

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26620116

研究課題名(和文) 自然乳化を利用する水/水分配マイクロ操作法

研究課題名(英文) Aqueous / aqueous partition utilizing spontaneous emulsification

研究代表者

火原 彰秀 (HIBARA, Akihide)

東京工業大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：30312995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロ水滴は、pLレベルの空間に試料や試薬などを閉じ込めることができるため、単一細胞や単一生体分子などの微量試料の分析を行うための微小反応場として期待されている。しかし、水滴内包物の定量分析を行う場合、光路長が短く、また内包物量が微量であるため、検出法が限られていた。本研究では、自然乳化を利用したマイクロ水滴内包物の選択的濃縮法を研究した。この方法によりマイクロ空間内で溶質分子を選択的に濃縮できることを初めて明らかにした。また、タンパク質定量・タンパク質結晶化などの分析への応用例を実証した。

研究成果の概要(英文)：Water-in-oil microdroplets formed in microfluidic devices have been studied with eagerness in the past decade because of they can be used as picolitter sized chemical containers and applied to analysis for high-throughput microanalyses such as single cell assay. However, the quantification of the microdroplet contents was difficult because of its short optical path lengths. In order to overcome this difficulty, we developed the selective condensation method for microdroplet contents by utilizing spontaneous emulsification at the interface of the microdroplets. Here, we demonstrated the selective condensation of analyte molecules in microspaces, and their applications to protein determination and crystallization.

研究分野：分析化学

キーワード：マイクロ流体 マイクロ液滴 ナノ液滴 濃縮 分離 タンパク 界面活性剤

1. 研究開始当初の背景

マイクロ・ナノ流体を用いた分析手法は、分析時間の短縮、分析操作の自動化、試料・試薬・廃液の低減、分析の高速化などの観点から注目を集めている。この中で、互いに不溶な二相流体を用いた溶媒抽出などは、マイクロ・ナノ空間の特性を活かした試料前処理法として研究がなされてきた。特に近年では、マイクロ液滴を用いた反応・抽出、細胞や生体試料の閉じ込めなどが盛んに研究されている。

われわれは、これまでマイクロ液滴を抽出・反応を検討してきた。液滴をさらに小さくしてナノ液滴を生成する過程を研究する中で、界面活性剤濃度の条件によって、図1のような流れの中で自然乳化が起こることを見いだした。この過程を観察する過程で、「少数分子閉じ込め」と「試料濃縮」により分析性能を向上させることを着想した。

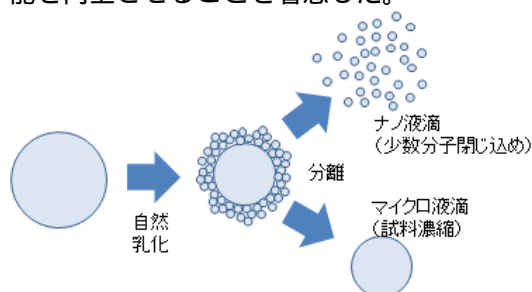


図1

2. 研究の目的

マイクロ液滴の自然乳化過程の理解、マイクロ・ナノ液滴の分離操作の確立、ナノ液滴およびマイクロ液滴の分析応用を目的とする。分析手法としての実証として、蛍光アッセイを実現することを目指した。

本研究で実現を目指す「自然乳化」と「マイクロ・ナノ液滴分離」を利用した操作は、系の設計によって分離や濃縮を自在にコントロールできる全く新しい化学・生化学操作となると期待できる。「少数分子のアッセイ」、究極的には「単一分子アッセイ」は究極の感度をもつ分析法として発展する可能性がある。また、これまでマイクロ・ナノ化学の分野で様々に試みられてきた「濃縮」を、流れの中で簡便に実現できる全くあたらしい方法として発展する可能性がある。

3. 研究の方法

マイクロ水滴の生成およびマイクロ水滴内包物の顕微観察には、壁面をオクタデシルトリクロロシランで疎水処理したガラス製のマイクロ流体デバイスを用いた。幅 70 μm 、深さ 5 μm の浅い流路と、幅 250 μm 、深さ 100 μm の深い流路を接続した T-junction 構造によりマイクロ水滴を生成した。生成する水滴径に応じて、浅い流路の深さ 10 μm としたものを

使用した。水相として後述する種々の溶質を含む水溶液を、有機相として非イオン性界面活性剤である Span 80 を含むオクタンを用いた。深い流路を有機相で満たし、浅い流路より水相を押し出すと、サイズの均一なマイクロ水滴が数個から数十個生成した。マイクロ水滴の直径は、浅い流路の深さが 5 μm のとき 20 μm 、10 μm のときに 40 μm であった。マイクロ水滴がマイクロ流路の底面に沈降した状態で有機相を 0.02 $\mu\text{L min}^{-1}$ で流し、マイクロ水滴が下流へ流れにくい状況で経時変化を顕微観察した。

