

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：51101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23655148

研究課題名(和文) 赤血球ゴースト膜を基にした環境適応型マイクロ反応器の作製 - 化学発光による検討 -

研究課題名(英文) Preparation of environment adaptable micro-reactor based on erythrocyte ghost membrane; investigation by chemical luminescence

研究代表者

大久保 恵 (OKUBO, Satoshi)

八戸工業高等専門学校・その他部局等・教授

研究者番号：90132555

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：環境適応型のマイクロ反応器を提案するため羊血液等から得られる赤血球ゴースト膜(WG)について蛍光反応とWGの融合合体の関係を調べる基礎的研究である。2種の蛍光物質をそれぞれ数 μm 径のWGに封入後、融合させて蛍光物質間の光エネルギー移動(FRET)の程度を観測し、実際に血球膜が融合しているかを評価した。その結果、WGの融合法と温度条件の設定によって融合膜体が形成されFRETを確認し、マイクロ反応器として応用できることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In order to propose an environment adaptable micro-reactor, this research is the fundamental research to investigate the relation of luminescent reaction to fusion of erythrocyte ghosts from sheep blood. It was observed the extent of fluorescence resonance energy transfer(FRET) between two enclosed and fused fluorescent substances within each erythrocyte ghost with several micrometer size, and evaluated the fusion of the erythrocyte ghosts. As the results, it was shown that the FRET in the combined vesicles was observed in dependence on selection of temperature condition and the fusion methods, and it was revealed that the fused erythrocyte ghosts can be applied to a new type of micro-reactor.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：環境関連化学

キーワード：赤血球ゴースト膜 リポソーム ミクロ反応器 蛍光共鳴エネルギー移動

1. 研究開始当初の背景

ヘモグロビンを抜き取った赤血球ゴースト膜（以下 WG）の調製はヒト血液からリン酸緩衝液を用いた Dodge らの方法、Tomoda らの改良法などが提案されていた。筆者はこれらの方法をさらに改良してヒツジの血液に応用し、安定な調製法を確立するとともにポルフィリンなど多種類の物質の封入特性を明らかにしている。柔軟な構造の WG は物質が出入りしやすいこと、WG は互いに接触させると合体し、より大きな構造体に変化する性質がある。これは反応性物質を WG に封入させた後、必要な時に WG を融合合体させることにより WG の微小な閉鎖空間内を反応場とした新しい反応システムを構築できる可能性に注目していた。また畜産関係で発生する廃血液による汚染防止とバイオマスの有効利用にもつながる取組が必要であった。

2. 研究の目的

(1) 融合技術を用いて柔軟な分子格納体である WG を合体した WG 内部を 2 つの物質が微量で反応するマイクロ空間から成る新規のマイクロ反応器（マイクロリアクター）を生み出すことを目的にしている（図 1）。具体的には、2 種の蛍光物質をそれぞれ約数 μm

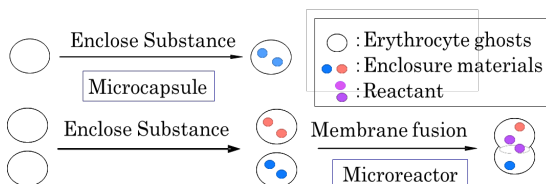


図 1 本研究で考える新しいマイクロリアクターの概念図

径の WG に封入しておき、融合合体させて蛍光物質間の光エネルギー移動の程度を観測する。融合については最適な融合条件を検討する。

(2) 人工膜系のリポソームについても同様の実験で融合による反応性を確認し、赤血球ゴーストとリポソームから成る複合的な反応器の可能性を探る。また、膜内に封入している物質がどの程度膜外に散逸し、内部に保持するかについても測定し評価する。

3. 研究の方法

(1) 膜系の融合と反応の確認のために、接触させて FRET が観測できる二種の蛍光物質を事前に WG にそれぞれ閉じ込める。2 種の封入 WG を融合させて蛍光共鳴エネルギー移動（以下 FRET）が観測されると合体した膜内で二種の蛍光物質同士が接触し相互作用しているこ

