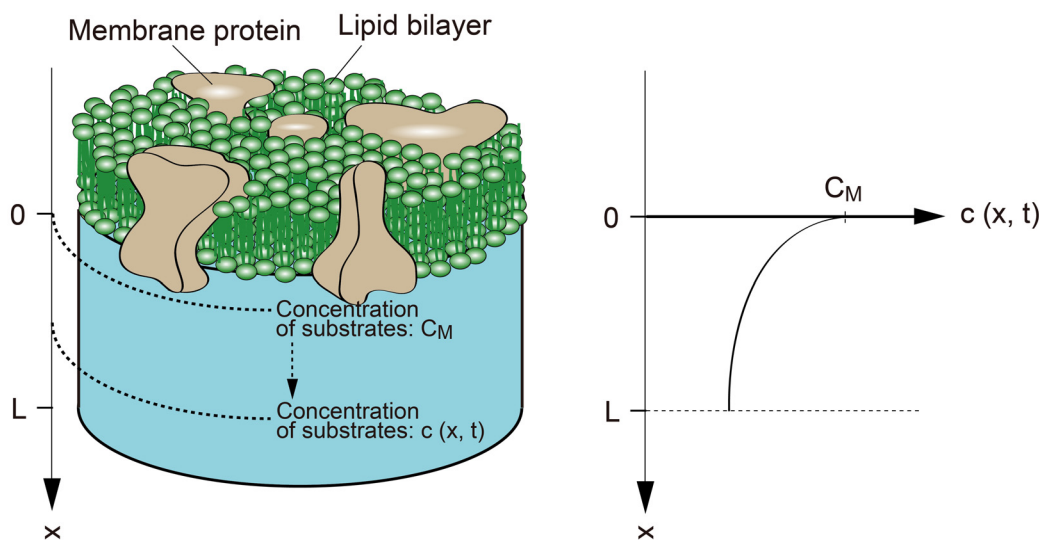


Fig. 2.4 脂質膜チャンバに流入した基質の拡散モデル

2.2.7 蛍光検出の理論モデルにおける拡散の影響

本研究で示した蛍光検出の理論モデルにおいては物質の拡散を考慮していないため、膜タンパク質を介して脂質膜チャンバ内に流入した基質は瞬時に拡散し、脂質膜チャンバ内の濃度が均一になるという仮定に基づいたモデルとなっている。この仮定が妥当であるか検証するために、膜タンパク質を介して流入した基質の拡散がどの程度の時間スケールで起こる現象であるかを検討する。

拡散のモデルは Fig. 2.4 に示すように、脂質膜チャンバを円筒型とし、膜タンパク質の基質輸送によって脂質膜の近傍 ($x = 0$) で基質濃度 (concentration of substrates) が C_M である状況を仮定した。本研究で用いた脂質膜チャンバはチャンバ高さが幅に比べて小さいため、側壁面の影響を無視し、一次元拡散方程式を適用することにより、ある時刻 t での脂質膜からの距離 x での基質濃度 $c(x, t)$ を求める。時刻 t における脂質膜チャンバの底面 (ガラス基板表面) での基質濃度はチャンバ高さを L とすると、 $c(L, t)$ である。本モデルを反映した一次元拡散方程式は以下の式で表される。

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (2.7)$$

$$c(0, t) = C_M \quad (2.8)$$

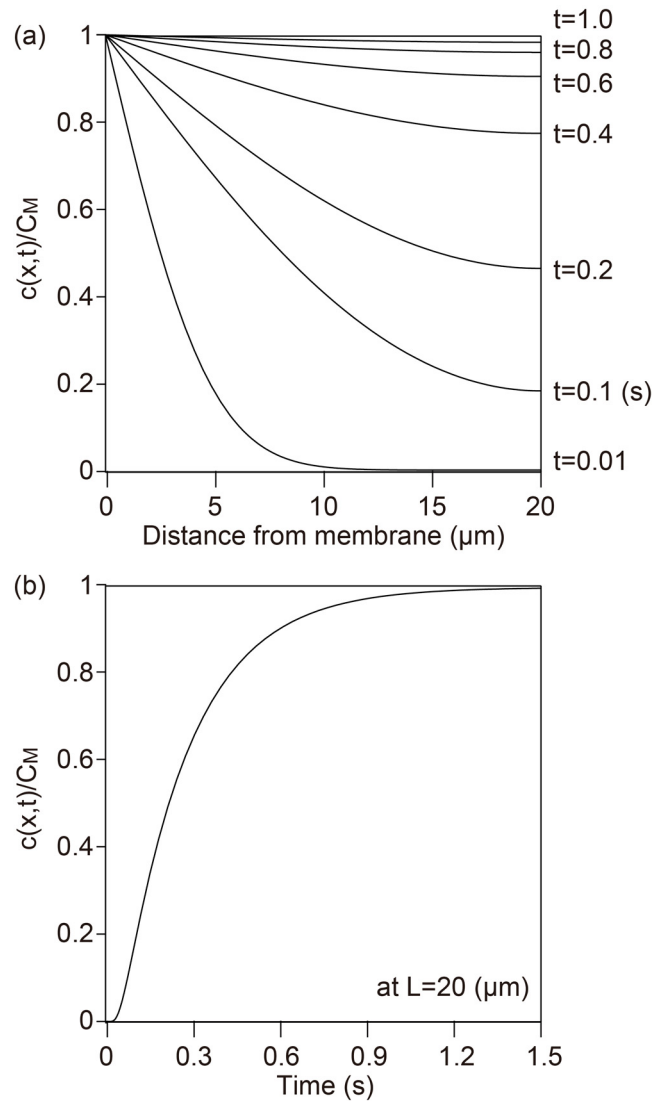


Fig. 2.5 脂質膜チャンバ内での基質の拡散過程 (a) 脂質膜チャンバ内での基質濃度分布の経時変化 (b) 脂質膜チャンバ底面（ガラス基板表面）での基質濃度分布の経時変化

$$c_x(L, t) = 0 \quad (2.9)$$

$$c(x, 0) = 0 \quad (2.10)$$

ここで、式 (2.8) および式 (2.9) は境界条件、式 (2.10) は初期条件である。式 (2.7) から式 (2.10) を用いて一次元拡散方程式を解くことにより（Appendix D 参照）以下の式を得た。

$$c(x, t) = C_M \left(1 - \frac{4}{\pi} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{2n+1} \sin\left(\frac{(2n+1)\pi x}{2L}\right) \exp\left(\frac{-(2n+1)^2 \pi^2 D t}{4L^2}\right) \right) \quad (2.11)$$

脂質膜チャンバの高さ(本研究で構築した脂質膜チャンバの値を用いることにより $L = 20$ (μm) および基質の拡散係数(ここでは水中のカルシウムイオンの拡散係数を用いることにより $D = 754$ ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)) を式 (2.11) に代入し、脂質膜からの距離 (x) に対する脂質膜近傍の基質濃度で規格化した基質濃度 ($\frac{c(x, t)}{C_M}$) をプロットすると Fig. 2. 5a に示す曲線となる。このグラフは時刻 t の時のチャンバ内の基質濃度分布を表しており、約 0.1 秒でチャンバ底面での基質濃度上昇が始まり、約 1 秒後にはチャンバ内の基質濃度はほぼ均一となることがわかる。また、Fig. 2. 5b は脂質膜チャンバの底面(ガラス基板表面; $L = 20$ (μm))における脂質膜近傍の基質濃度で規格化した基質濃度の時間変化を表している。具体的な数値を挙げると、 $t = 0.55$ (s) で $\frac{c(x, t)}{C_M}$ が 0.9 を超え、 $t = 1.05$ (s) で $\frac{c(x, t)}{C_M}$ は 0.99 に到達する。これは膜タンパク質の基質輸送による脂質膜近傍の基質濃度上昇が約 1 秒後にはチャンバ内全体に反映され、一様と見なせることを意味している。よって基質の濃度上昇に対応した脂質膜チャンバ内の蛍光輝度上昇までの時間は約 1 秒である。蛍光の検出時間 (t_d) が 100 秒以上の場合には誤差は 1% 以内となることから拡散を考慮する必要はないと考えられる。本研究において一般に検出時間 (t_d) は 100 秒以上であったことから、理論モデルの構築においては拡散を考慮せずに議論を進めることとした。

2.3 デバイス作製

2.3.1 デバイス作製概要

脂質膜チャンバは、銀 - 塩化銀電極 (Ag/AgCl electrode) が組み込まれた親水・疎水パターン基板 (hydrophilic/hydrophobic patterned substrate) を用いて形成される。本デバイスはフォトリソグラフィと電気めっき (electroplating) の技術を用いて作製した。作製プロセスは Fig. 2. 6 に示す通り、3つのステップから成る。まず、ガラス基板 (glass substrate) 上に金電極 (Au electrode) のパターンニングを施す (Fig. 2. 6a-d)。次に親水・疎水のパターンをガラス基板上に形成する (Fig. 2. 6e-i)。最後に親水部にのみ露出した金電極上に電気めっきにより銀 - 塩化銀電極を作製する (Fig. 2. 6j, k)。

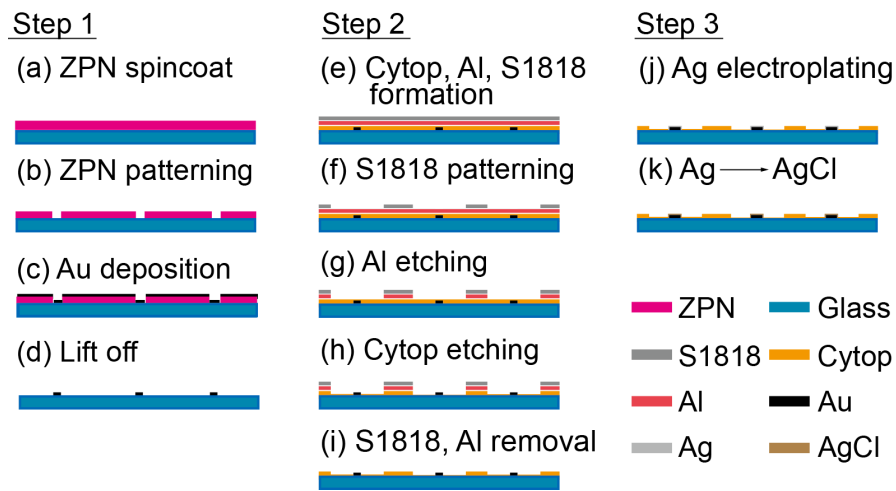


Fig. 2.6 デバイス作製のプロセス (©2013 IEEE)

2.3.2 ガラス基板表面への金電極のパターニング

本項の内容は特許申請の予定であるため現時点では公表できない。

2.3.3 ガラス基板表面への親水・疎水パターニング

本項の内容は特許申請の予定であるため現時点では公表できない。

2.3.4 金電極上への銀 - 塩化銀電極の形成

本項の内容は特許申請の予定であるため現時点では公表できない。

2.3.5 サイトップ層の形成における条件検討

本項の内容は特許申請の予定であるため現時点では公表できない。

2.4 脂質膜チャンバの形成

親水・疎水パターン基板を用いた脂質膜チャンバの形成は以下に示す手順に従って行った (Fig. 2.7)。脂質膜チャンバの形成過程の観察を容易にするために、電極を導入していない基板を用いて、脂質膜チャンバの形成を行った。電極を導入した基板を用いても、同様の方法を用いて脂質膜チャンバの形成が可能である。

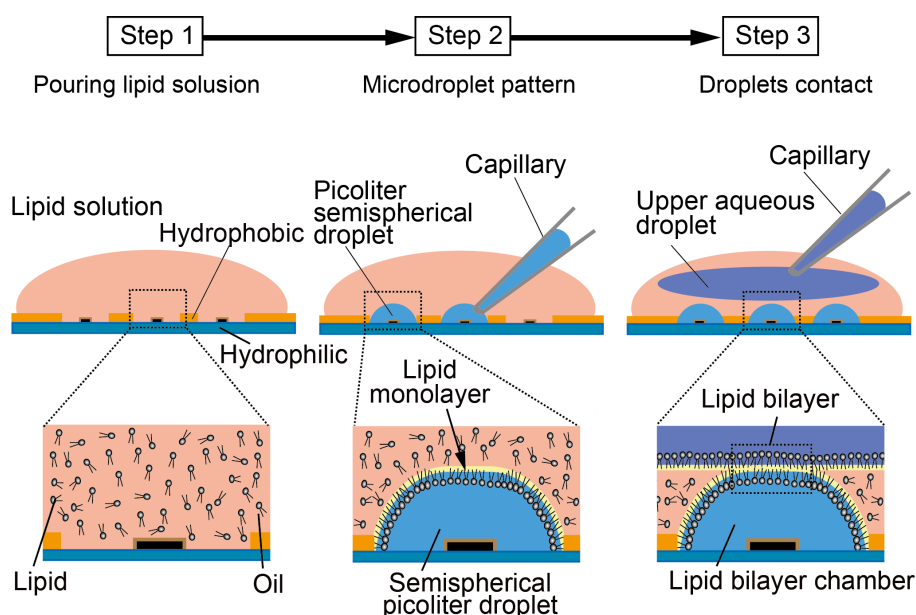


Fig. 2.7 脂質膜チャンバ作製手順

まずリン脂質（Phospholipid）を分散させた有機溶媒（Oil）（ヘキサデカン；hexadecane）で親水・疎水パターン基板上を満たす（Pouring lipid solution）。リン脂質には、アゾレクチン（Asolectin）またはジフィタノイルホスファチジルコリン（DPhPC）を用いた。また、リン脂質の濃度は、20 mg/ml とした。（リン脂質の濃度がこの濃度よりも小さい場合には、脂質膜の形成効率が減少する傾向にあった。）

