

ナノ粒子が細胞膜を透過する現象の理解 ：分子動力学計算および平面脂質膜法による解析

大阪府立大学大学院工学研究科物質・化学系専攻化学工学分野

仲村 英也

In next generation cosmetics utilizing nanoparticles, the nanoparticles are often required to translocate across a cell membrane. Application of the external electric field has been utilized to increase the cell membrane permeability, however, damage to the cell can be a great concern. Using a molecular dynamics simulation, we here show that even under a weak external electric field that is lower than the membrane breakdown intensity a cationic nanoparticle directly translocates across a model cell membrane without membrane disruption. We then reveal its physical mechanism. At the contact interface between the nanoparticle and the cell membrane, the electric potential across the membrane is locally enhanced by superimposing the nanoparticle surface potential on the externally applied potential, resulting in the nanoparticle direct translocation. Our finding implies that by controlling the nanoparticle-induced local enhancement of the membrane potential the cellular delivery of nanoparticles via non-endocytic and non-disruptive pathway can be realized.

1. 緒言

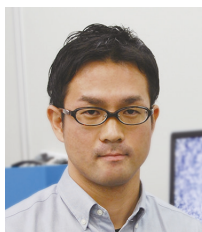
ナノ粒子を利用した治療・診断技術の開発が活発に行われている。ナノスケールのサイズと、それに起因して発現する特異的な諸特性を利用して、薬物や遺伝子の送達キャリア、ハイパーサーミア、フォトサーマル治療、バイオイメージングなどへの応用が精力的に研究されている¹⁾。化粧品においても、ナノ粒子を活用したいわゆるナノ化粧品の開発が活発化している。これらのナノ粒子医療技術やナノ化粧品においてその効果を最大限に引き出すには、ナノ粒子は標的となる細胞の内部に送達される必要がある。そのためには、ナノ粒子は細胞を覆う最も基本的な生体障壁である細胞膜を透過しなければならない。一方で、ナノ粒子の種類によっては、粒子が細胞膜を透過して細胞内部まで到達すると、生体へのリスクが高まる場合もある。すなわち、十分な効能と安全性の両方を兼ね備えたナノ粒子医療技術やナノ化粧品を実現するには、ナノ粒子が細胞膜を透過する現象を理解し、これを精密に制御するための学理が必要である¹⁾。

ナノ粒子と生細胞との相互作用は幅広い分野において関心が高く、最近の研究をまとめると、ナノ粒子の細胞膜透過経路はエンドサイトーシスと直接透過の大きく2つに大別されることが分かってきた¹⁾。エンドサイトーシスは生細胞固有の生物的取り込み機能として知られている。細胞膜が変形してナノ粒子を包み込んで小胞を形成し、最終的

にこの小胞ごと細胞内にナノ粒子が取り込まれる。一方、直接透過経路は、ナノ粒子が小胞化されずに細胞内に直接輸送される透過経路である。生細胞にナノ粒子が作用した場合の多くは、エンドサイトーシスが最もよく発現する主要な透過経路であることが分かってきた。しかしながら、エンドサイトーシスによって取り込まれたナノ粒子は小胞から脱出できず、結果的に送達効率が低下してしまうという課題がつかまとう。一方で、直接透過経路は小胞にトラップされずにナノ粒子を細胞内部に送ることができるため、これを実現できれば高い送達効率が期待できる。しかしながら、直接透過は自発的には起こりにくい透過経路であるため、これを何かしらの工夫で促進する必要がある。

直接透過を促進する手法として、電場・超音波・磁場などの外力場を印加する物理的手法がこれまで提案されている。その中で、電気穿孔法(エレクトロポレーション)は、細胞に外部から電場を印加することで、一時的に膜透過性を向上させ、エンドサイトーシスを介さずに物質を細胞内部に直接送達する手法である。近年では、ナノ粒子の細胞内送達への応用も多数報告されており、粒子を高効率で細胞内に直接送達できることが見出されている²⁾。一方で、過度な高電場の印加は、細胞死を引き起こすことが欠点となる。従って、電場印加環境におけるナノ粒子の細胞膜透過を適切に制御し、高い送達効率と低侵襲性を両立することが望まれる。しかしながら、電場印加時のナノ粒子の細胞膜透過メカニズムは明らかとなっていない。

以上の背景のもと、本研究では電場印加環境におけるナノ粒子の細胞膜透過現象に焦点を当て、これを分子動力学(MD)シミュレーションにより詳細に解析した。その結果、「微弱な電場の印加によってナノ粒子が細胞膜を直接透過する」新奇的な透過現象を見出し、そのメカニズムを明らかにしたので報告する³⁾。加えて、平面脂質膜法を用いた実験系の構築にも取り組んだので、これについても報告する。



Understanding of direct translocation of nanoparticle across cell membrane: analysis by molecular dynamics simulation and planer lipid bilayer method

