

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2008～2010

課題番号：20246044

研究課題名(和文) オンチップ・テザートマイクロツールによる生体膜輸送体の動的計測と評価

研究課題名(英文) Evaluation and dynamic measurement of biomembrane transporter using on-chip tethered microtool

研究代表者：

新井 史人 (ARAI FUMIHITO)

名古屋大学・工学研究科・教授

研究者番号：90221051

研究成果の概要(和文)：研究では、フォトファブ리케이션を基盤とする微細加工技術を駆使し、局所限定空間を有するマイクロ流体チップを製作し、その内部で細胞や機能性マイクロツールを操作し、チップ内の環境制御で生じる細胞変化を計測可能な、単一細胞レベルの操作・観察・計測システムに関する研究を推進した。本システムを用いて、高浸透圧ストレスによる細胞の体積変化の計測により、従来誰も調べることができなかった生体膜輸送体の機能の定量評価を実現した。

研究成果の概要(英文)：We promoted the research on basic technologies for on-chip single cell analysis to measure the cell variations induced by control of the environmental conditions and physical stimulus using functional microtool. We fabricated the microfluidic chip having local cell cage by micro-processing based on photofabrication. Functional microtools such as tethered shape tool, flexible tool and sensing tool, were also fabricated. We succeeded in quantitative evaluation of biomembrane transporter by measuring the volume variation of the cell induced by osmotic stimulus on this system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	19,600,000	5,880,000	25,480,000
2009年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
2010年度	9,400,000	2,820,000	12,220,000
総計	38,300,000	11,490,000	49,790,000

研究分野：知能機械学・機械システム

科研費の分科・細目：機械力学・制御

キーワード：マイクロ・ナノデバイス、光ピンセット、先端機能デバイス、ナノバイオ、フォトリソグラフィ、イオンチャネル、マイクロ流体デバイス、遺伝子操作

1. 研究開始当初の背景

微生物は常に環境の変化にさらされており、それらに対する適応機構が生存のためには非常に重要である。例えば外界の浸透圧が下がると細胞内に水が流入する。水が流入し続けると最後には細胞が破裂し、その生物は死に至ってしまう。そこで、細胞の膨張による細胞膜の張力の増加で機械刺激受容性チャネル(mechanosensitive channel, MscL)が開閉し、イオン等を流出させることにより細胞内の浸透圧も下げて、それ以上の水の流入

を防ぐ適応機構が備わっている。このように MscL は細胞の浸透圧調節および生体膜のテンションの調節に必須の生体膜輸送系と考えられている。

従来 MscL の機能解析はパッチクランプ法で陰圧を与えながら測定しイオン排出を測定する実験が行われている。しかし実際に細胞の容量変化を示す実験は行われておらず、細胞の容量変化への MscL の影響を考察させるデータも示されていない。つまり MscL の機能は、生化学的実験を用いた間接

的な結果に基づく推定の域を脱していない。研究分担者の魚住が行っている水輸送の通路となる水チャネル(AqpZ)の研究においても、細胞収縮の測定法として細胞へのフリーラジカルの取り込み実験を行っているが、直接的なデータではないため結果に疑問が残っており、更なる調査が必要である。

細胞の容量変化の測定を難しくする要因として、(1)細胞の外部環境を経時的に変化させるには集菌や菌の洗浄などが必要であり、特定の観察対象を長時間観察することは難しい (2)外界の変化を起こすタイミング調整は困難であることがあげられる。これらの要因を解決するには従来の計測技術では不十分であり、機械システム学的アプローチの導入が必要であった。

