

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「二次元機能性原子・分子薄膜の創製と
利用に資する基盤技術の創出」
研究課題「超絶縁性脂質二分子膜に基づくイオン・
電子ナノチャネルの創成」

研究終了報告書

研究期間 2014年10月～2021年3月

研究代表者：平野 愛弓
(東北大学材料科学高等研究所 教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

本研究では、平野グループが提案してきた安定化脂質二分子膜に基づき、その内部に、膜に垂直な方向や平行な方向に電圧を印加できる膜システムを構築し、さらにその膜中に様々なチャンネル形成物質を包埋することによりナノチャンネルを創成し、これらナノチャンネルに基づく種々の化学・物理センサの構築を目指した。チャンネル形成材料としてはイオンチャンネルタンパク質や、金属および半導体ナノ粒子等を対象とし、イオンチャンネルに対する薬物副作用センサや、ナノ粒子に基づく新原理センサの構築について検討した。

はじめに、本研究で創成するデバイスの基本構造となる微細孔含有シリコンチップについて、平野グループが中心となってプロセスの高効率化を行い、さらに、孔縁部形状と膜安定性の関係について明らかにした (Sci. Rep., 2017)。また、脂質二分子膜系のボトルネックであるイオンチャンネルの包埋過程 (チャンネル含有プロテオリポソームと脂質二分子膜の膜融合) について検討し、膜融合時に遠心力を負荷して膜近傍にプロテオリポソームを濃縮することにより、従来の 10 倍以上の高確率でイオンチャンネルを包埋することに成功した (Biophys. J., 2016)。一方、手老グループは、基板支持二分子膜モデル系を用いて、膜融合過程のその場蛍光観察法を開発した。この手法と原子間力顕微鏡 (AFM) 観察に基づいて脂質二分子膜中の膜融合サイトを同定し、膜融合モデルを提案するとともに (Sci. Rep., 2017)、種々の膜融合促進因子を明らかにした (JJAP, 2019; Biochim. Biophys. Acta, 2021)。チャンネル物質の合成を担当した戸澤グループでは、試験管内でタンパク質を合成する無細胞発現系を用いて、薬物副作用の問題から注目される膜タンパク質の hERG チャンネルを合成した。この無細胞合成 hERG チャンネルを対象に、平野グループでは、上述の膜融合促進法および手老グループからの知見を活用して脂質二分子膜中に包埋し、正常型 hERG のチャンネル電流と副作用薬物による阻害作用を記録した (Sci. Rep., 2017)。さらに、薬物濃度とチャンネル開時間の関係を評価することにより、薬物副作用の定量化に成功した (Chem. Record, 2020)。このアプローチを種々の hERG チャンネル遺伝子型へ展開することにより「hERG 遺伝子型 vs. 薬物副作用のリスク」をデータベース化できれば、個別化医療における力強いツールとなりうる。このスキームと hERG チャンネルセンサの貢献についてまとめ、個別化医療実現のための新概念として提唱した (Chem. Record, 2020)。

ナノ粒子に基づくセンサの構築に関しては、脂質二分子膜へのナノ粒子の包埋から着手した。始めに、木村グループが、基板支持脂質二分子膜モデル系を用いてナノ粒子の包埋について検討し、金ナノ粒子の表面疎水化により、リポソーム膜中や基板支持脂質二分子膜への金ナノ粒子の包埋に成功した (J. Phys. Chem. B., 2017)。しかし、同様のアプローチで水|膜|水型の脂質二分子膜中に金ナノ粒子を包埋することは非常に困難であった。そこで、脂質二分子膜への溶解性が比較的高いことが報告されている C₆₁ 酪酸メチルエステル (PCBM) を対象に、廣瀬グループと平野グループが共同で脂質二分子膜へのドーピングを試み、膜透過電流 (膜に垂直な方向の電流) が可視光照射の ON・OFF により可逆的に変調されることを見出した (J. Electroanal. Chem., 2019)。さらに、平野グループでは、膜内平行電圧を印加するための電極をパタニングしたチップを作製し、この電極チップ中での PCBM ドーピング膜の形成を試みた結果、PCBM 由来の光応答電流の大きさが膜平行電圧の印加により増幅されることを見出した (ACS Omega, 2019)。さらに、膜平行電圧の効果は、ナノ粒子のみならず、イオンチャンネルに対しても観測されることを見出し (Chem. Lett., 2021)、「膜平行電圧」を脂質二分子膜系における新しい制御因子として提案した。膜平行電圧の印加による効果とそのメカニズムについては、さらに詳細な検討を行っており、現在論文執筆の最終段階にある。その他、膜内チャンネル形成物質の作製法から派生した、廣瀬グループの室温原子層堆積 (ALD) によるナノ粒子の表面コーティング技術 (J. Vac. Sci. Technol. A, 2017) は、ALD の新展開として注目を集め、CREST と並行して受託した JST 大学発新産業創出プログラム (START) の成果と合わせて山形大学発ベンチャー株式会社 Cool ALD の設立に至った。今後は、開発した微粒子 ALD および電極チップ系をベンチャー会社としての活動にのせて実用化を加速させる予定である。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 膜平行電圧を印加可能な人工細胞膜系の構築