Hideya Nakamura

Department of Chemical Engineering,
Osaka Prefecture University

2. 計算方法

本研究では、粗視化分子動力学法(Coarse Grained-Molecular Dynamics: CG-MD)により、電場印加時のナノ粒子の細胞膜透過現象を解析した。粗視化分子動力学法は、複数の原子をある1個の相互作用点(粗視化サイト)で代表させ、この粗視化サイトのダイナミクスを追跡することで系全体の分子のダイナミクスを計算する手法である。これにより、本研究で必要となるナノ粒子、細胞膜、溶媒層からなる比較的大きな計算領域(一辺が20nm以上)を扱うことができる。粗視化サイト間の相互作用を規定する力場には、生体分子用に近年開発されたMARTINI粗視化モデル⁴⁾を用いた。Fig. 1に、本研究で用いた計算系を示す。モデル細胞膜には、生細胞膜の基本骨格である脂質二重膜を用いた。脂質二重膜は、両イオン性リン脂質DPPCおよび負帯電性リン脂質DPPGの2成分で構成し、一般に表面が負に帯電している実際の生細胞膜を模擬した。このモデル細胞膜を2つ配置し、互いに独立した2つの溶媒区画を設けて、これらを細胞の外内に見立てた。各溶媒区画には分極を考慮した粗視化水分子⁵⁾とナトリウムイオンおよび塩化物イ

オンを挿入し、生理食塩水と等張な154mM NaCl aq.とした。ナノ粒子には、様々な治療・診断へ活用されているアルカンチオール修飾正帯電性金ナノ粒子⁶⁾をモデルナノ粒子として用いた。ここで、本透過現象において粒子の表面電位は重要な因子である。そこで、末端が正電荷を持つアンモニウム基で修飾された8-アミノ-1-オクタンチオール(amino-OT)と、電荷がゼロの無極性1-オクタンチオール(OT)の割合(amino-OT: OT)を変化させて、表面電位が異なる粒子を用意した(Fig. 1C and D)。ナノ粒子の粒子径はどれも同等で約4nmである。これらを用いて、ナノ粒子の表面電位が透過現象に及ぼす影響を解析した。ナノ粒子は細胞膜の上部に配置し、計算の初期状態を得た。電場 E の印加を計算に考慮するため、電荷 q_i を有する系内の全粗視化サイトに外力 $F=q_iE$ を付与した。電場 E は膜の法線方向下向きに印加した。電場の印加によって発生する膜電位(膜の内表面を基準とした外表面の電位差)を、印加膜電位 $\Delta\psi_{\text{appl}}$ と定義した。ここで、印加膜電位は $\Delta\psi_{\text{appl}}=Ed$ により算出した。 d は細胞膜の膜厚であり、本研究では $d=4\text{nm}$ で一定とした。また、膜の穿孔・破壊が起こり始める臨界印加膜電位を $\Delta\psi_{\text{appl,C}}$ と定義し、粒子を含まない条件で計算を

