

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K21930

研究課題名(和文) ナノ空間平行二相流を活用した細胞膜組込ナノ流体デバイス作製法の開発

研究課題名(英文) Development of a fabrication method for cellular membrane-integrated nanofluidic device utilizing nanochannel parallel two-phase flows

研究代表者

嘉副 裕 (Kazoe, Yutaka)

慶應義塾大学・理工学部(矢上)・准教授

研究者番号：20600919

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：100 nm空間を利用するナノ流体工学が進展し化学分析法の超高性能化が実現しつつある。一方、同スケールの細胞・小胞は既存の化学的方法ではできない多種多様な機能を有しており、構成要素である細胞膜は様々な分子の超高選択的輸送や濃度勾配を逆行する能動輸送など特異的な役割を担う。そこで、細胞膜をナノ流路に組込んだ新しい機能デバイスの創製に向けて、本研究では独自のナノ空間混相流体制御技術を活用した脂質二重膜組込法を開発した。部分疎水修飾したナノ流路を用いることで安定な平行二相流操作を実現し、これを用いることで2本の並行する深さ4000 nmの流路の境界に脂質二重膜を形成することに初めて成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、細胞や小胞のもつ多種多様な機能をナノ空間で再現し、既存の化学的手法の延長でない新奇方法論による超高選択的分離、少数薬物モニタリングなどナノ流体工学の新領域を開拓するための基盤技術を提供するものである。細胞膜の力学的応答の評価などin vitro研究ツールとしても活用でき、in vivo研究では困難であった現象解明の実現にも繋がる。このように、本研究は将来的にナノ流体工学、分析化学、生物学などの分野に大きな波及効果をもたらすと期待される。

研究成果の概要(英文)：Nanofluidics utilizing 100 nm spaces has developed and realized analytical methods with ultra-high performances. On the other hand, cells and organelles with sizes similar to micro/nanospaces have various functions, which can not be realized by conventional chemical methods, and cellular membranes have specific roles such as ultra-high selective molecular transport and active transport opposite to the concentration gradient. Therefore, to create new functional devices by incorporating cellular membrane in nanochannels, this study developed a method to form lipid bilayer in nanochannel utilizing our multiphase fluid control technology. Utilizing a nanochannel with partial hydrophobic modification, stable manipulation of parallel two-phase flow was achieved. Based on this fluid operation, we succeeded in formation of lipid bilayer at an interface between two parallel channels with a 4000 nm depth for the first time.

研究分野：マイクロ・ナノ流体工学

キーワード：ナノ流路 脂質二重膜 混相流

1. 研究開始当初の背景

10-1000 nm のナノ流体工学が進展し、ナノ空間の支配的な表面効果や体積 aL-fL という空間の小ささを利用することで、超微量・超高効率のクロマトグラフィ (Ishibashi *et al.*, *Small*, 2012) など化学分離・分析法の超高機能化が実現しつつある。

一方、10-1000 nm 空間と同スケールの細胞・小胞は、既存の化学分離・分析法ではできない多種多様な機能を有している。特に、これらの構成要素である細胞膜と膜タンパクは、細胞・小胞内外で脂溶性分子、イオン、タンパクなど様々な分子種の超高選択的輸送を実現し、濃度勾配を逆行する能動輸送を駆動するなど特異的な機能を有している (図 1(a))。

そこで代表者は、図 1(b)のように細胞膜と膜タンパクをナノ流路に組み込めば、細胞・小胞がもつ機能を再現でき、既存の化学の方法の延長でない新しいナノ流体機能デバイスを創成できると着想した。夾雑物中の 1 種の分子/イオン分離・精製、薬物の簡易・迅速モニタリングなどが実現し、将来的には人工細胞/小胞システムの構築にもつながると期待される。

しかし、微小空間への細胞膜と膜タンパクの組込は今のところマイクロスケールに留まっており、ナノ流路では未実現である。その原因は、現状では油相と水相の流体を用いて両親媒性の脂質分子を操作し、細胞膜の主成分である脂質二重膜を形成する方法が一般的であるが、ナノ空間では粘性力と表面張力の効果がマイクロに比べて桁で上昇するため、多相流体制御が極めて難しいことにある。

