

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23710150

研究課題名（和文） 巨大リポソームの膜ダイナミクス変化と膜界面反応の同時測定マイクロデバイスの開発

研究課題名（英文） Development of a micro fluidic device for simultaneous measurements of membrane dynamics and reaction of giant liposome

研究代表者

中根 優子 (NAKANE YUKO)

独立行政法人理化学研究所・ナノバイオプローブ研究チーム・特別研究員

研究者番号：00546244

研究成果の概要（和文）：

メンブレノームにおける、膜ダイナミクス変化と膜界面反応との同時測定が可能なマイクロデバイスの開発を目的として研究を行った。顕微鏡観察と電気化学測定の同時測定を可能とするマイクロデバイスおよびマイクロ電極をガラス基板上に設計、作製し、電気化学測定が可能であることを確認した。また、ペルオキシダーゼ様化合物であるヘミンを修飾した巨大リポソームを、膜界面触媒能を有する膜モデルとして作製した。

研究成果の概要（英文）：

A micro fluidic device for simultaneous measurements of membrane dynamics and reaction of giant liposomes was developed. We designed a micro device for simultaneous measurement by both microscopy and electrochemistry and fabricated micro electrode on glass substrates. The fabricated micro electrode showed that it is available for electrochemical measurements. Hemin-modified giant liposomes were prepared as a model of catalytic biomembrane.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,300,000	390,000	1,690,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・マイクロ・ナノデバイス

キーワード：マイクロデバイス、電気化学測定、同時測定、メンブレノーム、蛍光顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

流動モザイクモデルで構成される生体膜は細胞膜や細胞内小器官に共通であり、空間を分画する非常に優れた構造である。近年においては、この膜界面が注目され、細胞内外における効率的な反応の場であるという考えから、メンブレノームという新しい概念が提案されつつある。

中でもリポソームは、自己組織的に脂質二分子膜小胞を形成し、機能性物質の膜への修飾や内封が容易なことから、有用な生体膜モデルとされている。このリポソーム膜界面を反応場として人工シャペロンや人工酵素などが研究されている。このような取り組みは、メンブレン・ストレスバイオテクノロジーとして研究開始当初から展開されつつあった。これは、外的環境によるポテンシャル構造の

変動と、それに伴う機能発現というリポソームの特徴に加えて、外的環境の劇的な変動でしか現れない動的な機能（潜在的機能）への理解によって、生体膜の有する潜在的機能を材料設計や物質生産・変換プロセスに応用するという新しい研究領域である。

外来分子や環境の変化（ストレス）が、膜の動的構造変化（膜ダイナミクス変化）を引き起こすことは既に報告されており、生体膜の新たな興味の対象となっていた。また、同様な膜ダイナミクス変化として、脂質ラフト（分子イカダ）が挙げられる。このような膜ダイナミクス変化は、直径 $10\mu\text{m}$ 以上の巨大リポソーム（GUV：Giant Unilamellar Vesicle）を用い、1個のGUVの構造や物理量の変化をリアルタイムで測定し、統計的な解析をする単一巨大リポソーム法によって、新たな展開の兆しを見せていた。

しかしながら、ラフト形成や膜構造変化というような膜ダイナミクスの変化がその膜界面の反応にどのような影響を及ぼすのかという観点での研究はされていなかった。

2. 研究の目的

本申請では、細胞サイズの巨大リポソームを単一に囲い込み、その膜ダイナミクス変化と膜界面反応とを同時測定可能なマイクロデバイスを開発することで、膜ダイナミクス変化が膜界面反応にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることを目的としている。この2者の関係性を明らかにすることによって、生体膜の潜在機能に迫ることが可能となるとともに、その潜在機能を新規の材料設計や物質生産、変換プロセスへと発展させるために必要な知見を得ることができると考えた。膜ダイナミクス観察と膜界面反応測定との間の実験系のスケールギャップを、マイクロデバイスを用いることで解消し、生体膜の潜在的機能を明らかとすることを目的とした。