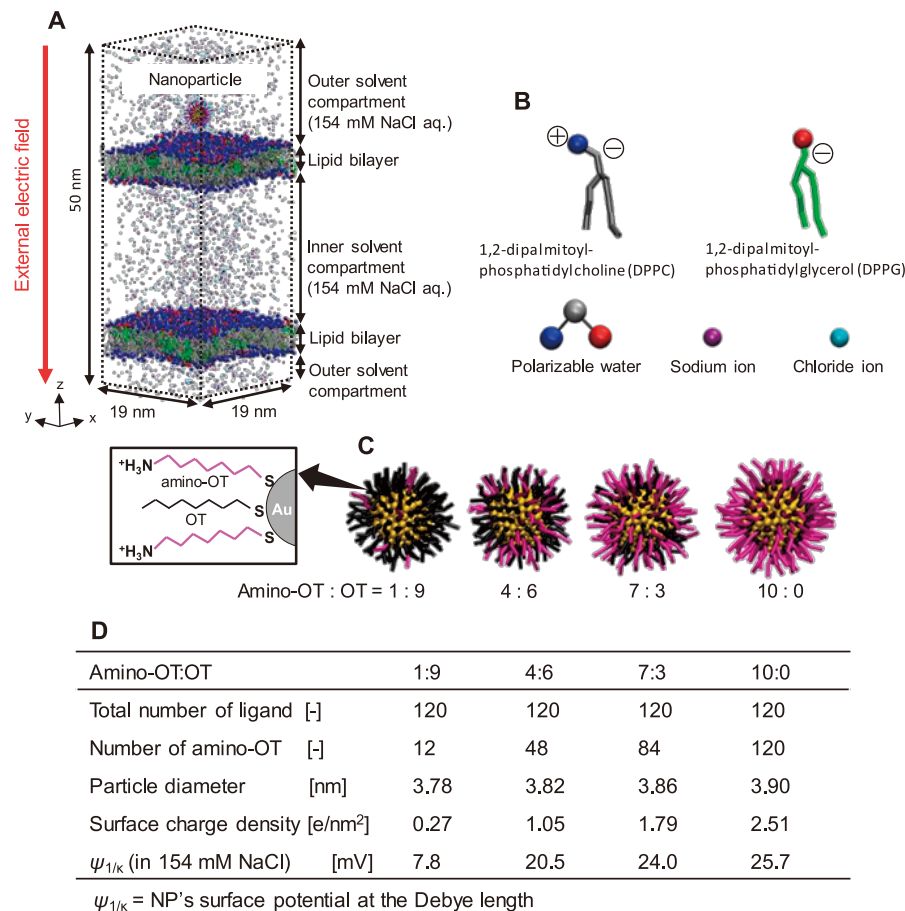


Fig. 1 Simulation system used in this study. (A) Initial configuration. Water molecules are not displayed for clarity. (B) Individual coarse-grained molecules. (C) Snapshots and (D) physical properties of nanoparticles.

行い $\Delta\psi_{\text{appl},c}$ を予め決定した。その結果、 $\Delta\psi_{\text{appl},c} = 230\text{mV}$ であり、この値は実験値とおおよそ同じであったことから、計算の妥当性が確認された⁷⁾。本研究では、印加膜電位が臨界電位を超えない条件 ($\Delta\psi_{\text{appl}} < \Delta\psi_{\text{appl},c}$) で計算を行った。すなわち、外部電場の印加だけでは膜の穿孔は起こらない微弱な電場の範囲に絞って検討を行った。

3. 結果および考察

比較のため、はじめに、電場を印加しなかった場合のナノ粒子の挙動を解析した。Fig. 2Aに、電場は印加せず粒子のみに一定の外力を付与して下向きに強制的に移動させたpullシミュレーションの結果を示す。図はz軸に沿っ

た計算系断面を表している。amino-OT:OT = 1:9 および 4:6 のナノ粒子の場合、ナノ粒子表面が比較的疎水性であることから、下向きへの強制移動に伴い粒子は細胞膜の疎水部に侵入した。さらに下向きに移動させると、粒子は内部溶媒層に到達したが、このとき、細胞膜は元の平面膜から大きく変形し、一部に欠損も見られた。一方、表面電位が比較的高い amino-OT:OT = 7:3 および 10:0 のナノ粒子の場合は、粒子は膜表面に付着した後、さらに粒子を膜に対して強制的に押し込んでも、粒子は膜に包まれたままで、膜を透過することはなかった。以上より、電場を印加しない場合、amino-OT:OT = 7:3 および 10:0 のナノ粒子は細胞膜を透過できないことが分かった。また、amino-

