

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：32641

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710116

研究課題名(和文) リポソームを利用した極微量溶液操作系の構築

研究課題名(英文) Extremely small reagent handling system utilizing liposomes

研究代表者

鈴木 宏明 (Suzuki, Hiroaki)

中央大学・理工学部・准教授

研究者番号：20372427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、リン脂質二重膜小胞(リポソーム)を化学・生化学反応溶液の操作単位として、その融合と分裂によってフェムトリットルの溶液操作を実現することを目的とした。マイクロ流路と光ピンセットを併用し、顕微鏡下で特定のリポソームペアを電気融合させ、溶液混合を行った。また、融合したリポソームが排除堆積効果により分裂様の変形を起こし、内部の微量溶液が分割され、かつ温度を変化させると分割後のリポソームが完全に分離することを確認した。以上の実験結果により、効率に課題が残るものの、当初の計画通りにフェムトリットル(直径10マイクロメートル以下)の溶液操作技術基盤を確立することに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this project we used giant unilamellar vesicles (liposomes) as a unit biochemical reactor with the volume of femtoliter for realizing minute chemical handling system. In particular we utilized the microfluidic channel and the optical tweezers to select and align a pair of liposomes in interest. Application of electric signal induced liposome fusion to mix the internal reagents, triggering the chemical reaction. Followingly the fused liposome transformed into the budded shape, separating the reaction products. Additionally lowering the ambient temperature induced the complete fission of the budded daughter vesicles. All these features materialize the chemical handling system in the femtoliter volume, which had been unattained with the previous technologies.

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, ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：リポソーム フェムトリットル 溶液操作

### 1. 研究開始当初の背景

フェムトリットルまたはそれ以下の極微量反応溶液操作技術は、ナノスケールの生化学反応容器[Chiu et al., *Science*, 1999]や新材料合成法[Zheng et al., *Adv. Mat.*, 2004]への応用が期待されている。これまでに、EWOD やマイクロ流路内での油中水滴生成・操作技術が広く研究されてきたが[Huebner et al., *Lab Chip*, 2008]、水溶液の界面張力が大きい(1~100 mN/m 程度)という制限から、通常は直径で数百~数十 $\mu\text{m}$ (体積で nL~pL)の液滴が制御可能な範囲であった。一方、脂質二重膜から成るリポソームも液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 10nm~100 $\mu\text{m}$  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効果で多様な変形を示すことが知られている。

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ができれば、世界最小のフェムトリットル溶液操作系実現への可能性が広がると考えた。これまでに、融合剤や電気刺激を用いてリポソームを融合し、内封液を混合させることで反応をトリガーする試みがなされてきた。しかし、融合後のリポソームを分割することは困難であったため、その応用は一度の試薬混合に限られていた。多種の溶液の逐次的混合や、溶液の分割といった操作は実現されていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、油液界面と比べて界面エネルギーが劇的に小さいリン脂質二重膜小胞(リポソーム)を化学・生化学反応溶液の操作単位として、その融合と分裂によってフェムトリットル( $10^{-15}\text{L}$ )の溶液操作を実現し、その汎用性・応用可能性を探ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

リポソームの融合と分裂が起こる物理条件を詳細に調べ、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、およびその繰返しが可能な基盤技術の確立を目指した(図1)。リポソームの融合方法としては、すでに操作が確立されている電気融合法を用いた。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を応用した。これは、リポソームがその内部にポリエチレングリコール(PEG)や Dextran などの高分子を内封することで、リポソームが分裂様の変形を示す現象である

研究期間内に、以下の具体的研究項目を実施した。

(1) リポソーム分裂現象の内封高分子(高分子の種類・濃度・分子量)依存性を調べ、その実験結果を提唱理論モデルにあてはめて定量的に検証する。

(2) リポソーム融合→分裂への形状変化の再現性および応用可能性を検討する。マイクロ加工技術を利用することで、最終的に 90%以上の再現性を目指す。

(3) タンパク質合成などの生化学反応を行い、バイオ応用の可能性を検証する。

以上の実験から、リポソームを利用したフェムトリットル溶液操作システムの実現可能性を示し、汎用技術応用への礎を構築した。

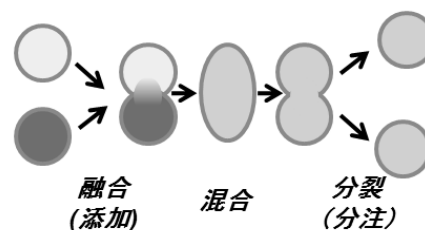


図1 リポソームを用いた微小体積での試薬ハンドリングのスキーム。この操作を繰返し可能な系を構築する。

### 4. 研究成果

(1) 溶液を「足す」操作には、リポソームの電気融合法を用いた。マイクロ流路内で光ピンセットを用いて任意のリポソームを隣接させた後、高電圧の直流パルス信号を与え

るとリポソームが融合する。リポソーム内部に PEG や DEXTRAN などバックグラウンドとしての高分子（分子量が数千～数万）が重量濃度で数%存在する場合、それらの並進エントロピーを最大にするために融合後のリポソーム膜に曲率が生じ、自発的に分裂様の形態変化を示すことを見出した。この物理現象を利用して、融合によりリポソーム内部で混合した溶液を娘リポソームに分割した。この現象は、内封高分子として PEG20k を用いた際に、60%以上の割合で起こることを示した。

(2) マイクロ流路と光ピンセットシステムを用いることで、目的のリポソームのみに操作を加えることができるシステムを開発した。(図2)

