

マイクロ流体技術を用いた人工細胞膜の構築とその応用

庄司 観・關谷悠介・平谷萌恵・川野竜司*

東京農工大学 工学研究院 生命工学専攻
〒184-8588 東京都小金井市中町2-24-16

Construction of Artificial Cell Membranes Using Microfluidics and Its Application

Kan Shoji, Yusuke Sekiya, Moe Hiratani, and Ryuji Kawano*

Department of Biotechnology and Life Science, Tokyo University of Agriculture and Technology (TUAT)
2-24-16, Naka-cho, Koganei-shi, Tokyo 184-8588, Japan

This paper describes construction of planar lipid bilayers and its application using microfabricated and microfluidic devices. Microfabrication and microfluidics have the potential to significantly change the way of recent chemical or biological experiments. Microfabricated devices offer the ability to work with smaller sample volumes, shorter reaction time, and the possibility of parallel operation. They also hold the promise of integrating an entire onto a single chip, as lab-on-a-chip. In this review, we introduce recent our approach for artificial cell membrane chip and bio-mimetic microfluidic devices. Artificial cell membranes have emerged as a biometric tool in such areas as membrane protein study, synthetic biology, and drug discovery. We propose a stable and reproducible preparation procedure for the planar lipid bilayers using “droplet contact method”, and they are applying to membrane protein measurements with a microfabricated device. These concepts are based on the conjugation between artificial (mechanically fabricated) materials and biomaterials, and this thought of the conjugation is promising to make unprecedented system.

Keywords : microfluidics / lipid bilayer / nanopore / electrochemistry / bioMEMS

1. はじめに

細胞は数マイクロメートルサイズの空間に精緻な構造, 逐次的な反応システムを凝集することで高度な機能を発現している. 最近この細胞機能を模倣, 再構成することで人工的な細胞を構築する人工細胞研究が行われている. 例えば合成遺伝子を作製し酵母を用い完全に人工の遺伝情報を持った人工生命と

も言える微生物を作り出す研究¹⁾や, 細胞分裂を人工的に誘起させる研究²⁾が報告されている. 細胞の中でも細胞膜は内側と外側を隔てるコンテナとしての役割のほか, 物質や情報のやり取りを行うインターフェースとしての役割を有している. 細胞膜はリン脂質二分子が親水面を水相に, 疎水面を内側に向け整列配向した層状構造を形成しており, 脂質分子以外にもステロール類, 糖鎖, 膜タンパク質など多様な分子によって構成されている. この細胞膜, 膜タンパク質などの膜部分を人工的に作製し, その機能を使うことで1) 膜タンパク質そのものの機能評価や薬剤分子への応答評価といった膜タンパク質研究, 2) 膜受容体を用いたバイオミメティックセンサ, と

* Corresponding Author
Tel: 042-388-7187
Fax: 042-388-7187
E-mail: rjkawano@cc.tuat.ac.jp

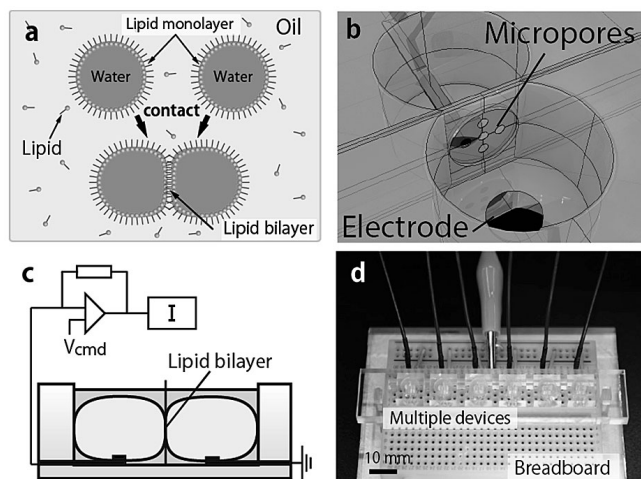


Fig. 1 a) Droplet contact method. b) Perspective illustration of the device. c) Side view of the device. d) Multiple arrayed device.

