

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：32619

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12546

研究課題名(和文)ハニカム状フィルムを支持体とした多細胞型人工脂質膜の創製

研究課題名(英文)Preparation of multicellular artificial lipid membrane by using a honeycomb film support

研究代表者

松村 一成 (Matsumura, Kazunari)

芝浦工業大学・工学部・教授

研究者番号：10348899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：多細胞型人工脂質膜の支持体の作製を目的として、移流集積法を用いてポリスチレンビーズを銅板メッシュ内の50 $\mu$ mの矩形領域にほぼ規則的に集積させる手法を確立した。そのビーズ配列を鋳型とした無電解金属電鍍と鋳型の溶解除去によって球殻構造体を得て、FIB加工とSEM観察で開口部の径や内部構造を明らかにした。この構造体にペインティング法等を用いて脂質膜を展開し、孔内が外部環境と区画されていることを蛍光観察にて確認した。また、脂質膜に膜融合性リポソームを用いてイオノフォアを導入し脂質膜中のイオン透過現象を蛍光観察にて追跡した。

研究成果の概要(英文)：In order to fabricate the supports for multicellular artificial lipid membranes, we developed a method to prepare the ordered polystyrene bead arrays into a rectangular hole of 50  $\mu$ m in a copper grid by using convective self-assembly method. After metal films were formed on the surface of microbeads as templates by electroless silver plating, the supporting structure was yielded after dissolving templates by toluene. FIB milling and SEM observation study indicates that two-dimensional closed packed structure of spherical pores with sub-micron sized apertures was successfully fabricated. The lipid bilayer membranes were formed on this structure using the painting method, and the fluorescence study indicates that the inside of the sphere was compartmented from the external environment by the membrane. The ionic permeability of the ionophores which were incorporated into lipid membranes using fusogenic liposomes was also monitored by pH-sensitive fluorescence probe.

研究分野：生体関連化学

キーワード：平面脂質膜 ハニカムフィルム 自己組織化 人工細胞 リン脂質 蛍光顕微鏡 リポソーム

### 1. 研究開始当初の背景

生体膜機能の理解のために、リガンド-レセプター分子間相互作用やイオンチャネルを介したイオン透過現象が注目され、それらをハイスループット解析する生体膜センサーが数多く提案されている。多くはセンサー表面などのデバイス上に平面脂質膜を固定する手法であるが、細胞同様に生体反応系を区画できるリポソームに着目した研究も近年報告がなされている。

これらのリポソームセンサーは、多数のリポソーム膜表面への分子吸着を総体として定量するものであるが、さらにリポソームを安定的にかつ任意のパターンで配列化すればリポソーム個体間の物質移動などを検出する系が構築できる。そこでリポソームを支持・固定する支持体として図1のような特徴を持つハニカム状多孔質膜(ハニカム状フィルム)に注目した。ハニカム状フィルムは、そのユニークな構造から細胞培養基材等の再生医療用途として注目がなされているが、脂質膜支持体としての研究例はない。そこで申請者が上記のように培ってきたリポソーム工学の手法を活用して全く新規の脂質膜構造体を得ることを着想した。

