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在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マイクロチップ上に人 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つの人工細胞膜システムを確 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、人工細胞 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、トランスポータなどを人工細胞膜に 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(2018-2022年度)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. 2023 年度の研究目的

実用化実証事業 11 年目となる 2023 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 チャーの継続的な研究開発支援として、評価システムの計 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 イブリッドセンサについて、東大・住友化学と共同でセン サアレイを開発し、疾患検知の概念実証を目標とした。

#### (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となる技術の実現を目標として 研究開発を行ってきた。 2023 年度は、2021 年度に設立した KISTEC 発ベンチャ ーである「株式会社 MAQsys」の研究開発支援を継続し、 イオンチャネル機能評価システムの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。2020 年度より、JST-CREST および科研費の支援を 受け、生体機能と機械を融合したバイオハイブリッドセン サの学術基盤および概念実証を目的とする研究を進めて いる。

2023 年度は、標的物質に対する細胞センサの応答特性 を電気的・光学的計測方法で評価するとともに、東京大 学・住友化学と共同で細胞センサアレイを作製し、センサ アレイによる疾患検知の概念実証を目標とした。

#### 2. 2023 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)等の公的研究費による支援と、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 や細胞内小器官の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して いる。2023年度は、MAQsys社が事業開始に向けて行う研 究開発に関して、イオンチャネル機能評価システムの計測 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、昨年度に開始した脂質二重膜を 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 スについての研究成果をまとめた。脂質二重膜は、計測チ ップの一対のウェルの境界において、油中液滴同士が接触 する界面に形成される。従来研究で、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ネル評価データ取得 数を劇的に向上させることに成功した(Anal Chem 誌掲載、 当該号表紙に採用)。また、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その成果を公表し た(Droplet 誌掲載、当該号表紙に採用)。さらに、機械学 習によりイオンチャネルの応答をリアルタイムに解析す る技術を応用し、人工細胞膜を維持・再形成しながら計 測・解析を行える自動化システムについても報告を行った (Biosens Bioelectron 誌掲載)。

さらに、イオンチャネルの脂質二重膜への再構成を促進 するため、セパレータの孔形状に関する検討を開始した。 一般的に孔形状は円形が良いとされてきたが、さまざまな 孔で試行したところ、必ずしも円形が最適ではない可能性 を示唆する結果が得られたており、検討を行っている。

成果展開として、協力研究員による萌芽研究を実施し、 また国内外の研究機関との共同研究も行っている。

#### (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。

2023 年度は、細胞センサの応答特性を評価するととも に、センサアレイによる疾患検知の概念実証を行った。

光学的計測方法に関して、異なる種類のセンサ細胞を画 像判別し、個々の標的物質応答性を解析する研究を行った。 センサ細胞を特徴的な形状のハイドロゲルに包埋するこ とで、位置情報に頼らず形状情報により自動判別すること ができる。従来、異種センサ細胞を用いる場合にはあらか じめ規則性をもたせて配列する必要があったが、本技術に より乱雑な状態のセンサ細胞の応答性を評価できた。

一方、センサアレイの研究についても東京大学・住友化 学と共同で進めた。ピペットを用いて簡便・迅速に細胞の アレイ化が可能な鉤爪を配列したデバイスを開発した。鉤 爪内にセンサ細胞を含む溶液をピペットで滴下すること で、細胞アレイを作製できる。また、この細胞センサを搭 載し蛍光計測が可能な小型計測装置についても東大と共 同で開発した。このセンサ細胞と蛍光計測システムにより、 疾患マーカとされる標的物質を感度よく検出できること を示した。

#### (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)に参画した。同 CREST では東大大杉研と共同で、 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 開発を行った。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、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。核様構造において機能的な核膜が 形成されていること、核膜孔複合体構造が存在することを 実験的に確認した。また、細胞核封入リポソームを培養細 胞と融合させるための異種リポソーム融合デバイスに関 して Sens Actuators B Chem 誌に発表した。

また、サイズや形状を制御したリポソーム作製技術についての成果が、Small Struct 誌に掲載された(当該号表紙・注目論文)。

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。

# 昆虫嗅覚受容体を発現したセンサ細胞の アレイ化技術の開発

# 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

1.1 昆虫の嗅覚受容体による匂い物質の感知 生物が匂いを感知するプロセスは、嗅覚器官の細胞によ って行われ、匂い物質が細胞膜に局在する嗅覚受容体タン パク質に結合することによって始まる。この匂い感知の分 子メカニズムは、脊椎動物と無脊椎動物で異なっている。 昆虫では、膜タンパク質である嗅覚受容体(Olfactory receptor, OR)と嗅覚受容体共受容体(Olfactory receptor co-receptor, Orco)が協働することにより、匂いの感知が行 われている [1,2], OR は匂い物質を識別する役割をもち、 蚊では約80種類が知られており、さまざまな匂い物質の 選択的受容において重要な役割を果たしている[3,4]。 Orco は細胞膜を横断してナトリウムイオン (Na<sup>+</sup>) やカル シウムイオン(Ca<sup>2+</sup>)を透過するイオンチャネルとしての 役割をもち、OR との相互作用により、匂い物質に応答し 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 機能している。このような嗅覚受容体は、細胞膜を貫通し て細胞表面に露出している。細胞表面の嗅覚受容体に匂い 物質が結合すると、嗅覚受容体が活性化され、細胞外から 細胞内への陽イオンの流入が濃度勾配に従って起こる。こ の流入により、通常は維持されている細胞膜内外の陽イオ ンと陰イオンのバランスが崩れ、細胞膜の脱分極が引き起 こされる。この脱分極は、神経細胞を通じて信号として伝 達され、最終的に脳で匂いとして認識される。現在、この ような嗅覚受容体による応答メカニズムを利用して匂い 物質を検出するため、昆虫などの嗅覚受容体を発現させた 培養細胞が作製されている。このような細胞はセンサ細胞 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 進められている「5」。

#### 1.2 センサ細胞による匂い物質の検出

匂い物質に対するセンサ細胞の応答は、一般的に蛍光を 利用した方法によって検出される。このため、センサ細胞 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)の遺伝子が導入される[6]。GCaMP は、 緑色蛍光タンパク質(GFP)、Ca<sup>2+</sup>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<sup>2+</sup>がカル モジュリン部分に結合することによって GFP の蛍光強度 が変化する。GCaMP を用いることにより、センサ細胞内 の Ca<sup>2+</sup>濃度の変化を、蛍光強度の変化として測定すること が可能である[7]。これにより、センサ細胞に発現してい 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外の Ca<sup>2+</sup>が細胞内に流入し、細胞質の Ca<sup>2+</sup>濃度の増加に従って、GCaMP の蛍光強度も増加する。 この蛍光応答を測定することにより、センサ細胞を用いて 溶液中の匂い物質を検出することが可能となる。