いう応用展開が期待できる。

しかしながら脂質二分子膜は厚さ～10 nm程度の超薄膜であり、これを「安定」にかつ「再現性」よく作製する技術が求められてきた。筆者らは人工的に取り出して使用可能な人工細胞膜（脂質二分子膜）を作製するために、マイクロ微細加工、マイクロ流体技術を用いて研究を行っている。これまでに脂質単分子膜を形成させた微小液滴を接触することで二分子膜を安定に作製可能な「Droplet contact method」を提案している。実際に、「∞」型のウェルにマイクロピペットで脂質溶液、水滴の順に滴下するだけで簡便に脂質二分子膜を作製でき、配線電極を通じ二分子膜中に再構成したイオンチャネルなどの膜タンパク質の電気生理学実験をハイスループットで行うことが可能になってきている (Fig. 1)。

本稿では筆者らが人工細胞膜（平面脂質二分子膜）システムを用いて最近取り組んでいる幾つかの研究について紹介する。

2. チャネル電流計測による抗菌性ペプチドのポア形成評価

抗菌性ペプチドとは、植物から哺乳類まで幅広い範囲の生物で保有が確認されているペプチドで、主に外敵となる菌からの防御機構の役割を担っている。これらのペプチドの作用機序のうち標的細胞の細胞膜と相互作用し、膜中でナノメートルスケールのポアを形成し膜を破壊することで発現する抗菌活性は薬剤耐性菌が比較的できにくいと言われている。膜に作用するペプチドは一般的に正電荷のアミノ酸を有しており、負電荷を有する細菌細胞膜と静

電相互作用をしやすいため幅広い菌類への抗菌活性は高いにも関わらず、母体の細胞や哺乳細胞への活性は低いことが知られている。また細胞膜に障害を与えることから細菌が薬剤耐性機構を獲得しにくいと考えられているため、抗菌薬への応用が期待されている。

ボンビニンとはキバラスズガエル (*Bombina variegata*) の皮膚の粘液から抽出された抗菌性ペプチドであり、20残基のアミノ酸から構成されている。ボンビニンH2とボンビニンH4（以下H2, H4）の2種類のペプチドを産生しており、H4はH2のN末端から2残基目のL-イソロイシンが自身の持つ異性化酵素によってD-イソロイシンに変換されることで生成される^{3,4)}。多くの抗菌性ペプチドにおいてこのような部分的なDアミノ酸の変異は見られ、Dアミノ酸が挿入されることによってポリペプチドが分解されるのを防ぐ効果があると考えられている。興味深いことに、この2種類のボンビニンの抗菌活性には違いがあり、H4の方がH2より活性が高いことが確認されているが³⁾、その理由は明らかになっていない。本研究ではボンビニンの抗菌活性が膜にポアを開けるためであると考え、人工細胞膜システムを用いポアを流れる電流を計測することにより、1残基のアミノ酸の光学活性の違いによる影響を分子レベルで明らかにする。

液滴接触法で作製した二分子膜にボンビニンを再構成することに成功しチャネル電流が観測できた。このことからボンビニンH2, H4どちらもヘリックス構造⁵⁾を持つモノマーが集合し膜中にポアを形成することが明らかとなった (Fig. 2a)。得られた電流は4種類の異なる形に分類可能であり、我々はこれらの電流がボンビニンの脂質膜中での会合状態を反映していると考えそれぞれの会合モデルを当てはめた⁶⁻⁸⁾ (Fig. 2b)。これらの電流値を定量的に解析する方法として1) 単位時間中に流れた電荷の評価 (Charge flux)⁹⁾、2) Step-like signalからのポアサイズ評価、の2つを行った。Charge fluxの評価において、その中央値は78 pC/sec (H2)、94 pC/sec (H4)となり、H4の方がポア形成能は高く膜に開けるポアの総面積が大きいことが示唆された (Fig. 2d)。次に安定な会合状態を持つと考えられる step-like signalの電流値とHilleの式^{6,10)}を用いることでポアの直径を算出したところ、中央値は2.4 nm (H2)、1.4 nm (H4)となりH2のポアの方がH4よりも大きいという結果になった (Fig. 2c)。これらの結果から、ボンビニンでは1アミノ酸の光学活性の変換によりL体 (H2) に比べD体 (H4) では膜中で会合して形成するポアが小さくなるがより安定な会合状態を示し、

