

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K17503

研究課題名(和文)微量・高速生化学分析に向けたマイクロ水滴多段階分離機構の開発

研究課題名(英文) Separation method of microdroplet contents for high-throughput trace analysis

研究代表者

福山 真央 (Fukuyama, Mao)

東北大学・多元物質科学研究所・助教

研究者番号：40754429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロメートルサイズの水中油滴(マイクロ水滴)が近年微量生化学分析の反応場として用いられている。本研究では、自然乳化を用いたマイクロ水滴内包物の選択的濃縮・分離法における分離選択性の調整法を確立した。具体的には、逆ミセル中の水の活量を調整することで、マイクロ水滴から逆ミセルへと分配する溶質の選択性を調整できるようになった。また、本手法を用いて5 fmolのプロテアーゼの活性測定を実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた知見を活用すれば、界面活性剤溶液を流すだけで、多数のマイクロ水滴の同時分離・濃縮操作が可能になる。操作の簡便さより、この手法はマイクロ水滴を用いた高スループット分析の汎用的な分離・濃縮法になると考えている。また、本手法は酵素活性の測定だけでなく、miRNAやタンパク質の計測などへも応用可能であると考えている。これらの計測が実現すれば、将来的に、再生医療における1細胞レベルでの品質管理や、バイオマーカー探索・細胞間コミュニケーションの解析が可能となり、創薬・医療分野に多大な貢献ができると期待している。

研究成果の概要(英文)：Recently, water-in-oil microdroplets have been utilized for the biochemical trace analyses. In this study, the separation method for microdroplet water-soluble contents by using spontaneous emulsification was developed. The selectivity of the separation was controlled by the activity of water in the reverse micelles in the organic phase. In addition, activity assay of 5 fmol protease was demonstrated by utilizing this method.

研究分野：分析化学

キーワード：マイクロ分析 マイクロ水滴 自然乳化 界面活性剤

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生命科学や医療・製薬分野では、1細胞解析や微量の化学ライブラリを用いた薬剤応答アッセイなど、高スループットかつ微量な生化学分析手法が求められている。これに対する一つのアプローチとして、この数十年、数センチ角の基板の上に化学・生化学操作を集積したマイクロ流体デバイスの研究が急速に進展してきた。さらに近年、マイクロメートルサイズの水滴（マイクロ水滴）をフェムトリットル～ナノリットルサイズの分析場として利用する研究が注目を集めている。マイクロ水滴を利用した微量化学操作技術は **Droplet Microfluidics** と呼ばれている。**Droplet Microfluidics** では、1,000 Hz で生成するマイクロ水滴の中に微量（zeptomol～フェムtomol程度）の試料や試薬を閉じ込め、個々の水滴を独立した反応場として扱うことができる。そして、マイクロ流路の構造を利用し1つ1つの水滴について合一や検出、ソーティングといった操作ができるため、1分子検出や1細胞解析等への応用が期待されている。これまでに多くのマイクロ水滴操作が報告されてきたが、分析化学操作として重要な、マイクロ水滴内包物の分離、特に水溶性分子同士の分離についてはほとんど報告がない。

近年申請者らは、自然乳化中のマイクロ水滴内包物の選択的濃縮挙動を発見した（図1）[1]。自然乳化とは外力を必要としない乳化現象のことである。**Span 80**（非イオン性界面活性剤）を含む有機相内にマイクロ水滴を入れると、マイクロ水滴界面で自然乳化が起こり、ナノメートルサイズの水滴（ナノ水滴）が生成する。その際、親水性分子およびサイズの大きい分子はマイクロ水滴内に濃縮され、疎水性の分子は逆ミセルに分配することがわかった。この手法では、マイクロ水滴を、**Span 80** の入った有機相に入れるだけでマイクロ水滴内包物の分離または濃縮できる。操作の簡便さより、**Droplet microfluidics** の様々な生化学分析操作に応用可能であると期待できる。しかし、この手法では溶質の性質に合わせて分離選択性を調整することはできず汎用性が低かった。

