

氏名	やまうらだいち 山浦大地
研究科、専攻の名称	東北大学大学院工学研究科（博士課程）電子工学専攻
学位論文題目	微細加工シリコン基板に基づく脂質二分子膜の安定化と高効率薬物副作用検査系への応用に関する研究
論文審査委員	主査 東北大学教授 平野 愛弓 東北大学教授 吉信 達夫 東北大学教授 藤掛 英夫

論文内容要約

近年、工学技術と細胞膜やタンパク質などのバイオ材料を融合した研究が盛んに行われており、新しいバイオデバイスの創製や医療などへの応用が期待されている。生体機能を司る重要なバイオ材料である膜タンパク質は、脂質二分子膜に包埋されることで様々な機能を発現することで細胞膜における高度な信号伝達に重要な役割を担っており、創薬分野においては主要な開発ターゲットの1つとなっている。本論文では、タンパク質と脂質二分子膜に注目し、これらを半導体微細加工技術と組み合わせた医療・創薬分野へと応用可能なバイオデバイスの開発を目指した。

現状、創薬分野においては、薬物副作用が創薬費用高騰の主な原因の1つとなっていることから、薬物副作用のリスクを高い効率・信頼性で評価できる薬物副作用検査系の構築が求められている。膜タンパク質の一種であり、細胞膜におけるイオンの通り道としての役割を持つイオンチャネルは、薬物副作用検査の重要な評価対象であるが、その中でも心筋細胞に多く存在し、薬物副作用が致死性の不整脈につながる **hERG** (*human ether-a-go-go-related gene*) チャネルに対する副作用リスクの評価は極めて重要である。現在、イオンチャネルに対する薬物副作用を検査する方法として、細胞膜に細いガラス管を押し当ててイオンチャネルを流れるイオンの流れを電流として測定し、その活動を評価するパッチクランプ法が広く用いられている。しかし、この方法は細胞ベースの方法であるため、検査結果が細胞状態の影響を受けてしまうなどの問題点があった。本論文では、**hERG** チャネルへの薬物副作用検査系として、細胞膜を模した系を人工的に構築する脂質二分子膜再構成系を採用した。脂質二分子膜再構成系は、実験系を一から組み立てるため、系の化学状態を任意にコントロールすることができるという利点があり、高い信頼性を持つ副作用検査が期待できる。しかし、脂質二分子膜再構成系を薬物副作用検査に用いるためには、1) 脂質二分子膜の安定性が非常に低いため、わずかな外力で膜が破れ、実験を中止せざるを得なくなる 2) 複数の薬物の副作用を同時に検査する系が確立されていないため、**high-throughput** な検査ができない という2つの問題を克服する必要があった。本研究では、これらの問題に対して、脂質膜の安定性については、脂質膜を保持するシリコンチップの構造・表面状態の最適化を行うことによって、**high-throughput** な測定系の構築については、マルチウェル型アレイチャンバーも設計・製作による