# 1.3 センサ細胞を利用した匂い物質センサ

生物の嗅覚受容体は、分子構造を三次元的に認識するこ とにより、特定の匂い物質に選択的に応答する。そのため、 嗅覚受容体を発現するセンサ細胞を用いた匂いセンサは、 従来の酸化物半導体センサなどの人工物と比較して、高い 選択性と感度を実現できる可能があると考えられている。 センサ細胞を利用した匂い物質センサの用途としては、匂 いによる病気の診断や早期発見など、将来的には健康医療 分野での応用が期待されている。 医療分野での最近の例と しては、匂いに対する線虫の化学走性を利用し、がんの早 期発見方法が実用化されている[8] がんに関連すると考 えられている匂い物質のデータベースが整備されつつあ **り**[9] 匂い物質に対する蚊の嗅覚受容体の反応選択性も 明らかになっており「3,41、がんに関連する匂い物質の検 出に昆虫の嗅覚受容体を利用する可能性も議論されてい る[5] 昆虫の嗅覚受容体を発現するセンサ細胞は、次世 代の匂いセンサの基盤要素として注目されており、センサ 細胞の蛍光応答を利用した匂い物質センサの開発が進め られている。

匂いは、複数の匂い物質の組み合わせによって形成され ている。そのような匂いを、高い選択性をもつ嗅覚受容体 を用いて識別するためには、それぞれ異なる嗅覚受容体を 発現する複数種類のセンサ細胞を組み合わせて使用する 必要がある。しかしながら、単一のチャンバ内に複数種類 の細胞をアレイ化する技術は、これまでのところ十分に開 発されていなかった。本研究では、複数の匂い物質を同時 に検出するため、単一のチャンバ内に複数種類のセンサ細



図1 開発したアレイ化デバイス。(A)デバイスの写真。(B)デバイスを用いてアレイ化したセンサ細胞の蛍光記録画像。

胞をアレイ化するデバイスを開発した。

# 2. 実験方法

#### 2.1 アレイ化デバイスの作製

本研究で開発したアレイ化デバイスは、複数種類のセン サ細胞を単一のチャンバ内に配列することを目的として いる。デバイスの構造は、大きなチャンバ内に配置された 複数のマイクロウェルによって構成されている。デバイス の設計には CAM ソフトウェアを使用し、作製には NC 加 工機を用いた。材料には、厚さ 4mm のアクリル板を使用 した。

#### 2.2 センサ細胞のアレイ化

開発したデバイスを用いたセンサ細胞のアレイ化は、ハ イドロゲルと混合したセンサ細胞をピペッティングでマ イクロウェルに注入することによって行った。センサ細胞 には、ネッタイシマカ (Aedes aegypti)の嗅覚受容体 (AaOR15)と共受容体、カルシウムセンサタンパク質 (GCaMP)を発現する昆虫細胞(ExpiSf9)を使用した。セ ンサ細胞の培養には ExpiSf CD 培地を用い、平底の三角 フラスコを使用して27℃、125 rpm で振とう培養を行った。 培養したセンサ細胞は、5分間、300×gで遠心して回収し た。回収したセンサ細胞は、ハイドロゲル(TrueGel3D) と混合し、アレイ化デバイスのマイクロウェルに 1.0 ul ず つピペッティングによって分注した。ハイドロゲルは、 27℃で 25 分間静置することによってゲル化させた。アレ イ化デバイスのチャンバは、BSA を含むアッセイ溶液 (HBSS (ハンクス平衡塩溶液) / 20 mM HEPES, pH 7.2 / 0.1% BSA) で満たした。

#### 2.3 蛍光応答の検出

センサ細胞の蛍光応答の測定には、CCD カメラ式ゲル 撮影装置を蛍光イメージャとして使用した。標的匂い物質 であるアセトフェノンは、 DMSO に溶解後、アッセイ溶 液(HBSS/20 mM HEPES)に希釈して使用した。センサ 細胞をアレイ化したデバイスを蛍光イメージャのイメー ジングボックス内に設置し、標的匂い物質を含むアッセイ 溶液をピペッティングによってアレイ化デバイスのチャ ンバに滴下した。蛍光画像の記録は、標的匂い物質を滴下 してから 210 秒間にわたって行われた。記録した蛍光応答 画像の解析には、画像解析ソフトウェア(ImageJ)を用い た。ソフトウェアの ROI 機能を利用して、マイクロウェ ルごとの蛍光輝度の変化を測定し、数値化した。数値化し た蛍光輝度の変化は、センサ細胞の応答前の蛍光輝度(F<sub>0</sub>) と応答後の蛍光輝度(F)から、正規化した蛍光輝度変化 (*ΔF/F<sub>0</sub>*)を算出し、標的匂い物質を含む溶液を添加した時 間を 0 秒とするグラフを作成した。

マイクロウェル内のハイドロゲルに封入されたセンサ 細胞の観察は、青色励起光 (470 nm) と緑色蛍光フィルタ (525 nm) を備えた蛍光顕微鏡を用いて行った。

#### 3. 結果と考察

図1に、開発したアレイ化デバイスを示す。チャンバ内 には 81 個のマイクロウェルが配置されている (図 1A)。 マイクロウェルは円柱状構造をしており、チャンバ底面か らの微小突起によって形成されている。マイクロウェルは、 チャンバ内で均等に配置されている。チャンバの深さはマ イクロウェルよりも大きくなっており、アッセイ液でチャ ンバを満たすと、マイクロウェルはアッセイ液で完全に覆 われる。マイクロウェルの側壁には4つのスリットが設け られており(図 2B も参照) これによりチャンバ内のア ッセイ液はマイクロウェルの上部だけでなく、側面からも マイクロウェル内部にアクセスすることが可能である。こ のようなデバイスを用いることにより、ハイドロゲルに封 入されたセンサ細胞をピペッティングによって簡単にア レイ化することができる(図1B)。単一のチャンバ内に複 数種類のセンサ細胞をアレイ化することにより、複数種類 の標的匂い物質を同時に検出することが可能になると考 えられる。

