

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：82718

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13656

研究課題名(和文)非球面細胞サイズリポソームの創成

研究課題名(英文)Creation of non-spherical liposomes using a microdevice

研究代表者

神谷 厚輝(Kamiya, Koki)

地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所・人工細胞膜システムグループ・研究員(任期有)

研究者番号：70612315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：接着培養細胞の細胞表面は複雑な形状を有しているが、一般的な人工球体膜のリポソームは球体である。そこで、リポソームの形状を非球体にすることで、形状の面で細胞に近づけることを目的とした。マイクロ加工技術で、1辺10 μ mの立方体の人工細胞骨格の作製に成功した。そして、その人工細胞骨格の面にリン脂質膜を形成させ非球体リポソームを作製した。蛍光色素のカルセインが非球体リポソームに封入されたことから、全ての面において脂質膜が形成されたことが証明された。さらに、リン脂質2重膜に再構成されるとナノポアを形成しリポソーム内外の物質を輸送するヘモリシンの機能を非球体リポソーム膜上で観察した。

研究成果の概要(英文)：I developed a cell-sized non-spherical liposome formation using three-dimensional micro structures to emulate a surface structure of cultured cells. I fabricated a micro-cubic frame based on a stackable photoresist processed using two photon laser writing. Next, I formed lipid membranes on the faces of the micro-cubic frame structures into microfluidic devices. Moreover, to confirm the formation of the lipid bilayer membranes on the faces of the micro-cubic frame structures, nanopore-forming membrane proteins were reconstituted into the non-spherical liposomes. I observed the diffusion of fluorescent molecules through the nanopore-forming membrane proteins.

研究分野：生体関連化学、生物物理学

キーワード：リポソーム 細胞模倣膜 人工細胞モデル マイクロデバイス 非球体リポソーム

1. 研究開始当初の背景

接着細胞の細胞表面は、複雑な曲率を有しており、膜タンパク質の機能や小胞輸送等に重要な役割を果たしている。細胞膜の主成分のリン脂質から構成されリン脂質二重膜を形成している球状の人工細胞膜リポソームは、ドラッグデリバリーシステムの担体等に応用使用されている。ドラッグデリバリーシステムに用いられるリポソームは、直径約100-300 nmのリポソームである。また、直径約10 μm の細胞サイズのリポソームも作製可能である。このような大きさのリポソームは容易に光学顕微鏡により観察が可能であるため、細胞サイズリポソームは、リン脂質二重膜の生物物理的特性の観察、膜タンパク質の機能観察やバイオリアクタの作製といった人工細胞モデルとして利用されている。細胞サイズのリポソーム作製法で古典的であるが最も用いられている方法に、静置水和方法やエレクトロフォーメーション法がある。静置水和方法は、クロロホルムに溶解したリン脂質をアルゴンガス気流下で乾燥させ、リン脂質フィルムを形成させる。そして、このリン脂質フィルムに緩衝溶液を加え静置することによって、自己組織的リポソームが形成される。エレクトロフォーメーション法は基本的には静置水和方法と同じであるが、緩衝溶液を加え、交流電場を与えることにより、リポソーム形成を促進させる。

近年、より細胞を模倣したリポソームを作製する目的として、マイクロ流体デバイスによるリポソーム作製が国内外で多くの研究者によって開発されている。マイクロ流体デバイス内でリポソームを作製することで、リポソーム内への生体分子の効率的な封入や真核細胞のようなリン脂質非対称膜(リン脂質2重膜の内膜と外膜で異なったリン脂質組成で形成された膜)の作製に成功している。例えば、デバイス内で異なったリン脂質から構成される液滴を接触させることにより、平面リン脂質非対称膜が形成される。そして、この平面非対称膜にジェット水流を印加するとことにより、脂質チューブが形成され、チューブが分裂することで、リン脂質非対称膜をもった球体リポソームが形成される。このような細胞を模倣したリポソームは、様々な生命現象を理解するうえで、大変有用であると考えられている。