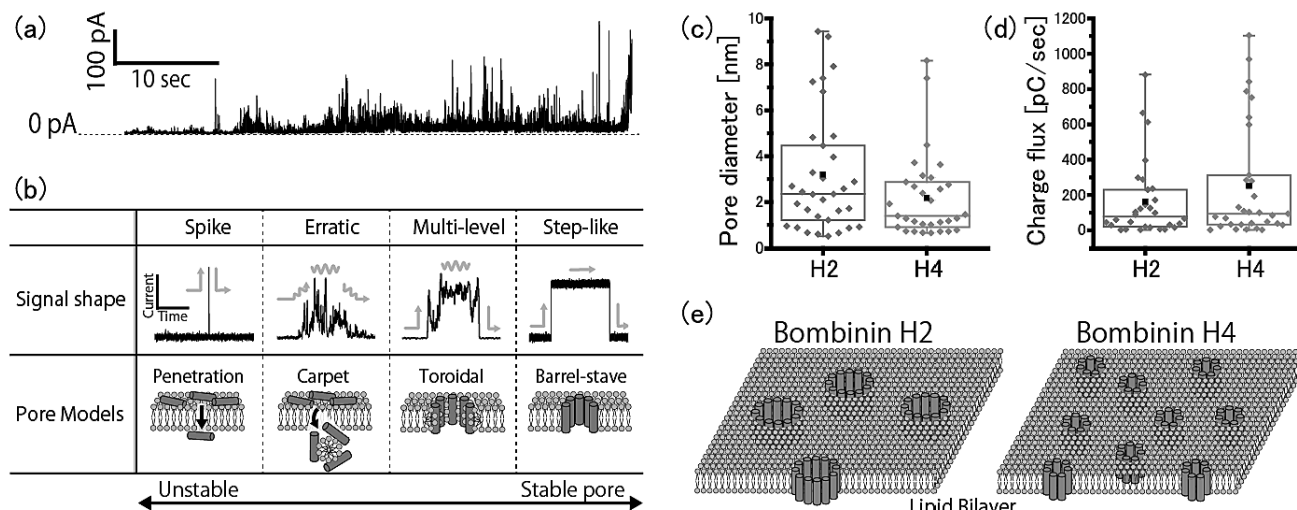


Fig. 2 (a) Representative current signal of bombinin H2. (b) Classification of signals with their shapes. We expected these signals are corresponded to proposed pore models. (c) Box plot of estimated pore diameter of each bombinin pore. (d) Box plot of charge flux. (e) These figures describe estimated property of each bombinin pore from analyses.

溶菌活性と直接相関があると考えられるイオン透過性がより高くなることが明らかとなった (Fig. 2e).

以上のように人工細胞膜システムを用いることで膜中でのペプチドの挙動を分子レベルで観察することが可能になった。これを利用することで以前までわからなかった、数分子レベルのペプチドの挙動やポアの安定性も知ることができる。そのため、様々な新規抗菌性ペプチド薬剤を設計した際の評価として利用が期待できる。

3. DNA コンピューティング技術とナノポアによる自律的癌診断・薬剤放出システムの構築

microRNA (miRNA) は18-25塩基からなるノンコーディングRNAの一種であり、細胞の成長やアポトーシス、シグナル伝達などの制御を担っている。miRNAの異常な発現は全ての癌で見られ、癌特異性が高いことが知られている¹¹⁾。さらに未成熟な癌細胞でも発現プロファイルが変化し、血液や唾液などの体液中に放出され検出が容易であることから、診断マーカーとして用いれば癌の早期診断に有用であるとされる¹²⁾。これまで一般的にmiRNAの検出にはDNAマイクロアレイ法¹³⁾や定量的逆転写PCR法¹⁴⁾が用いられている。しかしDNAマイクロアレイ法は反応に10~20時間を要し、感度が低く、再現性や特異性に欠けるといふ欠点がある。定量的逆転写PCR法もPCR反応前にmiRNAの逆転写反応を要し操作が煩雑である他、温度の制御に高価なサーマルサイクラーを要するため、ポイントオブケア検査などの簡

