

人工脂質膜小胞の自己組織化

Self-assembly of artificial lipid membrane vesicles

精密工学専攻 21号 齊藤明日香
Asuka Saito

1. 諸言

近年、人工脂質膜小胞（リポソーム）を人工細胞のカプセルとして利用した研究が多くなされている。その多くは、内部に封入した生化学反応の特徴を調べるなど、個々のリポソームを実際の細胞に模擬した反応容器として利用したものである⁽¹⁾。これらは、単細胞のモデルとみなすことができる。一方、生命は進化の過程で、複数の単細胞が集合して個体としての機能を持つ、多細胞化を成し遂げた⁽²⁾。しかし、人工細胞の再構成系で多細胞体の構築を試みた例は少ない。

本研究では、単細胞のモデルとして利用されているジャイアントユニメラリポソーム（GUV）の自己組織化手法を提案する。GUV 同士に接着力を持たせれば、不定数の凝集体を形成する。しかし、多細胞体は細胞が1層のシート状に並んだものが基本構造になっているため、ランダムな凝集では多細胞体のモデルとして不十分である。シート構造の形成には、コロイドソームの形成法⁽³⁾にみられるような、油水界面への吸着の利用が考えられる。しかし、GUV を形成する脂質膜は、水油界面で二重膜構造を維持できない。

本研究では、水性ポリマー二相系（Aqueous Two Phase System; ATPS）⁽⁴⁾の相界面を利用した GUV の配列法を検討した（Fig. 1）。ATPS は異なる2種類の高分子の水溶液を同一容器に加えると相界面を形成する性質を持つ。従来、ATPS は、水溶性分子の2相への親和性の違いを利用し、分子や粒子状物質の分離に用いられてきた^(4,5)。この界面は小さいながらも界面エネルギーを有するため、粒子状物質の吸着を促すこともできる⁽⁶⁾。ソフトな細胞サイズの粒子である GUV を ATPS の界面に吸着・配列させ、多細胞様の構造が自発的に形成する条件を探索した。

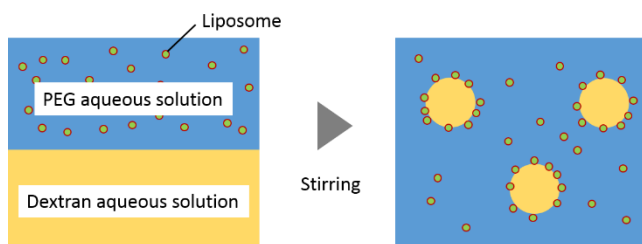


Fig. 1 Assembly of GUVs at the ATPS interface.

2. 水性二相界面（ATPS）

2.1. ATPS 系の状態図

GUV を吸着させるための ATPS 界面をつくる組成の指針を得るために、ATPS の状態図を作製した⁽⁴⁾。二種類の水溶性ポリマーとして、ATPS の研究で多く用いられるポリエチレングリコール（PEG）、デキストラン（DEX）を利用した。ATPS

の相挙動は、高分子の化学組成だけでなく、その分子量によっても異なる。本研究では、従来研究で多く用いられている分子量の組み合わせ（PEG 20k と DEX 70k）に加え、ATPS を形成する高分子の質量濃度の低下をねらい、より大きな分子量の組み合わせ（PEG 500k と DEX 200k）も検討した。

方法として、濃度を調整した PEG 水溶液と DEX 水溶液の混合物を複数種類準備した。振動攪拌後に遠心を行い、界面の有無を目視で確認した。界面があれば純水を加えて同様の作業を繰り返し、界面がなくなった濃度を記録した。さらに、ATPS を2種類作製し、上層と下層における PEG と DEX の濃度を旋光度と屈折率より計測し、状態図を作成した。

2.2. 実験結果

Fig. 2 に、界面消滅点と PEG, DEX の濃度計測により得られた状態図を示す。図中のマーカーが計測データで、実線はフィッティング曲線である。実線の右上側の組成であれば、二相界面が形成される。この結果から、PEG 20k/DEX 70k ではどちらも 10%w/w 以上の濃度が必要であるが、PEG 500k/DEX 200k では数%w/w 程度の低濃度でも ATPS が形成されることがわかった。しかし、高分子の濃度が下がることで屈折率差が低下し、目視での界面の有無確認が困難になることが多くあった。また、界面エネルギーの大きさは、双曲線上に引く Tie line の長さに比例する。PEG 500k/DEX 200k では Tie line が短くなるため、界面張力の低下、また、分子や粒子の吸着力低下が、状態図から予想された。

