

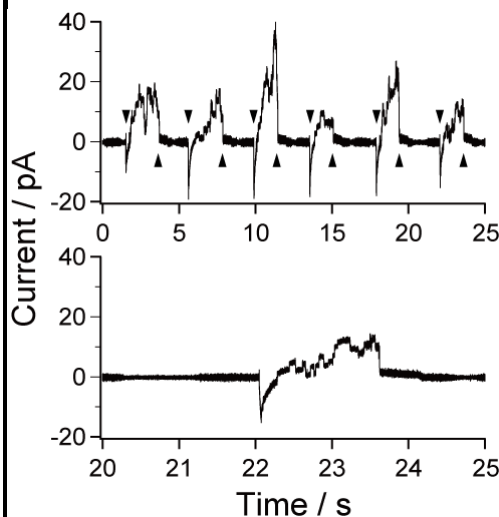
研究成果報告書

研 究 題 目		生体電気信号計測による創薬スクリーニング装置の開発	実 施 年 度
			2017 年度
代 表 研 究 者	所 属	岡山大学・大学院自然科学研究科・生命医用工学専攻	
	氏 名	井 出 徹 印	
1. 研究の目的・背景 【背景】 チャネル蛋白質は生体電気信号の発生・制御に関係する分子で（膜を介したイオン性電流を生じさせる）、チャネル蛋白質の欠陥が原因である多くの疾患群（チャネル病）が知られており、早急な治療薬開発が求められている。ところが、好適なセンサーデバイスが無いことから、創薬スクリーニングを動物実験等の時間がかかる方法に頼らざるを得ず、治療薬の開発が遅れている。 蛋白による電気信号に対する薬剤の効果を直接計測すれば、高感度の評価装置（スクリーニング装置）となるが、従来の生体電気計測は効率が極めて低く、創薬スクリーニングに使用できない。そこで、我々は全く新しい電気信号計測技術を開発し、測定効率を著しく上げることを試みた。 我々が開発した方法は、微細に加工した金属表面に蛋白を固定し電気計測を実施する新しい方法であり、本法による計測がより安定で、汎用性が高いものとなれば、医薬品創薬におけるスクリーニング装置の実用化に向けて大きく前進できるものと期待され、医療に大きく寄与できるものとする。また、このようなチャネル病創薬支援の産業に対する波及効果も極めて大きいものと考えられる。 【目的】 チャネル蛋白質の欠陥に起因する疾患（チャネル病）に対する治療薬の評価用センサーの開発を行う。即ち、原因となる蛋白質からの生体電気信号を用いた、治療用薬剤のハイスループットスクリーニング装置を開発する。装置開発には、我々が基礎研究用に独自に開発した新しい人工細胞膜形成法を応用する。この技術とマイクロ流路技術を組み合わせることにより、電気信号計測の自動化が可能となり、高効率な装置の作製に繋がるものと考えられる。 新しく開発した計測法では、親水修飾した金属電極に脂質溶液層を通過させることによって、電極表面に人工細胞膜を形成させる。膜の形成に要する時間は制御可能であり、数秒以内に電気信号を計測できる状態になる。チャネル蛋白質は電極表面に固定されており、人工膜の形成と同時に膜に組込まれる。本研究の目的は、この方法を改良し汎用性を高め（生体のイオンチャネルに適用すること）、測定効率を上げることにある。			

2. 研究成果及び考察（申請時の計画に対する達成度合を織込む）

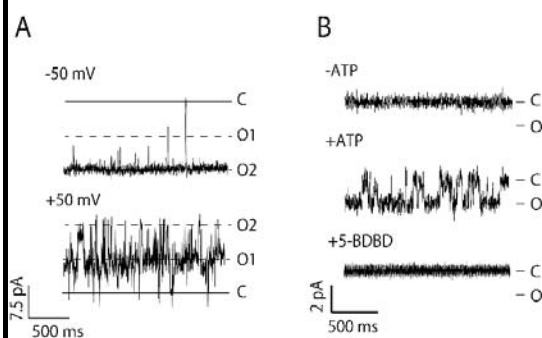
研究計画は、大きくは（i）人工細胞膜形成法の改良（ii）組み込み法の改良 に分けられる。具体的には、（i）には、測定チャンパー、電極などの材質、形状、修飾法の改良・製作、（ii）には、蛋白質の固定・修飾法の開発が含まれるが、（i）（ii）は不可分であり、実際の測定結果から（i）（ii）の改良を繰り返した。

