研 究 報 告 書

「三次元人工細胞アレイからなる化学チップの創成」

研究期間: 平成 20 年 10 月～平成 24 年 3 月
研 究 者: 佐々木善浩

1，研究のねらい

シリコンやガラス基板などから作製される極めて小さなチップ上に、分析、合成、抽出などの化学プロセスを集積する化学チップ作製技術の開発は、ゲノミクス、プロテオミクス、マイクロマシニングなどの研究分野の中核をなすものであり、近年、その動向が注目を集めている。例えば、バイオや環境分野における超微量分析やハイスループットスクリーニング技術の実現、環境に負荷の小さいデバイスやベッドサイド臨床検査の開発、さらにはこれらを利用した新市場の開拓など、技術面、社会面、産業面からのニーズは高く活発な研究が行われている。しかしながら今後、これらの化学チップ技術をプロテオーム創薬やバイオインフォマティックスなどの生命科学分野にさらに積極的に展開する上では、ガラスやシリコンなどに代わり、生体分子に対し親和性が高く、例えば膜タンパク質などを効率的に集積しうる新規のバイオデバイスの開発が必要不可欠である。この観点から、デバイス作製のための材料として生体膜モデルなどとして盛んに研究が行われている人工細胞膜（リポソーム）に着目した。人工細胞膜は、遺伝子やタンパク質などをはじめとする様々な生体分子を効率よく集積するための動的な特性を有する超分子基板であり、高分子・無機材料からなる静的な基板にかわる第三のバイオ基板として有用であると考えられる。

以上の背景をもとに、本研究では、ボトムアップ的な手法とトップダウン的な手法とを融合させることで人工細胞膜（リポソーム）が連結された三次元人工細胞アレイを作製し、これを自己集積型バイオチップへと展開することを目指した。具体的には、オリゴヌクレオチドの相補的塩基対形成を利用した人工細胞からなるマイクロアレイの構築、さらにこれらの人工細胞膜をネットワーク化するための手法の確立を目指した。

2．研究成果

<u>オリゴヌクレオチドによるリポソーム集積構造の構築</u>

人工細胞アレイ作製のための予備的検討として、DNA による水溶液中でのリポソームの集積挙動について検討した。具体的には、リポソームの脂質二分子膜への疎水性アンカーとして機能する疎水性のコレステリル基を修飾したDNAによりリポソームを標識し、相補的塩基対形成によるリポソームの集積を行った。その結果、異なる配列を有する DNA でラベルした二種類のリポソーム（粒径 100 nm）を混合し、この溶液に相補性を有するリンカーDNA を添加すると、リポソームが選択的に会合することが動的光散乱測定などから明らかになった。ここで、リンカーDNA の添加量を変化させることで、リポソームからなる会合体の粒径を制御しえることも示された。また、示差走査型熱量分析により、この会合挙動について検討を行ったところ、リポソームがその形態を保ったまま集積していることも明らかとなった。

同様の原理を用い、固体基板上へのリポソームの集積挙動について検討した。その結果、相補的塩基対形成に基づき DNA でラベルしたリポソームがその内水相を保持したまま DNA

を修飾した基板上に集積しえることが確認された。この集積挙動の時間変化ならびに集積量を、水晶発振子マイクロバランス法により定量的に評価した。また、ここで用いるオリゴヌクレオチドの塩基配列は任意かつ容易に変化させることができる。そこで、複数の疎水化 DNA とリンカーDNA を組み合わせると、基板に対して水平方向並びに垂直方向にリポソームを集積できることも示された。以上の結果から、これらの手法により図 1 に示すように、リポソームが融合することなくその形態を保ったまま、三次元方向に密に集積したリポソームアレイを作製できることが明らかとなった。