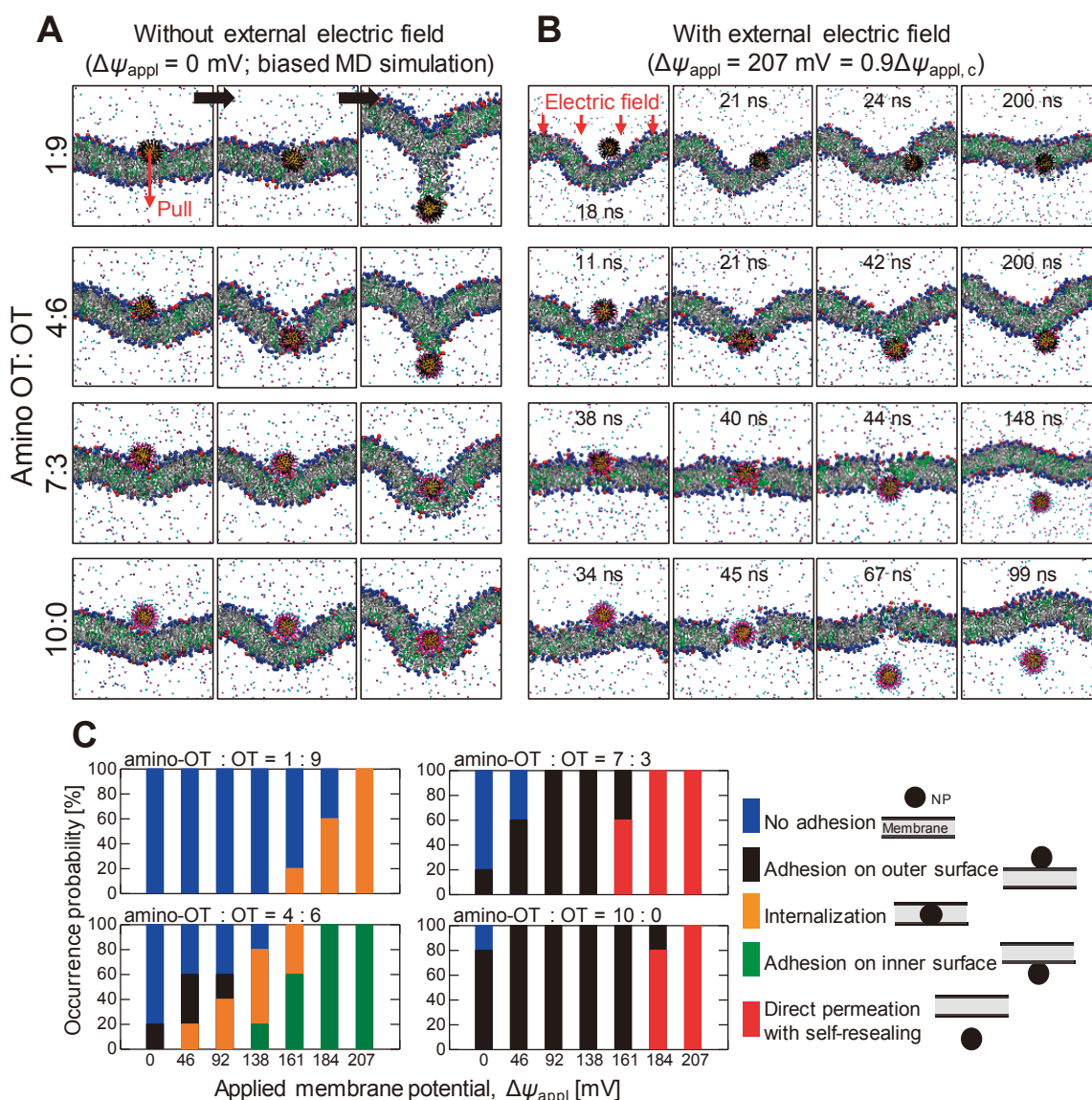


Fig. 2 Interaction of NP with cell membrane under external electric field. Dynamics of NPs (A) without external electric field and (B) with external electric field ($\Delta\psi_{\text{appl}} = 207\text{ mV} = 0.9\Delta\psi_{\text{appl},c}$). Water molecules were not shown for clarity. Snapshots are cross-sectional side view. (C) Occurrence probabilities of five modes of final fate of each NP as a function of applied membrane potential.

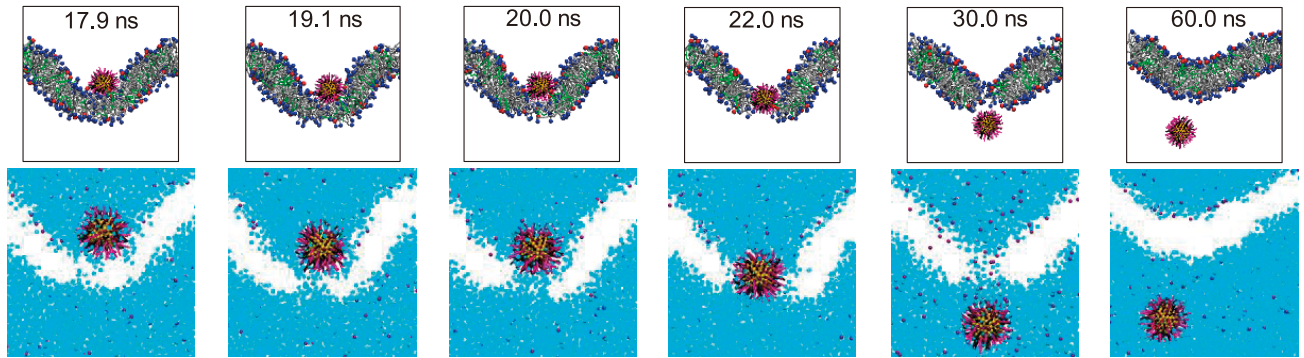


Fig. 3 Dynamics of solvent molecules during the direct permeation of NP across the cell membrane. Cyan dots show water molecules. Purple and cyan beads are sodium and chloride ions, respectively. In the case of the NP with amino-OT:OT = 7:3 under $\Delta\psi_{\text{appl}} = 207 \text{ mV} = 0.9 \Delta\psi_{\text{appl},c}$. Snap shots are cross-sectional side view.

OT:OT=1:9 および 4:6 のナノ粒子の場合は、粒子に外力を付与することで細胞膜を透過する可能性が示されたが、透過の際には膜の変形および欠損が著しかったことから、ダメージが大きい透過経路であると考えられる。また、ナノ粒子にのみ外力を付与することそのものが、実際には極めて困難であることも粒子すべき点である。

一方、電場を印加すると、ナノ粒子の細胞膜透過挙動は大きく変化した。Fig. 2Bに、粒子の典型的な細胞膜透過挙動を示す。Fig. 2Cには、計算系に種々の電位を印加した際の、各粒子挙動の発生頻度を示す。なお、この計算では、ナノ粒子には印加電場から受ける静電気力以外の外力は作用していない。結果より、興味深いことに、pullシミュレーションでは膜を透過しなかった amino-OT:OT=7:3 および 10:0 のナノ粒子が、電場を印加することで細胞膜を直接透過することが分かった。Fig. 2Bに示すように、amino-OT:OT=7:3 および 10:0 のナノ粒子は、細胞膜表面に付着した後、膜の構造が変形し、二重膜を貫通する親水性の細孔が生成した。そして、粒子は脂質膜小胞にトラップされたり、脂質分子を膜から引き抜いたりすることなく、親水性の膜貫通孔を通じて細胞膜を直接透過した。さらに着目すべき点として、粒子の侵入により膜に生成した細孔は、粒子透過後に瞬時に縮小し、膜が自己修復することが分かった。すなわち、細胞膜をほとんど損傷しない透過経路であると言える。Fig. 2Cより、この直接透過経路が発現するには、161mV以上の印加膜電位 ($\Delta\psi_{\text{appl}} \geq 161 \text{ mV} = 0.7 \Delta\psi_{\text{appl},c}$) が必要であることも分かった。以降では、この新奇なナノ粒子の細胞膜直接透過経路に焦点を当てて、さらに詳細な解析を行った。