（i）膜形成法の改良：人工細胞膜は金属電極と水溶液の界面に形成した。親水性高分子で修飾した金属電極にリン脂質溶液を通過させ、水溶液層と接触させることにより、先端部に人工膜を作った。漏れ電流を減じ、かつ膜形成効率を上げるために、電極の素材、形状、修飾法を検討した。電解研磨した金電極の他に、金線先端をハサミで斜めに切断したものを用いても良好な結果が得られた。何れの場合も安定な二重層膜形成が見られ、グラミシジン等のチャンネル形成ペプチドによる単一チャンネル電流計測も容易に行うことが出来た。下図は本法による人工膜形成の繰り返しを示している。数秒以内に人工膜形成が可能となった。



従来法では人工膜形成に数分から数十分を要していたので、測定効率を数十倍に高めることが可能となり、初期の目標を達成し得たと考えている。

（ii）チャンネル蛋白組み込み法の改良：電極表面に固定したチャンネル蛋白質を直接人工膜に組み込んだ。蛋白の組込効率が最大となるように、電極の素材および形状、表面修飾法、チャンネルの固定法を検討した。電解研磨した金電極表面に界面活性剤を用いて精製したチャンネル蛋白を His-tag を介して結合させ、人工膜に再構成した。電極表面に脂質二重層膜が形成されるのとほぼ同時にチャンネル蛋白が膜中に組み込まれることを確認した。BK、P2X4 等のヒトチャンネル蛋白の組込に成功しており、賦活剤、阻害剤による活性の制御も測定可能となった。現状では上述の方法が最も測定効率が良いが、引き続き表面修飾法などを検討中である。下図 A, B は各々 BK、P2X4 チャンネルによる単一チャンネル電流記録である。



（iii）測定の自動化：マイクロ流路技術との融合に向けて、電極先端の形状検討を行った。ガラス管を用いた微小電極をモデルとして、水溶液の流動に耐え得る膜形成法（電極の形状）を検討した。これを用いて、チャンネル形成ペプチドの活性測定が安定して行えるようになった。また、この方法により、上記（i）（ii）を自動化することに成功した。この成果は申請時には予定していなかったもので、計画を越える成果が得られたものと考えている。

3. 経費の使用状況（申請時の計画に対する実績を記述）

助成金額は 125 万円。

申請時には、試薬、電子部品等消耗品費を約 90%、旅費を 10%程度計上したが、概ね計画通り使用した。内訳は、消耗品費約 100 万円、旅費約 18 万円である（この他に大学の管理費約 6 万円）。消耗品費は主に、チャネル蛋白の発現・精製に用いる分子遺伝学・生化学試薬、および測定装置の構築に使用した電子部品、電極作製用の素材、試薬類である。旅費は、研究協力先である光産業創成大学院大学（浜松）への出張旅費、および研究会（ナノテクノロジー融合研究会、2018.3.2、北九州）での成果発表のための旅費とした。

4. 将来展望（今後の発展性、実用化の見込み等について記述）

これまでに、本研究で開発した方法によって、主要なチャネル蛋白数種類の計測に成功している。今後の課題は、さらに適用可能なチャネル蛋白の種類を増やすことで、より汎用性の高い装置に改良していくことである。本研究で計測に成功した P2X4、BK チャネルは疾病に直接関与する蛋白であり、これらの疾病に対する創薬支援への道が拓けたと言える。一方で、計測の自動化に成功はしたが、未だ装置は大きく、計測にはある程度習熟した技術者が必要である。よりコンパクトで操作性の高い装置に改良していく必要がある。

本研究の最終目標は、創薬スクリーニングを支援するハイスループットデバイスを開発することにある。このためには、チャネル電流の計測効率をさらに数十倍引き上げる必要がある。そこで、現状では同時に計測可能な蛋白数は数個までであるが、これを数十から数百倍にすることを計画している。本研究の成果とマイクロ流路技術を組み合わせることにより、多チャネル同時計測装置の構築を予定している。

5. 成果の発表（学会での発表、学術誌への投稿等を記載。予定を含む）

〔学術論文〕

Daichi Okuno, Minako Hirano, Hiroaki Yokota, Junya Ichinose, Takamitsu Kira, Taiki Hijiya, Chihiro Uozumi, Masahiro Yamakami and Toru Ide.

A gold nano-electrode for single ion channel Recordings.

Nanoscale, 2018, 10, 4036-4040.

〔学会発表〕

①Toru Ide, Minako Hirano. Artificial bilayers on a substrate for channel recordings. 9th International Workshop on Nanostructures & Nanoelectronics. Sendai (2018)

②井出 徹, 山上 真弘, 平野 美奈子, 横田 浩章, 一ノ瀬 純也. Single channel recordings of ion channels immobilized on a solid substrate. The 55th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan. Kumamoto (2017)

③平野 美奈子, 川島 信幸, 富田 正久, 井出 徹. Automated system for channel current measurements. The 55th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan. Kumamoto (2017)

④Toru Ide, Minako Hirano. Single molecule measurement of ion-channel proteins. 8th International Workshop on Nanostructures & Nanoelectronics. Sendai (2017)