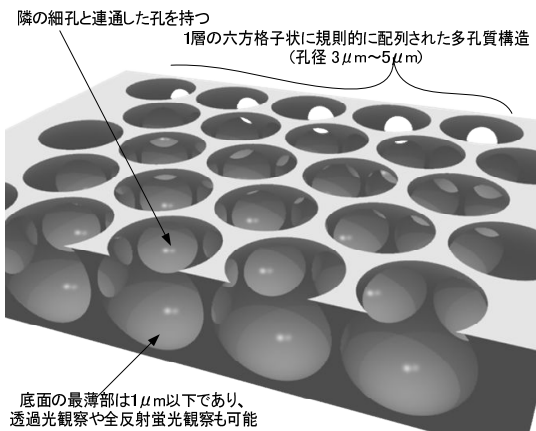


図1 本研究で用いるハニカム状フィルムの形状と特徴

### 2. 研究の目的

本研究はハニカム状フィルムを支持体として脂質膜小胞であるリポソームを生体組織のように多数配列させたハイブリッド構造を作成する。得られた多細胞型の脂質膜構造の物性を評価し、任意の小胞内の酵素反応を色素で可視化することを目的とする。ハニカム状フィルムの作製方法としては、高分子溶液からのキャストフィルム作成時に凝結水滴が自己組織的に配列した物を用いてきたが、ここでは新たに高分子ビーズを鋳型として用いた手法について記述する。以下の記述には含まれないが、関連研究として人工脂質膜に導入したイオノフォアのイオン透過性を pH 感受性蛍光色素で定量化する研究、人工脂質膜に希土類蛍光錯体を導入する研究、脂質ナノディスクを安定化する短鎖ペプチドの研究なども行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) ポリスチレン(PS) 粒子の区画化配列と球殻構造体作製

カバーガラスにPS 溶液(20mg/ml,クロロホルム)を滴下し、TEM 用銅グリッドCu-400Aを浮かべて蒸発と共に銅メッシュが固着された基板を作成した後に、PS 粒子分散メタノール溶液を滴下した。溶媒の自然蒸発時にPS 粒子は銅メッシュ枠内に二次元的に集積配列した。配列したPS粒子を表面に触媒層としてPt/Pd をイオンコーターで60nm 被覆させ、ヒドラジンを還元剤とした無電解銀電鍍を15分間行なった。銀被膜されたPS 粒子を銅メッシュごと剥がし、65 のトルエンに1時間浸漬させてPS粒子を溶解除去して得られた球殻構造体をFIB加工装置とSEMを用いて微細孔及び加工断面を顕微鏡観察した。図2に本法による作成手順の概略図を示す。

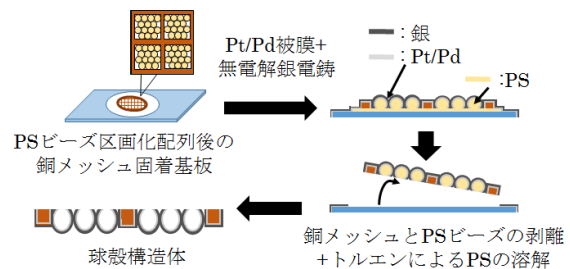


図2 球殻構造体の作製手順

#### (2)多細胞型人工脂質膜の作製と溶液内包性の評価

作成した球殻構造体の開口部に脂質膜アレイを得るため、Phosphatidylcholine(PC)を主成分としたクロロホルム溶液にリン脂質蛍光誘導体であるDiacyl Phosphatidylethanol-amine-N Lissamine-Rhodamine -B-Sulfonyl(Rh-PE) を溶かした溶液を筆毛3、4本に付けて塗布した後、遮光環境で乾燥させ、pH 感受性蛍光色素であるPyranine を溶かした緩衝溶液に浸漬し、45 で静置水加法を半日行った。次に球殻構造体外部のPyranineを緩衝溶液で洗浄し、Rh-PE、Pyranine両者の蛍光を顕微鏡にて観察した。

#### (3)膜融合性リポソームを用いたイオノフォアの導入とイオン透過現象の蛍光追跡

球殻構造体上にpH5 のPyranine 溶液を内包させたRh-PE含有人工脂質膜を作成し、それに対しカチオン性脂質1,2-Distearoyl-3-Trimethyl ammonium Propane(DSTAP)とイオノフォアであるGramicidin を脂質膜に含有した粒径100nm の脂質膜小胞分散液を滴下して膜融合させることで、微細孔脂質膜部分にイオノフォアを導入した。イオノフォアの導入を確認するため、金属強化型脂質膜小胞の外部pHを塩基性水溶液の滴下によ

