

研究報告2022 目次 【研究開発部】

実用化実証事業

「人工細胞膜システム」グループ

◆ 総括	104
◆ 微小気泡を用いる脂質二重膜の再形成技術	106
◆ 昆虫嗅覚受容体を発現したセンサ細胞の機能評価技術の開発	109
◆ DNAを用いた脂質二重膜接着・融合技術	112
◆ 業績	115

人工細胞膜システムグループ

グループリーダー 竹内 昌治

【基本構想】

膜タンパク質は細胞膜中に存在し、細胞の内外への物質輸送・排出、シグナル伝達・変換などにおいて重要な役割を果たしており、1兆ドル余り(2011年)の医薬品の世界市場において、薬剤の標的の半数以上がこれら膜タンパク質や膜表面性物質だと言われている。リガンド同定済みのGタンパク質共役型受容体(GPCR)に関するだけでも約600億ドル(2009年)に上り、リガンド未同定のGPCRをはじめ、イオンチャネルやトランスポーターなどの膜タンパク質の機能や特性を一つ一つ解明することが、基礎研究のみならず創薬・医療分野における重要な課題である。しかし細胞膜中に存在する膜タンパク質は単離が困難なため、機能解析は難しいとされてきた。

創造展開プロジェクト(2009-2012年度)では、細胞膜のモデルとなる脂質二重膜を人工的に再構成した後、精製された膜タンパク質を導入することで、その膜タンパク質の特性を低ノイズで解析する戦略にもとづいて研究を行い、膜タンパク質を再構成するための2つの人工脂質二重膜システムを確立した。(1)電氣的計測技術に適する平面膜システムでは、ヒト由来イオンチャネルの並列同時シグナル計測に適する自動化・集積化チップ、小型化チップをそれぞれ研究・開発した。(2)光学的計測技術に適するリポソーム膜システムでは、細胞サイズリポソームの形成手法を確立し、トランスポーターの輸送現象やGPCRの基質結合を蛍光により観測することに成功している。

2013年度に実用化実証事業に移行後は、地域イノベーション戦略支援プログラムの支援も受けながら、創造展開プロジェクトで得られた研究成果を展開し、標的膜タンパク質の生体外での創薬解析支援システムを確立すべく研究開発を行ってきた。具体的には、効率的膜システム要素技術の開発として、人工脂質二重膜の集積化や薬剤スクリーニングに適したデバイスとするためのシステム全体の基盤研究開発を実施し、膜タンパク質の調製・導入法の開発として、イオンチャネルやGPCR、トランスポーターなどを人工脂質二重膜に効率的・体系的に導入できる手法の研究開発を実施している。最終的に、大学・研究機関などで使用できるシステムや製薬企業から薬剤候補化合物の評価を受託できる評価法の開発を目標とした。2021年度、このイオンチャネルの機能評価技術を基盤とするベンチャーの起業に至った。一方で、NEDO事業(2015-2019年度)および地域イノベーション・エコシステム形成プログラム(2018年度開始)では、膜タンパク質の機能利用による人工細胞膜センサに関わる研究開発を行っている。膜タンパク質である嗅覚受容体に代表されるように、生体のもつセンサは優れた感度・特異性をもつことが知られており、膜タンパク質をセンサ素子として活用するための研究開発を実施している。JST-CREST事業(2020年度開始)、科研費研究(2021年度開始)において、細胞をセンサ素子として用いる研究開発も企業と共同で進めている。周辺技術も含め、小型・高性能な次世代センサの実用化技術の開発を目標としている。

1. 2021年度の研究目的

実用化実証事業9年目となる2021年度は、イオンチャネル機能評価システムについて、事業化に向けた実用化研究開発を推進し、起業への道筋を立てることを目標とした。一方で、センサ開発に関しては、これまでの細胞膜センサ研究の成果を応用・展開して、標的物質に応答する細胞をセンサ素子とするバイオハイブリッドセンサの概念実証に向けた基盤研究を開始した。

(1) イオンチャネル機能評価システムの開発

従来、膜タンパク質の機能解析は、培養細胞を用いた電気生理学的手法(パッチクランプ法)や蛍光イメージング法によって行なわれるのが一般的である。しかしながらこれらの手法では、培養中の汚染対策や個体差の均一化処理が煩雑であるほか、標的以外の雑多なタンパク質からの影

響が避けられず、一つの標的タンパク質に限定して機能を探ることは難しかった。

我々の目指す人工細胞膜プラットフォームは、細胞膜のモデルとなる脂質二重膜を簡便に再現良く形成し、その膜に再構成する標的膜タンパク質の活性を保持したまま機能解析を可能とするシステムである。実用化実証事業においては、これらの人工脂質二重膜デバイスを膜タンパク質の機能解析や創薬スクリーニングといった場面において実用的なプラットフォームとして拡張していくための要素技術、あるいは量産化に必要な技術の実現を目標として研究開発を行ってきた。

2021年度は、これまで継続してきたイオンチャネル機能評価システムについて、量産性や機能性向上に関する実用化研究開発を完遂し、ベンチャー企業の設立につながることを目標とした。

(2) バイオハイブリッドセンサの開発

膜タンパク質は、匂いや味などの化学量センサとしての役割を生体内で担っており、その感度や特異性は人工的なセンサに比べ非常に高いことが知られている。こうした膜タンパク質の機能を活用することができれば、小型で高性能の化学量センサを実現できると考えられる。

イオンチャネル機能評価システムの開発成果により、マイクロチップ上での脂質二重膜を再現良く形成し、そこに再構成したイオンチャネルの機能を活用できるようになった。NEDO 事業（2015-2019 年度）では、昆虫嗅覚受容体を脂質二重膜に組み込んだ人工細胞膜センサのプラットフォーム技術を確立し、地域イノベーション・エコシステム形成プログラムでも、この人工細胞膜センサの要素技術の研究を行ってきた。その成果のデモンストレーションとして、ヒトの呼気中に混合したごく微量の疾患マーカーの検出を実証し、新聞・TV 等で取り上げられるなど注目された。その結果、生体機能と機械を融合したバイオハイブリッドセンサの基盤研究および概念実証を目的とする科研費研究、JST 事業の採択につながった。

2021 年度は、標的物質に反応する細胞をセンサ素子とする細胞センサについて、その計測技術に関する基礎研究を開始した。光学的計測技術と電気的計測技術について、比較検討することを目的とした。

2. 2021 年度の研究成果

(1) イオンチャネル機能評価システムの開発

JST 大学発新産業創出プログラム（START、2018-2021 年度）において、マイクロチップ上に細胞膜を簡便・再現良く形成するコア技術を利用し、細胞内イオンチャネルに対する薬剤候補物質の評価技術の実用化研究開発を進めてきた。計測チップに関しては、東レエンジニアリング社と共同で性能向上を目指して改良を行った。特にチップベースとなるプラスチック部品については、設計変更した射出成形品を完成させ、計測データの信頼性・再現性を向上できることが確認された。こうしたシステム開発成果に加え、製薬企業との薬剤候補化合物評価の実証実験の結果を踏まえ、2021 年 8 月、同技術を活用し、イオンチャネル創薬支援の事業化を行う「株式会社 MAQsys」が KISTEC 発ベンチャーとして設立された。形質膜や細胞内イオンチャネルを標的とした薬剤候補化合物の評価を通して、新たな創薬市場の創出を目指す。KISTEC では、起業後も MAQsys 社の事業開始を支援するため、共同開発を継続する。

成果展開として、協力研究員による萌芽研究を実施し、その成果が Lab on a Chip 誌に掲載された。外部研究機関との共同研究も行っており、東大豊田研究室との成果は Langmuir 誌に採択された。国際医療福祉大相馬研究室との科研費研究や東工大松浦研究室との共同研究についても継続して実施している。

(2) バイオハイブリッドセンサの開発

生体機能と機械を融合したバイオハイブリッドセンサに関しては、科研費研究（2021-2025 年度）による学術基盤確立、JST-CREST 事業（情報担体；2020-2025 年度）による実用性実証を目的とした研究開発を本格的に開始した。細胞上に発現させた受容体をセンサ素子とする細胞センサに関して、東京大学、住友化学と共同で実施する。竹内 G では、センサ細胞が標的物質に反応して発する微小シグナルをデバイスで検出するための計測基盤について研究を行い、概念実証のための計測システムを製作・開発する。

2021 年度は、微小シグナルの検出技術について、光学的技術および電気的技術それぞれの感度や応答性に関する比較検討を開始した。標的物質と細胞表面の受容体が結合すると、細胞内へのカルシウムイオンの流入が生じる。光学的計測では、例えばこのカルシウムイオン濃度を蛍光輝度に変換することで標的物質を検出する。電気的計測では、細胞内へのイオン流入（イオン電流）や膜電位変化を直接・間接的に検出する方法がある。こうした計測技術の感度や応答性能などの特長について、それぞれ検討を行っている。また、こうした細胞や細胞膜機能を活用するバイオハイブリッドセンサに関する研究をまとめた総説が Lab on a Chip 誌に掲載された。

(3) 共同研究による成果

JST-CREST 事業（ゲノム合成：2018-2023 年度、東大白髭教授代表、機能的人工染色体の設計と利用のための革新的研究）に参画している。同 CREST では東大杉研と共同で、人工細胞核を封入したリボソームを作製するためのデバイスを設計・開発している。カエル卵抽出液中で細胞核様構造が形成される機能を利用し、リボソーム中に細胞核を封入する。2021 年度は、細胞核封入リボソームの作製に関して進展があり、学術論文への投稿に向けて同成果をまとめているところである。

上記のそれぞれの研究成果は、業績一覧に示す通り、国際会議・国内学会での発表、学術論文、記者発表などとして積極的に公開している。また、コア技術・要素技術として重要な成果については特許出願も行っている。

微小気泡を用いる脂質二重膜の再形成技術

「人工細胞膜システム」グループ

大崎 寿久、橋本 和泉、三村 久敏、三木 則尚、竹内 昌治

1. はじめに

(1) 細胞膜モデルとしての平面脂質二重膜

細胞膜は、主に脂質二重膜と膜タンパク質から構成される。脂質二重膜は、両親媒性の脂質分子が疎水性相互作用により炭化水素鎖を内側に向かい合わせた構造をもつ。極性分子やイオン等の透過を抑制し、細胞内外を隔てる役割を主に果たす。一方、膜タンパク質は細胞内外への物質輸送や情報の伝達に関与している。膜タンパク質は、細胞の生理学的機能に対する寄与は大きく、その機能評価は創薬においても不可欠になっている。

細胞膜モデルとしての平面脂質二重膜の研究は、1960年代から行われてきた。油水界面における脂質分子の単分子膜形成を利用した刷毛塗り法や、気液界面に形成される単分子膜を貼り合わせる Montal Mueller 法など、脂質分子の両親媒性の性質を使った親疎水界面における自発的な膜形成過程を利用する脂質二重膜形成原理が多く報告されている[1,2]。

平面脂質二重膜は、2つのウェル間に設けられた高分子フィルムの微小な孔に作られることが多い。微小孔周縁部と脂質二重膜との界面は油相で保持され、ウェル間で電気的な絶縁が保たれた状況であることから、電気的な計測に適する。膜の静電容量など、電気的性質を明らかにする研究や、膜タンパク質の中でイオンの透過制御に関わるイオンチャネルの電気生理学的研究に至るまで、細胞膜モデル、細胞膜機能計測のプラットフォーム技術として平面脂質二重膜は利用されている。一方で、これらの古典的な平面脂質二重膜技術は、手順の煩雑さや並列化の困難さから、実験室での利用にとどまっていた。

そうした中で、2000年頃より、細胞膜モデルの作製やイオンチャネルをはじめ膜タンパク質の機能評価を細胞外でスルーブット良く行うための方法として、MEMS技術の活用に着目が集まるようになった。MEMS技術を使い作製するマイクロ流体デバイスは、微小流路や微小容器を設計することで、サンプル溶液などの希釈・混合といった操作を迅速・効率的に行うことができる。また自動化や並列化といった特長も併せもつ。こうしたデバイス技術の研究の進展により、細胞外での平面脂質二重膜の形成、すなわち細胞膜を人工的に再現する「人工膜法」の研究が盛んに行われた。こうした成果を受けて、イオンチャネルをはじめとした膜タンパク質の機能評価や機能活用といった成果展開が期待されている[3]。

(2) 液滴接触法

我々の研究グループでは、一対の微小液滴の間に脂質二重膜を形成する人工膜法「液滴接触法」を発明し、その実用化を目指した研究を続けてきた。液滴接触法も脂質分子の両親媒性を利用した膜形成法である。デカンなどの油相に脂質を分散しておき、そこに水滴を滴下するとその表面には自発的に脂質単分子膜が形成される。単分子膜が表面に形成されたこの油中水滴2つを接触させることで、その界面に脂質二重膜構造が形成される[4]。この方法は、液滴の滴下操作のみで簡便・迅速に再現良く平面脂質二重膜を形成できる点で優れる。我々は、本方法をイオンチャネル機能評価システム[5]や細胞膜センサ[6,7]へと応用すべく、これまで研究開発を行ってきた。

(3) 脂質二重膜の不安定性

平面脂質二重膜を工学利用する上での課題として、膜を作製する際の煩雑さや再現性に加えて、脂質二重膜の物理的不安定性が挙げられている。脂質二重膜は厚さがわずかに5nmほどしかなく、また非共有結合性の疎水性相互作用により膜構造を維持している。そのため、わずかな衝撃や振動などの物理的外乱や電気的揺動が加わることで、容易に破壊される。こうした脂質二重膜の不安定性は、セパレータ微小孔の縮小による膜サイズの微細化や、微小孔周縁部の表面物性を最適化することで改善できることが報告されている[8]。また、平面脂質二重膜に隣接しているウェル水溶液が揺動し、外乱となって膜破壊が生じることもある。これを避けるため、我々のグループでは微小液滴のスロッシング現象に関する研究も行った[9]。しかしながら、こうした脂質二重膜の安定化にも限度はあり、膜の破壊を未然に防ぐことは難しい。

そこで、破壊された脂質二重膜を簡便・迅速に再現性良く再形成する技術について検討を行っている。液滴接触法デバイスでは、セパレータ微小孔において脂質二重膜が破壊されると液滴同士が融合した状況となる。これまでの研究により、融合した液滴同士を物理的に分断し、再度、接触させることで脂質二重膜を再形成できることが分かっている[10]。液滴の分断と再接触はモータ等を利用すれば自動化が可能である[11]。ただし、並列処理におけるデバイスの複雑化は避けられない。本研究では、破壊された脂質二重膜の再形成方法として、微小気泡を用いて融合液滴を分断する技術について提案した。

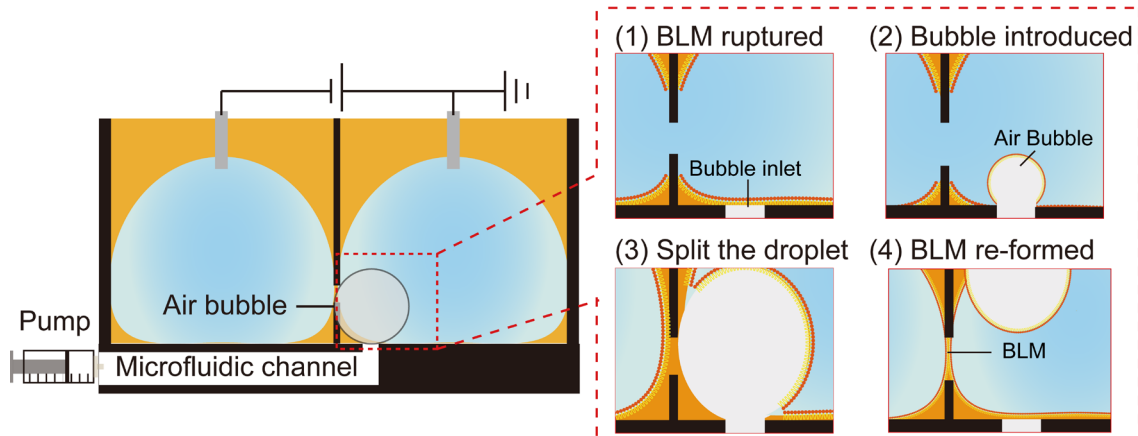


図 1：微小気泡による平面脂質二重膜の再形成のコンセプト図。(左) デバイスのイメージ図。マイクロ流路を設け、外部のポンプから気泡を導入する。(1)～(4) 膜が破壊された状態から、微小気泡により再形成されるまでの状態図。

2. 実験方法

(1) 微小気泡発生デバイスの作製

脂質二重膜再形成のための微小気泡発生デバイスは、前述の液滴接触法を基盤とした[5]。8 字状に 2 つの円筒ウェル(直径 4 mm、深さ 3 mm)が接したダブルウェルを設け、その境界に直径 600 ミクロンの微小孔をもつセパレータを配置している。ウェルは液滴の位置・接触圧力を制御しており、液滴は微小孔において接触して、面積が制御された平面脂質二重膜が形成される。微小気泡は、ウェル底面に設計した流路を介して発生させた。本研究では、気泡出口は直径 0.5 mm とした。また、電気計測のための銀-塩化銀電極もそれぞれのウェル底面に配置した。デバイスの模式図を図 1 に示す。