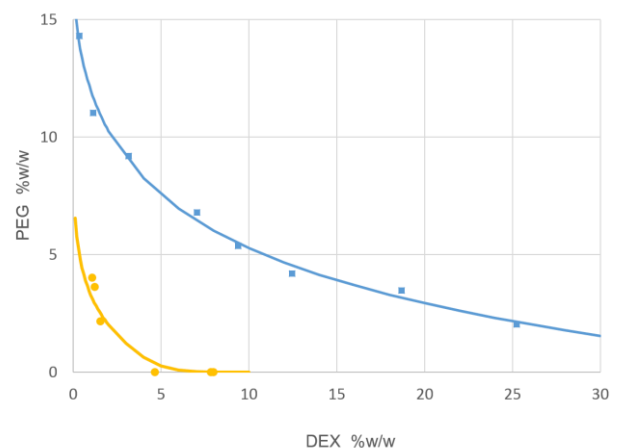


Fig. 2 Phase diagram of the ATPS consisting of PEG 20k/DEX 70k (■) and PEG 500k/DEX 200k (●).

2.3. 二相界面の作製方法の検討

GUV を吸着させるための球形の ATPS 界面を作製するために、2種類の高分子溶液の操作方法を検討した。

2.3.1 攪拌振動による APTS 界面の作製

攪拌振動を利用し、一方の高分子溶液(DEX)を分散させることで球形界面を作製する方法を試みた。まず、それぞれ濃度 20%w/w の PEG 20k と DEX 70k を同じチューブ内に 4 : 1 の割合で加えた (終濃度 PEG 20k 16%w/w, DEX 4%w/w) 。それを、ボルテックスで振動攪拌し、5 分静置した。その後、チューブ内の底面部の溶液を滴出し観察した。同様の操作を、それぞれ濃度 5%w/w の PEG 500k と 10%w/w の DEX 200k の組み合わせでも実施した (終濃度 PEG 500k 4%w/w, DEX 2%w/w)。

2.3.2 溶液滴下による APTS 界面の作製

PEG 溶液中に DEX 溶液を滴下し、界面を作製する方法を試みた。ここで、DEX 溶液は PEG 溶液よりも比重が重く、滴下すると下に沈むため、倒立顕微鏡による観察が容易になる。まず、ガラスとシリコン樹脂 (PDMS) で作製した容器の中に 1 ml の PEG 溶液を適量入れ、その後、0.2 μ l の DEX 溶液を滴下する。その後、5 分静置し倒立顕微鏡で観察した (Fig. 3)。

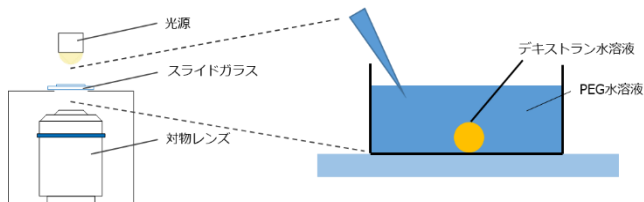
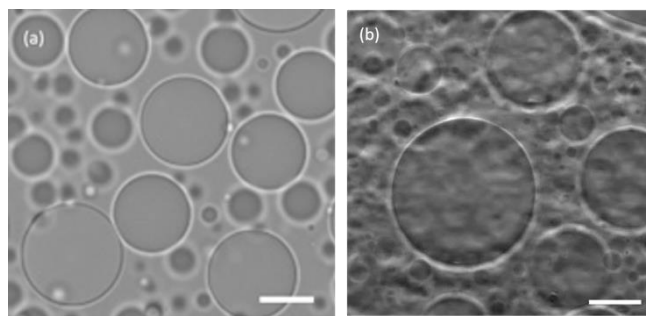


Fig.3 Experimental system for injecting a drop of the dextran solution into the PEG solution.

2.4 実験結果

振動攪拌を行った場合は、どちらの組成においても、直径 5~50 μ m 程度の分散が大きい Water-in-Water (W/W) エマルションが形成した (Fig. 4)。DEX 溶液の量を調製することで、エマルションの量を調製することが可能である。しかし、分散相 (ここでは DEX 溶液相) が多い場合は、静置中に隣接するエマルション同士が融合し、巨大化してしまう。理想の大きさとして 500 μ m ほどの大きさを目指し、時間経過とともにこの大きさを求めることが可能であろう。この現象は、PEG 20k/DEX 70k の場合と PEG 500k/DEX 200k の場合で同様であった。また、PEG 500k/DEX 200k の場合は、溶液の粘性が非常に高いため、攪拌に時間を要した。



(Scale Bar=20 μ m)

Fig.4. APTS interfaces formed by the vortex stirring.

