

均一サイズの人工細胞膜小胞を効率よく作製する技術を開発 ～細胞模倣リアクター生産の技術革新に寄与～

学校法人 中央大学

概 要

中央大学理工学部 教授 鈴木宏明の研究グループは、細胞膜を模擬した巨大一枚膜小胞(ジヤイアントユニラメラベシクル、GUV)^{注1}を、簡便かつ高効率に作製する技術を開発しました。

全ての細胞は、脂質二重膜^{注2}と呼ばれる膜の中に、タンパク質や核酸(DNA や RNA)が包まれた構造をしており、この中で様々な反応や変化が起こります。つまり、細胞は、マイクロサイズの反応容器(リアクター)です。

近年、この細胞膜を模擬した細胞と同サイズの容器を人工的に作製し、細胞の環境を模擬したリアクターを開発する研究が進んでいます。マイクロ流路を使うことで、形や大きさが揃った、均一な人工細胞膜小胞(GUV)をつくるのが可能になってきました。しかし、これまでに発表された方法は、困難な課題が残されていました。

本研究グループは、マイクロ流路中で均一な油中液滴(W/O 液滴)をつくり、それを脂質の並んだ油・水界面を通過させることで、均一なダブルエマルジョン液滴をつくる技術を開発しました。ダブルエマルジョン液滴は、非常に薄い油の殻(シェル)で囲まれた小胞で、その界面が脂質で覆われています。界面張力のバランスにより、この薄いオイル層が一箇所に集まると、他の部分が脂質二重膜となり、擬似的な細胞膜として働きます。油や界面活性剤の成分を最適化することで、界面通過率が90%以上となる条件を確立しました。

この技術により、人工細胞(Artificial Cell)または合成細胞(Synthetic Cell)の研究^{注3}がいっそう加速することが期待されます。送液開始から1分程度で流れが安定し、すぐに均一 GUV を得ることができるため、少量かつ貴重な生化学サンプルを GUV 中に封入することができます。細胞ではつくることが困難なタンパク質を合成したり、環境中や生体由来サンプル中のマーカー物質をセンシングしたりする用途への応用が期待されています。

本成果は2021年12月21日、Sensors & Actuators B: Chemicalにて公開されました。

【注意事項】 本内容については、すぐに報道していただけます。

【研究者】 鈴木 宏明 中央大学理工学部 教授(精密機械工学科)
 牛山 涼太 中央大学大学院理工学研究科 修士2年(精密工学専攻)
 小祝 敬一郎 東京海洋大学 ゲノム科学研究室 助教

【発表(雑誌・学会)】 雑誌名: Sensors & Actuators B: Chemical
 論文タイトル: “Plug-and-play microfluidic production of monodisperse giant unilamellar vesicles using droplet transfer across Water–Oil interface”
 論文リンク: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.131281>
<https://authors.elsevier.com/a/1eHcR3IQMPL8o3>

【研究内容】

1. 背景

脂質膜小胞(リポソーム)は、脂質二重層からなる生物学的な機能区画で、生体膜研究の基本的なモデルシステムとして用いられてきました。なかでも、巨大一枚膜小胞(Giant Unilamellar Vesicle)は、その大きさゆえに観察・操作が容易であり、幅広い生物学的・物理化学的応用が可能です。GUV は、核酸、酵素、膜タンパク質などの重要な生体分子を合成するための細胞模倣マイクロリアクターとして機能し、外部刺激によって合成反応を引き起こすこともできます。このことから、ボトムアップ型の人工細胞研究において、細胞モデルの構築にも利用されています。これらの応用では、結果を定量的に理解するために、GUV のサイズを制御することが重要です。

近年、マイクロ流体工学に基づく GUV 製造法がいくつか報告されており、高い単分散性、高いスループット、およびサイズ制御性が得られています⁴。しかし、従来の技術には、熟練した手工芸的な製造が必要であったり、流体の流量の精密な微調整が必要であったりといった困難な点があり、幅広い用途に用いることができていませんでした。本研究では、液滴の界面通過法をマイクロ流路内で行うアプローチを採用し、製造と操作が簡便な均一 GUV 製造法を開発しました。本研究で作製した単分散 GUV は、細胞模倣マイクロリアクターに必要な α HL 孔形成および浸透圧による収縮特性を有していることを確認しました。