機械システム学の観点からでは、近年の細胞の構成要素並びに細胞集団を扱うバイオ産業が発展する中で、細胞の機能にはまだ不明な部分が多い。バイオチップを作製し、内部の層流を利用して細胞周りの電気化学的勾配やイオン濃度勾配などの環境情報を変化させる研究報告があるが、特定の細胞や選ばれた細胞集団に対する調査は困難である。バイオチップを用いた細胞実験に微小操作が加わることで、細胞を極めて高い選択性をもって高精度に位置決めし、細胞周りの実験条件を柔軟に変更できるようになり、細胞システムの仕組みをより詳細に調査できる。工学的に新しい操作手法とバイオチップの高機能化を複合的に組み合わせることで、目的達成に適した計測システムが実現できる。

2. 研究の目的

本研究では、光合成微生物であるラン藻の浸透圧変化による細胞の容量変化や剛性変化を、実際に細胞の外部環境をさまざまに変化させながら、単一細胞レベルでリアルタイムに観測するシステムの構築を目的とする。このシステムを用いて、これまでの疑問点や矛盾点を解消し細胞の機能としくみに関するまったく新しい知見を得て、生物科学の発展に寄与することを目的とする。

本研究では我々のこれまでの成果を更に発展させ、環境制御が可能な局所限定空間を有するマイクロ流体チップや細胞計測のため機能性マイクロツールをフォトファブ리케이션に代表される MEMS 技術により製作し、オンチップ細胞評価システムを構築する。本システムを単一細胞の局所環境計測に応用し、特に実現が困難とされる細胞の局所情報 (pH, 温度, 剛性, 粘度など) をリアルタイムに計測することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、フォトファブ리케이션を基盤とする微細加工技術を駆使して、マイクロ流路と流体制御機能を有するマイクロ流体チップと、機能性マイクロツールを製作し、チップ内部の環境制御で生じる細胞の変化を計測可能な、単一細胞レベルの操作・観察・計測システムを構築する。環境変化に伴う細胞の容積, 剛性等を動的に計測し, 分子生物学的手法に基づいて生体膜輸送体の特性, 機能と仕組みを解明する。本研究では, 高浸透圧適応機構を有するラン藻の一種の *synechocystis* sp. PCC6803 を用いる。本研究は, 下記の 3 つの班で分担し研究を進める。

(1) 環境計測 (丸山)

①単一細胞評価のための局所限定空間の形成と環境制御

② 単一細胞評価のための局所環境計測 (2) 細胞操作 (新井)

①テザードマイクロツールの加工とオンチップ化

②テザードマイクロツールのレーザ駆動制御

③テザードマイクロツールの機能化と局所計測

(3) 細胞計測・評価 (魚住)

①浸透圧変化による細胞の容量変化の計測と評価

②浸透圧変化による細胞の剛性変化の計測と評価

4. 研究成果

(1) 単一細胞評価のための局所限定空間の形成内部への単一細胞の導入・環境制御

単一細胞評価を目的として、図 1 に示すような内部に局所限定空間を有し pH, 電解質濃度等を制御可能なマイクロ流体チップを設計し作製した。流路中の任意の細胞を図 2 に示すように光ピンセットを用いて細胞 1 個単位で限定空間に搬送し保持する。この限定空間はポリビニルアルコールを主成分とする感光性樹脂 Bio-Surfine AWP でできており、液透過性を有するため、限定空間内部の溶液を、外部の溶液に流れの影響を受けずに拡散現象で置換できる (図 2(c), (d) 参照)。

