

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：32641

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26289038

研究課題名(和文)人工細胞膜を用いた極微小バイオ溶液ハンドリング技術の展開

研究課題名(英文) Application of minute biofluid handling techniques using an artificial cell membrane

研究代表者

鈴木 宏明 (Suzuki, Hiroaki)

中央大学・理工学部・教授

研究者番号：20372427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ジャイアントリポソーム(GUV)の溶液添加・混合・分割といった連続操作、それを用いた逐次反応が可能な超微細生化学実験基盤技術を確立することを目指した。GUVの融合方法として、実績のある電気融合法に加え、細胞融合で用いられるPEG融合法も検討したところ、GUVと生細胞を効率的に融合する条件を確立した。GUVの分割方法として、申請者らが発見した高分子の排除体積効果によるGUV分裂変形に加え、界面活性剤様の分子の添加による分裂も総合的に検討した。最終的に、3種類の生化学反応(酵素反応、ゲノム増幅反応、およびRT-PCR)をGUV内で試し、これらの反応の逐次的操作が可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：We aimed to establish an ultra-small biochemical assay platform using giant liposomes as a femtoliter-volume reactor, which enables addition, mixing, and aliquoting. As a means of GUV fusion, we studied PEG-mediated fusion method in addition to the well-established GUV electrofusion method, and found that PEG-fusion is more suitable for fusing GUV and the live cell membrane. For aliquoting, we thoroughly studied the effect of depletion-volume effect and addition of mono-acyl lipids. Finally we demonstrated the three distinct biochemical reactions in GUVs; (1) an enzyme reaction, (2) the whole-genome amplification, and (3) the reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) to show that the sequential handling of these reagents is possible.

研究分野：バイオ流体力学

キーワード：バイオリクター リポソーム 膜融合 膜分裂 ゲノム増幅 PCR

1. 研究開始当初の背景

マイクロサイズの液滴やマイクロチャンバーといった微細な化学・生化学反応容器の技術は、1細胞レベルの遺伝子発現解析やそのばらつき(細胞の個性)の計測といった生命科学の新しいフロンティア開拓の推進力となった。マイクロ流体技術の黎明期では、細胞や反応液を微細な空間に閉じ込めてそのダイナミクスを観察するという静的なものであったが、近年では巧妙なマイクロデバイスを駆使して液滴を動的に操作し、溶液の添加や分注(分割)といった、生化学実験者が研究室のベンチで行う標準操作がマイクロスケールで実現可能となった[Huebner et al., *Lab Chip*, 2008]。これらの研究では主に油中水滴を用いているが、油/水の界面張力が大きい(1~50 mN/m程度)という制限から、通常は直径で数百~数十 μm (体積でnL~ μL)の液滴が制御可能な範囲であった。これは動物細胞(真核細胞)と同程度の大きさであり1細胞検査技術には適用可能であるが、バクテリアや細胞内小器官、また生体の超分子複合体といった1 μm 程度またはそれ以下の対象を扱うには大きすぎる。直径をさらに1桁(体積で3桁)下げて、数マイクロメートル(フェムトリットル)のスケールでの溶液操作が可能になれば、上記の対象をターゲットとした生命科学の新展開が期待される。

当研究グループは、細胞膜の成分である脂質二重膜から成るリポソームの研究を継続して行ってきた。これも油中水滴と同様に溶液を内封できるカプセルであり、その大きさは直径10 nm~100 μm まで幅広く調整可能である。脂質膜の曲げ弾性係数は $10k_B T$ 程度であり、熱揺らぎを少し超える程度のエネルギー入力で多様な変形を示す。従って、リポソームを反応容器として溶液の添加や分割を行うことで、世界最小のフェムトリットル溶液操作系が実現する。これまでの成果では、電気刺激を用いてリポソームを融合させ、さらに高分子の排除体積効果により溶液体積を分割可能なことを示した[Terasawa et al., *PNAS*, 2012] (図1)。さらに、平成24-25年度に科研費若手研究(B)の助成を受け、光ピンセットを用いて任意のリポソームを選択し