Fig. 3に、粒子が膜を透過した際の水分子の挙動を示す。ナノ粒子が細胞膜に侵入し始める前に、水分子のワイヤー状のクラスターが膜を横切って形成された (17.9ns and 19.1ns in Fig. 3)。この水分子クラスターはさらに成長して、水分子チャンネルとなり (20.0 ns in Fig. 3)、この水分子チャンネルを通じてナノ粒子は細胞膜を透過した (30.0ns

in Fig. 3)。粒子が膜を透過した後は、水分子チャンネルは消失し、膜は自己修復した (60.0ns in Fig. 3)。以上より、ナノ粒子の細胞膜直接透過は、ナノ粒子と細胞膜表面の接触界面直下で水分子ワイヤーが形成されることにより誘発されることが明らかとなった。この溶媒分子のダイナミクスは、典型的なエレクトロポレーションにおけるものと非常に類似している⁸⁾。しかしながら、本研究で印加している膜電位は、穿孔が起こる臨界値よりも低い電位であり、ナノ粒子が存在しない場合、水分子ワイヤーは生成しないことが特徴である。

以上の結果より、まず、ナノ粒子の細胞膜直接透過にはある大きさ以上の電場の印加が必要であることが分かった。さらに、ナノ粒子の透過は、典型的なエレクトロポレーションと類似して、ナノ粒子と細胞膜表面の接触界面直下における水分子ワイヤーの形成に誘発されることも分かった。これらの知見を踏まえて、我々は、ナノ粒子と細胞膜表面の接触界面電気現象の変化が、ナノ粒子の細胞膜直接透過を引き起こしているという仮説を立てた。そして、この仮説を検証するため、ナノ粒子と細胞膜表面の接触界面における局所的な膜電位を解析した。Fig. 4Bに、ナノ粒子を含まない計算系に電場を印加した際の膜電位分布を示す。結果より、電位を印加しない場合、膜電位はおおよそ0mVであったのに対し (Fig. 4A)、電場を印加すると、印加膜電位 (この場合、 $\Delta\psi_{\text{appl}} = 184 \text{ mV}$) よりも高い約300mVの膜電位が発生することが分かった。これは、溶媒中のイオンの電気泳動による膜表面の電荷のインバランスに起因している。すなわち、外部電場の印加によって溶質イオンは電気泳動するが、細胞膜を透過できないため、カチオン (Na^+) は細胞膜の上側 (外層) 表面に、アニオン (Cl^-) は下側 (内層) 表面に局在する。その結果、細胞膜表面電荷のインバランスが生じ、付加的な膜電位が発生したと考えられる。本研究では、この膜表面電荷のインバランスに起因する膜電位を $\Delta\psi_{\text{sci}}$ と表記する。Fig. 4C, Dに、ナノ粒子が細胞膜表面に付着した際の膜電位分布を示

す。結果より、ナノ粒子と細胞膜との接触界面においては、印加膜電位にナノ粒子の表面電位が重畳することで、膜電位が局所的に増強されることが明らかとなった (Fig. 4C の $\Delta\psi_{NP}$)。以上の結果より、ナノ粒子と細胞膜の接触界面においては局所的に高い膜電位が発生し、その総膜電位 ($\Delta\psi_{overall}$) は、①印加膜電位 ($\Delta\psi_{appl}$)、②膜表面電荷のインバランスに起因する電位 ($\Delta\psi_{sci}$)、③ナノ粒子の膜表面への付着によって生じる電位 ($\Delta\psi_{NP}$) の3種類の総和となることが分かった (i.e., $\Delta\psi_{overall} = \Delta\psi_{appl} + \Delta\psi_{sci} + \Delta\psi_{NP}$)。最後に、この接触界面における膜電位増強とナノ粒子の細胞膜直接透過を定量的に関係付けるために、接触界面における総

膜電位と膜穿孔が起こる臨界膜電位の比較を行った。Fig. 5に、接触界面における総膜電位 $\Delta\psi_{overall}$ と印加膜電位 $\Delta\psi_{appl}$ の関係を示す。図中の $\Delta\psi_{overall, C}$ は膜破壊が起こり始める総膜電位の臨界値であり、膜表面電荷のインバランスに起因する電位 $\Delta\psi_{sci}$ を考慮して予め求めたところ、本計算系では $\Delta\psi_{overall, C} = 337$ mV であった。結果より、ナノ粒子が細胞膜を直接透過した $\Delta\psi_{appl} \geq 184$ mV の範囲においては、ナノ粒子と細胞膜の接触界面における総膜電位 $\Delta\psi_{overall}$ は臨界電位 $\Delta\psi_{overall, C}$ を超えていることが分かった。すなわち、細胞膜の破壊が起こらない微弱な電場を印加したにも関わらず、ナノ粒子と細胞膜の接触界面における局所的な

