

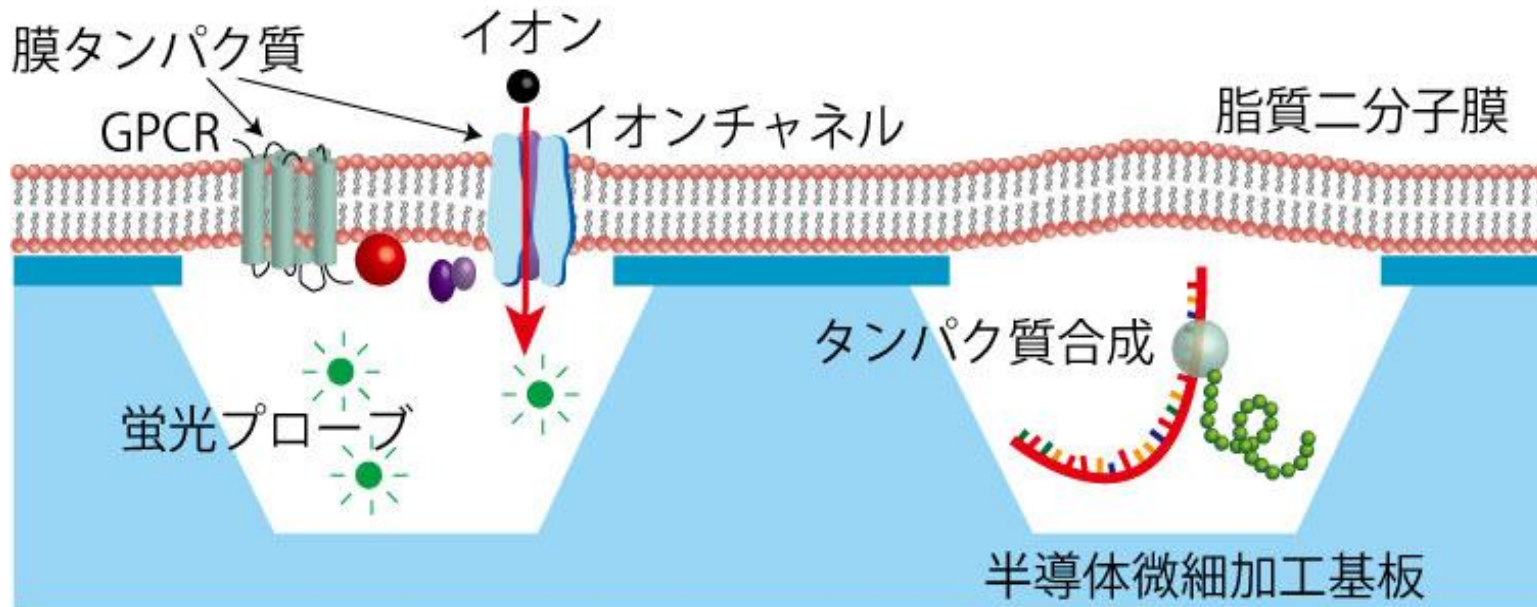
人工細胞型マイクロバイオセンサーの開発
Development of a biosensor
that functions like an artificial cell

兵庫県立大学工学研究科 住友弘二
(メディカル ジャパン2020大阪, 2020.2.27)

Contents

- } 背景
 - } マイクロウエル架橋膜と人工細胞
- } 膜タンパク質の機能計測
 - } イオン透過計測
 - } ラフト様相分離
- } 脂質膜の融合
 - } ベシクル融合
 - } ウイルスの融合
- } 課題と今後の展望

人工細胞アレイ



- 必要な生体分子だけで構成
- 化学環境の制御
- 膜タンパク質機能の発現
- 分子スケールでの機能解析

Bottom up approach

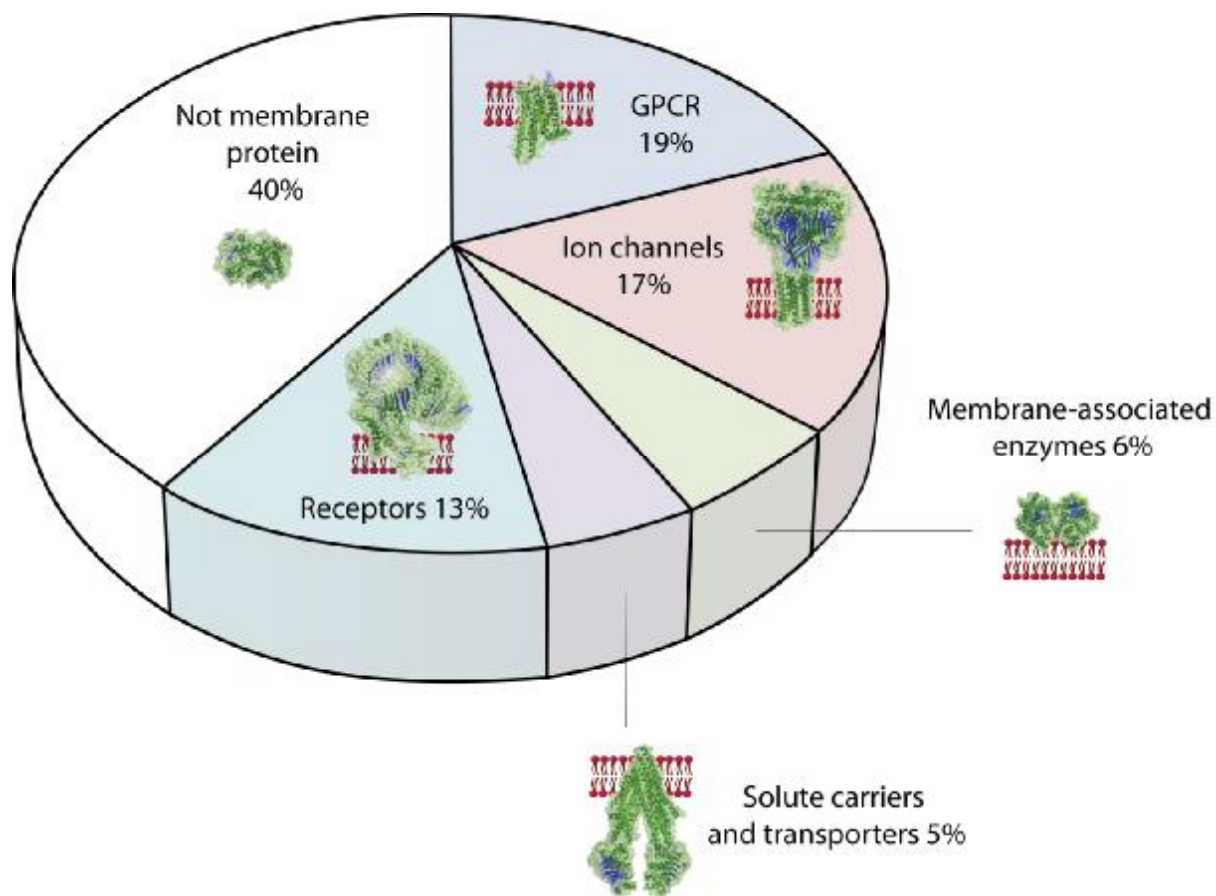
膜タンパク質

- } 受容体タンパク質
(リガンド作動性チャネル, GPCR)
 - } イオン, アミノ酸等の出入り (物質輸送) を制御
 - } 細胞間の情報伝達を担う
 - } 高感度なバイオセンサーとして働く
- } 現在の市販薬は, 60%以上が膜タンパク質がターゲット
 - } 疾病の原因, 発症, 抑制に重要な役割



