

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2013

課題番号：24680033

研究課題名(和文) マイクロ流体工学による人工細胞システムの時空間制御

研究課題名(英文) Spatio-temporal control of artificial cell system based on microfluidic technology

研究代表者

瀧ノ上 正浩 (Takinoue, Masahiro)

東京工業大学・総合理工学研究科(研究院)・講師

研究者番号：20511249

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,400,000円、(間接経費) 6,420,000円

研究成果の概要(和文)：近年、細胞サイズの小胞に遺伝子発現系を内包した人工細胞の研究が盛んに行われているが、ダイナミックな現象を取り出すまでには至っていない。本研究では、微小流体を自在に制御できるマイクロ流体工学を駆使し、人工細胞に物質・エネルギー的な非平衡性を与えることで、人工細胞内でのダイナミックな反応と人工細胞の自律運動を実現するための基礎技術の開発に成功した。本研究の成果により、今後、動的な人工細胞構築の発展が進むと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In recent years, artificial cell systems have been actively studied. Biomolecular reaction systems such as gene expression systems are enclosed in the artificial cells constructed with cell-sized small vesicles. However, up to date, dynamic phenomena have not been realized in artificial cells based on those artificial systems yet. In this study, we succeeded in the development of basic technologies to realize dynamic phenomena such as autonomous reactions and motions of artificial cells using microfluidic technology, which can precisely control a tiny volume of fluids.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：情報学・生体生命情報学

キーワード：人工細胞 人工生命 非線形 非平衡 マイクロ流体力学 マイクロ流路 ゲル リボソーム

1. 研究開始当初の背景

近年、生体分子膜の小胞に DNA やタンパク質を内包して構築する人工細胞・分子ロボット・分子マシンの研究が盛んに行われ、生命システムの構成的理解や工学的応用に貢献している。現在では、人工細胞内で DNA 増幅・タンパク質翻訳が再構成され、一から細胞等のシステムをデザインして構築できる可能性が分かってきた。しかしながら、動的なシステムのデザインと構築に関しては未だ発展途上である。たとえば、リズムなどの動的現象は代謝系や心臓、神経系などにみられ、生物学的に重要な役割があるため、その人工的な構築は重要な課題であるが、それらを設計したり作製したりする方法論は確立されていない。したがって、このような動的現象の実現のため、非平衡のあるシステムの設計方法および作製する方法を確立する必要がある。また、従来は、人工細胞内部の反応の構築に注力されており、人工細胞等の自律運動に関する手法も未だ確立されていない。自律的な運動も系の非平衡性に起因するものであり、非平衡性の導入は不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、微小流体を自在に制御できるマイクロ流体工学を駆使し、人工細胞に物質・エネルギー的な非平衡性を与えることで、人工細胞内でのダイナミックな反応と人工細胞の自律運動を実現する。時間的かつ空間的にダイナミックな自律的な人工細胞システムを実現し、実細胞の *de novo* 構築への基礎技術の開発を行うことを目的とする。特に、人工細胞構築に必要な基礎技術開発を中心に研究を行うことを目的とする。従来から、人工細胞構築に必要な技術として、脂質二重膜小胞 (リポソーム) による方法、油中水滴エマルジョンによる方法が行われてきた。本研究では、これらをベースにして、非平衡性・自律性を持つシステムに発展させることを目指す。また、リポソーム型・油中水滴型に加え、ハイドロゲルを利用した人工細胞の研究も展開し、新たな技術の開発を目指す。

3. 研究の方法

本研究では大きく分けて3つのアプローチによって、時間的かつ空間的にダイナミックな自律的な人工細胞システムのための基礎技術開発を進めた。

(1) 人工細胞のための膜小胞のための技術開発。

人工細胞構築のための脂質二重膜小胞 (リポソーム) を効率良く生成するためのマイクロ流体デバイスの開発を行った。脂質としては、合成リン脂質であるジオレオイルフォスファチジルコリン (Dioleoyl Phosphatidyl-choline, DOPC), ジオレオイルフォスファチジエタノールアミン (Dioleoyl Phosphatidyl- ethanolamine,

