

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26540150

研究課題名(和文) エネルギー代謝・分子情報通信のある非平衡動的な人工細胞システムの創成

研究課題名(英文) Construction of dynamical artificial-cell like systems with energy metabolism and molecular communication

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)・准教授

研究者番号：20511249

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、人工細胞膜小胞の生成、人工細胞小胞内での化学反応の制御、人工細胞小胞同士の相互作用に関して、制御システムのためのマイクロ流体デバイスの構築を行った。人工細胞膜小胞の生成では、遠心キャピラリデバイスという単純な仕組みによって細胞サイズの人工細胞膜小胞(リポソーム)を生成できることを示した。化学反応の制御では、油中水滴の融合と分裂現象をコンピュータで制御することによって、物質の流入出を制御し、代謝のモデルとしての化学リズム反応の制御に成功した。このような人工細胞小胞の融合分裂を用いた、物質交換による相互作用(分子情報通信)の手法の開発も行った。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed microfluidic control systems for generation of liposomes (artificial cell-membrane vesicles), control of chemical reactions in artificial cell-like vesicles, and molecular interaction between artificial cell-like vesicles. In the study of the generation of liposomes, we developed a centrifugal capillary-based microfluidic device. We demonstrated that the centrifugal capillary-based microfluidic device could generate cell-sized monodisperse liposomes. In the study of the control of chemical reactions, we demonstrated a chemical rhythm reaction could be controlled based on computer-aided fusion and fission of microdroplet-based artificial cell-like vesicles. By extending this method, we demonstrated the interaction between microdroplet-based artificial cell-like vesicles.

研究分野：生物物理学, マイクロ流体工学, 分子ロボティクス

キーワード：人工細胞モデル マイクロ・ナノデバイス 非平衡 非線形 マイクロフルイディクス エマルション

1. 研究開始当初の背景

近年、生体膜小胞にDNAなどを内包した「人工細胞」が盛んに研究され、生命の構成的理解や工学応用に貢献している。現在、人工細胞内でDNA複製・タンパク質翻訳が実現され、細胞を一から設計・構築できるようになったと思われる。しかし、実際は、小胞の内外の物質・エネルギーの流入出がなく、エネルギー代謝もないため、従来の人工細胞では、生化学反応が平衡状態へ収束する減衰過程を実現するに留まり、持続的な動的現象を実現することはできない。持続的リズムなどの動的な現象は心臓・神経系など各所にみられ、生物学的に重要な役割があるため、人工細胞においても、これらの実現・制御は重要な課題である。したがって、このような動的現象の実現のため、生命にとって本質的なエネルギー代謝を含む非平衡性を人工細胞に実現する技術が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、マイクロ流体工学による細胞スケールの空間制御と、生物物理学による生体分子の設計・制御を駆使し、人工細胞の物質・エネルギー的な非平衡性を実現し、生命にとって本質的なエネルギー代謝(物質の流入出系・非平衡開放系)のモデル系を構築し制御する。これにより、リズム現象・遺伝子発現制御・自律運動などの高次生体機能のモデル系を実現するとともに、人工細胞間の分子情報通信のモデル化を行い、同期・分化などによる多細胞的な集団挙動モデルの構築を目指す。このような時空間的に動的な人工細胞システムを実現し、人工細胞・人工生命技術に新奇な方法論をもたらすとともに、新たな情報処理技術や新たなものづくり技術の創成を促進することを目指す。

3. 研究の方法

本研究では、大きく分けて以下の3つのアプローチによって研究を進めた。

- (1)人工細胞膜小胞(リポソーム)の生成
- (2)マイクロ流体デバイスによる油中水滴型人工細胞の化学反応制御
- (3)メカニカルな液滴制御デバイスによる油中水滴型人工細胞の相互作用制御

以下でそれぞれの方法に関して具体的に説明する。

(1)人工細胞膜小胞(リポソーム)の生成
エネルギー代謝・分子情報通信のある非平衡動的な人工細胞システムを構築するためには、まずは人工細胞の本体となる人工細胞膜小胞(リポソーム)の生成が必要である。従来は、静置水和法と呼ばれる自己組織的なリポソーム形成や、エマルジョン遠心沈降法と呼ばれる反応溶液を含んだ油中水滴エマルジョンを油水界面を通過させることによってリポソームを形成させる方法が主流であったが、細胞サイズで大きさのそろっ