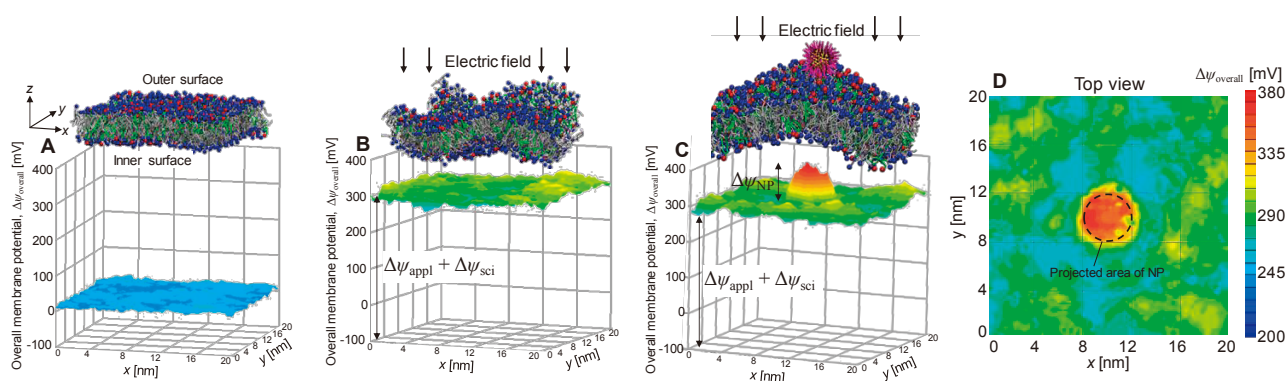


Fig. 4 Typical contour maps of the calculated overall membrane potential ($\Delta\psi_{overall}$) along the membrane surface: (A) without external electric field and without NP; (B) under external electric field without NP; (C, D) under external electric field with NP adhesion on the membrane surface. In the case of $\Delta\psi_{appl} = 184$ mV = $0.8 \Delta\psi_{appl, C}$ and NP with amino-OT:OT=10:0. $\Delta\psi_{sci}$ is the membrane potential derived from imbalance of the membrane surface charge. $\Delta\psi_{NP}$ is the enhanced membrane potential arising from the NP adhesion.

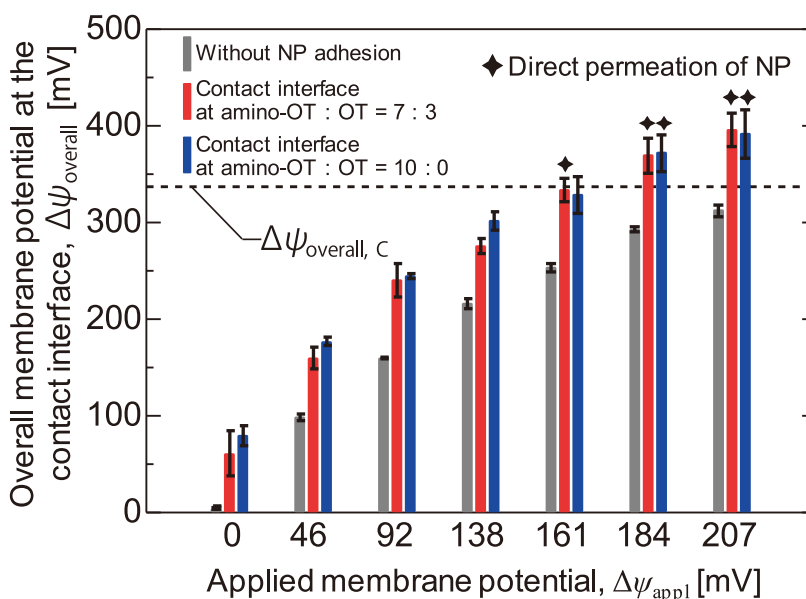


Fig. 5 Overall membrane potential at the contact interface between the NP and the membrane surface as a function of the applied membrane potential. Error bar corresponds to the max-min within five independent simulation runs. $\Delta\psi_{overall, C}$ is the critical overall membrane potential for the membrane breakdown. The $\Delta\psi_{overall, C}$ was preliminarily determined as 337 mV. Detail about the determination of $\Delta\psi_{overall, C}$ can be found in Supplementary Text and fig. S4.