図2に、作製したデバイスを用いてアレイ化したセンサ 細胞と、標的匂い物質に対する蛍光応答の結果を示す。こ こでは、2種類のマイクロウェル構造を用いて、標的匂い 物質に対するセンサ細胞の応答を調べた(図2A)。一方の 構造では、マイクロウェルを形成する側壁に4つのスリッ トがあり、もう一方の構造ではスリットがない。蛍光顕微 鏡画像から、どちらのマイクロウェル構造においても、ハ イドロゲルに封入されたセンサ細胞は流出することなく、



図2 アレイ化したセンサ細胞の蛍光応答。(A)マイクロウェルの蛍光顕微鏡画像。(B)蛍光応答の時間経過。(C)蛍光応答の最大 値の比較。

マイクロウェル内に保持されていることが確認された。粒 子状の構造体は、それぞれ1個のセンサ細胞に相当し、セ ンサ細胞で発現しているGCaMPに由来する緑色蛍光が観 察された。

図 2B は、2 種類のアレイ化デバイスを用いて測定した センサ細胞の正規化された蛍光応答の時間経過を示す。グ ラフの曲線は、それぞれ別々に測定した2種類のデバイス 中の 5 個のマイクロウェルの平均値と標準偏差を表して いる。標的匂い物質であるアセトフェノンを、終濃度100 μM となるようにアレイ化デバイスのチャンバに加えたと ころ、蛍光輝度の増加が確認された。これは、加えられた 標的匂い物質によってセンサ細胞の昆虫嗅覚受容体が活 性化され、その活性化された受容体のイオンチャネルを通 って Ca<sup>2+</sup>が細胞外から細胞質に透過し、細胞質の Ca<sup>2+</sup>濃度 が上昇したことに反応して GCaMP の蛍光輝度が増加した ためである。蛍光応答の時間変化からは、標的匂い物質を 加えてからセンサ細胞の応答が観察されるまでの時間は、 スリットがないマイクロウェルに比べて、スリットがある マイクロウェルで速かった。また、蛍光応答が最大となる のは、両方のマイクロウェルにおいて、標的匂い物質を添 加してから約200秒後であった。

図 2C は、2 種類のアレイ化デバイスを用いて測定した センサ細胞の正規化された蛍光応答の最大値の比較を示 す。スリットがあるマイクロウェルでは、スリットがない マイクロウェルに比べ、センサ細胞の応答が増加すること が確認された。このため、マイクロウェルの側壁に設けら れたスリットは、ハイドロゲルに封入されたセンサ細胞の 標的匂い物質に対する応答に効果的に機能していると考 えられた。すなわち、センサ細胞の応答性を向上させるた めには、センサ細胞を内封したハイドロゲルと標的化学物 質を含む溶液が接する表面積を増大させることが有効で あると考えられる。

本研究では、匂いを形成する複数の匂い物質を選択的に 検出することを目指し、次世代の匂いセンサ素子として期 待されるセンサ細胞を単一のチャンバ内にアレイ化する ためのデバイスを開発した。このデバイスを用いることに より、ハイドロゲルに封入されたセンサ細胞をピペッティ ングによって容易にアレイ化し、標的匂い物質の検出に利 用できる小型のセンサチップを簡便に作製できることが 確認された。また、デバイスの主要な構成要素であるマイ クロウェルの構造を検討することにより、マイクロウェル を形成する側壁に設けられたスリットが、標的匂い物質に 対するセンサ細胞の蛍光応答を向上させることを示した。 今後は、単一のチャンバに複数種類のセンサ細胞をアレイ 化したセンサチップを実際に作製し、複数の標的匂い物質 を選択的に検出する試みを進めていく予定である。本研究 で開発したアレイ化デバイスを活用することにより、複数 種類のセンサ細胞を用いた標的匂い物質の識別が可能と なり、匂いを利用した病気の診断など、さらなる研究の進 展が期待される。

#### 【謝辞】

本研究は、JST・CREST・JPMJCR20C4の支援を受けた ものです。本研究で使用したセンサ細胞は、住友化学(株) から供与されました。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

1. はじめに

# 1.1 人工細胞

近年、国内外で人工細胞研究が盛んに行われている。 本研究でいう人工細胞とは、脂質二分子膜によって細胞 のように外界から隔てられた区画、いわゆる脂質二分子 膜小胞(リポソーム)ことである。最近ではその定義が拡 張され、油相中に形成した水相液滴や両親媒性高分子膜 で囲われた小胞、ハイドロゲルなども人工細胞として用 いられる。これらの人工細胞に関する研究は、「ボトムア ップ」の合成生物学として、細胞(様)システムの構築を 行いつつ細胞システムの理解を深めるために、または既 存の細胞を凌駕する機能的で有用な細胞様システムの構 築するために取り組まれている。人工細胞に目的の機能 性を付与する際、人工細胞内への機能性区画の導入およ び、人工細胞内でのそれらの構築などが試みられる。例 えば、これまでにリポソーム内部に光合成反応[1]やミト コンドリアで行われる好気呼吸反応[2]、細胞核が行う遺 伝子発現反応の時空間的制御[3]などを再現し、それを利 用した機能性人工細胞の構築に関する報告がある。しか し、これらの先行研究では既存の細胞が持つ細胞小器官 の機能性の一部を模倣ないし再構築するにとどまり、そ れらの細胞小器官を人工細胞内に完全に構築したという 報告はない。今後、既存の細胞の構造や機能を完全に模 倣した人工細胞を構築するためには、人工細胞内に細胞 小器官を構築する技術を開発することが重要になると考 えている。

#### 1.2 アフリカツメガエル卵抽出液

アフリカツメガエル卵抽出液はアフリカツメガエル (Xenopus laevis)の未受精卵を遠心分離し、脂質成分とミ トコンドリアなどを含む卵黄成分を取り除いたもので、 試験管内細胞核形成能[4]や試験管内双極性紡錘体形成能 などの珍しい特徴を持つ生体材料として知られる。この 卵抽出液調製の際にカルシウムイオンを添加したもの は、細胞周期が間期で停止し、DNA を添加するとその 周りに核膜が形成され、細胞核が形成されることが知ら れている。一方、カルシウムイオンを添加していない分 裂期卵抽出液では、添加 DNA を基点とした細胞核形 成、ならびに内部での DNA 複製が起こり、その後、細 胞膜が消失して双極性紡錘体の形成や娘 DNA の分配と いった、通常の体細胞内で細胞周期依存的に見られる動 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

