

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24656161

研究課題名(和文) マイクロプレートを用いた均一径リポソームによる膜タンパク解析用ペアリングデバイス

研究課題名(英文) Formation of uniformed giant liposome using microplates

研究代表者

繁富 香織 (Shigetomi, Kaori)

北海道大学・情報科学研究科・研究員

研究者番号：90431816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、マイクロ・ナノ加工技術により作製されたハンドリング可能なマイクロプレートを用いて、プレート上に直径が揃ったジャイアントリポソームを効率的に作製し、簡単に操作することができるマイクロデバイスを実現する技術開発である。フォトリソグラフィ技術を用いてパリレンのプレート上にパーマロイをパターンニングし、その後パリレンをコートすることで、磁性体が挿入されているマイクロプレートを作製することができた。作製した磁性体入りマイクロプレートは、ネオジウム磁石を用いて、簡単に動かすことができた。作製したマイクロプレート上にリン脂質をパターンし、水和法によりジャイアントリポソームを作製することができた。

研究成果の概要(英文)：In this research, we developed a microdevice that can produce uniformed sized giant liposome efficiently, and can be handled. The permalloy was patterned on the microplate of parylene using photolithographic technique and coated with the parylene after that. The produced microplate could be easily moved using the neodymium magnet. The pattern of the phosphatide lipids were produced on the produce d microplate, and then giant liposomes were formed by the hydrating method.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：知能機械学・機械システム

キーワード：マイクロ・ナノデバイス 折紙工学

### 1. 研究開始当初の背景

近年、細胞と同様の大きさ（直径数 10 ミクロン）、膜構造を持つジャイアントリポソームは、人工細胞のモデルとして用いることができることから国内外で注目されている。さらに、リポソームは、薬剤物質を包み込むことができ、ドラッグデリバリー (DDS) 技術として活用することが期待されている。特に、ジャイアントリポソームにチャンネル形成膜タンパク質(コネキシン)を再構築し、細胞と結合させギャップジャンクションを通して物質を輸送する方法は、高効率・低侵襲で細胞に物質を導入することができる新しいリポソーム DDS 法として近年注目されている。しかし、ジャイアントリポソームは柔らかく、ハンドリングが困難であるため、リポソームを精度よく操作する技術は確立されていなかった。

これまでの我々の研究において、微細加工技術を用いて、リン脂質膜をパターンし、ジャイアントリポソームの作製を試み、均一サイズのドーム状の脂質膜を作製することが可能になった[1]。また、マイクロ構造体(マイクロプレート)を作製し、プレートに細胞を培養しハンドリングする技術を確認してきた。そこで、これらの技術を組み合わせる事により、ハンドリング可能な均一径ジャイアントリポソームの作製が実現できると考えた。

本研究では、マイクロナノ加工技術の専門家と膜タンパク質の専門家が密接に連携し、これまで実現が不可能であった単一径ジャイアントリポソームによる膜タンパク質の効率的な解析システムの実現にむけたデバイスを作製することができたと考えている。

### 2. 研究の目的

本研究は、微細加工技術を用いて磁性体入りマイクロプレートを作製し、従来困難であったハンドリング可能な均一径ジャイアントリポソームを形成し、リポソームと

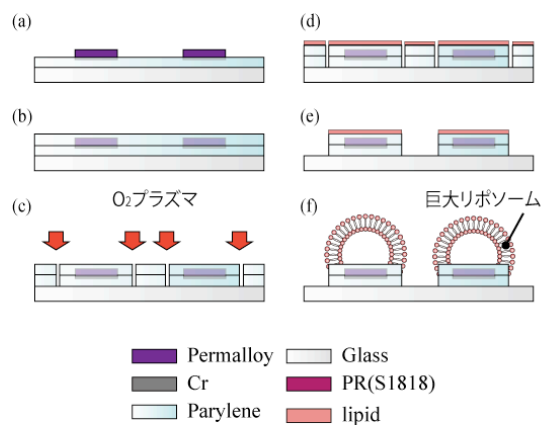


図1 Fabrication process of the permalloy microplates, and GUVs onto the plates.