易的な診断への応用が難しい。そこで我々は、DNAコンピューティング技術とナノポアを用いて、1) 小細胞肺癌の早期診断マーカーとなるmiR-20aの迅速検出、さらに診断治療を同時に行うtheranosticsへの応用を見据え、2) アンチセンス核酸医薬(以下、薬剤DNA)の放出を自律的に行うシステムの構築を試みた。

DNAコンピューティングは、DNA分子を用いた並列計算に関して主に研究されてきたが¹⁵⁾、近年はその技術を*in vivo*での遺伝子治療に応用する研究が行われている。Shapiroらは肺癌によるmessenger RNA転写量の変化を自律的に認識し癌診断を行うDNAコンピューティングを報告している¹⁶⁾。この方法では、多種のDNA、RNAの中から診断マーカーとなる特定の核酸分子が存在する場合と存在しない場合の二状態を二進数の演算に適用し、出力された診断結果から次の反応に用いることができる。これまでDNAコンピューティングの出力を確認する場合、PCRでの増幅・ゲル電気泳動をした後に蛍光により確認するのが一般的であったが、多段階のステップを要し、結果を得るまでに長い時間が必要になる。我々はこの問題をナノポアを用いて解決することを試みた。ナノポアとは、チャンネル膜タンパク質により脂質二分子膜上に形成されるナノスケールの微細孔である。ナノポア計測ではポア内の分子の挙動をイオン電流値変化として高感度に検出することが可能であることから電気化学的一分子計測法として注目されている¹⁷⁾。溶血毒素タンパク質である α -hemolysin (α HL)は、脂質二分子膜上に直径約1.4 nmのナノポアを形成することができ、直径約1.0 nmのsingle-

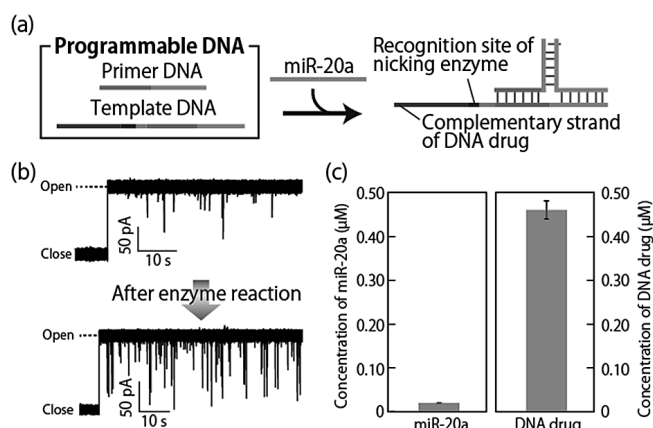


Fig. 3 (a) Scheme of miR-20a detection. (b) Typical current and time traces of reaction solutions in the presence of miR-20a. (c) Concentrations of miR-20a and DNA drug.

stranded DNAの検出に最適であり本研究でもこの α HLを用いた¹⁸⁾.

液滴接触法デバイスのマイクロドロプレットは、診断用と薬剤用の二つのドロプレットから構成され、間には人工脂質二分子膜を形成する。診断用ドロプレットには我々が配列設計を行ったProgrammable DNAをセットした。Programmable DNAは小細胞肺癌から分泌されたmiR-20aが存在する時のみmiR-20aとの間で三又の構造を形成し、酵素反応による薬剤DNAの合成・増幅が自律的に行われるようにプログラムした (Fig. 3a)。合成された薬剤DNAは脂質二分子膜中に形成された α HLナノポアを通過して薬剤用のドロプレットに移動する。ナノポア計測によりこの時のチャンネル電流値の変化を観察することで、薬剤DNAの合成の確認を迅速かつラベルフリーに行うことができる。