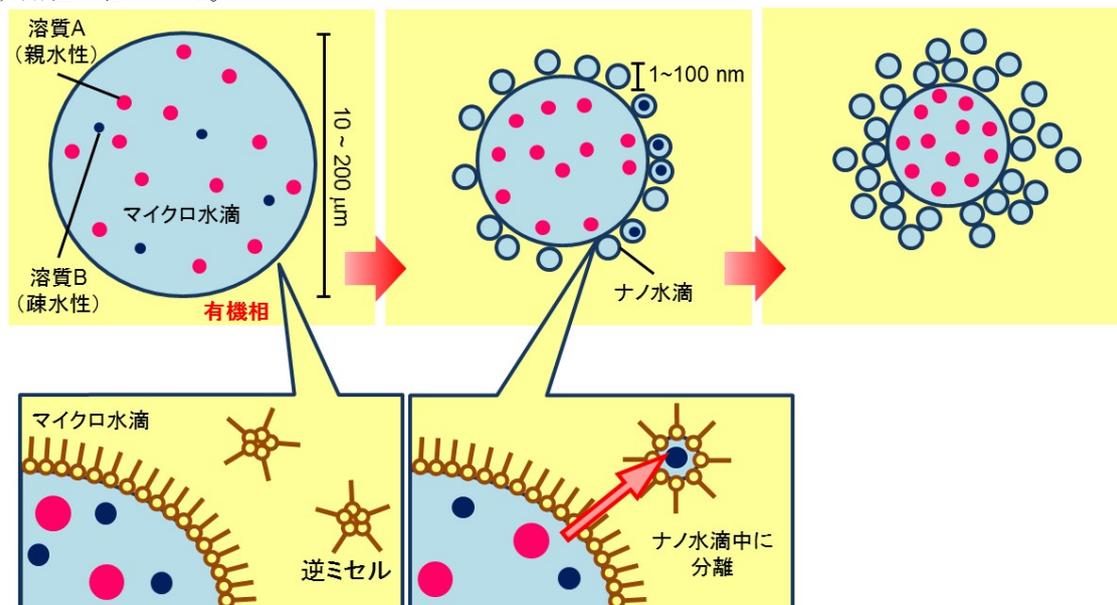


図1 自然乳化を用いたマイクロ水滴内包物の選択的濃縮法

2. 研究の目的

以上を踏まえ、本研究では、(1) 自然乳化を用いた選択的濃縮法における選択性の調節法の開発、および(2) (1)を用いた生化学分析への応用として、プロテアーゼ活性アッセイの実証を目的とした。

3. 研究の方法

ポリジメチルシロキサン(PDMS)製マイクロ流体デバイスにてマイクロ水滴アレイを作製した。幅 2 mm、高さ 80-100 μm のマイクロ流路の天井部に、幅 150-200 μm、高さ 80-110 μm のマイクロウェルが並んだマイクロ流体デバイスを作製した（図 2a）。このマイクロ流体デバイスに、水相を満たし、その後ヘキサデカンを流すことで、マイクロ流路内を有機相が満たし、1つ1つのマイクロウェル内に水相が孤立した状態にした。ここに、**Span 80** ヘキサデカン溶液を流すと、水相が自発的に水滴状に変形する。同時にマイクロ水滴界面では自然乳化が始まる。自然乳化中のマイクロ水滴からナノ水滴への水や溶質の分配の様子を顕微鏡観察した（図 2b-d）。

