

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：32641

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H02576

研究課題名(和文) 脂質二重膜バイオリアクタ形成デバイスの開発とバイオマーカー検出技術への応用

研究課題名(英文) A Production Device for Lipid Bilayer Bioreactor and Its Application for Biomarker Detection Technology

研究代表者

鈴木 宏明 (Suzuki, Hiroaki)

中央大学・理工学部・教授

研究者番号：20372427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロ流路を用いた均一なドロップレットが産業界で広く使われるようになってきたが、脂質二重膜でできた巨大脂質膜小胞(GUV)の系はその段階に至っていない。最大の要因は、均一なGUVを製造するのが困難なことである。本研究では、マイクロ流体工学を用いて簡便かつ高効率にナノ-ピコリットルサイズの巨大脂質膜小胞を区画とした均一なバイオリアクターを製造する方法を確立した。これを、タンパク質合成反応や膜タンパク質再構成のプラットフォームとして用いられること、また、がんなどの疾患バイオマーカーの検出に応用するための膜融合および核酸増幅反応を行えることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この10年ほどでマイクロ流路を用いたGUVの生成法が複数発表されてきたが、いずれもシステムの構築および動作が比較的複雑で再現性の面で困難があった。本研究で構築した均一GUV生成法は、再現性が高く、経験の浅いオペレータでも動作でき、多くの実験条件を試すことができる。これにより、GUVをバイオリアクターとして用いた研究が加速する。また、GUVを用いたバイオマーカー検出法の確立に関しても、道筋を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Uniform droplets using microfluidic devices have become widely used in industry, but giant unilamellar vesicles (GUVs) made of lipid bilayers have not yet reached that stage. The main reason is the difficulty in producing uniform GUVs. In this work, we established a simple and highly efficient method for producing uniform bioreactors composed of nano- to picoliter-sized GUVs using microfluidics. We have also shown that this system can be used as a platform for protein synthesis reactions and membrane protein reconstitution, as well as for membrane fusion and nucleic acid amplification reactions for the detection of disease biomarkers.

研究分野：バイオチップ

キーワード：リボソーム マイクロ流路 核酸増幅 バイオリアクター 膜タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

この10年ほどで、微小液滴を使ったデジタルマイクロfluidicsが生化学分析や診断などの分野で様々な用途に応用され、多くの機器が市販されるようになった。この技術では、ナノ~ピコリットルの反応容器を多数並列に調整することができ、単一の細胞やウイルス、遺伝子を検出するための用途に使われる。これらは、オイル中に分散した均一なマイクロ液滴(ドロップレット)を反応容器として利用している。

一方、自然界のマイクロリアクタである細胞やオルガネラは、脂質二重膜を区画として使っている。脂質二重膜を人工的に再構成したりリポソームは外側が水環境であり、反応容器に細胞が持つ機能(選択的物質透過能や、膜融合や出芽による物質の取込み、放出など)を付与することができる。申請者を含む多くの研究者により、巨大脂質膜小胞(GUV)を用いた擬似細胞反応系の構築法が確立されてきた。

しかし、GUVの系は、上記の液滴系とは異なり、産業界で利用される段階に至っていない。最大の要因は、均一なGUVを製造するのが困難なことである。従って、GUVの製造法に革新をもたらすことが、産業応用への道筋の「谷」を克服するための必要要件である。脂質二重膜の形成は純粋な力学的プロセスであり、流体力学と界面科学によるアプローチが不可欠で、これを巧みに制御することが肝要であるが、これまで工学的な素養を持った研究者の参入は限定的であった。脂質二重膜形成の力学を理解し、そのパラメータ微調整を行うことで均一かつ高効率な工業的GUV形成法確立につながる。

脂質膜小胞(リポソーム、ベシクル)は、薬学分野では薬剤送達システム(DDS)、生物物理学分野では細胞膜モデルの容器として研究が進められてきた。しかし、工学、特に力学を専門とする研究者が研究対象とした例は多くない。最近、海外の研究グループにより、マイクロ流体デバイスを用いた均一GUVの作製法が複数報告された。オランダ・ラドバウド大学化学科のW. Huck教授のグループは、W/O/W型エマルジョンをテンプレートとし、外力を加えずとも界面張力のバランス調整で自発的かつほぼ100%の効率でGUVが生じる系を報告した(NN Deng et al., JACS, 2016)。しかし、その系は手作りでガラス管を組み合わせることで接着したものであり、再現性に難がある。かつ、溶媒として生体毒性があるトルエンやクロロホルムを使用しているため、生化学検査等に用いる場合に問題が生じ得る。