膜タンパク質の機能を利用したナノバイオデバイス

薬のターゲットとしての膜タンパク質



Human membrane proteins as drug targets

Louis Tiefenauer and Sophie Demarche: *Materials* 2012, **5**, 2205-2242

概要

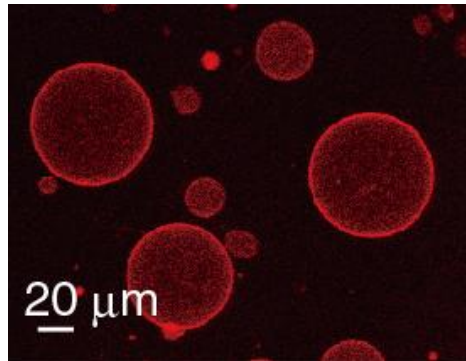
- } 半導体基板に形成したマイクロウエルを脂質二分子膜でシールすることで、**膜タンパク質**が機能する場、すなわち人工細胞を形成する。
 - } 膜タンパク質そのものの機能を計測
 - } 細胞表面での現象（物質輸送）を、デバイスとして再現
 - } 膜タンパク質が機能するのに必要なものだけを用いて、化学的に制御された人工細胞環境を構築することで、単純化・明確化した系として膜タンパク質本来の機能を計測する。アレイ化することで、並列化、ハイスループット化を実現する。
 - } 細胞表面における生物小胞の融合機構を人工的に半導体基板上に構築することで、新しいハイブリッド型バイオセンサーの創出する。
-



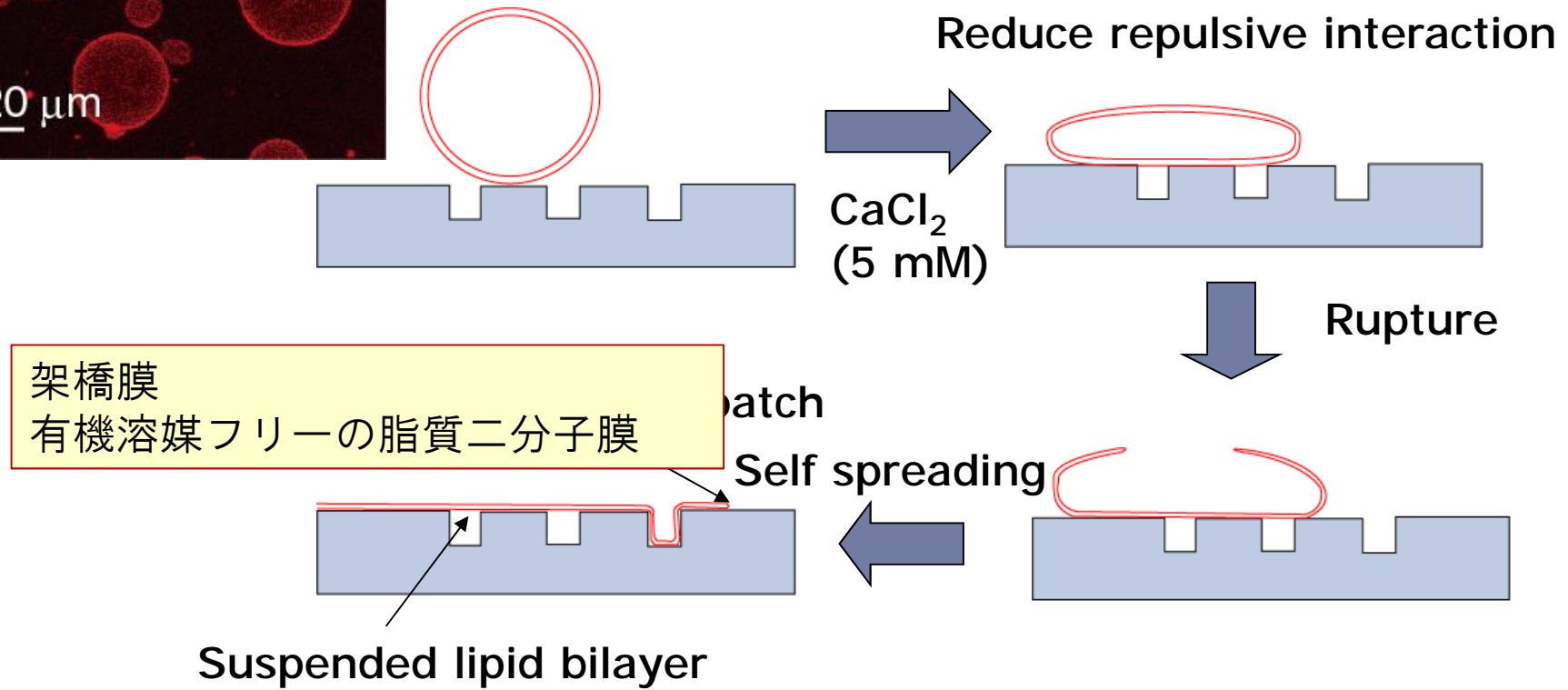
Contents

- } 背景
 - } マイクロウエル架橋膜と人工細胞
- } 膜タンパク質の機能計測
 - } イオン透過計測
 - } ラフト様相分離
- } 脂質膜の融合
 - } ベシクル融合
 - } ウイルスの融合
- } 課題と今後の展望