2. 研究内容と成果

マイクロ流路内(図1)において、フローフォーカシング構造を用いて、脂質で安定化された W/O 液滴を生成しました。次に、下流に外水相を導入することで、界面に脂質の並んだ W-O 層流を形成しました。W-O 層流に沿ってマイクロ流路の幅を狭めると、W/O 液滴が W-O 界面に押しつけられます。流路の屈曲部の中央付近で、W/O 液滴が界面を越えて移動し、W/O/W 液滴が形成されることが確認されました(図 2)。さらに下流に設置したマイクロ流路の分岐部では、油層と外側の水層が分離され、出口から W/O/W 液滴を試験管に回収しました。最後に、余分なオイルのデウェッティング⁵により、脂質二重層が形成されました。この流れは、油相にスクアレン 80%、1-オクタノール 20%の時に安定化し、また、効率の高い界面通過には、外液相に 1%の高分子界面活性剤(Pluronic F68)を添加することが重要であることを発見しました。

細胞模倣マイクロリアクターとしての機能を検証するために、 α -ヘモリシン(α HL)による膜透過アッセイを行いました。 α HL は脂質二重層膜に 7 量体の膜貫通孔($\varphi=1.5$ nm)を形成するため、膜を通して低分子を透過させることができます。作製した GUV の外水相に最終濃度 0.1 mg/ml の α HL を添加すると、40 分かけて徐々に GUV 内部に封入した蛍光分子の減少が見られました(図 3)。 α HL を含まない対照実験では、明確な蛍光分子の透過が見られませんでした。この結果は、このリアクターの界面が脂質二重膜であることを証明し、かつ、反応に必要な基質等を供給可能になることを示しています。ほかにも、浸透圧による収縮性能を評価し、この容器内で細胞に似た高分子の混雑状況をつくる実験を行う用途に利用可能であることを示しました。

3. 今後の展開

本研究では、マイクロ流路を用いた簡便で再現性の高い単分散 GUV の生成方法を確立しまし

た。本装置は、マイクロ流路内の部分的な表面処理を必要とせず、PDMS 流路にチューブを接続した直後に稼働することができます。W/O/W 液滴生成の安定状態を短時間(1~2 分)で達成できるため、貴重な内容液(反応液など)の量を~20 μl にまで減らすことができます。本研究では、限られた種類の脂質組成しか試していませんが、エマルション界面通過法に用いられる様々な混合脂質が、我々のマイクロ流体 GUV 形成法に容易に適用できると考えられます。本技術は、脂質膜が関与する人工細胞研究および定量的な生化学研究の主要なプラットフォームとなるものと考えています。

4. 謝辞

この研究は、科学研究費補助金(文部科学省)基盤研究 B (19H02576)、基盤研究 A (19H00901)、および学術変革領域 A(20H05935)からの助成を受けて行われました。

【お問い合わせ先】

＜研究に関すること＞

鈴木 宏明 (スズキ ヒロアキ)

中央大学理工学部 教授 (精密機械工学科)

TEL : 03-3817-1827

E-mail: suzuki@mech.chuo-u.ac.jp

＜広報に関すること＞

矢ヶ崎 大地 (ヤガサキ ダイチ)

中央大学 研究支援室

TEL 03-3817-7423 FAX 03-3817-1677

E-mail: kkouhou-grp@g.chuo-u.ac.jp

【用語解説】

注1) 巨大一枚膜小胞 (ジャイアントユニラメラベシクル、GUV)

細胞膜の主成分であるリン脂質から再構成された、脂質二重膜の袋状構造。リポソームとも呼ばれる。直径が $1\mu\text{m}$ 以上のものは、ジャイアントと呼ばれ、人工的に再構成した細胞モデルの区画として用いられている。