DOPE), および、卵黄由来のフォスファチジルコリン (EggPC) を利用した。リポソームによる人工細胞内では、無細胞タンパク質合成系 (PureSystem) を利用し、DNA 情報からのタンパク質の合成を実証した。また、非平衡性 (物質流入出の開放系) を実現するため、膜貫通型ナノポアタンパク質である α ヘモリシンを利用し、人工細胞内外での物質の移動を確認した。

(2) 人工細胞内部での動的な反応の構築。

油中水滴型人工細胞の内部で、動的な非線形反応である解糖振動反応を行った。解糖振動反応は、酵母エキストラクトに栄養源となる糖を加え、温度を 25°C に保つと自発的に発生する振動である。糖の代謝に関わる生化学反応回路によって、NADH や ATP 等の分子の濃度振動が観察された。ここでは、人工細胞のサイズによって、反応の効率が変化することについて調べた。油中水滴型人工細胞の作製では、複数のオイルとその界面活性剤の組み合わせに対して、効率良く反応する条件を確かめた。

(3) マイクロハイドロゲル分子ロボット型の人工細胞の自律運動機能の構築。

自律運動の機能を構築するため、まずは、強度があり安定した形状を保つことができるハイドロゲルを利用した。ハイドロゲルは、生体親和性があり、ドラッグデリバリー等にも利用されているマテリアルである。ハイドロゲルの中に、生体分子や薬剤等を内包することができるので、人工細胞への応用も可能である。本研究では、遠心型マイクロ流体デバイスを利用して、細胞サイズのマイクロハイドロゲルを生成した。遠心型マイクロ流体デバイスは、シリンジポンプや煩雑な流路開発を必要としないマイクロ流体デバイスで、マイクロハイドロゲルビーズの作製に適している。ここでは、ハイドロゲルの材質として、主に、アルギン酸カルシウムゲルとアガロースゲルを利用した。

4. 研究成果

3つのアプローチにおいて、時間的かつ空間的にダイナミックな自律的な人工細胞システムのための基礎技術開発に成功した。

(1) 人工細胞のための膜小胞のための技術開発。

ここでは、水滴に遠心力をかけてリポソームを生成する新規なマイクロ流体デバイスを構築した (図 1)。このデバイスにより、リポソームが効率良く生成されることが分かった (図 1b)。作製されたリポソームの大きさを計測したところ、5-20 μm の細胞サイズのリポソームが効率良く生成されていた。

また、リポソーム内に蛍光分子を内包し、ナノポアタンパク質により分子の流入出ができることが確認できた。さらに、内部でタンパク質発現ができることも確かめられた。これらの実験により、本技術が、人工細胞研究に実用化できることが確かめられた。

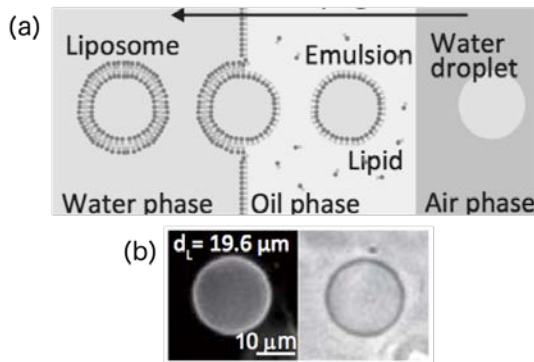


図 1. (a)遠心型マイクロ流体デバイスによるリポソームの生成. (b)生成されたりポソーム.

(2) 人工細胞内部での動的な反応の構築.

油中水滴型人工細胞を構築して、内部での生化学反応に成功した. 酵母エキストラクトを利用した代謝反応系の再構築ができ、蛍光顕微鏡下で反応の揭示観察に成功した. 代謝反応系は、エネルギーを利用する非平衡系のモデルとして重要である.

本実験で、様々な検討をした結果、オイルとしてミネラルオイル、界面活性剤として合成界面活性剤 Span80 を用いる条件、オイルとしてシリコンオイル、界面活性剤としてシリコン系界面活性剤を用いる条件において、安定した生化学反応が可能であることが分かった.