脂質膜によるマイクロウエルのシール

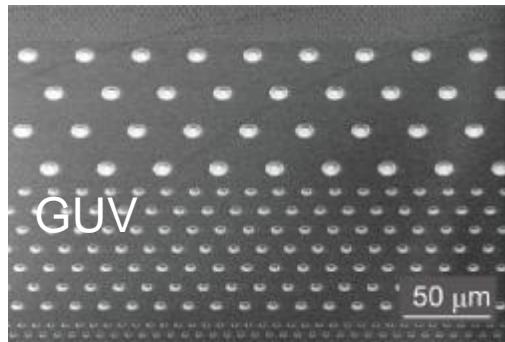


GUVs are ruptured on a substrate with microwells

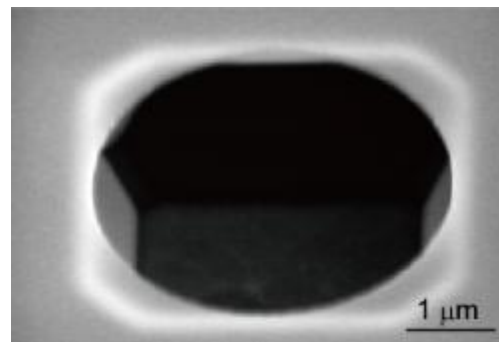


マイクロウエル形成：半導体微細加工

シリコン基板に、細胞サイズ（mmスケール）の微小井戸を作製
（リソグラフィとエッチング）



（広域）

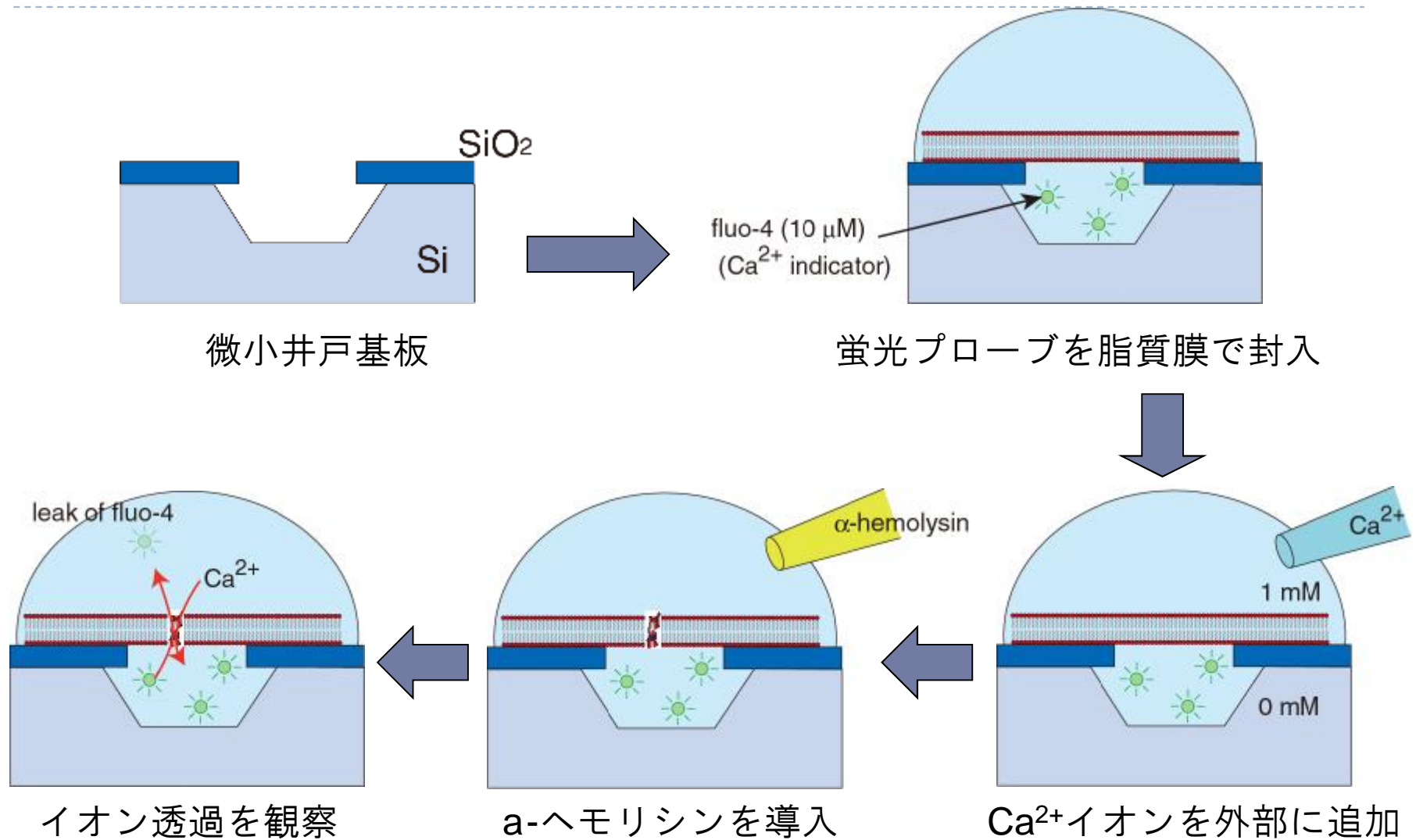