## 2. 研究の目的

本研究では、マイクロ流体工学を用いて簡便かつ高効率にナノ~ピコリットルサイズの巨大脂質膜小胞を区画とした均一なバイオリアクターを製造する方法を確立し、がんなどの疾患バイオマーカーの検出に応用することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 均一リポソーム生成法の開発

申請者は、2019年9月から2020年8月まで、所属機関の在外研究制度を利用して、オランダのラドバウド大学・Wilhelm TS Huck教授の研究室に滞在した。そこで、キャピラリーの組み立てを利用した均一リポソーム形成法を習得した。同時進行で、マイクロ流路を用いた均一リポソームの形成法の開発を進めた。マイクロ流路内でW/O液滴を形成し、その下流でO-W界面通過を発生させる流路を設計した。均一な薄膜のW/O/W液滴ができ、さらにそれが逆濡れ現象(dewetting)によりリポソームへの変換が起こる外液相、オイル相、および内液相の組成条件を念に検討した。

### 均一径リポソームのバイオリアクター利用

研究期間の後半では、上記の均一の内部で様々な生化学反応が起こる条件を検討した。一つ目は、再構成された無細胞転写翻訳系(PUREsystem)によるタンパク質合成が起こる条件を検討した。一般的に生化学反応は生理的塩濃度の環境下で進行するが、この条件ではW/O/W液滴のシェルが脂質二重膜に変換されるときに破裂する現象が多く見られた。脂質組成やその他の溶液組成を広範囲に検討した。また、当該均一リポソームは、浸透圧刺激によって収縮させ、その内部にある分子を濃縮することができる。この現象を利用して、当初計画していなかった、リポソーム内におけるDNAゲルの形成制御を行った。DNAゲルを形成するDNAナノスターをリポソーム内に封入し、浸透圧で収縮させるとそれらが濃縮され、人工的に細胞核を模擬した凝集体を形成させた。

### リポソーム内miRNA増幅法の開発

リポソームの膜融合を利用して、膜に内封された核酸(mRNA, miRNAなど)をリポソームリアクター内に取り込み、増幅反応により検出する系の構築を行った。界面通過法により作製したりポソーム内に、酵素とオリゴを組み合わせた指数等温増幅反応系(Exponential isothermal amplification)を封入させ、蛍光により核酸の増幅を確認した。また、膜融合を効率的に行うため

のマイクロ電極を開発し、それによりターゲット核酸の検出を効率的に行うための系の構築を目指した。

#### 4. 研究成果

##### 均一リポソーム生成法の開発

オイル相として、粘度が比較的低いスクアレンを用い、それに 20% 程度のイソプロパノールを加えることで、PDMS 流路内でオイルが濡れ広がらずに安定した界面を形成できること、また、外液相に界面活性剤および PVA を加えることで、100% に近い界面通過率が得られることを見出した (図 1)。この方法は送液量の微調整が不要で、再現性が高く、多くの実験条件をこなせる系であることが確かめられた。 $\alpha$ -hemolysin のナノポア形成アッセイにより、逆濡れ後に脂質二重膜が形成されることも確認した。

##### 均一径リポソームのバイオリクター利用

PUREsystem を含む均一 W/O/W 液滴から均一 GU 形成させ、その内部で緑色蛍光タンパク質 (GFP) の合成反応が進行する条件を確立した。特に、脂質の種類と濃度の選択が重要であった。外液相の組成も吟味し、GU 内において、試験管内反応の 50% 程度の合成効率が見られることが分かった。同様に、膜タンパク質を用いたバイオセンサー応用に向けて、 $\alpha$ -hemolysin の in situ 合成と再構成を試した。外液相で  $\alpha$ -hemolysin のペプチド合成を行った場合にはナノポア形成による内封マーカー分子の漏出が明確に見られた。内液相でペプチド合成を行った場合には、ナノポア形成活性が低かったが、組成条件を入念に検討することで、マイクロ流路で形成させた均一 GU への膜タンパク質再構成への道筋を拓くことができた。

さらに、流路で作製した GU 内部に DNA ナノスターを封入し、液液相分離により均一な DNA 凝集体を形成させることにも成功した。これは、細胞が持つ最大かつ最重要なオルガネラである核を人工的につくる目的に応用できる。