概要: 脂質二分子膜の内部に、膜に平行な方向への電圧印加を可能にする電極内蔵型微細加工チップを作製し、その中で膜形成に成功した。さらに、膜平行電圧の印加により、フラレン誘導体PCBMによる光応答電流が増大することを観測した。このような膜平行電圧を印加できる測定系は世界初であり、細胞膜や人工細胞膜の研究分野に、従来の膜に垂直な方向の電圧に加えて「膜平行電圧」という新基軸をもたらす新しいプラットフォームとなる。

2. 無細胞合成 hERG チャンネルの単一チャンネル電流計測

概要: 微細加工シリコンチップ中で形成した脂質二分子膜中に、無細胞発現系を用いて合成した hERG チャンネルを包埋することにより、正常型 hERG チャンネルの単一チャンネル電流計測と、副作用薬物による阻害作用の測定に成功した。巨大分子の hERG チャンネルの無細胞合成とチャンネル電流計測は世界初のことであり、チャンネル分子科学の分野に、無細胞合成→人工脂質二分子膜系での機能解析という新しい潮流を生み出した。

3. 脂質二分子膜へのイオンチャンネルの効率的包埋法の確立

概要: 脂質二分子膜への生体チャンネルの包埋は、チャンネル含有リポソームと脂質二分子膜との膜融合によって進行する。膜融合は分泌過程のモデルとしても注目されているが、その確率が低いことが課題であった。本研究では3種のヒトチャンネル (hERG, Na1.5, GABA 受容体チャンネル) を対象に膜融合促進について検討し、遠心力を駆動力とすることにより、従来の約 6% の確率から 67% へと、さらに最適遠心条件では 83% へと包埋確率を著しく向上させることに成功した。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. 無細胞合成チャンネルのチャンネル電流計測

概要: 微細加工シリコンチップ中で形成した脂質二分子膜系を用いて、無細胞合成した正常型 hERG チャンネルの単一チャンネル電流計測と、副作用薬物による阻害作用の測定とその定量的評価に成功した。このアプローチを種々の遺伝子型の hERG チャンネルに展開することにより、個人個人の hERG チャンネル genotype の副作用リスク評価ができるようになれば、将来の個別化医療の実現に向けて大きく貢献できると期待される。

2. 使い捨て可能なフレキシブル電極内蔵型チップの開発

概要: 脂質二分子膜の内部に膜平行電圧を印加するための電極内蔵型微細加工チップを、上述のシリコンチップに加えて、フレキシブル材料を用いて作製する技術を開発した。高度な製造技術を必要とする Si チップに比べて、フレキシブルチップでは非常に低コストにイオンチャンネル評価チップを作り出すことができた。本チップは量産にも優れており、イオンチャンネル評価技術の産業普及に貢献すると考えられる。

3. 室温原子層堆積技術を用いたナノ粒子コーティング技術の構築

概要: 脂質二分子膜に包埋し光導電変調を起こすための、酸化物被覆ナノ粒子の製造技術の構築を進めた。実際には、光プラズモン効果を有する金ナノ粒子への酸化チタンの室温コーティングを試み、100 nm の模擬粒子上でナノメートルレベルでの膜厚制御と被覆を実証した。ナノ粒子への室温原子層堆積は新規の領域であり、ナノ粒子電子チャンネル、センサ材料、超高効率光触媒、水素製造への活用が期待される。