的な細胞活動が見られることで知られている。先行研究 ではこれらの卵抽出液を油相中でマイクロ液滴化し、そ の内部での双極性紡錘体形成および細胞核形成が報告さ れている。しかし、これらをわれわれが人工細胞と呼ぶ リポソームの内部で形成したという報告はない。

#### 1.3 界面通過法

一般にリポソーム形成手法には大きく分けて①水和法 と②界面通過法、③ダブルエマルション法の3つがあ る。このうち特定組成を持った水相溶液を内封したリポ ソームの作製には②界面通過通法が最も広く用いられ る。界面通過法では脂質を分散したオイルの中で標的溶 液のマイクロ液滴形成を行い、液滴界面に脂質分子を吸 着させてエマルション化する。さらに、このエマルショ ンを脂質分散オイルとリポソーム外液の界面に形成され た反対極性の脂質単分子膜で包み込むことで、標的マイ クロ液滴をリポソーム化する(図1)。一般的には、この 際、マイクロ液滴とリポソーム外液との間に密度差を作 り、遠心力などを用いて界面通過の促進が行われる。こ れまでに様々な研究において、この界面通過法を用いた 様々な生体分子のリポソーム内封が行われてきた。しか し、アフリカツメガエル卵抽出液に関しては未知のタイ プの卵抽出液内封の報告はあるが、その後の卵抽出液内 封リポソームの中で双極性紡錘体形成や間期細胞核形成 などに関する報告はない。

#### 1. 4 卵抽出液内封リポソーム内細胞核形成

本研究では、アフリカツメガエル間期卵抽出液を用 い、リポソーム内での細胞核形成の実現に取り組む(図 2)。まず、界面通過法を用いた間期卵抽出液の効率的な リポソーム内封条件の検討を行い、効果的なリポソーム 内封プロトコル構築を行う。次に、作製した間期卵抽出 液内封リポソーム内にて細胞核形成反応を誘導し、核形 成反応後のリポソームの顕微鏡観察を行う。その際、形 成された核様構造の核内輸送能を評価する。さらに、リ ポソーム内に形成された核様構造について、免疫染色法 を用いた分子的特徴づけを行う。なお、本研究の詳細に ついてはプレプリントで報告している[6]。

#### 2. 実験方法

#### 2.1 卵抽出液内封リポソーム作製



図 1 界面通過法によるリポソーム作製.本研究の特徴として クロロホルム添加と待ち時間の導入を行っている.

アフリカツメガエル間期卵抽出液内封リポソームは下 記のように作製した。まず、氷上で間期卵抽出液(Ext)、 Energy mix(EM)、GFP-NLS、精子クロマチン(XSP)を 融解し、これらを Ext/EM/GFP-NLS/XSP = 50/1/1/1の体積比で混合した後、ボルテックスおよびスピンダウ ンを行って氷上に静置した。1 mLの脂質分散オイル(2.5 mM POPC in mineral oil w/  $\Delta$ % chloroform)を1本の 2.0 mL チューブ(チューブ#1)に取り、氷上で冷却し た。続いて 1.5 mL チューブ(チューブ#2)2本を用意し、 150  $\mu$  L  $\mathcal{O}$  egg lysis buffer (250 mM sucrose, 10 mM HEPES pH 7.7, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT)、および 150 μL の脂質分散オイルを順番に重層 し、氷上で冷却した。その直後、チューブ#1 に 50 µL の卵抽出液ミックスを添加し、チューブ#2と合わせて氷 上で τ 分間油水界面の培養を行った(τ:待ち時間)。界 面培養後、チューブ#1を1分間ボルテックス(3,200 RPM) し、ボルテックスした卵抽出液ミックス入脂質分 散オイルを 500 μL ずつ直ちにチューブ#2の脂質分散 オイル上に氷上で重層した(2本)。次に、これらのチュ ーブ#2 を 4℃、9,000g で 30 分間遠心し、界面通過を行 った。遠心後のチューブ#2を氷上に回収し、18Gシリン ジ針を用いてチューブの底、リポソームペレット付近に 貫通穴を開け、蓋を開けたチューブトップに人差し指で 圧をかけることで、リポソームペレットをチューブから 押し出し、あらかじめ氷上で冷却しておいた1mL egg lysis buffer に分散・回収した。回収後のリポソームは直 ちにチューブをボルテックスすることによって撹拌し、 次の核形成反応誘導実験まで氷上で静置した。

#### 2.2 リポソーム内細胞核形成

間期卵抽出液を内封したリポソーム内での細胞核形成 融合実験は下記のように行った。まず、卵抽出液内封リ ポソームを含む egg lysis buffer が入ったチューブを 22℃ にセットしたブロックインキュベータに静置し、90 分間 細胞核形成反応の誘導を行った。その後、200g で5 分間 遠心し、上澄みを捨て、総体積が 140 μL になるように 調整した。この際、DNA を蛍光染色するために最終濃 度5 μM の SYTO41 を添加してボルテックスを行っ た。蛍光染色後のリポソームは、BSA コートしたガラス



図 2 アフリカツメガエル間期卵抽出液内封リポソームを用い たリポソーム内細胞核形成.

とフレームシールで作製した顕微鏡観察用スライドサン プルに内封し、共焦点顕微鏡を用いて観察を行った。

#### 2.3 リポソーム内核様構造の免疫染色

リボソーム内に形成された核様構造の分子構造を確認 するために、核膜孔複合体タンパク質抗体(mAb414-AF594)を用いた免疫染色を行った。まず、細胞核形成反 応を行ったリボソームを4°C、200gで5分間遠心し、上 澄みを捨てて体積を100  $\mu$ Lに調整した。次に、チュー ブを氷上に設置し、100  $\mu$ Lの固定液を添加した。氷上 で1時間静置した後、1 mLのクエンチ液を加え、4°C, 1,000gで5分間遠心した。上澄みを捨てて体積を100  $\mu$ Lに調整し、そこへ1  $\mu$ Lの0.5 mg mL<sup>-1</sup> mAb414-AF594 を添加して、氷上で一晩培養した。翌日、1 mL のクエンチ液を添加し、4°C、1,000gで5分間遠心した 後、上澄みを捨て、体積を100  $\mu$ Lにした。最終濃度5  $\mu$ MのSYTO41を加えてDNAの蛍光染色を行い、顕微 鏡観察用スライドサンプルに内封して、共焦点顕微鏡観 察を行った。