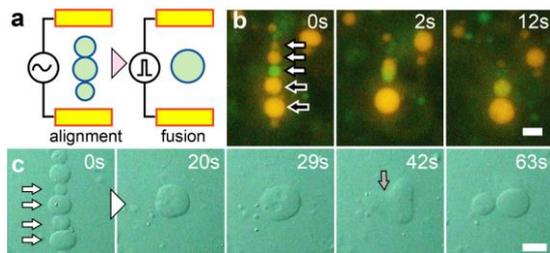


図1. 人工細胞膜(リポソーム)の融合・分裂変化。(a)電気融合法の模式図。交流電場を与えることでリポソームが整列し、パルス電圧を与えると融合する。(b)リポソーム融合の様子。内封した色素が混合している。(c)リポソームの自発的分裂。高分子の排除体積効果による。スケールは10 μm 。

て融合・分裂操作を行えること、また、温度制御により分裂効率を上げられることを示した[Shiomi et al., *PLoS One*, 2014]。以上が研究開始時までに達成した成果であったが、応用に向けてリポソーム調整時における内封容積の制御や、液滴分割後の体積比率の制御が課題として残っていた。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに開発した技術を改良・発展させ、フェムトリットル体積の溶液添加→混合→分割といった連続操作、それを用いた逐次反応が可能な超微細生化学実験基盤技術を確立することを目指した(図2)。

リポソームの融合方法としては、これまでに実績のある電気融合法に加え、細胞融合で用いられるポリエチレングリコール(PEG)融合法も検討した。リポソームを分割するには、申請者らが発見した高分子の排除体積効果によるリポソーム分裂変形に加え、界面活性剤様の分子の添加による分裂も検討した。

また、上記システムをエンジニアリングとしてより再現性の高い系とするため、インクジェットノズルを使った均一かつスケールブルなリポソーム形成方法を開発し、かつリポソーム内部に弱く架橋したゲルを用いることで、フェムトリットルの溶液体積が厳密に制御して添加・反応・分割を実現する技術を開発することを目指した。

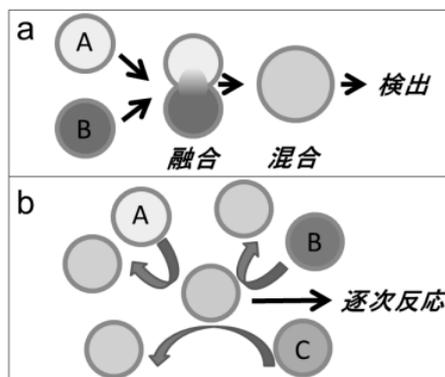


図2 (a)リポソームを用いた従来の化学反応系。一度の混合操作に限られる。(b)本提案で構築する反応系。リポソームの融合と分裂を自在に制御し、逐次反応が可能になる。

3. 研究の方法

本研究で設定した3つの主要目標に対する実験的アプローチを以下に述べる。

(1) 均一・均質リポソーム形成法

ピエゾ駆動のインクジェットノズルを用い、均一かつサイズ制御可能(数~数百フェムトリットル)な細胞モデルとしてのリポソーム形成方法を検討した。具体的には、クラスターテクノロジー社のパルスインジェクター装置を用いて大きさ数十マイクロメー

トルの液滴（水滴）をオイル中に注入し、油中水滴エマルジョンとした。油中にはリポソーム膜の材料となるリン脂質が 1~5 mg/ml の濃度で溶解しており、これにより液滴が安定化される。油層の下にはリポソームの外液となる水溶液を設置してある。重力により油水界面まで沈降した液滴が、この界面を通過する際に、さらにリン脂質の単層膜で包まれて、リポソームが形成されるという方式を検討した(図 3)。この方法では、テンプレートとしての油中液滴がインクジェットで形成されるため、均一・均質なりポソームが形成されると予想した。