自然乳化には、条件によりいくつかの機構が提案されている。界面活性剤添加により、界面張力が著しく低下して界面が大きく変形する場合には、変形により突出した水相がもとの水相から脱離し、有機相中に水滴をつくる機構が考えられる。これに対して今回用いる水/アルカン(オクタン)に界面活性剤 Span 80 を加えた系の油水界面は、機械的に大きく変形するわけではない。まず、油水界面に Span 80 が多層吸着し、その親水部分に疎水層(油膜)を通じて水が分配後、ある体積の水滴として分割され、もとの水相近傍の有機相中に孤立水相を形成する機構が報告されている。さらに今回は、有機相を定常的に流す条件であり、水滴表面にせん断応力がかかるため、マイクロ水滴表面から、多層吸着層や生成したナノ水滴が運び去られる現象も起こると考えられる。以上の知見を総合して考えると、今回実験に用いるマイクロ水滴表面では、まず油相中の界面活性剤(ミセル)がマイクロ水滴に近づき、ミセルあるいは多層吸着層の親水部に水が分配してサイズが増し、水滴表面から運び去られるという現象が起こっていると考えられる。この界面活性剤(ミセル)が次々に供給されることで、マイクロ水滴が縮小していくと考えられる。

4. 研究成果

Span 80 を 120 mmol L^{-1} 含むオクタンを有機相としたとき、自然乳化によるナノ水滴の生成とマイクロ水滴の縮小が確認できた。20 μm 径の水滴が5分で5 μm 程度まで縮小し、その後のサイズは一定であった(図2)。

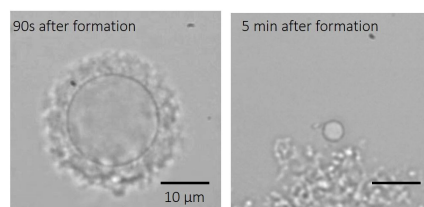


図2

蛍光性を持つ tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) Chloride ($[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$) の 0.1 mmol L^{-1} 水溶液のマイクロ水滴の縮小を観察した際、

[Ru(bpy)₃]Cl₂ の蛍光強度が上昇する様子が観察された。蛍光強度よりマイクロ水滴内の [Ru(bpy)₃]Cl₂ 量を計算すると、[Ru(bpy)₃]²⁺ はマイクロ水滴外に出ていかず、水滴内に定量的に濃縮されることが分かった。

自然乳化によるマイクロ水滴内包物の濃縮では、内包物の特性により濃縮挙動が異なる。例えば図3で示すように、[Ru(bpy)₃]²⁺ は定量的にマイクロ水滴内に濃縮される一方で、フルオレセインで標識した平均分子量 350 Da のポリエチレングリコール (FITC-PEG350) は、マイクロ水滴内にほとんど濃縮されずナノ水滴へ分配した。FITC-PEG350 が比較的疎水的な水溶性分子であり、マイクロ水滴とその表面あるナノ水滴間の有機相薄膜を透過しやすいためであると考えられる。

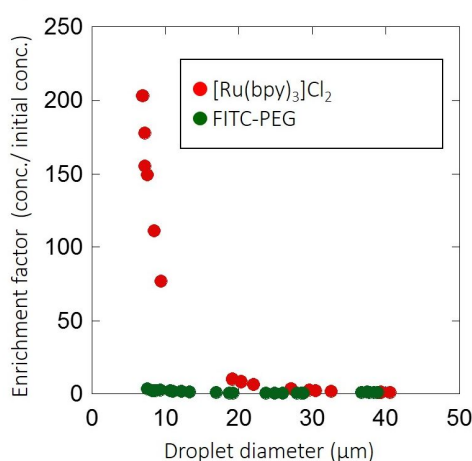


図3

濃縮/分配挙動に影響を与えるパラメータとして、上記の溶質の疎水性以外にも溶質のサイズがある。例えば、マイクロ水滴中の FITC-PEG350 の98%がナノ水滴へと分配する一方で、PEG部分の平均分子量が2,000 Da の FITC-PEG2,000 では、70%しか分配しない。この結果より、同種の高分子であれば、サイズの大きい方がマイクロ水滴内に留まりやすいことが分かった。

以上の実験から親水性またはサイズが大きい分子がマイクロ水滴に濃縮しやすいことが分かった。今後、生化学分析に応用する上で、濃縮/分配選択性が制御できることが望ましい。そのためには、界面活性剤の種類、温度、有機相種類などによる選択性変化を系統的に解析する必要があると考えている。

タンパク質の定量操作の例として、蛍光標識のついたピオチン分子を用いたアビジンの定量を行った。蛍光標識ピオチンは比較的疎水的な小分子 (723 Da) であり、自然乳化中にナノ水滴へ分配すると予想した。一方、アビジンは60 kDa以上の大きな分子であり、アビジンと結合した蛍光標識ピオチンはマイクロ水滴内に濃縮すると考えた。そのため、試

料水溶液中のアビジンの濃度が高いほど、自然乳化後のマイクロ水滴の蛍光強度が高くなると予想した。実験の結果、図4に示すように予想通りの傾向が観察され、数十amol程度のアビジンが定量できることが示された。今後、非常に微量なタンパク質試料の測定が可能になると期待できる。

