

学 位 論 文 題 名

Fundamental Studies on Chemical Sensors Based on Bilayer Lipid Membranes
(脂質二分子膜に基づく化学センサーの基礎研究)

学位論文内容の要旨

生体膜ではそこに存在するタンパク質によって高感度・高選択的な物質認識、情報変換が行なわれている。この生体膜を形成し、蛋白質やキャリアの保持体となっているのが厚さ50 Åの脂質二分子膜である。この膜は、膜を構成する脂質分子が整然と配向を保ち、かつ超薄膜であり、従来液膜型イオン選択性電極でキャリアのメディアとして広く用いられている液膜などと比較すると非常に異なる膜といえる。また、イオノフォアや蛋白質等による物質の選択的認識により、transmembrane signalling（膜電位の変化や膜透過性の変化）が生ずるのもこの膜の大きな特徴といえる。私はこの様な数々の特徴を有する脂質二分子膜に基づく化学センサーの可能性を、高木-Montal法による平面脂質二分子膜を用いて膜電位変化及び膜透過性変化を指標として研究・評価した。

(1) 天然及び人工イオノフォア含有脂質二分子膜の電位応答挙動の基礎研究

イオノフォアを感応膜とした膜電位の研究は従来液膜型イオン選択性電極を中心に広く行なわれてきた。私は今回、脂質二分子膜に天然及び人工イオノフォアを含有させ、その応答挙動を観察し、イオン認識の感度、選択性、ダイナミックレンジ等の観点において液膜のそれらと比較・研究した。また、純人工脂質を用いて高木-Montal法により平面脂質二分子膜の作製に初めて成功し、膜表面電荷の影響についてバリノマイシンを用いて定量的に検討した。これらの検討に基づきセンサー感応膜としての脂質二分子膜の特徴的な機能を明らかにした。高木-Montal法による平面脂質二分子膜は黒膜、リボソーム、Tip-Dip法による二分子膜に比べて膜構造の制御、操作性、安定性の面で卓越している。脂質二分子膜は、以下の様に作製した。円形の孔（直径0.2 mm）をあけたテフロンフィルムで仕切った2つのテフロン製水槽に緩衝溶液を満たし、両槽の水面に、両性イオン性脂質としてL- α -phosphatidylcholine(PC)、電荷

を持たない中性脂質として 1,3-dipalmitolein(DPT), アニオン性脂質として L- α -phosphatidyl-L-serine(PS)、L- α -phosphatidylinositol(PI), カチオン性脂質として $(C_{12})_2$ -L-Glu-Ph- C_4N^+ , $(C_{12})_2N^+$ をそれぞれ cholesterol(chol)との混合溶液として展開した。有機溶媒が揮発した後、両槽の水面を同時に上げ、テフロンフィルムの小孔中に脂質二分子膜を作製した。イオノフォアは上記脂質溶液に相当量添加して膜中に組み込ませた。目的イオンは、アース側の水槽に加え、膜電位変化を両槽へ置いた Ag/AgCl 電極間の電位差としてエレクトロメーター(入力抵抗 $> 10^{15} \Omega$)で測定した。

イオノフォアとしては、単環性クラウンエーテル類、ビスクラウンエーテル類、クリプタン類、非環状イオノフォア類、ヘミスフェランド、脂溶性大環状ポリアミンなどを人工イオノフォアとして、また天然イオノフォアとしてはバリノマイシン(VM)、モネンシン等について検討を行った。VM含有脂質二分子膜は K^+ イオンに対し Nernst 的な応答を示し、このときの VM の含有率は感度に大きく影響した。感度は PC に対して VM がモル比で 5.6:1 以上で一定となり、このときの感度及び選択性は VM を用いた液膜型イオン選択性電極の値と同等であった。次に膜表面負電荷が電位応答へ及ぼす影響について検討した。用いた脂質と感度との関係は $DPT < PC < PS < PI$ となり膜表面の負電荷密度が上昇するにつれ感度が良くなることがわかった。膜表面正電荷の影響は、膜中の純人工カチオン性脂質の割合が増加するにつれて電位応答が Nernstian slope を保ったまま抑制された。液膜で広く用いられている人工非環状イオノフォアは、脂質二分子膜では電位応答を示さなかった。膜透過性の測定により、イオノフォアが膜中に存在し錯形成も行われていることが示唆されているので、電位応答挙動の違いに二分子膜の特性が反映されていると考えられる。また、クラウン化合物の脂質二分子膜における電位応答強度は、単環性クラウンエーテル $<<$ ビスクラウンエーテル $<$ クリプタンとなった。これらの結果より、用いた各種イオノフォア及びその錯体の形状と応答との関係を見てみると、どれだけ 3 次元的にイオンを包接しうるかが、二分子膜での応答を支配しているように考えられる。上記イオノフォアは全て液膜では応答するものなので、脂質二分子膜での応答挙動は二分子膜の特徴的な機能によるものと思われる。