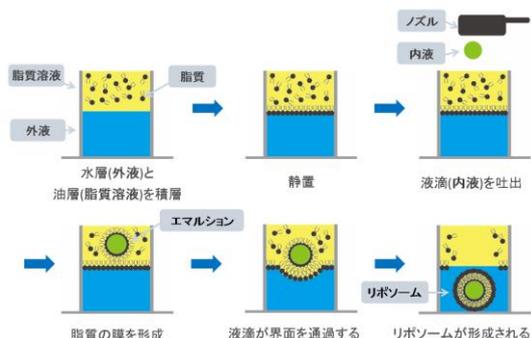


図 3 インクジェット界面通過法を用いた均一・均質リポソーム作製法。

(2) リポソームの融合法・分裂法の最適化

図 2 に示したマイクロ逐次反応系は、膜融合による内封水溶液の混合と、膜分裂による内封水溶液の分割に依存している。

膜融合は、当グループで以前より利用していた電気パルスを用いた方法の最適化に加え、ハイブリドーマ作製等における細胞融合で使われる PEG 融合法も検討した。また、膜分裂については、これも当グループで以前より使用していた、高分子の排除体積効果による分裂様変形の条件最適化に加え、生体由来の界面活性剤様分子である lysoPC (アシル鎖が 1 本で水溶性の高いリン脂質) を用いた分裂変形も検討した。

(3) リポソーム溶液操作系における様々な生化学反応試験

リポソームは細胞や細胞内小器官など生物が使う万能な区画界面であるため、ほとんどの生化学反応を内部に許容できるはずである。この系の有用性を示すため、単純な①酵素反応に加え、近年急速に発展した次世代 DNA シーケンサの前処理に使われる②ゲノム増幅反応、および細胞のタンパク質発現解析に利用される③逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を試した。特に、③は①と②と違って PCR 時に急激な温度変化サイクルが必要であるため、リポソームの安定性に問題が生じないかが懸念であった。PCR は近代のバイオテクノロジーにおいて広範に利用される必須技術であるが、リポソームがこの温度サイクルに耐えることができれば、提案シ

ステムの利用範囲が格段に広がると期待される。また、提案の逐次反応の実証試験として、②のゲノム増幅反応に対する反応基質供給を試した。

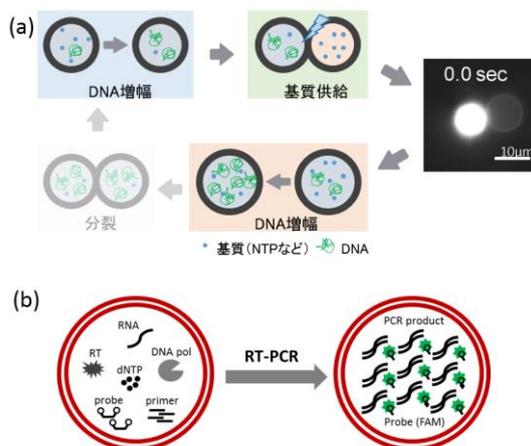


図 4 (a) GUV 内における、 $\phi 29$ DNA ポリメラーゼによるゲノム DNA 増幅反応。(b) mRNA を検出するためのリポソーム内 RT-PCR 反応。

4. 研究成果

(1) 均一・均質リポソーム形成法

結論から述べると、本研究提案の中でこの項目(1)に関しては、当初想定した目標を達成することができなかった。しかし、他研究グループのごく最近の論文によれば実現の目処が付いてきており、これらの研究を参考に、当グループにおいてもより実用化に対して簡便な方法の開発を継続する。