リポソーム間、リポソームと細胞のペアリングを実現する技術である。

### 3. 研究の方法

図 1 に、磁気入りマイクロプレートの作製法とプレート上でのリポソーム作製法を示す。磁場によるハンドリングのため、マイクロプレート上にジャイアントリポソームを作製した後、ガラス基板からプレートが剥がれやすくなるためにガラス基板にゼラチンをコートし、生体適応材料であるポリマー(パリレン)を蒸着する。その上にパーマロイをスパッタし、フォトリソグラフィーを用いてパターンニングする(図 1-a)。パーマロイによる脂質膜への影響を防ぐため、再度パリレンを蒸着し、パーマロイをパリレン内に閉じ込める(図 1-b)。アルミを蒸着後パターンしアルミをマスクとして用いて、パリレンを O<sub>2</sub> プラズマで削る(図 1-c)。

作製されたアルミを取り、クロロホルムに溶かした脂質で全体をコートする(図 1-d)。その後、マイクロプレート以外のパリレンを剥がし、細胞がプレート上のみ脂質膜を形成する(図 1-e)。最後に水和法により、マイクロプレート上にジャイアントリポソームを形成する。

#### 4. 研究成果

本萌芽研究を通し以下の項目を達成することができた。

1) 微細加工技術により磁場によりハンドリング可能なマイクロプレートを作製。ハンドリング可能な磁性体入りマイクロプレートを作製することに成功した。磁性体としてパーマロイ、そしてマイクロプレートとしてパリレン樹脂を用いた。フォトリソグラフィー技術を用いて、パリレンのプレート上にパーマロイをパターンニングし、その後、パリレンでコートすることで、磁性体が挿入されているマイクロプレートを作製することができた。作製した磁性体入りマイクロプレートはネオジウム磁石を用いて、簡単に動かすことができた(図2)。

2) マイクロプレート上に均一径のジャイアントリポソームを作製しハンドリング技術の確立。マイクロプレート上にジャイアントリポソームを作製することに成功した。プレート上にリン脂質をパターンシ(図3)、水和法によりリポソームを作製することができた。この手法により、サイズの整ったジャイアントリポソームをハンドリング可能なマイクロプレート上に作製することができた。

ハンドリング可能なジャイアントリポソームの作製技術は、医薬品、食品、化粧品など多くの産業分野において、大量の均一直径リポソームを効率的に生産するシステムへの応用、さらに、創薬の開発において、膜タンパク質の機能解析を行うことは重要な技術になると考えている。

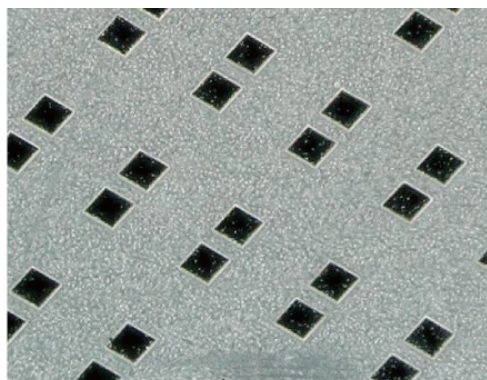


図2 Produced paylene microplates with permalloy. Size of the plates is  $50 \times 50 \mu\text{m}$ .

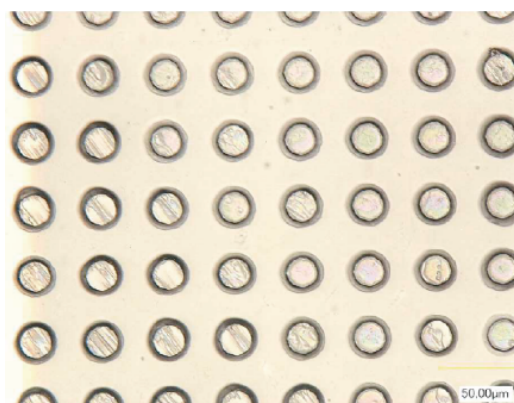


図3 Lipid layers were selectively formed on the microplates. Size of the plates is  $50 \mu\text{m}$  in diameter.

#### 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 4 件)

- ① 繁富香織 マイクロプレートを用いた折り畳み構造技術 折紙工学の深化と適応拡大に貢献する数理科学 2012/11/15-16 明治大学(東京)
- ② 繁富香織 細胞折紙 数学・数理科学と諸科学/産業との協働によるイノベーション創出のための研究推進プログラム (招待講演) 2014/2/26-28 明治大学(東京)
- ③ 繁富香織 MEMS と折り紙の折り畳み技術を用いた細胞の3次元立体構造の構築(招待講演) 第20回 バイオレオロジーリサーチフォーラム 2014/3/7 関西大学 東京センター(東京)

- ④ 繁富(栗林)香織 尾上弘晃 竹内昌治  
細胞折紙 折り紙の折畳み技術を用いた細胞の立体構造体の作製 第 26 回  
代用臓器・再生医学研究会 2014/3/1  
北海道大学(札幌)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

繁富 香織 (Kaori Kuribayashi-Shigetomi)  
北海道大学 情報科学研究科 学術研究員  
研究者番号 : 90431816

### (2) 研究分担者

尾上 弘晃 (Hiroaki Onoe)  
東京大学 生産技術研究所 助教  
研究者番号 : 30548681

神谷 厚輝 (Koki Kamiya)  
公益財団法人 神奈川科学技術アカデミー  
バイオマイクロシステムプロジェクト  
研究員  
研究者番号 : 70612315