

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 11 日現在

機関番号：82704

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23710154

研究課題名（和文） 均一サイズ単層膜ジャイアントリポソーム形成技術に関する研究

研究課題名（英文） Formation of Size-controlled Giant Unilamellar Liposomes

研究代表者

大崎 寿久（OSAKI TOSHIHISA）

（公財）神奈川科学技術アカデミー・バイオマイクロシステムプロジェクト・研究員

研究者番号：50533650

研究成果の概要（和文）：本研究では、微細加工技術（MEMS）とエレクトロスプレー技術を組み合わせることで細胞膜の材料である脂質を基板上にマイクロメートルサイズで微細パターンニングする技術を開発した。この脂質パターンに水溶液を加えることで、再現良く、整然と配列した均一直径の単層膜ジャイアントリポソーム（人工的に作製したモデル細胞膜）を形成できることを示した。更に、これらジャイアントリポソームを誘電泳動現象を利用して操作・回収する技術についても開発を行った。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a method that allows formation of a uniform-size giant unilamellar liposome array. Microfabrication technologies and an electrospray technique enabled precise patterning of lipids on a substrate; with a simple hydration process of the lipid pattern, we succeeded in highly reproducible giant liposome array formation with a narrow range of size distribution. The formed liposomes were well suitable for model cell membrane studies. We further developed manipulation devices for the liposomes based on dielectrophoresis phenomena.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：脂質、生体材料（リポソーム）、人工細胞膜、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

創薬の標的として重要な GPCR やトランスポーターなどの膜タンパク質については、光学的観測技術の向上と共に培養細胞上での機能解析が盛んに行われている。しかしながら、細胞上では単一の膜タンパク質の機能を観測・評価することは困難であるため、近年、人工の脂質二重膜（モデル細胞膜）が注目され、用いられるようになってきている。

脂質二重膜が水相を内包した形状のリポソーム（ベシクル）は、水中において脂質分子が自己組織化により形成する構造の一つである。その球状膜において直径が数～数百

マイクロメートルのものはジャイアントリポソームと呼ばれ、上述の膜タンパク質研究や人工細胞研究に多く利用されている。

ジャイアントリポソームの形成には図 1a に示す静置水和法やエレクトロフォーメーション法が一般的に用いられてきた。どちらの手法も乾燥脂質を水和させることでリポソームを自発的に形成させるが、これらの手法では形状やサイズの整ったジャイアントリポソームを得ることはできなかった。他方、図 1b に示すように脂質分子を分散させた W/O 液滴を水相に移すことによりリポソームを得る遠沈法も開発されているが、本法で

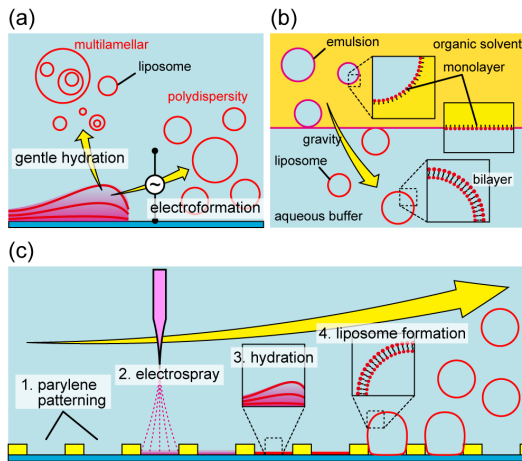


図 1 ジャイアントリポソーム形成手法 (a) 静置水合法とエレクトロフォーメーション法 (b) 遠沈法 (c) 本研究で開発した複合材料基板へのエレクトロスプレーによる脂質パターンニング法

は脂質二重膜中に有機溶媒が残存し W/O/W 液滴になってしまう問題が指摘されている。すなわち、形状・サイズの整ったジャイアントリポソームを効率よく形成することはこれまでのところ実現されていない。また、浮遊しているリポソームでは経時的な観察を行う上で課題があった。