次に、先の細いキャピラリー（Capillary）を用いて、親水性パターン上に微小液滴（Microdroplet）をパターンニング（Microdroplet pattern）する。マイクロポンプを用いてキャピラリー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、自発的にキャピラリーから排出された水溶液が親水性パターン内に配置され、微小液滴アレイ（Microdroplet array）が形成される（Fig. 2. 8a）。この時、微小液滴と有機溶媒の界面に脂質分子が親水基を液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（Lipid monolayer）を形成する。

次に、キャピラリーを用いて微小液滴を覆う程度の大きさを持つ上側の液滴（Upper aqueous droplet）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液滴アレイの上から接触させる。この時の上側の液滴の移動速度は、100 $\mu\text{m/s}$ から 1 mm/s の間とした。上側の液滴と有機溶媒の界面にも脂質の単層膜が形成され

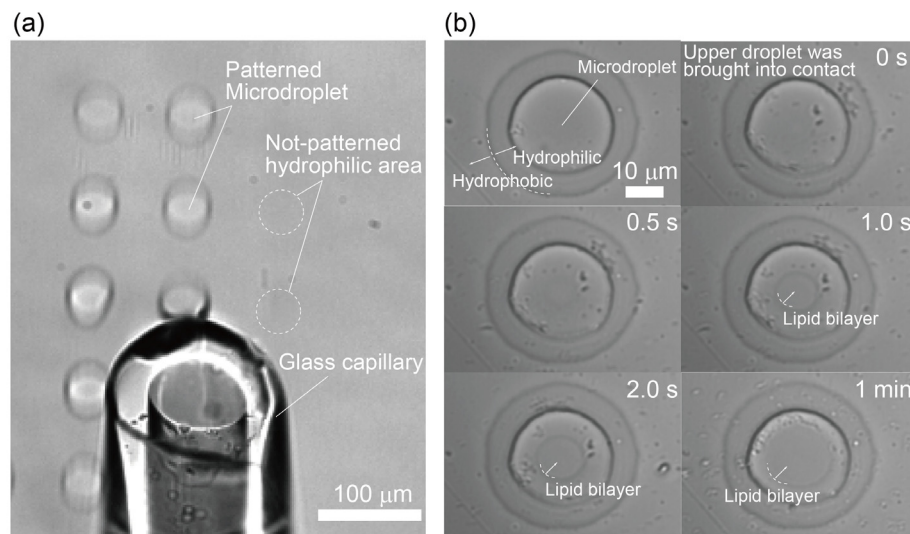


Fig. 2.8 脂質膜チャンバ形成プロセス (a) 微小液滴のパターニング (©2012 IEEE) (b) 脂質二重膜の形成過程

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 / ヘキサデカン / 脂質の有機溶媒膜が形成される^[40]。この膜は、上下の液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 (Lipid bilayer) が形成される^[60]。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る (Fig. 2.8b)。Fig. 2.9a は形成した脂質二重膜チャンバアレイの明視野顕微鏡写真である。20 倍の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る。拡大図を見ると、微小液滴上に形成された脂質二重膜の境界を観察することができる (Fig. 2.9b)^[61]。

40 μm の直径の親水性パターンを持つ基板を用いて形成された脂質膜チャンバを 40-μm チャンバ、200 μm の直径の親水性パターンを持つ基板を用いて形成された脂質膜チャンバを 200-μm チャンバと呼ぶこととする。親水性部分にパターンされた微小液滴は常に親水性部分よりも小さいことがわかる。これは微小液滴と、ガラス基板と、脂質の分散した有機溶媒の界面張力のバランスに起因するもとだと考えられる。親水性部分の大きさとパターンされる微小液滴の大きさを同等にするためには、例えばガラス基板の表面処理により、さらに親水性を向上させること、有機溶媒の液滴に使用する水溶液に対する表面張力を小さいものに変更することが有効であると考えられる。

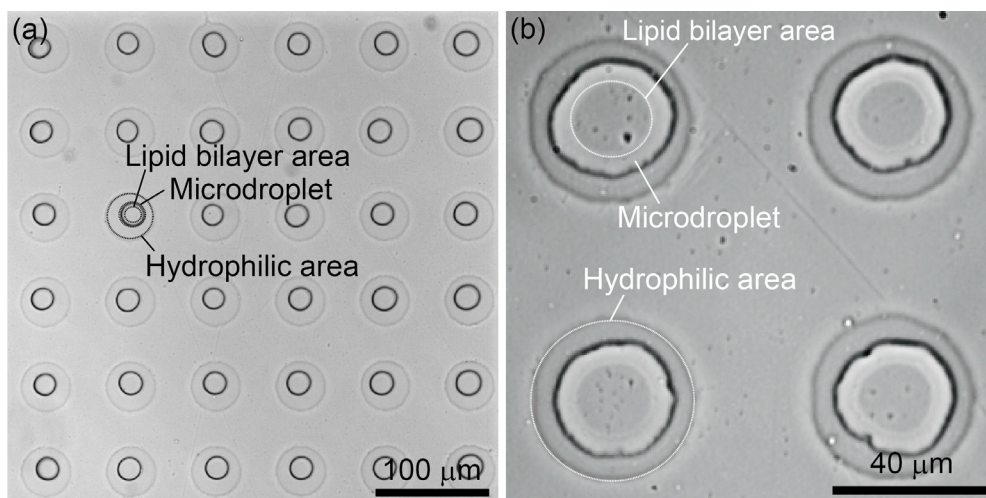


Fig. 2.9 形成された脂質膜チャンバアレイ (a) 脂質膜チャンバアレイ (b) 脂質膜チャンバの拡大図 (© 2014 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim)

2.5 脂質膜チャンバの膜面積制御

本研究で提案した脂質膜チャンバ形成方法は、二つの液滴を脂質が分散した有機溶媒中で接触させるというものである。この方法によって形成された脂質膜チャンバは、他の脂質膜チャンバ形成方法とは異なり、脂質膜チャンバ形成後に脂質膜面積を変化させることが可能である。脂質膜面積を変化させることにより、脂質膜内の膜タンパク質の密度を制御することも可能となる^[62]。ここでは、その脂質膜面積の可変性を実証する。

脂質膜チャンバを形成した後で、上側の液滴をキャピラリを介してマニピュレータにより動かした。その際のタイムラプス画像を Fig. 2.10 に示す。観察開始直後は微小液滴の上側全体に渡って脂質二重膜が形成されている。その後、上側の液滴を動かすに従って、脂質の単層膜同士が接触していた部分が引き剥がされ、結果として脂質二重膜の面積が小さくなる様子が観察された (4-12s)。最終的には上側の液滴と微小液滴は接触しない状態となり、脂質二重膜部分は消失した (16s)。これらの結果から、上側の液滴を操作することにより、脂質二重膜の面積の可変性が示された。

また、液滴を解離させることにより一度は消失した脂質二重膜が、再度液滴を接触させることにより再び微小液滴上に形成されることがわかった (Fig. 2.10 (16s -307s))。このように脂質二重膜の形成と消失を自在に操作できることは、液滴を接触させる本手法ならではの

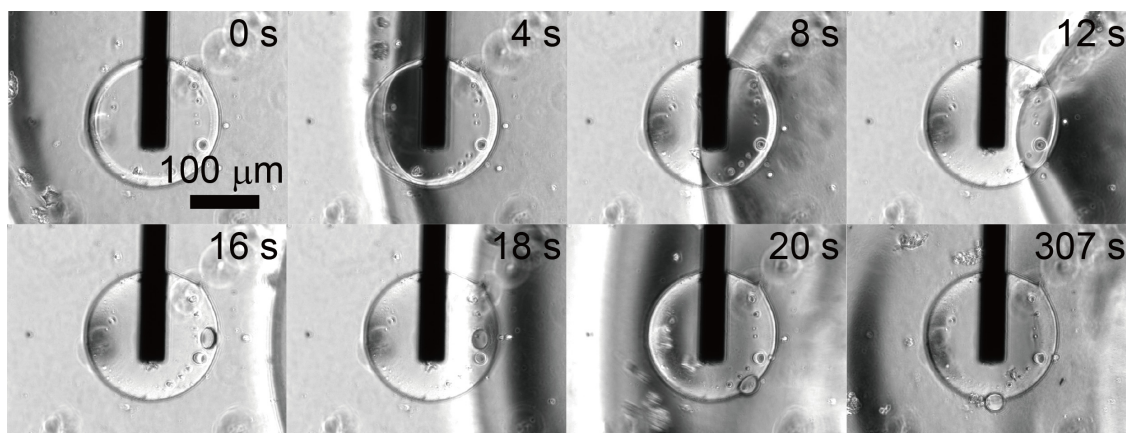


Fig. 2.10 脂質膜面積の変化

特徴である。脂質二重膜の形成と消失の操作により、今後、膜タンパク質を介して外部との物質交換を行う時間を制御できる可能性がある。

2.6 結言

本章では、脂質膜チャンバを用いた膜タンパク質の輸送機能の蛍光検出をモデル化し、 S/V に対する膜タンパク質の輸送機能の検出時間の変化について調べた。その結果、 S/V が大きくなるほど膜タンパク質の膜輸送のイメージングに有利であることが確認された。また、検出時間は S/V に対しておよそ反比例して小さくなることが示された。しかし、完全に反比例にはならない領域も存在し、それは膜タンパク質の数が時間とともに変化することによるものであり、そのような領域では、脂質膜チャンバの S/V を大きくすることは検出時間の短縮にそれほど有効には働かないことがわかった。

以下の内容は雑誌掲載の予定のため現時点では公表できない。

また、電極を導入した脂質膜チャンバの形成方法について述べ、実際に各チャンバ内に電極が導入された脂質膜チャンバを作製した。本研究で提案した親水・疎水パターン基板の親水性部分に電極を配置する方法が、微小液滴内に電極を導入する方法として有効であること

が確認された。また、脂質の分散した有機溶媒中で微小液滴の上から別の水滴を接触させる方法が、微小液滴の上部に脂質膜を形成する方法として有効であることが確認された。また、サイトップのスピンコート条件と銀塩化銀電極の作製条件を検討することにより、電極を親水性部分にのみ露出させることができる条件と、銀 - 塩化銀電極を脂質膜チャンバの内部に収めるための条件を見出した。

第3章 脂質膜チャンバの評価

3.1 緒言

作製した脂質膜チャンバを、膜タンパク質の輸送機能の蛍光検出のための評価軸と、電圧印加のための評価軸に分けることで総合的に評価する。まず蛍光検出システムとしての評価には、第2.2節で述べた通り、脂質膜面積 (S) とチャンバ体積 (V) の比 (S/V) が重要なパラメータとなる。そこで、作製した脂質膜チャンバに関して、脂質膜面積、チャンバ体積、及びそれらの比を測定する。また、脂質膜の時間に対する安定性、および物質透過性についても検証する。一方で、電圧印加のシステムとしての評価を行うために、意図した膜電位を印加できているか検討すると共に、電圧印加に対する安定性を検証する。また、形成した脂質膜の基本的な特性評価として、導入した電極により脂質膜の電気容量 (膜容量) と脂質膜の電気抵抗 (膜抵抗) を測定する。

3.2 脂質膜チャンバの体積と膜面積の測定

3.2.1 チャンバ体積と膜面積の測定方法

まず、脂質膜チャンバの体積は以下の方法により測定した。倒立型共焦点顕微鏡により脂質膜チャンバの断面スライス画像を取得した。脂質膜チャンバを形成する際に用いる脂質分子を分散したヘキサデカンに DiI (赤色蛍光色素) を添加し、また、微小液滴にはカルセイン (Calcein, 緑色蛍光色素) を混合することにより、それぞれ有機溶媒部分と微小液滴部分を可視化した。xy 平面の共焦点画像を z 軸方向に 0.5 μm 刻みで取得した。画像処理ソフトウェア

(ImageJ) を用いて、得られたカルセインの蛍光画像において蛍光強度が液滴内の値から半減する値を閾値として決定した。その閾値よりも蛍光強度が高い部分を脂質膜チャンバの内部として定義し、チャンバ高さと同様に体積を見積もった。チャンバ高さは基板にパターンされた微小液滴の最上部とした。次に脂質膜面積の測定方法について説明する。共焦点画像を取得する際に、同時に、脂質膜チャンバの明視野画像を取得した。この画像から、脂質二重膜内部と外部の境界を判別することができるため、その脂質膜の内部の面積を ImageJ を用いて測定した。

3.2.2 計測結果

Fig. 3. 1b および 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; 40- μm chamber) の xy 断面図と xz 断面図である。また、Fig. 3. 1e および 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; 200- μm chamber) の xy 断面図と xz 断面図である。それぞれの脂質膜チャンバの高さは、およそ 7 μm と 20 μm であった。40- μm チャンバと 200- μm チャンバの体積は Table 3. 1 に示した通りである。40- μm チャンバの体積は 200- μm チャンバに比べて 100 倍小さいことがわかった。また、変動係数 (CV) の値は、40- μm チャンバと 200- μm チャンバにおいて、それぞれ 7% と 16% であった。この結果から、チャンバ体積のばらつきは、親水性部分のパターンの直径が小さい方が小さくなることが示唆される。

また、これら断面画像から、形成された脂質二重膜は基板上にパターンされた微小液滴の界面に沿って曲率を持っていることがわかった。この曲率は上側の液滴とパターンされた微小液滴の内圧の差から生じているものと考えられる。このような曲率を有する脂質二重膜は、膜の曲率に応じて機能を変化させる膜タンパク質の機能計測に応用できる可能性があると考えられる^[63]。

Fig. 3. 1a および d はそれぞれ 40- μm チャンバと 200- μm チャンバの明視野画像である。これらの画像から、膜面積を測定した結果を Table 3. 1 に示す。40- μm チャンバの膜面積は 200- μm チャンバに比べて 35 倍小さいことがわかった。CV の値は、40- μm チャンバと 200- μm チャンバにおいて、それぞれ 18% と 26% であった。この結果から、膜面積のばらつきは、チャンバ体積と同様に親水性部分のパターンの直径が小さい方が小さくなることが示唆される。