(2) グルタミン酸イオンチャンネルセンサー

リセプターイオンチャンネルタンパク質によるリガンド受容時のシグナル増幅を伴

う情報変換は、生体膜が発現する最も興味深い高次機能の一つであり、高感度センシング膜の基本設計にとって重要な原理となる。私は、ラット小脳神経細胞シナプス膜より単離精製されたグルタミン酸リセプターイオンチャンネルタンパク質 (GluR) を、感応素子とした脂質二分子膜センサーのL-グルタミン酸 (L-Glu) に対する応答挙動を、シングルチャンネル型及びマルチチャンネル型について、チャンネル電流時間積分値 (シグナル増幅の直接的指標) に着目して解析を行ない、ダイナミックレンジ、検出限界を検討した。

GluRシングルチャンネル型センサーでは脂質二分子膜は、高木-Montal法によりポリイミドフィルムの小孔 (直径約 $20\ \mu\text{m}$) 中に作製した。成膜後 GluR をプロテオリボソームとして一方の水槽へ添加し、fusionにより脂質二分子膜中に包埋させ感応膜とした。目的物質である L-Glu はもう一方の水槽 ($\text{pH}=7.6$) に加えた。測定は両槽に設置した Ag/AgCl 電極間に $-100\ \text{mV}$ の定電位を印加し、そのときの電流変化を高入力インピーダンス増幅器で検出した。そのシグナルはフィルターを介し、コンピューターに取り込み解析した。GluR マルチチャンネル型センサーでは GluR 含有感応膜は、高木-Montal 法によって、片方の槽の脂質層とプロテオリボソームを展開したもう片方の槽の脂質層を張り合わせるにより作製した。ポリイミドフィルムは直径約 $120\ \mu\text{m}$ の孔を有するものを用いた。測定、解析は上記と同様な方法で行なった。

GluR シングルチャンネル型感応膜の作製に際しては検出シグナルがシングルチャンネル電流となる様に二分子膜の面積 (フィルムの小孔直径)、二分子膜支持材質、GluR の添加量、fusion の時間、溶液の pH、溶液の温度等を検討。その結果、検出電流シグナルはチャンネルの開閉に伴って矩形波を示し、チャンネルを通過したイオン数 (クーロン数) が L-Glu 濃度とともに増加し、特に L-Glu 濃度が $300\ \text{nM}$ から約 $3\ \mu\text{M}$ の領域では、顕著な濃度依存性を示した。GluR マルチチャンネル型感応膜においては、シグナルはシングルチャンネル電流の和として検出され、 $30\ \text{nM}$ から $300\ \text{nM}$ の範囲で L-Glu 濃度に依存してクーロン数が顕著に増加した。また、光学異性体である D-Glu と比較すると L-Glu に対して顕著な選択性を有することも見出された。このセンサーの増幅率を、単位時間 (S) 当たり一分子の感応素子 (GluR) によって誘起された膜透過イオン数の変化量と定義すると、上記のシングルチャンネル型センサーでは 1.9×10^7 となり極めて高いシグナル増幅が示された。上述のマルチチャンネルセンサー (十数個の感応素子を含む) の検出限界は、 $3 \times 10^{-8}\ \text{M}$ であったが、これはイオンチャンネルのシグナル増幅能によるものである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 梅 澤 喜 夫
副 査 教 授 多 賀 光 彦
副 査 教 授 谷 口 和 弥
副 査 教 授 魚 崎 浩 平
副 査 教 授 中 村 博

