

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：32641

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K04908

研究課題名(和文) ナノスケール脂質膜小胞の電気融合法の開発

研究課題名(英文) A microfluidic device for electrofusion of nanoscale lipid vesicles

研究代表者

津金 麻実子 (Tsugane, Mamiko)

中央大学・理工学部・共同研究員

研究者番号：00469991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体由来の小胞の検出や解析を想定したナノスケール小胞の効率的な電気融合を実現するデバイスを開発した。微細加工技術で作成したデバイスは、ガラス基板上にシリコン電極とリポソームを保持するPDMS製のマイクロウェル構造を有する。リン脂質から界面通過法を用いてリポソームを作製後、金属メッシュフィルターを用いてサイズが異なる2種類のリポソームを調製し、デバイスに導入した。蛍光顕微鏡の観察下で電気パルスを印可することにより、大小2サイズのリポソームの融合が確認された。本デバイスはマイクロウェル構造により融合前後の比較や統計処理が容易であり、効率的で網羅的な小胞の融合解析への寄与が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

電気融合法は電気パルスで膜融合を実現する汎用的方法であるが、これまで直径1マイクロメートル以下の小胞の電気融合は困難であった。本研究では、電極を微細加工により作製し、さらにマイクロウェルと組み合わせた新規デバイスを開発した。エクソソームに代表される小胞は生体において多岐にわたる機能を担っており、これらの生化学的解析に単離精製した小胞とリポソームの融合が活用できることが期待される。従来はハイブリドーマ作製など直径10マイクロメートル前後の細胞同士で培われてきた技術を、ナノスケールの小胞にも適用することで、バイオテクノロジーが扱う膜操作の適用範囲が格段に拡張すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We developed a new microfluidic device that realizes efficient electrofusion of nanoscale vesicles for the detection and analysis of vesicles derived from living cells. This device is equipped with silicon electrodes bonded to a glass substrate for electrofusion and PDMS microwells for trapping vesicles. GUVs (giant unilamellar vesicles) were prepared from phospholipids using the water-in-oil (W/O) emulsion transfer method, and then two different sizes of vesicles were prepared using a metal mesh filter with a high aperture ratio. After introducing vesicles into the fusion device, voltage pulse was applied under observation with a fluorescence microscope. We successfully performed trapping in some of the microwells and electrofusion of two sizes of vesicles.

研究分野：ナノバイオサイエンス

キーワード：リポソーム 人工脂質膜小胞 膜融合 電気融合 マイクロ流体デバイス

1. 研究開始当初の背景

脂質二重層から構成される細胞膜(原形質膜)は、融合、分裂などの物理的变化を通じて、メンブレントラフィック、エキソサイトーシス、エンドサイトーシスなど生体内で様々な生理機能に関与する。また、脂質二重膜の融合は、膜融合を人工的に制御することでモノクローナル抗体産生のためのハイブリドーマ作製などの細胞融合に活用されている。

一方、生体膜と同じリン脂質から人工的に作製された小胞であるリポソームは、ドラッグデリバリーシステム(DDS)の薬物キャリアとして利用され、細胞内に取り込まれた後にエンドソームと膜融合したり、細胞と直接融合したりと生体内の小胞と同様の挙動を示す。また近年、リポソームを人工細胞のモデルとして小胞内で生化学反応を行う技術が提案されている。