注2) 脂質二重膜

リン脂質が疎水的相互作用によって平面状に並び、膜を構成した分子配列構造。リン脂質の疎水基が向かい合って2層に並ぶため、二重膜と呼ばれる。

注3) 人工細胞、合成細胞

細胞の部分的な性質を調べたり、利用したりするために、細胞そのものを利用するのではなく、要素分子を人工的に組み合わせることで細胞の機能を疑似的に作り出したもの。

注4) 参考文献

N.N. Deng, M. Yelleswarapu, W.T.S. Huck, Monodisperse Uni- and Multicompartment Liposomes, *J. Am. Chem. Soc.* 138 (2016) 7584–7591.

S. Deshpande, Y. Caspi, A.E.C. Meijering, C. Dekker, Octanol-assisted liposome assembly on chip, *Nat. Commun.* 7 (2016) 1–9.

注4) デウェッティング

ガラスなどの親水的な表面に水などの液体が広がることをウェッティング (濡れ) と呼ぶ。反対に、テフロン加工した表面では水が濡れ広がらずに丸くなる。前者から後者の状態に変化することをデウェッティングと呼ぶ。上記の例では、小胞の表面に薄く広がったオイル層が一カ所にまとまって集まる現象を指している。

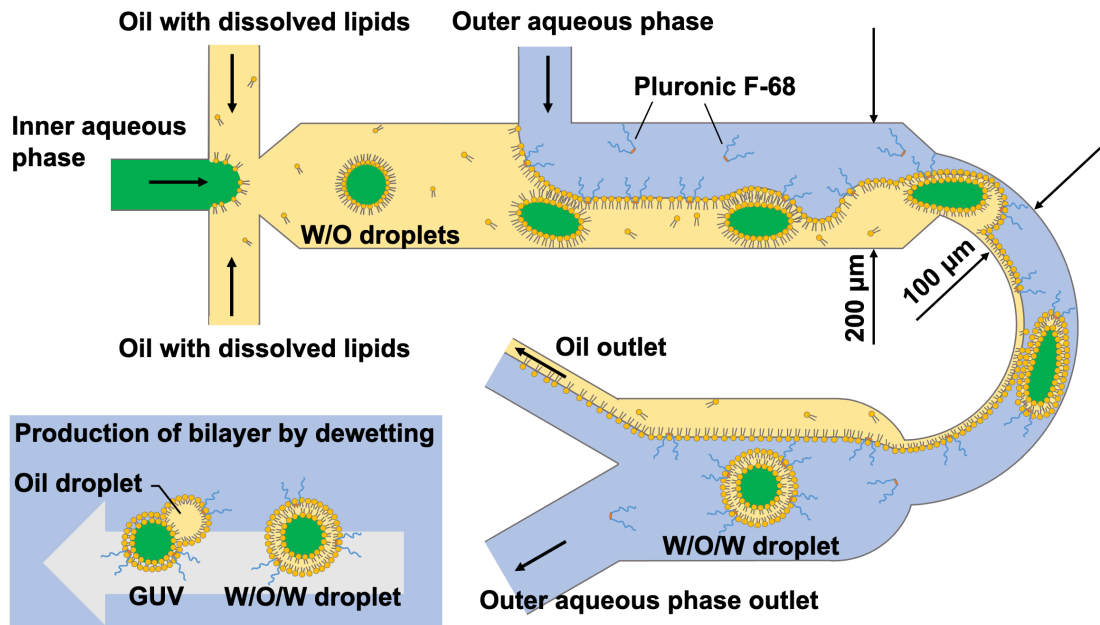


図1 マイクロ流路内で W/O 液滴を W-O 界面を越えて移動させ、W/O/W 液滴中の過剰なオイルをディウェッティングすることにより、単分散 GUV を製造する手順の模式図。