#### 3. 結果と考察

#### 3.1 卵抽出液内封リポソーム作製

クロロホルム添加量(Δ)と待ち時間(r)を変化させな がら界面通過法による卵抽出液内封リポソーム作製実験 を行った。その結果、形成されたリポソーム数とリポソ ームへの卵抽出液内封率について、クロロホルム添加に よる増加が見られた。一方、待ち時間については、形成 リポソーム数の増加に関してのみ有意な寄与が見られ た。各待ち時間条件ごとにも、クロロホルム添加量の増 加とともにリポソーム数(図3上)および卵抽出液内封率 (図3下)それぞれについて有意な増加が見られた。一 方、クロロホルム添加量の増加に対してこれらの変数の 有意な増加は認められなかった。これらはクロロホルム 添加が界面通過法を用いた卵抽出液内封リポソームの形 成に有効であること、待ち時間についてもリポソーム数 を増やすために有効であることを示唆している。

#### 3.2 リポソーム内細胞核形成

界面通過法を用いて作製した間期卵抽出液内封リポソ ームを 22℃で 90 分間培養し、リポソーム内での細胞核



図 3 界面通過法による卵抽出液内封リポソーム作製. Δ:クロ ロホルム添加量、 r:待ち時間.

形成反応を誘導した。その結果、リポソーム中に核様構 造の形成を確認した。この際、形成された核様構造が核 としての特徴を持つかどうか確認するために、事前に核 移行シグナル(NLS)付 GFP(GFP-NLS)を卵抽出液に内封 した。その結果、リポソーム内に DNA と GFP-NLS が 同所局在する様子が見られた(図4上)。一方、NLS が付 いていない GFP では、リポソーム内での DNA 凝縮は見 られたが、GFP がリポソーム内部全体に分布する様子が 見られた(図4下)。これらは観察された核様構造が DNA と核内輸送能という細胞核の部分的特徴を持つことを示 唆している。

#### 3.3 リポソーム内核様構造の免疫染色

リポソーム内形成が確認された核様構造について、細胞核としての特徴を追加で確認するために、核膜孔複合体タンパク質(NPC)抗体を用いた免疫染色実験を行った。その結果、固定したリポソーム内において、DNAとGFP-NLSの同所局在に加え、NPC抗体がそれらの区画の表面に集中して分布する様子が見られた(図4上)。これは、バルク条件の卵抽出液内で形成した細胞核の免疫染色結果と一致するものだった(図4下)。これらは観



**図 4 細胞核形成反応誘導後の卵抽出液内封リポソーム.** スケ ールバー:10 μm.



図 5 核様構造内封リポソーム、およびバルク卵抽出液中形成核 に対する、核膜孔複合体(NPC)抗体を用いた免疫染色. スケール バー:10 μm.

察された核様構造の表面に核膜孔複合体が分布している ことを意味しており、観察された核様構造が核内輸送の 機能に加えてその表面に核膜孔を持っていることを示唆 している。

#### 【謝辞】

本研究で用いたアフリカツメガエル卵抽出液の調製 には新冨圭史博士(理研)にご協力いただきました。また、 GFP-NLS については原裕貴博士(山口大学)に譲渡いただ きました。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] Lee, K.Y., Park, S.J., Lee, K.A., Kim, S.H., Kim, H., Meroz, Y., Mahadevan, L., Jung, K.H., Ahn, T.K., Parker, K.K. and Shin, K., 2018. Photosynthetic artificial organelles sustain and control ATPdependent reactions in a protocellular system. *Nature biotechnology*, **36**(6), pp.530-535.
- [2] Westensee, I.N., Brodszkij, E., Qian, X., Marcelino, T.F., Lefkimmiatis, K. and Städler, B., 2021. Mitochondria encapsulation in hydrogel - based artificial cells as ATP producing subunits. *Small*, 17(24), p.2007959.
- [3] Aufinger, L. and Simmel, F.C., 2018. Artificial gelbased organelles for spatial organization of cell - free gene expression reactions. *Angewandte Chemie International Edition*, 57(52), pp.17245-17248.
- [4] Lohka, M.J. and Masui, Y., 1983. Formation in vitro of sperm pronuclei and mitotic chromosomes induced by amphibian ooplasmic components. *Science*, 220(4598), pp.719-721.
- [5] Chiba, M., Miyazaki, M. and Ishiwata, S.I., 2014. Quantitative analysis of the lamellarity of giant liposomes prepared by the inverted emulsion method. *Biophysical journal*, **107**(2), pp.346-354.
- [6] Takamori, S., Mimura, H., Osaki, T., Kondo, T., Shintomi, M., Shintomi, K., Ohsugi, M. and Takeuchi, S., 2024. Nuclear assembly in giant unilamellar

vesicles encapsulating *Xenopus* egg extract. *bioRxiv*, pp.2024-06.

# 均一サイズ巨大ベシクル作製技術の開発

# 1. はじめに

創薬の標的として重要な G タンパク質共役受容体 (GPCR) やトランスポータなどの膜タンパク質について は、細胞における物質授受や神経におけるシグナル伝達な どの生命現象に深く関与していることが知られており、光 学的観測技術の向上とともに培養細胞上での機能解析が 盛んに行われている。しかしながら、細胞上では単一の膜 タンパク質の機能を観測・評価することは困難であるため、 近年、人工細胞膜(脂質二重膜)が注目され、利用される ようになってきている。人工の脂質二重膜の中で、顕微鏡 観察に適した大きさである直径 10 マイクロメートル程度 の細胞サイズのベシクル(脂質二重膜小胞)も古くから用 いられているものの一つである。脂質二重膜が水相を内包 した形状のベシクルは、水中において脂質分子が自己組織 化により形成する構造の一つである[1]。その球状膜にお いて直径が数~数百マイクロメートルのものは巨大ベシ クルと呼ばれ、上述の通り、膜タンパク質研究や人工細胞 研究に多く利用されている[2]。