膜融合法の一つである電気融合法は、瞬間的な電気パルスにより一過的に細胞膜の穿孔や膜融合を誘発する方法であり、溶液条件を大きく変えずとも安価で簡便に遺伝子導入や物質送達を行うことができる。一般的な電気融合法では、まず電極間に1 MHz程度の交流電場を与えて誘電泳動を誘起して膜を近接させ、次に短い直流電圧のパルスを与えて近接した膜を穿孔し、膜融合を起こす。この方法では、小胞の粒子半径が小さいほどより大きな電圧を与える必要があり、電極間距離が同じであれば、直径1 μm の小胞が膜融合を起こすには10 μm の小胞の10倍大きな電圧を要する。このことから、ギャップ1 mmの電極では1000 V以上の大電圧を要するため、電極部で電気分解が生じたり、電気回路の能力を超えたりしてしまう。以上の理由で電気融合は直径5 μm 以上の大きさの細胞や小胞(GUV: giant unilamellar vesicle)に対してのみ有効であり、1 μm 以下のLUV(large unilamellar vesicle)や100 nm以下のSUV(small unilamellar vesicle)については十分な検討がされていない。しかし、メンブレントラフィックにおける輸送小胞や神経終末のシナプス小胞は数十~百ナノメートルである。近年、細胞外小胞のエクソソームががんの転移や悪性化に関与するなど細胞間の情報伝達を担うことが注目されているが、これも50-150 nmとナノサイズである。よって、ナノ小胞膜の電気融合には新規の方法や技術が求められ、この基礎的条件の確立は、小胞を扱うバイオテクノロジーの発展に有益な知見となりうると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、生体由来の小胞の検出や解析を想定した直径5 μm 以上のリポソーム(GUV)とナノスケール小胞の効率的な電気融合を実現する新規デバイスを開発することを目的とする。理論上は、小胞のサイズが小さくなるとそれに比例した電界(電圧の勾配)が必要となるため、電極間距離を小さくしたり局所電界を発生させたりなどの装置上の工夫が必要となる。そこで、ギャップ間距離が短い電極を備え、さらに小胞をトラップできるマイクロウェル構造を有する融合デバイスを開発して、融合効率を評価する。

3. 研究の方法

(1) 脂質膜小胞(リポソーム)の作製

一枚膜の脂質膜で構成されている脂質膜小胞は界面通過法により作製した。まず、POPC、POPG、コレステロールからなる脂質を溶解したオイル(流動パラフィン)とリポソームの内液となる水溶液を強く攪拌することで脂質の単分子層に覆われた油中水型(W/O)エマルションを作製した。このエマルションが分散したオイルを外液となる水溶液の上に重層し遠心すると、脂質単分子膜を形成した油水界面をエマルションが油相側から水相側へ移動する。この時、界面上に形成された単分子膜が巻き込まれ、一枚膜の脂質二重膜で構成されるリポソームが形成される。

(2) リポソームのサイズ調整

サイズの異なるリポソームの調製には、金属メッシュフィルターを用いて、大きいサイズのリポソーム除去のためにエクストルージョン(図1(a))と、小さいサイズのリポソーム除去のためのろ過(図1(b))を行った。孔径が異なる金属メッシュフィルターの選択により、リポソームは直径6 μm 以上と直径2 μm 以下の2つのサイズに調製した。

エクストルージョン

ミニエクストルーダー(Avanti Polar Lipids)のフィルターホルダーに金属フィルターを設置した。さらに、ホルダーに1 mLのリポソーム懸濁液を入れたシリンジ、反対側に空のシリンジを設置し、手動でゆっくりと加圧して、リポソームをフィルターに通過させた。

ろ過

金属フィルターを取り付けたフィルターホルダーを15 mL遠沈管に重ね、リポソーム懸濁液1 mLをフィルター上に滴下した。重力により溶液がフィルターを通過し、上部の液量が減少したら外液を追加してピペティングした。この操作を繰り返した後、外液で満たした容器の中にホルダーを立てて外液を1 mL追加し、フィルターの上部の液を1 mL回収した。