（斜め45°）

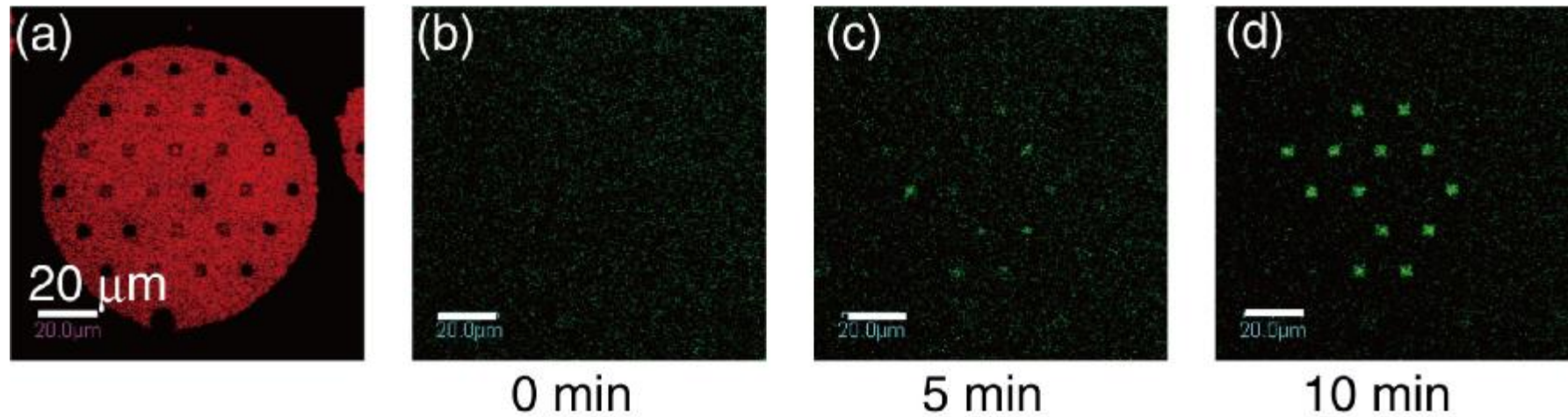


（断面）

イオン透過計測例（実験手順）



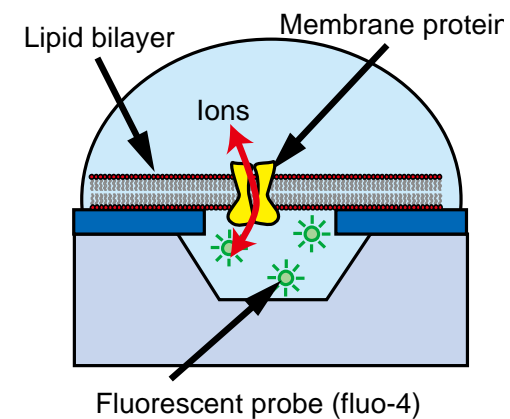
Ca²⁺ イオン透過の計測例（蛍光観察）



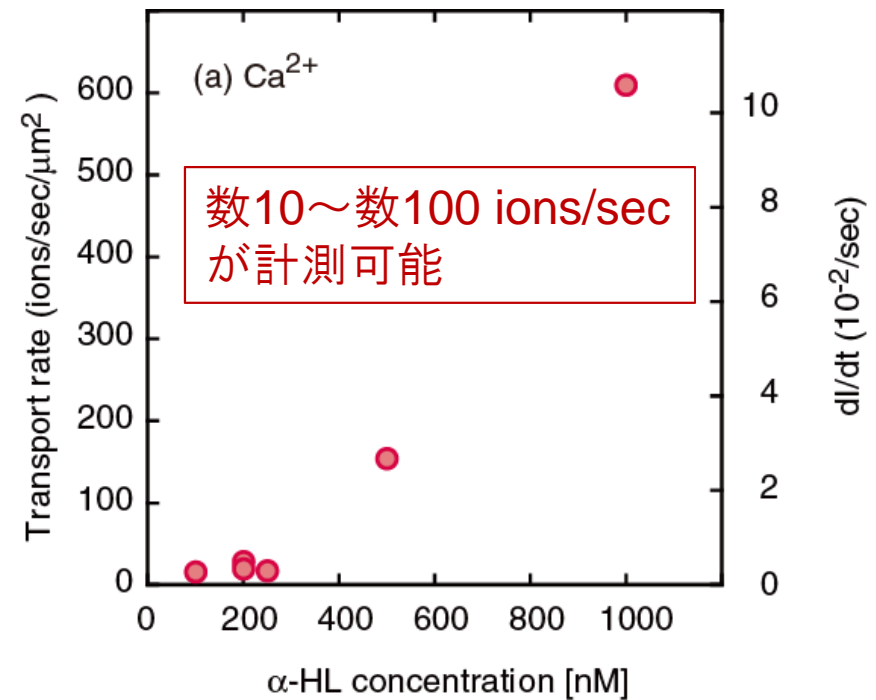
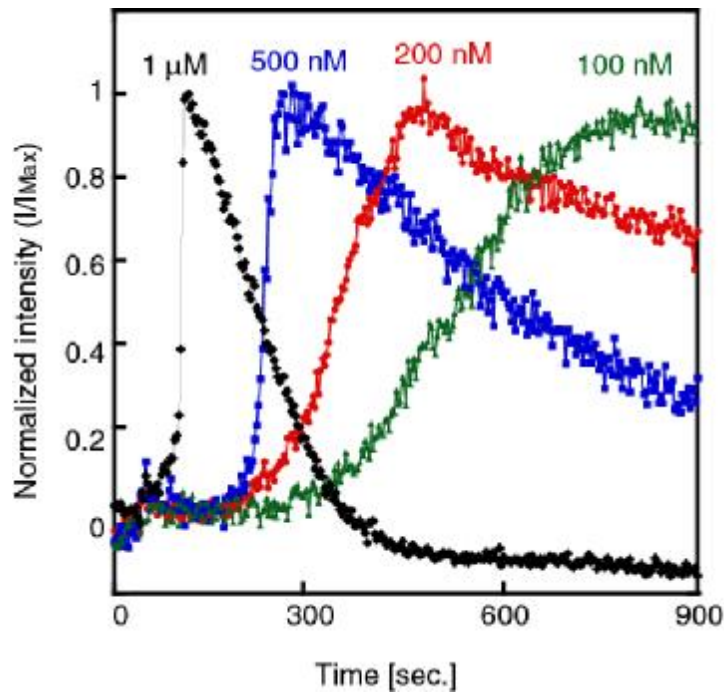
膜タンパク質をCa²⁺イオンが透過