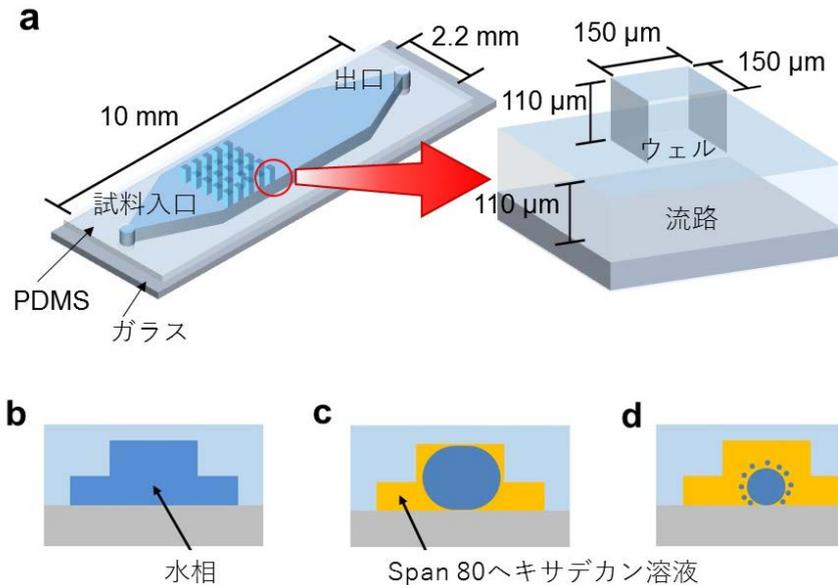


図2 マイクロ流体デバイスを用いたマイクロ水滴界面での自然乳化観察。
a) 本研究で使用したマイクロ流体デバイスの例。b)–d) 自然乳化観察のための流体操作。

4. 研究成果

(1) 逆ミセル中の水の活量に着目した、分離制御技術の確立

自然乳化の際は、水相から Span 80 逆ミセルへ水が分配し、ナノ水滴が生成するのだと考えられる。マイクロ水滴から逆ミセルへの水および溶質分配においては、マイクロ水滴に接触させる逆ミセルの水の活量が重要であると考えた。そのため、有機相中の逆ミセルの水和状態をあらかじめ調整し、その後マイクロ水滴を接触させることで、マイクロ水滴-逆ミセル間の水および溶質の分配が制御できると考えた。

そこで、Span 80 逆ミセル中の水の活量を調整する方法として、Span 80 のヘキサデカン溶液を NaCl 水溶液と接触洗浄することを着想した。この手法では、逆ミセル内の親水性空間と NaCl 水溶液の間で水が分配する。そして、分配平衡に達した状態では、逆ミセル内の水の活量と NaCl 水溶液の水の活量が等しくなると考えた。つまり、接触洗浄に用いた NaCl 水溶液の濃度を変化させることで、逆ミセル中の水の活量を調整することができると考えた。

この逆ミセル中の水の活量調整法を実証するために、まず、0.5 M の NaCl 水溶液を用いてマイクロ水滴を作成し、 C_{wash} M の NaCl 水溶液で接触洗浄した Span 80 を用いて水の縮小を観察した。その結果、マイクロ水滴の縮小は、マイクロ水滴内の水の濃度 (C_{micro} M) が C_{wash} と等しくなるところで止まることがわかった (図 3)。この結果より、逆ミセル内の水の活量が、接触洗浄に用いた NaCl 水溶液と等しくなったことが実証できた。

さらに、活量を調整した Span 80 水溶液を用いて、オリゴペプチドの濃縮を試みた。本研究では、テトラメチルローダミンを標識した、セリンとアスパラギン酸からなる 10 残基のオリゴペプチド (図 4a) を用いた。このオリゴペプチド水溶液を用いてマイクロ水滴を作成し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) または 1 M NaCl 水溶液で接触洗浄した Span 80 ヘキサデカン溶液と接触させた。その結果 PBS と分配平衡に達した Span 80 の逆ミセルにはオリゴペプチドが分配しない一方で (図 4b)、1 M NaCl 水溶液と分配平衡に達した Span 80 の逆ミセルにはオリゴペプチドが分配しやすいことが示された (図 4c)。つまり、予想通り逆ミセル中の水の活量により溶質の分離選択性を調節できることを実証した。

