

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510143

研究課題名(和文)細胞類似型マイクロ化学システムをめざした次世代人工細胞膜モデルの研究

研究課題名(英文)A Study of an Advanced Membrane Model for Cell-Mimetic Microchemical Systems

研究代表者

奥村 幸久 (OKUMURA, Yukihiisa)

信州大学・工学部・教授

研究者番号：40243042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,600,000円、(間接経費) 1,380,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内小器官に相当するサブシステムを持つ次世代細胞類似型マイクロ化学システム(次世代人工細胞)の構築に用いる膜モデルとして、内部に脂質膜ベシクルを持った巨大脂質膜ベシクル(オリゴベシキュラーベシクル, OVV)を利用する可能性について検討をおこなった。手法の改良によって、課題であったOVV形成の確実性を向上させることができた。またサブシステムの基盤となるOVV内部巨大ベシクルを複数形成することが可能となる条件について有用な知見を得た。初歩的なシステムの構築と検討をおこない、これらの結果から、次世代人工細胞の構築におけるOVV利用の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：A use of an oligovesicular vesicle as a novel advanced model of artificial cell membrane was examined. The reliability of the procedure to construct the model was improved. Formation of multiple inner vesicles that were to be the membrane foundation of inner chemical subsystems was possible.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学 マイクロ・ナノデバイス

キーワード：巨大脂質膜ベシクル 巨大リポソーム マイクロ化学システム 人工細胞膜モデル

### 1. 研究開始当初の背景

(1)自然界に存在する細胞に原理的に類似したマイクロ化学システムは、人工細胞とも呼ばれ、その構築は科学における究極の目標のひとつとされている。細胞と同様に、人工細胞はタンパク質等に相当する機能分子群と構築基盤である細胞膜に相当する人工膜とで構成される。細胞膜モデルとしては数-数十 $\mu\text{m}$ 程度の大きさを持つ脂質膜小胞(巨大ベシクル)の利用が従来から考えられている。(2)実際の生細胞の活動においてはミトコンドリアなど細胞内器官と呼ばれる種々の内部膜構造がサブシステムとして協同的に動作している。したがって、高度な人工細胞、すなわち「次世代」人工細胞を構築するには、細胞内外を区分する細胞膜のみでなく内部膜構造からなるサブシステムを持つモデルが必須であるが、これは実現されていない。(3)申請者はこれまでの巨大脂質膜ベシクルの形成と挙動に関する研究において、外部物質の影響による巨大ベシクルから OVV への形態変化誘起を見いだしていた。さらにこの現象を利用して、水溶性高分子や高分子ナノ粒子が内ベシクルの内水相のみに選択的に導入された OVV の形成を示す予備の結果を得ていた。

### 2. 研究の目的

本研究では「細胞類似型マイクロ化学システム」(人工細胞)の高度化には、細胞内小器官に相当するサブシステムを持った従来にない次世代人工細胞膜モデルの開発が必須であると考え、次世代人工細胞の構築基盤の確立を目指して、疑似細胞膜である巨大人工脂質膜小胞(巨大リポソーム)の内部に膜微小構造を持った膜モデルの構築および化学システムの組み込みを試みることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1)OVV 形成誘起条件の最適化と機構の解明。OVV 形成誘導に関するこれまでの研究から得られた予備的な結果を出発点とし、これを次世代人工細胞の構築基盤形成におけるキーププロセスとするために条件の最適化と形成機構の解明をおこなった。現時点では誘起効率が低いなどの解決すべき課題が残されていた。そこで、誘起能を持つ物質群の検索、および巨大ベシクル側の条件を検討する事で誘起条件の最適化をおこなった。同時に未だ明らかでない誘起機構に関する知見を手に入れることにより、改良への手がかりを得た。

(2)新たな OVV 形成方法の開発。

他の OVV 形成手法を試みた。例えば、小さな巨大ベシクルを共存させた状態で大きな巨大ベシクルの形成をおこない OVV を得る試み、あるいはマイクロマニピレーション装置により巨大ベシクル膜に物理的ストレスを与え OVV 形成に導く試みをおこなった(図1)。