2. 研究の目的

接着細胞の細胞膜は、複雑な曲率を有しているに対して、人工細胞膜のリポソームは通常エネルギー的に最安定な球形である。細胞膜上の曲率の違いによって膜タンパク質の機能に違いが生じることが報告されており、脂質膜の曲率は、細胞の生命活動に重要な役割を果たしているといえる。細胞骨格のアクチンをリポソーム内に封入したり、リポソームに電場をかけたりすることにより、球形リポソームを変形させる研究が行われてきた。

しかし、これらの方法では同一の変形を再現することは困難である。したがって、定量的なデータを得るようなリポソームの変形の制御は困難である。

そこで、微細加工技術を導入することにより、同一形状の非球体リポソームの作製を試みる。このような微細加工技術により、最終的には接着細胞のような複雑な形状を模倣した非球体リポソームが作製する。そして、“より”細胞を模倣した人工細胞の作製が可能になる。

3. 研究の方法

3. 1. 多光子リソグラフィによるマイクロサイズの構造物の作製

1辺10 μm の立方体の骨格を設計し、多光子リソグラフィ装置にて、ガラス基板上に1辺10 μm の立方体の骨格を持つ構造物を作製する。これを人工細胞骨格と呼ぶ。ガラス基板上に立方体の面が接している構造物と、ガラス基板上に立方体の頂点が接している構造物の2種類を作製した。

3. 2. 立方体の構造物の面へのリン脂質形成

ガラス基板上に形成した人工細胞骨格をPolydimethylsiloxane (PDMS)流路に組込んだ。まず、緩衝溶液でマイクロ流路中を満たした。つぎに、マイクロ流路中に、有機溶媒にリン脂質を溶解した溶液を満たした。最後に、衝溶液でマイクロ流路中を満たした。このような操作によって、マイクロサイズの人工細胞骨格の面にリン脂質2重膜を形成させた。溶液の送流はマイクロシリンジポンプを用いた。そして、非球体リポソームを光学顕微鏡で観察した。蛍光分子のカルセインを非球体リポソームに封入される場合は、始めの緩衝溶液にカルセインを加えた。

3. 3. ナノポアをもちいたリン脂質2重膜の形成確認

蛍光分子のカルセインを封入した非球体リポソームを作製した。この非球体リポソームの外側から、リン脂質2重膜上で7量体によりナノポアを形成する α ヘモリシンを加えた。そして、 α ヘモリシンによるカルセインの非球体リポソーム外への流出を顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

4. 1. 立方体の構造物の面へのリン脂質2重膜の形成

多光子リソグラフィによって、ガラス基板上に再現性良く1辺10 μm の立方体の骨格を形成することに成功した(図1上段)。立方体の辺の太さは、約2 μm であった。

マイクロ流路中で人工細胞骨格にリン脂質2重膜を形成させた後に、非球体リポソームの形成を顕微鏡にて確認した。人工細胞骨格の面にリン脂質膜が形成されていること

が確認された。共焦点レーザー顕微鏡にて詳細に非球体リポソームを観察した。蛍光分子のカルセインの蛍光が非球体リポソーム内で観察されたことから、すべての面でリン脂質が形成されていることがわかった(図1下段)。立方体の頂点がガラス面に接した立方体の人工細胞骨格で形成された非球体リポソームを共焦点顕微鏡により3次元画像を撮影した。その結果、非球体リポソームの下部に、非球体リポソーム形成時に使用したリン脂質が残留していることがわかった。リン脂質を溶解した有機溶媒を変更するなどの条件検討が必要である。