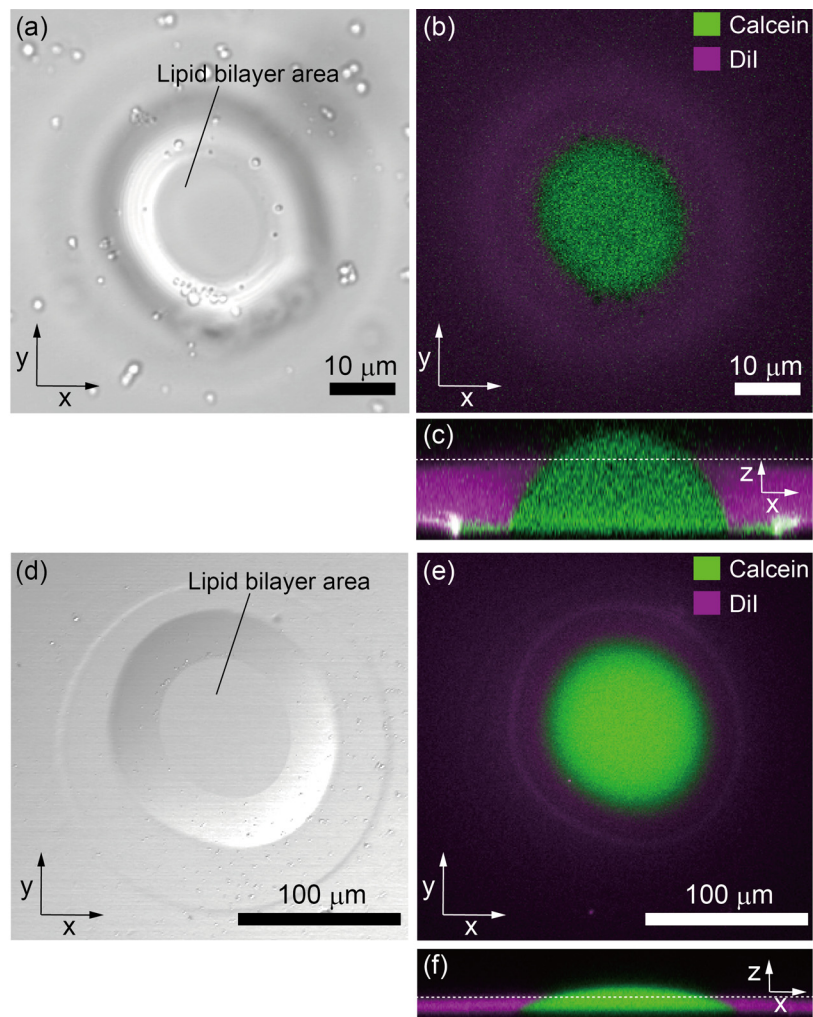


Fig. 3.1 脂質膜チャンバの明視野画像と共焦点画像 (a) 40- μm チャンバの明視野画像 (b) 40- μm チャンバの xy 断面の共焦点画像 (c) 40- μm チャンバの xz 断面の共焦点画像 (d) 200- μm チャンバの明視野画像 (e) 200- μm チャンバの xy 断面の共焦点画像 (f) 200- μm チャンバの xz 断面の共焦点画像 (© 2014 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim)

Table 3.1 脂質膜チャンバの体積と膜面積
(© 2014 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim)

	40- μm chamber	200- μm chamber
Area of lipid bilayer (S)	136 ± 24 (μm^2)	4760 ± 1257 (μm^2)
Volume of the chamber (V)	1.4 ± 0.1 (pL)	158 ± 25 (pL)
S/V	100 ± 10 ($\mu\text{m}^2/\text{pL}$)	30 ± 3 ($\mu\text{m}^2/\text{pL}$)

3.2.3 体積と膜面積に関する評価

測定した脂質膜チャンバの体積と膜面積から、膜タンパク質の輸送機能の蛍光検出において重要なパラメータである膜面積体積比 (S/V) の値を算出した (Table 3.1)。その結果、40- μm チャンバは200- μm チャンバに比べて S/V の値が約3倍であることがわかった。200- μm チャンバの S/V の値は、従来の膜タンパク質の蛍光計測を行った研究において用いられた脂質二重膜チャンバの S/V の値の範囲 ($4 \mu\text{m}^2/\text{pL}$ 以上^[36]) に入っていることから、膜タンパク質の蛍光計測に使用可能であると考えられる。また、蛍光計測膜輸送の電気計測と蛍光検出を同一のデバイスを用いて行った研究に比べ^[36]、約7倍となった。第2.2節より蛍光検出において、検出時間はおよそ S/V に反比例して短くなるため、200- μm チャンバを用いた場合、従来の電極を有する蛍光計測が可能である方法を用いるよりも、約7倍短い時間で計測が可能になると予測される。また、40- μm チャンバを用いた場合には、同様の考え方から、従来の方法に比べ^[36]、約25倍短い時間で計測が可能となると予測される。

また、CV値は40- μm チャンバと200- μm チャンバにおいて、どちらも10%であった。体積 V や膜面積 S を測定した際の CV 値は40- μm チャンバと200- μm チャンバの間で差が見られたが、膜面積体積比 S/V の CV 値はほぼ同一の値であった。これは、膜面積とチャンバ体積の間に正の相関関係があることを示唆している。

次に、電気計測で計測が困難な膜タンパク質の蛍光計測への応用可能性を検討する。一般に1 pA以下になると電気計測での計測が困難となる。このような膜タンパク質の一分子輸送機能解析を行うためには、蛍光計測が有効な手段である^[14]。電気計測での計測が困難である状況として、仮に0.1 pAの電流値となるイオン輸送を行う膜タンパク質を考える。膜タンパク質によって脂質膜チャンバ内に輸送された物質の濃度が10 μM に達した時に検出が可能であると仮定すると、200 μm チャンバを用いた場合には、30分以内に検出が可能であると予想される。既に第2.2節で述べた通り、検出が可能となる基質濃度は用いる蛍光指示薬と基質の組み合わせに依存して変化するが、蛍光指示薬の解離定数は数百 nM から数 mM であることが多い^{[9][73]}、10 μM の物質濃度を検出することは現実的である。以上のことから、構築した脂質二重膜チャンバによって、電気計測では計測が困難である膜タンパク質についても蛍光計測できる可能性が示唆された。

脂質膜チャンバを観察した時のチャンバ大きさが、従来の方法と比べてそれほど変化しないにも関わらず、このように S/V を大きく増加させることが可能となった要因は、微小液滴

の親水・疎水パターン基板を用いたパターンニングを脂質膜チャンバ形成に応用した、独特の方法にある。基板表面の親水部を利用して微小液滴が扁平になるようにすることで、同じ体積の液滴でも液滴の曲率半径を大幅に増加させることができる。曲率半径の大きい液滴ほど 2 つの液滴が脂質の分散した有機溶媒中で接触した際に形成される脂質二重膜の面積は大きくなる。これは、脂質二重膜が形成・維持されるためには、適切な圧力範囲があるからである。特に問題となるのは、圧力が高くなり脂質膜が破れることである。液滴の曲率半径が小さいほどその液滴の内圧は大きくなるため、液滴同士が接したときに変形しづらくなる。そのため界面に形成される脂質二重膜にかかる圧力は、同じ脂質二重膜面積で考えた場合、内圧の小さい液滴が接する場合に比べて、大きくなると考えられる。従って、曲率半径が大きく、体積の小さい液滴を形成し、接触させることが、 S/V を大きく増加させることに貢献していると考えられる。

以上の結果から、本研究で提案した方法により構築した脂質二重膜チャンバは、膜タンパク質の蛍光計測を可能とするに十分な特性を有していることが示された。

3.3 脂質膜の安定性の評価

3.3.1 時間に対する安定性の評価

脂質膜の安定性は脂質膜チャンバを用いて膜タンパク質の輸送を蛍光検出する際に非常に重要なパラメータである。膜タンパク質の輸送能力が小さい場合、または脂質二重膜中の膜タンパク質の数が少ない場合には、膜タンパク質の輸送を検出するまでに時間を要する。そのため、脂質膜チャンバを安定して維持できることは、検出できる膜タンパク質の種類に幅を持たせることに必須な条件である。ここでは、脂質膜チャンバを明視野顕微鏡で経時的に観察することにより、脂質膜チャンバの安定性を評価した。Fig. 3.2 は、40- μm チャンバの経時変化を示している。計測開始から 2 時間経過後も顕著な変化は観察されなかった。この結果から、本研究で作製した脂質膜チャンバを用いて 2 時間に渡って脂質膜面積に変化なく観察が可能であることが示された。

3.3.2 電圧印加に対する安定性の評価

本項の内容は雑誌掲載の予定であるため現時点では公表できない。



Fig. 3.2 脂質膜チャンバにおける脂質膜の安定性

3.4 脂質膜チャンバの物質透過性の評価

脂質膜チャンバを膜タンパク質の輸送機能の計測に使用する場合、膜タンパク質以外の要因で脂質膜チャンバ内外の物質交換が起こった場合、輸送前後の基質や蛍光指示薬の濃度やその他の条件に影響を与える。膜タンパク質計測において検出感度に関わるため、こうした物質の透過は極力抑える必要がある。そこで、構築した脂質二重膜チャンバの物質透過性について検討する。

モデル物質として、カルセインを用いた。カルセインは分子量が約 620 の親水性の蛍光分子である。脂質膜チャンバ内の溶液に濃度が 50 μM となるようにカルセインを超純水に溶解した。脂質溶液に 20 mg/ml の DPhPC をヘキサデカンに分散したものをを用いて脂質二重膜を形成した後に、脂質膜チャンバの明視野画像と蛍光画像を 10 分間隔で取得した。

0 分から 30 分間に取得した明視野及び蛍光画像を Fig. 3.3 に示す。これらの画像から、この 30 分間に膜面積を含めた脂質膜チャンバの形状はほとんど変化していないことが確認できる。取得したこれらの画像から、脂質膜チャンバ内の蛍光強度 (Signal) の合計値を計算し、時間に対してプロットしたものが、Fig. 3.3 の赤のマーカである。また、脂質膜チャンバの外側において、脂質膜チャンバ内として指定した範囲と同一の面積を持つ範囲内の蛍光強度 (Noise) の合計値を Fig. 3.3 の黒のマーカで示した。また、それらの蛍光強度の合計値の比 (S/N 比) をプロットしたものが Fig. 3.3 の青のマーカである。脂質膜チャンバ内の蛍光強度の合計値はバックグラウンドと同じように推移しており、また、S/N 比はほとんど変化していない (3.5% 以内の変化にとどまっている)。これらのことから少なくとも 30 分以内に 35% 程度の蛍光強度変化が観察されるような実験においては物質透過は蛍光計測にほとんど影響を及ぼさない (最大でも 10% 以内の誤差にとどまる) と考えられる。ここでは、カルセ

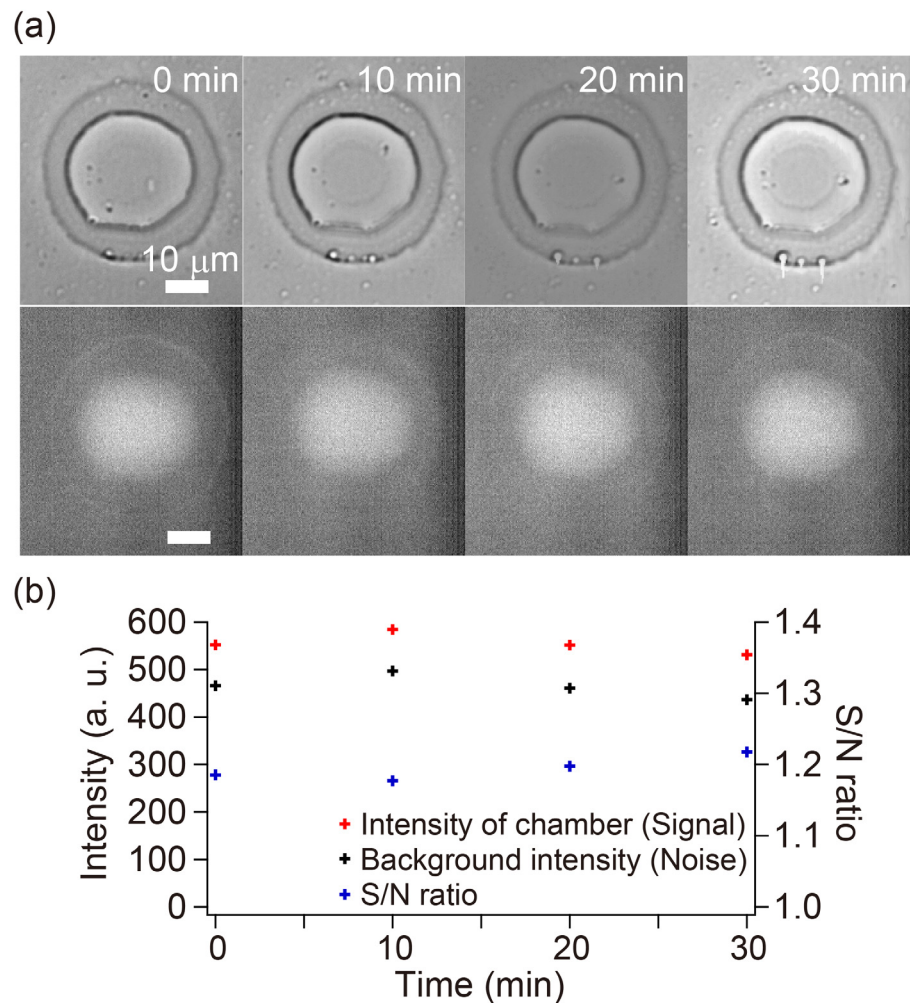


Fig. 3.3 脂質膜の物質透過性 (a) 脂質膜チャンバの明視野画像 (上) と蛍光画像 (下) (b) 脂質膜チャンバ内の蛍光強度 (赤マーカー; 左軸) とバックグラウンド蛍光強度 (黒マーカー; 左軸) と S/N 比 (青マーカー; 右軸) の経時変化