(3)OVV の修飾・機能化方法の検討。

初歩的モデルの構築の予備段階として、タンパク質等種々の他の物質の OVV への内包を試みた。導入の評価は主に導入物を蛍光標識する事によりおこなった。さらにマイクロマニピレーション装置を利用したマイクロインジェクション(ベシクル内部への物質の直接注入)など、他のベシクル操作手法と組み合わせることによって、より多彩な修飾・機能化の可能性を追求した。

(4)サブシステムを持った次世代人工細胞の初歩的モデルの構築。

これらの新しい方法論の検証のため、OVV を基盤とした「細胞類似型マイクロ化学システム」(人工細胞)の初歩的モデルの構築を試みた。

今後の機能分子組み込みにあたっての指針を得るため、酵素など入手可能な既存の機能分子からなるシンプルな化学システムを組み込んだ初歩的なモデルの構築をおこない、その過程において本システムの問題点を明らかにした。

### 4. 研究成果

(1) OVV 形成方法の開発として、第三物質の添加による巨大ベシクルの形態変化を用いた OVV 形成に関して、形態変化誘起能を持つ物質群の検索および母ベシクルである巨大ベシクル側の状態の影響など誘起条件に関する種々の検討をおこない、ハロゲン化物イオンのイオン半径と誘起能との相関を見いだすなどの成果を得た。これらの成果は未だ明らかでないこの OVV 形成誘起現象の機構解明にあたり重要となる知見である。

(2)上記とは異なる OVV 形成方法として、マイクロマニピレーションにより巨大ベシクル膜を直接変形し OVV 形成に導く手法について検討をおこない、従来よりも確実に OVV を得ることができる条件を明らかにした。

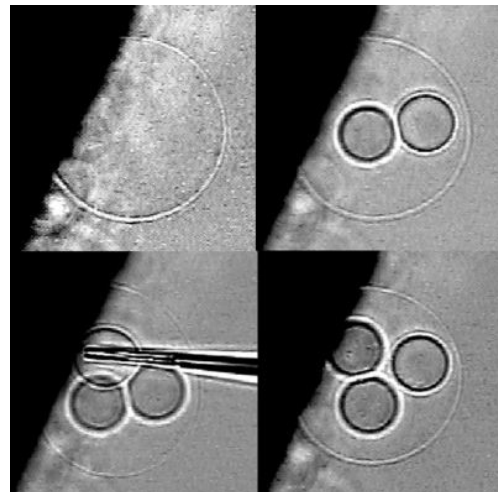


図1 脂質膜小胞に対するマイクロマニピレーションによる内部ベシクルの形成(雑誌論文 から)

特に、マイクロマニピュレーションによる OVV 形成において形成成功率が低下する原因について考察を進め、その結果に基づいて手法の改良をおこなうことによって、従来と比較して 2 倍程度の高い成功率で OVV 形成を誘起する事が可能となる条件を見いだした。これにより、マイクロマニピュレーションによる OVV 形成の有用性を高める事ができた。これは本 OVV 形成手法を次世代人工細胞モデル構築に応用するにあたり重要な成果である。

(3) エレクトロフォーメーションにより巨大ベシクルの形成を小さなベシクルを共存させた状態でおこなうことで OVV を得る手法についてその可能性を検討し、可能ではあるが現状では効率の良い OVV 形成にはさらなる改良が必要であることを示す結果を得た。

(4) エレクトロフォーメーション条件の最適化により従来よりもサイズの大きい GV の形成できることを明らかにし、卵細胞に匹敵する大きさの人工細胞を得る可能性を示した(図 2)。さらにこのようにして得た従来よりも大きな膜構造体に対する物理的マイクロマニピュレーションを利用した OVV 形成の検討をおこなった。

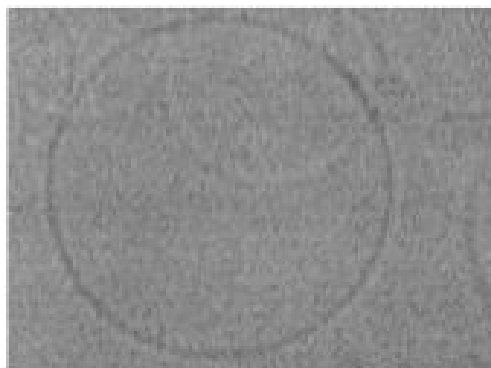


図 2 最適化した条件でエレクトロフォーメーションにより形成した直径 250 $\mu\text{m}$  の巨大ベシクル。通常条件で多く得られる巨大ベシクルよりも 5~10 倍程度大きい。(学会発表から)