解決を試みた。以下にこれらの成果について記述する。

従来の脂質二分子膜再構成系では、テフロンフィルムなどの数十 μm の厚さを持つ絶縁フィルムを脂質膜の支持体としていたが、チャンバーを移動させることやチャンバーに電極を差し込むなどの動作によって膜が破れてしまうほど膜の安定性は低いものだった。本研究の先行研究では、脂質二分子膜とその支持体の大きなサイズギャップが脂質膜の安定性を下げている原因と考え、半導体微細加工技術によって孔エッジ部にナノスケールのテーパー構造を持つシリコンチップを作製し、脂質膜の支持体とした。その結果、脂質膜の安定性は大幅に向上したが、この支持体のエッジ部分を薄くするというアプローチは、同時に支持体の脆弱性につながり、支持体の作製歩留まりは、10%未満と非常に低いものになった。そこで、本研究では始めに、作製歩留まりの向上と膜の安定性の両立を目指した。本研究では、シリコンチップの作製プロセスの一部に変更を加えることによって、様々な構造を持つシリコンチップを作製した。これにより、孔のエッジ部分のナノ構造と、孔周辺のマイクロ構造に違いを持つ3種類のチップを作製することができた。本研究では、これらのチップ上に脂質膜を形成し、その安定性を“遠心力耐性”と“溶液交換耐性”の2つの項目で調査を行った。1つ目の“遠心力耐性”とは、脂質膜に遠心力を印加した際の膜の生存率を調べたものである。本研究では、脂質膜にイオンチャンネルを効率よく包埋するために遠心力を印加する遠心包埋促進法を用いているが、その際に破れてしまう膜があることから膜の遠心力に対する耐性を重要視している。2つ目の“溶液交換耐性”とは、チャンバー内の溶液を交換した際の膜の生存率を調べたものである。創薬の現場では塩・薬物濃度などの条件変更のために溶液交換を頻繁に行うことため、溶液交換耐性は非常に重要な膜安定性の指標といえる。また、本研究においては、この溶液交換耐性を評価する際には、実際に溶液を交換するのではなく、同じ溶液を一定の時間間隔で出し入れすることによって、溶液交換時の膜へのストレスを再現した。以上のような安定性評価実験を行った結果、エッジ部分がナノテーパー状でありかつ、孔周辺の構造がマイクロテーパー構造になっているチップ上に形成した脂質膜の安定性が、他のチップ上に形成した脂質膜の安定性よりも優れていることが分かった。さらに、このチップは作製歩留まりも80%以上と非常に高かった。これによって、支持体の作製歩留まりと膜の安定性を両立することができた。また、本研究によって、脂質膜の安定性には、エッジ部のナノ構造だけではなく、孔周辺のマイクロ構造も重要であるということが分かった。これらの成果は、安定な脂質二分子膜系を再現性よく構築する上で極めて有用な知見である。

次に、脂質膜支持体表面特性の最適化による脂質膜の安定化に取り組んだ。脂質二分子膜再構成系において脂質膜は、支持体に支持されている領域と自立した領域に分けられるが、この2つの領域は継ぎ目なくつながっている。また、支持体に支持されている脂質膜の性質は、下地の影響を受けることが知られている。本研究では、支持体表面を改質し、支持部分の膜特性を変えれば、継ぎ目なくつながっている自立部分の膜特性も変えることができ、膜安定性を向上できるのではないかと考えた。始めに、平坦なシリコン基板を様々な修飾剤で修飾し、

修飾表面の基礎特性として水・油の接触角と表面粗さについて調べ、さらにその上に単層の脂質膜を展開した際の脂質膜の流動性について検討した。その結果、修飾表面上に展開した脂質膜の流動性は、疎水性・疎油性が高く、また表面粗さが低い表面上において高くなるということが分かった。次に、脂質膜の流動性の観点で最も大きな差があった2つの修飾剤を用いて、微細加工シリコンチップをそれぞれ修飾し、その中に形成した脂質膜の安定性について、上述の“遠心力耐性”と“溶液交換耐性”の2つで同様に評価・比較を行った。その結果、脂質膜の流動性が高くなるように表面修飾したシリコンチップ中で形成した脂質膜の安定性は、もう一方の脂質膜の安定性と比べて高くなるということが分かった。これは、脂質膜の流動性が高い、つまり、脂質膜の滑りがよい場合は、脂質膜に外部からの摂動が加わった際に脂質膜が滑ることで外力を緩和することができるため、結果的に脂質膜の安定性が向上したからだと考えられる。最後に、この系における hERG チャンネル電流の測定を行った。その結果、hERG チャンネルの応答を測定できたため、本系においても hERG チャンネルの活性を保持することができる、つまり、本系を薬物副作用検査系として応用可能なことを見出した。以上の結果から、脂質二分子膜を安定化するための指針だけでなく、脂質膜と表面との間の相互作用を理解する上でも非常に重要な知見を得ることができた。