以下に、研究の経過を述べる。まず、インクジェットノズルを用い、リポソームの内部水溶液となる水溶液（内液）を脂質が溶解したオイル相に射出したところ、オイルの種類と温度に応じて、内液の液滴が気/油界面を通過して沈降する条件がわかった。すなわち、オイルとして低粘度のスクアレンをを用い、かつ溶液全体を 60°C 以上に加熱することで、気/油界面にトラップされていた液滴（図 5a）が界面を通過する（図 5b）ことを明らかにした。次に、この均一油中液滴を別の油/水界面に積層し、それが重力により自発的に通過する条件を検討したところ、時折リポソームに変換される場合があるものの、非常に再現性が低かった。

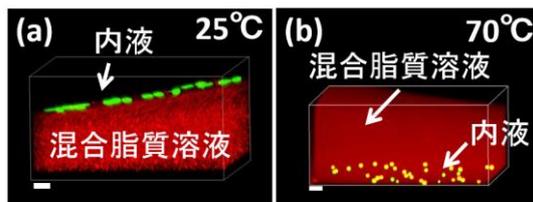


図 5 (a)内液組成のマイクロ液滴が気/油界面にトラップされる条件。(b)通過する条件。レーザー共焦点顕微鏡で取得したスタック像より三次元イメージを再構成。スケールは 100 μm 。

液滴が液／液界面を通過するダイナミクスは、気体・水・油が接する三重点における界面エネルギーのバランスで決まる。現在、このバランスを考慮したモデルを構築し、検証実験を行っている最中である。

(2) リポソームの融合法・分裂法の最適化

リポソームの分裂を促すには、高分子の排除体積効果を用いた膜の分裂用変形を利用した。詳細なメカニズムの記載は、鈴木らが執筆した論文および書籍にゆずるが、この効果は、化学的な性質に依存しない物理的な束一的性質に由来するものであり、一般性が高い(図6)。

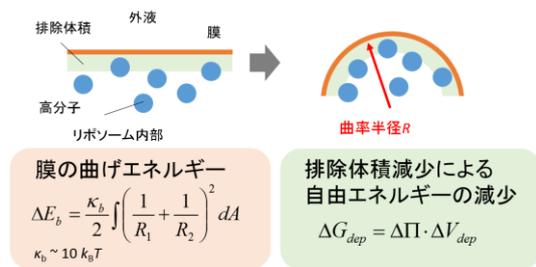


図6 リポソーム内のみ高分子が存在する場合に、排除体積効果により膜に正の曲率が生じるメカニズム。 $\Delta E_b < \Delta G_{dep}$ のときに膜の分裂様変形が起こる。

これまででは、限定された高分子分子量および濃度範囲でのみの検討を行っていたため、本研究において、高分子としてのポリエチレングリコール(PEG)の分子量が400, 6k, 20k, 濃度範囲は0~12%の広い範囲において網羅的にその効果を検証した。

その結果、PEG 6kでは濃度2%あたりで分裂様変形からチューブや小バディング形成に遷移すること、また、PEG 20kでは全ての濃度域でチューブや小バディングといった局所的な膜変形のみを呈することが明らかになった。また、PEG 400ではPEG 6kや20kと同程度の重量濃度においても、膜変形に対する影響がほとんどなかった(図7, 8)。これは、膜変形に対して高分子の分子量依存性が大きいという、排除体積効果の仮説に完全に一致した。