実際にmiR-20a存在下で30分間の酵素反応前後でのナノポア計測を行った。その結果、酵素反応後に60%以上の阻害を示すスパイク状の電流阻害が観測された (Fig. 3b)。これは小細胞肺癌マーカーであるmiR-20aをProgrammable DNAが認識し自律的に合成された薬剤DNAがナノポアを通過したことによって生じたものである。得られたシグナルのポア通過頻度 (イベント頻度) から薬剤DNAの定量を行った。イベント頻度とは、1秒間あたりに観測された電流阻害の回数を指す。miRNA存在下では反応前後でイベント頻度が0.14 /sから0.44 /sに上昇し、有意な差が見られた。あらかじめ用意した検量線を用いて合成量を定量した結果、 460 ± 20 nMと定量され、30分間でmiR-20a初期濃度 (20 nM) のおよそ23倍の薬剤DNAを合成できたことが分かった (Fig. 1c)。この増幅量は血中エクソソーム内に存在するmiRNA濃

度と小細胞肺癌治療に必要なアンチセンス薬剤濃度を考えると十分な量であった。

以上のようにDNAコンピューティング技術と、人工脂質二分子膜中に形成されたナノポアを用いることで、30分で自律的な癌診断と出力分子のラベルフリー検出ができた。また、ナノポア計測の結果から合成された薬剤DNAの定量を行うこともできた。これらのシステムを利用することで、ポイントオブケア検査のような簡易癌診断への応用や、病気の診断と治療を同時に行うtheranosticsへの展開が期待できる¹⁹⁾。

4. マイクロ流体技術を用いた平面脂質二分子膜の作製

膜タンパク質を再構築した人工脂質二分子膜は細胞膜の人工モデルとして幅広く利用されている²⁰⁾。特に平面脂質二分子膜は、膜透過タンパク質の物質透過性を電氣的に測定し評価することが可能であるため、膜タンパク質の評価システムとして注目されている。本稿でも述べたように筆者らのグループではこれまでに液滴接触法を用いることで安定な脂質二分子膜を再現性良く作製し、ポア形成ペプチドの評価、ナノポアを用いたRNA創薬の基盤技術の確立に成功している。本研究では、より複雑に構築された脂質二分子膜をよりハイスループットに作製するために、マイクロ流体技術を用いて脂質二分子膜の作製を行った。

マイクロ流体技術は、1 mm以下の微小空間内で溶液を扱う技術であり、Lab on a chipやDNAマイクロアレイの基盤技術となっている。マイクロ流体デバイス内では、粘性力が慣性力よりも支配的になるため、流体の流れは安定な層流を保ち、流路構造を任意に設計することで、流れのプロファイルを比較的自由に制御することが可能である。また近年、いくつかのグループがマイクロ流体デバイスを用いて脂質二分子膜の作製に関して報告している²¹⁾。我々は、マイクロ流体技術を用いて、平面脂質二分子膜を微小空間内に複数枚同時に配列した、平行配列型平面脂質二分子膜の構築を行っている²²⁾。平面脂質二分子膜を微小空間内に複数枚積層することができれば、cell-cellコミュニケーション、微生物やミトコンドリアのような内膜と外膜を持った構造を再現することができる。

本研究では脂質溶液と水溶液を交互に流す5層流マイクロ流路を用いることで、平面脂質膜を同時に複数形成できると考えた。この流路では脂質溶液と水溶液をマイクロ流体デバイスに流すことで脂質溶液