(a) PEG 20k/DEX 70k, (b) PEG 500k/DEX 200k.

PEG 溶液中に DEX 溶液を滴下する方法においても、両組成で相界面の形成が顕微鏡で観察された。PEG 20k/DEX 70k の場合は、直径 400 μ m 程度の球形のエマルションが得られ (Fig. 5a)、長時間の静置においてもその形状が変化することはなかった。しかし、PEG 500k/DEX 70k の場合は滴下した当初は球形の状態を維持していたが、静置中に界面が徐々に広がり、形状が変化していきってしまうことが分かった (Fig. 5b, c)。これは、界面張力が小さいため、曲率が大きい形状を保てなくなっているためだと考えられる。

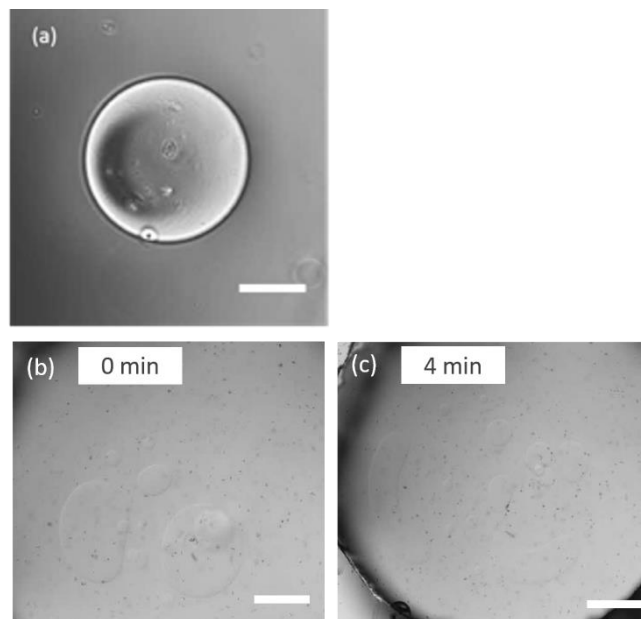


Fig. 5. APTS interfaces formed by injecting a drop of the DEX solution into the PEG solution. (a) PEG 20k/DEX 70k (Scale bar = 20 μ m), (b, c) PEG 500k/DEX 200k (Scale Bar = 500 μ m).

3. APTS 界面への GUV の付着

3.1. GUV の作製

本研究では、巨大一枚膜ベシクル (GUV) を界面通過法⁷⁾により作製した。材料として、脂質には POPC:POPG:Cholesterol を 9 : 1 : 1、または POPC : POPG : Cholesterol : DSPE-PEG を 9 : 1 : 1 : 1 の重量比で混合したものを用いた。内液はスクロース濃度が 500 mM、外液はグルコース濃度が 500 mM にな

るように調整した。この組成では、外液よりも内液のほうが比重が大きいため、リポソームが沈降して顕微鏡観察が容易になる。加えて、緩衝液となる Tris を内液と外液両方に 50 mM 加えた。以上の組成で、混合脂質を溶解したオイル（流動パラフィン）中に内液の W/O エマルジョンを振動攪拌により作製し、さらに外液上に重層し遠心することで、単層の脂質二重膜からなるリポソームを得た。油溶性の赤色蛍光分子 (DiI) をオイルに、および水溶性の緑色蛍光分子 (Calcein) を内液に含めることで、膜および内液を蛍光顕微鏡で観察することを可能にした。

その結果、どちらの組成においても、直径 5~20 μm 程度の球形 GUV が得られた (Fig. 6)。

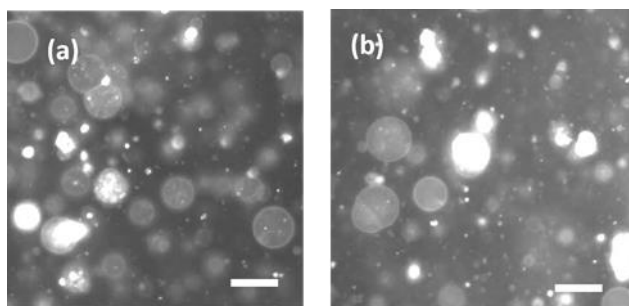


Fig. 6. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) images of GUVs. (a) Without DSPE-PEG. (b) With DSPE-PEG (Scale Bar = 20 μm).