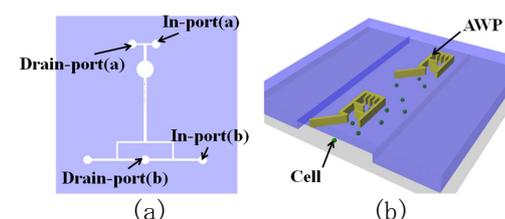


図 1 局所限定空間を有するマイクロ流体チップの概念図 (a) 上面図 (b) マイクロ流体路中の局所限定空間

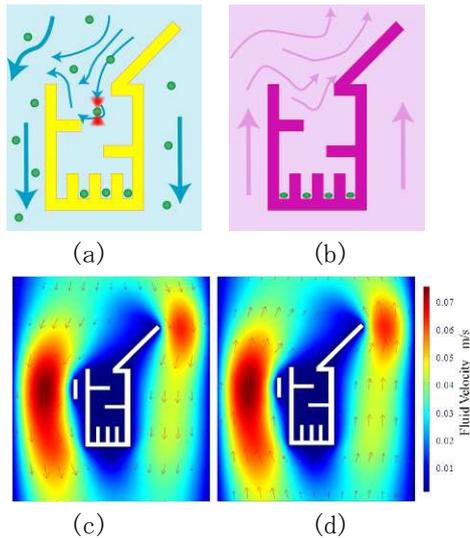


図2 局所限定空間への細胞搬送と内部の環境制御 (a) 限定空間への細胞搬送 (b) 拡散による溶液置換を用いた環境制御 (c)-(d) 限定空間内外の溶液置換時の流速分布解析

図2のマイクロ流体チップの作製プロセスを示す。流路部は、ネガ型フォトレジストSU-8で作製したパターンをモールドとし、ポリメチルシロキサン (PDMS) で転写して作製した。局所限定空間は、ガラス基板上にAWPのフォトファブ리케이션により作製し、流路部を接合することでマイクロ流体チップとした。

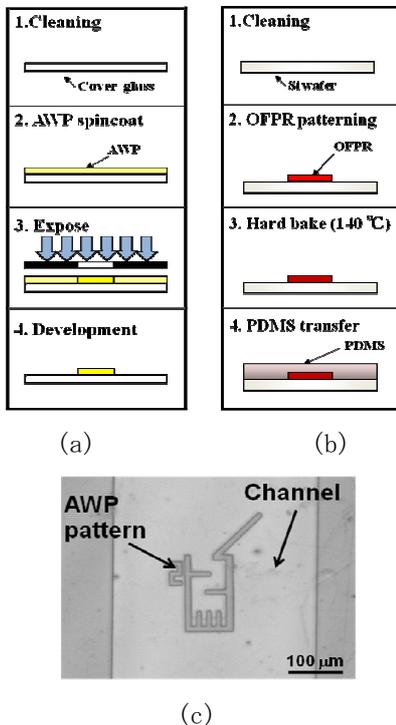


図2 局所限定空間を有するマイクロ流体チップの作製プロセス (a) 局所限空間部の作製プロセス (b) 流路部の作製プロセス (c) マイクロ流路内に作製した局所限定空間