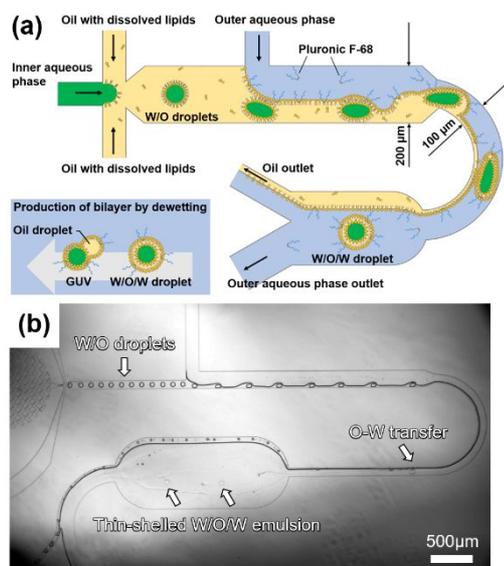


図 1 (a) マイクロ流路内均一 W/O/W 液滴形成と GU への変換プロセスの模式図。(b) 実際の流路を動作させている際の顕微鏡画像。

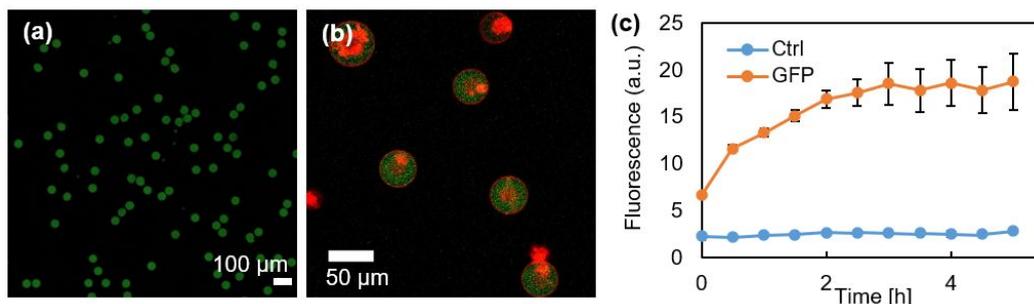


図 2 (a, b) 均一 GU 内の GFP 合成の顕微鏡画像。(c) GU 内 GFP 合成の時間変化。

##### リポソーム内 miRNA 増幅法の開発

等温の EXPAR (Exponential Amplification Reaction) 反応を用い、顕微鏡およびフローサイトメトリーで蛍光検出する方法を確立した。カスタムのマイクロ電極を用い、小胞の膜融合を効率化させることで、検出感度の向上を目指す系を構築した。また、派生テーマとして、振動誘起流れを用いて微小な流れ場をつくり、極微量サンプル中の miRNA を免疫凝集法で検出する技術を確認した。以上のように、申請当初に提案した内容を達成するだけでなく、複数の派生テーマが進行し、バイオマーカー検出のレパートリーを増やすことに成功した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ushiyama Ryota, Koiwai Keiichiro, Suzuki Hiroaki	4. 巻 355
2. 論文標題 Plug-and-play microfluidic production of monodisperse giant unilamellar vesicles using droplet transfer across Water?oil interface	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sensors and Actuators B: Chemical	6. 最初と最後の頁 131281 ~ 131281
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.snb.2021.131281	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 Shinohara Keisuke, Okita Tsutomu, Tsugane Mamiko, Kondo Takashi, Suzuki Hiroaki	4. 巻 241
2. 論文標題 Sizing of giant unilamellar vesicles using a metal mesh with a high opening ratio	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemistry and Physics of Lipids	6. 最初と最後の頁 105148 ~ 105148
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chemphyslip.2021.105148	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 Koseki Kaoru, Suzuki Hiroaki	4. 巻 36
2. 論文標題 Deformation Dynamics of Giant Unilamellar Vesicles in the Large Surface-to-Volume Ratio Regime: The Emergence of Neuron-like Morphology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 6238 ~ 6244
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.langmuir.0c00872	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 -

1. 著者名 Katsuta Shota, Okano Taiji, Koiwai Keiichiro, Suzuki Hiroaki	4. 巻 35
2. 論文標題 Ejection of Large Particulate Materials from Giant Unilamellar Vesicles Induced by Electropulsation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 13196 ~ 13204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.9b01617	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20件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 9件)