とを示すものとなる。これをもって化学反応を起こしうるマイクロな容器（ここでは WG）同士の一体（ここでは融合 WG）による新しい反応システムができたと考えることができる。

(2) WG は数~数 10 ミクロンオーダーの微小系であり高感度が必要なことを考慮して、FRET を用いる。これには励起波長値と発光波長値の近接した二種類の蛍光物質を選択することが必要になる。ここでは次のような組合せを選択した。各組の最初の物質が供与体分子、後の物質は受容体分子であり、各カッコ内は各物質の持つ最大励起波長（nm 単位）と最大発光波長（同）である。

- 1) アクリジンオレンジ + ローダミン B
(483,527) (520,579)
- 2) オーラミン O + ローダミン B
(495,523) (520,579)
- 3) チオフラビン T + アクリジンオレンジ
(410,482) (483,527)

観測には蛍光フィルターをセットし蛍光顕微鏡で蛍光発光を直接撮影する。また分光蛍光光度計で蛍光スペクトルを測定する。

(3) 融合には、非イオン性界面活性の膜構造内への相溶性を利用して膜の融合を誘発する方法（トリトン X-100 添加法）、膜間結合性を有する塩化カルシウムの添加を利用する方法（塩化カルシウム添加法）、および急速冷却と融解による分解・再融合による方法（凍結融解法）を用いる。また、融合温度を 4 から 45 までの温度範囲で変えて融合温度の影響を調べる。

(4) 生物系の WG を人工系と比較検討するためにリポソーム系について上記(3)と同様の実験を行う。

(5) 物質保持性の評価には、リポソームに蛍光物質カルセインを封入し、その後、溶液を希釈した試料の蛍光スペクトルを測定する。この状態の溶液は、リポソーム膜の内水相とリポソーム膜外部の溶液にもカルセインが混在した状態である。この蛍光強度値を A とする。次に、カルセインの消光試薬である塩化コバルト溶液を試料に添加すると膜外溶液は消光するが、リポソーム内水相に存するカルセインは消光せずに残る。この時の蛍光強度を B とする。最後にトリトン X-100 を使ってリポソーム膜を完全に破壊してリポソーム膜内水相のカルセインも消光させる。これを C とする。以下の式に従って、物質保持率および蛍光物質封入時を基準にした相対物質保持率を評価する。

$$\text{物質保持率(\%)} = (B - C) / (A - C) \times 100$$

$$\text{相対物質保持率(\%)} = \frac{\text{各種融合法における物質保持率}}{\text{封入のみの物質保持率}} \times 100$$

4. 研究成果

(1) トリトン X-100 添加法による赤血球ゴーストの融合に伴う FRET の有無について；アクリジンオレンジ/ローダミン B の系で FRET が生じなければアクリジンオレンジの緑色の蛍光のみが観測されるはずであるが、黄色の蛍光を強く示している多数の小胞が観測された（写真 1）。この小胞は融合した WG である。トリトン X-100 共存下でチオフラビン T からアクリジンオレンジへの FRET が、多数の融合 WG から発するアクリジンオレンジの蛍光発光としてみられている。また、オーラミン O / ローダミン B 系でもチオフラビン T / アクリジンオレンジ系でも赤血球ゴーストの融合を伴った特有の FRET が確認された。