最後に、以上の知見によって安定化した脂質二分子膜を多数並べた高効率な副作用検査系の構築を目指した。脂質二分子膜再構成系を利用した高効率副作用検査系は、マイクロ流路系や droplet interface bilayer 法などが報告されているが、これらは系を構築する際に有機溶媒を大量に使用しなければならない。薬剤の中には、水よりも有機溶媒の方に溶けやすい疎水性の薬剤も多いため、有機溶剤の共存は、水溶液中の薬物濃度、すなわちイオンチャンネルに作用する薬物の実効濃度が下がり、副作用があるはずの薬物を副作用がないと診断してしまう“偽陰性”のリスクを高めてしまう。本研究室における先行研究では、テフロンチャンバーに上述の微細加工シリコンチップを9枚セットした9ウェル型アレイチャンバーの設計・製作を行っていた。これによって、有機溶媒をほとんど使わずに複数の脂質膜を同時に形成し、さらにこのチャンバーを用いて複数のイオンチャンネル電流を同時に計測することにも成功している。しかし、このチャンバーでは、微量ではあるが有機溶媒を使用していることや、測定中に水漏れが起きること、溶液交換ができないこと、イオンチャンネルタンパク質の消費量が多いことなどの様々な問題を抱えていた。そのため、本研究ではこれらの問題を踏まえつつ、さらなるウェル数の拡大を行った。本研究では、16ウェル型のアレイ測定系の構築を目指し、チャンバー全体の構造、チャンバーの材質、脂質膜形成の条件出し、さらに、チャンバーにセットするチップサイズの縮小など様々な改良を行った。その結果、各ウェルにおける脂質二分子膜の形成確率の大幅な向上と測定中の溶液漏れの解消、必要なタンパク質量の大幅な低減に成功した。そして、このチャンバーによってイオンチャンネル電流の測定を行ったところ、複数のイオンチャンネルの応答を同時に測定することができ、このチャンバーにおいてもイオンチャンネルの活性を記録できることを示した。しかし、このイオンチャンネル応答の測定確率が非常に低かったため、その原因を調べたところ、

この 16 ウェル型チャンバーはウェルサイズが小さく、またチャンバーを構成しているのが疎水性材料であるテフロンであることによってウェル内に水が入りにくくなっていることが分かった。そして、これによって膜形成時に気泡がウェル内に入り込み、それによって膜形成確率が著しく下がっていることが原因であることが分かった。この結果を受けて、ウェル内への水の侵入が膜形成確率向上のキーであると考え、ウェルに脂質溶液を塗ることでウェルの入り口を親水性にしてから膜形成を行った結果、膜形成確率は大幅に向上した。しかし、膜形成確率が未だ十分でないことや、水漏れ対策を多数施したこのチャンバーであっても遠心包埋促進法を適用したときに水漏れが発生するということが分かったため、ウェル構造と蓋構造の見直しを行った。これにより、膜形成確率が測定に十分な程度にまで上昇し、また、遠心中でも水が漏れないチャンバーを作製することに成功した。以上によって、脂質二分子膜再構成系を高効率な薬物副作用検査系に展開するための基盤技術を確立することができた。

以上のように本論文は、脂質二分子膜再構成系を薬物副作用検査に応用する上で必要であった脂質膜の安定性の向上と高効率な薬物副作用検査系の構築に取り組んだ。脂質二分子膜の安定性については、脂質二分子膜の支持体であるシリコンチップの微細構造を最適化することや、脂質膜とその下地の相互作用を解明し、支持体表面状態を最適化することによって大きく向上させることに成功した。高効率な検査系については、高性能なアレイチャンバーの設計・製作によって高効率な薬物副作用検査系の基盤技術を確立することができた。本論文における研究成果は、目的であった薬物副作用検査系としてだけでなく、イオンチャンネルに代表される生体タンパク質の基礎研究などの、ナノテクノロジーや生体電子工学等の研究分野への幅広い応用を期待することができる。