これに対して、代表者は、ナノ流路の部分疎水修飾法を開発して、液液界面制御による油水平行二相流の形成にはじめて成功した (Kazoe *et al.*, *Lab Chip*, 2019)。よって、これを用いれば、図 1(b)の構想の第一歩であるナノ流路への細胞膜組込を実現できると考えた。

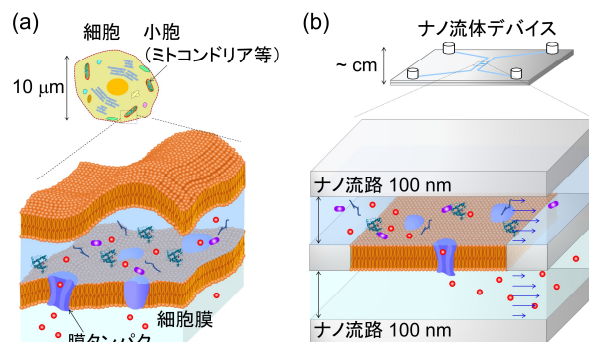


図 1 本研究の構想

2. 研究の目的

本研究の目的をナノ流路の油水平行二相流制御技術を活用したナノスケール脂質二重膜組込法の開発とし、ナノ流路の設計・作製と平行二相流形成の確認、及び脂質二重膜組込の検証に取り組んだ。

3. 研究の方法

図 2 に、本研究で提案したナノ流路への脂質二重膜組込法における流路設計と原理を示す。2本の並行するナノ流路の片方を疎水修飾して脂質分子のクロロホルム溶液(油相)を圧力で送流し、もう片方の流路に緩衝液(水相)を流す。ナノ流路を部分疎水修飾することで、油水界面が表面張力(ラプラス圧)により安定に保持され、両親媒性の脂質分子の親水基が界面の水相側に吸着する。水相を保持しながらクロロホルムを緩衝液に置換すると、親水疎水相互作用により脂質分子の疎水基同士が向かい合い、脂質二重膜が形成される。一般的に空間サイズが小さくなるほど表面張力が支配的に働くため、本手法はナノ流路のような超微小空間にも適用できる。

以上の複雑な流体操作を実現するため、表面張力と流体力のバランスを考慮して流路を設計・作製し、平行二相流形成を確認した。次に、蛍光分子でラベル化したリン脂質を用いて脂質二重膜形成を検証した。

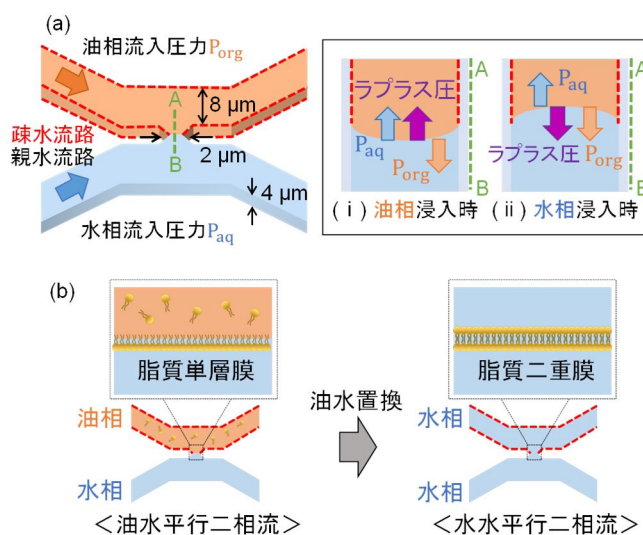


図 2 提案手法の(a) 流路設計と(b)原理

4. 研究成果

脂質二重膜形成の検証結果を図 2 に示す。図 3(a)に示すように、部分疎水修飾した流路を利用することで、油相と水相に等しい圧力を印加した状態で油水平行二相流の安定形成に成功した。