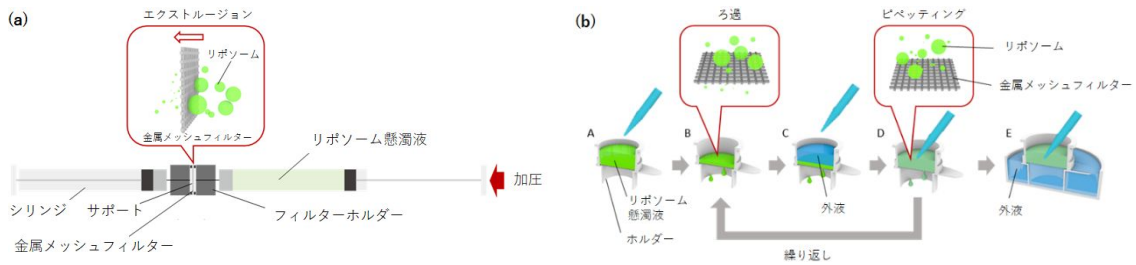


図1 金属メッシュフィルターを用いたリボソームのサイズ調整 (a)エクストルージョン、(b)ろ過

(3) カルセイン・コバルト複合体のキレート反応を用いたリボソームの融合の確認

2種類のリボソームの融合の確認にはカルセイン・コバルト複合体のキレート反応を用いた。カルセインにコバルトを加えるとカルセイン・コバルト錯体を形成し、カルセインの蛍光が消失する。この錯体に EDTA を加えると、EDTA とコバルトがキレート錯体を形成し、カルセインとコバルトの結合が解除されることで、カルセインの蛍光が復活する。この反応を利用するため、一方のリボソームの内液にカルセイン・コバルト複合体、もう一方のリボソームの内液に EDTA を加えた。異なる種類のリボソームが融合した場合のみ、内液が混合してカルセインの蛍光が見られ、融合を確認することができる。

(4) 電気融合デバイスの作製

電気融合デバイスの作製はソフトリソグラフィ技術を用いて作製した。まず、導電性シリコンウェハにレジストを塗布してマイクロウェルの構造を現像し、Deep RIE (深堀ドライエッチング) によってマイクロウェルの反転レプリカを作成した (図 2(a)A)。カバーガラスに PDMS をスピンコートした後、反転レプリカを作製したウェハを押し付け、PDMS を硬化させた (図 2(a)B)。反転レプリカ上に電極間距離が 1 mm の電極形状にレジストを塗布し、現像した後、Deep RIE によってマイクロウェルを作製した (図 2(a)C)。さらに、シリコン電極部分に導電性のワイヤを接続した (図 2(b))。小胞の電気融合の効率を比較するために、マイクロウェル構造は、ウェルが連結部で接続した構造、ウェルが独立している構造の2種類を作製した (図 2(c))。

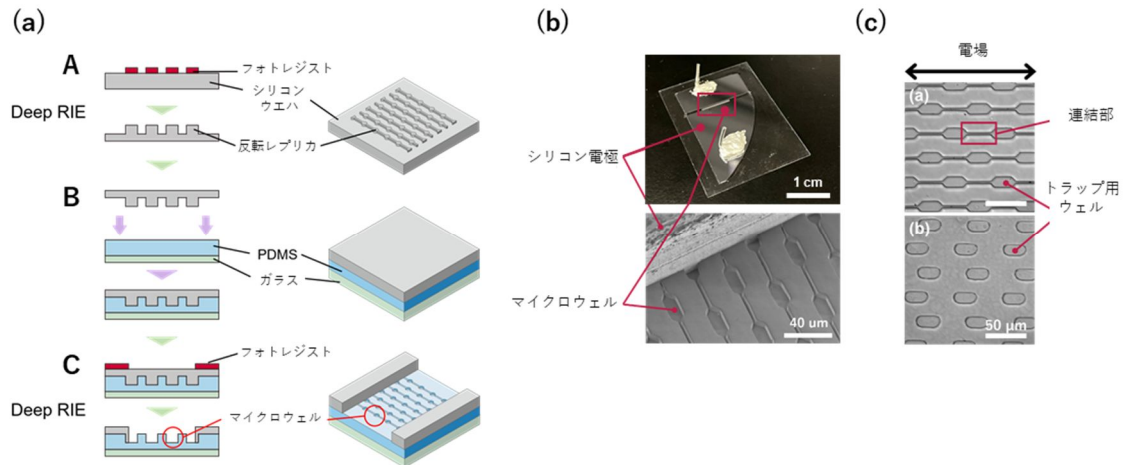


図2 電気融合デバイスの作製 (a)デバイスの作製手順、(b)デバイス全体の写真(上図)とSEM画像(下図)、(c)マイクロウェル構造の顕微鏡画像(上図が連結ウェル、下図が独立ウェル)