図3に示すように、光ピンセットによる単一細胞操作により、選択したラン藻のみを限定空間内に搬送し、観察エリアに保持することで成功した。

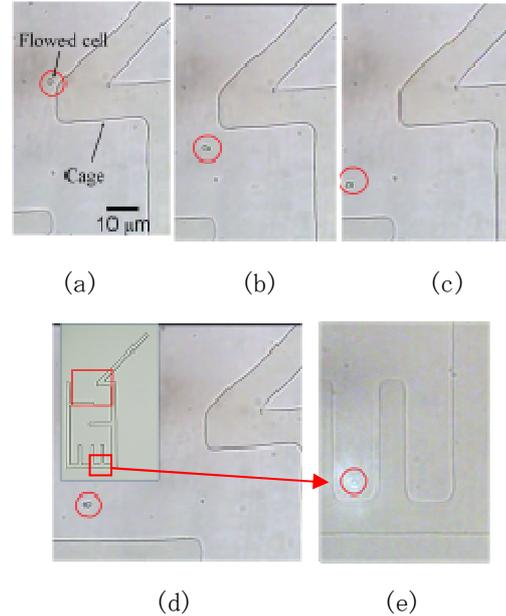


図3 光ピンセット操作によるラン藻の局所限定空間への搬送 (a)-(d) 光ピンセットによるラン藻の搬送 (e) 局所限定空間最奥部に保持されたラン藻

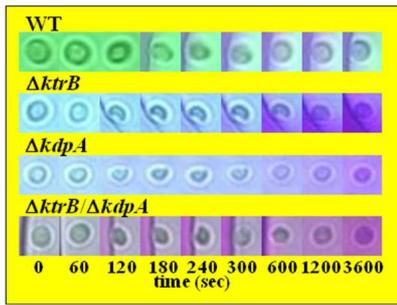
(2) ラン藻の高浸透圧適応機構におけるイオンチャネルの機能の定量評価

ラン藻 *synechocystis* sp. PCC6803 のイオンチャネルの高浸透圧適応機構における働きを評価した。高浸透圧適応機構は2相性で、主に働くイオンチャネルはKtr系とKdp系のカリウム輸送体であることが分かっている。

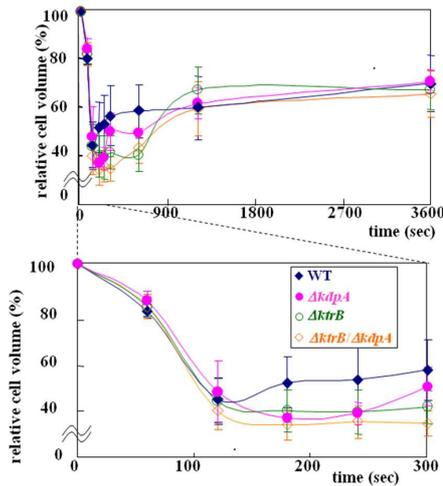
野生株, Ktr破壊株, Kdp破壊株, Ktr/Kdp破壊株の4種のラン藻の高浸透圧ストレス時の体積変化を直接観察することで、チャネルの働きを評価した。限定空間へラン藻を導入後、チップ内の溶液を培地のBG11から3mol/lのSorbitol溶液に置換することで、ラン藻は高浸透圧ストレスを受け収縮し、高浸透圧機構により体積が回復する。

実験結果は図4に示すように、Kdp破壊株で第1層の回復が見られたが野生株より弱く、Ktr破壊株では第1層の回復がみられなかった。以上の結果より、高浸透圧適応機構の第1層の回復にはKtrが関わっていることを実験的に評価できた。

生体輸送膜の機能を単一細胞の直接観察で定量評価した例はこれまでになく、本システムの新手法を広く適用することでバイオ分野の革新に貢献するものと考えられる。



(a)



(b)

図4 *synechocystis* sp. PCC6803 の高浸透圧適応機構におけるイオンチャネルの定量評価 (a) 高浸透圧ストレス時のラン藻の観察画像 (b) ラン藻の体積の時間変化

(3) 細胞計測のための機能性マイクロツールの作製と細胞計測への検討

細胞周辺の環境制御による細胞変化に加えて、細胞自体への力学的刺激による剛性計測や、細胞近傍の pH、温度、酸素濃度等の生理環境計測も重要である。そこで、図5に示すようなマイクロビーズを組立て計測に適した形状のテザード状のマイクロツールおよび細胞近傍の環境計測が可能なツールを作製した。