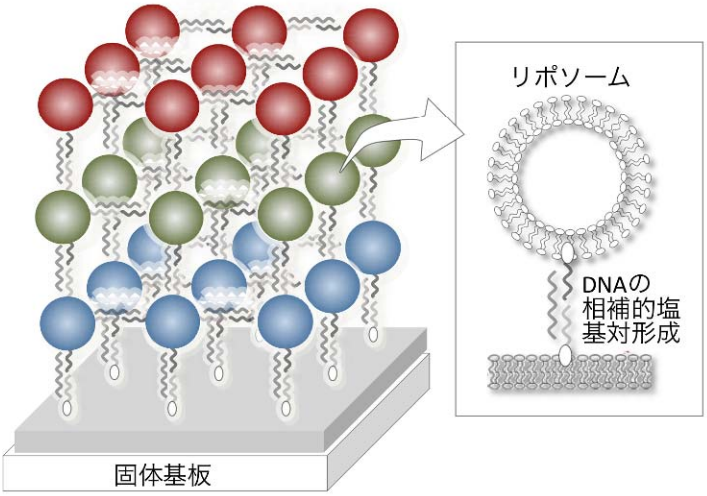

図 1. DNA の分子認識に基づき基板上に作製される三次元リポソームアレイの模式

ネットワーク化のための脂質ナノチューブの作製

脂質ナノチューブによるリポソームの有機的な連結を行った。脂質ナノチューブを作製する手法はこれまでにもいくつか報告されているが、脂質ナノチューブによりリポソームを連結しこれを容易にアレイ化する技術は確立されていない。本研究で目的とする人工細胞アレイをネットワーク化するための脂質ナノチューブ作製法に求められる条件としては、(1) 多くの脂質膜系に適用可能であること、(2) 安価かつ容易な操作で作製可能であること、(3) 伸長方向を容易に制御できること、などがあげられる。上述の条件を満たす脂質ナノチューブの形成手法の確立を目的として、ナノ微粒子をリポソームに内包し、このナノ微粒子を電場により泳動させることで、電場方向に脂質チューブを作製する手法を開発した。具体的には、負電荷を有する数十から数百 nm の粒径を有するラテックスナノ粒子を内包した巨大リポソームを、アビジン−ビオチン相互作用を用いて固定化し、このリポソーム固定化基板に電圧を印可することで、ナノ微粒子の電気泳動に基づき脂質ナノチューブが形成されることを見いだした(図 2)。これら脂質チューブ形成のメカニズムなどについて、脂質の種類や電圧強度などの諸パラメーターが及ぼす効果を網羅的に検討するため、脂質チューブ形成挙動の定量化を試みた。その結果、電極形状や、ジャイアントリポソームの固定化法等を改良することで、電圧強度に依存した脂質ナノチューブの形成挙動を制御しうることを見いだした。

他の外部場を用いた場合にもこの微粒子の流動による脂質ナノチューブ作製が可能である。荷電微粒子のかわりに磁性微粒子をジャイアントリポソームに内包させ、電磁石もしくはネオジム磁石で磁性微粒子を泳動させた場合にも同様の脂質ナノチューブ形成がみられた。さらに、慣性力(遠心力)により微粒子を泳動させた場合においても脂質ナノチューブの作製が可能であった。以上の結果から、何らかの外部場によりリポソームに内包された微粒子を泳動させることによる脂質ナノチューブ作製手法の一般性が示された。

脂質ナノチューブによりリポソームアレイをネットワーク化しバイオチップに応用するためには、得られるアレイの安定性などを考慮すると何らかの形でアレイを固定化するアプローチが重要である。このような観点のもと、アビジン―ビオチンではなくアガロースゲル中にリポソームを固定化した。この系においても、同様に微粒子の泳動を行うことで、脂質ナノチューブが作製できることを明らかにした。さらにここで作製される脂質ナノチューブがゲル中に固定化されたリポソームを確かに連結していることも示された。

上述の系に加え、脂質ナノチューブ形成の定量評価の際に、サンプル調製や外部場印可などに伴う液体の流動の効果を検討する中で、微小流路中で一定のせん断流を生じさせることが可能なマイクロチャンバーを用いることによっても脂質ナノチューブが作製できることを見いだした。具体的には、*ibidi* 社製スライドグラスチャンバーを用いアビジン―ビオチン相互作用により固定化されたジャイアントリポソームに 0.3 mL/min 程度のせん断流を与えることで脂質ナノチューブを極めて効率的に作製しうることを明らかにした。またここで得られる脂質ナノチューブが確かに内水相を有していることも示された。この結果は、その方向が完全に規制された中空の脂質ナノチューブを脂質の種類を問わず極めて容易に作製できる手法を初めて確立した点で興味深い。Bio-MEMS などのように、従来型のシリコン、ガラス基板を用い、トップダウン手法により生体適合型の化学チップを作る研究が盛んに行われている。また、DNA、タンパク質などの生体分子そのものをアレイ化することで、マイクロチップを開発する研究も国内外において多く行われている。ごく最近では、インタクトなリポソームを集積したリポソームアレイを、ナノスケールのコンテナーとして用いる研究も行われている。例えば、トップダウン的な手法により、人工細胞としてのこれらリポソームを連結したリポソームネットワークをつくる研究も報告されている。しかしながら、いずれの手法においても高価な装置、熟練したテクニック、希少な生体試料等を必要とする。この点に関して、比較的安価で多彩な物性を容易にチューニングすることが可能なナノ微粒子を用い、電場、磁場印加などのトップダウン手法に基づくナノ粒子の泳動現象と、脂質分子のボトムアップ的な自己組織化能とをうまく組み合わせることでバイオチップ作製のためのリポソームネットワークアレイを構築できることを明らかにした本結果は有用であるといえる。