<代表的な論文>

1. A. Hirano-Iwata, Y. Ishinari, M. Yoshida, S. Araki, D. Tadaki, R. Miyata, K. Ishibashi, H. Yamamoto, Y. Kimura, and M. Niwano, “Reconstitution of human ion channels into solvent-free lipid bilayers enhanced by centrifugal forces”, *Biophys. J.*, **110**, 2207-2215 (2016).
概要:脂質二分子膜への生体チャネルの包埋は, チャネル含有リポソームと脂質二分子膜との膜融合によって進行する. この膜融合は生体の分泌モデルとしても注目される現象であるが, その確率が低いことが課題であった. 本研究では電位依存性の hERG チャネルと Na チャネル, リガンド作動性の GABA 受容体を対象に膜融合促進について検討し, 遠心力を駆動力とすることにより, 従来の約 6% の確率から 67% へと包埋確率を著しく向上させることに成功した.
2. D. Tadaki, D. Yamaura, S. Araki, M. Yoshida, K. Arata, T. Ohori, K. Ishibashi, M. Kato, T. Ma, R. Miyata, Y. Tozawa, H. Yamamoto, M. Niwano, and A. Hirano-Iwata, “Mechanically stable solvent-free lipid bilayers in nano- and micro-tapered apertures for reconstitution of cell-free synthesized hERG channels”, *Sci. Rep.*, **7**, 17736 (2017).
概要:人工脂質二分子膜の課題である膜安定性の問題について検討した. 膜形成場となる微細孔の縁部形状について調べ, ナノスケールの縁部テーパ構造に加えて, マイクロメートルスケールの広い範囲のテーパ構造をもたせることにより, 脂質二分子膜の安定性が向上できることを明らかにした. さらに, DNA からタンパク質を合成できる無細胞合成法によって調整した hERG チャネルの膜中への包埋とチャネル電流の計測に成功し, 本膜系の個別化医療への展開可能性を示した.
3. T. Ma, X. Feng, T. Ohori, R. Miyata, D. Tadaki, D. Yamaura, T. Deguchi, M. Komiya, K. Kanomata, F. Hirose, M. Niwano, and A. Hirano-Iwata, “Modulation of photoinduced transmembrane currents in a fullerene-doped freestanding lipid bilayer by a lateral bias”, *ACS Omega*, **4**, 18299-18303 (2019).
概要:脂質二分子膜の内部に, 膜に平行な方向への電圧印加を可能にする電極内蔵型微細加工チップを作製し, その中での膜形成に成功した. さらに, 膜平行電圧の印加により, フラーレン誘導体 PCBM による光応答電流が増大することを観測した. このような膜平行電圧を印加できる測定系は世界初であり, 細胞膜や人工細胞膜の研究分野に, 従来の膜に垂直な方向の電圧に加えて「膜平行電圧」という新基軸をもたらす新しいプラットフォームとなる.

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「縦方向イオンチャンネルに基づく脂質二分子膜デバイス」グループ

研究代表者: 平野 愛弓(東北大学材料科学高等研究所 教授)

研究項目

- ・チャンネルタンパク質の脂質二分子膜中への包埋確率の向上
- ・基本構造となる微細加工シリコンチップの高効率作製プロセスの確立
- ・High throughput 薬物副作用評価系の構築
- ・電極内蔵型シリコンチップの作製と膜形成, イオン・電子ナノチャンネル機能評価への応用
- ・チャンネル形成物質を包埋した脂質二分子膜の形成, 電気特性の評価とデバイス応用

② 「チャンネル包埋脂質二分子膜内の分子構造の評価」グループ

研究代表者: 手老 龍吾(豊橋技術科学大学応用化学・生命工学系 准教授)

研究項目

- ・脂質二分子膜へのチャンネル包埋過程のリアルタイム観察
- ・チャンネル包埋制御因子の探索
- ・膜内チャンネルの同定と分子構造の高分解能観察

③ 「無細胞合成系によるイオンチャンネルタンパク質の合成」グループ

研究代表者: 戸澤 謙(埼玉大学大学院理工学研究科 教授)

研究項目

- ・正常型および変異型 hERG チャンネルの脂質二分子膜上への無細胞合成
- ・薬物スクリーニング系構築のためのイオンチャンネルの無細胞合成

④ 「脂質二分子膜電界効果トランジスタの構築」グループ

研究代表者: 廣瀬 文彦(山形大学大学院理工学研究科 教授)

研究項目

- ・室温・原子層堆積法(ALD)法の確立とセンサ応用
- ・ALD 法と脂質二分子膜の結合
- ・脂質二分子膜トランジスタのための電界シミュレーション
- ・脂質二分子膜トランジスタの構築
- ・低コストイオンチャンネル評価チップ作製技術の構築

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

① Technical University of Catalunya(スペイン)の Jordi Madrenas 准教授(神経回路工学)と平野グループで, 膜平行電圧系についての共同研究を進めている. Madrenas 准教授は, 東北大学電気通信研究所で開催される国際シンポジウムに毎年参加しており, その縁で 2015 年に討論したことから, 共同研究に発展した. Madrenas 准教授が理論的考察と予想, 平野グループがその実験的検証を進めるという役割分担で進めている.

② Technical University of Munich (ドイツ)の Bernhard Wolfrum 准教授(バイオエレクトロニクス)と平野グループで, バイオ固体基板インターフェースにおけるエレクトロニクスに関する共同研究を開始し, 電極付き基板の新たな発展性について検討している. 実際に, Wolfrum 准教授が 2016 年度に 1 ヶ月間, Wolfrum 研の大学院生が 2017 年度に 1 ヶ月間, 東北大学電気通信研究所に滞在し, 平野研の山本助教が 2018 年度に 10 ヶ月間 Technical University of Munich に滞在しており, 国際共著論文 2 報の発表に至っている.