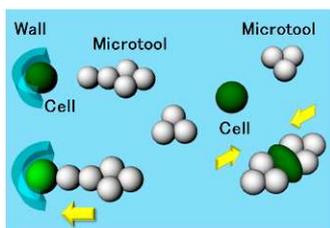


図5 マイクロビーズの組立によるテザード状ツールを用いた細胞剛性計測の概念図

大量のテザード状ツールを作製するために、本研究は図6に示す移流集積法と表面張力を用いた自己組織的な組立法を考案した。

ビーズを含んだ溶液をツール形状にパターンを作製した基板に滴下し、重力によるビーズの沈降と溶液の蒸発による界面の移動により、パターン内にビーズを集積する

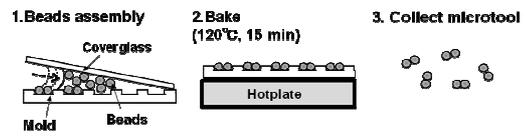
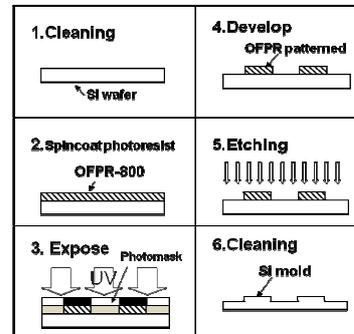
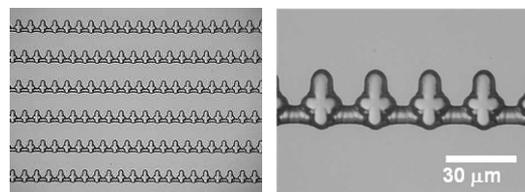


図6 移流集積法と自己集積化を用いたマイクロツール組立プロセス

基板へのパターンの加工は、図7に示すようにフォトファブ리케이션と反応性イオンエッチング (DRIE) を用いたプロセスで作製し、基板上に3万個程度のパターンを作製した。この基板を用い、図8に示すようにテザード状ツールの大量生産に成功した。



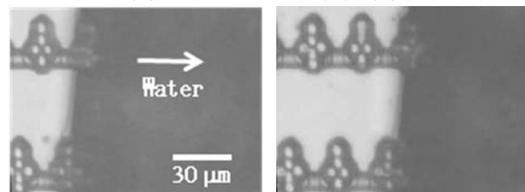
(a)



(b)

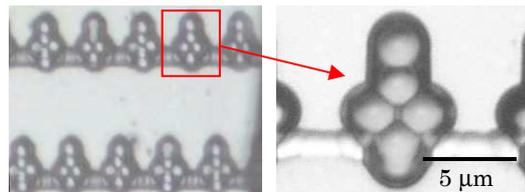
(c)

図7 モールドの作製 (a) モールドの作製プロセス (b) モールドの写真 (c) 拡大図



(a)

(b)



(c)

(d)

図8 マイクロツールの組立プロセス (a)-(c) ビーズのモールドへの導入 (d) 溶液蒸発時の表面張力によるビーズの凝集

基板上的パターンを制御することで、図9に示すようにさまざまな形状を作製でき、目的に応じたテザードツールを作製できる。

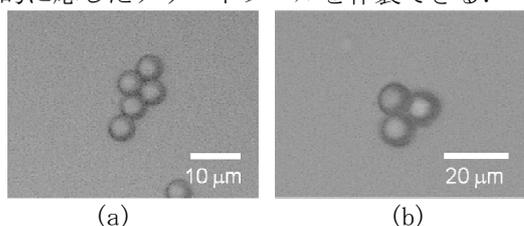


図9 モールドの作製 (a) モールドの作製プロセス (b) モールドの写真 (c) 拡大図

テザード状ツールの作製方法としては、ハイドロゲルで構築したビーズの組立による、図10に示すような柔軟なテザードツールの作製にも成功している。このゲルビーズは環境応答性の指示薬を内部に導入することで細胞近傍のpH、温度、酸素計測が可能であり、スピロピランを導入することで光制御による細胞附着制御も実現している。

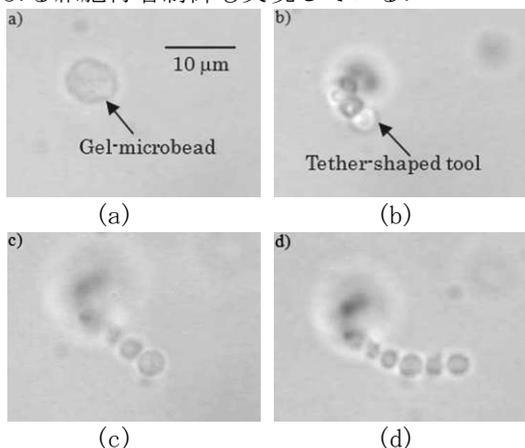


図10 ハイドロゲルビーズの組立による柔軟テザード状ツールの作製 (a) 土台となるゲルの基板への固定 (b)-(c) ゲルビーズの組立 (d) テザードツールの操作

