

補助事業番号 2021M-168

補助事業名 2021年度 体液診断への応用を目指したOn-Chipナノポアセンサの開発  
補助事業

補助事業者名 長岡技術科学大学 庄司 観

## 1 研究の概要

脂質二分子膜中に再構築されたポア形成膜タンパク質を用いたナノポアセンシング技術は、高い時間分解能を有し、一分子検出が可能であることから、DNAシーケンサや体液診断技術への応用が期待されている。近年、マイクロ流体デバイスを用いた高効率脂質二分子膜形成技術が報告されているが、膜形成に精密な流量制御が必要であることから、体液サンプルの前処理など他の機能を複合することは困難である。そこで本研究では、サンプル前処理用のマイクロ流体デバイスと独自のプローブ型膜形成システムを組み合わせたOn-Chipナノポアセンサの開発を行った。On-Chipナノポアセンサの開発により、より低コスト・簡易・高効率な体液診断技術の創製に繋がる。

## 2 研究の目的と背景

従来の脂質二分子膜形成マイクロ流体デバイスでは、精密な流量制御が必要であるため、膜形成以外の機能を付加することができず、サンプルの前処理が必要である体液診断への応用が困難であった。そこで本研究では、サンプル前処理用のマイクロ流体デバイスとプローブ型膜形成システムを組み合わせることで、体液診断に応用可能なナノポアセンサの開発を目指す。

## 3 研究内容

### (1) 体液サンプル前処理用マイクロ流路の開発に関する研究

(<https://mcweb.nagaokaut.ac.jp/~kshoji/research/>)

本研究では、体液サンプルと標識分子を様々な濃度比で混合可能なマイクロ流体デバイスを開発した。特に本研究では、2種類・3種類・4種類の溶液を混合可能なマイクロ流体デバイスをデザインし、有限要素法シミュレーションを用いてその機能を検証した(図1)。その後、フォトリソグラフィ・機械加工・3Dプリンティングを用いて、マイクロ流体デバイスを作製し、疑似体液であるDNA混合溶液およびナノポアセンシングに使用するポア形成膜タンパク質溶液をマイクロ流体デバイスに流しその機能を検証した。

2液混合マイクロ流体デバイスを作製し着色溶液を流入させた結果、シミュレーション通りに溶液が混合させることが分かった(図2)。さらに、3Dプリンタを用いて、3液混合マイクロ流体デバイス及び4液混合マイクロ流体デバイスの作製を試みた。しかしながら、3Dプリンタの解像度が不足していたため、流路がふさがってしまい作製できなかった。今後は、流路サイズの検討および高解像度な3Dプリンタを用いることで本マイクロ流路を構築する。