2. 研究の目的

本研究では、形状・サイズの整ったジャイアントリポソームを効率よく形成する手法の開発を目的とした。

先行研究により、乾燥脂質を正確にパターンニングすることができれば、リポソームの形状とサイズの均一性を改善できると推察されていた。しかしながら、簡便で再現性の高い脂質の微細なパターンニングは既存の手法では実現できておらず、脂質の微細パターンニング法を新たに開発することが本研究の最重要課題となった。

3. 研究の方法

本研究で開発した手法の概要を図 1c に示す。本法の特徴は、絶縁性・導電性の複合基板構造とエレクトロスプレー法による脂質分子の塗布過程にある。

(1) 複合材料基板の作製

図 2a に基板の作製プロセスを示す。ITO ガラス上に poly(chloro-*p*-xylylene) 高分子フィルムを化学気相蒸着プロセスにより蒸着し、一般的なフォトリソグラフィプロセスを用いてフィルムにマイクロ孔を形成した。孔の直径は 5 ~ 30 μm とした。

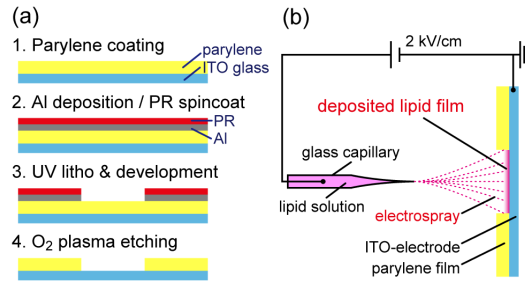


図 2 (a) 複合材料基板の作製プロセス (b) エレクトロスプレーによる脂質塗布過程の模式図

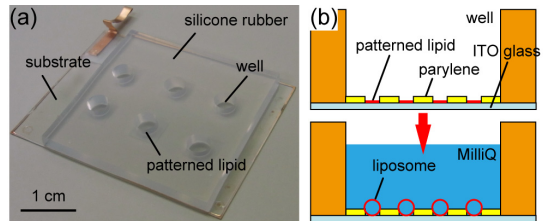


図 3 (a) 作製された基板と水和用のシリコンラバーチャンパー (b) 静置水合法の模式図

(2) 脂質のエレクトロスプレー

エレクトロスプレー法による脂質塗布の模式図を図 2b に示す。ガラスキャピラリーを先端にもつシリンジに脂質を分散したクロロホルム溶液が満たされている。このキャピラリーと複合基板との間に直流高電圧を印加することでキャピラリー先端から脂質をスプレーする。スプレーされた脂質は基板の導電性部分である ITO が露出した表面にのみ堆積し、高分子フィルムによりマスクされた部分は回避される。ここでは脂質には生体中によく見られるホスファチジルコリンを用い、スプレー条件として印加電圧 1 ~ 2 kV/cm、塗布時間 1 分を用いた。また蛍光顕微鏡による観察を行うため、脂質全量に対して 1wt% の蛍光脂質を混合した。

(3) 静置水合法によるリポソーム形成

エレクトロスプレーによりパターンニングされた脂質はデシケータ中で乾燥し、その後、図 3 に示すようなシリコンゴム製のチャンパーを設置して静置水和を行った。水和とリポソーム形成の様子は倒立型共焦点顕微鏡により行った。

4. 研究成果

(1) ドーム状リポソームの形成

図 4 に水和により形成されたジャイアントリポソームの鳥瞰図を示す。図は共焦点顕微鏡による断層像を三次元再構築することで作成した。MilliQ 水の滴下直後より脂質パターン上にドーム状のジャイアントリポソームが形成される様子が観察された。パターン

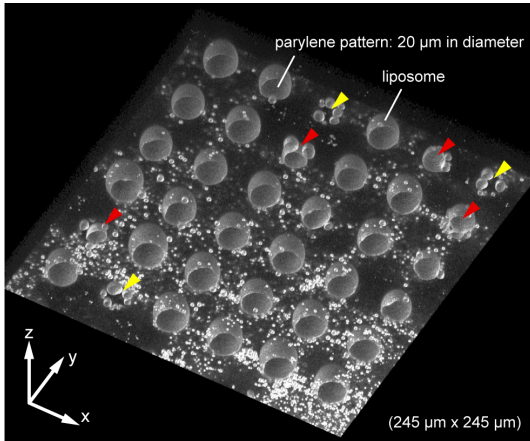


図 4 静置水和法により形成されたジャイアントリポソームアレイの鳥瞰図（共焦点断層画像を三次元に再構築し作成）6行6列のパターン上にドーム状のジャイアントリポソームが形成されている。一部にリポソームの成長が不完全であるものが見られる（図中、矢尻）