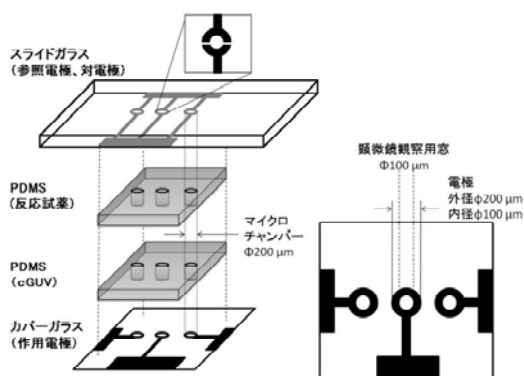


図1 マイクロデバイスの基本設計

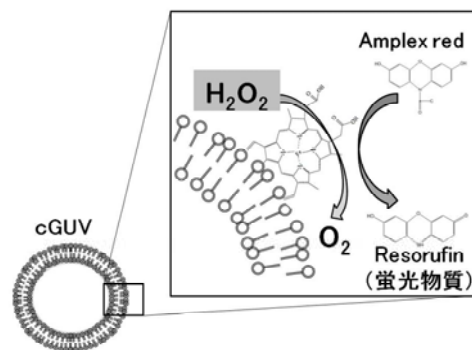


図2 cGUVのモデル系

3. 研究の方法

Micro Electro Mechanical System (MEMS) 技術によるマイクロデバイスを用いることでこの膜ダイナミクス変化と膜界面反応との同時測定を試みた。具体的には、図1に示すようなスライドガラスやカバーガラス上に、GUVを単一に囲い込む反応器を構築することで、このチャンバー内のリポソームを顕微鏡で観察しながら、同時に膜界面反応の測定を試みた。

膜界面反応としてGUVに修飾したペルオキシダーゼ（HRP）様触媒リガンドをモデル系とし、HRP様活性は、蛍光標識剤を用いた蛍光顕微鏡観察と過酸化水素（ H_2O_2 ）の電気化学測定により、各々を触媒反応の発生している位置と H_2O_2 消費量といった相補的な情報として得られると予想した。

3-1. マイクロデバイスの開発

図1の基本設計をもとに①ガラス基板上のマイクロメートルオーダーの電極パターンの作製②直径 $200\mu\text{m}$ のマイクロ反応器の作製を行った。

電極パターンの作製は、シランカップリングを用いた金ナノコロイドのスクリーンプリント法と、マスク蒸着法を試みた。マイクロ反応器はポリジメチルシロキサン（PDMS）を用いて作製した。

3-2. 触媒様活性を有するGUV(catalytic GUV; cGUV)の作製と触媒様活性の確認

HRP様触媒活性リガンドには、 Fe^{2+} を活性中心に持つポルフィリン体であるヘミンを用いた。GUVと疎水性相互作用によりヘミンを膜表面に吸着させた。GUVはリン脂質であるジパルミトイルホスファチジルコリンに蛍光色素（フルオレセイン：緑色蛍光）標識脂質を混ぜ、作製した。cGUVのHRP様活性については、図4上に示すような作製したPDMSマイクロ反応器へcGUVを単一に囲い込み、HRP活性の蛍光標識剤Amplex redの分解生成

物である resorufin を蛍光観察することで確認した。

4. 研究成果

4-1. マイクロデバイスの開発

シランカップリングによる金ナノコロイドのスクリーンプリント法は、ガラス基板上に金ナノコロイドの積層は確認されたが、作製した基板をもちいてフェリシアン化カリウムの酸化還元反応をサイクリックボルタンメトリー法で測定できなかった。このため、レジストパターンによるマスク蒸着法で、クロム-金の積層により電極を作製した。蒸着する金属薄膜の厚みやマスク除去の方法、条件等を検討した。中でもマスク除去は、マスクパターンが数 $10\ \mu\text{m}$ オーダーの微細構造であることからパターンの欠損が問題となった。これについてはマスク除去の際、超音波処理することで問題を解決し、パターンに欠損のない電極が作製可能となった(図3上)。電極面積は約 $0.012\ \mu\text{m}^2$ であるが、フェリシアン化カリウム溶液の酸化還元反応をサイクリックボルタンメトリー法で検出できたため、マイクロデバイスの電極として使用できることが示唆された。

マイクロ反応器の鋳型は SU-8 を用い、フォトレジストにより作製した。高さ $100\ \mu\text{m}$ 直径 $200\ \mu\text{m}$ の円柱上の鋳型をシリコンウェハー上に作製し、そこへ PDMS のポリマー材料を流し込んだ後 1000rpm 20 秒間基板を回転させることで、遠心力によりポリマーの厚さを $100\ \mu\text{m}$ 以下にした。ポリマー重合後、鋳型から PDMS を取り出しプラズマ処理したガラス基板上へ接着させることで、マイクロ反応器として作製した。作製した反応器へ cGUV 溶液を滴下し、単一に囲い込めることを

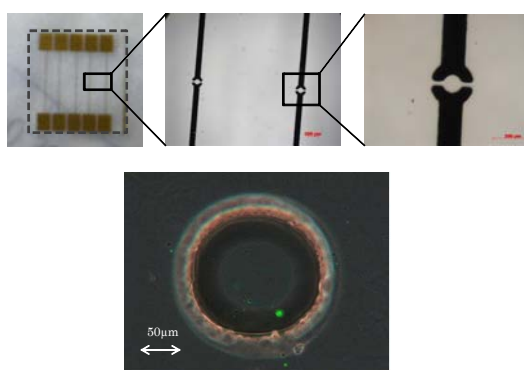


図3(上) 作製したマイクロデバイス電極。
(左) 全体(真ん中、右) 電極の部分の顕微鏡拡大図(下) PDMS マイクロ反応器に囲い込まれた cGUV (緑色)