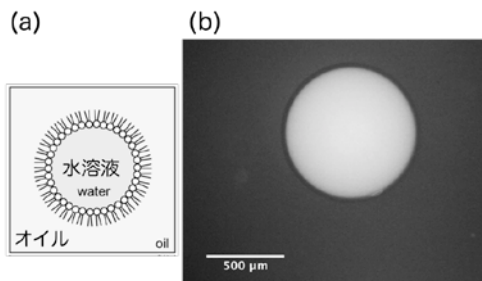


図 2. (a) 油中水滴型人工細胞. (b) 油中水滴型人工細胞内の酵母エキストラクトの NADH 観察.

(3) マイクロハイドロゲル分子ロボット型の人工細胞の自律運動機能の構築.

まず、細胞サイズのマイクロハイドロゲルで人工細胞 (分子ロボット) の作製に成功した. エネルギー的な非平衡性をあたえるため、化学反応を利用した. 白金触媒と過酸化水素が反応するエネルギーを使って、細胞サイズマイクロハイドロゲル型人工細胞に自律的な運動を実現することに成功した (図 3). ここでは、方向性のある運動の実現のほか、回転運動の実現にも成功した. 触媒の濃度や過酸化水素水の濃度によって、運動の効率が変わるため、効率良く良く運動できる条件を検討し、再現性良く運動を取り出すことに成功した.

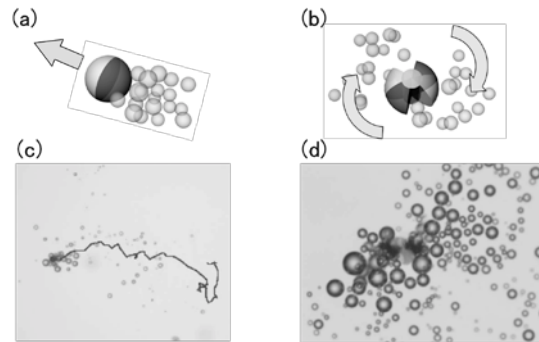


図 3. (a), (c) 方向性のある自律運動をするマイクロハイドロゲル型人工細胞 (分子ロボット). (b), (d) 自律回転運動をするマイクロハイドロゲル型人工細胞 (分子ロボット).

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) 早川雅之, 尾上弘晃, 永井健, 瀧ノ上正造, “マランゴニ流と拡散流を利用した複雑形状マイクロハイドロゲル粒子高速生成システムの開発”, 化学とマイクロ・ナノシステム, 査読無, vol. 13, no. 1, pp. 29-30 (2014), <http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/kitamori/CHEMINAS//pdf/kaisi13-1.pdf>
- (2) Masayuki Hayakawa, Hiroaki Onoe, Ken H. Nagai, Masahiro Takinoue, “Rapid formation of anisotropic non-spherical hydrogel microparticles with complex structures using a tabletop centrifuge-based microfluidic device”, The 17th International Conference on Minuturized Systems for Chemistry and Life Sciences(microTAS2013), 査読有, pp630-632(2013), http://www.rsc.org/images/loc/2013/PDFs/Papers/212_0647.pdf
- (3) 早川雅之, 尾上弘晃, 永井健, 瀧ノ上正造, “異方性をもつ複雑形状マイクロハイドロゲル粒子作製システムの開発”, 電気学会研究会資料 (バイオ・マイクロシステム研究会), 査読無, No. BMS-13-043 (2013), pp. 41-44, https://ieej.ixsq.nii.ac.jp/ej/?action=pages_view_main&active_action=repository_view_main_item_detail&item_id=60821&item_no=1&page_id=13&block_id=18
- (4) 瀧ノ上正造, “コラム: 複雑な非対称性をもつマイクロ粒子”, パリティ (丸善), 査読無, 2012年, 5月号, p. 20
- (5) 瀧ノ上正造 (訳), Amy Q. Shen, Perry Cheung (著), “閉じ込め系におかれた複雑流体の可能性”, パリティ (丸善), 査読無, 2012年, 5月号, pp. 12-20

〔学会発表〕(計 20 件)