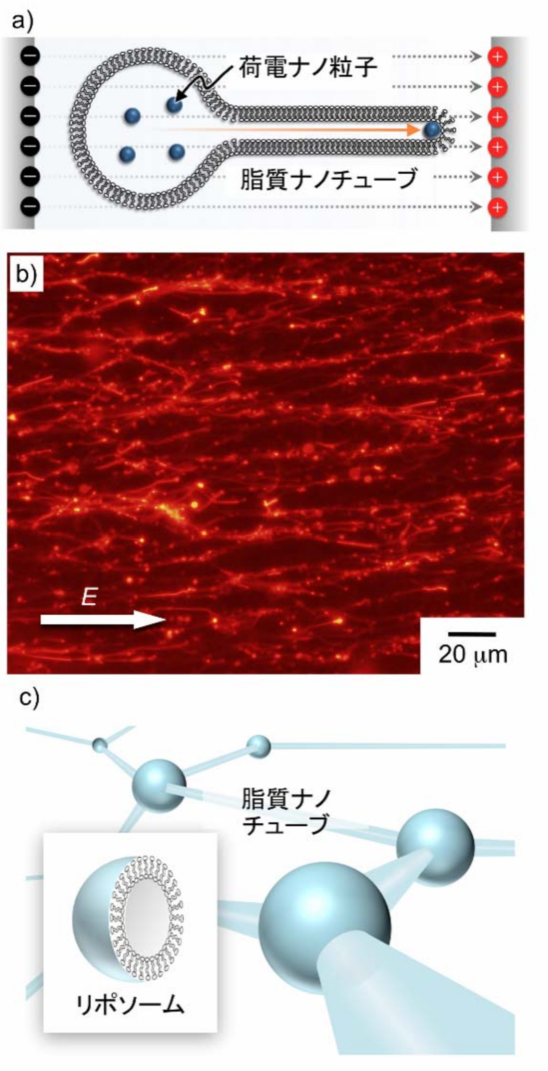

図 2. 電場により形成される脂質ナノチューブ形成の模式図（a）蛍光顕微鏡観察像（b）ならびにリポソームネットワークの概念図（c）.

3，今後の展開

これまでの研究を踏まえ、プリント基板などを用いてさらにその空間構造が制御された脂質ナノチューブネットワーク系を構築する。また、細胞とのコミュニケーション手法の一つとしての脂質ナノチューブによる細胞内物質輸送システムの実現、さらにこの手法を用いた革新的な細胞機能性手法の確立を目指す。デバイス化の上ではさらなる脂質ナノチューブおよびネットワークの安定化は必要不可欠である。この観点のもと、ヒドロゲル中のリポソームならびに脂質膜を安定化する手法として、多糖からなるナノゲルを用いる手法を別途開発している。この手法を本リポソームネットワーク系に展開し、さらにその構造が安定化された脂質ナノチューブを作製し現実のデバイス応用を目指したい。

4，自己評価

当初の目標では、三次元的に人工細胞（リポソーム）を配置し、これを自在に連結することを目指して研究を開始した。三次元的なリポソームの組織化については当初の計画どおりに研究が進み期待した結果が得られた。リポソームの連結手法については、当初、脂質膜の融合や、チャネル型の膜タンパク質などの生体分子の組み込みによる方法を提案していたが、その手法の煩雑さや制御の困難さなどから、当初計画していたような結果が得られなかった。代替手法として、当初の研究計画においては想定していなかった「外部場による脂質ナノチューブの形成制御」という全く新しい手法を確立した。この手法は、自己組織化のみによるリポソーム間連結の完全な制御という観点では未だ技術的に未熟であるが、その手法の簡便さ、リポソームを形成する物質を問わない手法の一般性、脂質ナノチューブを形成させるための外部場の多様性（電場、磁場、重力場）などから当初予定していた有機的に集積されたリポソームによるデバイス作製というアウトプットを得る点では方法論として有用であり、今後の展開が期待される。