確認した(図3下)。

4-2. cGUV の作製と触媒様活性の確認

作製した cGUV は Amplex red、 H_2O_2 と混合した後、PDMS マイクロ反応器へ単一に囲い込まれる濃度に調製後滴下した。脂質膜にフルオレセイン標識脂質が含まれているため、cGUV は緑色で示される。赤色は HRP 様活性による分解生成物 resorufin を示している。cGUV、Amplex red、 H_2O_2 の3者を混合後、時間の経過とともに赤色蛍光の強度が上昇していることが明らかとなった。この蛍光の上昇が、cGUV の存在しない反応器では、存在する反応器よりも緩やかであったため、cGUV の表面に修飾されているヘミンが触媒様活性を有していることが示された。

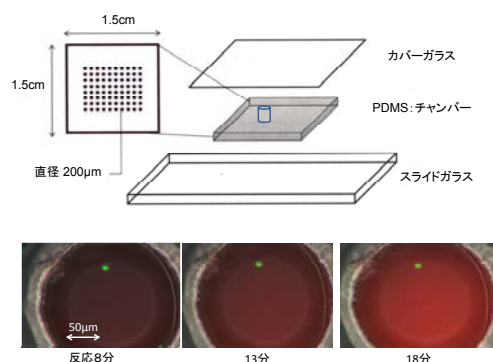


図4(上) cGUV 触媒様活性を確認するためのマイクロデバイスの概念図(下) 単一の cGUV (緑色) を囲い込んだマイクロ反応器の内の resorufin 生成の経時変化

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 6 件)

- ① Multilayered, Core/shell Nanoprobes Based on Magnetic Ferric Oxide Particles and Quantum Dots for Multimodality Imaging of Breast Cancer Tumors. Qiang Ma, Yuko Nakane, Yuki Mori, Miyuki Hasegawa, Yoshichika Yoshioka, Yomonobu M. Watanabe, Kohsuke Gonda, Noriaki Ohuchi and Takashi Jin. *Biomaterials*. 査読有. pp. 8486-8494. 2012.
- ② Bovine serum albumin-coated quantum dots as a cytoplasmic viscosity probe in a single living cell. Yuko Nakane, Akira Sasaki, Masataka Kinjo and

Takashi Jin. *Analytical methods*. 査読有. pp. 1903-1905. 2012.

- ③ Sensing system for bisphenol A utilizing a molecularly imprinted polymer modified electrode. Izumi Kubo, Nobuyuki Yokota and Yuko Nakane. *Advanced Materials Research*. 査読有. pp. 922-926. 2012.
- ④ Characteristics of molecularly imprinted polymer thin layer for bisphenol A and response of the MIP-modified sensor. Izumi Kubo, Nobuyuki Yokota, Yusuke Fuchiwaki, and Yuko Nakane. *ISRV Materials Science*. 査読有. Article ID 861643. 2012.
- ⑤ The establishment of bisphenol A (BPA) sensing system utilizing molecularly imprinted polymer receptor and electrochemical determination. Izumi Kubo, Nobuyuki Yokota, Yuko Nakane and Yusuke Fuchiwaki. *International Journal of Electrochemistry*. 査読有. Article ID 534936. 2011.
- ⑥ Saccharification of xylan by *Thermobacillus composti* and its immobilization on a hydrophilic porous gel carrier. Yuko Nakane, Keiko Watanabe, Kanako Nakagawa and Toshifumi Sakaguchi. *Mokuzai Gakkaishi*. 査読有. pp. 143-149. 2011.

[学会発表] (計 3 件)

- ① Y. Nakane and T. Jin. Near infrared in vivo imaging of breast cancer tumours by using PbS quantum dots. *Colloids and Nanomedicine 2012*. Amsterdam (The Netherlands) 2012 年 7 月.
- ② 中根優子, 佐々木章、金城政孝、神隆. アルブミン修飾量子ドットによる生きた細胞での細胞質粘性測定. 第 6 回バイオ関連化学シンポジウム. 2012 年 9 月. 札幌.
- ③ 中根優子, 佐々木章、金城政孝、神隆. 量子ロッドを用いた蛍光相関分光法による細胞質粘度の定量的測定. 第 5 回バイオ関連化学シンポジウム. 2011 年 9 月. つくば.

[図書] (計 1 件)

- ① 疑似生体膜. 中根優子. 薄膜の評価技術ハンドブック (監修 金原榮). 査読無.

テクノシステム. pp.597-599. 2013.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中根 優子 (NAKANE YUKO)

独立行政法人理化学研究所・ナノバイオプロ
ーブ研究チーム・特別研究員

研究者番号：00546244

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし