

固体支持膜の形成位置制御と分子操作への応用

固体表面を支持台としてその上に形成した人工生体膜（あるいは人工細胞膜とも表現できます）を、固体支持膜と呼びます。NTT物性科学基礎研究所では、固体表面の特定の位置だけに選択的に固体支持膜を作製する独自技術を発表しています。本稿では、この技術を武器に展開してきた新しい研究成果について紹介します。1つは、タンパク質を検出する固体支持膜マイクロアレイの提案です。もう1つは、固体支持膜内の特定の分子を1つずつ操作する技術の提案です。

ふるかわ かずあき ※

古川 一暁

NTT物性科学基礎研究所

自発展開

NTT物性科学基礎研究所が固体支持膜に興味を持って研究を開始し、初めての外部発表⁽¹⁾を行ってから約10年が経ちました。初期の成果は、2009年6月号の本誌に詳しく記述されています⁽²⁾。本稿ではそれ以後の進展に関して、特に固体支持膜を生体分子の輸送や操作に利用した研究について紹介します。

はじめに、簡単に自発展開法による固体支持膜の形成について復習します。図1にその概略を示します。細胞膜は多種多様な分子が集合して形成されていますが、その主要な成分は脂質分子と呼ばれる、水となじむ親水基と水をはじく疎水基を持つ分子です。脂質分子の単分子膜が内側に疎水基を閉じ込めるように2枚重なったものを脂質二分子膜と呼び、これが細胞膜の基本構造となります。脂質分子それ自体は水に溶けないのですが、脂質二分子膜構造をとることで水となじみ、安定に存在することができます。

脂質分子は例えば卵黄から抽出することもできますし、化学合成で人工的

につくこともできます。自発展開で固体支持膜を作製する要領は次のようです。まず、原料の脂質分子を固体表面に塗布します。これを静かに緩衝液（例えば生理食塩水）に浸します。すると、塗布した原料と固体表面との接点で、脂質分子は二分子膜構造を自発的に形成し固体支持膜となり、時間の経過とともに固体支持膜は広がっていきます。念のため確認しておきますが、広がっていくのは脂質分子の原料が崩れていくのではなく、二分子膜構造を形成していくためです。これは自己組織化と呼ばれる現象です。自発展開は親水性の固体表面に選択的に生じます。このため、親水性・疎水性からなるパターンを作製した固体表面では、親水性表面だけに選択的に固体支持膜

を形成します。これは私たちが見出した重要な技術となっています^{(1),(3)}。

固体支持膜は蛍光顕微鏡という装置で観察します。観察のためには、蛍光色素が結合した脂質分子を全体の1%ほど混合しておきます。色素は膜内に一様に分布するため、蛍光像は固体支持膜の形を反映したものとなります。

固体支持膜マイクロアレイの作製

マイクロアレイとは、固体表面に多種類の検査薬を固定化したものです。この上に調べたい試料を滴下することにより、一度に多数の検査を行うことができます。もっとも代表的なものは、DNAチップと呼ばれるDNA検出用のマイクロアレイです。DNAはアデニン(A)、チミン(T)、グアニン(G)、