以上のような計測に、計測内容に適した物理的、化学的性質のツールを作製する技術確立しており、限定空間内での単一細胞レベルでの評価実験に適用を進めていく。

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)

[雑誌論文] (計5件)

- ① Zulkifli, L., Akai, M., Yoshikawa, A., Shimojima, M., Ohta, H., Guy HR., and Uozumi, N., The KtrA and KtrE subunits are required for Na⁺ dependent K⁺ uptake by KtrB across the plasma membrane in *Synechocystis* sp. PCC

6803., *The Journal of Bacteriology*, 査読有, Vol. 192, pp. 5063-5070, 2010.

- ② H. Maruyama, T. Fukuda, F. Arai, Optical Adhesion Control of Hydrogel Microtools for On-Demand Immobilization and Measurement of Cells on a Microfluidic Chip, *Journal of Robotics and Mechatronics*, 査読有, Vol. 22, pp. 631-638, 2010.
- ③ H. Maruyama, R. Iitsuka, K. Onda, F. Arai, Massive Parallel Assembly of Microbeads for Fabrication of Microtools Having Spherical Structure and Powerful Manipulation by Optical Tweezers, *Journal of Robotics and Mechatronics*, 査読有, Vol. 22, pp. 356-362, 2010.
- ④ H. Maruyama, S. Sakuma, Y. Yamanishi, F. Arai, Size-Dependent Filtration and Trapping of Microparticles in a Microfluidic Chip Using Graduated Gaps and Centrifugal Force, *Journal of Robotics and Mechatronics*, 査読有, Vol. 22, pp. 280-285, 2010.
- ⑤ Sato, A., Sato, Y., Fukao, Y., Fujiwara, M., Umezawa, T., Shinozaki, K., Hibi, T., Taniguchi, M., Miyake, H., Goto, D.B., and Uozumi, N., Threonine at position 306 of the KAT1 potassium channel is essential for channel activity and is a target site for ABA-activated SnRK2/OST1/SnRK2.6 protein kinase, *Biochem. J.*, 査読有, Vol. 22, pp. 439-448, 2009.

[学会発表] (計14件)

- ① Kyohei Tomita, Hisataka Maruyama, Fumihito Arai, Evaluation of Thermal Conductivity of Single Carbon Nanotube Using Functional Gel Temperature Sensor in Liquid, 第40回記念フラーレン・ナノチューブ総合シンポジウム, 2011年3月10日, 名古屋, 名城大学
- ② H. Maruyama, R. Iitsuka, K. Onda, F. Arai, Massive Parallel Assembly of Microbeads for Fabrication of Microtools Having Spherical Structure and Powerful Laser Manipulation, 2010 IEEE International Conference on Robotics and Automation, 2010年5月4日, Anchorage, USA
- ③ Hisataka Maruyama, Shinya Sakuma, Yoko Yamanishi, Fumihito Arai, SIZE-DEPENDENT FILTRATION AND TRAP OF MICROPARTICLES USING CENTRIFUGAL FORCE AND GRADUATED MECHANICAL GAP IN MICROFLUIDIC CHIP, The 13th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 2009年11月4日, Korea, JEJU