り上昇させ、小胞内部のPyranine の蛍光増感を蛍光顕微鏡を用いて経時的に追跡した(図4)。

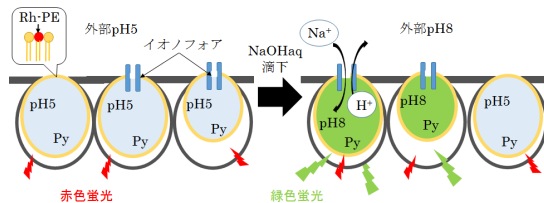


図4 イオノフォア導入人工脂質膜小胞へのイオン透過現象に伴う蛍光発光の模式図

#### 4. 研究成果

##### (1) 球殻構造体の形状観察

図2の手順によって作成された鋳型及び銀電鋳後の開口部、FIB 加工後断面を図4 に示す。観察結果から PS 粒子は銅メッシュ枠内にて単粒子層を形成し、目的通りの集積構造を形成していることが確認された。開口部の径が1.0~1.2 $\mu\text{m}$ でありマイクロインジェクション等の処理も可能な適切なサイズといえる。FIB によって断面加工した球殻構造体を観察した結果、各球殻は隣接球殻と連通した孔を持つことが確認された(図3d 矢印部分)。これは高分子溶液から自己組織的に作製したハニカムフィルムと同様に、孔内に作製した脂質膜小胞が孤立せず物質移動可能な構造であることを示している。

本法で作製した球殻構造体は、一定範囲の数(80~110)だけ集積したビーズを鋳型にすることで多細胞型脂質支持体としたものである。移流集積法などでビーズを平面基盤上に二次元的に規則配列させることは従来から広く行われてきたが、本法のような矩形孔に100個オーダーのビーズを効率的に集積させた報告は殆どない。集積数を規定することは多細胞型人工脂質膜を進展させる上で様々な利点があるため、本法を新規に確立した意義は高いと考えている。

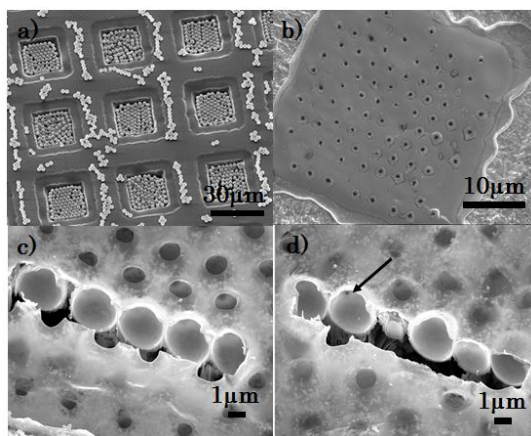


図4 球殻構造体のSEM観察結果  
a)鋳型 b)球殻構造体開口部 c),d)FIB加工後

##### (2) 多細胞型人工脂質膜の溶液内包性の評価

図5に球殻構造体に支持された人工脂質膜を光学顕微鏡で観察した顕微鏡像を示す。これは比較のため、良好な球殻構造体形成が認められる下部矩形領域とその他の矩形領域を同一視野に収めて観察した結果である。図4 a)で球殻構造体が形成されていると確認された部位に、脂質膜が展開され脂質膜に含まれた Rh-PE の赤色蛍光と、内包された Pyranine の緑色蛍光が同時に確認されている。構造体の外部に遊離した Pyranine の蛍光は pH 調整によって消光させているため、この図で緑色蛍光が認められている孔は外部から脂質膜によって区画化されていることが示されている。本結果は静置水和法による脂質膜展開によるものであるが、エレクトロフォーメーション法(EF法)を用いた展開膜との比較、構造体内の接続孔部分の脂質膜構造の調査などを行うことによって更に洗練された手法とすることが出来ると考えている。