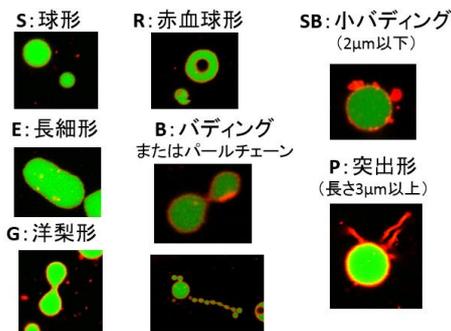


図7 高分子の排除体積効果により生じる様々な膜形状とその分類。

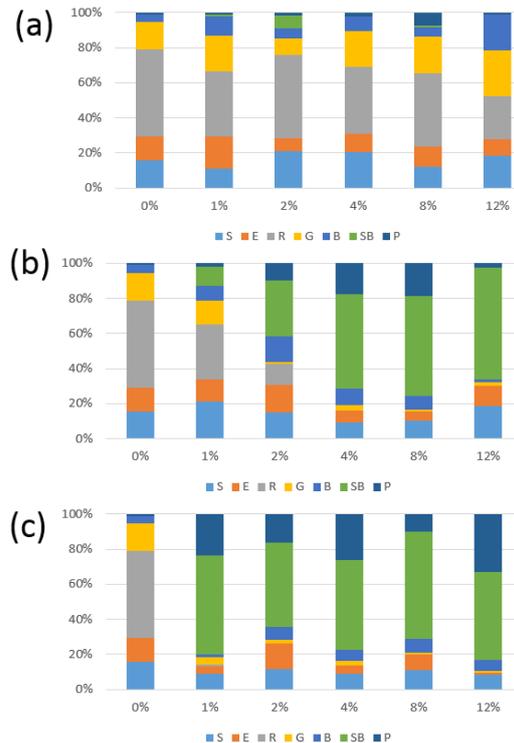


図8 高浸透圧条件によるジャイアントリポソームの収縮に伴うリポソーム変形形態の分布。(a) PEG400, (b) PEG6k, (c) PEG20k. 数字(%)はこれらの高分子の重量%濃度。S~Pの記号は図7の形状に対応。

また、これらの変形モードが脂質膜の弾性変形エネルギーと配乗体積効果の自由エネルギーのバランスで生じることを理論的に考察し、現在論文を執筆中である。

もうひとつの膜分裂方法として、一本鎖アシル脂質(lysoPC)の添加を試した。その結果、溶液中に数mMのlysoPCを添加するだけで、球形のリポソーム膜が大きく変形し、効率的に膜分裂をすることが明らかになった(図9)。従来の報告では、あらかじめ収縮変形させたリポソームにμMのlysoPCを加えることで、くびれの形成が進行して分裂することが示されていたが、より濃いmMのlysoPCを加えると、球形のものも収縮し、分裂することを明らかにした。内部に封入した反応との適合性は未検証であるが、リポソーム体積の人為的操作の可能性の幅を広げた。

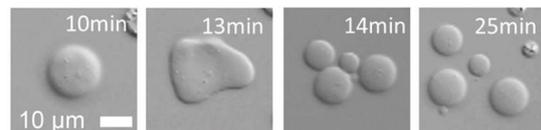


図9 lysoPC添加によるGUVの変形と分裂。

最後に、リポソーム(人工膜)同士の融合法として、これまで電気融合法を用いて高効率(少なくとも50%以上)の融合効率を達成していたが、用途によっては、リポソーム反応器から生細胞に物質を輸送したり、または生細胞内の物質を回収したり、といった操作が

必要になり得る。哺乳類細胞と GUV の電気融合は野村らのグループが報告しているものの(Saito et al., *PLoS One*, 2014), それ以外の報告例は少なかった。私たちが GUV とヒト細胞 (Jurkat 細胞および HeLa 細胞) の電気融合を試したところ, GUV 同士でみられるような膜の大変形はなく, 部分的に膜融合する様子が見られた。ハイブリドーマ作製などでよく使われるポリエチレングリコール添加による融合を試したところ, リポソーム内のみ封入した蛍光色素 (カルセイン) が細胞内に効率的に移動する様子が見られ, 効率的な膜融合が誘起されることが明らかとなった (図 10)。人工脂質膜とは異なり, 生細胞の表面にはさまざまなタンパク質や糖鎖が存在しており, 水和や排除体積効果により融合前に膜同士が分子レベルで接近することが大きく妨げられると考える。リポソームを使った溶液操作系は, 細胞の内封物や膜局在成分の操作に応用する際にその効力を最大限に発揮すると考えており, 今後, 物理化学的に定義された理解が必須である。