(5) リボソームの電気融合と蛍光顕微鏡観察

電気融合デバイスに2種類のリボソーム懸濁液の混合溶液を導入した。電気融合デバイスを電気融合装置(ネッパジーン)に接続して、共焦点レーザー顕微鏡(ZEISS)のステージに設置した。顕微鏡観察下で、電圧を印加してリボソームの融合を行った。電圧は、1 MHz、15 Vの交流電圧を150 s印加後、60 μs、500 Vの直流電圧を0.2 s間隔で3度加えた。交流電圧はリボソーム同士を近接するためだけでなく、リボソームをマイクロウェルにトラップさせるため、通常より長時間印加した。その後、リボソーム内部のカルセインの蛍光強度を観察し、融合の評価を行った。

4. 研究成果

(1) リポソームの作製とサイズ調整

界面通過法で作製したリポソームを、金属メッシュフィルターを用いてエクストルージョンとろ過でサイズ調整したところ、直径 6 μm 以上で多くは 10-30 μm (内液に Alexa 647 添加) と直径 2 μm 以下 (内液に Rhodamine 添加) の大小異なるサイズのリポソームを得ることができた (図 3)。

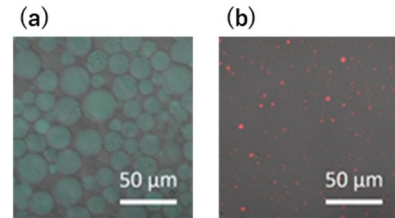


図 3 サイズの異なるリポソーム
(a)直径 6 μm 以上 (b)直径 2 μm 以下

(2) カルセイン・コバルト複合体のキレート反応を用いたリポソームの融合の確認

大サイズリポソームの内液にカルセイン・コバルト複合体と Alexa 647、小サイズリポソームの内液に EDTA と Rhodamine を加え、電気融合を試みた。本実験では、アルミ電極を電極間距離 1 mm でガラス板に貼付した簡易的な電気融合デバイスを用いた。電極の間にリポソーム溶液を入れ、アルミ電極を電気融合装置に接続し、電圧を印加した。その結果、電圧を印可して約 10 分後からカルセイン蛍光を有するリポソームが確認された (図 4)。よって、大小リポソームで融合していることが示唆された。大小 2 種類のリポソームは体積の差が大きいいため、融合後、リポソームの内液の混合に時間を要すると考えられる。

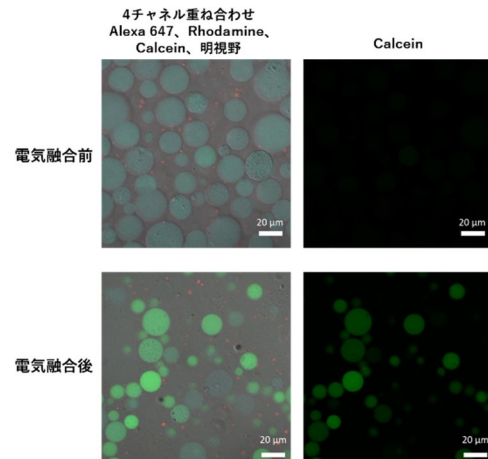


図 4 カルセイン・コバルト複合体のキレート反応によるリポソームの融合の確認

(3) 電気融合デバイスを用いたリポソームの融合

同一サイズリポソームの電気融合

電気融合デバイスにおける融合効率を確認するため、まずは 2 種類の同一サイズ (サイズ調整なし) リポソームで電気融合を行った。

カルセイン・コバルト複合体と Alexa 647 を内封したリポソームと、EDTA と Rhodamine を内封したリポソームを電気融合デバイスに導入した。その後、電圧を印可して、カルセインの蛍光を観察し、融合の有無を確認した。リポソームは内液の比重を糖で調整することにより PDMS 上に沈降し、さらに交流電圧を印加することでマイクロウェル内に 1-2 個トラップされた (図 5(a) 左図)。その後、直流電圧を印加するとリポソームが融合し、カルセインの蛍光が出現したリポソームが確認された (図 5(a) 右図、(b) 下図)。

