

研究概要集2023 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	85
◆ イオンチャネル活性の繰り返し測定を目的とする平面脂質二重膜の再形成法の開発	87
◆ 細胞センサのための匂いサンプルの効率的溶解技術の開発	90
◆ 選択的リボソーム電気融合のためのマイクロ流体デバイス	94
◆ 業績	97

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)電気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. 2022年度の研究目的

実用化実証事業10年目となる2022年度は、イオンチャネル機能評価システムについて、設立したKISTEC発ベンチャーの研究開発支援として、評価システムの計測精度および計測効率の向上を目標とした。一方で、センサ開発に関しては、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計測基盤技術の研究・開発を目標とした。

(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、これらの人工細胞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。

2022年度は、2021年度に設立した KISTEC 発ベンチャー企業「株式会社 MAQsys」の研究開発支援として、イオンチャンネル機能評価システムの計測精度および計測効率の向上に関する技術開発を目標とした。

(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。

イオンチャン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ン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認し、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。

2022年度は、標的物質に応答する細胞をセンサ素子とするセンサ細胞について、応答シグナルの電気的検出技術および匂い物質の計測基盤技術の開発を目標とした。

2. 2022年度の研究成果

(1) イオンチャン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）等の公的研究費による多くの支援と、東レエンジニアリング社の技術協力を得て、2021年8月、KISTEC 発ベンチャーとして「株式会社 MAQsys」を設立した。同社は形質膜や細胞内イオンチャン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している。2022年度は、MAQsys 社が事業開始に向けて行う研究開発に関して、イオンチャンネル機能評価システムの計測精度および計測効率の向上に関する研究支援を行った。

計測効率向上に関しては、脂質二重膜を繰り返し形成するプロセスの自動化を目的としたデバイスの開発を行った。脂質二重膜は、計測チップの一对のウェルの境界において、油中液滴同士が接触することで形成される。従来から、このウェル境界において接触した液滴を分割・再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た。そこで、計測チップのウェル境界近傍に微小薄板を上から挿入するモジュールを設計・作製した。薄板の挿入により脂質二重膜を繰り返し形成し、時間当たりのイオンチャンネル評価データ取得数を向上させることに成功した。また、これとは異なるアプローチとして、微小気泡をウェル境界近傍に発生・誘導することで液滴を分割・再接触させ、脂質二重膜を繰り返し形成する技術についても開発し

た。一方で、計測精度の向上に関しては、昨年度に導入したブタ BK チャンネルをベンチマークとしながら、他のイオンチャンネルについて調製・評価を行った。

成果展開として、協力研究員による萌芽研究を実施している。外部研究機関との共同研究も行っており、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それぞれ目的として、研究および開発を進めている。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している。KISTEC では、センサ細胞が標的物質に応答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・開発することを目標としている。

2022年度は、微小シグナルの電気的検出技術と匂い物質の計測基盤技術に関して研究を行った。センサ細胞では、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。電気的検出技術の開発では、細胞内へのイオン流入（イオン電流）を容量性電流として捉える微小電極アレイデバイスを構築した。また、匂い物質の計測基盤技術については、水溶液中への匂い物質の効率的溶解デバイスの研究を行った。匂い物質は一般に水に難溶であるため、センサ細胞のある水溶液中に効率良く溶解させる必要がある。匂い物質の溶解因子として、水溶液中の対流速度が重要であることを数値シミュレーションで示し、その結果にもとづいたマイクロ流体デバイスを設計・作製した。

(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ポソームを作製するための技術開発を行っている。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、リポソーム中に細胞核を封入する。2022年度は、細胞核封入リポソームを再現性良く作製する技術を構築した。また、リポソームと培養細胞の融合技術に関する研究成果が Nanoscale 誌に掲載された。

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。

イオンチャネル活性の繰り返し測定を目的とする 平面脂質二重膜の再形成法の開発

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. 1 イオンチャネル

イオンチャネルは、生体機能の維持において重要な役割を果たす膜タンパク質である。多くの疾患とも関係しており、細胞内における機能の解明だけでなく、治療薬開発の標的としても重要である [1]。イオンチャネルの活性を測定するための主要な手段の一つとして、電気生理学的な方法がある。このうち、平面脂質二重膜法は、現在でも精力的に開発が進められている [2]。この手法では、2つのウェルの中心に配置されたセパレータ上のマイクロポアに脂質二重膜が形成され、そこにイオンチャネルが導入される (図 1A)。各ウェル中の水溶液は、パッチクランプアンブに接続された銀/塩化銀電極と接触しており、単一分子レベルのイオンチャネルのイオン透過活性が、イオン電流として測定される。生体組織や細胞から抽出したイオンチャネルに加えて、試験管内で合成されたイオンチャネルの活性測定にも適用可能な、高い汎用性を有する方法である。

1. 2 平面脂質二重膜の形成

平面脂質二重膜の形成には、伝統的な方法として、脂質を分散した有機溶媒をマイクロポアに塗布するペインティング法や、空気と水溶液の界面に形成された脂質単層膜をマイクロポアで貼り合わせる Montal-Mueller 法などがある [3,4]。現在では、脂質二重膜の安定的形成と測定スループットの向上を目指し、微細加工技術を活用した様々なデバイスが開発されている [5]。しかし、イオンチャネルの活性を繰り返し測定する目的に適したデバイスの開発は、まだ十分に進んでいないとは言えない。

液滴接触法 (Droplet contact method, DCM) は、脂質二重膜形成において高い再現性と簡便性を兼ね備えた方法である [6]。この手法では、脂質を分散した有機溶媒中に水溶液を滴下し、2つの液滴の界面に脂質二重膜が自発的に形成される。当研究室では、この手法に基づく DCM デバイスが開発されてきた (図 1B)。DCM デバイスは、ダブルウェルチャンバで構成されており、1個のチャンバを有するシングルデバイスの他に [7]、16個のチャンバを並列化したアレイデバイスも開発されている [8]。DCM

デバイスの特徴は、ダブルウェルチャンバ単位で脂質二重膜をアレイ化することができる点である。そのため、既存の DCM デバイスに脂質二重膜の再形成機能を追加することにより、測定スループットが更に向上すると期待される。

1. 3 ワイピングブレード一体型 DCM デバイス

本研究では、イオンチャネル活性の繰り返し測定を目的として、DCM デバイスを使用した平面脂質二重膜の再形成法を開発する。これまで、DCM デバイスを利用したイオンチャネルの活性測定では、信号出現のタイミングを早めるため、疎水性の材質で作られた細いスティックを使い、マイクロポアの周囲を優しく擦るマニュアル操作が行われることがあった [7]。ここでは、この操作をデバイスによって代替し、再現性良く容易に実行するために、既存の DCM デバイスに適用可能なワイピングモジュールを開発した (図 1C)。作製したモジュールは、ワイピングブレードと呼ぶ微小な板を含み、バネと一緒に DCM デバイスに組み込むことで、ワイピングブレード一体型 DCM デバイスを開発した。このデバイスは、ワイピングモジュールを指で押し下げることにより動作する。押し下げられたモジュールは、バネの力により元の位置に戻る。実験ではまず、ワイピングブレードがマイクロポアの近くを垂直に移動することにより、マイクロポアに形成された脂質二重膜が再形成される確認した。次に、ブタの器官から調製された BK チャネルの K^+ 透過活性を測定し、新たに開発したデバイスを使用してイオンチャネルの活性を繰り返し測定できるか確認した。これにより、開発したデバイスの効果を、平面脂質二重膜の再形成によるイオンチャネル活性の繰り返し測定において評価した。

2. 実験方法

2. 1 デバイスの作製

本研究では、脂質二重膜の再形成を繰り返し行うため、1個のダブルウェルチャンバを備えたワイピングブレード一体型 DCM デバイスを作製した (図 1C)。作製したデバイスは2層構造を有し、上部にワイピングモジュール、下部にダブルウェルチャンバを配置した。ダブルウェルチャ