(5) その他には、GV のマイクロマニピュレーションへの微小電極の利用の検討をおこない、適当な電圧を印加することにより、形成したベシクルの移動などに利用するための知見を得た。また、通常のエレクトロフォーメーションでは GV の形成の完了に 90~120 分を要するが、適当な条件下では数分以内に形成が終わる迅速形成現象を見いだしており、この現象に基づく GV 形成の効率化の可能性を探るため、迅速形成条件下における膜構造体の成長と膜融合現象との関係に関する解析などをおこなった。

(6) タンパク質等種々の物質の OVV への内包を試みその可否を明らかにした。これは、次世代人工細胞初歩的モデルの構築にあたり必要な予備的な知見である。また、巨大ベシクル系への機能分子の組み込みにあたって

の指針を得るための諸検討をおこなった。まず、シンプルな化学システムを組み込んだモデルの構築を試みるにあたり必要となる人工基質分子の設計をおこなった。さらに物質移動速度に関する検討をおこなった。これらの検討により、実際の反応系構築の試みが可能となった。マイクロ化学システムとしての挙動を解析するため、電気生理的手法の導入を検討した。内部に巨大ベシクル(GV)を保持する巨大ベシクル(オリゴベシキュラーベシクル(OVV))を用いた次世代人工細胞初歩的モデルの構築を試み、その過程で本システムの可能性と問題点とを明らかにした。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

Yukihisa Okumura, Electroformation of Giant Vesicles and Transformation to Oligovesicular Vesicles, *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, **18**, 2013, 63-79

DOI:10.1016/B978-0-12-411515-6.00003-5

Yukihisa Okumura, Satoshi Yabushita, Aya Watanabe, Immobilization of Giant Vesicles onto Hydrophobized Polymer Gel Particles, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **84**, 2011, 1144-1146

DOI:10.1246/bcsj.20110083

Yukihisa Okumura, Yuuichi Iwata, Electroformation of Giant Vesicles and Electrode Polarity, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **84**, 2011, 1147-1149

DOI:10.1246/bcsj.20110097

Yukihisa Okumura, Shuuhei Oana, Effect of Counter Electrode in Electroformation of Giant Vesicles, *Membranes*, **1**, 2011, 345-353

DOI:10.3390/membranes1040345

Yukihisa Okumura, Koji Urita, Rapid Electroformation of Giant Vesicles, *Chem. Lett.*, **40**, 2011, 530-532

DOI:10.1246/cl.2011.530

Yukihisa Okumura, Tohru Ohmiya, Toshiki Yamazaki, Formation of Oligovesicular Vesicles by Micromanipulation, *Membranes*, **1**, 2011, 265-274

DOI:10.3390/membranes1040265

Yukihisa Okumura, Yuuichi Iwata, Electroformation of Giant Vesicles on Indium Tin Oxide (ITO)-Coated Poly(ethylene terephthalate) (PET) Electrodes, *Membranes*, **1**, 2011, 109-118

DOI:10.3390/membranes1020109

Yukihisa Okumura, Takuya Sugiyama, Electroformation of Giant Vesicles on a Polymer Mesh, *Membranes*, **1**, 2011,

184-194

DOI:10.3390/membranes1030184

[学会発表](計4件)

奥村幸久, 巨大ベシクルのエレクトロフォーメーションと印加電圧の効果, 日本化学会第94春季年会(2014年3月29日, 名古屋), 3PB-046

赤津智広・奥村幸久, 巨大ベシクルの迅速なエレクトロフォーメーション, 日本化学会第93春季年会(2013年3月23日, 草津), 2PC-158

堀内駿・奥村幸久, 巨大ベシクルからオリゴベシキュラーベシクルの形成, 日本化学会第93春季年会(2013年3月23日, 草津), 2PC-159

山崎稔季・奥村幸久, 巨大ベシクルのマイクロマニピュレーションと膜の性状, 日本化学会第92春季年会(2012年3月27日, 横浜), 3PB-059

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

奥村 幸久 (OKUMURA, Yukihiisa)

信州大学・工学部・教授

研究者番号: 40243042