- (1) 早川雅之, 尾上弘晃, 永井健, 瀧ノ上正造, “マランゴニ流と拡散流による微小液滴の変形原理の解明と複雑形状粒子の構築”, 日本物理学会第 69 回年次大会, ポスター発表, No. 30aPS-91, 3 月 27-30 日, 2014, 東海大学湘南キャンパス, 神奈川
- (2) 早川雅之, 尾上弘晃, 永井健, 瀧ノ上正造, “マランゴニ流と拡散流を利用した 複雑形状マイクロハイドロゲル粒子高速生成システムの開発”, 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 28 回研究会, ポスター発表, No. 1P14, 12 月 5-6 日, 2013, イーグレひめじ, 姫路
- (3) 森田雅宗, 柳澤実穂, 齊藤博英, 尾上弘晃, 瀧ノ上正造, “遠心式マイクロ流体デバイスを用いて均一サイズの細胞の器を創る”, 「細胞を創る」研究会 6.0, ポスター発表, No. P-6, 11 月 14-15 日, 2013, 慶応義塾大学鶴岡メタボロームキャンパス, 鶴岡
- (4) 瀧ノ上正造, 杉浦晴香, 北畑裕之, 森義仁, “非線形化学振動反応のための非平衡人工細胞モデルの構築”, 「細胞を創る」研究会 6.0, ポスター発表, No. P-7, 11 月 14-15 日, 2013, 慶応義塾大学鶴岡メタボロームキャンパス, 鶴岡
- (5) Masahiro Takinoue, “Microfluidic technologies toward the construction of nonequilibrium artificial cells and molecular robots”, Prof. Utkan Demirci Lab. Seminar (MIT-Harvard medical school), 招待講演, Nov. 4, 2013, Boston, USA
- (6) Masayuki Hayakawa, Hiroaki Onoe, Ken H. Nagai, and Masahiro Takinoue, “Rapid formation of anisotropic non-spherical hydrogel microparticles with complex structures using a tabletop centrifuge-based microfluidic device”, The 17th International Conference on Minuturized Systems for Chemistry and Life Sciences (microTAS2013), oral, 27-31 October, 2013, Freiburg, Germany
- (7) Masamune Morita, Miho Yanagisawa, Hiroaki Onoe, Masahiro Takinoue, “遠心式マイクロ流体デバイスによる細胞サイズリポソームの作製 (The synthesis of cell-sized liposomes by centrifuge-based microfluidic device.)”, 第 51 回日本生物物理学会, ポスター発表, No. 3P209, 10 月 28-30 日, 2013, 国立京都国際会館, 京都
- (8) Haruka Sugiura, Masahiro Takinoue, “Oscillations of a genomic DNA in a cell-sized chemically open system”, 第 51 回日本生物物理学会, ポスター発表, No. 2PT285, 10 月 28-30 日, 2013, 国立京都国際会館, 京都
- (9) Masayuki Hayakawa, Hiroaki Onoe, Ken H. Nagai, Masahiro Takinoue, “遠心力を利用した複雑形状マイクロハイドロゲル粒子の高速生成 (Centrifuge-based rapid synthesis of complex-shaped microhydrogel particles)”, 第 51 回日本生物物理学会, ポスター発表, No. 3P312, 10 月 28-30 日, 2013, 国立京都国際会館, 京都
- (10) Motosugi Murata, Haruka Sugiura, Masahiro Takinoue, “膜の分子透過性へのフィードバック制御のある非平衡系人工細胞の数理解析 (Numerical analysis of non-equilibrium open artificial cell with a feedback control over molecular permeability of the cell membrane)”, 第 51 回日本生物物理学会, ポスター発表, No. 2P284, 10 月 28-30 日, 2013, 国立京都国際会館, 京都
- (11) Masahiro Takinoue, Haruka Sugiura, Hiroyuki Kitahata, Yoshihito Mori: “マイクロドロップレットで構築された非平衡人工細胞の実験的・数理解析 (Experimental and numerical analyses of microdroplet-based nonequilibrium artificial cells)”, 第 51 回日本生物物理学会, ポスター発表, No. 2P283, 10 月 28-30 日, 2013, 国立京都国際会館, 京都
- (12) 早川雅之, 尾上弘晃, 永井健, 瀧ノ上正造, “異方性をもつ複雑形状マイクロハイドロゲル粒子作製システムの開発”, バイオ・マイクロシステム研究会, No. BMS-13-043, 10 月 8 日, 2013, 東京大学生産技術研究所, 東京
- (13) 瀧ノ上正造, “マイクロサイズの非平衡場の制御による動的人工細胞の構築と異方性複雑形状粒子の作製”, 第 7 回自己組織化討論会, 招待講演, 6 月 29-30 日, 2013, 晴海グランドホテル, 東京
- (14) Masahiro Takinoue, “Nano/micro-technologies for the Construction of Non-equilibrium Artificial Cell Models”, French-Japanese Seminar on “Bioinspired Methods and Applications”, 招待講演, Feb. 4-6, 2013, 東京大学生産技術研究所, 東京
- (15) 瀧ノ上正造, “分子ロボットの感覚”, 計測自動制御学会 システム・情報部門学術講演会 2012, 招待講演, 3E2-2, 11 月 23 日, 2012, ウィル愛知, 名古屋
- (16) 早川雅之, 尾上弘晃, 永井健, 瀧ノ上正造, “自己駆動粒子への応用を目指した非球形マイクロゲルの作製法”, 「細胞を創る」研究会 5.0, ポスター, No. P-45, 11 月 21-21 日, 2012, 東京工業大学すずかけ台キャンパス, 横浜
- (17) 瀧ノ上正造, 杉浦晴香, 森義仁, “非平衡人工細胞モデルを目指したマイクロ流体技術の開発”, 「細胞を創る」研究会 5.0, ポスター, No. P-89, 11 月 21-21 日, 2012, 東京工業大学すずかけ台キャンパス, 横浜
- (18) 星健介, 厚美佑輔, 齋藤健, 山下仁義, 松戸里紗, 番匠康雄, 小長谷明彦, 木賀大介, 山村雅幸, 小宮健, 瀧ノ上正造, “Biomolecular Rocket”, 「細胞を創る」研究会 5.0, ポスター, No. P-46, 11 月 21-21 日,