5，研究総括の見解

オリゴヌクレオチドの相補的塩基対形成を利用してマイクロアレイの構築、さらにこれらをネットワーク化し、三次元人工細胞を模倣したアレイを作製し、自己集積型バイオチップへと展開することを目指している。

佐々木氏は、リポソームの脂質二分子膜への疎水性アンカーとして機能するコレステリル基修飾 DNA を用いてリポソームを標識し、相補的塩基対形成によるリポソームの集積を行い、リポソームが融合することなくその形態を保ったまま、三次元方向に密に集積したリポソームアレイを作製できることを明らかにした。次に、ナノ微粒子をリポソームに内包し、このナノ微粒子を電場により泳動させることで、電場方向に脂質チューブを作製する手法を開発した。

当初、リポソームの脂質膜の融合やチャネル型の膜タンパク質などの生体分子の組み込み法を提案していたが、研究者自身も述べているようにその手法の煩雑さや制御の困難さなどから、当初期待した結果が得られなかった。「外部場による脂質ナノチューブの形成制御」は、そのための代替手法である。生体においては、ホルモン、成長因子などの拡散型メッセンジャー物質の伝搬を行うことではじめて細胞間のコミュニケーションが可能となり、それを目指すという提案であるが故に、本提案が賛否両論の末採択されたという経緯があったことをふまえる

と、総括としては、その可能性をあらゆる方向から忍耐強く検討してほしかったというのが率直な気持ちである。結果、リポソームアレイや、脂質ナノチューブが現時点で作りっぱなしの印象を与えてしまうのは否めない。興味深い課題提案であるゆえに、目的としたことを今後も引き続き、継続発展してほしいと切に願う。

6．主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1. Y. Sasaki, Y. Shioyama, W.-J. Tian, J. Kikuchi, S. Hiyama, Y. Moritani, T. Suda, "A Nanosensory Device Fabricated on a Liposome for Detection of Chemical Signals", *Biotechnol. Bioeng.*, **105**, 37-43 (2010).
2. Y. Sasaki, K. Abe, K. Akiyoshi, "Construction of a 3D-liposomal array for Biochip Applications", *Nanobio-Interfaces in Relation to Molecular Mobility*, 97-102 (2010)
3. Y. Sasaki, M. Mukai, A. Kawasaki, K. Yasuhara, J. Kikuchi, Switching of the Enzymatic Activity Synchronized with Signal Recognition by an Artificial DNA Receptor on a Liposomal Membrane, *Org. Biomol. Chem.*, **9**, 2397-2402 (2011).
4. K. Yasuhara, Z. Wang, T. Ishikawa, J. Kikuchi, Y. Sasaki, Y. Moritani, S. Hiyama, T. Suda, Specific delivery of transport vesicles mediated by complementary recognition of DNA signals with membrane-bound oligonucleotide lipids, *Supramol. Chem.,* **23**(3,4), 218-225 (2011).
5. Y. Sekine, K. Abe, A. Shimizu, Y. Sasaki, S. Sawada, K. Akiyoshi, Shear flow-induced nanotubulation of surface-immobilized liposomes. *RSC advances*: DOI: 10.1039/C2RA00629D (2012).

（2）特許出願

研究期間累積件数：1 件

発　明　者：　佐々木善浩，秋吉一成

発明の名称：　脂質構造体の製造方法

出　願　人：　東京医科歯科大学大学

出　願　日：　2011/2/28

（3）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物等）

1. 佐々木善浩，阿部慶太，秋吉一成．バイオ応用のための三次元リポソームアレイの構築．第 59 回高分子討論会，札幌，2010 年 9 月（依頼講演）

2. Sasaki Y. Self-assembled liposomal array for biochip applications. International Symposium on Integrated Molecular/Materials Engineering, Beijing, China, Jun, 2011 (Invited)

3. Sasaki Y, Abe K, Kikuchi J, Akiyoshi K. Fabrication of artificial cell array for creation of biochip. International Symposium on Nanobio-Interfaces Related to Molecular Mobility, Tokyo, Japan, November, 2009. (Invited)

4. 佐々木善浩，秋吉一成．生体膜トンネルナノチューブ、その生物学的機能と材

料化学への展開, 化学, 67, 68-69, 2012.

5. 第 19 回高木賞, 佐々木 善浩、阿部 慶太、秋吉 一成, “バイオチップ作製へ向けた三次元リポソームアレイの構築”, 第 4 回バイオ•ナノテクフォーラムシンポジウムおよび第 19 回インテリジェント材料／システムシンポジウム, 東京, 2010 年 3 月.