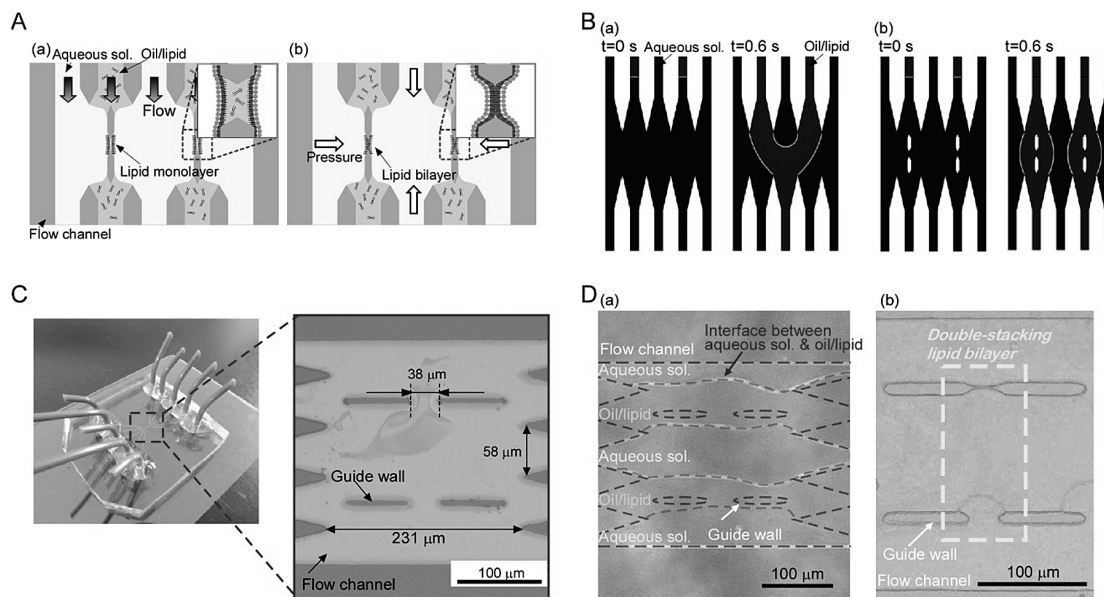


Fig. 4 A) Formation process of the lipid bilayer by using microfluidic device. B) Simulation results of (a) without and (b) with guide walls. C) Photograph and microscopic image of the micro channel. D) Microscopic images of (a) five layers flow and (b) lipid bilayers.

と水溶液の層が形成されその界面に脂質単分子膜が形成構築される。さらに、流体を制御し単分子膜同士を接触させることで脂質二分子膜を作製することが可能である (Fig. 4A)。はじめに、流体シミュレーションを行い脂質溶液と水溶液を5層流で送液可能なデバイス構造を設計した。シミュレーションの結果、通常の5層流路では、水溶液と脂質溶液間の界面張力により層状に流れないことが分かった。そこで、脂質溶液を流す流路に流体のガイドとなる微小壁を設けることで、脂質溶液と水溶液を層状に流すことができることが分かった (Fig. 4B)。

次に、フォトリソグラフィ技術により作製したマイクロ流体デバイス (Fig. 4C) を用いて脂質二分子膜の平行配列形成実験を行った。シリンジポンプを用いて脂質溶液と水溶液をマイクロ流路内に流すことで、シミュレーション結果通り、脂質溶液が微小壁に沿って流れ、脂質溶液と水溶液が層状に流れることを確認した。さらに、水溶液の流量を増加させることで、脂質溶液層が薄くなり、微小壁の間に脂質二分子膜が形成された (Fig. 4D)。

本研究では、マイクロ流体技術を用いることで微小空間内に脂質二分子膜を平行配列形成することに成功した。従来の液滴接触法では液滴のサイズが数ミリメートルスケールであったため脂質二分子膜と微小空間内に積層することは困難であったが、マイクロ流体技術を用いることで、デバイスの小型化に成功し脂質二分子膜の積層に至った。さらに、従来法では油層と水溶液層を多層状に流すためには流路

内の表面コーティングなど複数の工程が必要であったが、本研究では流路内にガイドを設けるという流路の構造をデザインすることで、油層と水溶液層の多層流を実現した。しかしながら、脂質二分子膜の寿命や作製の歩留まりに問題があるため、壁のサイズや流量などを最適化する必要がある。

将来、本マイクロ流体デバイスを用いて作製した積層脂質二分子膜により、cell-cell コミュニケーションのモデル作製や微生物が持つ内膜外膜様の構造を再現することで、細胞生物学の新たな実験ツールとして利用できることを期待している。

5. おわりに

本稿では細胞の「膜」部分を人工的に取り出して使うために微細加工・マイクロ流体技術を利用したマイクロシステム、及びその応用に関して述べた。人工材料と生体材料をうまく組み合わせることで、今後人工物、天然物の利点を融合させた高度なシステムの構築が期待できる。

文 献

- 1) Venter JC and co-workers : *Science*, **329**, 52-56 (2010)
- 2) Sugawara T and co-workers : *Nat. Commun.* **6**, 8352 (2015)
- 3) Simmaco M, Kreil G, Barra D : *Biochim. Biophys. Acta.*, **1788**, 1551-1555 (2009)
- 4) Jilek A, Mollay C, Tippelt C, Grassi J, Mignogna G, Müllegger J, Sander V, Fehrer C, Barra D, Kreil G : *Proc.*

Natl. Acad. Sci. USA, **102**, 4235-4239 (2005)

- 5) Mangoni ML, Papo N, Saugar JM, Barra D, Shai Y, Simmaco M, Rivas L : *Biochemistry*, **45**, 4266-4276 (2006)
- 6) Watanabe H, Kawano R : *Anal. Sci.*, **32**, 57-60 (2016)
- 7) Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ : *Trends Biotechnol.*, **29**, 464-472 (2011)
- 8) Chui JKW, Fyles TM : *Chem. Soc. Rev.*, **41**, 148-175 (2012)
- 9) Hille B : *J. Gen. Physiol.*, **51**, 199-219 (1968)
- 10) Macazo FC, White RJ : *Anal. Chem.*, **86**, 5519-5525 (2014)
- 11) Calin GA, Croce CM : *Nature Rev.*, **6**, 857-866 (2006)
- 12) Zhen D, Haddadin S, Wang Y, Gu LQ, Perry MC, Freter CE : *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, **4**, 575-586 (2011)
- 13) Thomson JM, Parker J, Perou CM, Hammond AM : *Nat. Methods*, **1**, 47-53 (2004)
- 14) Raymond CK, Roberts BS, Garrett-Engele P, Lim LP, Johnson JS : *RNA*, **11**, 1737-1744 (2005)
- 15) Hagiya M, Arita M, Kiga D, Sakamoto K, Yokoyama S : *DIMACS Ser. Discret. M.*, **48**, 57-72 (1999)
- 16) Benenson Y, Paz-Elitzur T, Adar R, Keinan E, Livneh Z, Shapiro E : *Nature*, **414**, 430-434 (2001)
- 17) Bayley H, Jayasinghe L : *Mol. Membrane Biol.*, **21**, 209-220 (2004)
- 18) Ashkenasy N, Sánchez-Quesada J, Bayley H, Ghandiri MR : *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 1401-1404 (2005)
- 19) Hiratani M, Ohara M, Kawano R : *Anal. Chem.*, **89**, 2312-2317 (2017)
- 20) Tanaka M, Sackmann E : *Nature*, **437**, 656-663 (2005)
- 21) Zagnoni M : *Lab Chip*, **12**, 1026-1039 (2012)
- 22) Shoji K, Kawano R : *Proc. of MicroTAS 2016* (2016)

(Received 1 February 2017 ;

Accepted 11 February 2017)

著者略歴

庄司 観 (しょうじ かん)

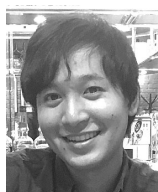
2016年3月 大阪大学大学院工学
研究科博士課程修了

2016年4月 日本学術振興会 特
別研究員 (PD)



關谷 悠介 (せきや ゆうすけ)

2016年4月 東京農工大学大学院
工学府生命工学専攻
博士前期課程



平谷 萌恵 (ひらたに もえ)

2016年4月 東京農工大学大学院
工学府生命工学専攻
博士前期課程



川野 竜司 (かわの りゅうじ)

2005年3月 横浜国立大学工学研
究院博士課程修了
2014年1月 東京農工大学工学研
究院テニユアトラッ
ク 特任准教授