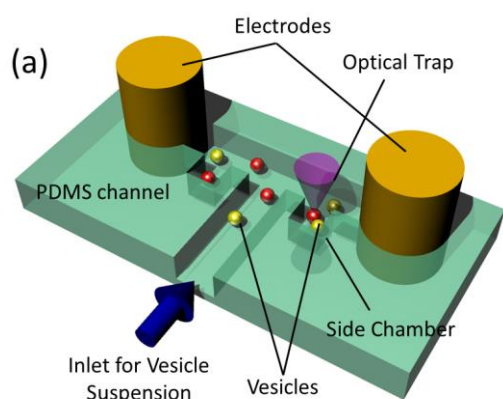


図2 本研究で構築したリポソーム融合分裂システムの模式図。

さらに、分裂様変形したリポソームを膜の相転移温度付近まで冷却することで、娘リポソームを連結する脂質チューブ構造が完全に切り離され、次の溶液操作サイクルに移行可能であることを示した。(図3)

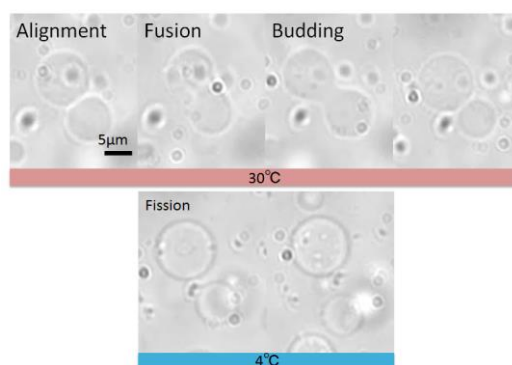


図3 分裂様変形したリポソームを冷却することで、隣接した娘リポソームが完全に分離する。

最終的に、本実験系を用い、酵素を封入したリポソームに基質を含むリポソームを複数回融合させ、加水分解反応が段階的に進行することを示した。(図4)

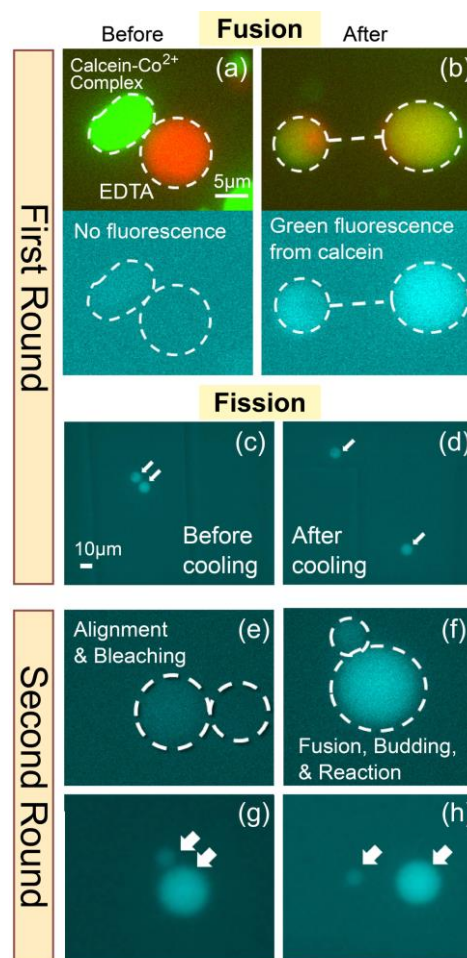


図4 カルセイン・コバルト複合体のキレート反応を、本研究で開発したリポソーム溶液操作系を用いて複数回の逐次連続反応を行った。

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)

(3)連携研究者  
なし

[雑誌論文] (計0件)  
(投稿中)

[学会発表] (計 7件)

- ① 鈴木宏明, バイオチップにおけるマイクロ三次元加工技術への期待, 日本材料学会関東支部会, 2013年12月13日, 中央大学後楽園キャンパス (招待講演).
- ② H. Shiomi, S. Tsuda, H. Suzuki, T. Yomo, Manipulation of liposome-based bioreactor featuring adding, mixing, and aliquoting femtoliter volumes, MicroTAS 2013, Oct. 27-31, 2013.
- ③ 鈴木宏明, 細胞機能の再構築を目指すマイクロ技術, 第86回生化学会年会, 2013年9月11-13日, パシフィコ横浜 (招待講演).
- ④ 塩見秀明, 津田宗一郎, 鈴木宏明, 四方哲也, ジャイアントリポソームを用いたフェムトリットル溶液操作システム, 日本機械学会2013年度年次大会, 2013年9月9-11日, 岡山大学津島キャンパス.
- ⑤ 塩見秀明, 津田宗一郎, 鈴木宏明, 四方哲也, ジャイアントリポソームを用いたフェムトリットル溶液操作システム, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第27回大会, 2013年5月23-24日, 東北大学片平キャンパス.
- ⑥ 塩見秀明, 津田宗一郎, 鈴木宏明, 四方哲也, 細胞サイズリポソーム融合分裂操作系の構築, 細胞を創る研究会5.0, 2012年11月21-22日.
- ⑦ 塩見秀明, 津田宗一郎, 鈴木宏明, 四方哲也, 単一リポソーム融合分裂操作系の構築, 第2回ソフトマター研究会, 2012年9月24-26日, 九州大学西新プラザ.

[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

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 宏明 (SUZUKI, Hiroaki )

中央大学・理工学部精密機械工学科・准教授

研究者番号: 20372427

(2)研究分担者

なし