1. 発表者名 山田, 牛山, 鈴木
2. 発表標題 マイクロ流路を用いたW/O/Wドロップレットの薄層化による単分散リポソーム作製法の検討
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第43回研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 H. Suzuki, R. Ushiyama, K. Koiwai
2. 発表標題 A plug-and-play microfluidic device for efficient generation of monodisperse giant unilamellar vesicles
3. 学会等名 20th IUPAB Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 T. Okita, M. Tsugane, K. Shinohara, K. Kato, H. Suzuki
2. 発表標題 A Microfluidic Device with Silicon Electrodes for Quantitative Evaluation of Vesicle Fusion
3. 学会等名 $\mu$ TAS 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 K. Shinohara, T. Okita, M. Tsugane, T. Kondo, H. Suzuki
2. 発表標題 Monodispersion of Giant Unilamellar Vesicles Using a Metal Mesh Filter
3. 学会等名 μTAS 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 牛山, 小祝, 松浦, 鈴木
2. 発表標題 マイクロ流路を用いた効率的液滴界面通過による単分散GUVの作製と特性評価
3. 学会等名 細胞を創る研究会 14.0
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 沖田, 津金, 篠原, 加藤, 鈴木
2. 発表標題 マイクロチャンバーを有する電気融合デバイスにおける小胞融合率の評価
3. 学会等名 日本機械学会第12回マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤, 津金, 篠原, 沖田, 鈴木
2. 発表標題 マイクロデバイスを用いた膜小胞融合と内封 DNA の増幅
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第44回研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 牛山, 小祝, 松浦, 鈴木
2. 発表標題 マイクロ流路内 W/O 液滴界面通過による単分散 GUV の作製と機能評価
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第44回研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤(雅), 渡邊, 的野, 野出, 上野, 松浦, 芳坂, 鈴木
2. 発表標題 ピレン修飾巨大リポソームの作製と酸化グラフェンとの相互作用解析
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第44回研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 米山, 牛山, 瀧ノ上, 鈴木
2. 発表標題 単分散 GUV 内での DNA ゲル形成
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第44回研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 篠原, 津金, 鈴木
2. 発表標題 複合コアセルベートとリポソームの相互作用に関する基礎検討
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第44回研究会
4. 発表年 2021年

1 . 発表者名 T. Okita, M. Tsugane, K. Shinohara, H. Suzuki
2 . 発表標題 Electrofusion device with the structural trapping for massive and quantitative measurement of vesicle fusion
3 . 学会等名 Pacifichem 2021 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 R. Ushiyama, T. Matsuura, K. Koiwai, H. Suzuki
2 . 発表標題 Production of monodisperse giant unilamellar vesicles using a microfluidic channel
3 . 学会等名 Pacifichem 2021 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 K. Shinohara, T. Okita, M. Tsugane, H. Suzuki
2 . 発表標題 Size purification of giant unilamellar vesicles using the mesh filter with the high opening ratio
3 . 学会等名 Pacifichem 2021 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 R. Ushiyama, H. Suzuki
2 . 発表標題 Efficient Production of Monodisperse Giant Unilamellar Vesicles by Transferring across the W-O Interface
3 . 学会等名 MEMS 2021 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2021年

1. 発表者名 牛山涼太, 鈴木宏明
2. 発表標題 単分散巨大人工脂質膜小胞の効率的作製に向けた界面通過条件の詳細検討
3. 学会等名 日本機械学会第 11 回マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2020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 高開口率の金属メッシュを使用した巨大人工脂質膜小胞のサイズ調整
3. 学会等名 細胞を創る研究会13.0
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 S. Katsuta, T. Okano, H. Suzuki
2. 発表標題 Ejection of large particulate materials from giant unilamellar vesicles
3. 学会等名 Microtas 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. Suzuki
2. 発表標題 Giant Liposome-based Dynamic Bioreactor
3. 学会等名 Okinawa Colloids 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 勝田翔太, 岡野太治, 鈴木宏明
2. 発表標題 電気パルスを用いた巨大リボソームからのマイクロ物体の排出
3. 学会等名 第58回日本生体医工学会大会 & BMS研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 David Boal	4. 発行年 2020年
2. 出版社 森北出版	5. 総ページ数 656
3. 書名 細胞のメカニクス(第2版)	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 W/O/W液滴の製造方法, W/O/W液滴の製造装置及びW/O/W液滴	発明者 鈴木宏明, 牛山諒太	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-075103	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------