の一部では複数の比較的小さいリポソームが形成されたものなどが見られるが、それを除けばリポソームの直径は非常に整ったものであることがわかる。

(2) 脂質の選択的パターンニング

脂質パターンニングの選択性を確認するため、乾燥状態の脂質塗布基板を顕微鏡により観察した。図 5a および 5d に示すように、エレクトロスプレーにより塗布された脂質は、ITO が露出したマイクロ孔部分にのみ選択的かつ均一に存在していることがわかる。スプレー中の脂質溶液は非常に微細な霧状となって基板に向かって電位勾配により誘導され、基板上で即座に乾燥する過程をたどるため、均一な塗布が可能になったものと考えられる。

(3) ジャイアントリポソームの均一性

形成されたジャイアントリポソームのサイズ分布について、マイクロ孔直径 10 μm と 20 μm の結果を図 5 に示す。共焦点顕微鏡像より平均直径と変動係数 (CV) をそれぞれ求めたところ、図 5c, f のヒストグラムに示すように、リポソームの平均直径はマイクロ孔とほぼ一致した径となることがわかった。また変動係数はおよそ 10% となったが、通常の静置水和法などでは 50% 未満となることは非常に稀であることを考えれば、本法のリポソームの均一性が非常に高いことがわかる。マイクロ孔直径 5 μm 、30 μm についても同様に変動係数 10% 以下を達成することができた。

このように、細胞と同程度の大きさの範囲であれば、高分子フィルムのマイクロ孔パタ

ーンを調整することにより任意サイズの均一径ジャイアントリポソーム形成を実現できる。形成は最も一般的な水和法であるため簡便であり、再現性も高いことから応用的な研究への展開が可能な技術であると考えられる。

(4) 長期的なリポソームの観察

本研究で開発した均一径ジャイアントリポソーム形成法のもう一つの特徴として、リポソームがガラス基板の直上で形成される点にある。従来法では、リポソームは浮遊状態となり、追従しての長時間観察は困難であった。それに対して、本法では基板上に固定化されているため経時的な観察を行うことが容易であり、焦点深度によって補正が必要な蛍光観察における蛍光強度解析などでも煩雑な作業を行う必要がない。さらに、均一なリポソームがアレイ化されていることからサンプル数を増やして統計的な処理を行うこともできるという利点もある。本法を利用することでこれまで難しかったジャイアントリポソームを用いた観測実験が実現できるようになると期待される。

(5) ジャイアントリポソームの操作技術

リポソーム操作技術は、誘電泳動現象を利用した手法を開発した。誘電泳動は不均一な電場中において誘電体に誘起される力である。本研究では微細なガラス針表面に一对の電極を配線し、交流電場により誘電泳動現象を起こすことで、リポソームを一つずつ選択的に操作・回収することに成功した。

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 1 件)

- (1) Taiga Kodama, Toshihisa Osaki, Ryuji Kawano, Koki Kamiya, Norihisa Miki, and Shoji Takeuchi, Round-tip dielectrophoresis-based tweezers for single micro-object manipulation, Biosensors and Bioelectronics, 2013, 47, 206-212. (査読有)
DOI: 10.1016/j.bios.2013.03.022

〔学会発表〕(計 11 件)

Toshihisa Osaki, Pendant Liposome System to Access the Internal Solution, The 26th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems, 2013/1/24, Taipei, Taiwan
Taiga Kodama, Contactless Catch-and-Release System for Giant Liposomes Based on Negative Dielectrophoresis,

