

学 位 論 文 題 名

人工及び天然イオノフォアを包埋した脂質二分子膜を
用いる化学センサーの基礎研究

学位論文内容の要旨

脂質二分子膜は、厚さ50~60 Åのイオン透過性の極めて低い脂質分子配向膜である。脂質二分子膜を構成要素とする生体膜は、膜蛋白質がイオン・分子を認識し、引き続いて膜電位変化や膜透過性変化に情報変換を行っている。また、生体膜中のレセプターチャネル蛋白などは、1分子の認識を膜を横切る多数個のイオンの流れに情報変換する様な信号増幅機能を持つ。今までに、膜蛋白を感応素子とする脂質二分子膜を用いるセンシング膜が、十数例報告された。しかしながら、従来からイオン選択性電極（ISE）に用いられている人工及び天然イオノフォアを感応素子とする脂質二分子膜を用いるセンシング膜は、膜電位応答型バリノマイシン包埋脂質二分子膜と水溶液中のノナクチンによるイオン輸送に基づく脂質二分子膜のみである。

本論文は、脂質二分子膜を用いるイオン・分子認識、情報変換に基づく電気化学センシングを一般化するために、従来ISEに用いられていた人工イオノフォアを脂質二分子膜に直接包埋することを試み、選択的イオン認識に引き続く情報変換を実験的に考察したものである。具体的には天然及び人工イオノフォアを直接包埋した脂質二分子膜の目的イオン認識によるイオン選択的膜透過性変化とイオン選択的膜電位（電荷分離）応答を検討した。また、従来ISEに電位応答改善のために用いられてきた脂溶性のアニオン性サイトを膜電位応答の改善のために初めてイオノフォアと同時に脂質二分子膜に包埋し、膜電位応答を検討した。

本論文は4章から構成されている。

第1章「序論」においては、これまでのイオン・分子認識及び情報変換機能を有する膜を用いた電気化学センサー及び脂質二分子膜を用いるセンサーについて、また、過去に報告された脂質二分子膜の作製法、電気化学特性及びイオノフォアを介するイオンの膜透過（キャリアーメカニズム）について概説し、イオノフォア包埋脂質二分子膜のセンシング膜としての位置付けについて述べた。

第2章「膜透過性変化に基づく人工イオノフォア包埋脂質二分子膜センサー」では、イオノフォアを含む膜と含まない膜のバックグランドコンダクタンス（目的イオンが膜の両側に無い場合）を比較することによって、単分子膜貼り合わせ法（Folding法）によって形成されたフォスファチジルコリン及びコレステロールから成る脂質二分子膜に11種の内7種の人工イオノフォアを包埋できることを初めて示した。

さらに得られたイオノフォア包埋脂質二分子膜の内、valinomycin及びETH 4120を各々包埋した脂質二分子膜は、バルクにおけるイオノフォアの選択性を反映して目的イオ

ン濃度に依存したコンダクタンス差（バックグランドコンダクタンスを差し引いた値）が増加することを見い出した。このとき、目的カチオンはcis側のみに添加しており、cis側が負電位のときにも目的カチオン濃度に依存してコンダクタンス差が増加すること及び目的カチオンの対アニオンに脂溶性の高い対アニオンを用いたときにコンダクタンス差がさらに増加することを見い出した。これらの結果から、イオノフォア包埋脂質二分子膜におけるイオン透過は、従来考えられてきたイオノフォアによる目的カチオンの輸送（キャリアメカニズム）に加えてイオノフォア錯体カチオンをゲートとする対アニオンの対向透過によることを初めて見い出した。また、7種のイオノフォアを各々包埋した脂質二分子膜についても、各目的イオン濃度に依存したコンダクタンス差の増加が観測された。

さらに、本章では、Folding法及びtip-dip法によるイオノフォア包埋脂質二分子膜の信号増幅能及び検出限界を比較した。tip-dip法によるイオノフォア包埋脂質二分子膜は、検出限界がFolding法による膜より劣り、信号変換比（イオノフォア1分子が1秒間に透過させるイオン数）によって評価した信号増幅能は、Folding法による膜に比べて1~10万倍優れていることを見い出した。

第3章「膜電位変化に基づく人工イオノフォア包埋脂質二分子膜センサー」では、イオノフォア包埋脂質二分子膜を電位応答型センシング膜として一般化するために、Folding法による6種の人工イオノフォアを各々包埋した脂質二分子膜及びvalinomycin包埋脂質二分子膜の膜電位応答について検討した。また、膜電位応答及び膜抵抗を制御することを目的として、従来液膜型ISEの電位応答の改善のために用いられている脂溶性のアニオン性サイト（potassium tetrakis(4-chlorophenyl)borate (KTPClPB)及びsodium tetrakis(4-fluorophenyl)borate (NaTFPB))を初めてイオノフォア包埋脂質二分子膜に包埋し、影響を検討した。

