

脂質膜でシールした微小井戸構造におけるイオンリーク評価 Estimation of Ion Leakage through Microwells Sealed with a Lipid Bilayer

NTT 物性基礎研[○] 梶村吉晃, 大嶋梓, 住友弘二

NTT Basic Res. Labs.,[○] Yoshiaki Kashimura, Azusa Oshima, Koji Sumitomo

E-mail: kashimura.yoshiaki@lab.ntt.co.jp

【緒言】我々はシリコン基板上の微小井戸を脂質膜でシールし、膜タンパク質を再構成することによって、膜タンパク質の機能を利用したバイオデバイスの構築を目指している。これまでに我々は、上記構造の作製方法やデバイス動作原理の確認について報告してきた[1]。低ノイズ・高感度なデバイス作製のためには、いかに効率よく微小井戸内部を脂質膜でシールするかが課題の一つである。本研究では、井戸内部に Ca^{2+} インジケータを封入し、外液から井戸内部への Ca^{2+} イオンリークを定量的に評価、検討した。

【実験】微小井戸基板($\phi \sim 4 \mu\text{m}$)を Ca^{2+} インジケータ(fluo-4 10 μM)を含むグルコース溶液に浸すことにより、井戸構造内部を蛍光プローブで満たした。巨大脂質膜ベシクル(DPhPC:Cholesterol=8:2, Rhod-DPPE 1mol%) を基板上に沈降させた後、NaCl 20 mM を加えることにより展開した。蛍光プローブを含まないグルコース溶液で外液を置換した後、外液に CaCl_2 (終濃度 1 mM) を加え、蛍光観察を行った。

【結果と考察】Fig. 1 は fluo-4 を封入した微小井戸の蛍光像の経時変化である。 CaCl_2 を加えた直後はほとんど蛍光強度の変化は見られないが、20分程度で脂質膜パッチの外側から中心へ向かって蛍光強度の増加が見られた。Fig. 2 は脂質膜パッチの外側、中間、中心付近の井戸について、それぞれ蛍光強度をプロットした結果である。この結果から、 Ca^{2+} イオンは脂質膜を通してではなく、主

に脂質膜と基板との間の水層を通じて井戸内部へ拡散してきたと考えられる(Fig. 1b)。水層を通じた Ca^{2+} イオンの井戸内部への流入量(J_{Ca})は、 $J_{\text{Ca}} = C_{\text{sat}} N_A V/S (dI/dt)$ と表される[1]。ただし、 C_{sat} : 外液の Ca^{2+} 濃度、 N_A : アボガドロ数、 V : 井戸の体積、 S : 井戸と水層が接する有効面積である。水層の厚さをすでに報告されている 2 nm とすると、Fig. 2 の結果から脂質膜パッチの外側、中間、中心の井戸について、それぞれ $J_{\text{Ca}} \sim 100, 15, 3$ (ions/sec/ μm^2)となる。また、脂質膜パッチの縁から井戸までの距離と、蛍光強度増加の立ち上がりまでの時間との関係から、水層を通じた Ca^{2+} イオンの拡散定数は $0.5 \sim 1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 程度と見積もることができ、脂質分子と同程度の拡散定数を持つことがわかった。

[1] K. Sumitomo *et al.*, Appl. Phys. Express, **3**, 107001 (2010); K. Sumitomo *et al.*, Biosens. Bioelec., **31**, 445 (2012).

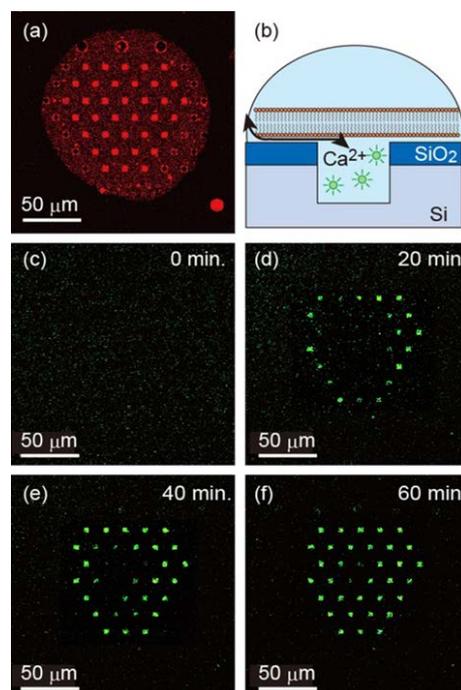


Fig. 1 (a) 脂質膜パッチの蛍光像、(b) デバイス構造(c-d) fluo-4 の蛍光強度変化。

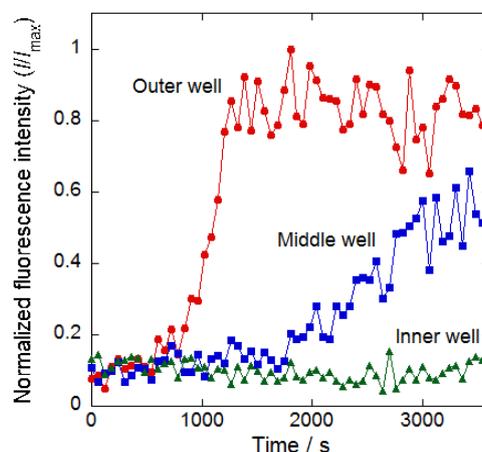


Fig. 2 Ca^{2+} インジケータを封入した微小井戸の蛍光強度変化。