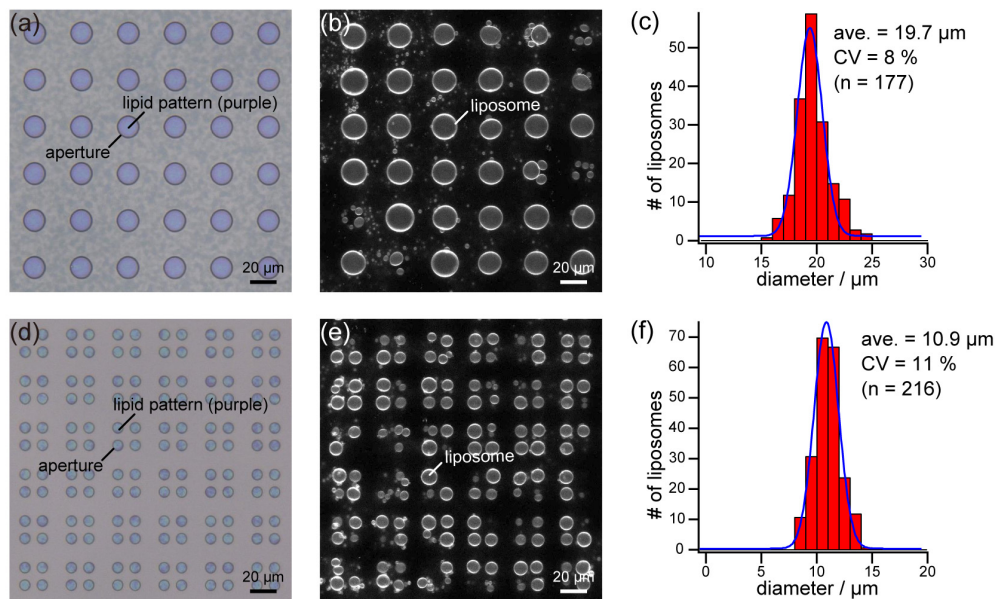


図 5 (a) エレクトロスプレー後の乾燥脂質の顕微鏡写真（パターン径 20 μm ）と (b) 静置水和法により形成されたジャイアントリポソームの蛍光顕微鏡写真、および (c) そのサイズ分布。図中に平均直径と変動係数を示す。(d) パターン径 10 μm の場合の顕微鏡写真、(e) 蛍光顕微鏡写真と (f) サイズ分布。

The 26th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems, 2013/1/23, Taipei, Taiwan
 Toshihisa Osaki, Artificial Cellular Membrane Microchip for Membrane Protein Analysis, The 10th International Conference on Nano-Molecular Electronics, 2012/12/12, 兵庫（招待講演）
 Taiga Kodama, Smooth-tip Dielectrophoresis Based Tweezers for Single Liposome Handling, The 16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 2012/10/30, 沖縄
 Toshihisa Osaki, Uniform Size Liposome on a Chip: Observation of Transport Kinetics through Nanopore Membrane Protein, The 16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 2012/10/29, 沖縄
 大崎寿久、静置水和法による均一径リポソームアレイ、第 50 回日本生物物理学会年会、2012/9/24、名古屋
 大崎寿久、静置水和法により形成した均一径リポソームアレイ応用技術、日本膜学会第 34 年会、2012/5/8、東京
 Toshihisa Osaki, Towards Artificial Cell Array System: Encapsulation and Hydration Technologies Integrated in Liposome Array, The 25th International Conference on Micro Electro Mechanical

Systems, 2012/1/31, Paris, France
 Taiga Kodama, Dielectrophoresis-Based Tweezers for Cell-Sized Liposome Manipulation, The 25th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems, 2012/1/31, Paris, France
 Toshihisa Osaki, Selective Lipid-Patterning for Heterologous Giant Liposome Array, The 15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 2011/10/4, Seattle, USA
 大崎寿久、水和法を用いた均一径リポソームの形成、日本膜学会第 33 年会、2011/5/13、東京

〔その他〕

ホームページ等

http://www.newkast.or.jp/innovation/labot/akeuchi_project.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大崎 寿久 (OSAKI TOSHIHISA)
 神奈川科学技術アカデミー・バイオマイクロシステムプロジェクト・研究員
 研究者番号：50533650