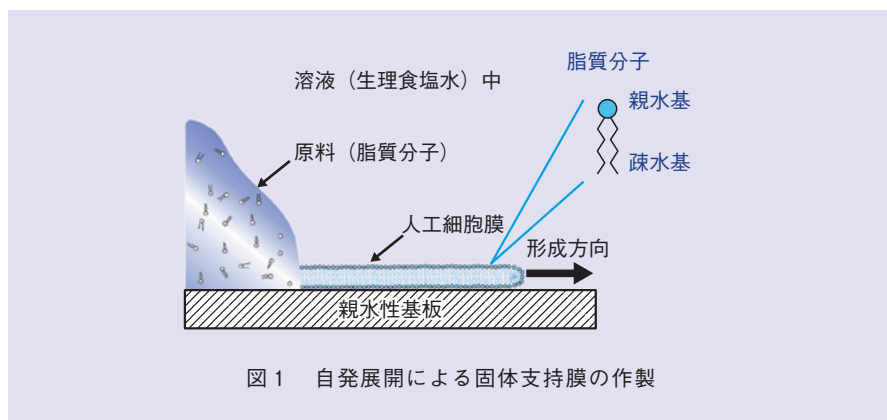


図1 自発展開による固体支持膜の作製

※ 現、明星大学

シトシン(C)という4つの塩基がひも状に結合した高分子です。相補的な配列を持つ2本のDNAが選択的に2重らせん構造を形成することは有名です。塩基配列の異なる1本鎖DNAを多数固定化したDNAチップで試料を検査すれば、固定化したDNAの塩基配列が分かっているの、試料の中に含まれるDNAの配列も分かるという仕組みです。

ところで、近年、DNAの代わりにタンパク質を検出する「タンパクチップ」の研究開発が盛んです。この場合、マイクロアレイの作製には、DNAを固定するのではなく、タンパク質を固定することになります。DNAは安定な分子で、固体表面へ固定してもその性質が維持されます。一方、タンパク質はとてもデリケートな分子で、固定化のために必要なさまざまな処理によって、その活性が極端に小さくなったり、失活したりします。そこで固体表面に直接的に固定するのではなく、固体支持膜という台座を敷き、この上

に固定するという解決策が提案されています。マイクロアレイ化を実現するには、別々の分子を含む固体支持膜をできるだけ集積度高く、固体表面に形成しなければなりません。このとき私たちの開発した技術が役に立ちます⁽⁴⁾。

その例を図2に示します。ポイントは、表面パターンを使うことにより集積化を実現することです。図2(a)は、表面酸化膜(SiO₂)を備えたシリコンウエハに金(Au)で作製したパターンを示します。自発展開用の原料を500×250μmの領域に塗布します。塗布後の試料を蛍光顕微鏡で観察すると、図2(b)のように見えます。ここでは、青、緑、赤の蛍光を示す色素を有する脂質分子を入れて、それぞれが区別できるようにしてあります。この試料をさらに緩衝液中に浸して自発展開させた後の蛍光像を、図2(c)に示します。表面に作製したパターンどおりに、親水性のSiO₂表面のみに自発展開が生じていることが分かります。そして最終的に幅10μmの固体支持膜

が幅5μmの間隔で並んだアレイを作製することができます。それぞれの原料は水に溶け出すことがないので、異なる色素が混じることがありません。

私たちの研究以前にも、固体支持膜のマイクロアレイ作製の技術開発が行われていました。しかしながら、その方法は、それぞれ異なる原料を含んだ水溶液を固体表面にできるだけ小さな滴にして並べるといったものでした。決められた範囲内になるべく多くの異なるセンサを作製したいのですが、隣どうしの滴が混ざり合っただけでは何にもなりません。あまりに小さな滴はすぐに乾燥してしまい、これも固体支持膜作製にとっては不都合でした。これらのことから、センサアレイの密度は滴の大きさによって制限されていました。一方私たちの方法は、同一の緩衝液中で別々の原料を独立に自発展開させられますから、アレイの密度は取り扱い可能な水滴の大きさではなく、作製可能な表面パターンの密度によって決まります。この結果、私たちの技術を用いれば、従来技術に比べて格段に集積度の高い固体支持膜マイクロアレイが実現できます。

タンパク質センシングの実証

得られた固体支持膜マイクロアレイがタンパク質センシングに利用できることは、ストレプトアビジンとビオチンの特異的な結合を利用して実証しています⁽⁴⁾。その結果を図3に示します。作製したマイクロアレイには3本ず