微小気泡発生デバイスは CAD で構造設計を行い、小型 NC 切削機を用いて作製した。材料にはアクリル板(3 mm 厚、および 1 mm 厚)を用いた。切削したアクリル部品はウェル、ウェル底部、マイクロ流路をそれぞれ設計した 3 層からなる。これらは、アラインメントを施した上で熱圧着により接合した。セパレータ部品は別途アクリルフィルムから切削し、2 つのウェル境界に挿入して接着した。気泡導入流路は、テフロンチューブを介してシリンジに接続した。シリンジに空気を満たし、シリンジポンプによって気泡を吐出させた。ポンプを用いることで、吐出速度、および吐出時間を制御することができる。電極は銀線をウェル裏面から挿入し、ウェル底部側の表面は銀-塩化銀ペーストを塗布・乾燥させた。

(2) 微小気泡の発生による膜再形成

微小気泡発生デバイスを用いた脂質二重膜の破壊や再形成の検証は、ナノポア形成ペプチド(アルファ-ヘモリン)の膜への再構成を電気生理学的に観測することで行った。まず、各ウェルに 20 mg/mL DPhPC 脂質/デカン溶液、および 1 M KCl バッファ溶液を逐次滴下することで平面脂質二重膜を作製した。次に、デバイスに物理的振動を外部から故意に加えて脂質二重膜を破壊した。破壊が確認で

きたら、シリンジポンプを稼働させ、マイクロ流路を通してウェル底面より微小気泡を発生させた。平面脂質二重膜の破壊や気泡の発生、その後の脂質二重膜再形成の成否といった一連の過程について、電気計測を行った。計測にはパッチクランプ増幅器を用い、50 mV 定電圧印加下で、電流変化を観測した。観測時はアルミ箔で作製したファラデーケージでデバイスを覆うことで、周囲の電磁波ノイズの影響を低減させた。

3. 結果と考察 微小気泡発生による平面脂質二重膜の再形成過程の模式図を図 1 に示す。前述の通り、液滴接触法デバイスではセパレータ微小孔に脂質二重膜が形成され、膜が破壊されると、この微小孔において各ウェルの 2 つの液滴が融合した状態となる(図 1-1)。本研究では、セパレータ近傍のウェル底面より微小気泡を発生させ、片側のウェル中に微小気泡を導入する(図 1-2)。導入された気泡は、セパレータ微小孔に達すると融合した液滴を分断する(図 1-3)。その後、気泡はウェル底面より分離して液滴表面から気中に解放される。これに伴い、セパレータ微小孔からも気泡が離れることで、液滴同士が再度接触し、脂質二重膜が再形成される(図 1-4)。

図 2 に、本デバイスを用いて微小気泡により平面脂質二重膜が再形成されたときの電流応答の結果を示す。図中 A-1 は、脂質二重膜が破壊された状況を示す。液滴同士が融合し、銀-塩化銀電極間が 1M KCl 溶液でショートした状態であるため、電流値はオーバーフローしている(図 1-1 に対応)。A-2 において、微小気泡の発生のため、シリンジポンプを稼働させた(図 1-2 に対応)。直後の A-3 では、気泡がセパレータに到達したことで、電極間が絶縁された状態となる。そのため、オーバーフローしていた電流値がゼロとなっている(図 1-3 に対応)。A-4 における鋭いピーク信号は、微小気泡がウェル底面を離れて気中に解放され、セパレータ微小孔において液滴同士が再接触した際に生じたものと考えられる。その後、一定の待ち時間の後、A-5 においてステップ状の電流値上昇が観測されている。こ

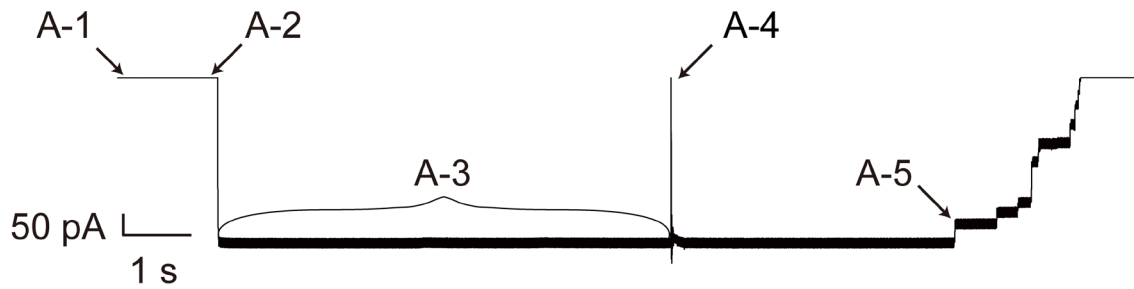


図2：脂質二重膜の再形成プロセスにおける典型的な電流応答。

これは、アルファ-ヘモリシンが脂質二重膜に再構成し、ナノポアを形成した際に生じる信号である。本実験条件におけるステップサイズ（コンダクタンス）も先行研究と一致しており、少なくとも A-5 の信号が観測されるまでに平面脂質二重膜が再形成されたと考えられる（図 1-4 に対応）。

本研究では、微小気泡を利用した平面脂質二重膜の再形成法について試作したデバイスによる実証を行った。電流値変化の観測結果より、微小気泡により脂質二重膜が再形成できることを示した。一方で、微小気泡による液滴分断などで課題があることも明らかとなり、気泡発生条件の検討やデバイス構造の改良を進める予定である。本成果は、物理的に不安定な脂質二重膜の再形成を簡便・迅速に行えることを示したものであり、今後、自動化や複数の脂質二重膜への適用などに繋がるものと考えている。

【謝辞】

本研究内容の一部は、文部科学省地域イノベーション・エコシステム形成プログラム、および国立研究開発法人科学技術振興機構 大学発新産業創出プログラム（START）の支援により行われました。ここに感謝申し上げます。

【参考文献】

1. P. Mueller, D. O. Rudin, H. T. Tien, W. C. Wescott, "Methods for the Formation of Single Biomolecular Lipid Membranes in Aqueous Solution," *J. Phys. Chem.*, vol. 67, pp. 534-535, 1963.
2. M. Montal and P. Mueller, "Formation of Biomolecular Membranes from Lipid Monolayers and a Study of Their Electrical Properties," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 69, pp. 3561-3566, 1972.
3. T. Osaki and S. Takeuchi, "Artificial Cell Membrane Systems for Biosensing Applications," *Anal. Chem.*, vol. 89, pp. 216-231, 2017.
4. K. Funakoshi, H. Suzuki, and S. Takeuchi, "Lipid Bilayer Formation by Contacting Monolayers in a Microfluidic Device for Membrane Protein Analysis," *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 24, pp. 8169-8174, 2006.
5. K. Kamiya, T. Osaki, K. Nakao, R. Kawano, S. Fujii, N. Misawa, M. Hayakawa, and S. Takeuchi, "Electrophysiological Measurement of Ion Channels on Plasma/Organelle Membranes Using an On-Chip Lipid Bilayer System," *Sci. Rep.* vol. 8, 17498, 2018.
6. N. Misawa, S. Fujii, K. Kamiya, T. Osaki, T. Takaku, Y. Takahashi, and S. Takeuchi, "Construction of a Biohybrid Odorant Sensor Using Biological Olfactory Receptors Embedded into Bilayer Lipid Membrane on a Chip," *ACS Sens.* vol. 4, no. 3, pp. 711-716, 2019.
7. T. Yamada, H. Sugiura, H. Mimura, K. Kamiya, T. Osaki, and S. Takeuchi, "Highly Sensitive VOC Detectors Using Insect Olfactory Receptors Reconstituted into Lipid Bilayers," *Sci. Adv.*, vol. 7, eabd2013, 2021.
8. L. K. Bright, C. A. Baker, M. T. Agasid, L. Ma, and C. A. Aspinwall, "Decreased aperture Surface Energy Enhances Electrical, Mechanical, and Temporal Stability of Suspended Lipid Membranes," *ACS Appl. Mater. Interface*, vol. 5, pp. 11918-11926, 2013.
9. Y. Izawa, T. Osaki, K. Kamiya, S. Fujii, N. Misawa, S. Takeuchi, and N. Miki, "Suppression of Sloshing by Utilizing Surface Energy and Geometry in Microliter Cylindrical Well," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 258, pp. 1036-1041, 2018.
10. Y. Tsuji, R. Kawano, T. Osaki, K. Kamiya, N. Miki, and S. Takeuchi, "Droplet Split-and-Contact Method for High-Throughput Transmembrane Electrical Recording," *Anal. Chem.*, vol. 85, pp. 10913-10919, 2013.
11. M. Gotanda, K. Kamiya, T. Osaki, N. Miki, and S. Takeuchi, "Automated Generation System of Cell-Sized Liposomes," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 292, pp. 57-63, 2019.

昆虫嗅覚受容体を発現したセンサ細胞の 機能評価技術の開発

「人工細胞膜システム」グループ

三村 久敏、大崎 寿久、高森 翔、竹内 昌治

1. はじめに(1) 昆虫の嗅覚受容体

生物における匂いの感知は、嗅覚器官に存在する細胞によって行われ、細胞膜に局在する嗅覚受容体タンパク質を通して行われる。嗅覚受容のメカニズムは脊椎動物と無脊椎動物では異なっており、昆虫の場合は、膜タンパク質である嗅覚受容体 OR (Olfactory receptor) と嗅覚受容体共受容体 Orco (Olfactory receptor co-receptor) が相互作用することによってその役割を果たしている [1,2]。OR は、匂い物質を識別する役割を担い、様々な匂い物質を受容する必要から、蚊では 80 種類前後が存在することが知られている [3,4]。Orco は、膜を介してナトリウムイオン (Na^+) やカルシウムイオン (Ca^{2+}) などの陽イオンを輸送するイオンチャネルとしての役割を担い、OR と相互作用することにより、匂い物質に反応して活性化されるリガンド依存性陽イオンチャネルとして機能する。細胞表面に局在する嗅覚受容体に匂い物質が結合すると、活性化された嗅覚受容体を通して、細胞内への陽イオンの流入が濃度勾配に従って起こり、細胞膜の脱分極が引き起こされる。細胞の脱分極は、信号として神経細胞系を伝達され、匂いの関知が行われる。現在では、匂い物質の検知を目的として昆虫などの嗅覚受容体を発現させた培養細胞はセンサ細胞と呼ばれ、次世代の匂いセンサへの応用を目指した研究が盛んに行われている [5]。

(2) センサ細胞

匂い物質に対するセンサ細胞の応答検出には、蛍光反応が利用されることが多い。この目的のため、センサ細胞を作製する際には、OR と Orco の遺伝子に加え、カルシウムセンサタンパク質 (GCaMP) の遺伝子が培養細胞に導入される [6]。GCaMP は、緑色蛍光タンパク質である GFP、 Ca^{2+} 結合タンパク質であるカルモジュリン、ミオシン軽鎖ペプチドフラグメントの 3 つを遺伝子工学的に融合したタンパク質であり、 Ca^{2+} がカルモジュリンに結合することにより、GFP の蛍光強度が変化する。これを利用することにより、センサ細胞内の Ca^{2+} 濃度の変化を、GCaMP の蛍光強度変化としてモニターすることが可能となっている [7]。そのため、センサ細胞に発現させた嗅覚受容体にリガンドである匂い物質が結合すると、活性化された嗅覚受

容体を通して細胞外の Ca^{2+} が細胞内に流入し、細胞質の Ca^{2+} 濃度の上昇が起こり、GCaMP の蛍光強度も増加する。その結果、センサ細胞では、溶液中の匂い物質の有無を蛍光強度の変化として検知することが可能となる。

(3) センサ細胞を利用した匂いセンサ

生物の嗅覚受容体は、分子構造を認識することにより、匂い物質を特異的に結合する。そのため、センサ細胞を利用した匂いセンサは、人工物である従来の酸化半導体センサなどに比べ、高い選択性と感度を有すると考えられる。細胞センサを利用した匂いセンサの用途としては、匂い診断による病気の早期発見など、将来的には健康医療分野での応用が期待されている。生物の嗅覚を利用した最近の例としては、匂いに対する線虫の化学走性を利用することにより、早期がんの検出法が実用化されている [8]。さらに、がんに関連すると考えられる匂い物質のデータベースの整備も進められており [9]、匂い物質に対する蚊の嗅覚受容体の反応特異性も明らかにされていることから [3,4]、それらを比較参照することにより、がんに関連した匂い物質検出における昆虫嗅覚受容体の応用可能性についても議論されている [5]。このように、昆虫の嗅覚受容体を発現させたセンサ細胞は、次世代の匂いセンサにおける基盤要素として大きな注目を集めており、前述の蛍光反応を利用した光学的方法による匂いセンサだけでなく、センサ細胞の応答を電気的に検出する匂いセンサの開発も進められている [10,11]。その一方で、センサ細胞の応答検出法には、光学的方法と電気的方法があることから分かるように、これまでに作製された匂いセンサの設計思想は開発グループごとに異なっている。そのため、光学的方法と電気的方法による応答性能の比較はもちろんのこと、異なったデバイスを用いて行われたセンサ細胞自体の性能評価も単純に比較できるものではなかった。本研究では、細胞センサの応答強度や反応特性といった機能評価を同一条件下で行うため、光学的方法または電気的方法、あるいはその両方でセンサ細胞の応答を検出するためのデバイス開発を行った。

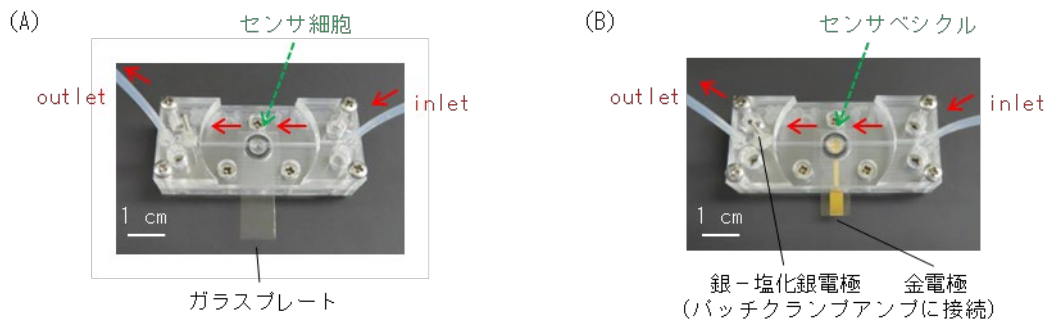


図1：作製した機能評価デバイス。(A) 光学的方法で用いるもの。(B) 電気的方法で用いるもの。

2. 実験方法

(1) 機能評価デバイスの作製

本研究で作製した機能評価デバイスは、匂い物質に対するセンサ細胞の応答を、同一条件下で光学的及び電気的に検出することを目的としている。光学的方法では、匂い物質に反応したセンサ細胞中の GCaMP の蛍光変化を検出する。電気的方法では、固定化標本法により [12]、匂い物質で活性化された嗅覚受容体を通して輸送される陽イオンを、電荷移動に伴う容量性電流として検出する。機能評価デバイスの構造は、センサ細胞を注入するためのウェルと、そこに匂い物質を含む溶液を送液するためのマイクロ流路で構成されている。ウェルの底面は、光学的方法と電気的方法に応じて、スライドガラスまたは金電極をそれぞれ配置して固定する構造となっている。電気的方法で参照電極として使用するため、マイクロ流路には、銀-塩化銀電極も配置した。

機能評価デバイスは、CAD で構造設計を行い、小型 NC 切削機と熱圧着プレス機を用いて作製した。材料にはアクリル板 (4 mm 厚と、1 mm 厚) を用いた。切削したアクリル部品は、マイクロ流路とウェルからなる上層部、スライドガラスまたは金電極を固定するための下層部からなる。上層部のマイクロ流路とウェルは熱圧着により接合した。上層部と下層部の固定にはネジを用いた。光学的方法で用いるスライドガラスには、ガラスカッターを用いて所定の大きさに切断した No.3 厚ガラス (0.25~0.35 mm) を使用した。電気的方法で用いる金電極は、所定の大きさに切断した No.3 厚ガラス基盤に、アクリル板を切削して作製したマスクをポリイミド耐熱テープで密着固定し、クロム、

金の順でスパッタすることによって作製した。銀-塩化銀電極は、銀線に銀-塩化銀ペーストを塗布して作製した。マイクロ流路の入口と出口には、匂い物質を含む溶液のウェルへの送液と廃液を行うため、テフロンチューブ ($\phi 0.5$ mm) を接続し、接着剤を用いて固定した。

(2) 光学的方法による検出

光学的方法で用いる機能評価デバイスの検証は、昆虫嗅覚受容体を一過性発現させたセンサ細胞を作製し、その匂い物質への応答を検出することによって行った。ヒトスジシマカ (*Aedes albopictus*) の嗅覚受容体 (AaOR8) と共受容体 (AaOrco)、カルシウムセンサタンパク質 (GCaMP) の遺伝子を動物細胞 (HEK293) に導入し、匂い物質 (1-octen-3-ol) に反応するセンサ細胞を作製した。センサ細胞は、培養で用いた培地をハンクス平衡塩溶液 (0.1% BSA 含む) に置換し、機能評価デバイスのウェルに添加した。機能評価デバイスは、37°C の CO₂ インキュベータ内に 30 分間静置することにより、ウェル底面のスライドガラスにセンサ細胞を接着させた。機能評価デバイスの入口側テフロンチューブには、分岐したテフロンチューブを介して、2 台のシリンジポンプを接続した。機能評価デバイス内のセンサ細胞の観察は、倒立顕微鏡を用いて行った。匂い物質に対するセンサ細胞の応答は、匂い物質を含まないハンクス平衡塩溶液 (0.1% BSA 含む) に続けて、匂い物質を含む同様液を連続して送液し、その際に起こる、青色光で励起され、緑色光で検出される GCaMP の蛍光変化を記録した。

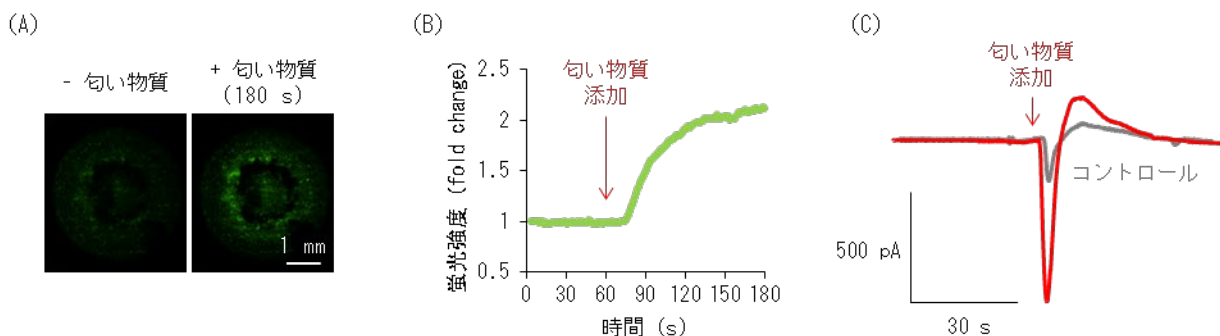


図2：匂い物質に対するセンサ細胞及びセンサベシクルの応答。(A) センサ細胞の蛍光顕微鏡観察像。(B) 光学的方法によって検出したセンサ細胞の応答。(C) 電気的方法によって検出したセンサベシクルの応答。匂い物質 (1-octen-3-ol) の濃度はいずれも 100 μ M。

(3) 電気的方法による検出

電気的方法で用いる機能評価デバイスの検証は、検体応答の確実性を保証するため、昆虫嗅覚受容体を再構成した脂質ベシクル（センサベシクルと呼ぶ）を用いて行った。センサベシクルの合成には、無細胞合成系を利用した。まず、試験管内転写反応により、AaOR8 と AaOrco の DNA を鋳型として、それぞれの mRNA を合成した。次に、両方の mRNA を、脂質と一緒に無細胞翻訳系に加えることにより、匂い物質（1-octen-3-ol）に反応するセンサベシクルを試験管内で合成した。センサベシクルは、遠心操作によって簡易精製し、機能評価デバイスのウェルに添加した。機能評価デバイスは、スイングロータのバケットの中心に置いて遠心することにより、センサベシクルをウェル底面の金電極に吸着させた。センサベシクルの吸着と金電極の絶縁のため、金電極表面には、チオール層と脂質層からなる自己組織化単分子膜層を予め形成した。機能評価デバイスの入口側テフロンチューブには、分岐したテフロンチューブを介し、3 台のシリンジポンプを接続した。電流計測を行うため、金電極と銀-塩化銀電極はパッチクランプアンプに接続した。匂い物質に対するセンサベシクルの応答は、塩濃度と匂い物質の有無が異なる 3 種類の溶液を送液することにより検出した。① 低塩濃度溶液、② 高塩濃度溶液、③ 匂い物質を含む高塩濃度溶液、を順番に送液することにより、昆虫嗅覚受容体は匂い物質によって塩濃度勾配存在下で活性化される。その結果、活性化された昆虫嗅覚受容体を通して陽イオンの輸送が起こり、これによって誘起されたと考えられる容量性電流を記録した。

3. 結果と考察

作製した機能評価デバイスを図 1 に示す。同一のデバイス構造を用いて、スライドガラスと金電極を交換することにより、匂い物質に対するセンサ細胞またはセンサベシクルの応答を検出することが可能である。これにより、光学的方法と電気的方法による検出手法の比較に加え、評価対象の匂いセンサ素子を同一条件下で直接に比較することが可能になると考えられる。

図 2 に、本研究で作製した機能評価デバイスを用いて検出した、匂い物質に対するセンサ細胞またはセンサベシクルの応答結果を示す。図 2A は、機能評価デバイスのウェル中における、匂い物質の添加前後のセンサ細胞の蛍光観察像を示す。匂い物質の添加によって緑色蛍光の輝度が増し、センサ細胞が反応していることが分かる。粒子状の構造体それぞれが一個のセンサ細胞に相当する。緑色蛍光はセンサ細胞に発現している GCaMP に由来する。蛍光強度の増加は、匂い物質の添加によって活性化された昆虫嗅覚受容体を通し、細胞外から細胞内に Ca^{2+} が輸送され、細胞質の Ca^{2+} 濃度の上昇を検知した GCaMP の蛍光強度が増加したことによる。図 2B は、匂い物質の添加によって起こった、センサ細胞の蛍光強度の時間変化を示す。匂い物質の添加から、およそ 2 分後に蛍光強度は最大に達している。

図 2C に、機能評価デバイスを用いて検出した、匂い

物質に対するセンサベシクルの応答結果を示す。匂い物質を含まない溶液（コントロール）に比べ、匂い物質を含む溶液を送液した際には、計測された電流値が増加していることを示している。溶液中の匂い物質に対し、センサベシクルが反応していることが分かる。電流値の増加は、匂い物質によって昆虫嗅覚受容体が活性化され、これを通して運ばれる Ca^{2+} が増加したためと考えられる。輸送される Ca^{2+} が増加したことにより、それによって誘起される容量性電流も増加したと考えられる。

本研究では、次世代の匂いセンサ素子となり得るセンサ細胞やセンサベシクルの検証や比較のため、これに利用できる機能評価デバイスを作製した。作製したデバイスは、顕微鏡を利用した光学的方法と、パッチクランプアンプを利用した電気的方法により、匂い物質に対するセンサ細胞やセンサベシクルの応答を検出することができる。昆虫嗅覚受容体を発現させたセンサ細胞とセンサベシクルを用いた実証試験により、前者は蛍光観察により、後者は容量性電流計測によって、匂い物質に対する応答をそれぞれ検出できることを示した。今後は、電気的方法によるセンサ細胞の応答検出や、光学的方法と電気的方法による同時検出についても検討する。本デバイスの活用により、光学的方法と電気的方法の詳細な比較を行うと共に、匂い物質に対するセンサ細胞とセンサベシクルの応答特性を明らかにすることにより、昆虫嗅覚受容体を利用した次世代匂いセンサ素子の詳細な解析が可能になるものと考えられる。

【謝辞】

本研究は、JST、CREST、JPMJCR18S5 の支援を受けたものです。ここに記して感謝申し上げます。

【参考文献】

1. Sato K, et al., Nature 2008, 452, 1002-1006
2. Wicher D, et al., Nature 2008, 452, 1007-1011
3. Carey AF, et al., Nature 2010, 464, 66-71
4. Wang G, et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 2010, 107, 4418-4423
5. Hirata Y, et al., Lab Chip 2021, 21, 2643-2657
6. Mitsuno H, et al., Biosens. Bioelectron 2015, 65, 287-294
7. Tian L, et al., Nat. Methods 2009, 6, 875-881
8. Hirotsu T, et al., PLOS ONE 2015, 10, e0118699
9. Janfaza S, et al., Database 2017, bax055
10. Lee M, et al., ACS Nano 2015, 9, 11728-11736
11. Bazzone A, et al., Methods Enzymol 2017, 594, 31-83

DNA を用いた脂質二重膜接着・融合技術

「人工細胞膜システム」グループ

高森 翔、三村 久敏、大崎 寿久、竹内 昌治

1. はじめに

(1) 脂質二重膜の融合

脂質二重膜（脂質膜）は両親媒分子である脂質が水溶液中で炭化水素鎖間の疎水性相互作用を介して構成する構造であり、原核細胞から真核細胞まであらゆる細胞膜の基本構造として知られている。

脂質膜は細胞膜だけでなく、細胞内の様々な細胞小器官の基本構造でもある。核や葉緑体、ミトコンドリアは二層の脂質膜で、小胞体やゴルジ体などは一層の脂質膜で覆われている。これら脂質膜で分画された構造体は細胞内で物質勾配を生じさせ、この物質の偏りが細胞小器官ごとに異なる生化学的な機能性を生み出している。

脂質膜は細胞外物質の細胞内への取り込み、細胞間情報伝達などにも関係している。神経細胞間の情報伝達は、神経伝達物質を内封したシナプス小胞膜が細胞膜に融合（膜融合）し、神経伝達物質を細胞外へ放出することで行われる。この膜融合現象は細胞外でも頻繁に見られ、筋芽細胞の多核筋管への分化、受精における卵と精子の融合などが有名である。

膜融合現象を人為的に誘導することで、細胞融合やリボソーム（脂質二重膜小胞）融合、細胞・リボソーム融合を起こすことができる。特に、リボソーム・細胞融合は新しい細胞内物質導入法として近年注目されている[1]。膜融合の分子メカニズムについては現在も活発に研究が行われているが、図1のような流れだと考えられている。標的脂質膜が近接し、近接膜が同時局所破壊され、脂質膜の自発的再形成の特性によって融合膜が形成される。

(2) 電気融合

人為的に膜融合を起こす技術には様々なものがあるが、最も一般的な方法は電気融合だろう[2]。まず、リボソームや細胞などの標的サンプルに交流電場を印加し、誘電泳動現象の一つであるパールチェーン形成が誘導される。形成されたパールチェーンにパルス電場を印加すると、近接したリボソーム膜や細胞膜に電気穿孔が誘起され、自発的な脂質膜の再形成を経て膜融合が起こる。電気融合は専用の電場発生装置を用いることで比較的容易かつ短時間で行うことができる方法だが、パールチェーン形成による標的膜のペアリングが本質的にランダムなプロセスであり、狙った膜ペア以外の融合（膜Aと膜Bを融合させる際に膜A同士、膜B同士の融合も同時に起こってしまう）も頻繁に起こる（低い選択性）という欠点がある。また、リボソームや細胞の種類・組成に依存して交流電場への応答性に違いが生じるため、そもそも目的の膜ペアのパールチェーン

を形成することが難しいことも多い。さらに、過度な強度の電場は細胞を損傷させてしまうことも知られている。

(3) SNARE 模倣デバイスを用いた膜融合

細胞内ではSNAREと呼ばれるタンパク質複合体が膜融合を誘起することが知られている[3]。そして、このSNAREタンパク質は出芽酵母からヒトまで様々な真核細胞で見つかっている。近年、ペプチドの人工合成を用い、SNAREタンパク質の構造と融合メカニズムを模倣したペプチドデバイスも開発されている[4]。これらSNAREタンパク質やSNARE模倣ペプチドを用いた膜融合はその原理から選択性に優れている。また、電場の印加を必要としないという点で電気融合よりも細胞への害も少ない。しかし、複数種類の膜融合を選択に誘導するための複数種類のペプチドデバイスの設計などは原理的に難しい。

近年、ペプチドデバイス設計の低い自由度を克服する方法としてDNAを用いたSNARE模倣デバイスも開発されている[5]。DNAを用いた場合も、ペプチドと同じように高い膜融合の選択性を実現することができる。さらに、ワトソン・クリック塩基対(A/T、G/C)の選択性に起因する、配列設計における高い自由度を利用することで、選択性の高い膜融合デバイスを同時に複数種類設計することができる。この自由度の高さはDNAのプログラマビリティと言われ、DNAナノテクノロジーの分野では様々なデバイスが開発されている。しかし、これらSNARE模倣デバイスを用いた膜融合は総じてデバイス単体では電気融合などに比較すると膜融合効率が低いことが知られている[6]。

(4) DNA と電気を組み合わせた膜融合

前述したDNAのプログラマビリティを活かしつつ、融合効率を改善する方法として、DNAと電気融合を組み合わせた方法も提案されている。この方法はDNA-assisted selective electrofusion (DASE)法と呼ばれ、DNAで脂質膜の選択的接着を実現し、そこへパルス電場を印加することで接着膜の融合だけを誘起する[7]。このDASE法を用いればリボソームと培養細胞の膜融合を実現できる可能性がある。前述したようにリボソームと培養細胞の融合法は注目を集めている技術であり、本研究ではDASE法を用いたリボソームと培養細胞の融合を目指し、DNAナノデバイスを用いたリボソームと細胞の接着に関する実験を行った。

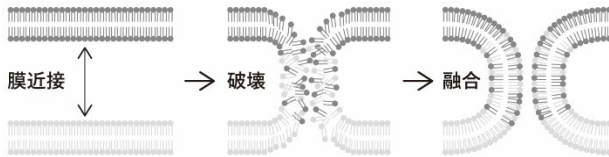


図1：脂質二重膜の融合手順。標的脂質二重膜を近接させ、同時局所破壊を行うことで、脂質二重膜の自己修復能を利用した膜融合を誘導することができる。

2. 実験方法

(1) DNA ナノデバイスの設計と構築

SNARE 模倣 DNA デバイスとして図2のような構造のDNAを設計した。各々のデバイスは2本鎖DNAのスペーサー (γ/γ^*) を中心とし、一方の末端の鎖に脂質膜へのアンカー用コレステロールが修飾されている。反対末端には相補鎖と選択的結合を起こすための1本鎖DNA (α/α^* 、 β/β^*) が付与されている。コレステロール修飾された1本鎖DNAを購入し、ハイブリダイゼーション用バッファー (100 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA) にそれぞれの1本鎖DNAを6.4 μ Mとなるように溶解した。このバッファーに溶解したDNAをPCRチューブに40 μ Lずつ分注し、サーマルサイクラーを用いて75°Cから4°Cまで9時間かけてゆっくりと温度低下し、DNAハイブリダイゼーション反応を行った。

(2) DNAを用いたリポソーム膜の機能化

まず、リポソーム(POPC/ATTO565-DOPE=100/0.1 モル比)を界面通過法で作製した(リポソーム内液: 340 mMのスクロース溶液を、外液: 140 mM グルコース+100 mM NaCl)。DNAによる膜の機能化にはリポソーム内外の浸透圧を維持した上でDNAデバイスを加え(0/64/128/192/256 nM)、室温で4時間培養した。脂質膜に固定されなかった遊離DNAについては、遠心分離(1000g, 5 min)と上清のリポソーム外液への置換を2回繰り返すことで除去した。その後、5 μ MのYOYO-1を加え、共焦点顕微鏡を用いた蛍光観察を行った。

(3) DNAを用いた細胞膜の機能化

培養したHEK293T細胞をトリプシン処理し、HBSS(-)に分散した。その後、DNAを加え(0/64/128/192/256 nM)、氷上で4時間培養した。脂質膜に固定されなかった遊離DNAについては、遠心分離(200g, 5 min)と上清のHBSS(-)への置換を2回繰り返すことで除去した。その後、5 μ MのYOYO-1と5 μ MのSYTO17を加え、共焦点顕微鏡を用いた蛍光観察を行った。

(4) DNAを用いたリポソーム・培養細胞接着

リポソームとHEK293T細胞を2.2-3の手順でDNAを用いて機能化した(ただし、DNA濃度は512 nMとした)。この際、リポソーム膜の機能化には α と β を持つDNAを、HEK293Tの機能化には α^* と β^* を持つDNAを

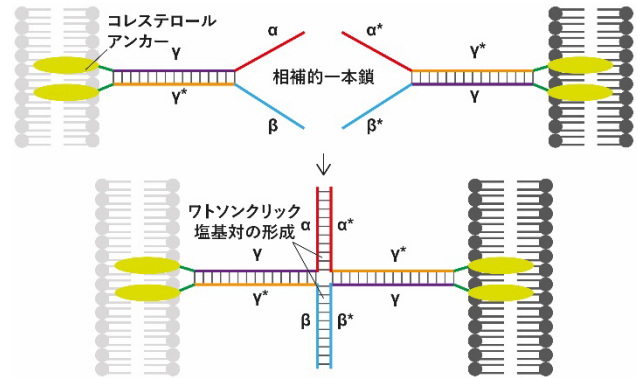


図2 本研究で作製したDNAナノデバイスの構造とDNAを介した脂質二重膜接着のメカニズム。

用いた。DNAで機能化したリポソームとHEK293T細胞を1.5 mLチューブで等体積混合し、室温で4時間培養した。その後、5 μ M YOYO-1、5 μ M SYTO17、5 μ M WGA-CF405Sを加えて蛍光染色を行い、共焦点顕微鏡で蛍光観察を行った。