巨大ベシクルの形成には静置水和法やエレクトロフォ ーメーション法が一般的に用いられてきた[1]。どちらの 手法も試験管内やガラス基板上、電極上などで脂質を薄い 層にして乾燥させた後、水和させることでベシクルを自発 的に形成させるが、これらの手法では形状やサイズを揃え たり、制御したりすることはできなかった[1,3,4]。また、 浮遊しているベシクルでは経時的な観察を行う上で課題 があった。他方、脂質分子を分散させた油中水滴を水相の 上に積層し、遠心力などで水滴を油相から水相に移すこと によりベシクルを得る遠心沈降法(界面通過法)も多く利 用されるようになった[5]。また、サイズ制御の課題を解 決するため、マイクロ流体デバイスを用いたベシクル形成 方法も近年では盛んに研究が行われている。

そこでわれわれも、微細加工技術(MEMS)を利用する ことでこれらの問題を解決し、膜タンパク質研究や人工細 胞研究に資する、形状・サイズの整った巨大ベシクルを効 率よく形成できる手法の開発を目的として独自に研究を 行ってきた。その結果、脂質薄膜を基板上に微細パターニ ングできる方法を新たに見出し、この脂質薄膜の微細パタ ーンを水和させることにより、細胞サイズの巨大ベシクル をサイズ・形状を制御して形成・アレイ化することに成功 した。本稿では、この成果について誌上発表を行ったので その内容を報告する[6]。

# 人工細胞膜システムグループ 大崎寿久、神谷厚輝、竹内昌治

#### 2. 実験方法

本研究で開発した脂質薄膜の微細パターニングの手法 の概要を図 1a に示す。先行研究により、パターニングさ れた脂質薄膜を水和することでベシクルの形状やサイズ の均一性を改善できることが示唆されてきたが[3, 4]、再 現性の高いパターニング手法は報告されていなかった。本 研究では、絶縁性・導電性の複合基板構造とエレクトロス プレー法を組み合わせることで、脂質薄膜の微細パターニ ングを実現した。

#### 2.1 複合材料基板の作製

図 1b に基板の作製プロセスを示す。ITO 薄膜を蒸着したガラス上にパリレン高分子フィルムを CVD プロセスにより蒸着した。フィルム厚は 1  $\mu$ m とした。このパリレンフィルムに、一般的なフォトリソグラフィープロセスを用いて直径 5~30  $\mu$ m の円形孔をパターニングした。これにより、円形孔底面は導電性の ITO 電極が露出し、それ以外は絶縁性のパリレンフィルムに覆われた絶縁性・導電性の複合基板構造を得た。

#### 2.2 脂質薄膜のパターニング

エレクトロスプレー法[7]による脂質塗布の模式図を図 1c に示す。内径 15 µm のガラスキャピラリを先端に接 続したシリンジには脂質溶液が満たされている。このシリ ンジに直流高電圧を印加することでキャピラリ先端から 脂質溶液が噴霧される。スプレーされた脂質は乾燥しなが ら複合材料基板の ITO 電極が露出した導電性表面、すな わち円形孔パターン底面にのみ堆積し、パリレンフィルム によりマスクされた絶縁性部分は回避される。脂質分子と して DOPC (0.5 mg/mL)を、スプレー条件として印加電 圧 0.5~2.0 kV、塗布時間 1 分を用いた。また蛍光顕微鏡 による観察を行うため、DOPC に対して 1wt%の蛍光脂質 (Rhod-DPPE)を混合した。

#### 2.3 静置水和法によるベシクル形成

エレクトロスプレー法によりパターニングされた脂質 薄膜は真空デシケータ中で1時間以上乾燥し、保存した。 巨大ベシクルの形成は、静置水和法により行った。基板上 にシリコーンゴムにパンチで穴を開けたチャンバを貼り 付け、チャンバに水溶液を滴下することで水和を行った。 水和による巨大ベシクル形成の様子は、倒立型共焦点顕微 鏡により行った。



図1 エレクトロスプレー法による脂質分子の微細パターニング。(a)本方法による均一サイズ巨大ベシクル作製の概念図。(b)パリレ ンフィルムのパターニングプロセス。(c)複合材料基板上へのエレクトロスプレーの模式図。(d)基板上への脂質スプレー前後の明視野 顕微鏡写真と蛍光顕微鏡写真。(e)AFMによる脂質パターン画像。左画像の破線部の断面プロファイル(右上)。パターン上の脂質量分 布(右下)。AFM画像から見かけの体積を推定。実線はガウス分布。Reproduced from ref. [6].

#### 3. 結果と考察

#### 3. 1 巨大ベシクルの形成

まず、導電性・絶縁性複合材料基板上の脂質分子の微細 パターンの様子を示す(図1d)。明視野顕微鏡および蛍光 顕微鏡画像から、絶縁性のパリレン領域上ではなく、導電 性 ITO 電極上にのみ脂質分子が堆積していることを示し ている。エレクトロスプレーによりキャピラリ先端から噴 霧された脂質は、基板表面に堆積する前に乾燥していると 理論的に考えられる。液滴蒸発の原理に従うと、マイクロ メートル以下のサイズで噴霧された液滴(ミスト)は、1 ミリ秒以内に急速に蒸発する。蒸発までにミストが移動で きる距離は 500 µm 以下と推定され、本研究のキャピラリ 先端から基板までの距離 20 mm よりも十分に小さいため、 脂質粒子として基板に堆積していると考えられる。このこ とは、原子間力顕微鏡 (AFM) 画像からも支持されている (図 1e)。AFM による断面プロファイルが台形形状であ ることは、本パターニング法がコーヒーリングの形成を回 避し、均一な脂質薄膜パターンを作製できることを示して いる。

次に、脂質薄膜パターンの水和による巨大ベシクルの形 成を示す(図2)。脂質薄膜パターン上に水溶液を導入する と、脂質分子の自己組織化が始まり、基板上に均一サイズ のベシクルが形成された。得られたベシクルの形状は、エ レクトロスプレーにより堆積した脂質量に応じて、ドーム 状構造(図2a)から球状構造(図2b)へと変化した。図 2cに示すように、直径20.2±1.2 μm(変動係数(CV) 5.9%)の1000個を超える均一径の巨大ベシクルを得ることに成功した。均一な脂質薄膜パターンを形成できたことにより、ベシクルサイズの均一性が得られたと考えられる。 脂質薄膜の水和は、水溶液の導入後ただちに開始し、5分以内に完了した。

#### 3.2 ベシクルアレイの評価

巨大ベシクルのサイズは、円形孔パターン上の脂質量を 調節することで制御できる。すなわち、円形孔パターンの 面積を変えることでベシクル直径を制御した。図 2d-h に 示すように、形成されたドーム型ベシクルの直径は、円形 孔とともに大きくなることが分かった。またそのときの CV は、円形孔パターン 5~20 μmの範囲で 8%未満であ り、均一径のベシクル形成を制御できた。