- ④ Benoît Chapurlat, Hisataka Maruyama, YokoYamanishi, Kyosuke Kotani and Fumihito Arai, Size-Dependent Microparticle Filtration Using Magnetically Driven Microtool for Producing Gel-Microtool, The 2009 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems, 2009年10月15日, アメリカ, セントルイス
- ⑤ 猪股直生, 丸山央峰, 新井史人, レーザ駆動 Robot-on-a-chip に関する研究 — その3: テザード型マイクロツールの設計と製作 —, 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会 2009, 2009年5月26日, 福岡, 福岡国際会議場
- ⑥ 恩田一寿, 丸山央峰, 新井史人, レーザ駆動 Robot-on-a-chip に関する研究 — その1: 統合型光ピンセットのバイラテラル制御システム —, 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会 2009, 2009年5月26日, 福岡, 福岡国際会議場
- ⑦ 丸山央峰, 佐久間臣耶, シャブラブノア, 山西 陽子, 新井 史人, 磁気駆動 Robot-on-a-chip に関する研究 — その3: 磁気駆動マイクロツールを用いた微粒子の連続選別 —, 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会 2009, 2009年5月26日, 福岡, 福岡国際会議場
- ⑧ Fumihito Arai, Kazuhisa Onda, Ryo Iitsuka, Hisataka Maruyama, Multi-beam Laser Micromanipulation of Microtool by Integrated Optical Tweezers, 2009 IEEE International Conference on Robotics and Automation, 2009年5月15日, Kobe, Kobe International Conference Center
- ⑨ 四十九 俊彰, マイクロ流路を用いたラン藻の高浸透圧ストレスに対する適応機構のリアルタイム観察, 日本植物生理学会年会, 2009年3月21日, 名古屋
- ⑩ 丸山 央峰, 遠心力と磁気駆動マイクロツールを用いたオンチップ粒子選別, 第18回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 2008年12月9日, 京都大学桂キャンパス, 船井哲良記念講堂
- ⑪ Benoît Chapurlat, Production of Functional Microtool Using Size-Classified Gel-Microbeads, 2008 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, 2008年11月8日, 名古屋, 名古屋大学野依記念学術交流館
- ⑫ Fumihito Arai, MICROPATTERNING OF HYDROGEL AND ON-CHIP LONG TIME MONITORING OF INDIVIDUAL CELLS IN A CAGE, The 12th International Conference on Miniaturized Systems

- for Chemistry and Life Sciences, 2008年10月15日, アメリカ, サンディエゴ
- ⑬ 飯塚 龍, フォトリソグラフィによるマイクロツールの作製とマルチビーム統合型光ピンセットによる操作, 第26回日本ロボット学会学術講演会, 2008年9月9日, 神戸市, 神戸大学
- ⑭ 四十九 俊彰, マイクロ流路を用いたラン藻の浸透圧適応のリアルタイム観察, 日本生物工学会, 2008年8月28日, 仙台

[その他]

ホームページ等

- ① http://www.biorobotics.mech.nagoya-u.ac.jp/research/Robomec09/Robomec09_Iitsuka.pdf
- ② http://www.biorobotics.mech.nagoya-u.ac.jp/research/Robomec09/Robomec09_Maruyama.pdf
- ③ http://www.imech.mech.tohoku.ac.jp/research/Robomec09/Robomec09_Onda.pdf
- ④ http://www.imech.mech.tohoku.ac.jp/research/Robomec09/Robomec09_Inomata.pdf
- ⑤ http://www.biorobotics.mech.nagoya-u.ac.jp/research/40th_FNTS/40th_FNTS_Tomita.pdf

受賞(学生の個人受賞を含む)

- ① Benoît Chapurlat, Hisataka Maruyama, YokoYamanishi, Kyosuke Kotani, Fumihito Arai, Best Paper Award, 2008 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Sciences, 平成22年11月8日, 名古屋
- ② 飯塚 龍, 日本機械学会若手優秀講演フェロー賞, 平成22年6月15日, 旭川

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新井 史人 (ARAI FUMIHITO)
名古屋大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 90221051

(2) 研究分担者

魚住 信之 (UOZUMI NOBUYUKI)
東北大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 40223515

(3) 連携研究者

丸山 央峰 (MARUYAMA HISATAKA)
名古屋大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号: 60377843