井戸内に封入した蛍光プローブが発光



イオン透過の膜タンパク質濃度依存性



微小井戸の小さな容積のため、わずかなイオン透過でもイオン濃度の大きな変化



分子レベルでのタンパク質機能計測
高感度バイオセンサー

人工細胞型ナノバイオデバイスに向けた課題

- } 検出効率の向上
 - } 単一チャネルの計測
 - } 時間分解能の向上

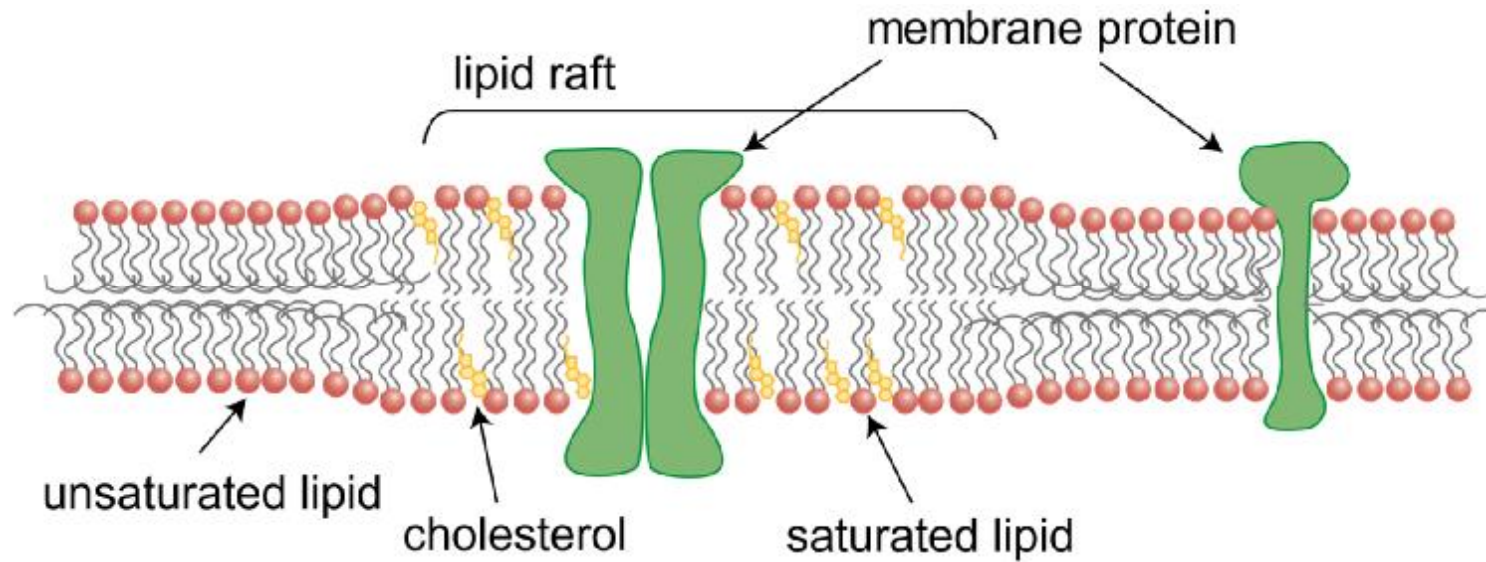
- } デバイスのlifetimeの延長

- } 架橋膜への膜タンパク質の配置
 - } プロテオリポソームの膜融合制御

- } 脂質二分子膜の機能化
 - } ラフト様構造のデバイスへの導入
 - } 脂質膜の側方拡散の制御

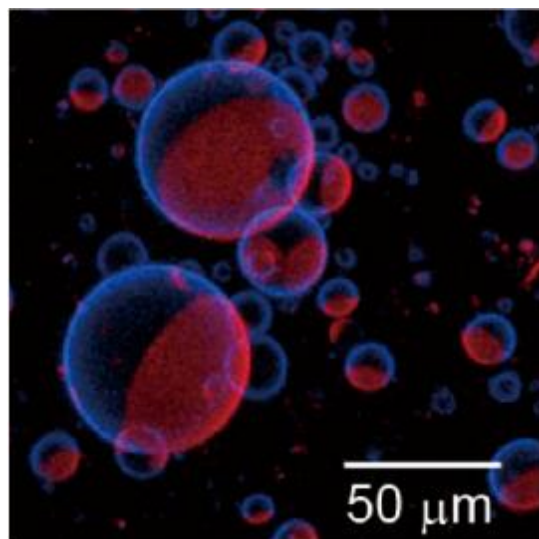


細胞膜のラフト構造

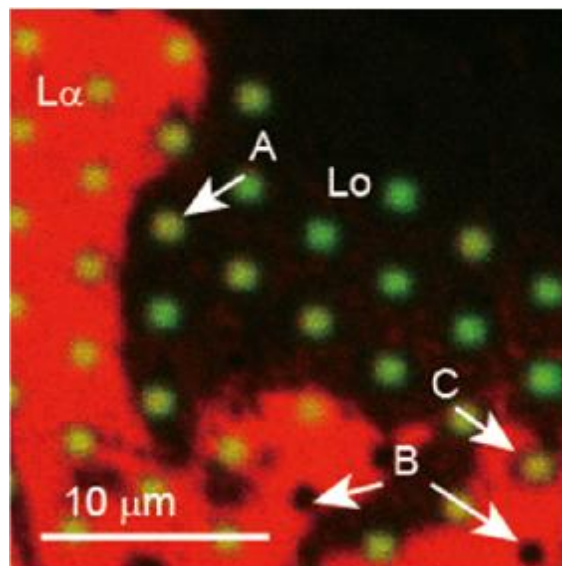


- 膜タンパク質の分布，局在
 - 膜タンパク質の機能化
 - 信号伝達
- ➡ 疾病との深い関連

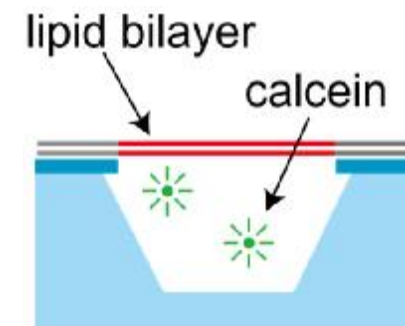
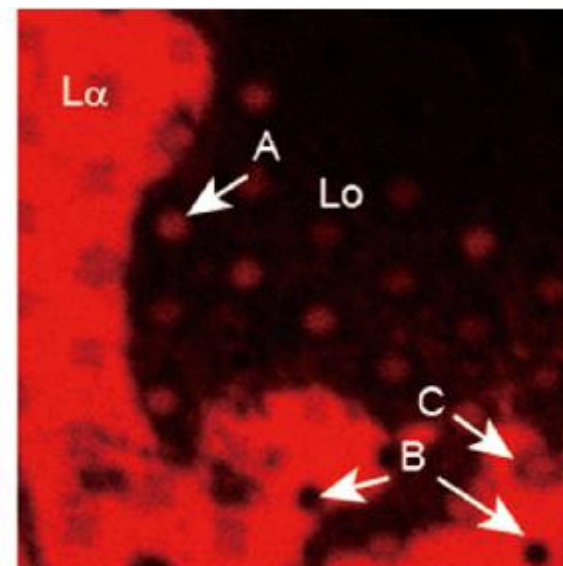
架橋膜におけるラフト様構造