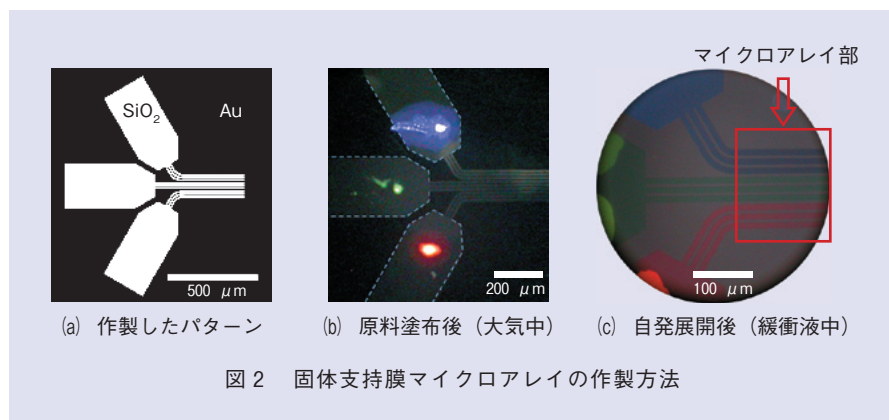
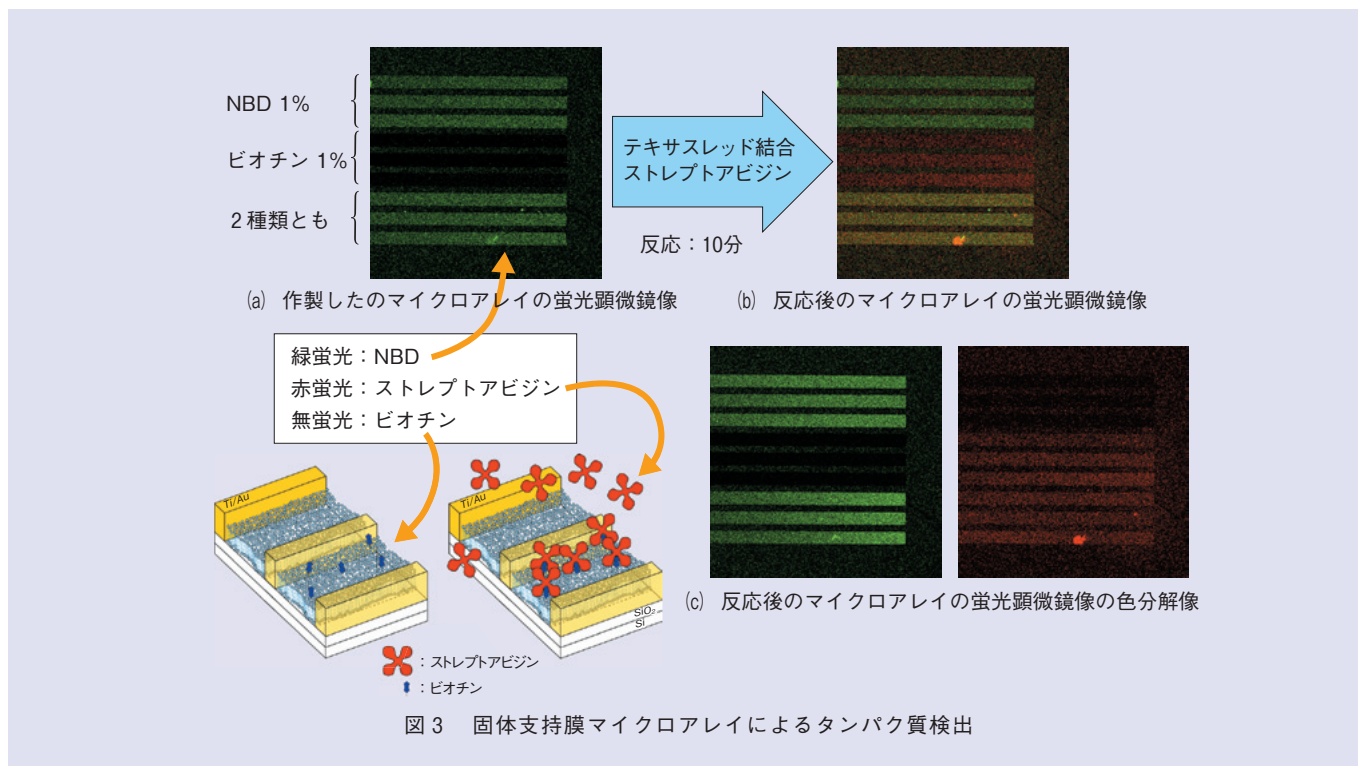


図2 固体支持膜マイクロアレイの作製方法



つの組になった計9本のラインがあります。それぞれの原料には、緑色に光るNBD色素が結合した脂質分子と、ビオチンが結合した脂質分子（これは光りません）を混合してあります。具体的には、卵黄由来の脂質分子（これも光りません）に、上段はNBD結合脂質分子を1%、中段はビオチン結合脂質分子を1%、下段は2種類とも、を混合した原料を用いて固体支持膜を作製しました。

作製したマイクロアレイの蛍光像を図3(a)に示します。蛍光を示すのはNBD結合脂質分子だけですから、上段3本と、下段3本の固体支持膜だけが緑色蛍光を示します。次に、ここ

にストレプトアビジンを反応させます。ストレプトアビジンにはあらかじめテキサスレッドという赤色蛍光を示す色素を結合させてあるので、ストレプトアビジンがある場所は赤く光ることで識別できます。反応後のマイクロアレイの蛍光像は図3(b)のように変化しました。NBDの緑色蛍光とテキサスレッドの赤色蛍光を区別した像を、図3(c)に示します。ストレプトアビジンが存在する場所は赤色蛍光を示す領域ですが、赤色蛍光像を見ると、ビオチンを含む中段および下段に作製した固体支持膜からのみ、確かに赤色蛍光が観察されました。このことから、タンパク質であるストレプトアビジン

を、私たちの固体支持膜マイクロアレイによって検出できることが実証できました。

ナノ構造との融合

前述のように、固体表面にパターンを描いておけば、自発展開により望みの場所に人工生体膜を形成することができます。それでは、自発展開はどれくらい狭い領域まで途切れずに継続できるのでしょうか。私たちは以下に示すように、この疑問に答えるための実験に取り組みました^{(5),(6)}。

新たに図4に示す構造を作製しました。これは、図2で利用した10 μm幅のパターンの途中で、数10 nmの間隙

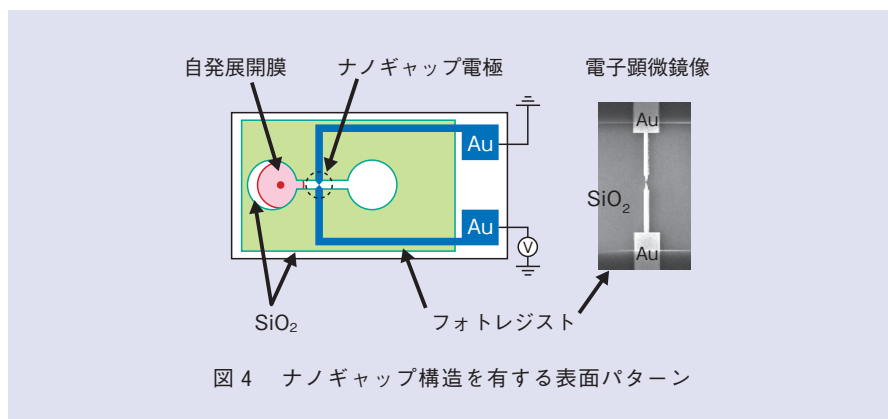


図4 ナノギャップ構造を有する表面パターン

を持つ一対の金電極を備えたものです。人工生体膜の厚さは約4 nmですから、それよりもやや広い間隙を作製したわけです。このナノギャップ電極は通常の顕微鏡の分解能よりもはるかに小さな構造なので、観察には電子顕微鏡を用います(図4)。

図5(a)に、ナノギャップ構造を通過して生じる自発展開の観察例を示しました。固体支持膜は10 μm幅の親水部に自発展開し(①)、ナノギャップ位置に到達します(②)。その後、固体支持膜は10 μm幅の真ん中から自発展開を続ける様子が③に明瞭に観測され、ナノギャップを通過して成長することが明らかになりました。その後も、自発展開は順調に進行します(④、⑤)。

本特集の他記事にもあるように、もっとも一般的な固体支持膜の作製法にベシクル融合法があります。しかしながら、ナノギャップ電極間のような非常に微細な領域に固体支持膜が形成されたかどうかを判定するのは容易で

はありません。自発展開法によれば、図5の観察結果から、ナノギャップ電極間に固体支持膜が形成されていることが強く示唆されます。

分子を操作する

私たちの作製したナノギャップは金でできているので、外部回路と電気的につながり、電圧を印加することが可能です。そのような状況で、固体支持膜の自発展開にどのような変化が生じるかを調べた結果を最後に示します。

図5(b)では、ナノギャップ間に電圧を-50 mV 印加した状態で自発展開を開始しました^{(5),(6)}。このとき、ナノギャップ電極に達するまでは電圧をかけていない場合と同様の自発展開特性を示しました(①、②)。固体支持膜の先端がナノギャップ電極に到達すると(③)、そこで自発展開は停止しました(④)。ここで電圧をゼロにすると(⑤)、ナノギャップ間を通過する自発展開が再び開始しました(⑥)。その後、自発展開は電圧を印加していない

時と同様に継続します(⑦、⑧)。

この実験結果の解釈として、電圧印加によりナノギャップ電極間に有効な電場が生じ、この電場によって脂質分子が捕捉されるモデルを提案しました。一般に、緩衝液のような電解質溶液中では、電場が届く距離(デバイ長)は電極表面から数~数10 nmに限られます。私たちの実験は、電極の間隔をnmスケールにすることで、電極間に有効電場を発生できることを示したものです。

図5(b)⑧の状態でも再び電圧を印加すれば自発展開を止めることができます。これは、再びナノギャップ電極間に電場を生じさせることで、分子を捕捉し、自発展開を継続するための脂質分子原料の供給を止めたことに対応します。ナノギャップ間隔はとても狭く、また有効電場はその一部にしか作用しないため、捕捉された脂質分子の数はせいぜい数10個程度と見積ることができます。つまり、ごく少数の分子を外部電圧のオンオフで操作することで、数億個の分子が関与する大きなスケールの現象を制御することに成功したといえます⁽⁵⁾。分子を捕捉するためには、ナノギャップ間に有効な電場が存在する必要があります。これは電解質溶液の濃度で決まるデバイ長と作製したナノギャップ間隔とに依存します。私たちは両者の関係を実験的に確かめており、モデルの正当性を裏付ける結果を得ています。

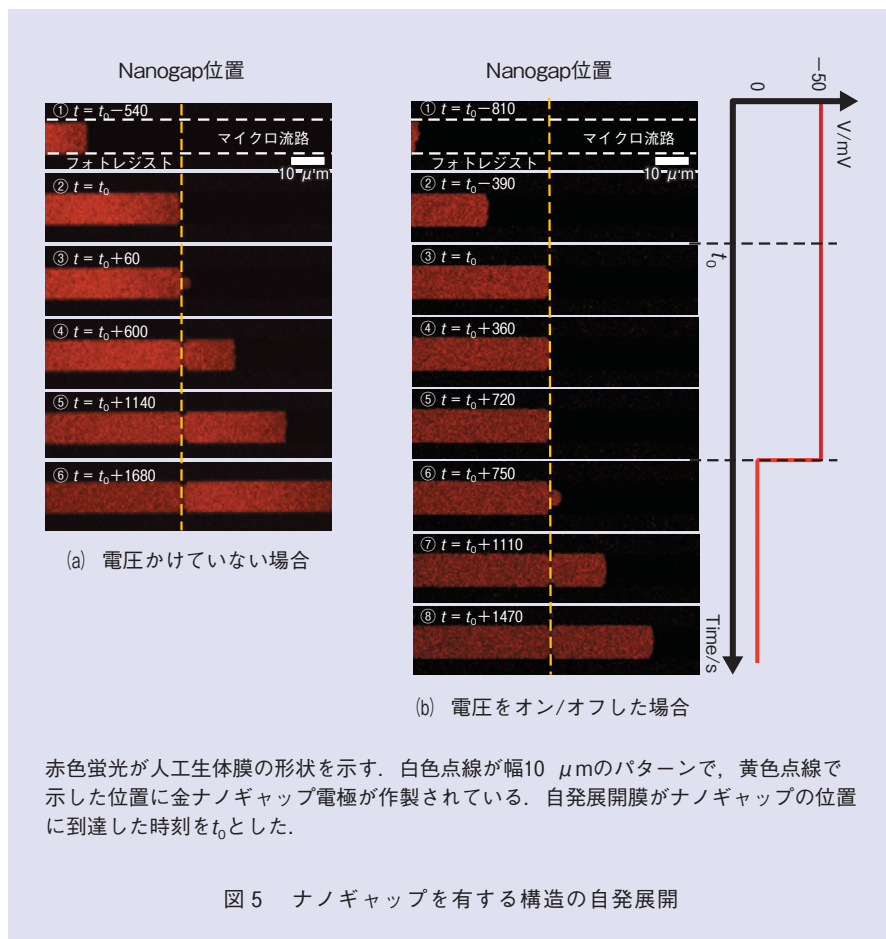


図5 ナノギャップを有する構造の自発展開

今後の展開

本稿では、固体支持膜を対象とした基礎研究の過程で得られた成果をバイオセンサ応用につながる側面を意識して紹介しました。今後タンパクチップの実現に向けた取り組みは、大いに期待できると思います。

ナノギャップ電極間の電場により分子を操作する技術は、究極的には1分子を自在に制御するNTT独自技術に発展できるものと考えています。その

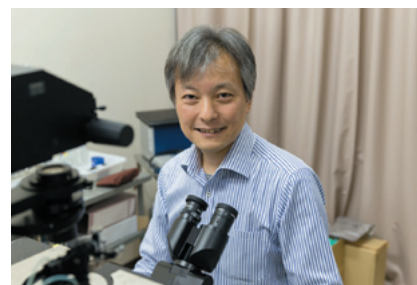
実現は、新たな研究領域の開拓につながります。

参考文献

- (1) K. Furukawa, H. Nakashima, Y. Kashimura, and K. Torimitsu : “Microchannel Device Using Self-Spreading Lipid Bilayer as Molecule Carrier,” Lab Chip, Vol.6, No.8, pp.1001-1006, 2006.
- (2) 古川 : “固体表面での人工細胞膜の成長制御とそのマイクロ流路デバイス応用,” NTT技術ジャーナル, Vol.21, No.6, pp.24-27, 2009.
- (3) K. Furukawa and H. Hibino : “Self-Spreading of Supported Lipid Bilayer on SiO₂ Surface Bearing Graphene Oxide,” Chem. Lett., Vol.41, No.10, pp.1259-1261, 2012.
- (4) K. Furukawa and T. Aiba : “Supported Lipid Bilayer Composition Microarray Fabricated by Pattern-guided Self-spreading,”

Langmuir, Vol.27, No.12, pp.7341-7344, 2011.

- (5) Y. Kashimura, K. Furukawa, and K. Torimitsu : “Electrostatic Control of Lipid Bilayer Self-Spreading Using a Nanogap Gate on a Solid Support,” J. Am. Chem. Soc., Vol.133, No.16, pp.6118-6121, 2011.
- (6) Y. Kashimura, K. Sumitomo, and K. Furukawa : “Electrostatic control of the dynamics of lipid bilayer self-spreading using a nanogap gate,” Mater. Res. Express, Vol.1, No.3, 035404, 2014.



古川 一暁

究極の技術を追求し、その実現がさらに新しい基礎研究の潮流を生む、そのようなポジティブサイクルが実現することを夢見て、日々研究に取り組んでいます。

◆問い合わせ先

NTT物性科学基礎研究所
機能物質科学研究部
TEL 046-240-3548
FAX 046-270-2364
E-mail kashimura.yoshiaki@lab.ntt.co.jp