次に、巨大ベシクルを形成する脂質二重膜のラメラリティ(単層性)について確認した。蛍光脂質を含む脂質二重 膜の共焦点顕微鏡画像は、膜の層の数に従って離散的な輝 度を示すと考えられる。本研究で得られた巨大ベシクルの 蛍光輝度を確認したところ、単層と考えられるベシクルで は均一な輝度、小胞を含むベシクルではその2倍の輝度を 示したことから、単一層の脂質二重膜からなるベシクルが 形成できたと考えられる(図 2i)。

本方法の汎用性を確認するため、様々な組成の脂質を用 いた巨大ベシクル形成を行った。標準条件では、DOPC 単 一脂質と DOPC/DOPS の 1:1 混合脂質を用いた(図 2)。 これらの脂質は動植物の細胞膜の主要な構成要素であり、 DOPC は双性イオンの極性基をもち、DOPS は 1 つの正 電荷と 2 つの負電荷を有する。また、9:1 の DOPC/DOPS



図2 脂質微細パターンから作製した巨大ベシクルの共焦点蛍光顕微鏡像。(a) ドーム型ベシクルと(b) 球状ベシクル。一連の共焦点二 次元スライス画像から再構築。(c) 均一サイズの巨大ベシクルアレイ。パリレンパターンは直径 22.7 µm。全体像は 4×5 の画像をつな ぎ合わせた。(d-g) パターンサイズを変えて得られたさまざまなサイズのベシクルアレイ。(h) 各パターンにおけるベシクルサイズ分布 を示すヒストグラム。平均直径は、4.2±0.3、9.7±0.7、20.4±0.8、34.4±2.6 µm (平均±標準偏差)。青色の矢印はパリレンパターン の直径。(i) 蛍光輝度の離散分布に基づいて評価したベシクルの脂質二重膜の単層性。単一ベシクル(青)と小胞を含むベシクル(赤) の投影輝度からヒストグラムを得た。Reproduced from ref. [6].

混合脂質や1:1:1 DOPC/DOPS/コレステロール混合脂質 でも均一巨大ベシクルを作製できた(図 3a,b)。さらに、 DOPC、DOPS、スフィンゴリン脂質(SM)、コレステロ ールの混合脂質によるパターニングと、巨大ベシクルアレ イの形成にも成功した(図 3 c-f)。これらの脂質はその混 合比率によってベシクル形成後にベシクル内で相分離が 起こり、ベシクル上に小ベシクルが出芽する。蛍光画像か ら、その相分離と出芽の様子を確認することができた。

#### 4. まとめ

エレクトロスプレー法を用いて微細パターニングした 脂質分子の水和により巨大ベシクルの自発的形成を制御 する方法について提案を行い、形成した巨大ベシクルの評 価を通して本方法の妥当性を検証した。脂質分子の均一な 微細パターニングを行うため、導電性・絶縁性パターン化 基板とエレクトロスプレー法を併用した。脂質パターンの 正確性が巨大ベシクルの均一性に寄与することが分かっ た。個々のスポットから誘導されたベシクルは高い単分散 性を示し、変動係数 (CV) は 8%以下であった。本方法に より数平方ミリメートルに及ぶ領域に配列された多数の 単分散ベシクルが得られ、統計的、時間分解的な解析に適 した巨大ベシクルアレイを構築することができた。本成果 は、ベシクルのサイズと位置を正確に操作できるため、ベ シクルや膜タンパク質などに関する研究に利用できると 考えられる。例えば、アレイ化されたベシクルは、細胞組 織を模倣した二次元モデルとして利用できる可能性があ



図 3 種々の脂質組成から作られた巨大ベシクルアレイの共焦点 顕微鏡写真。(a) 9:1 DOPC/DOPS。平均径:13.7±0.9 μm。(b) 1:1:1 DOPC/DOPS/コレステロール。平均径:15.6±1.2 μm。 (c) 24:23:32:21 DOPC/DOPS/SM/コレステロール(1wt% DIC)。 (d) 14:14:52:20 DOPC/DOPS/SM/コレステロール(1wt% CF-DOPE)。(e, f) c および d の結果に対応する一連の共焦点画像か ら再構築された重畳画像。Reproduced from ref. [6].

り、また異なる膜湾曲上の膜タンパク質の分布と機能を研 究するためにのプラットフォームとしての活用も期待で きる。

### 【謝辞】

本研究内容の一部は、JSPS 科研費 (JP26600066, JP25706015, JP23710154)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】

- P. L. Luisi, P. Walde, Giant Vesicles, John Willy and Sons Inc., New York, 2000; N. Duzgunes, Methods in Enzymology Vol. 367 Liposomes Part A, Academic Press, California, 2003.
- [2] A. Karlsson, R. Karlsson, M. Karlsson, A-S. Cans, A. Strömberg, F. Ryttsén, O. Orwar, Networks of Nanotubes and Containers, Nature 2001, 409, 150-152; I. A. Chen, K. Salehi-Ashtiani, J. W. Szostak, RNA Catalysis in Model Protocell Vesicles, J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 13213-13219; G. Tresset, S. Takeuchi, Utilization of Cell-sized

Lipid Containers for Nanostructure and Macromolecule Handling in Microfabricated Devices, Anal. Chem. 2005, 77, 2795-2801.

- [3] K. Kuribayashi, G. Tresset, H. Fujita, S. Takeuchi, Electroformation of Giant Liposomes in Microfluidic Channels, Meas. Sci. Technol. 2006, 17, 3121-3126.
- [4] M. Le Berre, A. Yamada, L. Rech, Y. Chen, D. Baigl, Electroformation of Giant Phospholipid Vesicles on a Silicon Substrate: Advantages of Controllable Surface Properties, Langmuir 2008, 24, 2643-2649.
- [5] H. Saito, Y. Kato, M. Le Berre, A. Yamada, T. Inoue, K. Yoshikawa, D. Baigl, Time-Resolved Tracking of a Minimum Gene Expression System Reconstituted in Giant Liposomes, ChemBioChem 2009, 10, 1640- 1643; V. Noireaux, A. Libchaber, A Vesicle Bioreactor as a Step toward an Artificial Cell Assembly, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004, 101, 17669-17674; S. Ota, S. Yoshizawa, S. Takeuchi, Microfluidic Formation of Monodisperse, Cellsized, and Unilamellar Vesicles, Angew. Chem. Int. Ed. 2009, 48, 6533-6537.
- [6] T. Osaki, K. Kamiya, R. Kawano, K. Kuribayashi-Shigetomi, S. Takeuchi, Controlled Self-Assembly of Vesicles by Electrospray Deposition, Small Struct. 2024, 5, 2300543.
- [7] O. V. Salata, Tools of Nanotechnology: Electrospray, Curr. Nanosci. 2005, 1, 25-33.