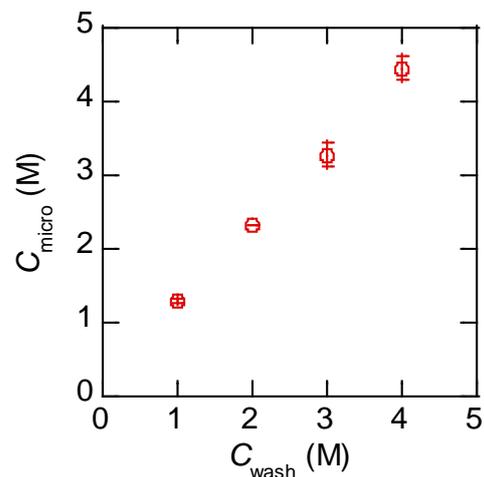


図3 Span 80 ヘキサデカン溶液の洗浄に用いた NaCl 水溶液の濃度 (C_{wash}) と縮小が停止した際のマイクロ水滴内の NaCl 濃度の関係。

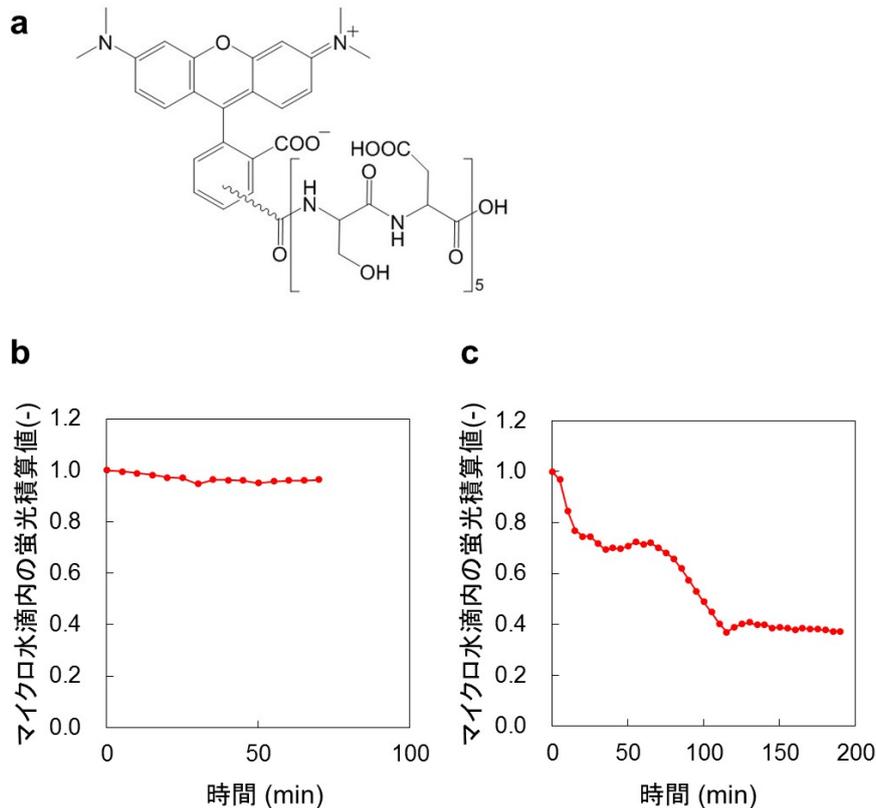


図4 蛍光標識オリゴペプチドのマイクロ水滴-逆ミセル間の分配挙動観察。
 a) 実験に使用したオリゴペプチドの化学構造。PBS (b) および 1 M NaCl 水溶液 (c) で接触洗浄した Span 80 溶液を用いて自然乳化をした際のマイクロ水滴内の蛍光積算値の時間変化

(2) マイクロ水滴内におけるプロテアーゼ活性アッセイの実証

(1) の結果をもとに本選択的濃縮法の生化学分析への応用可能性を示すため、プロテアーゼの活性の測定を着想した。まず、蛍光標識タンパク質とプロテアーゼを含む水溶液を用いてマイクロ水滴を作成し、自然乳化を起こす。その際に分子量の大きい蛍光標識タンパク質がマイクロ水滴内に留まり、プロテアーゼによって断片化されたタンパク質が逆ミセルへと分配すれば、マイクロ水滴の蛍光強度の時間変化よりプロテアーゼの活性が測定できると考えた。