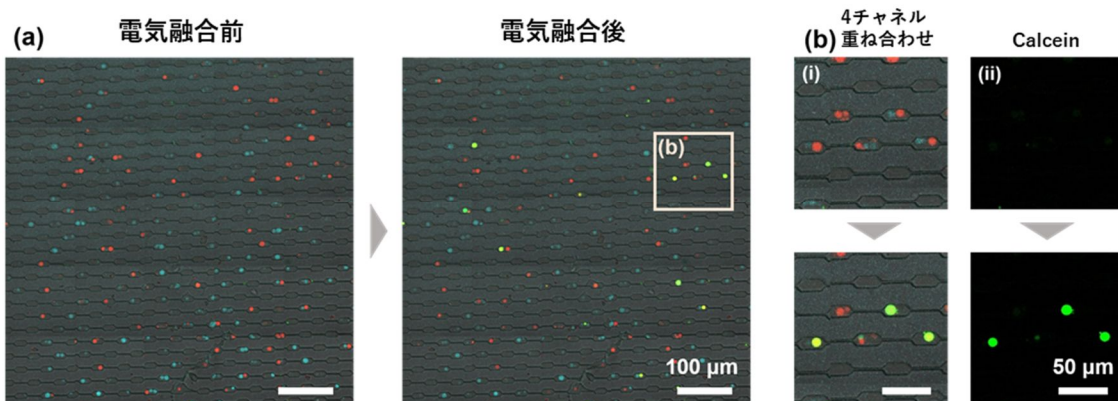


図 5 電気融合デバイスを用いたリポソームの電気融合 (a) 広範囲画像、(b) クローズアップ画像 (上図が電気融合前、下図が電気融合後)

直流電圧の印加前に 2 種類の異なるリポソームがトラップされたマイクロウェルを特定し、そのウェルにおいて電圧印加後の融合の有無、リポソーム内部のカルセインの蛍光強度を確認することにより、電気融合効率を算出した。その結果、ウェルを連結させたデバイスでは融合率が 57.4%、ウェルを独立させたデバイスでは 28.3%であった。よって、2 つの電極間における電圧の導通にはウェルをつなぐ連結部が有効であることがわかった。

大小サイズリポソームの電気融合

サイズの異なるリポソームの電気融合効率を確認するため、カルセイン・コバルト複合体と Alexa 647 を内封した大サイズリポソームと、EDTA と Rhodamine を内封した小サイズリポソームを電気融合デバイスに導入した。この実験におけるデバイスは、マイクロウェル内に大サイズリポソームが 2 つ以上トラップされないようにウェルの横幅を短くし、さらにウェル間の連結部に小サイズリポソームが入るように連結部の縦幅を長く設計した。

交流電圧の印加によって、マイクロウェルおよび連結部に 2 種類のリポソームがトラップされた(図 6 左上図)。続く直流電圧の印加により、内部にカルセイン蛍光が見られるリポソームが確認され(図 6 右下図の白色矢印)、リポソームの融合が示唆された。

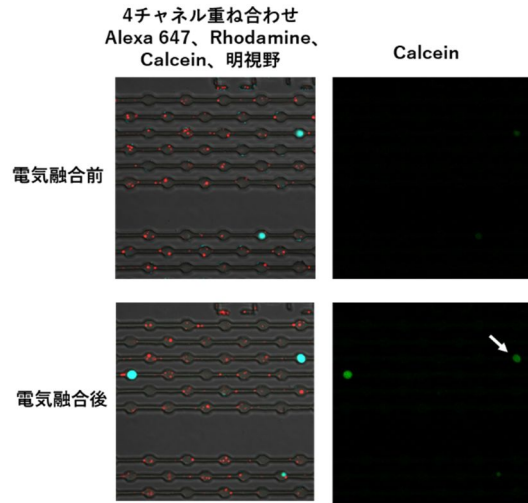


図 6 電気融合デバイスを用いたサイズの異なるリポソームの融合

このように、本研究において開発した電気融合デバイスを用いて、大小異なるサイズの電気融合を確認することができた。リポソームをマイクロウェル構造にトラップすることによって電気融合の効率を評価できる点が有用であると考えられる。