# 業 績

# 【原著論文】

- Kazuto Ogishi, Toshihisa Osaki, Hisatoshi Mimura, Izumi Hashimoto, Yuya Morimoto, Norihisa Miki, Shoji Takeuchi Real-time quantitative characterization of ion channel activities for automated control of a lipid bilayer system *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 237, 115490 (2023)
- Sho Takamori, Hisatoshi Mimura, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi
   A microfluidic device for selective pairing and electrofusion of cell-sized liposomes *Sensors and Actuators: B. Chemical*, Vol. 393, 134226 (2023)
- Izumi Hashimoto, Toshihisa Osaki, Hirotaka Sugiura, Hisatoshi Mimura, Sho Takamori, Norihisa Miki, Shoji Takeuchi Reproducible reformation of a bilayer lipid membrane using microair bubbles *Droplet*, Vol. 2, e73 (2023)
- Hisatoshi Mimura, Toshihisa Osaki, Sho Takamori, Kenji Nakao, and Shoji Takeuchi Lipid Bilayer Reformation Using the Wiping Blade for Improved Ion Channel Analysis *Analytical Chemistry*, Vol. 95, 17354-17361 (2023)
- Toshihisa Osaki, Koki Kamiya, Ryuji Kawano, Kaori Kuribayashi-Shigetomi, and Shoji Takeuchi Controlled Self-Assembly of Vesicles by Electrospray Deposition Small Structures, Vol. 5, 2300543 (2024)

### 【口頭発表】

- 竹内昌治
   Think Hybrid. ~ 匂いセンサから培養肉まで ~
   味の素株式会社社内講演, 2023 年 4 月, 神奈川
- 2. 竹内昌治 細胞エンジニアリングによる三次元組織構造
   第 31 回日本医学会総会 2023 東京, 2023 年 4 月, 東京
- Shoji Takeuchi Microfluidics for biohybrid robotics MICROSYSTEM ANALYSIS THAILAND SYMPOSIUM 2023, 2023 年 5 月, Bangkok, Thailand

- Shoji Takeuchi
   3D printing of biohybrid systems
   2nd French-Japanese Workshop on Additive
   Manufacturing, 2023 年 5 月, Tokyo
- 竹内昌治 Think Hybrid ~ロボットから培養肉まで~ 第1回「物質、デバイス、生命の融合」研究会,2023 年5月,北海道及びオンライン
- Shoji Takeuchi
   Biohybrid robotics based on microfluidic technology
   Swedish Microfluidics in Life Sciences (SMILS 2023),
   2023 年 5 月, Stockholm, Sweden
- 竹内昌治
   Think Hybrid! 異分野融合で近づく SF の世界
   市民公開講座 第 136 回分子科学フォーラム, 2023 年
   6月、オンライン
- 竹内昌治
   MEMS 技術の展望とバイオものづくりへの展開
   マイクロマシンセンター オンライン講演会, 2023 年
   6月, オンライン
- 竹内昌治 バイオハイブリッドな研究のすすめ 日本学術振興会 R041 バイオ・分子・ナノテクノロジ ー融合委員会第3回研究会, 2023 年6月, オンライン
- 竹内昌治 バイオハイブリッドデバイス技術
   第 2 回生理研 - 北大遺制研ジョイントシンポジウム, 2023 年 9 月, 北海道及びオンライン
- 竹内昌治
   Think Hybrid. ~異分野融合研究のすすめ~
   第 49 回ケミカルバイオロジー研究所セミナー, 2023
   年 9 月,大阪
- 高森翔、三村久敏、大崎寿久、近藤興、新冨美雪、 新冨圭史、大杉美穂、竹内昌治 アフリカツメガエル卵抽出液内封リポソーム内部構 造解明へ向けた研究 「細胞を創る」研究会 16.0, 2023 年 9 月,東京
- 13. 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の

研究開発 第 37 回機械系セミナー, 2023 年 9 月, 東京

 Hisatoshi Mimura, Toshihisa Osaki, Sho Takamori, Kenji Nakao, and Shoji Takeuchi
 SHAPE-CONTROLLED LIPID BILAYER FOR ENHANCED ION CHANNEL INCORPORATION The 27th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2023), 2023 年 10 月, Katowice, Poland

 Sho Takamori, Hisatoshi Mimura, Toshihisa Osaki and Shoji Takeuchi

 A CENTRIFUGAL DROPLET FORMATION UNIT FOR SINGLE-STEP GENERATION OF GIANT LIPOSOMES IN A CDICE DEVICE
 The 27th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2023), 2023 年 10 月, Katowice, Poland

- 16. 大崎寿久、中根卓馬、三村久敏、高森翔、三木則尚、 竹内昌治
   匂いガスの流れを利用した細胞匂いセンサの応答性の向上
   化学とマイクロ・ナノシステム学会 第48回研究会, 2023 年11月,熊本
- 三村久敏、大崎寿久、高森翔、小田悠加、竹内昌治 ハイドロゲルトラップ構造を用いたセンサ細胞アレ イの開発 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第48回研究会, 2023年11月,熊本
- 18. 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
   細胞を複数配列するためのハイドロゲルストリップ 作製デバイス
   化学とマイクロ・ナノシステム学会 第48回研究会, 2023 年11月,熊本
- Sho Takamori, Hisatoshi Mimura, Toshihisa Osaki, Tomo Kondo, Miyuki Shintomi, Keishi Shintomi, Miho Ohsugi and Shoji Takeuchi A challenge for nuclear assembly in synthetic cells using Xenopus egg extract 第 61 回日本生物物理学会年会, 2023 年 11 月, 愛知
- 20. 竹内昌治

バイオハイブリッドなものづくり キャノンメディカルシステムズ株式会社 ARL セミナ -2023「生体工学~細胞プロセシングの最先端」, 2024 年 1 月, 栃木

# 【特許】

国内特許出願 3件