また、油相を水相に置換した後得られた蛍光画像（図 3(b)）より、並行する 2 本の流路（深さ 4000 nm）の境界に脂質二重膜が形成されていることを確認した。また、脂質二重膜は電気抵抗値が数 $G\Omega$ と大きいことに着目し、電流測定からも脂質二重膜の形成を確認した。以上より、脂質二重膜の形成に成功し、提案した手法を検証した。2 本の並行する流路が脂質二重膜で仕切られているため、膜の両側で独立な流体操作が可能であり、様々な応用が期待される。

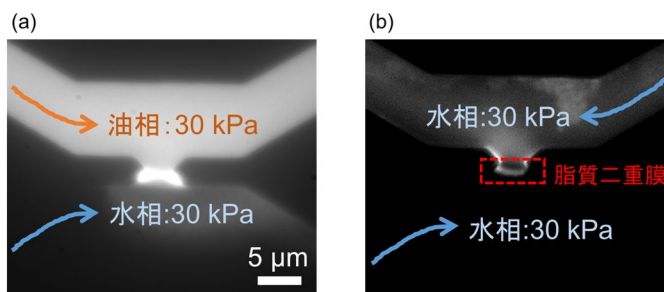


図 3 脂質二重膜形成の検証結果(蛍光画像) (a) 油水平行二相流の形成、(b) 脂質二重膜の形成

以上、独自の微小空間平行二相流制御技術にもとづき、並行する 2 本の微小流路の境界に脂質二重膜を形成する方法を提案し、これを検証した。本手法は細胞膜の機能を活用したナノ流体機能デバイス創製のための基盤となるものであり、将来的に分析、バイオへの応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 Hiroki Sano, Yutaka Kazoe, Takehiko Kitamori	4. 巻 37
2. 論文標題 Stable Formation of Aqueous/Organic Parallel Two-phase Flow in Nanochannels with Partial Surface Modification	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 1611 ~ 1616
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/analsci.21P138	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 嘉副裕	4. 巻 4
2. 論文標題 ナノ混相流体工学によるフェムトリットル化学プロセッシング	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 57 ~ 60
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 無
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 Koki Shoda, Minori Tanaka, Kensuke Mino, Yutaka Kazoe	4. 巻 11
2. 論文標題 A Simple Low-Temperature Glass Bonding Process with Surface Activation by Oxygen Plasma for Micro/Nanofluidic Devices	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 804 ~ 804
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/mi11090804	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 Yutaka Kazoe, Takuya Ugajin, Ryoichi Ohta, Kazuma Mawatari, Takehiko Kitamori	4. 巻 19
2. 論文標題 Parallel multiphase nanofluidics utilizing nanochannels with partial hydrophobic surface modification and application to femtoliter solvent extraction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Lab on a Chip	6. 最初と最後の頁 3844-3852
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/C9LC00793H	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4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 嘉副裕
2. 発表標題 ナノ流体工学による超高感度1分子分析技術の開発
3. 学会等名 第5回Skin Disease Research Conference (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹添直之, 嘉副裕
2. 発表標題 部分疎水修飾マイクロ流路での油水平行二相流を用いた脂質二重膜合成法の開発
3. 学会等名 4大学ナノ・マイクロファブリケーションコンソーシアム・シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹添直之, 嘉副裕
2. 発表標題 部分疎水修飾マイクロ流路での油水平行二相流操作による脂質二重膜合成法の開発
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 松浦柊, 嘉副裕, 北森武彦
2. 発表標題 ナノ平行二相流を用いたフェムトリットルタンパク質精製
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, アクトシティ浜松, 静岡
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 マイクロ・ナノ熱工学の進展編集委員会、丸山 茂夫、稲田 孝明ほか17名	4. 発行年 2021年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 808
3. 書名 マイクロ・ナノ熱工学の進展	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 マイクロ流体デバイス及び脂質二重膜を形成するための方法	発明者 嘉副裕, 竹添直之	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-210046	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
---------	---------