たリポソームを生成することが難しかった。本研究では、この問題を解決するため、エマルジョン遠心沈降法を改良してリポソームの生成を行う技術を開発した。この方法では、キャピラリーに溶液を封入し遠心力をかけて吐出することによって、細胞サイズで均一なエマルジョンを生成し、それを油水界面を通過させることで細胞サイズで大きさのそろったリポソームを生成した。

人工細胞膜小胞(リポソーム)のための脂質としては、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ルエタノールアミン(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)を利用した。また、物質流入出の実現のため、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た。

(2)マイクロ流体デバイスによる油中水滴型人工細胞の化学反応制御

エネルギー代謝・分子情報通信のある非平衡動的な人工細胞システムを構築するためには、人工細胞内外へのエネルギー基質となる物質の流入出が必須である。しかしながら、従来、人工細胞小胞(ここでは、油中水滴)を生成することは実現されていたが、生成した油中水滴型人工細胞の内外に物質を出し入れする手法がなく、人工細胞が閉鎖系になってしまうという問題があった。ここでは、マイクロ流体デバイスに固定した油中水滴型人工細胞(リアクタ)に、マイクロ流路を利用して輸送してきた基質を内包した油中水滴(キャリア)を融合・分裂させることで、一部溶液の交換を実現し、その融合・分裂頻度をコンピュータで制御することによって、油中水滴型人工細胞(リアクタ)の中での化学反応を時間的に制御することを行った。

マイクロ流路に流すオイルとしてミネラルオイルを用い、それに溶解させる界面活性剤として合成界面活性剤 Span80 を用いた。また、実験条件によっては、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た。化学反応として用いたのは、bromate-sulfite-ferrocyanide (BSF)系 pH 振動反応と呼ばれる化学リズム反応である。

(3)メカニカルな液滴制御デバイスによる油中水滴型人工細胞の相互作用制御

エネルギー代謝・分子情報通信のある非平衡動的な人工細胞システムを構築するためには、分子情報通信のための人工細胞間分子交換が必須となる。しかしながら、上記の(2)で構築したシステムでは、単一の油中水滴型人工細胞(リアクタ)の中での化学反応を制御することはできたが、このままでは、複数の油中水滴型人工細胞(リアクタ)間で物質交換が容易にはできない。そこで、ここでは、油中水滴型人工細胞(リアクタ)をマイ

クロ流路中で固定してマイクロ流路で油中水滴(キャリア)を輸送するという方法を拡張し、マイクロ流路ではなく、油中水滴をマイクロウェルの空いたプレート上のメカニカルな回転を利用する手法を検討した。ミネラルオイルを用い、それに溶解させる界面活性剤として合成界面活性剤 Span80 を用いた。また、実験条件によっては、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た。

4. 研究成果

以下に、それぞれのアプローチにおける研究成果を示す。

(1) 人工細胞膜小胞(リポソーム)の生成

図 1 に示すような装置の開発をし、リポソームを生成することに成功した。リポソームは細胞サイズで均一であることが分かった。また、このようなサイズのリポソームが大量に生成される物理的なメカニズムに関しても、実験・理論を通して解明することに成功した。

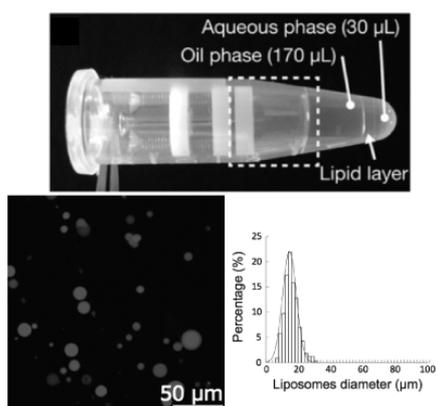


図1: (上)キャピラリー遠心デバイス(キャピラリーに溶液を封入し、遠心力をかけて吐出することによって、細胞サイズで均一なエマルションを生成し、それを油水界面を通過させる)。(下左)生成されたリポソーム。(下右)生成されたリポソームの直径分布の計測。

(2) マイクロ流体デバイスによる油中水滴型人工細胞の化学反応制御

図 2a に示したのが、本研究で開発したマイクロ流体デバイス内での、油中水滴型人工細胞(リアクタ)への基質を内包した油中水滴(キャリア)の融合・分裂の様子である。電圧印加のタイミングによって、融合分裂頻度を制御できることが分かった。この油中水滴型人工細胞(リアクタ)内に、化学反応溶液(BSF型pH振動反応)を内包させ、油中水滴(キャリア)にその反応のための基質を内包させ、融合分裂を繰り返すことで化学振動を実現できることを示した(図 2b,c)。これにより、エネルギー代謝を持つ人工細胞のモデ

ルシステムの実証に成功した。

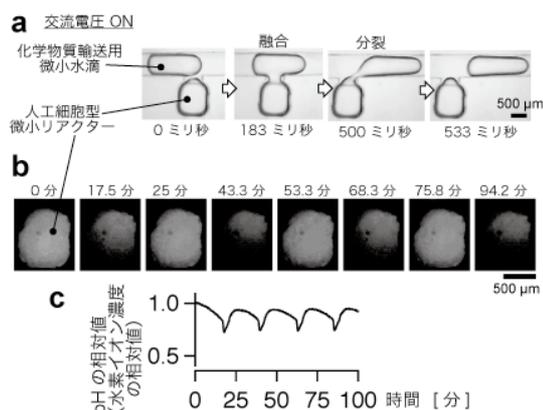


図2:(a) 油中水滴型人工細胞(リアクタ)への基質を内包した油中水滴(キャリア)の融合・分裂の様子。(b) 油中水滴型人工細胞(リアクタ)内でのBSF型pH振動反応の連続写真。(c)(b)の蛍光測定結果。

(3) メカニカルな液滴制御デバイスによる油中水滴型人工細胞の相互作用制御

図 3 のように、モーターで駆動し、メカニカルな移動にともなって融合分裂を実現する油中水滴型人工細胞の実現に成功した。相互作用(分子情報通信)による集団挙動に関しては、数理モデルを用いて検証した。

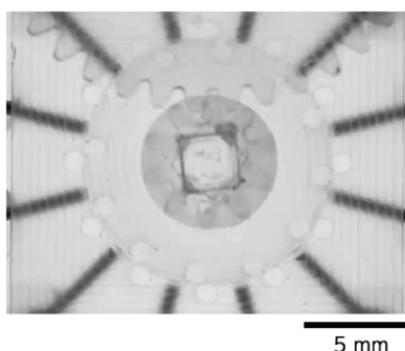


図 3: 開発したメカニカルな液滴制御デバイスの写真。

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 9件)

- (1) Masamune Morita, Hiroaki Onoe, Miho Yanagisawa, Kei Fujiwara, Hirohide Saito, Masahiro Takinoue, “The rapid synthesis of cell-sized liposomes by centrifuge-based microfluidic device”, *Proc. microTAS*, pp.336-338 (2014). 査読有
- (2) 森田雅宗, 杉浦晴香, 瀧ノ上正浩,

- “Droplet Microfluidics による人工細胞モデルの構築”, 日本流体力学会誌「ながれ」vol.34, no.1, pp.11-14 (2015). 査読無
- (3) 瀧ノ上正浩, “マイクロ流体工学による非平衡人工細胞”, 生体の科学・増大特集「生命動態システム科学」, vol.65, no.5, pp.502-503 (2014). 査読無
- (4) 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”(生命の最先端研究・生命の物理学(1)), *Newton 別冊*「やさしくわかる 生命の科学」, pp.102-103 (2014). 査読無
- (5) 瀧ノ上正浩, “細胞スケールの非平衡系における自己秩序化: 自律運動と自律振動反応”, *高分子* vol.63, no.6, pp.388-389 (2014). 査読無
- (6) Masamune Morita, Hiroaki Onoe, Miho Yanagisawa, Hiroaki Ito, Masatoshi Ichikawa, Kei Fujiwara, Hirohide Saito, Masahiro Takinoue, “Droplet-Shooting and Size-Filtration (DSSF) Method for Synthesis of Cell-Sized Liposomes with Controlled Lipid Compositions”, *ChemBioChem*, vol. 16, no. 14, pp. 2029-2035 (2015). DOI: 10.1002/cbic.201500354 査読有
- (7) Haruka Sugiura, Manami Ito, Hiroyuki Kitahata, Yoshihito Mori, Masahiro Takinoue, “Droplet-based Open Microreactor Based On Droplet Fusion-fission Inspired By Endo/exocytosis”, *Proc. microTAS*, pp.126-128 (2A2-2), (2015) 査読有
- (8) Haruka Sugiura, Manami Ito, Tomoya Okuaki, Yoshihito Mori, Hiroyuki Kitahata, Masahiro Takinoue, “Pulse-density modulation control of chemical oscillation far from equilibrium in a droplet open-reactor system”, *Nature Commun.*, vol.7,10212(2016).DOI:10.1038/ncomms10212. 査読有
- (9) Manami Ito, Haruka Sugiura, Shotaro Ayukawa, Daisuke Kiga, Masahiro Takinoue, “A Bacterial Continuous Culture System Based on a Microfluidic Droplet Open Reactor”, *Anal. Sci.*, vol. 32, no. 1, pp. 61-66 (2016). DOI: 10.2116/analsci.32.61. 査読有
- [学会発表](計 31 件)
- (1) Masamune Morita, Masahiro Takinoue, “Synthesis of Monodisperse Micro-Droplets Controlled by Co-Flowing Liquid Streams in Glass-Capillary Based Microfluidic Device”, *Physics of Structural and Dynamical Hierarchy in Soft Matter*, Poster no. P11, March 16-17 2015, Institute of Industrial Science, Univ. of Tokyo, Japan.
- (2) Masamune Morita, Hiroaki Onoe, Miho Yanagisawa, Kei Fujiwara, Hirohide Saito, Masahiro Takinoue, “THE RAPID SYNTHESIS OF CELL-SIZED LIPOSOMES BY CENTRIFUGE-BASED MICROFLUIDIC DEVICE”, The 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (microTAS2014), Oral, Oct. 30, 2014, San Antonio, USA
- (3) Masahiro Takinoue, Haruka Sugiura, Hiroyuki Kitahata, Yoshihito Mori, “Construction of a nonequilibrium artificial cell as a prebiotic autonomous system”, *Open Questions on the Origin of Life 2014 (OQOL2014)*, July 12-13, 2014, IIAS, Kizugawa, Kyoto, Japan
- (4) Masamune Morita, Hiroaki Onoe, Miho Yanagisawa, Kei Fujiwara, Hirohide Saito, Masahiro Takinoue, “Synthesis of Monodisperse Cell-Sized Liposomes for Construction of Artificial Cell”, *Open Questions on the Origin of Life 2014 (OQOL2014)*, July 12-13, IIAS, Kizugawa, Kyoto, Japan
- (5) 瀧ノ上正浩, “ミクロな非平衡場による人工細胞の制御 (Control of an artificial cell in a microscopic nonequilibrium open system)”, 「細胞を創る」研究会 7.0 シンポジウム講演(招待講演), 11月13日 2014, 東京大学弥生キャンパス, 東京
- (6) 瀧ノ上正浩, “遠心分離法を応用した微粒子・ベシクルの作製”, 先端技術講座:「使える」ソフトマター最前線, 日本化学会コロイドおよび界面化学部会, 招待講演, 11月12日, 2014, 日本化学会館, 東京
- (7) 瀧ノ上正浩, “マイクロ流体システムによる動的な人工細胞の構築と制御”, 京都非線形ソフトマター研究会 2014, 招待講演, 10月17日, 2014, 大原, 京都
- (8) 瀧ノ上正浩, “生物物理学における非平衡研究のためのドロップレットマイクロ流体工学 (Droplet-based microfluidics for nonequilibrium study in biophysics)”, 第52回日本生物物理学会, シンポジウム講演(招待講演), No. 1SCA-06, 9月25日, 2014, 札幌コンベンションセンター, 札幌
- (9) 瀧ノ上正浩, “非平衡系の制御で可能になる自律的な分子ロボット・人工細胞の構築”, 第5回マテリアルサイエンス研究科セミナー, 招待講演, 7月30日, 2014, 北陸先端大学, 石川
- (10) 瀧ノ上正浩, “マイクロ流体の非平衡現象制御による分子ロボット・人工細胞の構築”, 第9回 CIMoS セミナー, 招待講演, 7月4日, 2014, 自然科学研究機構 分子科学研究所 協奏分子システム研究センター, 岡崎, 愛知
- (11) 杉浦晴香, 伊藤真奈美, 北畑裕之, 森義仁, 瀧ノ上正浩, “非平衡人工細胞における非線形化学反応の解析”, 日本物理学

- 会, ポスター発表, No. 22pPSA-70, 3月22日, 2015, 早稲田大学・早稲田キャンパス, 東京
- (12) 杉浦晴香, 伊藤真奈美, 北畑裕之, 森義仁, 瀧ノ上正浩, “マイクロ液滴を用いた非平衡人工細胞の構築と非線形化学反応の制御“第24回非線形反応と協同現象研究会, ポスター発表, No. P12, 12月6日, 2014, 東京電機大学・東京千住キャンパス, 東京
- (13) 奥秋知也, 杉浦晴香, 瀧ノ上正浩, “微小液滴を用いた非線形化学反応ネットワークによる情報処理”, 第24回非線形反応と協同現象研究会, ポスター発表, No. P13, 12月6日, 2014, 東京電機大学・東京千住キャンパス, 東京
- (14) Masahiro Takinoue, Haruka Sugiura, Hiroyuki Kitahata, Yoshihito Mori, “油中水滴による非平衡な人工細胞システム (Nonequilibrium artificial cell system based on water-in-oil microdroplet.)”, 第52回日本生物物理学会, ポスター発表, No. 2P282, 9月26日, 2014, 札幌コンベンションセンター, 札幌
- (15) Manami Ito, Haruka Sugiura and Masahiro Takinoue, “細胞濃度制御のためのマイクロ流体ケモスタット (Microfluidic chemostat for cell density control)”, 第52回日本生物物理学会, ポスター発表, No. 2P284, 9月26日, 2014, 札幌コンベンションセンター, 札幌
- (16) Tomoya Okuaki, Haruka Sugiura, Masahiro Takinoue, “微小液滴を用いた非線形化学反応間の相互作用 (Interaction among nonlinear chemical reactions based on microdroplets)”, 第52回日本生物物理学会, ポスター発表, No. 2P284, 9月26日, 2014, 札幌コンベンションセンター, 札幌
- (17) 瀧ノ上正浩, “マイクロ流路による非平衡場の制御と応用”, 第8回自己組織化討論会, 6月29日, 2014, 晴海グランドホテル, 東京
- (18) 森田雅宗, 尾上弘晃, 柳澤実穂, 藤原慶, 齊藤博英, 瀧ノ上正浩, “遠心式マイクロ流体デバイスによる均一サイズ人工細胞モデル膜小胞の作製”, 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第29回研究会, ポスター発表, No. 1P19, 5月23日, 2014, 日本女子大学目白キャンパス, 東京
- (19) Masahiro Takinoue, “Microfluidic construction of artificial cell-like reactors”, The Pittsburgh Conference & Exposition (Pittcon) 2016, Invited Talk, March 6-10, 2016, Georgia World Congress Center, Atlanta, Georgia, USA
- (20) Masahiro Takinoue, “Droplet-based microfluidic technologies for artificial cell-like models and molecular robotics”, Dec. 15, 2015, Invited Talk, Institute of Pierre-Gilles de Gennes for microfluidics (IPGG), Paris, France
- (21) Masahiro Takinoue, “Construction and Application of Artificial Cell-like Systems based on Droplet Microfluidics”, 1st Japan-Korea Biomedical Technology Symposium, Invited Talk, June 12, 2015, Tokyo, Japan
- (22) 瀧ノ上正浩, “人工細胞構築を目指した微小流体の制御”, 生命動態システム科学四拠点, CREST, PRESTO, QBiC 合同シンポジウム「生命動態の分子メカニズムと数理」, 招待講演, 3月25日, 2016, 広島シェラトンホテル, 広島
- (23) 瀧ノ上正浩, “生体分子コンピュータから人工細胞モデル・細胞型分子ロボットへ”, 第55回生物物理若手の会 夏の学校, 招待講演, 8月22日, 2015, 琵琶湖畔・白浜荘, 滋賀
- (24) 杉浦晴香, 伊藤真奈美, 奥秋知也, 森義仁, 北畑裕之, 瀧ノ上正浩, “コンピュータ・分子ハイブリッド型人工細胞のための制御システム”, 計測自動制御学会 システム・情報部門 学術講演会 2015 (SSI2015), ポスター発表, 11月18日, 2015, 函館アリーナ, 函館
- (25) 杉浦晴香, 伊藤真奈美, 奥秋知也, 森義仁, 北畑裕之, 瀧ノ上正浩, “コンピュータ制御によるマイクロ水滴型人工細胞 (Computer-aided artificial cell based on microdroplets)”, 「細胞を創る」研究会 8.0, ポスター発表, 11月12-13日, 2015, 大阪大学吹田キャンパス・銀杏会館, 大阪
- (26) Manami Ito, Haruka Sugiura, Shotaro Ayukawa, Daisuke Kiga, and Masahiro Takinoue, “バクテリアケモスタットのためのマイクロ流体デバイスの構築 (Microfluidic chemostat for cell density control)”, 「細胞を創る」研究会 8.0, ポスター発表, P-32, 11月12-13日, 2015, 大阪大学吹田キャンパス, 大阪
- (27) Masahiro Takinoue, Haruka Sugiura, Manami Ito, Hiroyuki Kitahata, Yoshihito Mori, “マイクロ流体デバイスによる非平衡開放系型人工細胞リアクタ (Microfluidic nonequilibrium open-type artificial-cell reactor)”, 日本流体力学会 年会 2015, 口頭発表, 9月26-28日, 2015, 東京工業大学大岡山キャンパス, 東京
- (28) Manami Ito, Haruka Sugiura, Shotaro Ayukawa, Daisuke Kiga, and Masahiro Takinoue, “バクテリアケモスタットのためのマイクロ流体デバイスの構築 (Microfluidic chemostat for cell density control)”, 第53回日本生物物理学会, ポスター発表, No.3Pos200, 9月13-15日, 2015, 金沢大学角間キャンパス, 金沢
- (29) Tomoya Okuaki, Haruka Sugiura, Ryuji Kawano, Masahiro Takinoue, “微小液滴を用いた非線形化学反応間の相互作用の制御 (Control of the interaction among

nonlinear chemical reactions based on microdroplets)”, 第 53 回日本生物物理学会, ポスター発表, No. 2Pos201, 9 月 13-15 日, 2015, 金沢大学角間キャンパス, 金沢

(30) Haruka Sugiura, Manami Ito, Tomoya Okuaki, Yoshihito Mori, Hiroyuki Kitahata, Masahiro Takinoue, “パルス密度制御による小胞型非平衡開放系リアクタ (Vesicular nonequilibrium open reactor regulated by pulse-density modulation)”, 第 53 回日本生物物理学会, ポスター発表, No. 1Pos201, 9 月 13-15 日, 2015, 金沢大学角間キャンパス, 金沢

(31) Manami Ito, Haruka Sugiura, Shotaro Ayukawa, Daisuke Kiga, and Masahiro Takinoue, “細胞密度制御の可能なマイクロ流体デバイスの構築”, 第 2 回分子ロボティクス若手の会, ポスター発表, No.9, 8 月 1 日, 2015, 東京工業大学田町キャンパス, 東京

[図書] (計 件)

該当無し

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

該当無し

○取得状況 (計 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.takinoue-lab.jp/>

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・

准教授

研究者番号: 20511249

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

森田 雅宗 (Morita, Masamune)

日本学術振興会特別研究員

研究者番号: 90708504