3.2 PEG 溶液中で GUV の作製

本研究では、PEG 溶液中に GUV を懸濁し、その状態から界面に吸着させる方法を採用した (Fig. 1)。一方、PEG は細胞融合実験に使われるなど、細胞やリポソームを凝集させ、膜融合を誘発することが知られている。従って、ATPS を形成可能な PEG が存在する環境で、リポソームを独立した状態で存在できる条件を明らかにする必要がある。

予備検討において、高濃度の PEG 20k が外液に存在する条件で界面通過法を試みたところ、GUV がほとんど得られなかった。従って、通常の組成で GUV を作製したのち、外液に PEG を加える方法を試みた。ここで、混合脂質中に、脂質の頭部基に PEG 鎖を持つ DSPE-PEG 2000 を含むものと含まない GUV を作製して比較した。内液には外液と同じ分子量の PEG を同濃度で加えた。具体的には、作製した GUV 溶液を遠心し、チューブ底に沈殿させた。そして、上清をできるだけ取り除き、ピペッティングにより GUV を溶液内に分散させた。その溶液を、PEG 20k 15%w/w または PEG 500k 3.75%w/w を含む外液に加えた。

3.3 実験結果

3.3.1. DSPE-PEG 脂質の影響

DSPE-PEG 脂質の有無による、PEG 溶液添加後の GUV の様子を観察した。DSPE-PEG は PEG 鎖があるため、PEG 相に親和性があり、凝集を防げると考えた。予想通り、混合脂質に DSPE-PEG を含まない場合は、PEG 20k の添加後には

GUV がランダムに凝集した (Fig. 7a)。一方、DSPE-PEG を含有した GUV は、PEG 20k (15%w/w) の中でも各個体が独立した状態で存在している様子が観察できた (Fig. 7b)。以上の結果より、GUV の膜に DSPE-PEG を加えることは、PEG/DEX の ATPS において小胞を安定化させるために有効であることがわかった。

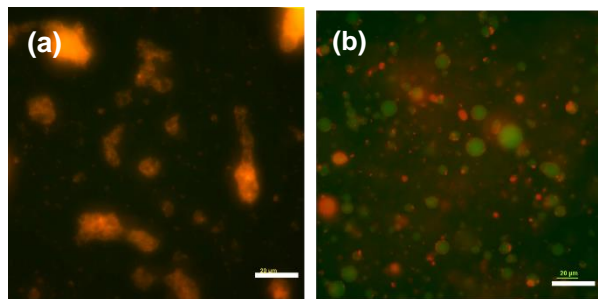


Fig. 7 CLSM images of GUVs after addition of PEG 20k (15%w/w) into the outer solution. (a) Without and (b) with DSPE-PEG in the membrane composition. Scale bar = 40 μm .

3.3.2. 高分子の低濃度化による凝集の防止

2章において、分子量が大きい高分子 (PEG 500k/DEX 200k) を用いることで、重量濃度が小さい領域でも二相界面が得られることを明らかにした。本節では、PEG 500k を用いたときの GUV の挙動を観察した。PEG 500k (3.75%w/w) を含む外液中に作製した GUV を加えたところ、GUV 膜に DSPE-PEG が含まれるかどうかに関わらず、GUV は凝集せず分散した状態が保たれた (Fig. 8)。以上の結果より、界面を作製する ATPS には、リポソームの形状や分散状態に影響しない PEG 500k/DEX 200k の系が適していることがわかった。

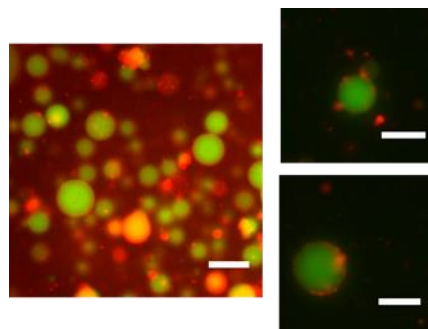


Fig. 8 CLSM images of GUVs without DSPE-PEG. (Left) Before and (right) after addition of the outer solution containing PEG 500k at 3.75%w/w (Scale bars = 20 and 10 μm , respectively).