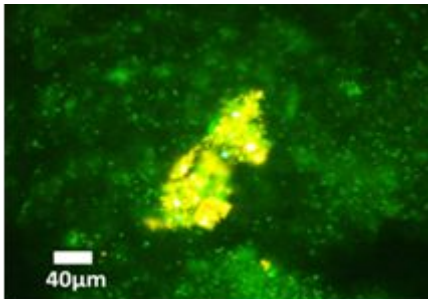


写真 1 アクリジンオレンジとローダミン B を封入した融合赤血球ゴースト膜の蛍光顕微鏡写真

融合条件；トリトン X-100 添加、
蛍光フィルター；WB、拡大倍率；200 倍

(2) 融合方法の違いが FRET に影響するか？ トリトン X-100 添加法以外に塩化カルシウム添加法および凍結融解法について、各蛍光物質間の FRET が観測されている（写真 2）。ただし、何度も融合を繰り返して大型化した発光体になっていると考えられ、融合度がトリトン X-100 共存の場合より高いと判断できる。顕微鏡観察による半定量的な評価では、アクリジンオレンジ/ローダミン B 系およびオーラミン O / ローダミン B 系の FRET は、トリトン X-100 添加法が最も融合しやすく、次にカルシウム添加法が適しているという結果であった。チオフラビン T / アクリジンオレンジ系では明確な違いは見られなかった。なお、凍結融解法では膜調製段階で用いるグルコースが膜融合には負の影響を与えていることが示唆された。各融合法における FRET 観測の結果は表 1 にまとめられる。+ の数は蛍光の強度と融合の程度に比例することを示す。

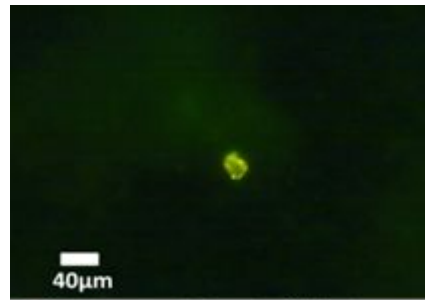
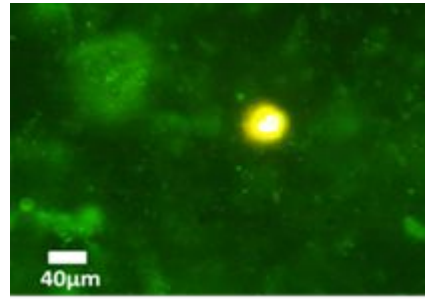


写真 2 アクリジンオレンジとローダミン B を封入した融合赤血球ゴースト膜の蛍光顕微鏡写真

融合条件；(上)塩化カルシウム添加、(下)凍結融解、
蛍光フィルター；WB、拡大倍率は 200 倍

表 1 赤血球ゴーストにおける FRET の結果

トリトン X-100 添加	塩化カルシウム添加法	凍結融解法
+++	++	+

+ が多いほど FRET が強く観測され、融合度が高い。

(3) 融合温度の影響について

トリトン X-100 添加法およびカルシウム添加法について融合温度が WG 膜融合に及ぼす効果をアクリジンオレンジ/ローダミン B 系を例に FRET で評価したところ、表 2 のとおりになった。いずれの方法でも高めの温度側の方が融合が進みやすいという結果である。なお、塩化カルシウム添加はトリトン X-100 添加に比して膜流動性が低いいため融合度が低いことが明らかである。