膜電位は、膜穿孔に必要な臨界電位を超えうることが示された。Fig. 6には、ナノ粒子が細胞膜を透過する直前および直後の膜電位を示す。結果より、ナノ粒子が細胞膜を透過した後は、粒子が細胞膜から脱離するため透過前に見られた局所的な膜電位増強が粒子透過後には消失し、系全体の膜電位は臨界強度を $\Delta\psi_{\text{overall, c}}$ を下回った。その結果、細胞膜はエネルギー的に安定な二重膜の構造へと自己修復することができたと考えられる。

4. 平面脂質膜法を用いた実験系の構築

MDシミュレーションの結果を検証するために、実験系の構築にも取り組んだ。以下ではその概要を報告する。本

研究では、人工細胞膜(すなわち純粋なリン脂質2重膜)を用いた実験系の構築に取り組んだ。中でも、膜を介した物質の透過を電氣的に測定可能である平面脂質膜法に着目した。平面脂質膜の作成には、比較的安定した膜を簡便に形成できる液滴接触法⁹⁾を用いた。Fig. 7Aに、液滴接触法により作成した脂質膜の模式図を示す。リン脂質デカン溶液を図の左右の各区画に予め注入し、ここにKCl水溶液をさらに注入することで、リン脂質分子で安定化されたW/O型の水滴を2個作成した。これらの水滴を接触させると、接触界面で平面脂質膜が形成される。この平面脂質膜を作成するための実験装置として、Fig. 7Bに示すアレイデバイスを独自に試作した。デバイスはPMMA製で、

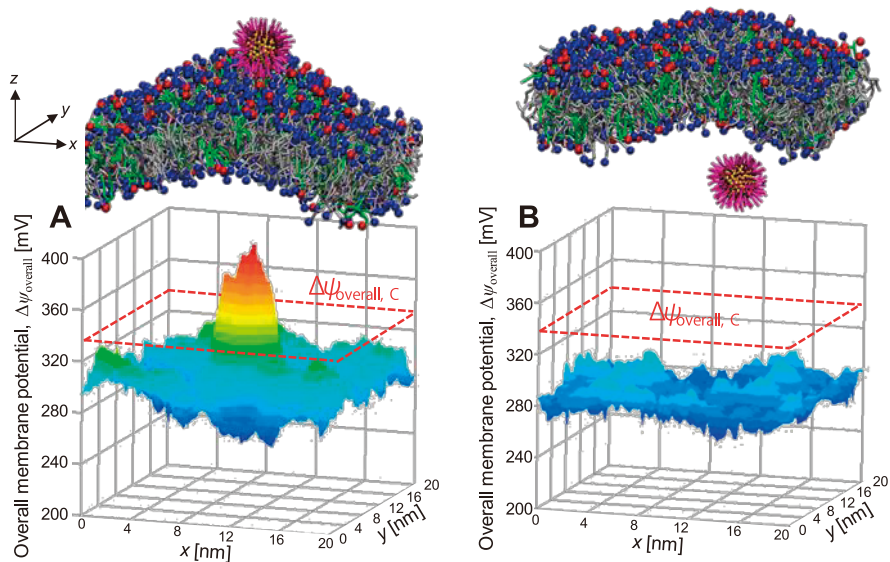


Fig. 6 Contour maps of the calculated overall membrane potential ($\Delta\psi_{\text{overall}}$) (A) before and (B) after membrane-crossing of the NP. $\Delta\psi_{\text{overall, c}}$ is the critical overall membrane potential for the membrane breakdown. In the case of the NP with amino-OT:OT=10:0 under $\Delta\psi_{\text{appl}} = 184 \text{ mV} = 0.8 \Delta\psi_{\text{appl, c}}$.

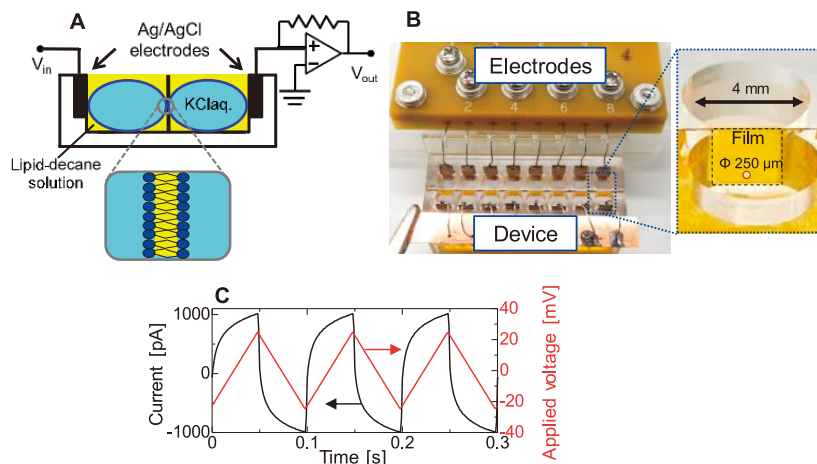


Fig. 7 Developed experimental set-up. (A) Schematic of droplet contact method. (B) Multi-well device and multi-channel electrode used in this study. (C) Applied voltage and measured current when bilayer was formed.