インのみに対して漏れの評価を行ったが、分子量が同程度で、親水的な性質を有する物質に対しては同様の傾向が見られるものと予想される。性質の異なる物質の透過性に関してはその都度検証する必要がある。

以上の結果から、本研究で構築した脂質二重膜チャンバにおける物質透過の影響は、膜タンパク質の輸送に由来する蛍光強度の変化が顕著に観察できる状況では、蛍光計測への影響はほとんど無視できることが示された。

3.5 膜容量・膜抵抗の測定

3.5.1 膜容量・膜抵抗の測定の概要

本研究で形成された脂質膜は、その形成過程において、脂質二重膜の境界が観察されたことから、脂質二重膜であることが示唆されているが、本節では本研究で提案する脂質膜チャンバ形成法により形成された脂質膜の電気的な特性を測定することにより、より定量的な脂質二重膜としての性質を調べる。形成された脂質膜の膜容量と膜抵抗を測定し、その値を過去の文献値と比較することにより、形成された脂質膜が脂質二重膜であることの妥当性を検討する。

3.5.2 膜容量の計測結果

本項の内容は雑誌掲載の予定であるため現時点では公表できない。

3.5.3 膜抵抗の計測結果

本項の内容は雑誌掲載の予定であるため現時点では公表できない。

3.6 膜電位の計測

3.6.1 膜電位計測の概要

本項の内容は雑誌掲載の予定であるため現時点では公表できない。

3.6.2 膜電位の計測結果

本項の内容は雑誌掲載の予定であるため現時点では公表できない。

3.7 結言

本章では、作製した脂質膜チャンバの特性を計測することにより、膜タンパク質の輸送機能の蛍光計測に適した系であること、また膜電位の固定に適した系であることを検証した。

まず蛍光計測系としての評価を、脂質膜面積 S とチャンバ体積 V および膜面積体積比 S/V により行った。得られた S/V の値は40- μm チャンバにおいては $100 \pm 10 \text{ pL}/\mu\text{m}^2$ 、200- μm チャン

バにおいては $30 \pm 3 \text{ pL}/\mu\text{m}^2$ であった。これらの値は、従来の膜タンパク質の蛍光計測が可能である脂質膜チャンバのもつ S/V の値の範囲 ($4 \mu\text{m}^2/\text{pL}$ 以上^[36]) に含まれている。よって、本研究で提案する脂質二重膜チャンバ構築方法によって形成された脂質膜チャンバは膜タンパク質の蛍光計測が可能であることが示された。

また、本研究で構築した脂質膜チャンバの体積は 40- μm チャンバにおいては $1.4 \pm 0.1 \text{ pL}$ 、200- μm チャンバにおいては $158 \pm 25 \text{ pL}$ と求められた。

さらに、構築された脂質膜チャンバは 2 時間に渡り脂質膜面積に変化がなく観察が可能であった。また、脂質膜チャンバ内に封入した蛍光物質は 30 分後も脂質膜チャンバ内にとどまっていることが確認された。これらの結果から安定した蛍光計測が可能な系であることが示された。

以下の内容は雑誌掲載の予定であるため現時点では公表できない。

[REDACTED]

以上の実験結果から、本研究で提案する脂質二重膜チャンバの構築方法を用いて形成された電極を内部に有する脂質膜チャンバは、膜タンパク質の輸送機能を蛍光計測する目的、および膜電位を印加する目的に適していることが示された。

第 4 章 膜輸送の計測

4.1 緒言

本章では、第 2 章で構築し第 3 章で評価した脂質膜チャンバを用いて、本研究の目的である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が可能であるか検証する。そのために、まずは膜タンパク質の蛍光計測が可能であるかを検証する。モデル膜タンパク質としては 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する^{[64][65]}。膜タンパク質の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する。また、カルシウムイオン以外の物質も検出可能であることを実証するために、 α ヘモリシンの貫通孔を介して脂質膜チャンバ内に拡散するカリウムイオンについても計測が可能か検証する。また、第 2 章で構築した蛍光計測の理論モデルの妥当性について蛍光計測の実験結果を用いて検討する。次に、導入した電極を用いて膜電位を固定した状態で α ヘモリシンの貫通孔を介して脂質膜チャンバ内に拡散するカルシウムイオンを蛍光計測し、膜電位固定下で膜タンパク質の蛍光計測が可能であることを示す。

4.2 膜輸送の蛍光計測

4.2.1 概要

膜タンパク質の輸送機能を蛍光計測する方法は大きく分けて二つある。一つは、蛍光基質を用いる方法で、脂質膜チャンバ内の蛍光基質が外部（内部）に輸送されることで蛍光強度

が小さく（大きく）なる現象を解析する。もう一つは、基質に結合し蛍光強度が変化する蛍光指示薬を使用する方法で、脂質膜チャンバ内に輸送された基質が、蛍光指示薬と結合する際の蛍光強度の変化を解析する。後者は基質自身が蛍光性である必要がなく膜輸送の計測において広範に利用できる。そこで本研究では、膜タンパク質の輸送機能を蛍光計測する方法として、後者の方がより幅広い輸送機能の計測に応用可能であると判断し、蛍光指示薬を使用した方法により膜タンパク質の輸送を蛍光検出する。ここでは、 α ヘモリシンが形成した貫通孔を通過して脂質膜チャンバ内に拡散するカルシウムイオン (Ca^{2+}) を検出する。ここで用いる方法は極めて汎用性の高い方法であるため、一般的な蛍光顕微鏡と市販されている蛍光指示薬を用いて、容易に膜タンパク質の輸送機能の計測が可能である。また、蛍光指示薬の種類を変更するだけで、同様の方法により、指示薬に対応した基質の輸送を計測することが可能である。そこで、カルシウムイオン (Ca^{2+}) 以外の物質としてカリウムイオン (K^+) を計測対象物質と設定し、 α ヘモリシンの貫通孔を通過し脂質膜チャンバ内に拡散するカリウムイオンの蛍光検出も試みる。

4.2.2 カルシウムイオンの膜輸送の蛍光検出結果

脂質膜チャンバを形成する際に、微小液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、脂質膜チャンバ内に 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た。

α ヘモリシン (α -hemolysin) は水溶性のタンパク質であるため、 α ヘモリシンを脂質膜に導入する際には、予めモノマー (33 kDa) を上側の溶液に混合すればよい。 α ヘモリシンのモノ

Table 4.1 カルシウムイオンの輸送計測における脂質膜チャンバ内外の溶液組成

	Inside of the chamber	Outside of the chamber
α -hemolysin	-	± 100 nM
Fluo-4	100 μ M	-
EDTA	500 μ M	-
CaCl_2	-	100 mM
KCl	150 mM	-
HEPES	10 mM	10 mM

マー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を起こし七量体となることで直径 1.5 nm 程度の貫通孔を形成する^[67]。

脂質膜チャンバ内に不純物として溶けているカルシウムイオンによる蛍光輝度の上昇を排除するために、カルシウムキレート剤としてエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を脂質膜チャンバの内側の溶液に添加した。また、浸透圧はチャンバの内外で同等になるよう塩化カリウム (KCl) 溶液を添加することにより調製した。脂質膜チャンバの内側と外側の溶液はそれぞれ Table 4.1 に示す物質濃度とした。

Fig. 4.1a は α ヘモリシン存在下での脂質膜チャンバアレイ (40- μ m 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る。Fig. 4.1 のそれぞれの画像において、視野内には 6×6 の合計 36 箇所の親水性部分がパターンされている。脂質膜チャンバは、Fig. 4.1a 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る。他の 6 箇所は脂質膜を形成した直後に膜が破れてしまったため、カルシウム蛍光指示薬の蛍光強度は確認することができない。このように、脂質膜を形成した直後 (0 min) に最も脂質膜は不安定であり、いくつかの脂質膜チャンバは膜が破れてしまうことが多い。ここで示した実験の場合では、脂質膜チャンバの形成率は、83% であった。それぞれの脂質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った。 α ヘモリシン存在下 (Fig. 4.1a) と α ヘモリシン非存在下での脂質膜チャンバ内の比蛍光強度の経時変化を Fig. 4.1b に示す。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る。比蛍光強度が徐々に上昇していき、ある時刻で急に飽和するという形状となるのは、2.2.6 項でのシミュレーションの結果から、キレート剤の影響によるものだと考えられる。また、 α ヘモリシン存在下の実験において、8 分後までに全ての脂質膜チャンバで比蛍光強度が増加した。なおグラフの経時変化における強度の急激な変化は蛍光ランプの光量のゆらぎによるものと考えられる。この結果から、本研究で構築した脂質膜チャンバを用いて、実際に膜タンパク質による輸送を蛍光検出できることが示された。

4.2.3 カリウムイオンの膜輸送の蛍光検出結果

4.2.2 項までの膜輸送の蛍光検出ではカルシウムイオンを検出した。ここでは、カルシウムイオン以外の種類のイオンに関しても同様の方法を用いて膜輸送の蛍光検出が可能であることを確認する。膜タンパク質の中には、カルシウムイオンを輸送する膜タンパク質に加えて

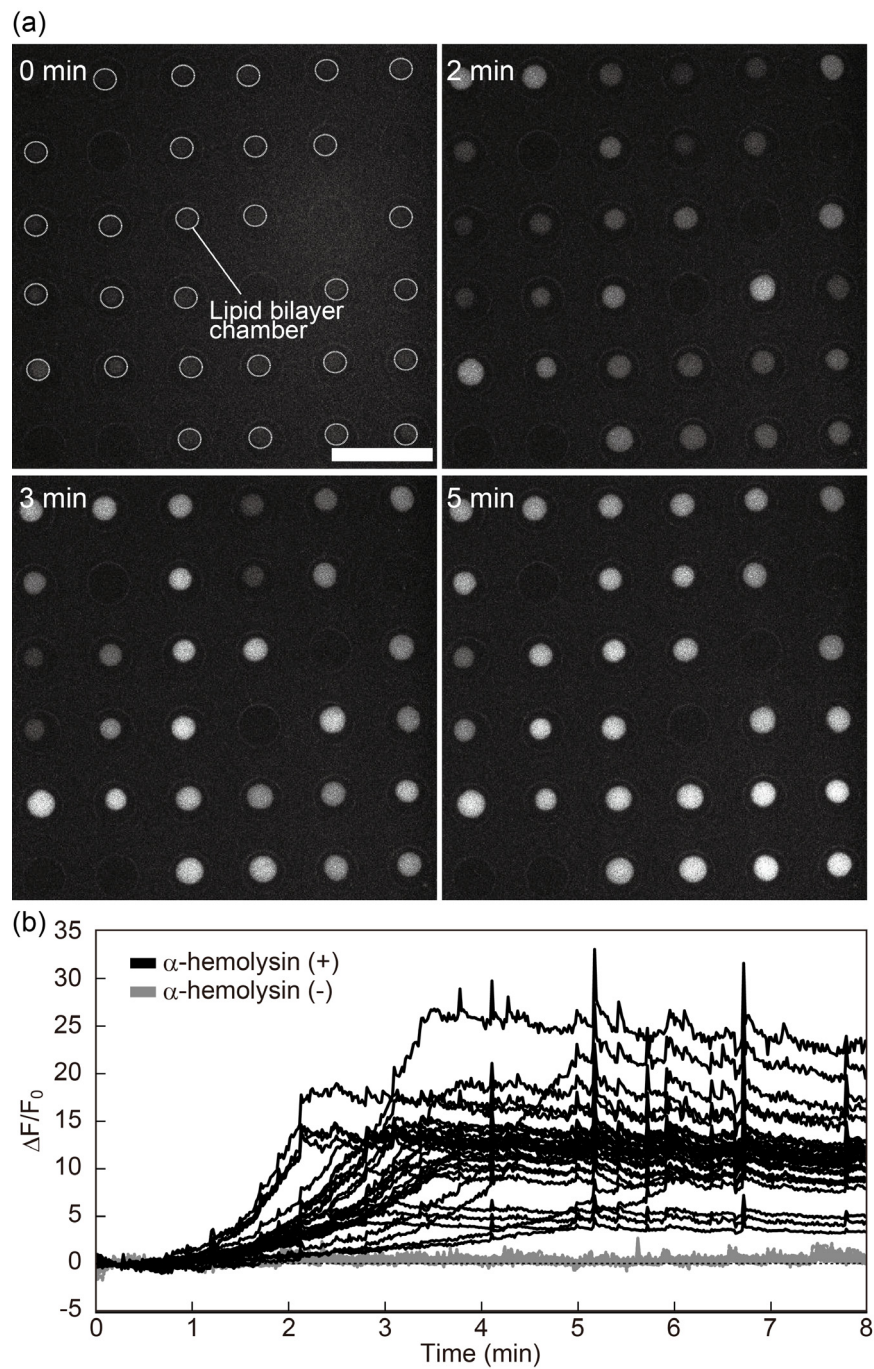


Fig. 4.1 カルシウム輸送の蛍光計測 (a) 計測中の脂質膜チャンバレイの経時変化 (b) 脂質膜チャンバ内の比蛍光強度の経時変化 (スケールバー : 100 μm) (© 2014 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim)

Table 4.2 カリウムイオンの輸送計測における脂質膜チャンバ内外の溶液組成

	Inside of the chambers	Outside of the chambers
α -hemolysin	-	100 nM
PBFI	100 μ M	-
KCl	-	120 mM
Sucrose	240 mM	-
HEPES	5 mM	5 mM