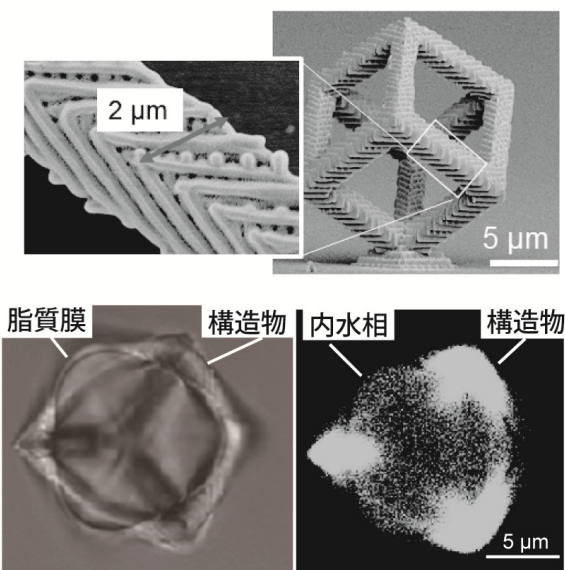


図 1. 多光子リソグラフィによるマイクロサイズ構造物の走査型電子顕微鏡像(上段)。非球体リポソームの顕微鏡像(下段)。明視野像では、構造物の面にあたる部分にリン脂質膜が観察された(下段左)。蛍光顕微鏡では水溶性の蛍光色素カルセインの封入が観察された(下段右)。

4. 2. ナノポアを用いたリン脂質 2 重膜の形成確認

α ヘモリシンは、リン脂質 2 重膜内で 7 量体を形成し、直径約 1.5 nm のナノポアを形成し、少分子を透過させることができる。そこで、蛍光分子のカルセインを封入した非球体リポソームを作製した。そして、この非球体リポソームの外側から、 α ヘモリシンを添加することにより、 α ヘモリシンを介したカルセインの非球体リポソームの内側から外側への透過を顕微鏡による経時観察を行った(図2)。その結果、 α ヘモリシンを添加した非球体リポソーム内に存在するカルセインの蛍光輝度は時間が経つほど低下した。これは、 α ヘモリシンを介した物質透過であると考えられる。したがって、この非球体リポソームは、リン脂質 2 重膜が形成されていることがわかった。

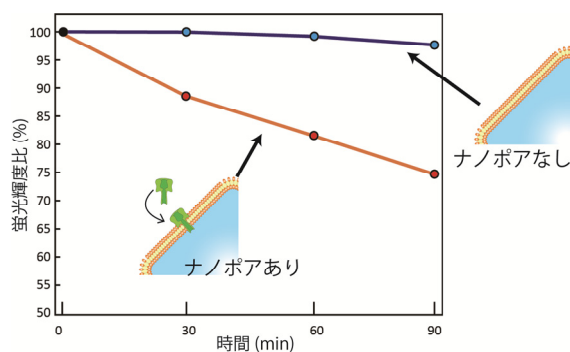


図 2. 非球体リポソームのリン脂質 2 重膜形成の確認。 α ヘモリシン非球体リポソームの外側から添加すると、非球体リポソーム内部のカルセインの蛍光が低下した。

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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 神谷厚輝、大崎寿久、藤井聡志、三澤宣雄、竹内昌治、マイクロデバイスを用いたリポソーム作製、**第1回分子ロボティクス年次大会(併催・分子ロボット倫理シンポジウム)**、March 6, 2018.
- ② 五反田真秀、神谷厚輝、井上晃佑、大崎寿久、藤井聡志、三澤宣雄、三木則尚、竹内昌治、多光子リソグラフィによって作製されたマイクロサイズ人工細胞骨格によるリポソーム変形、**第8回マイクロ・ナノ工学シンポジウム**、November 2, 2017.
- ③ 神谷厚輝、井上晃佑、大崎寿久、三木則尚、竹内昌治、細胞形状の模倣を目的とした非球体リポソーム作製、「**細胞を創る**」研究会 10.0, October 19, 2017.
- ④ 井上晃佑、神谷厚輝、大崎寿久、三木則尚、竹内昌治、マイクロサイズの人工物を用いた非球体リポソームの作製、**日本化学会第97春季年会**、March 17, 2017.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
神奈川県立産業技術総合研究所 人工細胞膜システムグループ

https://www.kanagawa-iri.jp/r_and_d/project_res/lab_intro/takeuchi_project/

東京大学 生産技術研究所
竹内昌治研究室
<http://www.hybrid.iis.u-tokyo.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神谷 厚輝 (KAMIYA Koki)

神奈川県立産業技術総合研究所
人工細胞膜システムグループ

研究者番号：70612315