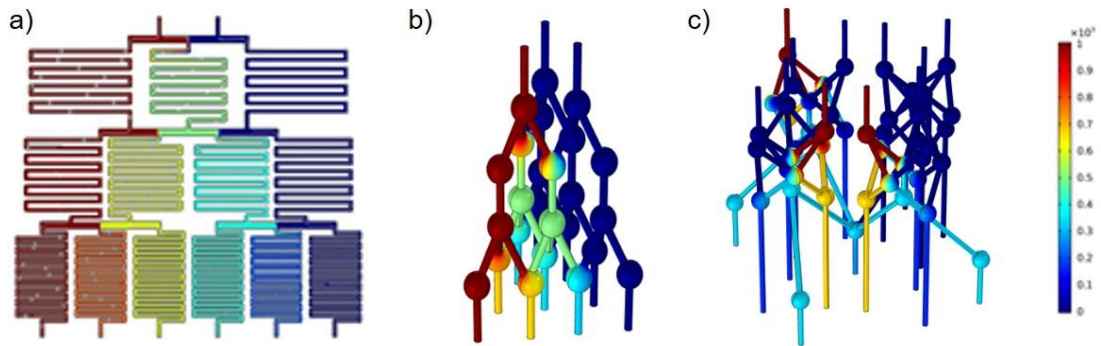


図1 溶液混合マイクロ流路のシミュレーション結果。a)2液混合, b)3液混合, c)4液混合マイクロ流路

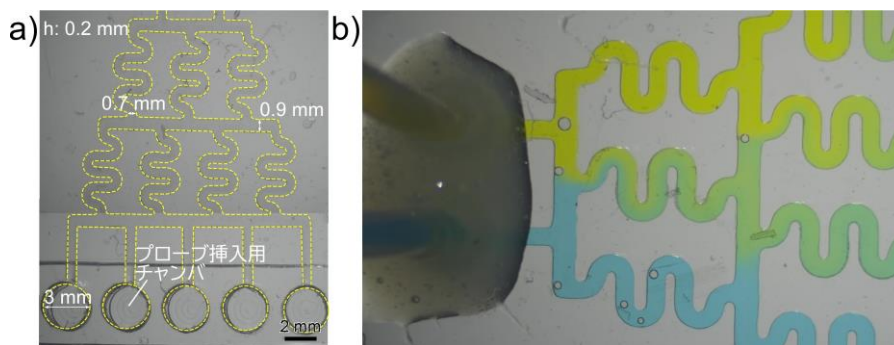


図2 a) 2液混合マイクロ流路の顕微鏡写真および b) 溶液混合の様子

## (2) ナノポアセンシングの自動化に関する研究

(<https://mcweb.nagaokaut.ac.jp/~kshoji/research/>)

マイクロ流体デバイスで体液を処理した後に効率的なナノポアセンシングを実行するために、ナノポアセンシングの自動化を試みた。我々の研究グループでは、電解液と脂質溶液が層となった浴溶液にマイクロ電極を挿入することで、電極先端に脂質二分子膜を形成する技術を有しており、プローブを上下動させることで簡便に脂質二分子膜を形成することが可能である(K. Shoji et al., Anal. Chem., 2020.)。脂質二分子膜を形成すると、浴溶液中に含まれるポア形成膜タンパク質が自律的に膜に再構築されナノポアが形成される。パッチクランプアンプを用いてナノポアを流れるイオン電流を計測することで、本ナノポアを通過する標的分子を電気的に検出することができる。そこで本研究では、ナノポアを通過するイオン電流をフィードバックシグナルとしてプローブの上下動を自動化することで、自動的にナノポアセンシングが可能なシステムの構築を試みた(図3)。

本自動ナノポアセンシングシステムを用いて、ナノポアセンシングにおいて使用予定の $\alpha$ HLナノポアのチャンネル電流計測を行った。その結果、2つ目のナノポアが脂質二分子膜に再構築されたことをイオン電流値から判断し、ステージを上下動させ脂質二分子膜を再形成することに成功した(図4)。さらに、本自動システムを用いて1時間以上脂質二分子膜の形成を繰り返し実行できることが分かり、本システムを用いることでハイスループットなナノポアセンサを構築可能であることが示唆された。

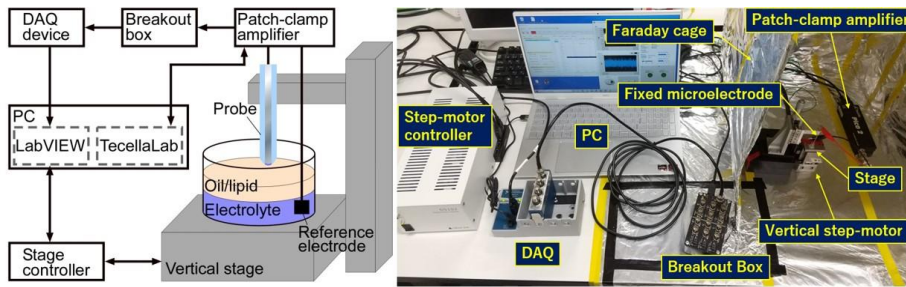


図3 自動ナノポアセンシングシステムの概略図および写真

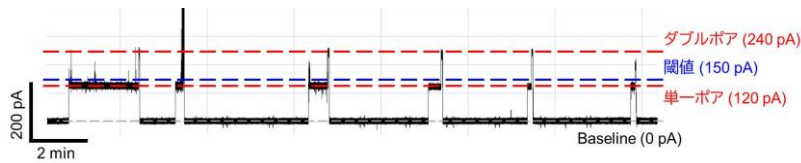


図4 自動ナノポアセンシングシステムによって得られた $\alpha$ HLのチャネル電流

### (3) 生体サンプルを用いたmiRNAの検出実験に関する研究

(<https://mcweb.nagaokaut.ac.jp/~kshoji/research>)