学 位 論 文 題 名

Fundamental Studies on Chemical Sensors Based
on Bilayer Lipid Membranes (脂質二分子膜に基
づく化学センサーの基礎研究)

申請者は脂質二分子膜に基づく化学センサーの可能性を、単分子膜貼り合わせ法による平面脂質二分子膜を用いて膜電位変化及び膜透過性変化を指標として研究・評価した。すなわち、種々の合成及び天然イオノフォアを包埋した脂質二分子膜を調製し、膜電位応答型イオンセンサーを製作し、またグルタミン酸リセプターイオンチャンネル蛋白を包埋した脂質二分子膜イオンチャンネルセンサーを製作し、いずれも基礎的に重要な結果を得ている。本論文は、三つの章からなる。

申請者はまず第一章において、化学センサーの種類、原理、歴史等について概説するとともに、利点と問題点を指摘しつつ、本研究の目的を示している。

第二章では、申請者は、まず種々の合成イオノフォアを包埋した脂質二分子膜に基づく、膜電位応答型イオンセンサーを開発している。22種の天然及び合成イオノフォアについて、それらを単分子膜貼り合わせ法により、種々の天然及び合成脂質二分子膜に包埋したセンサー膜を初めて調製した。バリノマイシン包埋脂質二分子膜 K^+ イオンセンサーについて、脂質の負電荷量は検出感度を上昇させカチオン性脂質膜はセンサーの感度及びダイナミックレンジを減少させることを見出した。イオン選択性

は液膜のそれと一致していることを見出した。イオノフォアの種類を変えた実験では、構造と電位応答の関係の経験則を見出した。すなわち、イオノフォアの種類により、膜電位が観測されるものとされないものがあることがわかった。電位応答を示さなかったイオノフォアについて、イオノフォア包埋二分子膜のゲストイオン誘起による膜コンダクタンスの測定より、 Hg^{2+} イオンに対する非環状イオノフォアの一つ、及び dibenzyl-14-crown-4 を除く全てのイオノフォアが溶出せず膜中に存在し、選択的錯形成も行われていることを実証した。それに基づき、金属イオンを三次元的に包み込み、その結果十分に疎水的な錯体が形成しうるかどうかが二分子膜での電位応答の生起に関わっていることを見出した。これは、液膜がこれらすべてのイオノフォアについて電位応答を示すことと対比し、重要な発見であり、申請者はこれを金属イオン／イオノフォア錯体の構造と二分子膜界面での電荷分離の関連として議論した。

第三章で、申請者はラット小脳神経シナプス後膜より単離精製されたグルタミン酸リセプターイオンチャンネル蛋白質 (GluR) を感応素子とした脂質二分子膜センサーを製作した。L-グルタミン酸 (L-Glu) に対する応答を、シングルチャンネル型及びマルチチャンネル型についてチャンネル電流の時間積分値として測定し、ダイナミックレンジ、検出限界、選択性等を評価した。その結果 GluR シングルチャンネル型感応膜は L-Glu 濃度が 300 nM から 3 μ M の領域で、また GluR マルチチャンネル型感応膜では 30 nM から 300 nM の範囲で、傾きの鋭い検量線を得た。また申請者はこのセンサーのシグナル増幅率を、単位時間 (s) 当り一分子の GluR により誘起された膜透過イオン数と定義し、その実測値 1.9×10^7 を得た。また、マルチチャンネルセンサーの L-Glu 濃度に対する検出下限は 3×10^{-8} M 以下であることが明らかとなった。

以上のように申請者は、脂質二分子膜を比較的安定に制御しつつ、種々の人工及び天然イオノフォア包埋二分子膜イオンセンサー及びグルタミン酸リセプターイオンチャンネル包埋二分子膜に基づく、グルタミン酸イオンチャンネルセンサーを初めて基礎開発した。これらの研究の、その基礎化学に対する寄与は顕著なものがあり、また参考論文 4 編はいずれも国内外の権威ある学術雑誌に掲載されたものである。因って、審査員一同は、申請者が博士 (理学) の学位を受けるのに、十分な資格を有するものと認定した。