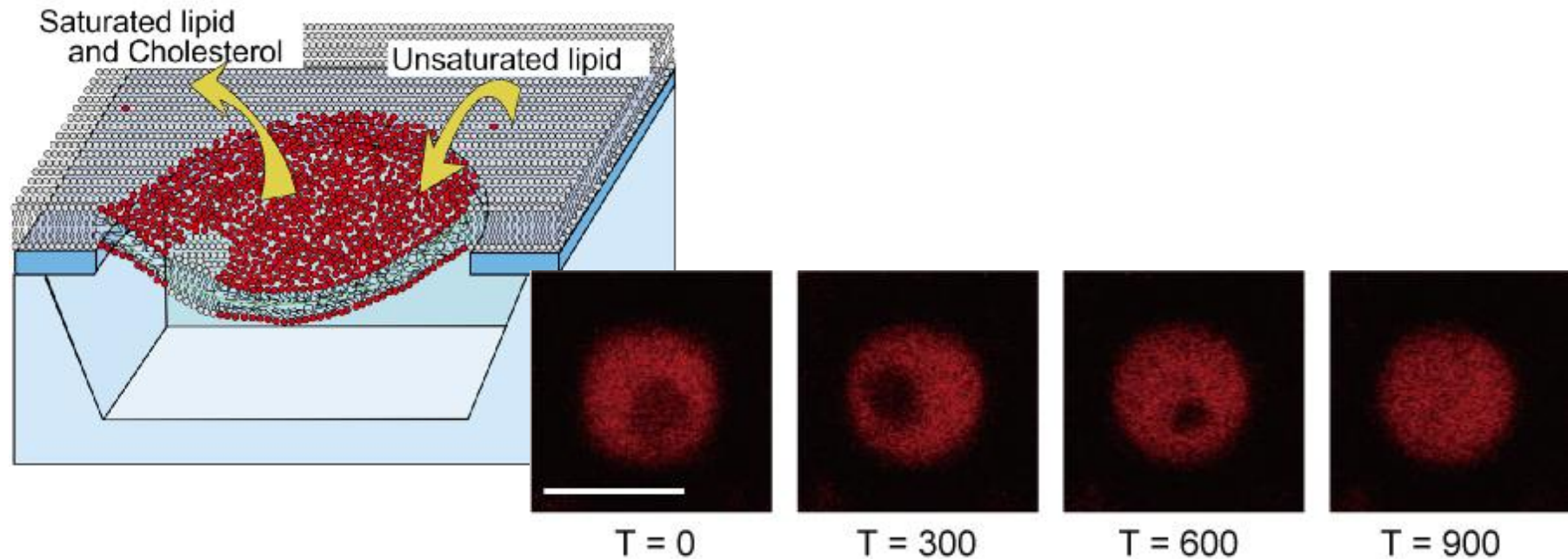
相分離ベシクル



マイクロウエル
上の脂質膜



架橋膜と支持膜の間の異方的側方拡散

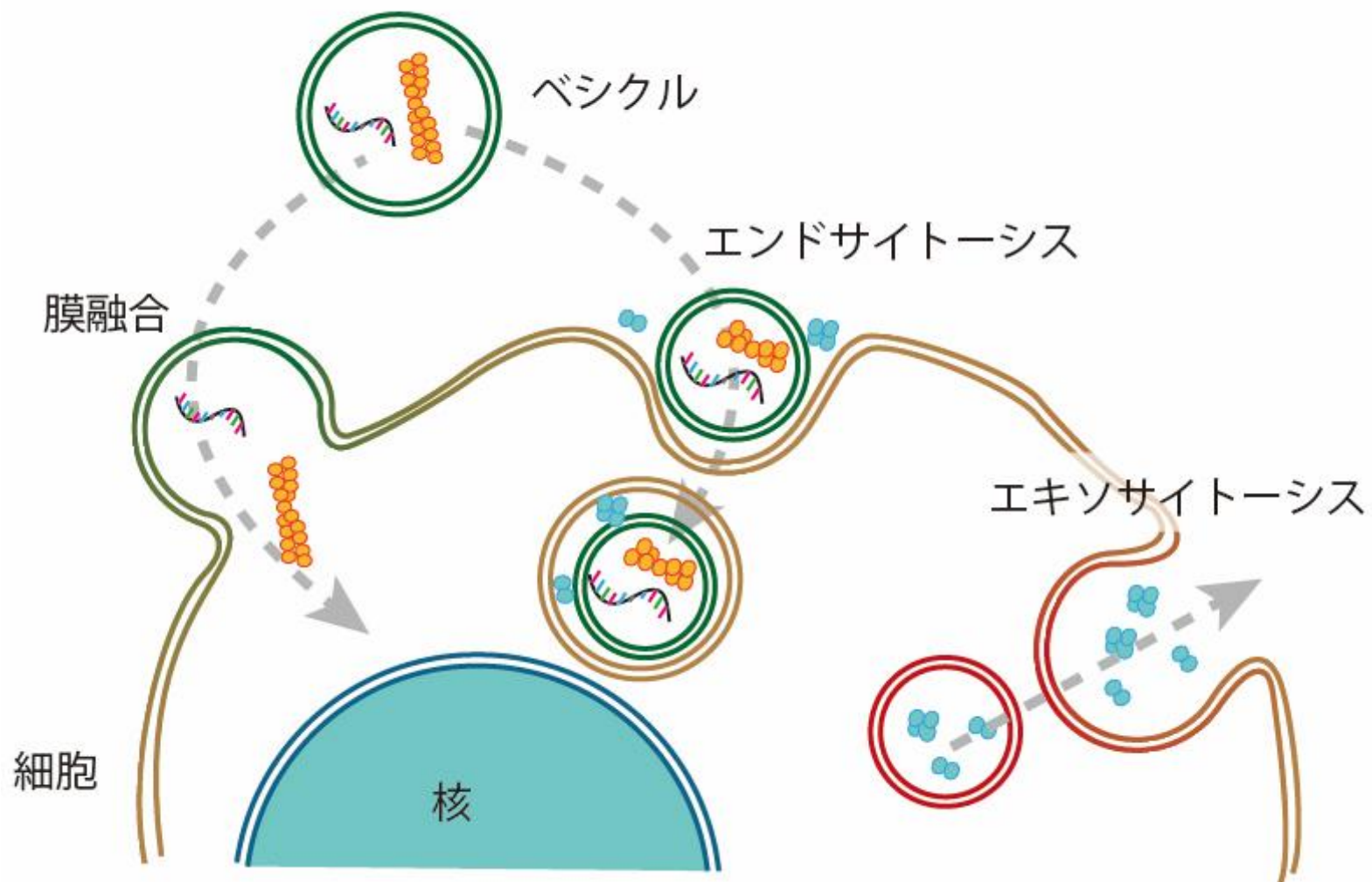


- 架橋膜では流動性の高いLa相の方が安定
 - 架橋膜あるいは支持膜との境界での膜形状 Bending energyの減少
- 飽和脂質, コレステロールは架橋膜から支持膜へ
不飽和脂質は架橋膜に凝集

Contents

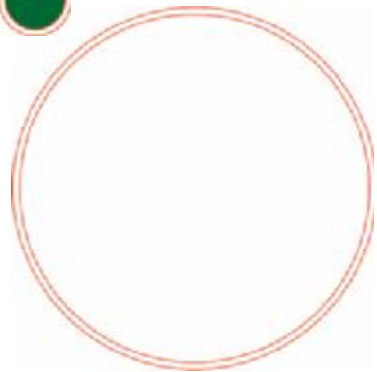
- } 背景
 - } マイクロウエル架橋膜と人工細胞
- } 膜タンパク質の機能計測
 - } イオン透過計測
 - } ラフト様相分離
- } 脂質膜の融合
 - } ベシクル融合
 - } ウイルスの融合
- } 課題と今後の展望

膜融合と細胞における物質輸送



ベシクル融合

蛍光封入ベシクル



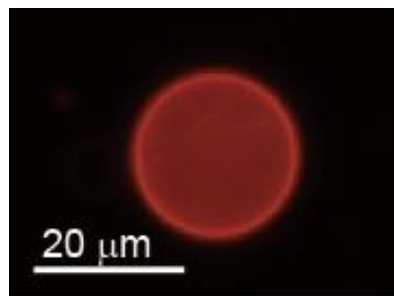
融合



融合制御要素

- 溶液の塩濃度やpH
- 脂質の電荷
- 脂質の種類, 構造

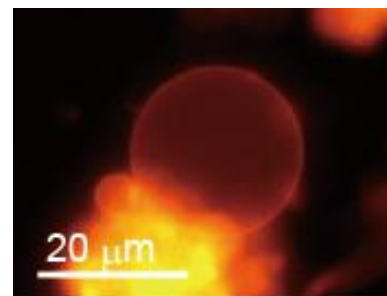
巨大ベシクル (GUV)



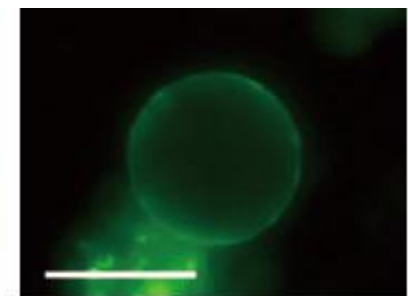
20 μm



CaCl₂なし

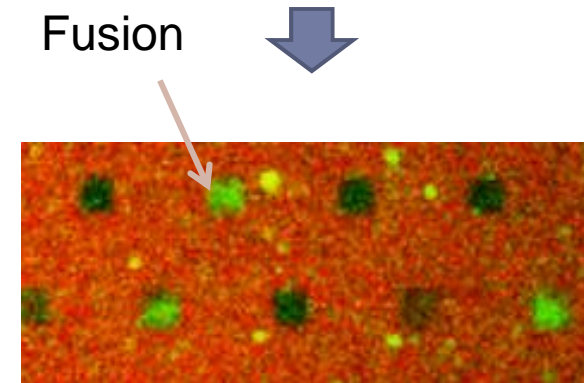
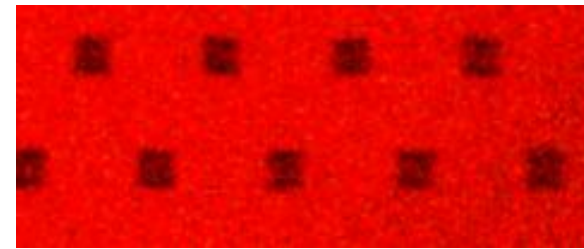
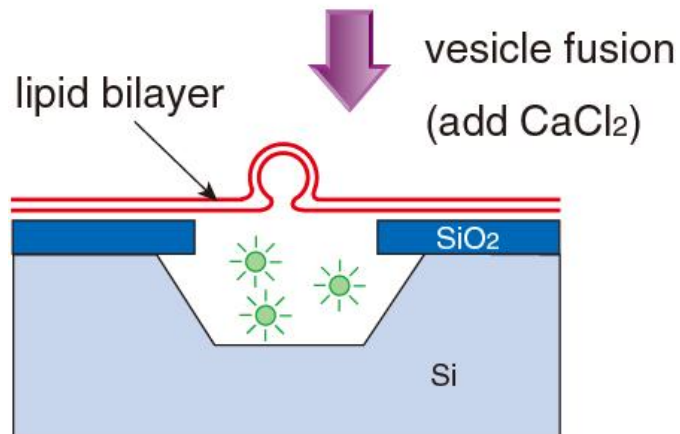
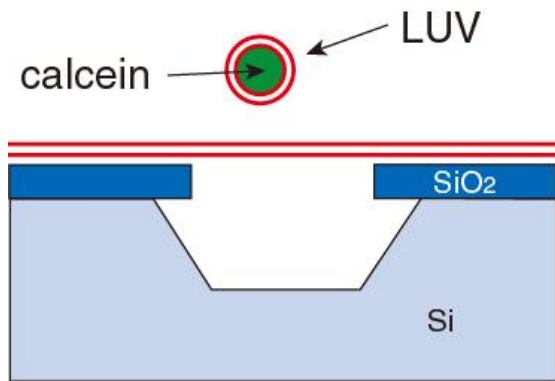


20 μm



CaCl₂ 1 mM

マイクロウェル架橋膜へのベシクル融合

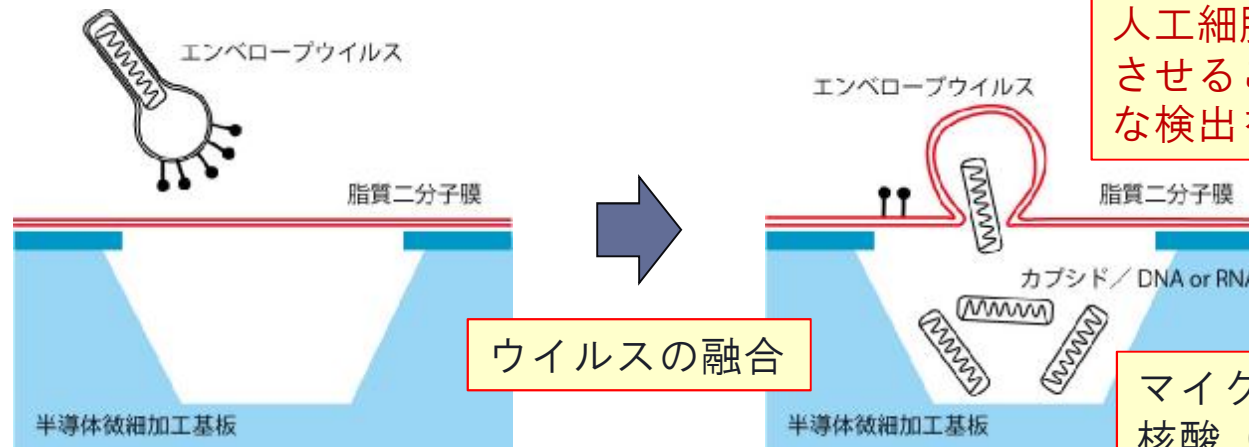


ウイルス感染能診断デバイス

特願2019-135654：「ウイルス感染能評価基板及びウイルス感染能評価方法」

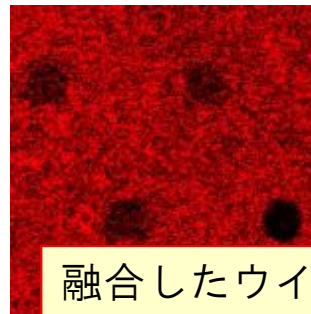
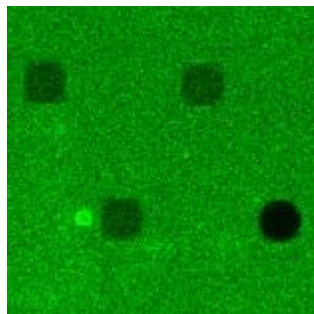
特願2019-135688：「脂質膜デバイス及び脂質膜デバイスの製造方法」