3.4. ATPS 界面へのリポソームの吸着

最後に、GUV を含む PEG 溶液中で DEX 相のエマルジョンを作製し、GUV の界面への付着を評価した。これは、ATPS の界面が GUV の自己組織化の足場になるかどうかを確認するためである。方法としては、界面通過法により作製した GUV 溶液 (膜組成: POPC : POPG : Cholesterol を 9 : 1 : 1 または POPC : POPG : Cholesterol : DSPE-PEG を 9 : 1 : 1 : 1)

の外液を、遠心後に PEG が含まれるものに置換した後、DEX 溶液を加えることで界面を作製した。界面の作製には、滴下法と攪拌法の両方を試した。界面形成後、そのまま静置し、顕微鏡観察を行った。以下の実験は、PEG 500k/DEX 200k を用いて行った。

3.5. 実験結果

DEX 溶液を滴下する方法では、DEX 液滴が沈降する間に、GUV が界面に付着することが分かった。しかし、GUV が W/W 液滴の界面を完全に覆う状況は確認されなかった。多くの GUV の吸着を促すため、ピペッティングにより W/W 液滴周辺の外液を攪拌すると、吸着量は多少増加するものの、わずかなせん断力で界面がちぎれ、安定性に欠ける結果を得た。

一方、攪拌振動により ATPS 界面を形成する方法では、W/W 液滴サイズの制御はないものの、界面の形成と GUV の吸着が同時に起こるため、より効率的な GUV の吸着がみられた (Fig. 9a,b)。一方、攪拌時のせん断により、大きな球形の GUV が多く破損した様子も見受けられた。今後、中間的な強度の攪拌方法が必要だと考えられる。

最後に、DSPE-PEG の有無による、ATPS 界面への GUV の吸着を比較した (Fig. 9)。DSPE-PEG は PEG 相に分配されやすいため、DSPE-PEG がない GUV のほうが界面吸着が促進されると予想したが、本実験条件においては、明確な差異がみられなかった。

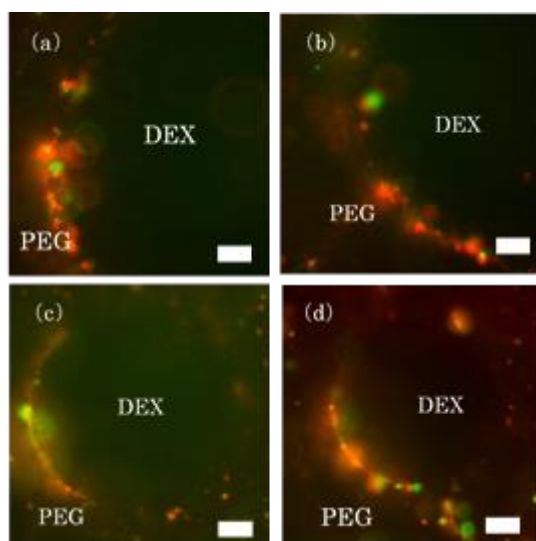


Fig. 9 CLSM images of GUVs adhered on the ATPS interface. (a, b) Without and (c, d) with DSPE-PEG (8.3%). Scale bars = 100 μ m.

4. 結言

本研究により、水性二相系 (ATPS) の界面が、GUV、ひいては人工細胞の集合体の足場となることを証明した。特に、従来よりも分子量の大きな高分子を用いることで、GUV の凝集を防ぎつつ、界面への吸着を促せることを示した。一方、本研究の課題として、定量性があげられる。界面への GUV

膜の付着の度合いは観察のみに頼るものであり、定量計測ではない。今後、ATPS や GUV の組成を系統的に変化させ、かつ吸着量を定量的に評価することで、より効率的な人工多細胞体構築法の基礎を築くことができると考えられる。

5. 参考文献

- (1) Okano, T.; Inoue, K.; Koseki, K., Suzuki, H., *ACS Synth. Biol.* **2018**, *7*, 739-747.
- (2) 西井一郎, 化学と生物 **2009**, *47*, 176-184.
- (3) Dinsmore, A. D. et al., *Science* **2002**, *298*, 1006-1009.
- (4) アルバートソン, P. Å., 水性二層分配法 **1972**, 東京大学出版会.
- (5) Atefi, E. et al, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 21305-21314.
- (6) Balakrishnan, G. et al., *Langmuir* **2012**, *28*, 5921-5926.
- (7) Okano, T. et al., *ACS Synth. Biol.* **2018**, *7*, 739-747.