表 2 アクリジンオレンジ/ローダミン B 系における FRET に及ぼす融合温度の影響

温度 ()	4	20	37	45
トリトン X100	+++	+++	+++	++++
塩化カルシウム	観測不可	観測不可	+	+

(4) リポソーム系の結果

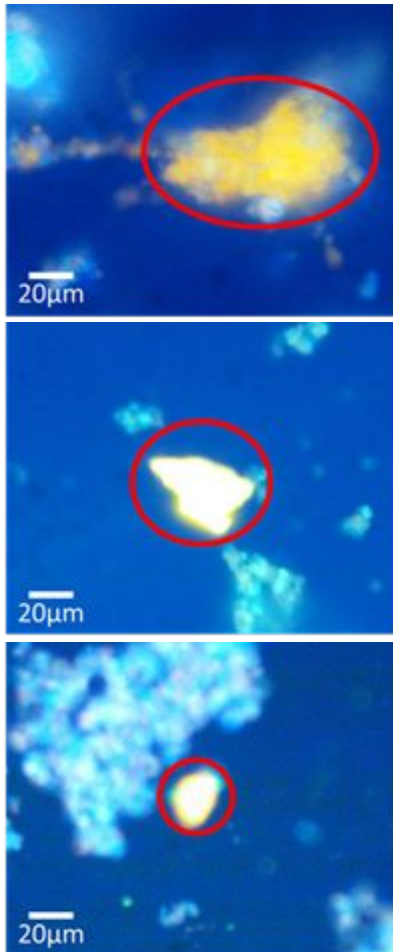


写真3 チオフラビン T/アクリジンオレンジ系の融合リポソームの蛍光顕微鏡写真
融合条件；(上)トリトン X-100 添加法、(中)塩化カルシウム添加法、(下)凍結融解法

チオフラビン T/アクリジンオレンジ系におけるトリトン X-100 添加法による融合リポソームの蛍光顕微鏡の写真結果を写真3に示す。トリトン X-100 添加によるリポソームの融合ではチオフラビン T からアクリジンオレンジへの FRET が、微小な多数の融合リポソームから発するアクリジンオレンジの蛍光発光としてみられた。このことにより赤血球ゴースト系と同じ条件で人工系のリポソームにおいても融合が生じることを示している。膜調製の条件を変えると融合度と融合した膜体の分散度が変わりうることも分かった。ここで融合の度合いは発光の強さを元にして視認及び写真判定で評価したものである。3法の中で凍結融解法が最も融合度が高く、塩化カルシウム添加法>トリトン X-100 添加法の順であった。逆に微小な融合体を多数形成させるという点ではトリトン X-100 添加法が優れていると言える。

以上より、リポソームにおける FRET 結果

による融合度と分散度は表3に纏められる。

表3 リポソームにおける FRET の結果

調製条件	凍結融解法	塩化カルシウム添加法	トリトン X-100 添加法
融合度	+++	++	+
分散度	+	+	+++

(5) 赤血球ゴースト - リポソームの融合

赤血球ゴーストはサイズ 5~10µm、リポソームの多重膜懸濁液はサイズ 0.1µm 程度である。大きさの異なる小胞を組み合わせて融合が可能か、また生物由来系と人工系の融合は可能かどうか実験で確認した。融合実験後の観察では、10~15µm の小胞数個と多数の 1µm の小胞が確認された(写真4)。その中で、赤血球ゴーストの周囲にリポソームが密着している状態が存在し、融合の途中の状態を示すものであることが分かった。また数個の赤血球ゴーストはすでにリポソームと融合して大きくなっていた。多数のリポソームが



写真4 赤血球ゴースト-リポソーム系の融合
塩化カルシウム添加法(400倍)

一回り大きな赤血球ゴースト(WG)に吸着・融合するという親和性の高い様式で容易に進行することが分かり、新しいタイプの反応システムになる可能性が見出された。

(6) 物質保持率の評価

リポソームに封入した蛍光物質の保持率を評価するため蛍光スペクトルの経時変化を追跡した。封入物質にはカルセインを用い、膜外部に移動するカルセインをコバルトイオンで消光する仕組みをリポソーム系に組み込んで上述の3種の融合法で比較した。図2はトリトン X-100 の場合の蛍光スペクトル変化を例示している。封入のみの物質保持率を基準に融合法毎の相対物質保持率を図3に示した。その結果、トリトン X-100 添加法が最も高い保持率 90% 超を示し、塩化カルシウム添加法>凍結融解法という順に膜内か

ら流出しやすいことが分かった。ただし、塩化カルシウム添加法では EDTA でカルシウムイオンを固定する前処理を行っている。以上より、リポソームの融合には膜流動性と膜の安定性が大きな要因である。相対物質保持率