直径 250 μm の小孔が開いたフィルムを内径 4mm の 2 つのウェルで挟み込んだ基本ユニットが 8 個設けられている。このウェル内部に 7.5 μL のリン脂質デカン溶液と 16.5 μL の KCl 水溶液をピペティングするだけで、フィルムの小孔を介して水滴が接触し脂質二重膜を簡便に形成することができる。また、各ウェルには Ag/AgCl 電極が埋め込まれており、この電極は電圧印加装置、8ch 同時測定が可能な微小電流検出アンプ、データロガーに接続されている。このセットアップで、電圧を印加することによって脂質膜を介して流れる微小電流をアンプで増幅して測定することができる。すなわち、検出された電流変化やそこから算出される膜比容量から、物質が脂質二重膜を介して移動する様子を捉えることが可能である。

脂質二重膜は、その構造から抵抗とコンデンサが並列に接続された RC 並列回路と電気的に等価と見なすことができる。これを利用して、Fig. 7C に示すような三角波電圧を印加した際に測定される微小電流の矩形波から、膜比容量を算出した。その結果、本装置で測定された平均膜比容量は $0.37 \pm 0.19 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ となった。これは液滴接触法を用いた膜比容量の文献値¹⁰⁾ ($0.4\text{--}0.6 \mu\text{F}/\text{cm}^2$) と同等であり、これより構築した実験系で、脂質二重膜が形成できることを確認できた。今後はこの実験系を用いて、電場印加環境下におけるナノ粒子の細胞膜透過を解析していく。

5. 総括

本研究では、微弱な電場印加環境下におけるナノ粒子の細胞膜透過現象を分子動力学シミュレーションにより解析した。その結果、以下のメカニズムでナノ粒子が細胞膜を直接透過することを新たに見出した。①まず、ナノ粒子が細胞膜表面に付着することによって、ナノ粒子と細胞膜との接触界面において膜電位が局所的に増強される。そして、②この増強された膜電位が臨界電位を超えた際、ワイヤー状の水分子クラスターが接触界面近傍で生成し、これがナノ粒子の細胞膜直接透過を引き起こす。さらに、③ナノ粒子の膜透過後は、局所的に高い膜電位が消失するため、細胞膜は自己修復する。

細胞にダメージを与えることなく、細胞内に物質を直接送達することは、理想的な送達方法である。ここで、物質が細胞膜を透過する際に生じてしまう欠損をできるだけ小さくし、ナノメートルスケールにすることができれば、理想的な低侵襲送達が実現できると思われる。本研究で得られた知見は、外部から印加した微弱な電場に、ナノ粒子の表面電位を重畳させることで、前述したナノメートルスケールの細胞膜穿孔を実現できる可能性も示唆している。今後も、ナノ粒子と細胞膜との界面電気現象に着目した研究

を進めていきたい。

謝辞

本研究を行うにあたり、多大なるご援助を賜りました公益財団法人コスメトロジー研究振興財団に深く感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Nakamura H, Watano S: Direct Permeation of Nanoparticles across Cell Membrane: A Review, *KONA Powder Part. J.*, 35, 49-65, 2018.
- 2) Zu Y, Huang S, Liao WC, Lu Y, Wang S: Gold Nanoparticles Enhanced Electroporation for Mammalian Cell Transfection. *J. Biomed. Nanotechnol.* 10, 982-992, 2014.
- 3) Nakamura H, Sezawa K, Hata M, Ohsaki S, Watano S: Direct permeation of nanoparticle across model cell membrane by nanoparticle-induced local enhancement of membrane potential, submitted.
- 4) Marrink SJ, Risselada HJ, Yefimov D, Tieleman, de Vries AH: The MARTINI Force Field: Coarse Grained Model for Biomolecular Simulations, *J. Phys. Chem. B.* 111, 7812-7824, 2007.
- 5) Yesylevskyy SO, Schäfer LV, Sengupta D, Marrink SJ: Polarizable Water Model for the Coarse-Grained MARTINI Force Field, *PLoS Comput. Biol.*, 6, 1-17, 2010.
- 6) Elahi N, Kamali M, Baghersad MH, Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review, *Talanta*, 184, 537-556, 2018.
- 7) Shimizu K, Nakamura H, Watano S: MD Simulation Study of Direct Permeation of a Nanoparticle across the Cell Membrane under an External Electric Field, *Nanoscale*, 8, 11897-11906, 2016.
- 8) Tieleman DP: The molecular basis of electroporation. *BMC Biochem.* 5, 1-12, 2004.
- 9) Kawano R, Tsuji, Sato K, Osaki T, Kamiya K, Hirano M, Ide T, Miki N, Takeuchi S: Automated Parallel Recordings of Topologically Identified Single Ion Channels, *Sci. Rep.*, 3, 1995, 2013.
- 10) Funakoshi, K, Suzuki H, Takeuchi S: Lipid Bilayer Formation by Contacting Monolayers in a Microfluidic Device for Membrane Protein Analysis, *Anal. Chem.*, 78, 8169-8174, 2006.