カリウムイオンを輸送するものも多い。カルシウムイオンに限らず、他のイオンでも同様に膜タンパク質の輸送を検出可能であることを示すことは、膜タンパク質に対する本計測系の汎用性を示す上で重要である。

カリウムイオンを検出するために、カリウムイオン蛍光指示薬である PBFI を使用した^{[73][74]}。この試薬はカリウムイオンと結合することにより蛍光強度が数倍に上昇する。4.2.2 項までの実験と同様に、 α ヘモリシンが形成する貫通孔を通過して拡散により脂質膜チャンバ内に流入するカリウムイオンの検出を試みた。脂質膜チャンバ(40- μ m チャンバ)内外の溶液は Table 4.2 の通りとし、蛍光顕微鏡により脂質膜チャンバ内の蛍光強度の経時変化を記録した。

計測結果を Fig. 4.2 に示す。上側の液滴を基板にパターンされた微小液滴に接触させ、脂質二重膜の形成を明視野像で確認した後で、蛍光画像の取得を開始した(0 min)。Fig. 4.2a は脂質膜チャンバの計測開始直前の明視野顕微鏡像及び計測中の蛍光顕微鏡像である。また、Fig. 4.2b は蛍光画像から求めた脂質膜チャンバ内の比蛍光強度の経時変化のグラフである。それぞれの曲線は別々の脂質膜チャンバの比蛍光強度を示しており、その中の一つの蛍光画像を Fig. 4.2a に示した。時間が経過するに従い全ての脂質膜チャンバにおいて、比蛍光強度の上昇が観察された。また、その増加は、どの脂質膜チャンバにおいても10分程度で飽和した。比蛍光強度の上昇が4.2.2 項におけるカルシウムイメージングで得られた経時変化(Fig. 4.1)とは異なり、徐々に上昇し徐々に飽和するという形状となっている。これは第2.2節での議論からキレート剤を含まない検出系となっているからであると考えられる。PBFIの蛍光強度の増加が10 mM程度で飽和することは確認しており(Appendix A 参照)10分後において、脂質膜チャンバ内のカリウムイオン濃度は10 mM程度に達したものと考えられる。各脂

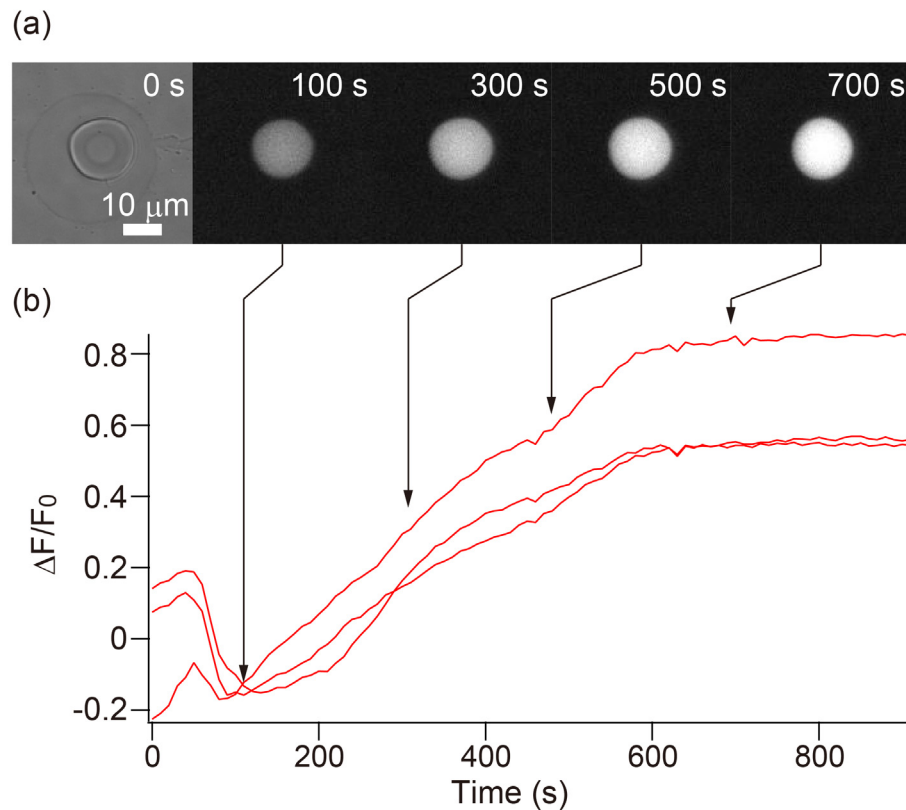


Fig. 4.2 カリウム輸送の蛍光計測 (a) 計測中の脂質膜チャンバの経時変化 (b) 脂質膜チャンバ内の比蛍光強度の経時変化

質膜チャンバで比蛍光強度にばらつきがあるのは、脂質膜面積のばらつきに起因して α ヘモリシンの貫通孔の数が脂質膜チャンバ毎に異なるため、また、チャンバ体積のばらつきに起因して比蛍光強度の上昇率が異なるためだと考えられる。計測開始直後の 100 秒程度は比蛍光強度が減少するという現象が見られた。この現象は、 α ヘモリシンの有無に関わらず、また、カリウムイオンの有無に関わらずしばしば観察された。原因の詳細は不明だが、蛍光指示薬の褪色によるものである可能性が考えられる。いずれにせよ、 α ヘモリシンが存在しない条件で、比蛍光強度が上昇する現象は観察されなかったことから、ここで観察された比蛍光強度の上昇は、 α ヘモリシンの貫通孔を通過して脂質膜チャンバ内に拡散したカリウムイオンによるものであると考えられる。以上の結果から、カルシウムイオン以外のイオンでも膜タンパク質の輸送の検出が可能であることが示された。よって、構築した脂質膜チャンバは汎用性があり、様々な蛍光指示薬を用いて計測が可能であると考えられる。

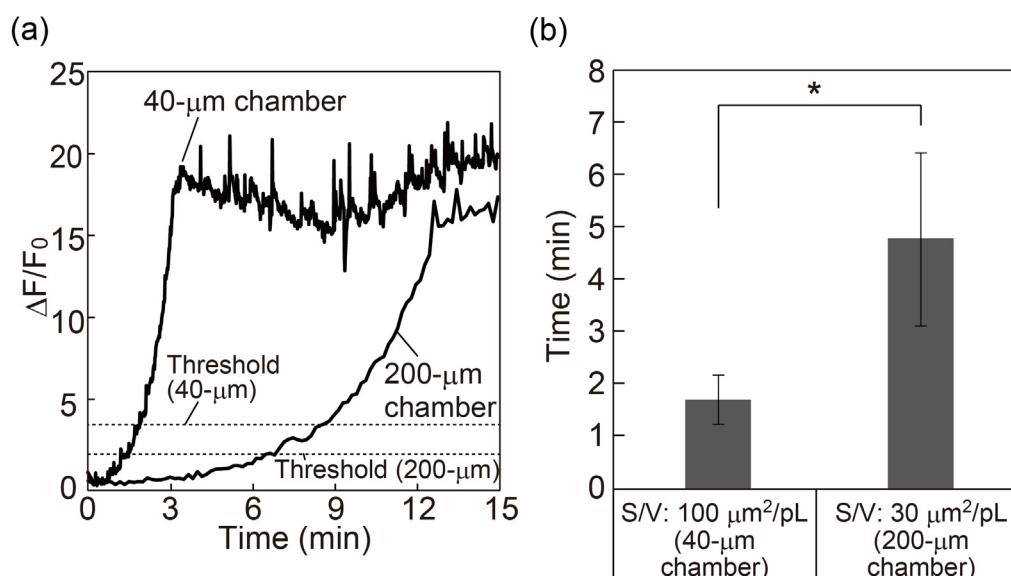


Fig. 4.3 100 nM の α ヘモリシン存在下での異なる膜面積体積比を有する脂質膜チャンバによる膜輸送の計測 (a) 脂質膜チャンバ内の比蛍光強度の経時変化 (b) 検出時間の比較 (Student T-検定 *: $P < 0.05$) (© 2014 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim)

4.3 膜輸送の蛍光検出における膜面積体積比の影響

4.3.1 概要

膜タンパク質の輸送機能の蛍光検出において、第 2.2 節で行ったシミュレーション結果から、脂質膜チャンバの S/V が大きいほど膜輸送を高速に検出できることが示唆された。そこで、実際にシミュレーションの結果と同様に、 S/V が大きいほど膜輸送を高速に検出でき、また、検出までの時間 t_d は S/V におよそ反比例するのかを検証する。そのために、異なる S/V を有する脂質膜チャンバを用いて、膜タンパク質の輸送機能の検出を行い、結果を比較する。

具体的には、40- μm チャンバと 200- μm チャンバを用いて、第 4.2 節と同様の方法により、 α ヘモリシンが形成した貫通孔を通過し拡散するカルシウムイオンを蛍光検出する。

4.3.2 異なる膜面積体積比を有する膜チャンバによる膜輸送の蛍光検出

Fig. 4.3a は 100 nM の α ヘモリシンを脂質膜チャンバ外側に溶解したときの 40- μm チャンバと 200- μm チャンバそれぞれの典型的な比蛍光強度の経時変化を表したグラフである。蛍光検出できたかを判断するためには、基準となる値が必要である。そこで、本研究では検出の

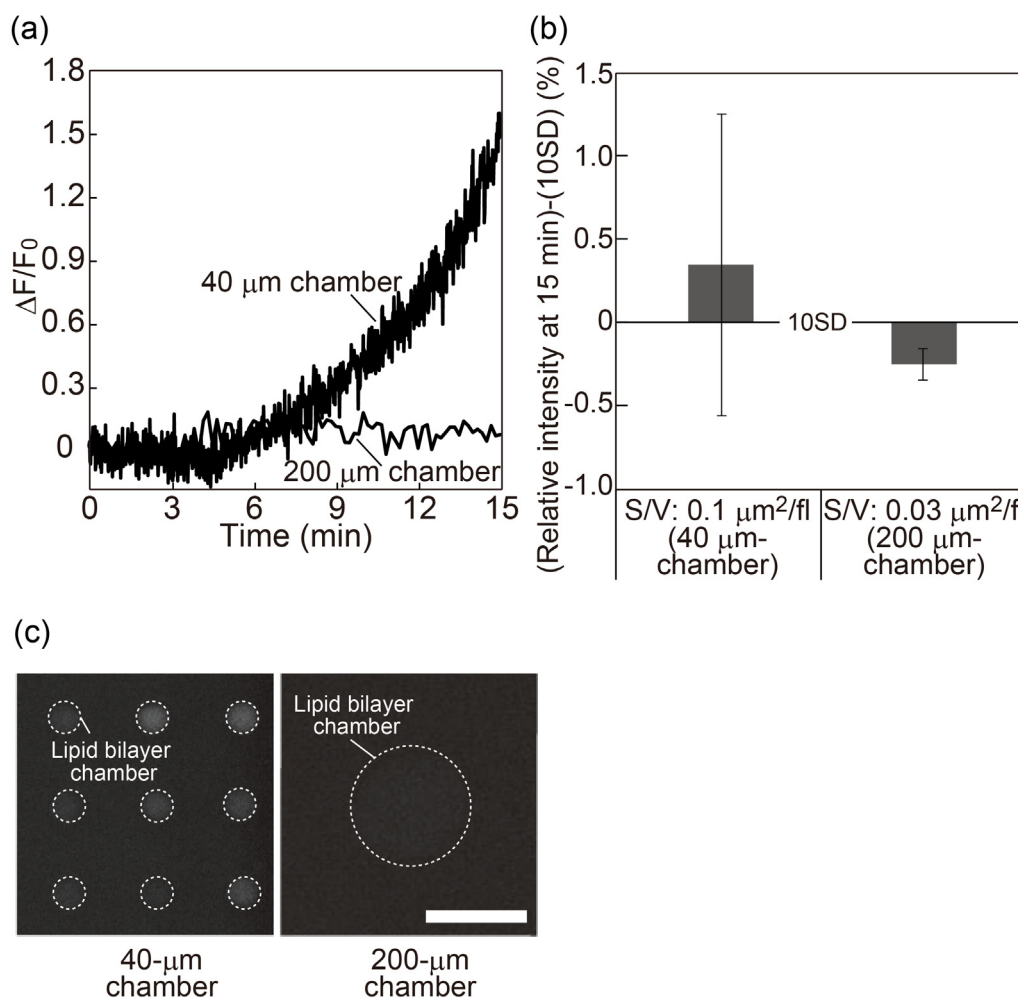


Fig. 4.4 10 nM の α ヘモリシン存在下での異なる膜面積体積比を有する脂質膜チャンバによる膜輸送の計測 (a) 脂質膜チャンバ内の比蛍光強度の経時変化 (b) 15 分後における脂質膜チャンバ内の比蛍光強度の閾値との比較 (c) 15 分後における脂質膜チャンバの蛍光画像

閾値 (Threshold) を各計測の 0-30 秒の比蛍光強度の標準偏差の 10 倍 (10SD) と定義した。各閾値を Fig. 4.3a に示した。この閾値を超えた時間 t_d を 40- μm チャンバと 200- μm チャンバとで比較したグラフを Fig. 4.3b に示す。この結果から、40- μm チャンバの方が 200- μm チャンバよりも早く検出できることが示された。ここで、 S/V の値は 40- μm チャンバの方が 200- μm チャンバに比べて約 3.3 倍大きく (第 3.2 節参照)、 t_d の値は 40- μm チャンバの方が 200- μm チャンバに比べて 0.36 倍になったことから、 t_d は S/V におよそ反比例していることが示され