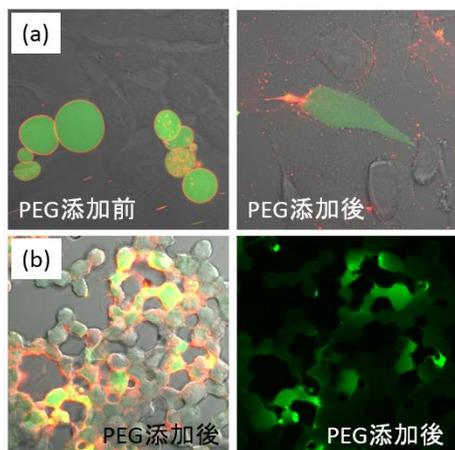


図 10 PEG 法を用いたヒト細胞と GUV の膜融合. (a) 基板上に生育した HeLa 細胞と GUV の PEG 融合. (b) Jurkat 細胞と GUV の PEG 融合. どちらも, 赤で染色したリポソームの膜成分が細胞膜に移動し, かつリポソームに内封した緑色色素が細胞質に移動している様子がわかる。

(3) リポソーム溶液操作系における様々な生化学反応試験

方法の項目で述べたように, ①単純な酵素反応, ② ϕ 29DNA ポリメラーゼによるゲノム増幅反応, および③逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)の 3 種類を試した。

①では, β ガラクトシダーゼ(GAL, 10U/ml) およびその蛍光源基質である PFB-FDG(150 μ M)をそれぞれ封入した GUV を作製し, 光ピンセットで操作して電気融合を行った。その結果, 1 回目の融合により基質が枯渇したリポソームに新しい基質を含むリポソームを融合させると, 加水分解反応がさらに進行することが蛍光観察により確認できた (図 11)。これにより, 図 2(b)に示した逐次的反応

が可能であることを示した。次に, ゲノム DNA を 30°C の等温で増幅する反応(Multiple displacement whole genome amplification)を行うために, ϕ 29DNA ポリメラーゼおよび DNA 合成の基質である dNTP をそれぞれ含むリポソーム集団を作製し, 図 11 と同様に光ピンセットを用いて隣接させ, 電気融合を行った (図 4a)。これも, 酵素反応と同様に, DNA 量の増加を示す緑色蛍光の増加が確認された (図 12)。これは, 細胞内で DNA がされる状況を人工的に模擬したものだといえる。さらに逐次的に基質(dNTP)を含むリポソームを追加で融合させると, それ以上の蛍光輝度の増加が見られなかった。しかし, 最近の実験結果より, この結果は逐次反応が進行していないことを示しているのではなく, DNA 濃度のインジケータ(SYBR Green I)の非線形性に由来しており, 高濃度の DNA 濃度を正しく検出できていないという事実が判明しつつあり, 今後その問題を詰めていく。