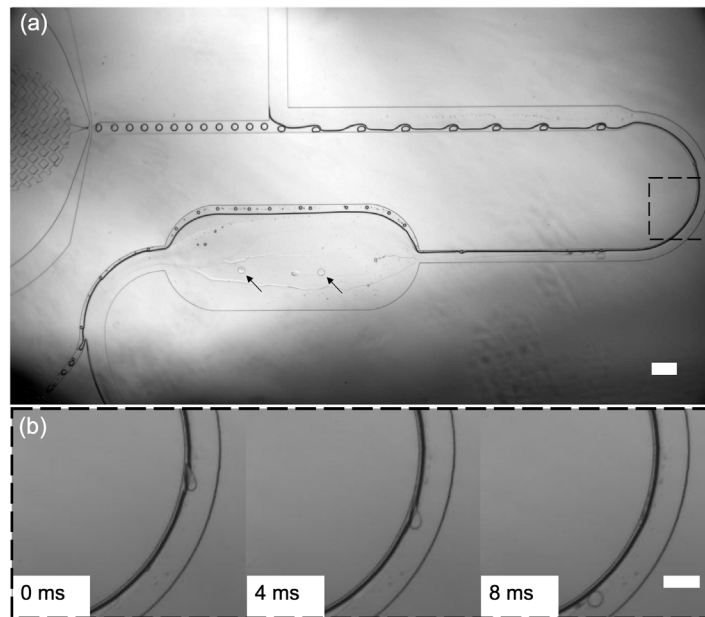


図2 流路全体の顕微鏡写真。黒い矢印は W/O/W 液滴を示す。スケールバーは 200 μm 。(c) W/O/W 液滴の連続拡大画像。液滴が W-O 界面を移動して W/O/W 液滴が生成されている。スケールバーは 100 μm 。

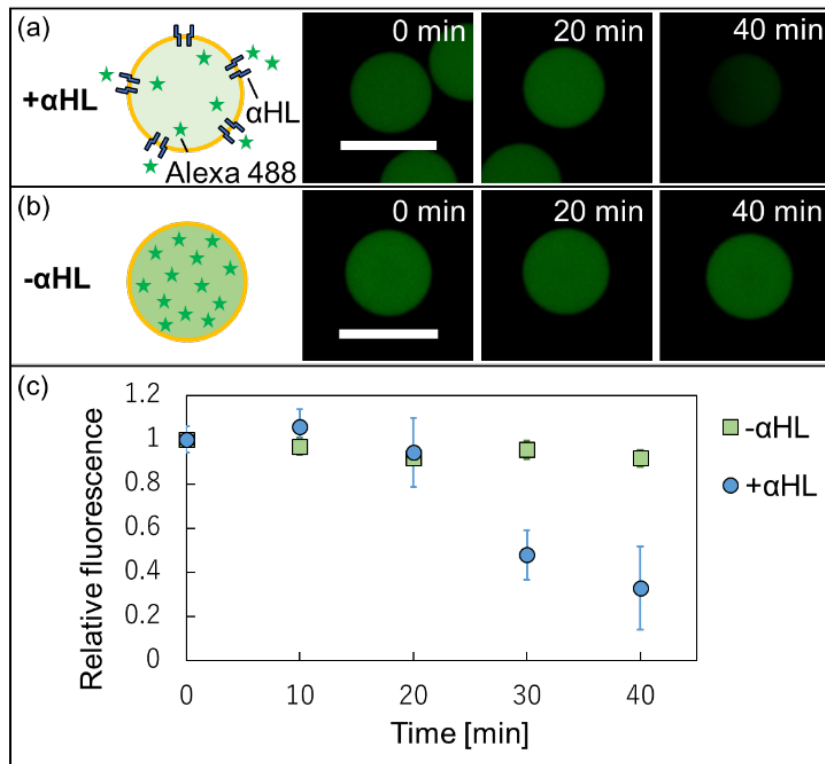


図3 膜タンパク質(α HL)による膜透過アッセイ。(a) α HLによる蛍光マーカー(10 μ M Alexa 488)の漏出。(b) α HL を含まない対照実験。(c) 時間依存的な蛍光の漏出(青丸、0.1mg/ml α HL あり；緑四角、 α HL なし；n=3)。スケールバーは50 μ m。