た。これらの結果は、第 2.2 節のシミュレーション結果と定性的に一致しており、構築した膜輸送の検出モデルが妥当であることを示唆している。

次に、 α ヘモリシンの濃度を 100 nM から 10 nM に減らした条件で同様の実験を行った。40- μ m チャンバと 200- μ m チャンバを用いて行ったそれぞれの実験で得られた脂質膜チャンバ内の比蛍光強度のグラフのうち、典型的なものを Fig. 4. 4a に示した。また、Fig. 4. 4b は 15 分後における 40- μ m チャンバと 200- μ m チャンバの各チャンバの閾値 (10SD) に対する比蛍光強度を表したグラフである。このグラフにおいて正の値は検出できたことを意味し、負の値は検出閾値に到達していないことを意味する。40- μ m チャンバでは、15 分以内に比蛍光強度が閾値を超えて増加するチャンバが観察された (Fig. 4. 4b)。閾値を超えて比蛍光強度が増加したチャンバの割合は 59% であった。また、比蛍光強度の増加は 100 nM の α ヘモリシン存在下の場合よりも緩やかな増加となった (Fig. 4. 4a)。これは、溶液中に存在する α ヘモリシン濃度が減少したことにより脂質膜に導入される α ヘモリシンの数が減少したことを示唆している。一方で、200- μ m チャンバでは、15 分以内に蛍光強度が閾値まで増加するチャンバは見られなかった。Fig. 4. 4c は 15 分後における 40- μ m チャンバと 200- μ m チャンバの蛍光画像である。これらの結果から、40- μ m チャンバの方が 200- μ m チャンバに比べて低濃度の膜タンパク質の輸送も検出可能であることが示された。これはすなわち、大きい S/V を持つ脂質膜チャンバは、高感度に膜タンパク質の輸送を検出可能であることを示している。

4.4 膜輸送の蛍光検出結果の理論モデルを用いた考察

本節の内容は雑誌掲載の予定であるため現時点では公表できない。

4.5 膜輸送の電気計測

4.5.1 概要

本項の内容は雑誌掲載の予定であるため現時点では公表できない。

4.5.2 膜輸送の電気計測結果

本項の内容は雑誌掲載の予定であるため現時点では公表できない。

4.6 膜電位存在下での膜輸送の蛍光計測

4.6.1 概要

本項の内容は雑誌掲載の予定であるため現時点では公表できない。

4.6.2 膜電位を固定した状態での膜輸送計測の方法

本項の内容は雑誌掲載の予定であるため現時点では公表できない。

4.6.3 膜電位を固定した状態での膜輸送計測の結果

本項の内容は雑誌掲載の予定であるため現時点では公表できない。

4.6.4 蛍光計測時における膜電位の変更

本項の内容は雑誌掲載の予定であるため現時点では公表できない。

4.7 結言

本章では、第2章で構築し第3章で評価した銀-塩化銀電極を内部に有する脂質二重膜チャンバを用いて、膜タンパク質の輸送を計測可能であることを検証した。

まず、カルシウムイオン蛍光指示薬を用いて α ヘモリシンの形成する貫通孔を通り脂質膜チャンバ内に拡散するカルシウムイオンを計測した。その結果、 α ヘモリシンの存在下でのみ脂質膜チャンバ内の比蛍光強度が上昇したことから膜タンパク質の膜輸送を蛍光計測できることが示された。また、カリウムイオン蛍光指示薬を用いてカリウムイオンに関しても同様に蛍光計測できることを示し、本脂質膜チャンバを用いた蛍光計測システムの汎用性を裏付けた。

また、膜面積体積比の異なる脂質膜チャンバを用いた膜輸送の蛍光計測により、膜面積体積比が大きいほど、高速・高感度に膜タンパク質の輸送を検出可能であることがわかった。この結果は第2章での膜輸送の蛍光検出のシミュレーション結果と定性的に一致したことから、第2章で構築した理論モデルの妥当性が裏付けられた。

以下の内容は雑誌掲載の予定であるため現時点では公表できない。

[Redacted text block]

[Redacted text] これらの結果から、本システム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応用可能であることが示された。

第5章 結論

5.1 結論

本研究では、電極を内部に有するピコリットルオーダーの微小液滴上に脂質二重膜を形成することにより、膜電位を固定した状態で膜を介した物質輸送の蛍光計測が可能である脂質膜チャンバを実現し、膜タンパク質の輸送機能の計測に応用可能であることを示した。

まず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や体積がどのように膜タンパク質の蛍光計測に影響を与えるかを検討した結果、膜面積体積比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比に反比例して短くなることがわかった。一方で、検出時間付近に膜タンパク質の急激な脂質膜への導入が起きている場合は検出時間が膜面積体積比に反比例して短くはならない領域も存在することがわかった。これは、検出時間の付近で膜タンパク質が急激に脂質膜に導入されるような特殊な状況においては、膜面積体積比を大きくすることは検出時間の短縮にそれほど有効には働かないことを示唆している。

次に、膜電位固定下で蛍光計測が可能である脂質膜チャンバを構築する手法を提案し、その手法により内部に電極を有する脂質膜チャンバを実現した。本研究で提案した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、各親水性部分に銀 - 塩化銀電極が設置された構造を用いることにより、内部に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アレイを形成可能であることが示された。また、微小液滴の上部から脂質分子の分散した有機溶媒を介して別の微小液滴を接触させることにより、微小液滴の上部に脂質二重膜を形成できることがわかった。この微小液滴を微小な空間として捉え

結論

ることにより、電極を内部に有する脂質膜チャンバとして利用できる。本脂質膜チャンバの構築方法は、親水性のマイクロパターンの直径を変更することにより脂質膜チャンバの膜面積体積比を変更することができる。また、基板が透明であるため倒立顕微鏡を用いた観察が可能である。以上の方法を用いて構築された脂質膜チャンバは、電極に電圧を印加することにより、意図する膜電位を脂質膜チャンバの内外に形成できることが示された。

本脂質膜チャンバは、膜タンパク質が輸送する基質に特異的に結合する蛍光指示薬を用いることにより、膜タンパク質の輸送を蛍光計測可能であることが示された。脂質膜チャンバを用いた膜タンパク質の輸送機能の蛍光計測において、チャンバの膜面積体積比が大きくなるに従い、膜タンパク質の物質輸送を早く検出でき、低濃度の膜タンパク質による物質輸送も検出できることが実験的に示された。蛍光検出による計測結果を基に、構築した膜輸送の蛍光計測の理論モデルを利用すれば、脂質膜を介した基質の輸送速度や脂質膜チャンバ内の基質濃度の変化などの脂質膜チャンバ内で起きている現象を推測することができる。さらに、本脂質膜チャンバは、電圧を固定した状態で蛍光計測を行うことができることが、 α ヘモリンを用いた輸送機能計測の実験からわかった。

以上の結果から、本研究で提案する脂質膜チャンバは、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が実証された。

5.2 展望

本研究で得られた成果に対し考察を加えるとともに、展望について述べる。

以下の内容は雑誌掲載の予定であるため現時点では公表できない。

[Redacted content]

結論

[Redacted text block containing the main body of the document, which has been completely obscured by black bars.]

結論

本研究で得られた成果を元に、これらの課題を解決すれば、様々な膜タンパク質の輸送機能の解析に応用可能である。特に、本研究で考案した膜電位固定下での蛍光計測は、従来の計測システムでは代替できないため、電気計測では計測が困難な膜タンパク質の電位依存性を計測することの意義は大きいと考えられる。本研究で提案した膜電位固定下で蛍光計測が可能な脂質膜チャンバは、膜タンパク質の基礎研究をはじめ、創薬やセンサ開発などの分野への応用展開が考えられ、様々な分野へ貢献する可能性を秘めている。

Appendix A PBF1 溶液の特性評価

本論文において、カリウムイオン蛍光指示薬 PBF1 を用いて、カリウムイメージングを行った。本付録では、PBF1 を用いて調製したカリウムイメージング用の溶液の特性について述べる。

A.1 PBF1 溶液の比蛍光強度のカリウム濃度依存性

PBF1 における蛍光強度のカリウムイオン濃度依存性を蛍光光度計を用いて測定した結果を Fig. A. 1 に示す。測定に使用した溶液の組成は Table A. 1 の通りである。この結果から、100 μM の PBF1 溶液は、およそ 1 mM から 10 mM の範囲を検出可能であることがわかる。Fig. A. 1 のグラフは、UV 励起 (365 nm 付近) し、450 nm での蛍光強度のデータを取得することにより作成した。

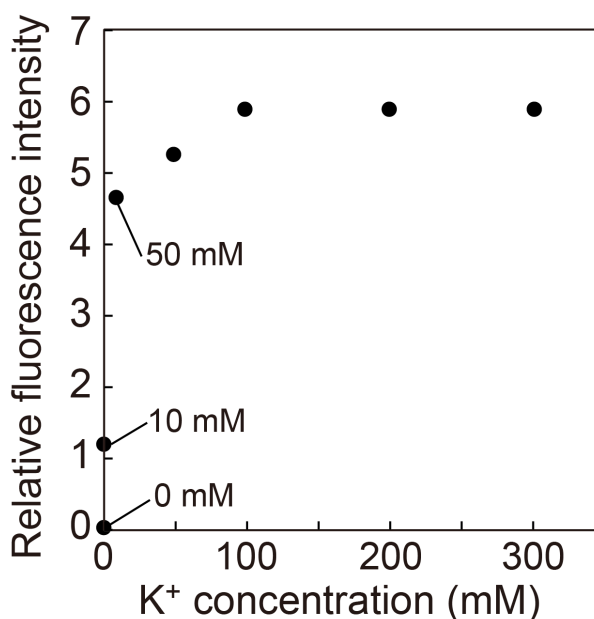


Fig. A. 1 PBF1 溶液の比蛍光強度のカリウムイオン濃度依存性

Table A. 1 PBF1 溶液の組成

PBF1	100 μM
HEPES	5 mM

A.2 PBFI 溶液の蛍光強度のスクロース依存性

本論文においてカリウムイメージングを行う際には、脂質膜チャンバの内外の浸透圧を等しくするためにスクロースをチャンバ内の溶液に混合した。チャンバ内で PBFI とスクロースが混合されるため、PBFI 溶液の蛍光強度がスクロースの濃度に依存しないことが必要である。そこで、PBFI 溶液の蛍光強度のスクロース濃度依存性を調べた。測定結果を Fig. A. 2 に示す。

スクロース (-) 溶液には第 A.1 節で調製した溶液を用い、200 mM スクロース溶液には、スクロース (-) 溶液に 200 mM のスクロースを混合したものをを用いた。この結果から、スクロースは PBFI 溶液の蛍光強度に影響を及ぼさないことが確認された。

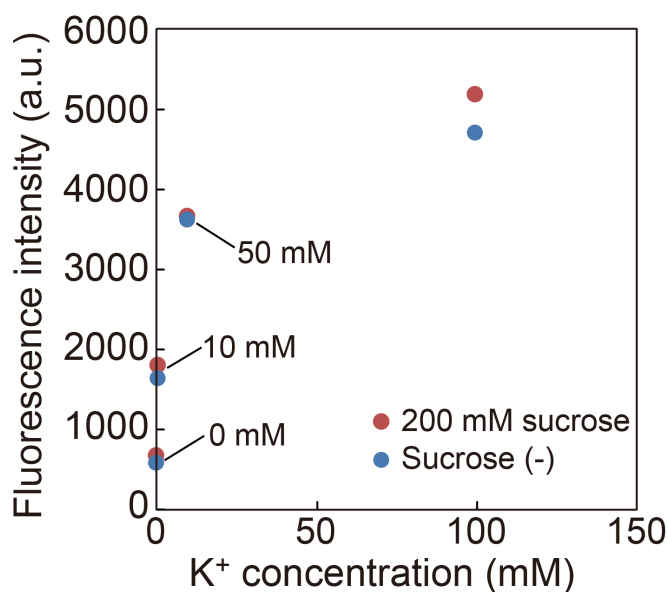


Fig. A. 2 PBFI 溶液の蛍光強度のスクロース依存性

Appendix B 親水・疎水パターン基板の作製プロセス

以下の内容は特許申請の予定であるため現時点では公表できない。

Appendix C 装置・薬品・材料

本研究で使用した装置・薬品・材料を Table C. 1、Table C. 2、Table C. 3 にまとめる。

Table C. 1 使用した装置

装置	メーカー	型番
デバイス作製関連		
マスクレス露光装置	Nanosystem solutions	DLS-50
スピコート	Mikasa	MS-A100
マスクアライナ	ユニオン光学	PEM-6M
プラズマエッチング装置	Samco	FA-1
真空蒸着装置	Sanyu Electron	SVC-700TM
接触型段差計	Veeco	Dektak 6M
形状測定レーザー顕微鏡	Keyence	VK-X200
測定顕微鏡	Mitsutoyo	MF-UD1010C
デジタルマイクロスコープ	Keyence	VHX100
定電流電源	Keithley	2400 Source Meter
蛍光・電気計測関連		
蛍光顕微鏡	Olympus	IX71
EM-CCD カメラ	浜松ホトニクス	C9100
CCD カメラ	浜松ホトニクス	C10600-10B-H
パッチクランプアンプ	Molecular Devices	Axopatch200B
AD コンバータ	AD Instruments	ML870 PowerLab8/30
共焦点顕微鏡	Carl Zeiss	LSM780
ピコピペット	アルテア技研	PicoPipet D1
電動マニピュレータ	Eppendorf	InjectMan NI2
手動3軸マニピュレータ	Narishige	MHW-3
蛍光光度計	Thermo Fisher Scientific	Nanodrop3300