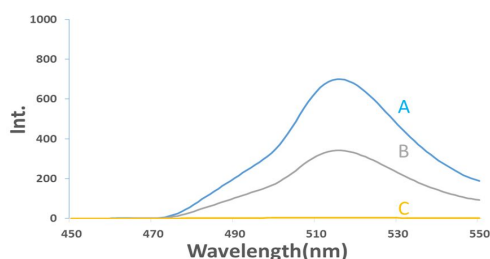


図2 カルセインの蛍光スペクトル変化系；トリトン X-100 添加のリポソーム系
 蛍光スペクトル A：融合操作後、B：膜外部溶液消光後、C：膜破壊後

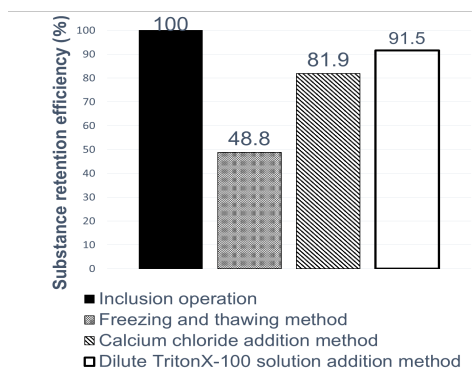


図3 リポソーム系における各種融合操作に対する相対物質保持率

が高いということは膜流動性が低く、逆に相対物質保持率が低いと膜流動性は高いという関係が見出される。膜融合を起こすには、膜流動性が大きくなければならない。凍結融解法では、個々の個体として膜融合を評価すると良好といえるが、融合操作が施されたりポソーム全体として評価すると物質保持性が低下する。逆にトリトン X-100 添加法では、膜融合は低い、融合操作が施されたりポソーム全体は物質保持性が高いと言える。つまり、融合しやすい方法は流出にもフレキシブルであり、融合し難い方法は、膜融合すれば確実に保持する傾向を示している。

(7) 成果のまとめと展望

蛍光反応の確認と膜融合方法について一定の励起と蛍光波長を有する蛍光物質を封入した赤血球ゴースト膜間で融合した系

において蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を捉えることができた。これは蛍光顕微鏡観察と分光蛍光法で確認するとともに同様のことがリポソーム膜系でも可能であった。

反応と膜融合度の関係では、WG膜同士においてはトリトン X-100 添加法が最も有効であった。リポソーム融合系では凍結融解法が良好であったが、膜体の分散度ではトリトン X-100 添加法が優れている。

4 ~ 45 の範囲で融合温度が高いほど WG が融合しやすい傾向が見出された。

WG系とリポソーム系との異なる小胞同士の融合法を見出し、生体系と人工系の融合にも発展でき、興味深い系であることが分かった。

反応後の生成物質の保存を想定した容器保持率に関してカルセインを例に物質保持率の面から融合法の適否を比較すると、トリトン X-100 の共存が最も有効で、続いて塩化カルシウム添加法、凍結融解法の順で有効であった。この結果は融合度とは逆の傾向を示すものとなった。

融合法、融合温度を選択することにより WG 系、リポソーム系およびそれらの混合系でも小胞の合体は可能であり、その中で蛍光反応が進行していることから小胞膜を利用した新しいマイクロ反応器が可能であると考えられる。

微量の反応を扱っているため高感度の蛍光反応に限定している。この方法が一般的な化学反応に応用できるかが今後の課題である。特に不安定な物質の微量反応に適用することが期待される。

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)

[学会発表](計 2 件)

Watanabe T., Miura M., Chiba K., Ohkubo S., "Observation of the fluorescence resonance energy transfer between some fluorescent substances in liposomes", *International Symposium for the 70th Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan*, Sendai(2013.9.28-30)

Aketo H., Miura M., Chiba K., Ohkubo

S., "Observation of the fluorescence resonance energy transfer between some fluorescent substances in erythrocyte ghosts", *International Symposium for the 70th Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan*, Sendai(2013.9.28-30)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大久保 恵 (OKUBO, Satoshi)

研究者番号 : 9 0 1 3 2 5 5 5

(2)研究分担者

齊藤 貴之 (SAITO, Takayuki)

研究者番号 : 1 0 2 9 0 6 8 6