3. 結果と考察

DNAデバイスで機能化したリポソームを図3に示す。リポソーム膜の機能化には前述の濃度条件のDNAを加え、室温で4時間培養した。リポソーム膜に挿入されたDNAをYOYO-1で染色して観察したところ、DNA濃度の増加とともにリポソーム膜のYOYO-1強度が上昇していく様子が見られた。リポソーム膜上のYOYO-1強度の平均値をプロットしたところ、機能化の際のDNA濃度の増加とともにYOYO-1強度の平均値が上昇する傾向が見られた。なお、プロット各点の算出につき、40個以上のリポソーム膜上のYOYO-1強度の平均値と、そのSDをプロットした。先行研究より100 nM前後でリポソーム膜状に導入できる類似のDNAデバイスの量が飽和することがわかっており、今回の実験でも同じ傾向を期待したが、エラーバーが大きくYOYO-1強度の飽和の蛍光は見られなかった。

次に、DNAで細胞膜を機能化したHEK293T細胞を図4Aに示す。前述のDNA濃度条件で機能化を行い、YOYO-1染色によりDNAを可視化した。DNA濃度が0 nMの時点で細胞表面にYOYO-1シグナルが観察された。さらに、DNA濃度の増加させていったところ、YOYO-1シグナル強度に明確な変化は見られなかった。また、すべてのDNA濃度条件において細胞膜表面にYOYO-1シグナルが局在した箇所が多く見られた。一方、SYTO17で可視化した核酸(SYTOはDNAとRNAの両方を染色することが知られている)については、細胞内の大部分の細胞質が染色されており、かつ核と考えられる箇所がより強く染色されている様子が見られた。この実験ではYOYO-1染色によって細胞膜上に挿入されるDNAデバイスの量が変化する様子が観察されると予想されたが、その様子を観察することはできなかった。この結果の解釈として、一つには細胞膜にDNAがほとんど導入できていないということが考

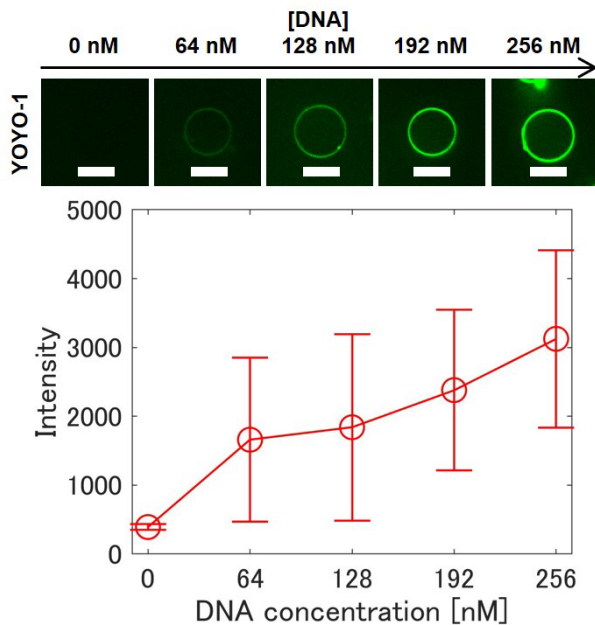


図3 DNAを用いたリポソーム膜の機能化. プロットはリポソーム膜上のYOYO-1強度の平均値±SD (各平均値の算出に付き40以上のリポソームの平均を算出). スケールバー: 10 μ m.

えられる。もう一つの可能性としては、氷上のHBSS(-)中で4時間培養している最中に細胞が劣化し、何らかの原因で溶液中に流出したDNAが細胞表面に局在してしまったということが考えられる。より明確な結果を得るためには、蛍光色素が修飾されたDNAがデバイスを用いて細胞膜の機能化の実験を行うことが必要だと考えている。

図4BにDNAデバイスで機能化したリポソームとHEK293T細胞の接着の様子を示す。図中の矢印はリポソームを示しており、矢印のないものはHEK293T細胞である。YOYO-1強度より、リポソーム膜がDNAで強く機能化できていることがわかる。一方のHEK293Tの膜上のYOYO-1強度は非常に弱いこともわかる。これらのリポソーム膜とHEK293T細胞膜の接着については界面のリポソーム膜が大きく湾曲していることから明らかだが、細胞膜をDNAで機能化する際の条件については検討が必要であることが示唆される。

本研究ではDASE法を用いたリポソームと培養細胞の融合を実現するために、リポソーム膜とHEK293T細胞膜をDNAナノデバイスで接着する実験を行った。その結果、リポソーム膜をDNAで機能化できることがわかった。一方、DNAを用いたHEK293T細胞膜の機能化にはリポソームのそれとは大きな違いがある可能性が示唆された。また、機能化したリポソームとHEK293T細胞を接着させることにも成功した。本成果を受け、今後はDASE法を用いたリポソーム・培養細胞融合に取り組むたいと考えている。具体的には細胞膜の機能化の条件検討・最適化を行い、DASE法を用いてリポソーム・培養細胞融合実験に取り組む。その後、従来の融合方法と比較してどの程度選択的な融合が可能になるのか、細胞の生存率に対する変化について解析し、将来的には細胞内への物質導入に挑戦したい。

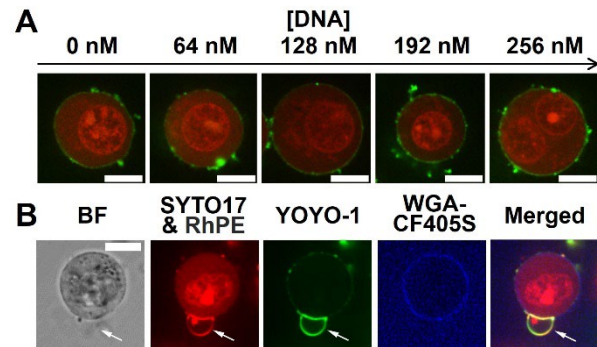


図4 (A) DNAで細胞膜を機能化したHEK293T細胞. 緑:YOYO-1、赤:SYTO17赤. スケールバー: 10 μ m. (B) DNAで機能化したリポソームとHEK293T細胞の接着. 矢印はリポソーム. スケールバー: 10 μ m.

【謝辞】

本研究内容の一部は、戦略的創造研究推進事業 CREST「機能的人工染色体の設計と利用のための革新的研究」(JPMJCR18S5)の支援により行われました。ここに感謝申し上げます。

【参考文献】

- Saito, Akira C., *et al.* "Introducing micrometer-sized artificial objects into live cells: A method for cell-giant unilamellar vesicle electrofusion." *PLoS one* 9.9 (2014): e106853.
- Zimmermann, U. "Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes* 694. 3 (1982): 227-277.
- Chen, Yu A., and Richard H. Scheller. "SNARE-mediated membrane fusion." *Nature reviews Molecular cell biology* 2.2 (2001): 98-106.
- Robson Marsden, Hana, *et al.* "A reduced SNARE model for membrane fusion." *Angewandte Chemie* 121.13 (2009): 2366-2369.
- Löffler, Philipp MG, *et al.* "A DNA-Programmed Liposome Fusion Cascade." *Angewandte Chemie International Edition* 56.43 (2017): 13228-13231.
- Stengel, Gudrun, Raphael Zahn, and Fredrik Höök. "DNA-induced programmable fusion of phospholipid vesicles." *Journal of the American Chemical Society* 129.31 (2007): 9584-9585.
- Takamori, Sho. *Electrofusion of Escherichia coli with Giant Lipid Vesicles and the Compaction of Escherichia coli Nucleoid*. Diss. University of Cambridge, 2021.

業 績

【原著論文】

1. Hironori Sugiyama, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi, and Taro Toyota
Role of negatively charged lipids achieving rapid accumulation of water-soluble molecules and macromolecules into cell-sized liposomes against a concentration gradient
Langmuir, 38, 112-121 (2022).
2. Kazuto Ogishi, Toshihisa Osaki, Yuya Morimoto and Shoji Takeuchi
3D printed microfluidic devices for lipid bilayer recordings
Lab on a Chip, 22, 890-898 (2022).

【総説】

1. 伊藤嘉玖, 大崎寿久, 三木則尚, 竹内昌治
膜タンパク質を組み込んだ人工細胞膜センサ表面と真空, 64(4), 162-167 (2021).
2. 山田哲也, 大崎寿久, 竹内昌治
蚊の嗅覚受容体を組み込んだ高感度匂いセンサの開発
AROMA RESEARCH 第86号, 22 (2), 37-42 (2021).
3. 山田哲也, 大崎寿久, 竹内昌治
呼気に含まれる匂い分子をppbレベルで検出! — 蚊の嗅覚受容体を組み込んだ高感度匂いセンサーの開発
化学 6月号, 76 (6), 12-16 (2021).
4. Yusuke Hirata, Haruka Oda, Toshihisa Osaki, and Shoji Takeuchi
Biohybrid sensor for odor detection
Lab on a Chip, 21, 2643-2657 (2021).
5. 山田哲也, 大崎寿久, 竹内昌治
蚊の嗅覚受容体を再構成した人工細胞膜センサ
におい・かおり環境学会誌2022年1月号, 53 (1), 17-24 (2022).