実際の実験では、プロテアーゼとしてパパインを、基質としてフルオレセインで標識したウシ血清アルブミン (FITC-BSA) を用いた。また、オリゴペプチドが分配した実績のある、1M NaCl 水溶液で接触洗浄した Span 80 のヘキサデカン溶液を用いて自然乳化を起こした。その結果、マイクロ水滴内の FITC-BSA 由来の蛍光強度は時間とともに減少し、逆ミセルへと分配することが示唆された (図 5a)。パパインの濃度が高いほど FITC-BSA の分配速度が高く、また、分配量が多かった。この結果より、予想通り FITC-BSA よりも断片化された FITC-BSA の方が逆ミセルへと分配しやすいことがわかった。また、120 分におけるマイクロ水滴内の蛍光積算値をパパイン濃度に対してプロットしたところ、パパイン濃度の増加に伴い蛍光積算値が減少することがわかった。この結果より、選択的濃縮法を用いたマイクロ水滴でのプロテアーゼ活性アッセイが実証された。この実験では、1 nL のマイクロ水滴を用いており、パパインが 5 μM の水滴には 5 fmol のパパインが入っている計算になる。本手法では、5 fmol のプロテアーゼ活性測定が可能であることが示された。

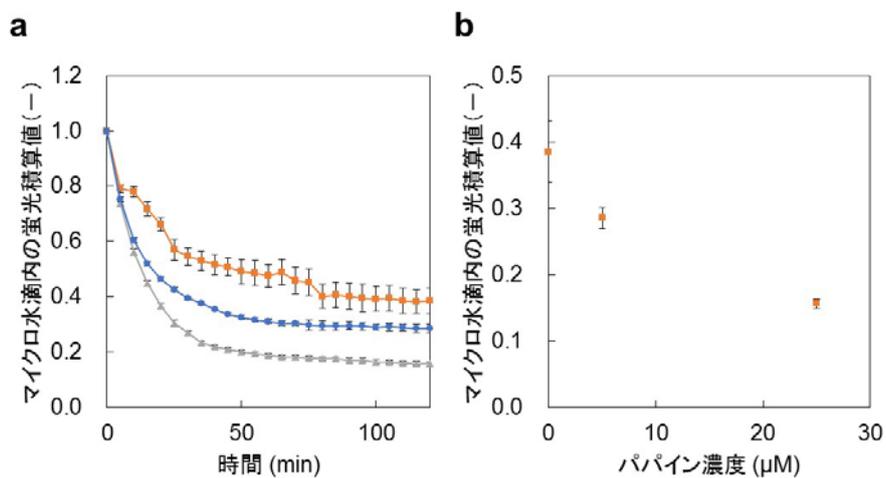


図 5 マイクロ水滴を用いたパパイン活性測定。a)パパインを 0 μM (オレンジ) 、5 μM (青) 、25 μM (灰色)含むマイクロ水滴の自然乳化時の蛍光積算値の時間変化。b) 120 min におけるマイクロ水滴内の蛍光積算値とパパイン濃度の関係。

<引用文献>

1. M. Fukuyama and A. Hibara, "Microfluidic selective concentration of microdroplet contents by spontaneous emulsification" *Analytical Chemistry* 2015, 87, 3562-3565.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 L. Zhou, M. Fukuyama, M. Proskurnin, and A. Hibara	4. 巻 1
2. 論文標題 Concentration control of aqueous microdroplets by flowing nanodroplets	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of MicroTAS 2018	6. 最初と最後の頁 373-374
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Mao Fukuyama, Yumi Yoshida, Kohji Maeda, Akihide Hibara
2. 発表標題 Control of the molecular transfer between microdroplets and nanodroplets in microfluidics
3. 学会等名 Colloidal Science & Metamaterials（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福山真央、周林、K. Lobko, M.A. Proskurnin、火原彰秀
2. 発表標題 マイクロ水滴濃縮操作を用いたナノ粒子-分子相互作用の観察
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第39回研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 L. Zhou, M. Fukuyama, M. Proskurnin, and A. Hibara
2. 発表標題 Concentration control of aqueous microdroplets by flowing nanodroplets
3. 学会等名 22nd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, MicroTAS 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 須藤誠、福山真央、火原彰秀
2. 発表標題 オリゴペプチドとタンパク質のマイクロ水滴濃縮過程の観察と反応速度解析
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考