本研究ではリポソームの視認性を高めるために、小サイズリポソームとして 1 μm 前後のものを用いたが、今後はナノスケールのリポソームでの適用を予定している。ナノスケールのリポソームは、蛍光染色すれば静止状態では輝点として観測できるものの、ブラウン運動していれば蛍光を捉えることができない。しかし、融合の有無の評価は、大サイズリポソームの膜が蛍光標識した小サイズリポソームとの融合により蛍光を示すことで可能であるとすでに確認している。

さらに、本デバイスを用いてリポソームとエクソソームなどの生体由来ナノスケール小胞の融合、膜融合を活用した膜タンパク質や microRNA などの生理活性物質の解析に発展させたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsugane M. and Suzuki H.	4. 巻 8
2. 論文標題 Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction in Giant Unilamellar Vesicles.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9214
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-27547-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Araki Seigo, Nakano Masayoshi, Tsugane Mamiko, Sunaga Fumiko, Hattori Mitsuru, Nakano Masahiro, Nagai Takeharu, Suzuki Hiroaki	4. 巻 145
2. 論文標題 A simple microfluidic device for live-imaging of the vertical section of epithelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Analyst	6. 最初と最後の頁 667 ~ 674
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/C9AN02165E	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 -

1. 著者名 Tsugane Mamiko, Suzuki Hiroaki	4. 巻 9
2. 論文標題 Elucidating the Membrane Dynamics and Encapsulation Mechanism of Large DNA Molecules Under Molecular Crowding Conditions Using Giant Unilamellar Vesicles	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Synthetic Biology	6. 最初と最後の頁 2819 ~ 2827
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acssynbio.0c00360	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 沖田勉、津金麻実子、鈴木宏明
2. 発表標題 脂質膜小胞の高効率電気融合デバイスの開発
3. 学会等名 化学とマイクロナノシステム学会第40回研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 篠原啓佑、沖田勉、津金麻実子、鈴木宏明
2. 発表標題 金属メッシュフィルターを用いた人工脂質膜小胞のエクストルージョン法の評価
3. 学会等名 化学とマイクロナノシステム学会第40回研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 津金麻実子, 鈴木宏明
2. 発表標題 リボソームを用いたRNA検出システムの開発
3. 学会等名 化学とマイクロナノシステム第37回 研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 津金麻実子, 鈴木宏明
2. 発表標題 ジャイアントリボソームを用いたRNA検出系
3. 学会等名 平成30年度生理研研究会（生体コモンスペース研究会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H. Suzuki, M. Tsugane, F. Sunaga, T. Okano
2. 発表標題 Spontaneous encapsulation of genome-size DNA into lipid bilayer vesicles
3. 学会等名 ALIFE 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野正義, 津金麻実子, 鈴木宏明
2. 発表標題 マイクロ流体デバイスを用いた上皮細胞縦断面の高解像度ライブイメージング
3. 学会等名 第46回可視化情報シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木宏明, 津金麻実子, 須永史子, 岡野太治
2. 発表標題 Spontaneous enveloping of genome-size DNA into lipid membrane
3. 学会等名 日本生物物理学会第56回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野正義, 荒木誠吾, 津金麻実子, 須永史子, 鈴木宏明
2. 発表標題 マイクロ流体デバイスを用いた上皮細胞縦断面の高解像度イメージング
3. 学会等名 化学とマイクロナノシステム第38回研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. Nakano, S. Araki, M. Tsugane, F. Sunaga, H. Suzuki
2. 発表標題 High-Resolution Imaging of the Vertical Section of Adherent Cells Using a Microfluidic Device
3. 学会等名 μ TAS 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 津金麻実子, 鈴木宏明
2. 発表標題 ジャイアントリポソームを用いたRNA検出システムの開発
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 M. Tsugane & H. Suzuki	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 14
3. 書名 Handbook of Single Cell Technologies, "Liposome-mediated material transfer in single cells"	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------