【書籍】

1. 杉浦広峻, 大崎寿久, 竹内昌治
脂質二重膜による膜タンパク機能計測デバイス
マイクロ・ナノ熱工学の進展, 587-592 (2021).
2. 山田哲也, 大崎寿久, 竹内昌治
昆虫の嗅覚受容体センサとは?
におい分析評価・対策事例と頻出Q&A集, 393-398 (2022).

【口頭発表】

1. Shoji Takeuchi
Biohybrid Devices—Harnessing Biofunctional Materials in Micro-Devices
2021 Virtual MRS Spring Meeting & Exhibit, 2021年4月, Online
2. 竹内昌治
生物×機械
第13回理研・未来戦略室フォーラム, 2021年5月, Online
3. 中根卓馬, 大崎寿久, 三村久敏, 高森翔, 三木則尚, 竹内昌治
匂いガス検出のための高効率ガス導入流路を有するバイオハイブリッドセンサ
化学とマイクロ・ナノシステム学会第43回研究会 (CHEMINAS43), 2021年5月, Online
4. 竹内昌治
Think Hybrid! 生物と機械を融合する
関東高分子若手研究会 2021春の講演会, 2021年6月, Online
5. Takuma Nakane, Toshihisa Osaki, Hisatoshi Mimura, Norihisa Miki, and Shoji Takeuchi
Efficient gas-to-liquid partition using gas-flow channels for cell-based gaseous odorant detection
The 21st International Conference on Solid-State Sensors, Actuators And Microsystems (TRANSDUCERS 2021), 2021年6月, Online
6. Kazuto Ogishi, Toshihisa Osaki, Yuya Morimoto, and Shoji Takeuchi
Monolithic fabrication of a lipid bilayer device using stereolithography
The 21st International Conference on Solid-State Sensors, Actuators And Microsystems (TRANSDUCERS 2021), 2021年6月, Online
7. 竹内昌治
異分野融合研究で近づくSFの世界
東進トップリーダーと学ぶワークショップ, 2021年7月, 東京及びOnline
8. 竹内昌治
バイオハイブリッドが拓く新たなセンシング
第4回デジタルバイオ分析研究会, 2021年8月, Online

9. 竹内昌治
三次元組織を作って使うバイオハイブリッド技術
第9回 Chem-Bio Joint Seminar 2021, 2021年8月,
Online
10. 竹内昌治
バイオハイブリッドが拓く超高機能デバイス
第82回応用物理学会秋季学術講演会, 2021年9月,
Online
11. 竹内昌治
バイオハイブリッド技術が切り拓く未来～体内埋め
込みデバイスから培養肉まで～
先端技術セミナー(ソニーグループ(株)R&D センター),
2021年9月, Online
12. Shoji Takeuchi
Emerging technology for Biohybrid devices
NTT Research Upgrade 2021 Summit, 2021年9月, アメ
リカ及び Online
13. Izumi Hashimoto, Toshihisa Osaki, Hiroataka Sugiura,
Hisatoshi Mimura, Norihisa Miki, and Shoji Takeuchi
Reliable re-formation of a lipid bilayer using a geometrically
guided air bubble
The 25th International Conference on Miniaturized Systems
for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2021), 2021年
10月, アメリカ及び Online
14. Kazuto Ogishi, Toshihisa Osaki, Yuya Morimoto, and Shoji
Takeuchi
Rapid fabrication of arrayed lipid bilayer devices using
stereolithography
The 25th International Conference on Miniaturized Systems
for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2021), 2021年
10月, アメリカ及び Online
15. Sho Takamori, Hisatoshi Mimura, Toshihisa Osaki, and
Shoji Takeuchi
DNA-mediated adhesion of giant liposomes with cells
towards the transplantation of artificial organelles
The 25th International Conference on Miniaturized Systems
for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2021), 2021年
10月, アメリカ及び Online
16. Hisatoshi Mimura, Toshihisa Osaki, Sho Takamori, and
Shoji Takeuchi
Dual-function device for detection of insect olfactory
receptor activity
The 25th International Conference on Miniaturized Systems
for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2021), 2021年
- 10月, アメリカ及び Online
17. 竹内昌治
“バイオハイブリッド”が拓く次世代センシング
第11回 CSJ 化学フェスタ 2021, 2021年10月, Online
18. Sho Takamori, Hisatoshi Mimura, Toshihisa Osaki,
Shoji Takeuchi
脂質共役型 DNA を用いた油中水滴界面上での脂質膜形
成
「細胞を創る」研究会 14.0, 2021年11月, Online
19. 三村久敏, 大崎寿久, 高森翔, 竹内昌治
匂いセンサ開発に向けた昆虫嗅覚受容体ベシクルを用
いた電気生理学的検出技術の開発
化学とマイクロ・ナノシステム学会第44回研究会
(CHEMINAS44), 2021年11月, Online
20. 田中葵, 高森翔, 三村久敏, 大崎寿久, 三木則尚, 竹
内昌治
毛細管を有する複数センサ細胞作製カセットの開発
第12回マイクロ・ナノ工学シンポジウム, 2021年11
月, Online
21. 竹内昌治
バイオハイブリッド技術が切り拓く未来～体内埋め込
みデバイスから培養肉まで～
第37回けいはんな「エジソンの会」, 2021年11月,
Online
22. 竹内昌治
バイオハイブリッドが拓く高感度センシング
第9回 iSyMs 全体会議, 2021年11月, Online
23. Hironori Sugiyama, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi, Taro
Toyota
Abiotic molecular transport against a concentration gradient
caused by flow-induced membrane asymmetry between the
inner/outer leaflets of cell-sized liposomes
第59回日本生物物理学会年会, 2021年11月, Online
24. Sho Takamori, Hisatoshi Mimura, Toshihisa Osaki, Shoji
Takeuchi
Adhesion of giant liposomes with cells using
lipid-conjugated DNA towards DNA-mediated fusion
第59回日本生物物理学会年会, 2021年11月, Online
25. 大崎寿久
昆虫嗅覚受容体を用いた高感度匂いセンサの開発
日本技術士会神奈川県支部講演会(第104回 CPD 講
座), 2021年11月, 横浜及び Online

- 26.竹内昌治
SFの世界に近づく先端工学～筋肉をまとうバイオハイブリッドロボットから培養肉まで～
第17回日立財団科学技術セミナー, 2021年11月,
Online
- 27.高森翔, 三村久敏, 大崎寿久, 竹内昌治
細胞小器官スケールリポソームの細胞内導入へ向けた
マイクロスケールリポソーム内包ジャイアントリポソ
ームと培養細胞の脂質共役型DNAを用いた接着
第44回日本分子生物学会年会, 2021年12月, 横浜及
びOnline
- 28.橋本和泉, 大崎寿久, 三村久敏, 三木則尚, 竹内昌治
微小気泡による脂質二重膜の再形成
令和3年度生体膜デザインコンファレンス・ミニ研究
会, 2021年12月, Online
- 29.大崎寿久
人工細胞膜技術を用いた創薬支援と次世代センサ開発
日本海水学会電気透析および膜技術研究会第50回荷電
膜コロキウム, 2021年12月, Online
- 30.Aoi Tanaka, Sho Takamori, Hisatoshi Mimura, Toshihisa
Osaki, Norihisa Miki, and Shoji Takeuchi
Cartridge device capable of spontaneous solution exchange
for sensor cell production
The 35th International Conference on Micro Electro
Mechanical Systems (IEEE MEMS 2022), 2022年1月, 東
京及びOnline
- 31.Kazuto Ogishi, Toshihisa Osaki, Yuya Morimoto, and Shoji
Takeuchi
On-site formation of lipid bilayer arrays with an air/liquid
interface
The 35th International Conference on Micro Electro
Mechanical Systems (IEEE MEMS 2022), 2022年1月, 東
京及びOnline
- 32.Shoji Takeuchi
3D tissue fabrication for biohybrid robots
MaP Distinguished Lecture Series 'Additive Manufacturing',
2022年3月, Online
- 33.杉山博紀, 大崎寿久, 竹内昌治, 豊田太郎
膜タンパク質なしにリポソーム内部に分子が濃縮され
る: リン脂質二分子膜が生命起源に果たしうる役割
第46回生命の起原および進化学会 学術講演会, 2022
年3月, Online

【記者発表、取材】

1. 竹内昌治, 大崎寿久
薬開発からバイオマシンまで! “タンパク質”人工合
成の世界
日本放送協会 (NHK), サイエンス ZERO, 2021年6月27
日
2. 竹内昌治
Growing Steak Meat in the Lab
日本放送協会 (NHK)、NHK World-JAPAN Science View,
2021年8月10日
番組HP上で2022年8月10日まで閲覧可能

【特許】

- (1) 国内特許出願 3件
- (2) 国外特許出願 0件