イオノフォア包埋脂質二分子膜の膜電位測定では、膜抵抗と測定装置の入力インピーダンスが合わない場合が多い。アニオン性サイトを同時に包埋することにより膜抵抗値が低下し、測定装置とのインピーダンスマッチングが達成され、膜電位を測定できる割合が60%から100%に向上した。

イオノフォア包埋脂質二分子膜の膜電位応答については、目的イオンに対してNernstian応答を示す膜（valinomycin及びETH 4120包埋膜）と示さない膜に分かれること、Nernstian応答を示さない膜については、バルクにおけるイオノフォアの選択性を反映する膜（cryptand包埋膜）と反映しない膜（dibenzo-30-crown-10, ETH 1001及びbis(12-crown-4)包埋膜）に分かれることを見い出した。これらのイオノフォア包埋脂質二分子膜にアニオン性サイトを同時に包埋することによって、目的イオンに対してNernstian応答する膜は検出下限が低下すること、Nernstian応答しない膜はNernstian応答を示しかつバルクの選択性を反映するようになることを初めて見い出した。また、これらのアニオン性サイト包埋による膜電位応答改善の結果から、膜電位発生時に脂質二分子膜内部において電荷中性則が達成されなくても良いとする従来の考えを不十分とする知見を得た。

第4章「総括」では、本研究を通じて見い出された知見について要約した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 魚 崎 浩 平

副 査 教 授 喜 多 村 昇

副 査 教 授 下 村 政 嗣

副 査 教 授 梅 澤 喜 夫 (東京大学大学院理学系研究科)

学 位 論 文 題 名

人工及び天然イオノフォアを包埋した脂質二分子膜を用いる化学センサーの基礎研究

人工脂質二分子膜 (BLM) は、生体膜におけるイオン・分子認識、情報変換及び信号増幅の機能に学ぶ新たな化学センシングの場となる。過去に膜蛋白質や天然イオノフォアを包埋したBLMセンサーが十数例報告されたが、BLMは一般性のある定量的な分析反応場として未だ確立されていない。本研究は、膜界面でのイオン・分子認識に基づき情報変換及び信号増幅がイオンの膜透過性、膜電位の変化として、いかに高精度・高感度に達成されるかを多くの人工及び天然イオノフォアを例に、定量的な化学センシング法としての基礎となる知見を得る目的で行われた。

具体的には、まず、液膜型イオン選択性電極 (ISE) に用いられている種々の人工イオノフォアを単分子膜貼り合わせ法により作製したBLMに直接包埋できることを初めて示した。

次に、作製した人工及び天然イオノフォア包埋BLMの目的イオン選択的な膜透過性変化を実験的に検討した。イオノフォア包埋BLMの膜コンダクタンスは、イオノフォアの錯形成の選択性を反映する濃度依存性を示した。その際、イオノフォアによる目的カチオンの輸送に加えて目的イオン/イオノフォア錯体を介する対アニオンの対向輸送が起こることを初めて見出した。さらに、ティップ・ティップ法により作製したイオノフォア包埋微小BLMは、一個のイオノフォアが千個のイオンを透過させる増幅能を持つことを見出した。

また、イオノフォア包埋BLMの目的イオン選択的な膜電位変化を実験的に検討した。ISEの電位応答の改善に用いられているアニオン性サイトをイオノフォア包埋BLMに初めて包埋した。BLMは高膜抵抗 (約100GΩ) のため測定装置とのインピーダンスマッチングが達成し難く電位測定が困難であったが、膜にアニオン性サイトを包埋することによって膜抵抗の制御を実現し、全ての膜について膜電位測定を可能にした。アニオン性サイトの包埋は、膜電位応答を著しく改善し、検討した全てのBLMについてイオノフォアの錯形成の選択性を反映したネルンストな電位応答が達成されることを見出した。また、アニオン性サイト包埋の影響の検討により、膜電位発生時にBLM内部の電気的中性が達成されなくても良いとする従来の説を不十分とする知見を得た。

本研究は、脂質二分子膜界面でのイオノフォアによる選択的イオン認識を、如何に定量的に膜電位及び膜透過性変化に情報変換・増幅するかという点に関して、化学にとって一般的に重要な基礎知見を与え、また化学センシングの基礎ともなる点において大き

な価値を有するものである。参考論文は、2編あり、いずれも英文で国際誌に掲載済みあるいは掲載決定済みである。

以上、審査員一同は申請者が博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと判定した。