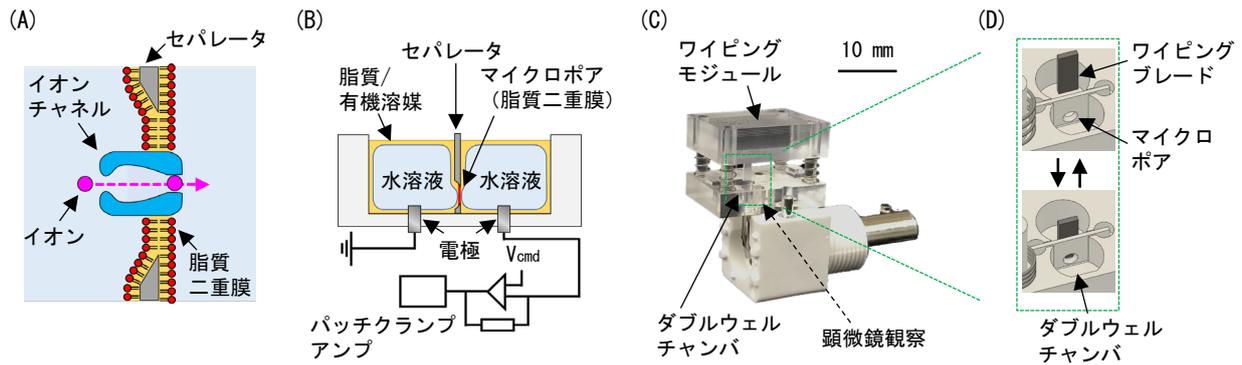


図1 (A) 平面脂質二重膜法によるイオンチャネルの活性測定。(B) DCM デバイスの模式図。(C) 開発したワイピングブレード一体型 DCM デバイス。(D) ダブルウェルチャンバ付近の模式図。

ンバは、当研究室で開発された DCM デバイスを基に、2つのウェルがそれぞれ直径 4 mm、深さ 3 mm となるように設計した。各ウェルの底部には、銀/塩化銀電極を形成するための穴を設けた。ワイピングモジュールには、ダブルウェルチャンバの一方のウェルの位置と深さに合うように、微小なワイピングブレードを 1 枚設けた。ワイピングブレードの寸法は、幅 1.5 mm、厚さ 0.4 mm、高さ 4.2 mm とした。ダブルウェルチャンバの中心には、厚さ 0.3 mm のセパレータを設置し、ダブルウェルチャンバを 2 つのウェルに分けた。脂質二重膜の形成を容易にするため、セパレータに設けられたマイクロポアには、狭端側直径 0.7 mm、広端側直径 1.1 mm のテーパを設けた。このテーパ付きマイクロポアの狭端側は、ワイピングブレードとの距離を正確に維持するため、ワイピングブレードに面するように配置した。

ワイピングブレード一体型 DCM デバイスには、ブレードをマイクロポアに整列させ、ワイピングモジュールの上下移動を可能にするため、4 組の貫通孔とガイドポストを設けた (図 1C)。ガイドポストには、押下後のワイピングモジュールが自動的に元の位置まで戻ることを可能にするためのバネを挿入した。また、ワイピングブレードの押下深度を調整するため、デバイスには高さ 1.5 mm のストップを設けた。

ダブルウェルチャンバ、ワイピングモジュール、セパ

レータは、CAM ソフトウェアを使用して設計し、小型 NC 加工機を用いてアクリル (PMMA) 板を切削して作製した。デバイスの電極は、ダブルウェルチャンバの底部に開けた穴に銀線を挿入し、穴と銀線の隙間を埋めるように銀/塩化銀インクを塗布することで作製した。インクが固化後、銀/塩化銀電極が形成された。

脂質二重膜形成におけるワイピングブレードの性能を向上させるため、ワイピングモジュールはコンパクトエッチャーを用いて酸素プラズマ処理を行った。これにより、親水性を高め、脂質を分散した有機溶媒がワイピングブレードに過度に吸着するのを防止した。

2. 2 脂質二重層の形成と評価

ワイピングブレード一体型 DCM デバイスを用いて脂質二重膜の形成は以下の手順で行った。リン脂質 (20 mg/ml) を分散した有機溶媒 (*n*-Decane) 2.5 μ l と水溶液 25 μ l をダブルウェルチャンバの両ウェルに順にピペットで加えた。これにより、形成された 2 つの液滴がセパレータのマイクロポアで接触し、それらの界面で脂質二重膜形成が促進される。脂質二重膜の再形成は、ワイピングモジュールを指で押し下げ、マイクロポアをワイピングブレードで覆うことによって実行した (図 1D)。指の圧力を緩めると、バネの反発力でワイピングモジュールは元の位置に戻る。そのため、この動作を繰り返すことにより、脂質二重膜の再形

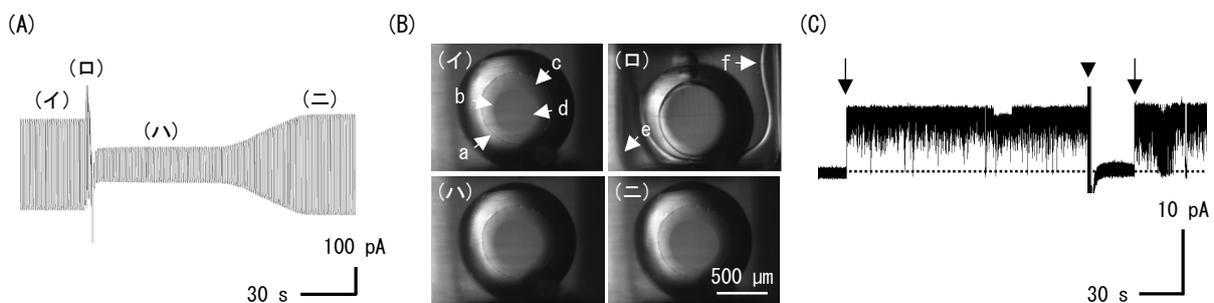


図2 (A) 電流値測定による膜容量の変化。イ～ニは、(B) のパネルに対応する。イ もともと形成されていた脂質二重膜、ロ ワイピング操作、ハ 脂質/有機溶媒層、ニ 再形成された脂質二重膜。(B) 膜形態の様子。a マイクロポア、b 境界、c 脂質/有機溶媒層、d 脂質二重膜、e ワイピングブレード、f 脂質分散有機溶媒。(C) 開発したデバイスを用いて測定した BK チャネルのイオン電流。矢印はイオン電流信号の出現開始、矢頭はワイピング操作を示す。

成を何度も行うことができる。

脂質二重膜の形成は、膜形態の光学観察と膜容量の電気測定を同時に行うことで確認した。光学観察は、デバイスの側面から、デジタル顕微鏡（倍率: 100x）と透過光を用いて行った。電気測定は、デバイスを BNC コネクタによってパッチクランプアンプに接続して行った。電磁波ノイズを抑制するため、デバイスはファラデーケージで覆った。膜容量の測定は、三角波（±50 mV、1 Hz）を電圧固定モードで印加し、時間経過に伴う電流値の変化を測定した。膜容量は、記録された電流値の振幅から算出した。

2. 3 イオンチャネルの活性検出

イオンチャネルの活性検出では、ブタ BK チャネルを含む膜小胞をサンプルとして用いた。脂質二重膜を上述の方法で形成した後、膜小胞を含む少量の水溶液を、ワイピングブレードが挿入される側のダブルウェルチャンバのウェルに添加した。イオン電流の測定は、パッチクランプアンプを用いて室温で実施し、5 kHz のサンプリング周波数と 1 kHz のローパスフィルタを用いて記録した。測定は、サンプルの添加から 30 分間、一定の電圧（+30 mV）で行った。

3. 結果と考察

ワイピングブレード一体型 DCM デバイスを用いて行った脂質二重膜の再形成は、膜容量と膜形態を確認することによって評価した。図 2A に示す通り、脂質二重膜の再形成過程では、膜容量の変化に基づく電流値変化が測定された。ワイピングモジュールを押下することで、マイクロポアにもともと形成されていた脂質二重膜による大きな膜容量を示す電流値が減少した。その後、時間とともに電流値は徐々に増加し、ワイピング操作前のレベルに戻った。また、図 2B で示す通り、マイクロポアにおける膜形態の変化が観察された。もともとマイクロポアに形成されていた脂質二重膜は、明瞭な境界により、脂質/有機溶媒層からはっきりと区別できた。ワイピングブレードが押し下げると、マイクロポアとその周辺が脂質を分散した有機溶媒により覆われ、もともと形成されていた脂質二重膜の消失が観察された。ワイピングブレードが引き上げられると、ぼやけた境界が観察され、脂質/有機溶媒層の形成が示唆された。時間が経つにつれて境界は次第に明瞭になり、脂質二重膜の再形成が確認された。電流値の測定による膜容量の変化と、顕微鏡観察による脂質二重膜の形成過程は一致していた。以上の結果から、ワイピングブレードの上下運動により、マイクロポアにもとから形成されていた脂質二重膜が消失し、新たな脂質二重膜が脂質/有機溶媒層を経て自発的に再形成されることを確認した。

ワイピングブレード一体型 DCM デバイスを利用した脂質二重膜の再形成を通じて、イオンチャネル活性を繰り返し測定できるか評価するため、ブタ BK チャネルの K^+ 透過活性を検出した。図 2C は測定した BK チャネルのイオン電流を示している。BK チャネルは、 Ca^{2+} によって活性化されることが知られている。測定に用いた水溶液に含ま

れる 2 mM Ca^{2+} 存在下では、BK チャネルは高いイオン透過活性を示した。イオン透過孔のゲートはほぼ常に開いた状態にあると推測される。測定した電流値は +30 mV の印加電圧時において 9.5 pA を示し、これは以前に報告された値と類似していた [9]。ワイピング操作により、BK チャネルの信号は一旦消失し、その後再び現れた。この結果は、前述のマイクロポアで観察された脂質二重膜の再形成結果と一致する。つまり、もともと形成されていた脂質二重膜に BK チャネルを含む小胞が融合すると、BK チャネルの活性を示す電流信号が出現する。次に、ワイピング操作により脂質二重膜が攪乱されると、電流信号も消失する。その後、脂質/有機溶媒層を経て脂質二重膜が自発的に再形成されると、新たな BK チャネルを含む小胞が融合し、BK チャネルの活性を示す信号が再度出現したと解釈される。

本研究では、イオンチャネル活性の繰り返し測定を可能にするため、脂質二重膜の再形成が行えるワイピングブレード一体型 DCM デバイスを開発した。脂質二重膜の再形成は、マイクロポアを備えたセパレータに沿って、ワイピングブレードを上下に動かすことで実現した。再形成された脂質二重膜は、顕微鏡による光学的観察と、膜容量増加に伴う電流値変化の測定により確認した。開発したデバイスを用いて BK チャネル活性を測定した結果、脂質二重膜の再形成を通じてイオンチャネル活性を繰り返し検出できることを確認した。今後は、並列化したワイピングブレード一体型 DCM デバイスの並列化の度合いを高め、測定対象となるイオンチャネルの種類を拡張を通じて、開発したデバイスの適用性の検証をさらに進める計画である。これにより、一分子レベルでのイオンチャネルの機能解析や、イオンチャネルに対する薬剤の活性評価への貢献が期待される。

【謝辞】

本研究は、JST START (JPMJST1811) による支援、JSPS 科研費基盤研究 B (17H02758)、科研費基盤研究 S (JP21H05013) の助成を受けて行われました。井出徹 教授 (岡山大学) からは、BK チャネルのサンプルを供与いただきました。ここに記して感謝申し上げます。

【参考文献】

- [1] Santos R, et al., Nat. Rev. Drug. Discovery 2017, 16, 19-34
- [2] Ogishi K, et al., Lab Chip 2022, 22, 890-898
- [3] Mueller P, et al., Nature 1962, 194, 979-980
- [4] Montal M, et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 1972, 69, 1937-1942
- [5] Osaki T, et al., Anal Chem 2017, 89, 216-231
- [6] Funakoshi K, et al., Anal Chem 2006, 78, 8169-8174
- [7] Kawano R, et al., PLoS One 2014, 9, e102427
- [8] Kawano R, et al., Sci Rep 2013, 3, 1995
- [9] Latorre R, et al., Annu Rev Physiol 1989, 51, 385-399

細胞センサのための匂いサンプルの効率的溶解技術の開発

人工細胞膜システムグループ

大崎寿久、中根卓馬、三村久敏、高森翔、三木則尚、竹内昌治

1. はじめに

1. 1 バイオハイブリッド匂いセンサ

環境にはさまざまな匂い物質が存在し、私たちの生活の様々な場面において重要な役割を果たしている。一例として、私たちは匂いによって食物や危険を感知するだけでなく、匂いは私たちに対して感情的な影響を与えたり、あるいはコミュニケーションツールとしても使用されたりしている。そのため、匂い物質を高感度かつ信頼性高く検出できるセンサの研究開発が近年盛んに行われている[1,2]。

生物の匂い感知では、匂い物質と結合し、シグナルを発する開始点となる嗅覚受容体が重要な役割を果たしている。特に昆虫の嗅覚受容体は、リガンド依存性イオンチャネルとして知られ、標的匂い物質の結合により、イオンチャネルが開き、細胞内に陽イオンを流入させることが知られている[3]。こうした嗅覚受容体は、従来の酸化半導体型センサと比べて匂い物質に対する高い特異性と感度を持ち、またナノメートルサイズの微小な素子であるため、次世代の匂いセンサとして注目されている。生物の嗅覚受容の仕組みを工学的に素子として利用するセンサは、バイオハイブリッド匂いセンサと呼ばれている[4-6]。

バイオハイブリッド匂いセンサの一つとして、特定の嗅覚受容体を培養細胞に発現させた細胞匂いセンサがある(図1a)。細胞匂いセンサでは、発現した嗅覚受容体と標的とする匂い物質と結合することで、細胞内にカルシウムイオンを種とした陽イオンが流入する。細胞内にカルシウムイオン感受性の蛍光タンパク質を同時に発現させてお

くことで、標的匂い物質を蛍光輝度として検出することができる。

1. 2 気中の匂いサンプル検出の課題

バイオハイブリッド匂いセンサは、標的匂い物質に対する特異性や感度に優れるが、嗅覚受容体や細胞などは水溶液中でなければ活性を維持できない。一方で、多くの匂い物質は分子量 400 程度までの揮発性有機化合物であるため、一般的に疎水的で水に溶けにくいことが知られている。すなわち、気中の匂い物質を水溶液中の嗅覚受容体や細胞に送達するための手法・機構がバイオハイブリッド匂いセンサの研究開発における大きな課題となっている[7,8]。

従来研究では、匂い物質と水との接触表面積を増大させることで、匂い物質を水中に溶解させる試みが行われている。一例として、匂い物質を水中でバブリングする手法や、反対に気中の匂い物質に向けてミスト状の水を噴霧する手法が研究され、匂い物質を水溶液中に効果的に溶解させることに成功している(図1b)[9,10]。しかしながら、これらの方法では、バイオハイブリッド匂いセンサによる匂い物質検出の前段階処理として、匂い物質を溶解するための追加の装置や手順が必要となり、バイオハイブリッド匂いセンサシステムが有する応答性や携帯性のような利点が損なわれる懸念がある。

そこでわれわれは、バイオハイブリッド匂いセンサの特長を生かしたその場匂い検出に適する匂い物質の水中への溶解技術の開発を検討した。本研究では、溶解度に対する水溶液中の対流の効果に着目した。溶液中の対流は、気

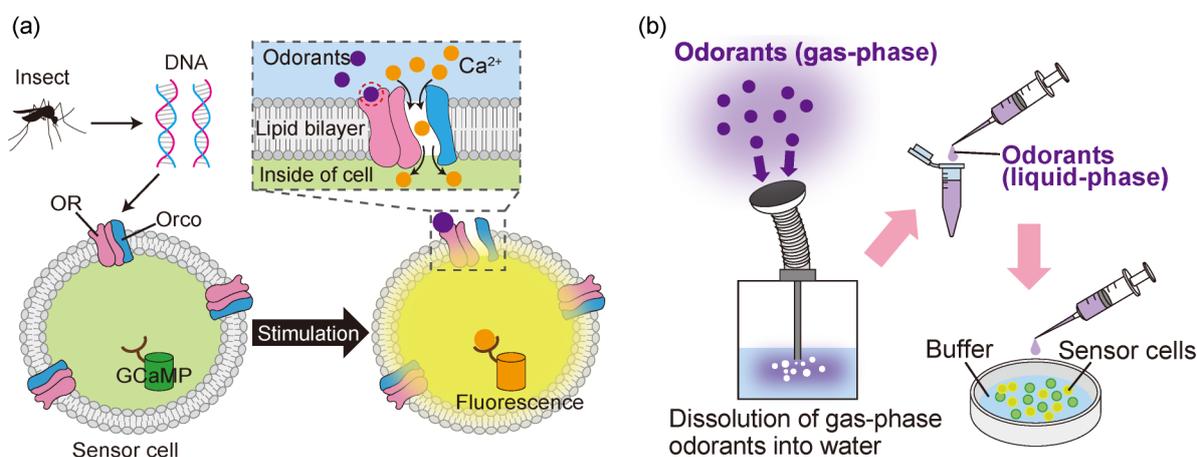


図1 (a) 細胞匂いセンサによる匂い物質検出メカニズム模式図。(b) 従来研究における気中匂いサンプルの収集技術[*]。

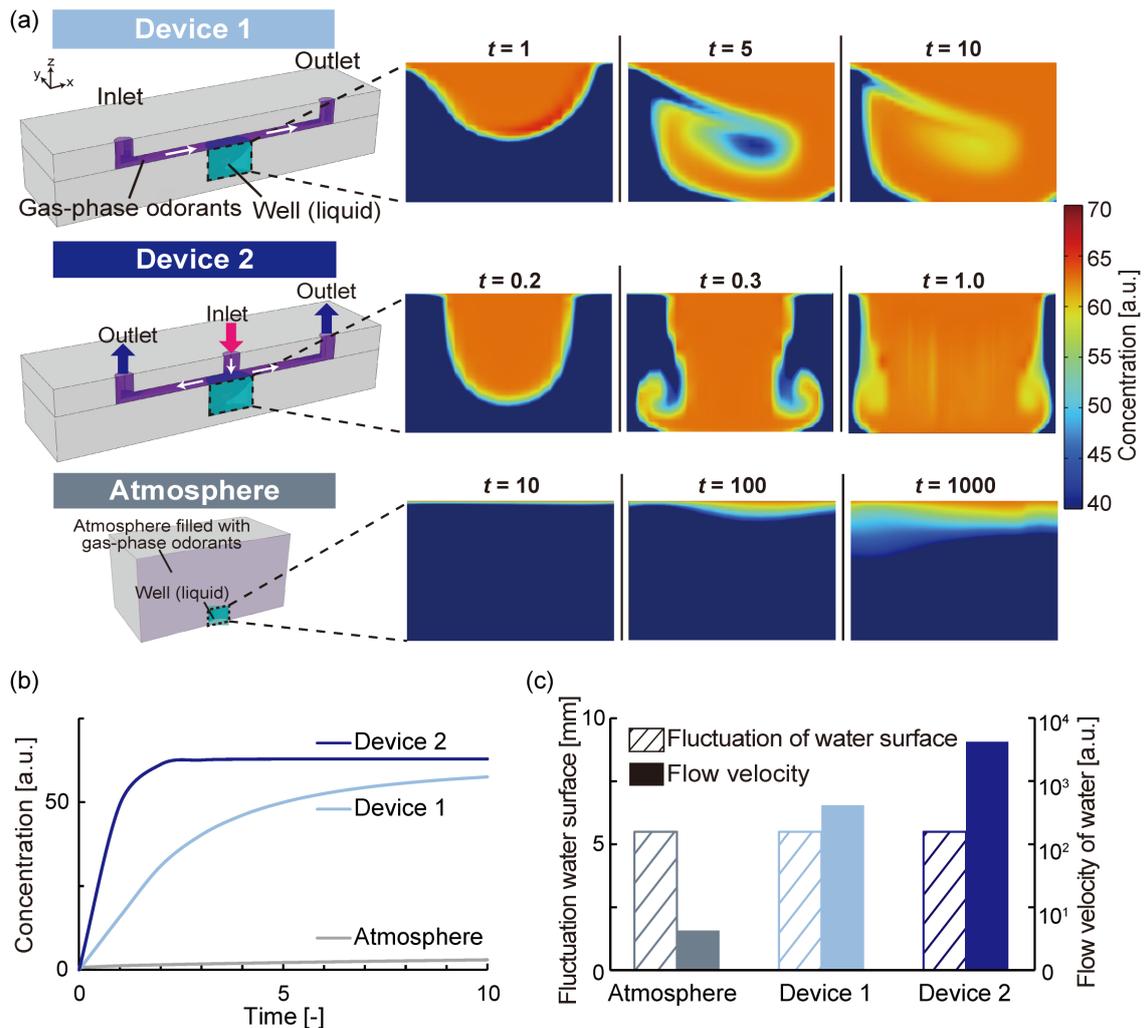


図1 シミュレーションにもとづく気中匂い物質のマイクロウェル水溶液中への溶解。(a) 各デバイス形状およびウェル内における匂い物質の濃度分布。(b) ウェル水溶液中の匂い物質の平均濃度の時間変化。(c) 気液界面の表面長 (左軸) と、ウェル水溶液中の平均対流速度 (右軸)。

液界面における匂い物質の気中から液中への分配において拡散律速となることを防ぐ効果があると期待できる。また、溶液中の対流は、接する気体の流れにより生じるせん断力によって誘起できると考えられるため、従来研究では困難であった匂い物質の溶解と検出のプロセスを単一のデバイスに統合することも可能となる。そこで本研究では、気中の匂い物質を水溶液中に効率良く溶解させるため、センサに気体を導入するマイクロ流路の形状に関して設計・開発を行った。このガスフローデバイスは、匂い物質導入用のマイクロ流路と、細胞センサのための水中環境を維持するための円筒形のマイクロウェルで構成される。まず、匂い物質の効率的溶解に重要となる設計要素について COMSOL Multiphysics による数値シミュレーションを用いて検討を行う。また、シミュレーションにもとづいてデバイスを作製し、匂い物質の水中への溶解量の比較を行う。最後に、センサデバイスに細胞センサを搭載し、気中の匂い物質検出の実証実験を行う。

2. 数値シミュレーション

ガスフローデバイスのモデルは、前述の通り、匂い物質を含むのガス導入路と水を満たした円筒形マイクロウェルからなる。ここでは、気液界面に対する匂い物質の導入方向が異なる2つのデバイス形状について、匂い物質の溶解度をシミュレーションした。図2aに示すように Device 1 は気液界面に水平に、Device 2 は気液界面に垂直にガス導入路が設置されている。ウェル直径は 5.5 mm、深さ 4 mm とした。対照条件としてガスの流れのない条件でのシミュレーションも行った。図1aのヒートマップ図は、ウェルに溶解した匂い物質の濃度分布の、それぞれのデバイスにおいて代表的な時間ステップでの結果を示している。匂い物質濃度が水中の対流に沿って時間発展している様子が分かる。Device 1 では、ガスの流れの方向に沿って同心円状の一方向の流れが観察され、Device 2 では左右対称な循環流が観察された。対照条件では、匂い物質の溶解は拡散によって気液界面から非常にゆっくりと進行した。デバイス設計ごとの匂い物質の溶解度の時間変化と対流速

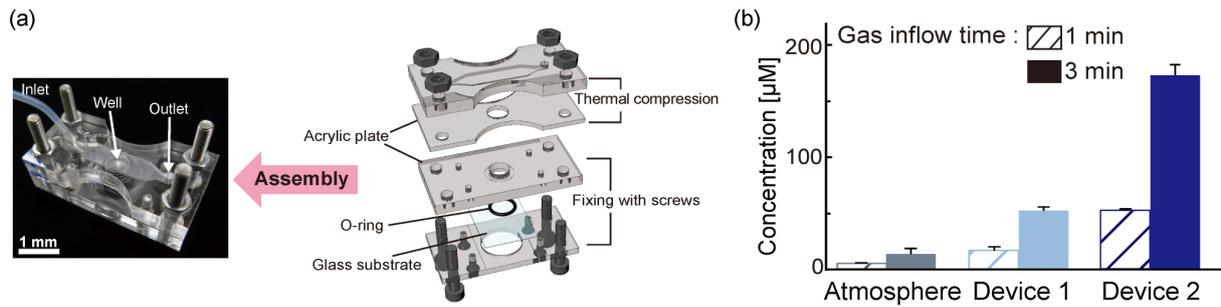


図2 (a) ガスフローデバイスの模式図と組み立て後の写真。(b) ウェル水溶液中の標的匂い物質濃度。

度を図 2b, 1c に示す。濃度と速度はウェル全体で平均値として求めた。本結果が示すように、ウェル内の水の対流速度と匂い物質の溶解性には正の相関が見られた。これは、導入路によるガスの流れがウェル内で対流を引き起こし、それが匂い物質の溶解に寄与したと考えられる。気中の匂い物質が水表面に接触すると、気液間で物質の移動が起こる。水中に流れがない場合、匂い物質の濃度は界面で飽和し、拡散律速となる。一方で、水中の対流は界面での匂い物質の飽和を防ぎ、気中から液中への物質の移動を阻害しないため、高い溶解性をもたらすと考えられる。一方で、気液界面の接触面積も匂い物質の溶解を促進するため、ガス流による水面の揺らぎをデバイスごとにシミュレーションした。計算の簡単化のため 2 次元モデルを用い、表面積に代えて表面長を指標とした。しかしながら、図 2c に示すようにデバイス設計に関係なく表面長にはほとんど変化が生じないことが分かった。したがって、匂い物質の溶解は、デバイス形状によって定められる水の対流速度に応じて向上したと考えられる。

2. 実験方法

2. 1 匂い物質濃度の定量方法

シミュレーション結果にもとづいて、ガス導入路とマイクロウェルからなる多層構造のガスフローデバイスを作製した (図 3a)。ガス導入路やウェル部分は、小型 NC 加工機を用いてアクリルを切削し作製した。また、ウェル底部は顕微鏡観察のためカバーガラスを使用した。それぞれの部品は、O リングなどを用いて、ボルト・ナットにより固定した。

ガス状の匂いサンプルは、ガス発生器を用いて調製した。規定容器中の標的匂い物質 (1-octen-3-ol) を 35 度で加熱し、乾燥 N_2 ガスを 0.2 L/min で導入することで 3 ppm の匂い物質を得た。匂い物質濃度は、ガスクロマトグラフを用いて定量した。

ガスフローデバイスのウェル水溶液中への標的匂い物質の溶解度測定は次の通り行った。まず、ウェルに水溶液を滴下してデバイスをガス発生器に接続し、0.2 L/min の流量で標的匂い物質を 1 分間または 3 分間デバイスに導入した。すぐにデバイスを開封し、ウェルから規定量の溶液を抽出し、ガスクロマトグラフで定量した。

2. 2 細胞センサによる匂い検出方法

ガスフローデバイス中に細胞センサを搭載して標的匂い物質の検出を行った。まず、ウェルに細胞センサを播種し、細胞がウェル底面のガラス基板に接着するまで 1 時間保持した。そのご、培地を計測用バッファに交換し、ガス導入路に標的匂い物質を 5 分間導入した。その際、倒立蛍光顕微鏡を用いて細胞センサの蛍光輝度の変化を観測した。

3. 結果と考察

3. 1 デバイス中の匂い物質濃度

デバイスごとの標的匂い物質の溶解度の比較を図 3b に示す。3 ppm の匂い物質をデバイスに導入したとき、経時的に濃度が上昇していることが分かる。デバイス間では、シミュレーション結果と同様に、対照実験、Device 1、Device 2 の順に、気中から溶解する匂い物質の濃度が顕著に増加することが確認された。シミュレーションに沿うこの実験結果は、気中の匂い物質の溶解性が水溶液中の対流によって向上し、ガス導入路の形状に依存して大きく変化することを示している。

3. 2 匂い物質に対する細胞センサの応答

開発したデバイスによる気中匂い物質の液中への効率的溶解性を検証するため、細胞センサを使用して標的匂い物質の検出を行った。Device 1 と 2、および対照条件と比較した。ただし、Device 2 については、より溶解濃度を高めることができるよう、ウェル深さを 2 mm に変更した Device 2b を用いた。図 4 は細胞センサの蛍光応答の時間変化を示している。蛍光輝度は、標的匂い物質存在下で上昇し、匂い物質を含まないキャリアーガス (N_2) のみの場合には上昇しなかった。このことから、調製した細胞センサが、標的匂い物質に対して正しく応答していることが示された。匂い物質存在下の条件では、匂い物質導入後、蛍光輝度が上昇するまでに遅延が確認された。この遅延時間は、気中から液中に匂い物質が溶解し、細胞センサに到達するのに必要な時間であると考えられる。遅延時間を蛍光輝度変化の 0% (0 秒) から最大輝度値 10% までの時間と定義した場合、遅延時間は、対照条件で 138 秒、Device 1 で 50 秒、Device 2b で 37 秒でした。また、蛍光輝度が 10% から 90% まで増加するのに要する応答時間については、

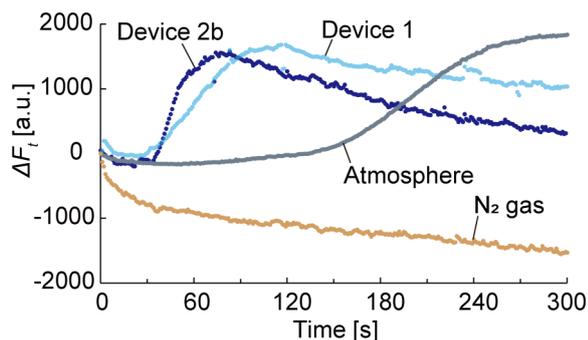


図3 デバイスごとの細胞センサの蛍光応答。

それぞれ 108 秒、40 秒、26 秒でした。こうした結果は、対照条件では、拡散律速となり匂い物質の溶解が進まず、細胞センサの応答に遅延が生じ、またセンサ応答後も十分な匂い物質濃度に到達するまでに長時間を要したことを示している。同様に、Device 1 と 2b の比較においても、匂い物質の溶解が速い Device 2b において、遅延時間・応答時間ともに最短となる結果となった。以上、ガスフローデバイスにより、気中の匂い物質の水溶液中への溶解を促進できることが示された。また、溶解促進により細胞センサの物質検出感度にも寄与できると考えられる。

【謝辞】

本研究内容の一部は、JSPS 科研費 JP21H05013、および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] Hirata, Y.; Oda, H.; Osaki, T.; Takeuchi, S. Biohybrid Sensor for Odor Detection. *Lab Chip* 2021, 21, 2643–2657.
- [2] Osaki, T.; Takeuchi, S. Artificial Cell Membrane Systems for Biosensing Applications. *Anal. Chem.* 2017, 89, 216–231.
- [3] Sato, K.; Pellegrino, M.; Nakagawa, T.; Nakagawa, T.; Vosshall, L. B.; Touhara, K. Insect Olfactory Receptors Are Heteromeric Ligand-Gated Ion Channels. *Nature* 2008, 452, 1002–1006.
- [4] Misawa, N.; Fujii, S.; Kamiya, K.; Osaki, T.; Takaku, T.; Takahashi, Y.; Takeuchi, S. Construction of a Biohybrid Odorant Sensor Using Biological Olfactory Receptors Embedded into Bilayer Lipid Membrane on a Chip. *ACS Sensors* 2019, 4, 711–716.
- [5] Yamada, T.; Sugiura, H.; Mimura, H.; Kamiya, K.; Osaki, T.; Takeuchi, S. Highly Sensitive VOC Detectors Using Insect Olfactory Receptors Reconstituted into Lipid Bilayers. *Sci. Adv.* 2021, 7, eabd2013.
- [6] Hirata, Y.; Morimoto, Y.; Nam, E.; Takeuchi, S. Portable Biohybrid Odorant Sensors Using Cell-Laden Collagen

Micropillars. *Lab Chip* 2019, 19, 1971–1976.

- [7] Lee, S. H.; Oh, E. H.; Park, T. H. Cell-Based Microfluidic Platform for Mimicking Human Olfactory System. *Biosens. Bioelectron.* 2015, 74, 554–561.
- [8] Deng, H.; Mitsuno, H.; Kanzaki, R.; Nakamoto, T. Extending Lifetime of Gas-Phase Odor Biosensor Using Liquid Thickness Control and Liquid Exchange. *Biosens. Bioelectron.* 2022, 199, 113887.
- [9] Terutsuki, D.; Mitsuno, H.; Sato, K.; Sakurai, T.; Mase, N.; Kanzaki, R. Highly Effective Volatile Organic Compound Dissolving Strategy Based on Mist Atomization for Odorant Biosensors. *Anal. Chim. Acta* 2020, 1139, 178–188.
- [10] Bouchard, D.; Hunkeler, D. Solvent-Based Dissolution Method to Sample Gas-Phase Volatile Organic Compounds for Compound-Specific Isotope Analysis. *J. Chromatogr. A* 2014, 1325, 16–22.

選択的リポソーム電気融合のためのマイクロ流体デバイス

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. 1 人工細胞内反応の制御

近年、細胞内反応などを模倣した人工細胞の構築を目指すボトムアップ合成生物学が注目を集めている。この人工細胞を構築する際、脂質二重膜小胞であるジャイアントリポソームが人工細胞のシャーシとしてよく用いられる。人工細胞に機能性を持たせるためには、その内部に必要な反応物質が内封される。このとき人工細胞に付与する細胞内生化学反応には、反応開始に何らかの刺激を要するタイプと、反応物質の混合によって自発的に反応が開始してしまうタイプがある。前者を人工細胞内で行う場合、反応物質は人工細胞内に予め混合・封入され、光や温度などの外部刺激によって内部反応が開始される。一方、後者のタイプの反応を人工細胞内で行う場合、混合した反応物を人工細胞内に封入する間に反応が開始してしまい、反応タイミングの制御が困難という問題がある。この問題を解決するための1つのアプローチとして、反応物を別々の人工細胞に分けて内封しておき、適切なタイミングでそれらを融合させ、内部反応物質を混合し、目的の反応開始を制御することが考えられる。

1. 2 電気融合法

電気融合法は実装が簡単であるため、効果的な人工細胞の融合方法として知られている[1]。一般的に電気融合は①ターゲットのペアリングと②ペアの融合の2ステップからなるが、最も一般的なやり方では、①交流電場を利用したペアリングと②パルス電場を用いたペアの融合が行われる。また、電気融合にはターゲットよりもはるかに大きなサイズの電極を備えたバルクデバイスが用いられることが多い。しかし、大きな電極間に形成される広範な電場の中では、ターゲットのペアが無作為に形成され、さらに目的の組み合わせ以外のペアや複数のターゲットが数珠状に繋がったものなどが多く形成されてしまう。これにより、パルス電場の印加を行った際、それら複数のターゲットの融合物などが不可避に生成される。そのため、正確な電気融合を行うためには、ターゲットの選択的なペアリング機構を別に用意する必要がある。先行研究ではマイクロマニピュレーション技術[2,3]、またはマイクロトラップとマイクロ電極を備えたマイクロ流体デバイス[4,5]などを用いて正確な電気融合が報告されている。しかし、前

者は、開放下での操作による資料の汚染、試料の蒸発、さらに溶液交換ができないといった欠点を持っている。また、後者にはマイクロトラップを用いた流路内でのペアリングは原理的に完全に制御しきれないという欠点がある。

1. 3 ハイドロダイナミックペアリング法

人工細胞の正確なペアリングに利用可能な方法として、マイクロ流体デバイス中でのハイドロダイナミックペアリング法がある。この方法は、流路中に長い分岐流路(バイパス流路)と短く細い流路を並列させることで、それぞれの流路への体積流量を制御し、流路を流れるターゲットを決定論的に捕獲できる方法である。先行研究ではこの方法を用いてマイクロビーズをマイクロ流体デバイス内に配列・アレイ化し、それらを選択的にペアリングできることが報告されている[6]。

1. 4 リポソーム選択的電気融合デバイス

本研究では、細胞サイズのリポソームを正確にペアリング、ならびに電気融合することが可能なマイクロ流体デバイスを構築する。われわれのデバイスは、図1Aに示されている通り、トラップチャンネルとバイパスチャンネルからなるハイドロダイナミックトラップシステムを2つ備えている。これらのハイドロダイナミックトラップシステムは、鏡面対称に配置され、中央のペアリングサイトで接続されている。これにより、それぞれのチャンネルでトラップされたリポソームの物理的なペアリングが可能になる(図1B)。さらに、デバイス内のペアリングサイトの上下には、電気融合のための低融点合金からなるマイクロ電極を備えている(図1C)。マイクロチャンネルの設計は、図1Dに示すように、細胞サイズのリポソームが主にトラップおよびペアリングされるように設計した。作製されたデバイス(図1E)を使用し、細胞サイズリポソームの選択的なペアリングと電気融合を実証します。

2. 実験方法

2. 1 デバイスの作製

本研究のマイクロ流体デバイスは以下のように作製した。まず、ソフトリソグラフィーでマイクロ流路構造を転写したPDMSを作製し、プラズマボンディングを用いてガラスにPDMSを接着した。その後、真空充填法[7]を用いて低融点合金を電極流路に流し込み、最後に導線を装着

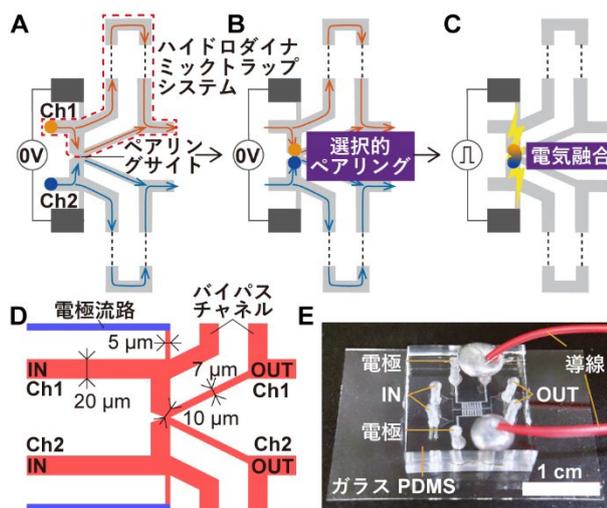


図 1 (A-C)デバイスの概念図、(D)デバイスの設計、(E)作製したデバイス。

した。

2. 2 リポソーム作製

本研究で用いたリポソームは標準的なエレクトロフォーメーション法で作製した。まず、モル比 0.1%の蛍光脂質を含む 1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholine (POPC)を2枚の ITO コートガラスの導電面にスピコートし、脂質コートした ITO ガラス面で U 字のシリコンスペーサーを挟み、チャンバーを作製した。チャンバー内にリポソーム内液 (340 mM スクロース) を流し込み、10Hz の交流電場 (2 V_{pp}) を 1.5 時間印加した。その後、プラスチック製のディスポスポイトを用いてリポソームをリポソーム外液 (140 mM グルコース + 100 mM NaCl) へ回収し、1,000 × g の遠心分離を 5 分かけ、上澄みをリポソーム外液に置換した。

2. 3 リポソームペアリング及び電気融合実験

異なる蛍光脂質で標識した 2 種類のリポソームをそれぞれシリンジに充填し、シリンジポンプを用いてデバイス内に流し込んだ。デバイスを顕微鏡ステージ上にセットし、マイクロ流路中を流れてくるリポソームの様子を顕微鏡に装着したカメラでモニタリング、およびレコーディングした。リポソーム導入時のシリンジポンプの流量は 0.005-0.04 μL min⁻¹ の範囲にセットした。

リポソームのペアが形成されたら、シリンジポンプを止めることでマイクロ流路内の流量を徐々に下げ、ペアリングサイトにリポソームペアが形成されている間にパルス電圧 (800 V mm⁻¹) を上下のマイクロ電極に印加することで、リポソームペアの電気融合を誘起した。電気融合過程については顕微鏡に装着したカメラでリアルタイムモニタリング、およびレコーディングを行った。

3. 結果と考察

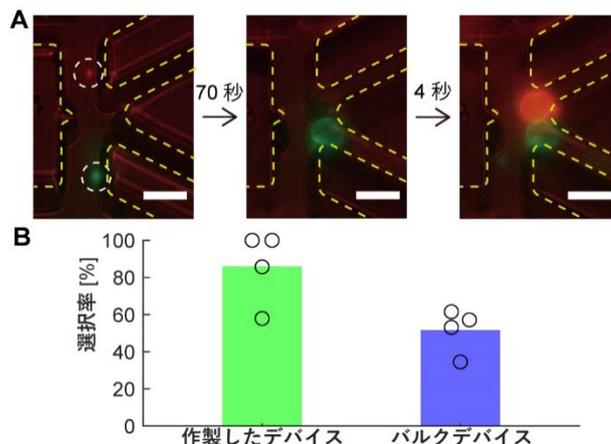


図 2 デバイス中でのリポソームのペアリングの様子(A)、ペアリングの選択率(B)。

3. 1 リポソームのペアリング

作製したマイクロ流体デバイス中でのリポソームのトラッピングの様子を図 2A に示す。

図 3A に見られる通り、上下の流路それぞれに左から右へ向かってリポソームを流したところ、まず緑色のリポソームが下の流路でトラップされ (図 2A 真中)、その 4 秒後に赤色のリポソームが上の流路でトラップされた (図 2A 右)。これらのリポソームは物理的に接触しており、赤色のリポソームと緑色のリポソームのペアが形成された状態にある。

デバイス中で形成されたリポソームのペアについて、そのペア形成の選択率を計算したものを図 2B にプロットした。ここでは選択率を観察されたすべてのリポソームペアのうち色が異なるリポソームペアの割合として定義した。なお、比較として、2つの平行バルク電極からなるバルクデバイス中で通常の交流電場を用いてペアリングを行った際のペア選択率についても観察、測定し、プロットした。作製したマイクロ流体デバイス中の選択率は平均約 80% であったのに対し、バルクデバイス中では平均約 50% だった。これらは作製したマイクロ流体デバイスには高い選択性があり、バルクデバイスには全く選択性がないことを示している。また、作製したマイクロ流体デバイスは原理的には 100% の選択性を持つはずがやや低くなっている点については、結合した 2 つのマイクロ流体トラッピング流路の界面での揺らぎによるものと考えている。

3. 2 トラップしたリポソームの大きさ分布

次に、作製したマイクロ流体デバイス中でトラップ・ペアリングしたリポソームについて、その直径を算出し、ヒストグラムを描画した (図 3)。比較対象として作製したデバイスに流したリポソームサンプルの直径分布についてもヒストグラムを描画した。

それぞれの直径分布を計算したところ、流したリポソ-

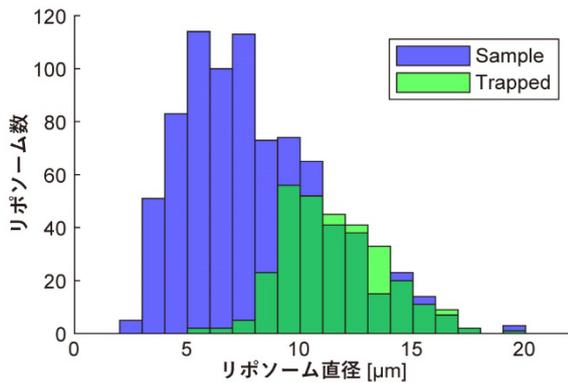


図 1 実験に使用したリポソームとトラップされたリポソームの直径分布。

ムの直径が平均 $11.5 \pm 2.3 \mu\text{m}$ (mean \pm SD)であるのに対し、トラップされたリポソームの直径は $8.0 \pm 2.3 \mu\text{m}$ (mean \pm SD)であることがわかった。また、前者の変動係数は $CV=40\%$ であったのに対し、後者は $CV=20\%$ だった。これらは作製したマイクロ流体デバイスにはトラップするリポソームのサイズに関する選択性があることを示している。

3. 3 リポソームの電気融合

作製したマイクロ流体デバイス中でペアリングしたリポソームの電気融合実験を行った。形成された色の異なるリポソームペアに対し、幅 $50 \mu\text{m}$ 秒、 800Vmm^{-1} のパルス電圧を印加したところ、リポソームの融合が観察された (図 4A)。

続いて印加電圧を変化させながら ($600\text{--}800 \text{Vmm}^{-1}$) マイクロ流体デバイス中でのリポソーム電気融合の成功率を算出し、プロットした (図 4B)。比較の対象として、バルクデバイス中でも同様の実験を行い、その成功率を算出・プロットした。バルクデバイス中では先行研究の報告通り、 600Vmm^{-1} で再現性良く電気融合に成功した (成功率約 80%) が、作製したマイクロ流体デバイス中では融合は見られなかった。電圧を 700Vmm^{-1} に上げたところ、マイクロ流体デバイス中でも融合の成功が見られたが、成功率は約 20%にとどまった。一方、バルクデバイスでは成功率が約 60%までやや低下した。 800Vmm^{-1} ではマイクロ流体デバイス中での融合成功率は 60%まで向上した。一方、バルクデバイス中の成功率は更に低下し、約 50%となった。

作製したマイクロ流体デバイスでバルクデバイスや先行研究よりも高い電圧が必要であった原因は、デバイスの設計値からのズレが原因だと考えている。今回作製したマイクロ流体デバイスを顕微鏡下で確認したところ、PDMS製の流路の角が設計値よりも丸くなっていることがわかった。これはフォトマスク作製時の過剰な露光やその後の Cr エッチングの過剰、SU-8 鋳型を UV 硬化させる際に、過剰に露光をしてしまったことなどが考えられる。その結果、リポソームペア形成位置が設計時に予定していた位置よりもやや下流にシフトしてしまい、パルス印加時に電場

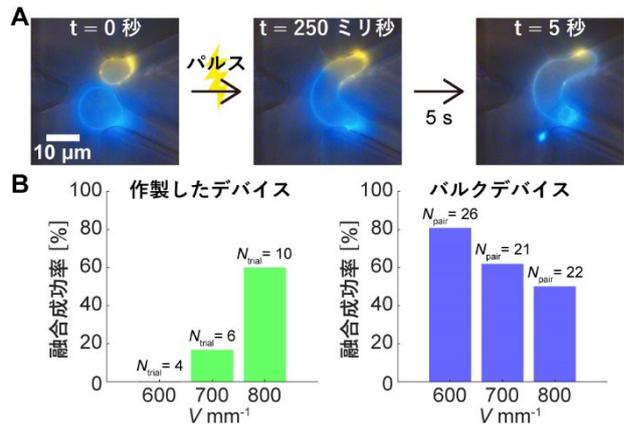


図 4 作製したマイクロ流体デバイス中でペアリングしたリポソームの電気融合(A)、およびその成功率(B)。

が効率的にリポソームペアにかからず、融合率が低下したと考えている。

【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)、科研費 (JP21H05013、JP22K15080)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] S. Takamori, P. Cicuta, S. Takeuchi L. Di Michele, DNA-assisted selective electrofusion (DASE) of Escherichia coli and giant lipid vesicles, *Nanoscale* 14 (2022) 14255-14267.
- [2] E. Toda, N. Koiso, A. Takebayashi, M. Ichikawa, T. Kiba, K. Osakabe, Y. Osakabe, H. Sakakibara, N. Kato, T. Okamoto, An efficient DNA-and selectable-marker-free genome-editing system using zygotes in rice, *Nature plants* 5 (2019) 363-368.
- [3] N. Bezlyepkina, R.S. Gracià, P. Shchelokovskyy, R. Lipowsky, R. Dimova, Phase diagram and tie-line determination for the ternary mixture DOPC/eSM/cholesterol, *Biophysical Journal* 104 (2013) 1456-1464.
- [4] A.M. Skelley, O. Kirak, H. Suh, R. Jaenisch J. Voldman, Microfluidic control of cell pairing and fusion, *Nature methods* 6 (2009) 147-152.
- [5] T. Robinson, P.E. Verboket, K. Eyer P.S. Dittrich, Controllable electrofusion of lipid vesicles: initiation and analysis of reactions within biomimetic containers, *Lab on a Chip* 14 (2014) 2852-2859.
- [6] T. Teshima, H. Ishihara, K. Iwai, A. Adachi, S. Takeuchi, A dynamic microarray device for paired bead-based analysis, *Lab on a Chip* 10 (2010) 2443-2448.
- [7] K. Sugahara, Y. Morimoto, S. Takamori, S. Takeuchi, A dynamic microarray device for pairing and electrofusion of giant unilamellar vesicles, *Sensors and Actuators B: Chemical* 311 (2020) 127922.