日本電信電話株式会社，三重大学 との共願

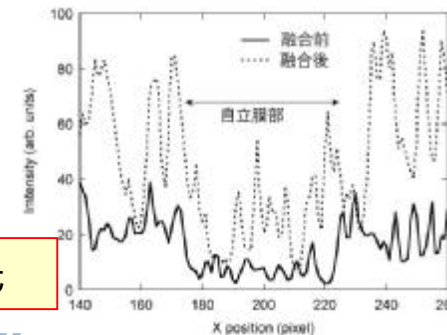


人工細胞膜にウイルスを融合させることで，安定で高感度な検出を可能にする

マイクロウェルに取り込んだ核酸（DNA, RNA）を検出



融合したウイルスからの蛍光



Contents

- } 背景
 - } マイクロウエル架橋膜と人工細胞
- } 膜タンパク質の機能計測
 - } イオン透過計測
 - } ラフト様相分離
- } 脂質膜の融合
 - } ベシクル融合
 - } ウイルスの融合
- } 課題と今後の展望

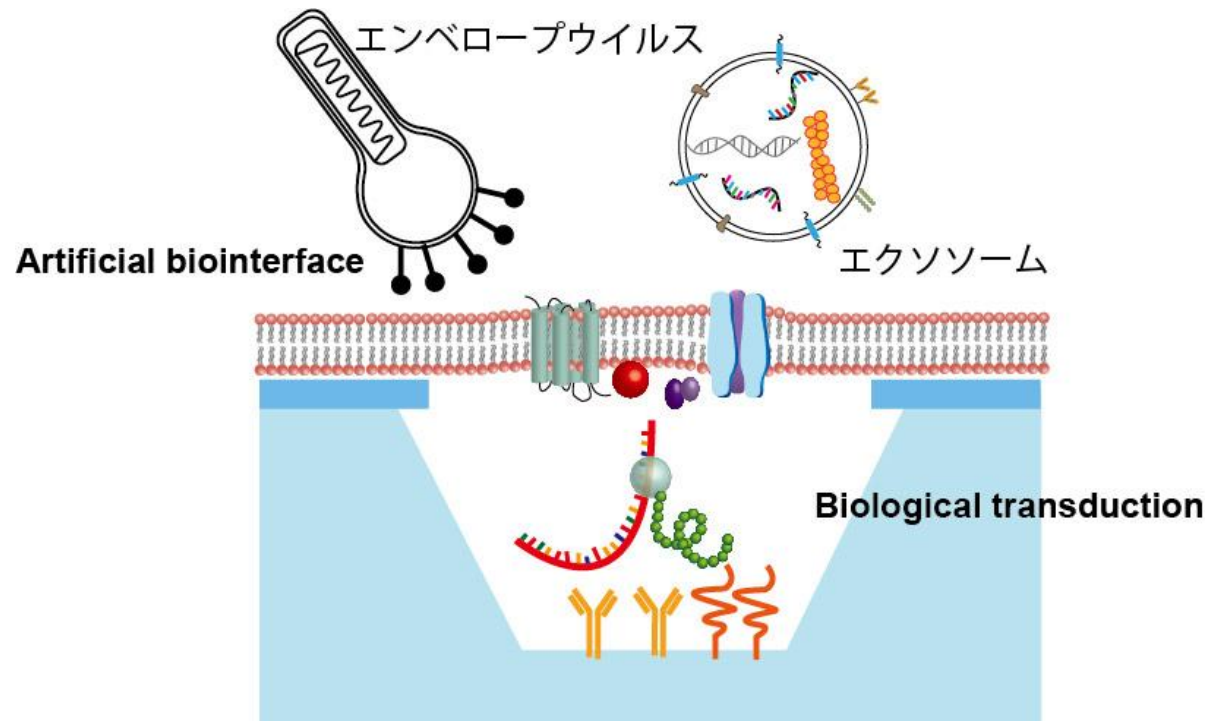
まとめ

- } 人工脂質膜によるマイクロウエルのシール
 - } 膜タンパク質が生体内と同様に機能する場の構築
 - } マイクロウエルの小さな容量により，イオン透過の高感度検出を実現

- } マイクロウエル架橋膜における相分離制御
 - } ラフト様構造の導入（脂質膜の機能化）

- } 脂質膜融合の制御
 - } ウィルスやエクソソーム等の内容物の評価を提案

まとめ



- 人工脂質膜で人工的なバイオインターフェイス
- マイクロウエル内で，細胞内のような反応場

解決すべき課題

- } 検出感度の向上
 - } 単一分子計測

- } ハイスループット化
 - } 大規模アレイ化
(作製効率の改善)
 - } 検出機構の簡易化
(電子デバイス化)

- } 機能の多様化, 安定化

期待する適用範囲

膜タンパク質レベル，分子レベルの検出
膜タンパク質そのものへの，直接的作用の検出

- } 膜タンパク質そのものの機能の理解
 - } 機能化のメカニズム，生体内での情報伝達メカニズムの理解

 - } 医療・健康・創薬の分野への貢献
 - } 疾病の診断（高感度バイオセンサー）
 - } 疾病発症メカニズムの解明
 - } 対症薬の探索（ハイスループットスクリーニング），薬効や副作用の検証
-



Acknowledgements

- } 兵庫県立大学

- } 中谷悠人
- } 原田幸輝
- } 安原杏実
- } 部家彰
- } 乾徳夫

- } NTT物性科学基礎研究所

- } 大嶋梓
- } 檜村吉晃
- } 上野祐子
- } 中島寛
- } 河西奈保子
(現 首都大学東京)

- } 三重大学

- } 湊元幹太

関西広域連合からのお知らせ

関西広域連合が実施するセミナーをご聴講いただき、ありがとうございます。

自社のPR、共同研究開発を想定されている新技術・新製品の内容、解決したい技術課題・相談内容などがございましたら、発表者の氏名と併せて、電子メールで以下の送付先へお送りください。

送付先 : sangyoinfo@kouiki-kansai.jp

問合せ先 : 関西広域連合 広域産業振興局

TEL:06-6614-0950