Table C.2 使用した薬品

薬品	メーカー
Fluo-4	Invitrogen
カルセイン	シグマアルドリッチ
DiI	Invitrogen
塩化カルシウム	和光純薬工業
塩化カリウム	和光純薬工業
HEPES	同仁化学研究所
エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩 (EDTA 2Na)	和光純薬工業
水酸化ナトリウム	和光純薬工業
スクロース	ナカライテスク
ヘキサデカン	関東化学
アゾレクチン	シグマアルドリッチ
DPhPC	Avanti Polar Lipids
ドータイト	藤倉化成
α ヘモリシン	シグマアルドリッチ
PBFI	Invitrogen
Cytop (CTL-809M)	旭硝子
硝酸銀 (粉末)	和光純薬工業
アンモニア水	関東化学
エタノール	関東化学
2-プロパノール (IPA)	関東化学
S1818	Shipley
ZPN1150	日本ゼオン
NMD-3	東京応化工業
HY 液	和光純薬工業
硫酸	関東化学

Table C.2 使用した薬品

混酸アルミ液	和光純薬工業
過酸化水素水	関東化学
アセトン	関東化学
超純水 (Milli-Q)	Millipore

Table C.3 使用した材料

材料	メーカー	備考
金線	ニラコ	直径 1.0 mm
銀線	ニラコ	直径 0.3 mm
アルミ線	ニラコ	直径 1.0 mm
タングステン線	ニラコ	直径 0.5 mm
クロム粉末	Newmet	
導電性銅箔粘着テープ	寺岡製作所	0.02 Ω/cm^2
ガラス基板	松浪	No. 1 (150-200 μm)
ガラス管	Narishige	外径 1.0 mm 長さ 90 mm

Appendix D 拡散方程式の解法

本論文では 2.2.7 項に示した通り、ある時刻 t での脂質膜からの距離 x での基質濃度 $c(x, t)$ を求めた。式 (A.1) から式 (A.4) で表される偏微分方程式を以下の手順で解くことにより、基質濃度 $c(x, t)$ を求めた。

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (\text{A.1})$$

$$c(0, t) = C_M \quad (\text{A.2})$$

$$c_x(L, t) = 0 \quad (\text{A.3})$$

$$c(x, 0) = 0 \quad (\text{A.4})$$

ここで、式 (A.2) および式 (A.3) は境界条件、式 (A.4) は初期条件である。 $w = C_M - c$ とおくと、上記偏微分方程式は以下のように変換される。

$$\frac{\partial w}{\partial t} = D \frac{\partial^2 w}{\partial x^2} \quad (\text{A.5})$$

$$w(0, t) = 0 \quad (\text{A.6})$$

$$w_x(L, t) = 0 \quad (\text{A.7})$$

$$w(x, 0) = C_M \quad (\text{A.8})$$

ここで、式 (A.6) および式 (A.7) は境界条件、式 (A.8) は初期条件である。 $w(x, t) = X(x)T(t)$ とおき、これを式 (A.5) に代入すると、

$$X \frac{\partial T}{\partial t} = D \frac{\partial^2 X}{\partial x^2} T \quad (\text{A.9})$$

となる。さらに、変数分離することにより、

$$\frac{1}{DT} \frac{\partial T}{\partial t} = \frac{\partial^2 X}{\partial x^2} \quad (\text{A.10})$$

を得る。ここで、式 (A.10) の右辺および左辺を μ とおく。式 (A.10) を変形することにより、以下の 2 つの式を得た。

$$\frac{\partial T}{\partial t} = \mu DT \quad (\text{A.11})$$

$$\frac{\partial^2 X}{\partial x^2} = \mu X \quad (\text{A.12})$$

式 (A.12) において、解として $X = e^{ax}$ を代入すると、

$$a^2 e^{ax} = \mu e^{ax} \Leftrightarrow e^{ax}(a^2 - \mu) = 0 \quad (\text{A.13})$$

ここで、 $e^{ax} \neq 0$ なので、 $a^2 = \mu$ となる。よって、 $\mu > 0$ のとき $a = \pm\sqrt{\mu}$ 、 $\mu = 0$ のとき $a = 0$ 、 $\mu < 0$ のとき $a = \pm i\sqrt{|\mu|}$ となる。

すなわち、 $\mu > 0$ のとき、特解は $e^{\sqrt{\mu}x}$ および $e^{-\sqrt{\mu}x}$ 、一般解は $X = Ae^{\sqrt{\mu}x} + Be^{-\sqrt{\mu}x}$ (ここで A および B は定数) となる。この場合、境界条件である式 (A.6) から $X(0) = 0 \Leftrightarrow A = B = 0$ となり、 $X(x) = 0$ となってしまうため、この解は不適である。

$\mu = 0$ のとき、特解は 1、一般解は A となる。この場合、境界条件である式 (A.6) から $X(x) = 0$ となってしまうため、この解は不適である。

$\mu < 0$ のとき、特解は $e^{i\sqrt{|\mu|x}}$ および $e^{-i\sqrt{|\mu|x}}$ 、一般解は $X(x) = Ae^{i\sqrt{|\mu|x}} + Be^{-i\sqrt{|\mu|x}}$ となる。オイラーの公式より、

$$X(x) = (A + B)\cos(\sqrt{|\mu|x}) + (A - B)\sin(\sqrt{|\mu|x}) \quad (\text{A.14})$$

ここで、 $A + B = C$ および $(A - B)i = D$ とおくと、式 (A.14) は以下のように変形できる。

$$X(x) = C\cos(\sqrt{|\mu|x}) + D\sin(\sqrt{|\mu|x}) \quad (\text{A.15})$$

境界条件である式 (A.6) および式 (A.8) から $X(x) = 0$ と $X(L) = 0$ を式 (A.15) に代入し、 $D \neq 0$ および $|\mu| \neq 0$ の条件を用いることにより、以下の式を得る。

$$\cos(\sqrt{|\mu|}L) = 0 \quad (\text{A.16})$$

よって、

$$\sqrt{|\mu|}L = \pm \frac{(2n+1)\pi}{2} \quad (n = 0, 1, 2, \dots) \quad (\text{A.17})$$

ゆえに、

$$\mu = -(\sqrt{|\mu|})^2 = \frac{(2n+1)^2\pi^2}{4L^2} \quad (n = 0, 1, 2, \dots) \quad (\text{A.18})$$

式 (A.11) において、解として $T = e^{bt}$ を代入すると、

$$be^{bx} = \mu De^{bx} \Leftrightarrow e^{bx}(b - \mu D) = 0 \quad (\text{A.19})$$

ここで、 $e^{bx} \neq 0$ なので、 $b = \mu D$ となる。これと式 (A.18) より、

$$b = \frac{-(2n+1)^2\pi^2}{4L^2}D \quad (n = 0, 1, 2, \dots) \quad (\text{A.20})$$

よって、 $T(t)$ の一般解は、

$$T(t) = E \exp\left(-\frac{(2n+1)^2\pi^2 D}{4L^2}t\right) \quad (n = 0, 1, 2, \dots) \quad (\text{A.21})$$

ここで E は定数である。 $w(x, t) = X(x)T(t)$ より、 $w(x, t)$ の一般解は、

$$w(x, t) = X(x)T(t) = F \sin\left(\frac{(2n+1)\pi x}{2L}\right) \exp\left(-\frac{(2n+1)^2\pi^2 D}{4L^2}t\right) \quad (n = 0, 1, 2, \dots) \quad (\text{A.22})$$

$w(x, t)$ は様々な n に対して異なる解があるが、重ね合わせの原理から、それらの線形結合も解である。よって、 $w(x, t)$ は以下のように表すことができる。

$$w(x, t) = \sum_0^{\infty} F_n \sin\left(\frac{(2n+1)\pi x}{2L}\right) \exp\left(-\frac{(2n+1)^2\pi^2 D}{4L^2}t\right) \quad (\text{A.23})$$

初期条件である式 (A.8) より、

$$w(x, 0) = \sum_0^{\infty} F_n \sin\left(\frac{(2n+1)\pi x}{2L}\right) = C_M \quad (\text{A.24})$$

これは、フーリエ正弦級数の形をしている。初期条件を満たすためには、 $w(x, 0)$ は C_M の半区間でのフーリエ正弦級数でなければならないので、フーリエ級数の公式より、

$$F_n = \frac{2}{L} \int_0^L C_M \sin\left(\frac{(2n+1)\pi x}{2L}\right) dx = \frac{4C_M}{(2n+1)\pi} \quad (\text{A.25})$$

と求めることができる。よって、 $w(x, t)$ は式 (A.23) に式 (A.25) を代入することにより

$$w(x, t) = \frac{4C_M}{\pi} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{2n+1} \sin\left(\frac{(2n+1)\pi x}{2L}\right) \exp\left(\frac{-(2n+1)^2 \pi^2 D t}{4L^2}\right) \quad (\text{A.26})$$

となる。ここで、 $c = C_M - w$ であるので、 $c(x, t)$ は

$$c(x, t) = C_M \left(1 - \frac{4}{\pi} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{2n+1} \sin\left(\frac{(2n+1)\pi x}{2L}\right) \exp\left(\frac{-(2n+1)^2 \pi^2 D t}{4L^2}\right) \right) \quad (\text{A.27})$$

となる。

参考文献

- [1] C. Miller, "Biophysics - Lonely voltage sensor seeks protons for permeation," *Science*, 2006, vol. 312, pp. 534-535.
- [2] A. Rinne, A. Birk, M. Buenemann, "Voltage regulates adrenergic receptor function," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, vol. 110, pp. 1536-1541.
- [3] J. P. Overington, B. Al-Lazikani, A. L. Hopkins, "Opinion - How many drug targets are there?," *Nature Reviews Drug Discovery*, 2006, vol. 5, pp. 993-996.
- [4] J. Drews, "Drug discovery: A historical perspective," *Science*, 2000, vol. 287, pp. 1960-1964.
- [5] C. Farre, N. Fertig, "HTS techniques for patch clamp-based ion channel screening - advances and economy," *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2012, vol. 7, pp. 515-524.
- [6] M. Zagnoni, "Miniaturised technologies for the development of artificial lipid bilayer systems," *Lab on a Chip*, 2012, vol. 12, pp. 1026-1039.
- [7] S. H. Kim, S. Iwai, S. Araki, S. Sakakihara, R. Iino, H. Noji, "Large-scale femtoliter droplet array for digital counting of single biomolecules," *Lab on a Chip*, 2012, vol. 12, pp. 4986-4991.
- [8] S. Sakakihara, S. Araki, R. Iino, H. Noji, "A single-molecule enzymatic assay in a directly accessible femtoliter droplet array," *Lab on a Chip*, 2010, vol. 10, pp. 3355-3362.
- [9] K. Sumitomo, A. McAllister, Y. Tamba, Y. Kashimura, A. Tanaka, Y. Shinozaki, K. Torimitsu, "Ca²⁺ ion transport through channels formed by alpha-hemolysin analyzed using a microwell array on a Si substrate," *Biosensors & Bioelectronics*, 2012, vol. 31, pp. 445-450.
- [10] T. Thapliyal, J. L. Poulos, J. J. Schmidt, "Automated lipid bilayer and ion channel measurement platform," *Biosensors & Bioelectronics*, 2011, vol. 26, pp. 2651-2654.
- [11] R. Kawano, T. Osaki, H. Sasaki, S. Takeuchi, "A Polymer-Based Nanopore-Integrated Microfluidic Device for Generating Stable Bilayer Lipid Membranes," *Small*, 2010, vol. 6, pp. 2100-2104.
- [12] V. C. Stimberg, J. G. Bomer, I. van Uitert, A. van den Berg, S. Le Gac, "High Yield, Reproducible and Quasi-Automated Bilayer Formation in a Microfluidic Format," *Small*, 2013, vol. 9, pp. 1076-1085.

- [13] T. Osaki, H. Suzuki, B. Le Pioufle, S. Takeuchi, "Multichannel Simultaneous Measurements of Single-Molecule Translocation in alpha-Hemolysin Nanopore Array," *Analytical Chemistry*, 2009, vol. 81, pp. 9866-9870.
- [14] R. Peters, "Optical single transporter recording: Transport kinetics in microarrays of membrane patches," *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 2003, vol. 32, pp. 47-67.
- [15] R. Peters, E. Coutavas, J. P. Siebrasse, "Nuclear transport kinetics in microarrays of nuclear envelope patches," *Journal of Structural Biology*, 2002, vol. 140, pp. 268-278.
- [16] D. Basting, M. Lorch, I. Lehner, C. Glaubitz, "Transport cycle intermediate in small multidrug resistance protein is revealed by substrate fluorescence," *Faseb Journal*, 2008, vol. 22, pp. 365-373.
- [17] Y. F. Zhao, M. Quick, L. Shi, E. L. Mehler, H. Weinstein, J. A. Javitch, "Substrate-dependent proton antiport in neurotransmitter:sodium symporters," *Nature Chemical Biology*, 2010, vol. 6, pp. 109-116.
- [18] P. H. Lu, R. H. Liu, F. J. Sharom, "Drug transport by reconstituted P-glycoprotein in proteoliposomes - Effect of substrates and modulators, and dependence on bilayer phase state," *European Journal of Biochemistry*, 2001, vol. 268, pp. 1687-1697.
- [19] K. Kamiya, K. Tsumoto, S. Arakawa, S. Shimizu, I. Morita, T. Yoshimura, K. Akiyoshi, "Preparation of Connexin43-Integrated Giant Liposomes by a Baculovirus Expression Liposome Fusion Method," *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, vol. 107, pp. 836-843.
- [20] G. Ohlsson, S. R. Tabaei, J. Beech, J. Kvassman, U. Johanson, P. Kjellbom, J. O. Tegenfeldt, F. Hook, "Solute transport on the sub 100 ms scale across the lipid bilayer membrane of individual proteoliposomes," *Lab on a Chip*, 2012, vol. 12, pp. 4635-4643.
- [21] V. Jogini, B. Roux, "Dynamics of the Kv1.2 voltage-gated K(+) channel in a membrane environment," *Biophysical Journal*, 2007, vol. 93, pp. 3070-3082.
- [22] T. Kalstrup, R. Blunck, "Dynamics of internal pore opening in K-V channels probed by a fluorescent unnatural amino acid," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, vol. 110, pp. 8272-8277.
- [23] A. Butler, S. Tsunoda, D. P. McCobb, A. Wei, L. Salkoff, "mSlo, a complex mouse gene encoding "maxi" calcium-activated potassium channels," *Science*, 1993, vol. 261, pp. 221-224.