2液混合マイクロ流体デバイスに、疑似生体サンプルを流し、標的分子の検出実験を行った(図5)。疑似体液としてDNA分散溶液を流し、DNA濃度の異なる溶液を一度に形成した。その後、マイクロ流路の出口部分に脂質二分子膜を形成するマイクロ電極を挿入しナノポアセンシングによるDNA検出実験を行った(図5)。その結果、各流出口において人工細胞膜を形成することに成功し、ナノポアを通過するチャネル電流計測に成功した(図6a)。また、DNAが含まれていると考えられる溶液においては、DNAのナノポア通過による阻害シグナルを確認した。本阻害シグナルのイベント頻度を解析した結果、各流出口で得られた阻害頻度に違いがあることが分かった(図6b)。阻害頻度は、溶液中の標的分子濃度に依存しているため、本マイクロ流体デバイスによりDNA濃度の異なる溶液が形成されたと考えられる。以上の結果より、本マイクロ流体デバイスとプローブ型人工細胞膜形成システムを組み合わせることで、本申請研究の目標であったOn-Chipナノポアセンサの概念を実証できた。

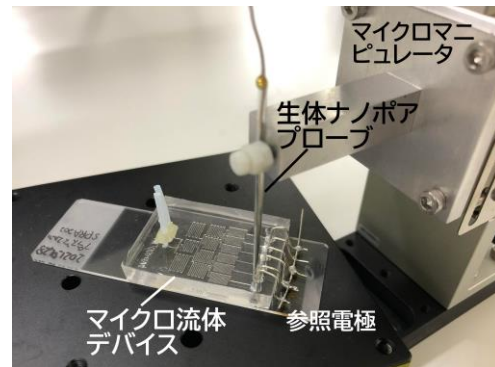


図5 On-Chip ナノポアセンサの写真

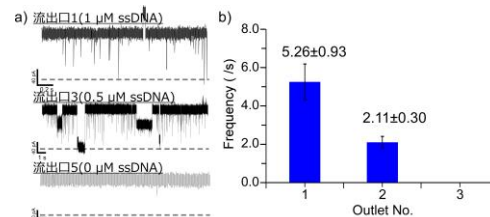


図6 a) ナノポアセンシングにより得られた各流出口における電流波形 b) 電流波形から阻害頻度を解析した結果

#### 4 本研究が実社会にどう活かされるか—展望

本研究では、体液サンプルを下処理するマイクロ流体デバイスとプローブ型人工細胞膜システムを組み合わせることで、体液処理から標的分子検出までOn-Chipで実行可能なバイオセンシングプラットフォームの構築に成功した。本システムは、非常にシンプルな構造であり、さらにプローブ位置制御という非常に簡便な手法によりナノポアセンシングシステムの自動化に成功した。そのため、血液・汗・尿などの体液中に含まれる生体分子を検出し診断するリキッドバイオプシーへの応用が期待できる。従来使用されてきた、PCRや執拗分析装置などの高額で操作の煩雑な危機を用いる現在の手法では、検体採取から解析までに数日を有し、専門的な知識も求められており、コスト・時間・人件費・設備費などの理由から広く普及していなかった。本システムは、体液液診断による早期がん診断やドーピング検査の「迅速化」「低コスト化」「簡略化」に寄与できる。さらに、マイクロRNAが関与する様々な生命現象を理解するための解析装置として、生命科学分野に幅広く寄与できる。

#### 5 教歴・研究歴の流れにおける今回研究の位置づけ

これまで、プローブ型人工細胞膜システムを開発し簡便なナノポアセンシング技術を確立していた。本研究により、マイクロ流体デバイスとの組み合わせが実現したことで、体液診断などより高度な検査技術への応用展開が可能となった。

#### 6 本研究にかかわる知財・発表論文等

学会発表

1. 庄司 観, “マイクロ流路と生体ナノポアプローブを組み合わせたセンサシステム”, Cheminas44, 2021.11.
2. Vu Xuan Viet, 吉原 諒, 庄司 観, “電流フィードバックによる人工細胞膜形成システムの開発”, 第5回分子ロボティクス年次大会, 2021.11.

#### 7 補助事業に係る成果物

特になし

#### 8 事業内容についての問い合わせ先

所属機関名: 長岡技術科学大学 技学研究院 機械系

(ナガオカギジュツカガクダイガク ギガクケンキュウイン キカイケイ)

住 所: 〒940-2188

新潟県長岡市上富岡町1603-1

担 当 者: 准教授 庄司 観 (ショウジ カン)

担 当 部 署: 技学研究院 機械系 (ギガクケンキュウイン キカイケイ)

E - m a i l: kshoji@mech.nagaokaut.ac.jp

U R L: <https://mcweb.nagaokaut.ac.jp/~kshoji/>