- 2012, 東京工業大学すずかけ台キャンパス, 横浜
- (19) 瀧ノ上正浩, “分子ロボットへの生物物理学的アプローチ”, 人工知能学会合同研究会, 招待講演, 11月15日, 2012, 慶応義塾大学日吉キャンパス, 横浜
- (20) Masayuki Hayakawa, Hiroaki Onoe, Ken H. Nagai, Masahiro Takinoue, “高重力を利用した非球形構造を持つマイクロハイドロゲル粒子の作製法 (High-gravity-based synthesizing method for hydrogel microparticles with non-spherical structures)”, 第50回日本生物物理学学会, ポスター発表, No. 1PT224, 9月22-24日, 2012, 名古屋大学東山キャンパス, 名古屋

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)
該当無し

○取得状況(計0件)
該当無し

〔その他〕

ホームページ等
瀧ノ上研究室ホームページ
<http://www.lifephys.dis.titech.ac.jp/>

アウトリーチ活動

- (1) 一般向け記事への協力: 瀧ノ上正浩, “細胞に見立てた水滴のふるまいから, 生命の物理的な原理を探る”(特集「生命とは何か」・Part3 生命をつくる最先端研究・(1) 生命の物理学), Newton, vol. 33, no. 7, pp. 62-63, 2013年7月号.
- (2) 一般向け記事への協力: 「非生命からの生命へのアプローチ」, 産学連携推進マガジン BioGARAGE (リバネス出版), vol. 16, pp. 4-5, 2013年3月号.
- (3) BIOMOD (国際生体分子デザインコンペティション) 2013 (2011年11月2-3日 @Harvard 大学) へ参加した学生への実験指導: 世界大会で3つの賞(プロジェクトアワード金賞, 優秀ビデオ部門賞3位, ベストT-shirtデザイン賞)を受賞.
- (4) BIOMOD (国際生体分子デザインコンペティション) 2012 (2011年11月3-4日 @Harvard 大学) へ参加した学生への実験指導: サポートした東工大チームが世界大会で総合第3位を含む5つの賞(世界総合第3位, 優秀プロジェクトWiki部門賞3位, 優秀ビデオ部門賞2位, 分子ロボット賞, プロジェクトアワード金賞)を受賞.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀧ノ上 正浩 (TAKINOUE, Masahiro)

東京工業大学・大学院総合理工学研究科・
講師
研究者番号: 20511249

(2) 研究分担者
該当無し

(3) 連携研究者
該当無し