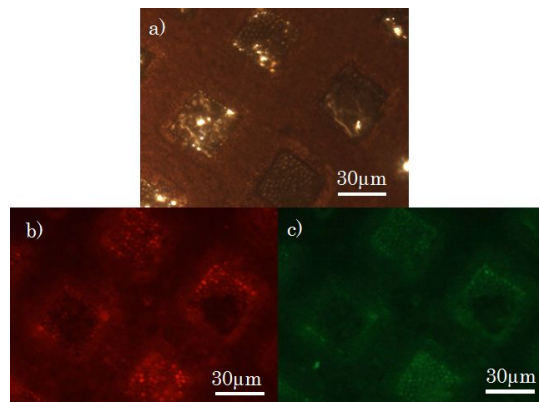


図5 球殻構造体に展開した人工脂質膜の光学顕微鏡像  
a)明視野 b)赤色蛍光像(Rh-PE) c)緑色蛍光像(Pyranine)

##### (3) 膜融合性リポソームを用いたイオノフォアの導入とイオン透過現象の蛍光追跡

球殻構造体に展開した脂質膜に膜融合性リポソームを用いて Gramicidin を導入し、そのイオン透過能を蛍光顕微鏡にて確認した。図4の模式図の様に、赤色蛍光で脂質膜の展開部位を確認しつつ、緑色蛍光の増加速度をみることで Gramicidin の導入部位の確認をすることが可能となる。蛍光観察によって導入処理によるイオン透過能の増加を確認することができ、またその蛍光増感は各開口部によって差があることが示された。

Gramicidin 導入量は各開口部へのリポソーム融合数等によって変化すると予想されるものの、現段階では蛍光修飾リポソームを用いた導入量の推定は良好な結果を得ていない。リポソーム融合量の定量性の良い可視化法の開発と EF 法による基板固定化リポソーム

ムの Gramicidin 導入量と蛍光増感速度の関係などを行う事で改善されるものと考えている。

本法で作製した人工脂質膜がその支持体の開口部でリポソーム融合現象によって任意の膜物質を導入することが可能であることが示された。多細胞型人工脂質膜の応用可能性を高めるためには、任意の部位への膜物質導入手法の開発が重要である。この結果をさらに進展させ、生体膜モデル研究の発展に寄与するような実験系の開発につなげる予定である。

<引用文献> Yuzo Kasuya, Megumi Ohtaka, Kei Tsukamoto, Yasuyuki Ikeda, Kazunari Matsumura, Liposome Immobilization on Peptide-modified Quartz Crystal Microbalance Electrodes for Kinetic Analysis of Interactions on Membrane Surfaces, Chem. Lett. 2008 37(6), 588-589; Yuzo Kasuya, Kei Tsukamoto, Daisuke Yamada, Kazunari Matsumura, Immobilization of a single intact liposome onto a peptide-modified glass microwell, Chem. Lett. 2012, 41(10), 1191-1192

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 5 件)

上野 和真、松村 一成、Preparation of Lipid Membrane Supported By Structured Porous Materials as a Multicellular Bio-membrane Model、2015 環太平洋国際化学会議、2015 年 12 月 20 日、米国ホノルル(米国)

吉田 隆太郎、松村 一成、膜融合によるイオンチャンネル導入リポソームの pH 応答性色素を用いたイオン透過性解析、第 66 回コロイドおよび界面化学討論会、2015 年 9 月 12 日、鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島県・鹿児島市)

吉田 海、細川 禎也、松村 一成、脂質膜に導入可能な大環状希土類錯体の合成とそのリポソーム内での蛍光挙動、日本化学会第 96 春季年会、2016 年 3 月 27 日、同志社大学京田辺キャンパス(京都府・京田辺市)

堀 博貴、檜山 大三郎、松村 一成、QCM 法を用いた短鎖ペプチド-脂質ナノディスク形成現象の追跡、第 10 回 QCM 研究会、2016 年 8 月 26 日、機械振興会館(東京都・港区)

上野 和真、松村 一成、新規生体膜デバイスに向けた微細孔アレイの配列と加工、第 26

回日本 MRS 年次大会、2016 年 12 月 20 日、開港記念会館他(神奈川県・横浜市)

[その他]  
ホームページ等

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

松村 一成 (MATSUMURA, Kazunari)  
芝浦工業大学・大学院理工学研究科・教授  
研究者番号：10348899