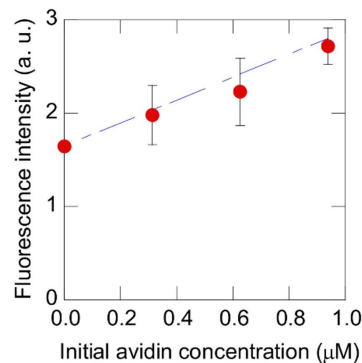


図4

タンパク質の三次元X線構造解析には前段階としてタンパク質結晶化の操作が必要である。pH、バッファー・沈殿剤の種類・濃度など多くの結晶化パラメータを微量のタンパク質試料で最適化することが好ましい。マイクロ水滴を利用したタンパク質結晶化条件検討は、nLサイズの水滴一つ一つについて異なる条件で結晶化を行うことができるため、省試料の観点より多くの研究がなされてきた³⁰⁾⁻³²⁾。しかし、タンパク質の濃縮速度の調節法については、ほとんど報告がなかった。

われわれは、自然乳化法を利用したタンパク質濃縮速度の調節法を着想した。具体的には、無機塩とタンパク質からなるタンパク質結晶化試料水溶液に自然乳化法を適用した場合、水のみがナノ水滴へ分配し、無機塩とタンパク質はマイクロ水滴に濃縮すると考えた。その結果、マイクロ水滴内のタンパク質の過飽和度が上昇し、結晶が生成すると考えた。本手法でタンパク質濃縮速度が調節できれば、タンパク質の過飽和度の上昇速度と結晶化によるタンパク質濃度の低下速度のバランスにより、タンパク質結晶数の調節が可能になると予想した。

実際に、lysozyme水溶液 (lysozyme 120 mg mL⁻¹, NaCl 100 mmol L⁻¹, pH 4.8) を用いて水滴を生成し、自然乳化法で濃縮をしたところ、マイクロ水滴内に lysozyme 結晶が得られた (図5)。マイクロ水滴周囲を流す有機相中の Span 80 濃度が高いほどマイクロ水滴内に生成するタンパク質結晶数が多くなった。Span 80 の濃度が高いほど、自然乳化によるナノ水滴の生成が速くなり、タンパク質の過飽和度が高く (結晶核生成頻度が高く) なり、水滴内の結晶数が多くなったと考えられる。

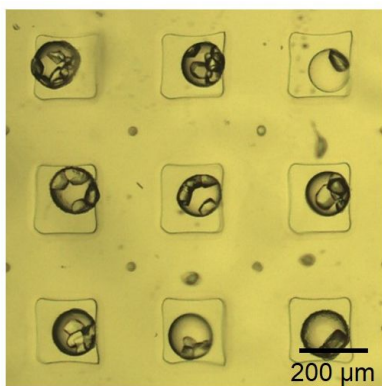


図 5

本手法は、多数個の水滴において同時にタンパク質の過飽和度調節および結晶化観察が可能である。濃縮速度と結晶核生成頻度の解析が多数同時にできるようになったといえる。今後、種々のタンパク質について結晶核生成や結晶成長速度の詳細な解析が進み、良質な結晶を得るのに重要な知見が得られるようになると期待できる。

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 6 件)

M. Fukuyama, A. Hibara, Microfluidic Selective Concentration of Microdroplet Contents by Spontaneous Emulsification, *Analytical Chemistry*, 87(7), 3562-3565 (2015). 査読有
<http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00155>

M. Fukuyama, A. Akiyama, M. Harada, T. Okada, A. Hibara, Microfluidic protein crystallisation controlled using spontaneous emulsification, *Analytical Methods*, 7(17), 7128-7131 (2015). 査読有
<http://dx.doi.org/10.1039/C5AY00578G>

福山真央, 火原彰秀, 自然乳化を利用したマイクロ水滴内包物の選択的濃縮法、*分析化学*, 65(2), 57-64 (2016). 査読有
<http://dx.doi.org/10.2116/bunsekikagaku.65.57>

〔学会発表〕(計 10 件)

福山真央, 火原彰秀, マイクロ液滴自然乳化を利用した分離法、*化学とマイクロ・ナノシステム学会第 30 回研究会*、北海道大学、2014 年 10 月 3 日

福山真央, 秋山葵, 火原彰秀, 自然乳化を利用したマイクロ液滴内結晶化、*日本分析化学会第 75 分析化学討論会*、山梨大学、2015 年 5 月 23 日

M. Fukuyama, A. Hibara, Y. Yoshida, K. Maeda, Sample Pretreatments for Droplet-Based Microanalytical System by Using Nanodroplet Formation, *PITTCO2016*, Atlanta, USA, March 9, 2016.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://researchmap.jp/read0076918/>

<https://scholar.google.com/citations?user=kTMIJqkAAAAAJ&hl=en>

<http://www.chemistry.titech.ac.jp/~okada/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

火原 彰秀 (HIBARA, Akihide)

東京工業大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：3 0 3 1 2 9 9 5

(2) 研究分担者

福山 真央 (FUKUYAMA, Mao)

京都工芸繊維大学・グローバルエクセレンス・助教

研究者番号：4 0 7 5 4 4 2 9

(平成 27 年度より研究分担者)

(3) 連携研究者

なし