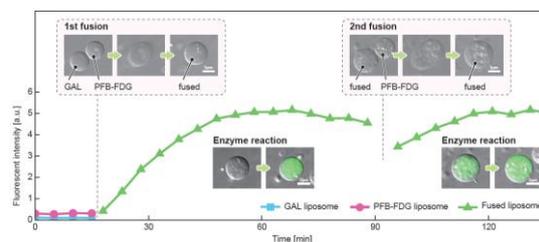


図 11 リポソームの電気融合による逐次的酵素反応。

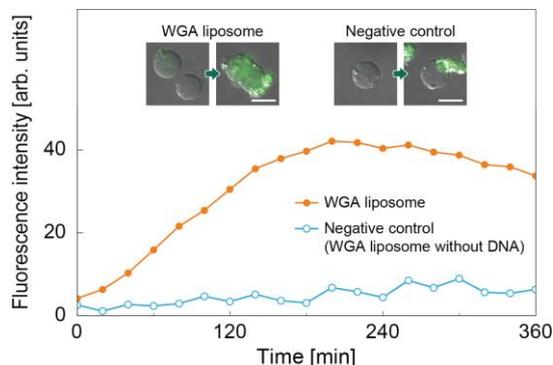


図 12 リポソーム融合によるゲノム増幅反応の誘導。

最後に, 図 4b に示したリポソーム内 RT-PCR 反応を行った。未発表データであるため詳細の記載および図の掲載は控えるが, 1 ステップリアルタイム RT-PCR キットとヒト培養細胞由来の totalRNA を共封入したリポソームを作製し, 20 または 40 サイクルの PCR 反応を行ったところ, その内部で標的とした mRNA 由来の DNA 増幅が確認された。これにより, リポソームがバイオテクノロジーで用いられる広範な反応に応用できることが示された。

以上の結果より, 動的な生体模擬バイオリアクターとしての GUV 利用の可能性を広げ, その基礎的な技術ベースを確立した。

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5件) 全て査読有り

- ① K. Nishimura, T. Matsuura, T. Sunami, S. Tsuru, H. Suzuki, T. Yomo, *ACS Synthetic Biology*, 4, 566-576, 2015.
- ② S. Tsuda, S. Fujii, H. Suzuki, T. Yomo, *PLoS One*, 10, e0132963, 2015.
DOI: 10.1371/journal.pone.0132963
- ③ S. Tsuda, H. Suzuki, T. Yomo, *Soft Matter*, 10, 6038-6046, 2014.
DOI: 10.1039/C4SM00992D
- ④ H. Shiomi, S. Tsuda, H. Suzuki, T. Yomo, *Plos One*, 9(7): e101820, 2014.
DOI: 10.1371/journal.pone.0101820
- ⑤ K. Nishimura, T. Matsuura, T. Sunami, S. Fujii, K. Nishimura, H. Suzuki, T. Yomo, *RSC Advances*, 4, 35224-35232, 2014.
DOI: 10.1039/C4RA05332J

[学会発表] (計11件)

- ① H. Suzuki, 1st Sino-Japan Seminar on MEMS and Biomedical Applications, Shenzhen, China, Mar. 20, 2017. (招待講演)
- ② 鈴木宏明, 第6回生体界面研究会, 金沢, 2017年2月9-10日. (招待講演)
- ③ 鈴木宏明, 東京理科大学イメージングフロンティアセンターシンポジウム, 千葉, 2016年12月10日. (招待講演)
- ④ 鈴木宏明, 日本表面化学会関東支部第5回セミナー, 東京, 2016年11月26日. (招待講演)
- ⑤ 岡野太治, 鈴木宏明, 第33回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 長崎, 2016年10月24-26日.
- ⑥ 勝田翔太, 岡野太治, 鈴木宏明, 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第34回研究会, 千葉, 2016年9月6-7日.
- ⑦ 鈴木宏明, 第5回生体界面研究会, 愛知, 2016年7月4-5日. (招待講演)
- ⑧ 鈴木宏明, 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第33回研究会, 東京, 2016年4月25-26日.
- ⑨ K. Takahashi, T. Okano, H. Suzuki, *μTAS* 2015, Gyeongju, Korea, Oct. 25-29, 2015.
- ⑩ H. Suzuki, *Pacificchem* 2015, Hawaii, USA, Dec. 15-20, 2015. (招待講演)
- ⑪ 高橋和志, 岡野太治, 鈴木宏明, 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第30回研究会, 北海道, 2014年10月2-3日.

[図書] (計2件)

- ① 鈴木宏明, 「少数性生物学 (第10章 少数を分ける)」, 日本評論社, 2017. (分担執筆)
- ② 岡野太治, 鈴木宏明, 「人工細胞の創製とその応用 (2.1 人工細胞の容器として

のリポソーム)」, シーエムシー出版, 2016. (分担執筆)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 宏明 (SUZUKI, Hiroaki)
中央大学理工学部・教授
研究者番号: 20372427

(3) 連携研究者

岡野 太治 (OKANO, Taiji)
中央大学理工学部・助教
研究者番号: 60622082