業 績

【原著論文】

1. Sho Takamori, Pietro Cicuta, Shoji Takeuchi, and Lorenzo Di Michele
DNA-assisted selective electrofusion (DASE) of *Escherichia coli* and giant lipid vesicles
Nanoscale, Vol. 14, 14255-14267 (2022)

【総説】

1. 大崎寿久、竹内昌治
人工細胞膜技術による創薬支援と次世代センサ開発
Nanofiber 学会誌, Vol. 13 (1,2), 25-31 (2022)
2. 大崎寿久、竹内昌治
人工細胞膜を用いるバイオハイブリッドセンサ
クリーンテクノロジー, Vol. 32 (11), 68-73 (2022)

【口頭発表】

1. 大岸憲人、大崎寿久、森本雄矢、竹内昌治
昆虫嗅覚受容体を用いた匂いセンサ信号の即時解析
化学とマイクロ・ナノシステム学会 第45回研究会 (CHEMINAS 45), 2022年5月, 東京及びオンライン
2. 竹内昌治
バイオハイブリッドが拓く新たな地平線
横浜市立大学医学研究科医科学専攻 大学院医学セミナー, 2022年5月, オンライン
3. 竹内昌治
細胞を使うモノづくりによるバイオハイブリッドシステム
第7回細胞生物若手の会交流会, 2022年6月, 東京及びオンライン
4. 竹内昌治
バイオハイブリッド匂いセンサ
日本学術振興会 R025 先進薄膜界面機能創成委員会 第9 研究会, 2022年6月, オンライン
5. 竹内昌治
バイオハイブリッドロボティクス
日本学術会議 機械工学委員会ロボット学分会 (第25期・第4回), 2022年6月, 福岡及びオンライン
6. 大崎寿久、中尾賢治、三村久敏、杉浦広峻、神谷厚輝、竹内昌治
イオンチャネル創薬支援のための MAQ システム開

発

第三回生体膜デザインコンファレンス, 2022年7月, 東京

7. 大崎寿久、山田哲也、杉浦広峻、三村久敏、神谷厚輝、竹内昌治
昆虫嗅覚受容体と機械の融合による匂いセンサ
第三回生体膜デザインコンファレンス, 2022年7月, 東京
8. Shoji Takeuchi
Biofabrication for biohybrid robotics
International Society for Biofabrication (ISBF) Virtual Event, 2022年7月, Online
9. 竹内昌治
異分野融合研究で近づく SF の世界
甲府南高校 SSH 事業「先端技術講座」, 2022年8月, オンライン
10. Shoji Takeuchi
Biohybrid robotics
2022 JSME-IIP/ASME-ISPS Joint Conference on Micromechatronics for Information and Precision Equipment (MIPE2022), 2022年8月, 名古屋及びオンライン
11. 大崎寿久、竹内昌治
人工細胞膜チップ事業化のための実用化研究開発
ナノファイバー学会第12回年次大会, 2022年9月, オンライン
12. 竹内昌治
バイオハイブリッドセンサによる高感度検出
第83回応用物理学会秋季学術講演会シンポジウム, 2022年9月, 宮城及びオンライン
13. 竹内昌治
バイオハイブリッドのすすめ
日本女子大学理学セミナー, 2022年9月, 東京
14. 高森翔、三村久敏、大崎寿久、竹内昌治
選択的リポソームペアリング・電気融合のためのダイナミックマイクロアレイデバイス
「細胞を創る」研究会 15.0, 2022年10月, 東京及びオンライン
15. 高森翔、三村久敏、大崎寿久、近藤興、新富美雪、

- 新富圭史、大杉美穂、竹内昌治
Encapsulation of *Xenopus* egg extract into giant liposomes by phase-transfer of inverted emulsions
第 74 回日本生物工学会大会, 2022 年 10 月, オンライン
16. Kazuto Ogishi, Toshihisa Osaki, Yuya Morimoto, and Shoji Takeuchi
Real-time estimation of physiological stimuli from gating currents of ion channels
The 26th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2022), 2022 年 10 月, 中国及びオンライン
17. Shoji Takeuchi
Emerging microfluidic technologies for biohybrid devices
The 26th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2022), 2022 年 10 月, 中国及びオンライン
18. Hisatoshi Mimura, Toshihisa Osaki, Sho Takamori, and Shoji Takeuchi
Ionotropic receptor-based sensor array utilizing solid-supported membrane electrophysiology
The 26th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2022), 2022 年 10 月, 中国及びオンライン
19. 竹内昌治
バイオハイブリッドデバイスが拓く新たな医療・環境計測
学振 R031 ハイブリッド量子ナノ技術委員会第 8 回研究会, 2022 年 11 月, オンライン
20. 大崎寿久、三村久敏、中尾賢治、竹内昌治
イオンチャネル創薬支援のための MAQ システム
膜シンポジウム 2022, 2022 年 11 月, 兵庫
21. 中根卓馬、大崎寿久、三村久敏、高森翔、三木則尚、竹内昌治
実験および数値シミュレーションに基づいた細胞匂いセンサのためのガス導入流路
第 13 回マイクロ・ナノ工学シンポジウム, 2022 年 11 月, 徳島
22. 三村久敏、大崎寿久、中尾賢治、高森翔、竹内昌治
人工細胞膜アレイチップを用いたイオンチャネル活性測定のための膜形成技術の開発
化学とマイクロ・ナノシステム学会第 46 回研究会 (CHEMINAS 46), 2022 年 11 月, 徳島
23. 加藤碧、小田悠加、大崎寿久、三村久敏、高森翔、三木則尚、竹内昌治
細胞を複数配列したハイドロゲルシート手動作製デバイス
化学とマイクロ・ナノシステム学会第 46 回研究会 (CHEMINAS 46), 2022 年 11 月, 徳島
24. 竹内昌治
生物の能力を活かすバイオハイブリッドセンサ
第 4 回日本生物診断研究会 すばらしい生物の能力, 2022 年 12 月, 東京及びオンライン
25. Sho Takamori, Hisatoshi Mimura, Toshihisa Osaki, and Shoji Takeuchi
A dynamic microarray device for selective pairing and electrofusion of liposomes
The 36th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (IEEE MEMS2023), 2023 年 1 月, ドイツ
26. Takuma Nakane, Toshihisa Osaki, Hisatoshi Mimura, Sho Takamori, Norihisa Miki, and Shoji Takeuchi
Gas-flow device for effective dissolution of gas-phase odorants utilized for biohybrid sensors
The 36th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (IEEE MEMS2023), 2023 年 1 月, ドイツ
27. Aoi Kato, Haruka Oda, Sho Takamori, Hisatoshi Mimura, Toshihisa Osaki, Norihisa Miki, and Shoji Takeuchi
Hand-driven device for preparation of linearly aligned hydrogel sheets
The 36th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (IEEE MEMS2023), 2023 年 1 月, ドイツ
28. Kazuto Ogishi, Toshihisa Osaki, Yuya Morimoto, and Shoji Takeuchi
Labor-saving platform for characterization of membrane proteins by automated monitoring and data reporting
The 36th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (IEEE MEMS2023), 2023 年 1 月, ドイツ
29. Hisatoshi Mimura, Toshihisa Osaki, Sho Takamori, and Shoji Takeuchi
One push membrane formation for iterative measurement of ion channel activity on arrayed chip
The 36th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (IEEE MEMS2023), 2023 年 1 月, ドイツ
30. Izumi Hashimoto, Toshihisa Osaki, Hisatoshi Mimura,

Sho Takamori, Norihisa Miki, and Shoji Takeuchi
Bubble-assisted re-formation of individual lipid bilayers
in arrayed device
The 36th International Conference on Micro Electro
Mechanical Systems (IEEE MEMS2023), 2023 年 1 月,
ドイツ

31. 竹内昌治
Think Hybrid 匂いセンサから培養肉まで
リコー技術者向け講演会, 2023 年 3 月, 神奈川及び
オンライン
32. 大崎寿久
人工細胞膜システムによる創薬支援と次世代センサ
令和 4 年度山口大学ブルーエナジーセンター講演会,
2023 年 3 月, 山口

【特許】

国内特許出願 4 件