- [24] S. Ota, S. Yoshizawa, S. Takeuchi, "Microfluidic Formation of Monodisperse, Cell-Sized, and Unilamellar Vesicles," *Angewandte Chemie-International Edition*, 2009, vol. 48, pp. 6533-6537.
- [25] H. Sasaki, R. Kawano, T. Osaki, K. Kamiya, S. Takeuchi, "Single-vesicle estimation of ATP-binding cassette transporters in microfluidic channels," *Lab on a Chip*, 2012, vol. 12, pp. 702-704.
- [26] T. Robinson, P. Kuhn, K. Eyer, P. S. Dittrich, "Microfluidic trapping of giant unilamellar vesicles to study transport through a membrane pore," *Biomicrofluidics*, 2013, vol. 7.
- [27] G. Baaken, N. Ankri, A. K. Schuler, J. Ruhe, J. C. Behrends, "Nanopore-Based Single-Molecule Mass Spectrometry on a Lipid Membrane Microarray," *Acs Nano*, 2011, vol. 5, pp. 8080-8088.
- [28] A. Kleefen, D. Pedone, C. Grunwald, R. Wei, M. Firmkes, G. Abstreiter, U. Rant, R. Tampe, "Multiplexed Parallel Single Transport Recordings on Nanopore Arrays," *Nano Letters*, 2010, vol. 10, pp. 5080-5087.
- [29] S. Ota, H. Suzuki, S. Takeuchi, "Microfluidic lipid membrane formation on microchamber arrays," *Lab on a Chip*, 2011, vol. 11, pp. 2485-2487.
- [30] P. V. Ganesan, S. G. Boxer, "A membrane interferometer," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, vol. 106, pp. 5627-5632.
- [31] T. Osaki, Y. Watanabe, R. Kawano, H. Sasaki, S. Takeuchi, "Electrical Access to Lipid Bilayer Membrane Microchambers for Transmembrane Analysis," *Journal of Microelectromechanical Systems*, 2011, vol. 20, pp. 797-799.
- [32] H. Bayley, B. Cronin, A. Heron, M. A. Holden, W. L. Hwang, R. Syeda, J. Thompson, M. Wallace, "Droplet interface bilayers," *Molecular Biosystems*, 2008, vol. 4, pp. 1191-1208.
- [33] Y. L. Cheng, R. J. Bushby, S. D. Evans, P. F. Knowles, R. E. Miles, S. D. Ogier, "Single ion channel sensitivity in suspended bilayers on micromachined supports," *Langmuir*, 2001, vol. 17, pp. 1240-1242.
- [34] L. Becucci, M. Innocenti, E. Salviotti, A. Rindi, I. Pasquini, M. Vassalli, M. L. Foresti, R. Guidelli, "Potassium ion transport by gramicidin and valinomycin across a Ag(111)-supported tethered bilayer lipid membrane," *Electrochimica Acta*, 2008, vol. 53, pp. 6372-6379.
- [35] 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, "Constructing droplet interface bilayers from the contact of aqueous droplets in oil," *Nature Protocols*, 2013, vol. 8, pp. 1048-1057.

参考文献

- [36] O. K. Castell, J. Berridge, M. I. Wallace, "Quantification of Membrane Protein Inhibition by Optical Ion Flux in a Droplet Interface Bilayer Array," *Angewandte Chemie-International Edition*, 2012, vol. 51, pp. 3134-3138.
- [37] R. Kawano, Y. Tsuji, K. Sato, T. Osaki, K. Kamiya, M. Hirano, T. Ide, N. Miki, S. Takeuchi, "Automated Parallel Recordings of Topologically Identified Single Ion Channels," *Scientific Reports*, 2013, vol. 3, 1995
- [38] J. R. Thompson, A. J. Heron, Y. Santoso, M. I. Wallace, "Enhanced stability and fluidity in droplet on hydrogel bilayers for measuring membrane protein diffusion," *Nano Letters*, 2007, vol. 7, pp. 3875-3878.
- [39] S. Leptihn, J. R. Thompson, J. C. Ellory, S. J. Tucker, M. I. Wallace, "In Vitro Reconstitution of Eukaryotic Ion Channels Using Droplet Interface Bilayers," *Journal of the American Chemical Society*, 2011, vol. 133, pp. 9370-9375.
- [40] K. Funakoshi, H. Suzuki, S. Takeuchi, "Lipid bilayer formation by contacting monolayers in a microfluidic device for membrane protein analysis," *Analytical Chemistry*, 2006, vol. 78, pp. 8169-8174.
- [41] T. Uchihashi, R. Iino, T. Ando, H. Noji, "High-Speed Atomic Force Microscopy Reveals Rotary Catalysis of Rotorless F-1-ATPase," *Science*, 2011, vol. 333, pp. 755-758.
- [42] J. B. Boreyko, P. Mruetusatom, S. A. Sarles, S. T. Retterer, C. P. Collier, "Evaporation-Induced Buckling and Fission of Microscale Droplet Interface Bilayers," *Journal of the American Chemical Society*, 2013, vol. 135, pp. 5545-5548.
- [43] T. Ide, Y. Takeuchi, T. Yanagida, "Development of an experimental apparatus for simultaneous observation of optical and electrical signals from single ion channels," *Single Molecules*, 2002, vol. 3, pp. 33-42.
- [44] T. Ide, Y. Takeuchi, H. Noji, K. V. Tabata, "Simultaneous Optical and Electrical Single Channel Recordings on a PEG Glass," *Langmuir*, 2010, vol. 26, pp. 8540-8543.
- [45] A. J. Heron, J. R. Thompson, B. Cronin, H. Bayley, M. I. Wallace, "Simultaneous Measurement of Ionic Current and Fluorescence from Single Protein Pores," *Journal of the American Chemical Society*, 2009, vol. 131, pp. 1652-+.
- [46] P. Bartsch, C. Walter, P. Selenschik, A. Honigmann, R. Wagner, "Horizontal Bilayer for Electrical and Optical Recordings," *Materials*, 2012, vol. 5, pp. 2705-2730.

- [47] C. Shao, E. L. Kendall, D. L. DeVoe, "Electro-optical BLM chips enabling dynamic imaging of ordered lipid domains," *Lab on a Chip*, 2012, vol. 12, pp. 3142-3149.
- [48] E. L. Kendall, C. R. Shao, D. L. DeVoe, "Visualizing the Growth and Dynamics of Liquid-Ordered Domains During Lipid Bilayer Folding in a Microfluidic Chip," *Small*, 2012, vol. 8, pp. 3613-3619.
- [49] A. Pantazis, V. Gudzenko, N. Savalli, D. Sigg, R. Olcese, "Operation of the voltage sensor of a human voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channel," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, vol. 107, pp. 4459-4464.
- [50] R. E. Dempster, T. Friedrich, E. Bamberg, "Voltage clamp fluorometry: Combining fluorescence and electrophysiological methods to examine the structure-function of the Na⁺/K⁺-ATPase," *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 2009, vol. 1787, pp. 714-720.
- [51] L. V. Virkki, H. Murer, I. C. Forster, "Mapping conformational changes of a type IIb Na⁺/P_i cotransporter by voltage clamp fluorometry," *Journal of Biological Chemistry*, 2006, vol. 281, pp. 28837-28849.
- [52] J. Kusch, S. Thon, E. Schulz, C. Biskup, V. Nache, T. Zimmer, R. Seifert, F. Schwede, K. Bendorf, "How subunits cooperate in cAMP-induced activation of homotetrameric HCN2 channels," *Nature Chemical Biology*, 2012, vol. 8, pp. 162-169.
- [53] P. Miranda, J. E. Contreras, A. J. R. Plested, F. J. Sigworth, M. Holmgren, T. Giraldez, "State-dependent FRET reports calcium- and voltage-dependent gating-ring motions in BK channels," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, vol. 110, pp. 5217-5222.
- [54] J. P. Bai, Y. L. Shi, "A patch-clamp study on human sperm Cl⁻ channel reassembled into giant liposome," *Asian Journal of Andrology*, 2001, vol. 3, pp. 185-191.
- [55] E. Gallucci, S. Micelli, G. Monticelli, "Pore formation in lipid bilayer membranes made of phosphatidylinositol and oxidized cholesterol followed by means of alternating current," *Biophysical Journal*, 1996, vol. 71, pp. 824-831.
- [56] V. Beck, M. Jaburek, E. P. Breen, R. K. Porter, P. Jezek, E. E. Pohl, "A new automated technique for the reconstitution of hydrophobic proteins into planar bilayer membranes. Studies of human recombinant uncoupling protein 1," *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 2006, vol. 1757, pp. 474-479.

- [57] S. May, M. Andreasson-Ochsner, Z. K. Fu, Y. X. Low, D. Tan, H. P. M. de Hoog, S. Ritz, M. Nalini, E. K. Sinner, "In Vitro Expressed GPCR Inserted in Polymersome Membranes for Ligand-Binding Studies," *Angewandte Chemie-International Edition*, 2013, vol. 52, pp. 749-753.
- [58] G. Baaken, M. Sondermann, C. Schlemmer, J. Ruhe, J. C. Behrends, "Planar microelectrode-cavity array for high-resolution and parallel electrical recording of membrane ionic currents," *Lab on a Chip*, 2008, vol. 8, pp. 938-944.
- [59] Y. Temiz, A. Ferretti, Y. Leblebici, C. Guiducci, "A comparative study on fabrication techniques for on-chip microelectrodes," *Lab on a Chip*, 2012, vol. 12, pp. 4920-4928.
- [60] A. M. El-Arabi, C. S. Salazar, J. J. Schmidt, "Ion channel drug potency assay with an artificial bilayer chip," *Lab on a Chip*, 2012, vol. 12, pp. 2409-2413.
- [61] H. Suzuki, K. V. Tabata, H. Noji, S. Takeuchi, "Electrophysiological recordings of single ion channels in planar lipid bilayers using a polymethyl methacrylate microfluidic chip," *Biosensors & Bioelectronics*, 2007, vol. 22, pp. 1111-1115.
- [62] L. C. M. Gross, O. K. Castell, M. I. Wallace, "Dynamic and Reversible Control of 2D Membrane Protein Concentration in a Droplet Interface Bilayer," *Nano Letters*, 2011, vol. 11, pp. 3324-3328.
- [63] K. Matsuzaki, K. Sugishita, N. Ishibe, M. Ueha, S. Nakata, K. Miyajima, R. M. Epand, "Relationship of membrane curvature to the formation of pores by magainin 2," *Biochemistry*, 1998, vol. 37, pp. 11856-11863.
- [64] L. Z. Song, M. R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley, J. E. Gouaux, "Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore," *Science*, 1996, vol. 274, pp. 1859-1866.
- [65] E. N. Ervin, R. J. White, H. S. White, "Sensitivity and Signal Complexity as a Function of the Number of Ion Channels in a Stochastic Sensor," *Analytical Chemistry*, 2009, vol. 81, pp. 533-537.
- [66] E. N. Ervin, R. J. White, T. G. Owens, J. M. Tang, H. S. White, "AC conductance of transmembrane protein channels. The number of ionized residue mobile counterions at infinite dilution," *Journal of Physical Chemistry B*, 2007, vol. 111, pp. 9165-9171.
- [67] H. Bayley, P. S. Cremer, "Stochastic sensors inspired by biology," *Nature*, 2001, vol. 413, pp. 226-230.

参考文献

- [68] D. W. Deamer, M. Akeson, "Nanopores and nucleic acids: prospects for ultrarapid sequencing," *Trends in Biotechnology*, 2000, vol. 18, pp. 147-151.
- [69] A. Aksimentiev, K. Schulten, "Imaging alpha-hemolysin with molecular dynamics: Ionic conductance, osmotic permeability, and the electrostatic potential map," *Biophysical Journal*, 2005, vol. 88, pp. 3745-3761.
- [70] S. Bhattacharya, J. Muzard, L. Payet, J. Mathe, U. Bockelmann, A. Aksimentiev, V. Viasnoff, "Rectification of the Current in alpha-Hemolysin Pore Depends on the Cation Type: The Alkali Series Probed by Molecular Dynamics Simulations and Experiments," *Journal of Physical Chemistry C*, 2011, vol. 115, pp. 4255-4264.
- [71] O. V. Krasilnikov, P. G. Merzlyak, L. N. Yuldasheva, C. G. Rodrigues, S. Bhakdi, A. Valeva, "Electrophysiological evidence for heptameric stoichiometry of ion channels formed by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin in planar lipid bilayers," *Molecular Microbiology*, 2000, vol. 37, pp. 1372-1378.
- [72] S. Y. Noskov, W. Im, B. Roux, "Ion permeation through the alpha-hemolysin channel: Theoretical studies based on Brownian dynamics and Poisson-Nernst-Planck electrodiffusion theory," *Biophysical Journal*, 2004, vol. 87, pp. 2299-2309.
- [73] K. Akashi, H. Miyata, H. Itoh, K. Kinoshita, "Preparation of giant liposomes in physiological conditions and their characterization under an optical microscope," *Biophysical Journal*, 1996, vol. 71, pp. 3242-3250.
- [74] K. Venema, R. Gibrat, J. P. Grouzis, C. Grignon, "Quantitative measurement of cationic fluxes, selectivity and membrane-potential using liposomes multilabelled with fluorescent-probes," *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1993, vol. 1146, pp. 87-96.

謝辞

謝辞

以下の内容は個人情報保護の観点から公表しない。