

生体由来小胞のその場解析に向けた電気膜融合マイクロデバイスの開発

Development of the electrofusion device for *in situ* analysis of biogenic vesicles

精密工学専攻 11号 沖田勉

Tsutomu Okita

1. 緒言

リポソームとは、細胞などの生体小胞と同じリン脂質の二重膜で構成される人工小胞であり、特に大きさが数 μm ~ 数十 μm 程度のリポソームは GUV (Giant Unilamellar Vesicles), 0.1 μm ~ 1 μm 程度のリポソームは LUV (Large Unilamellar Vesicles) と呼ばれる。小胞内部に分子を封入可能であり、膜や溶液の組成を調整することで様々な特性を付与することが出来るため、細胞のモデルや生体親和性の高い分子のキャリアとして用いられている⁽¹⁾。

隣接する複数の脂質膜小胞の膜が融合し、新たにひとつの小胞となる現象は膜融合と呼ばれる。膜融合が起こる時に内封されている溶液が混合されるため、人為的にリポソームを膜融合させることで、微量の溶液や分子を反応させるマイクロリアクターとして応用できる。我々は以前、RT-PCR 試薬を含むリポソームと mRNA を含むリポソームを膜融合させ、抽出等の操作を経ずにリポソーム内に封入した核酸を直接増幅・検出できることを示した⁽²⁾。このとき、膜融合を起こす手法として電気融合法を用いたが、従来の電気融合プロセスでは、小胞が毛細管現象や電気的效果により浮遊・移動するため、小胞融合の頻度や内封物の混合を定量的に評価することが困難であった。そこで、これらの課題を解決し、小胞融合の定量評価が可能な新たな手法の創出が必要である。

本研究では、個々の小胞をマイクロチャンバー内に固定することで小胞の移動を抑え、電気パルスを与える前後の脂質膜小胞の変化を顕微鏡下で直接観察可能なマイクロデバイスを開発した。また、微小な生体内小胞の解析への応用を見据え、マイクロリアクターとしての GUV と生体内小胞のモデルとした LUV との融合実験を行い、その融合効率を定量評価した。

2. リポソームの作製

2.1. 界面通過法による GUV の作製

GUV の作製には、W/O エマルジョン界面通過法を用いた (Fig. 1)。この方法では、従来の水和法をベースとした作製方法に比べ、単層の脂質二重膜小胞を得られやすく、分子の内封率が良いという利点がある。まず、膜となるリン脂質の混合物を溶解させた油相 (流動パラフィン) に内部水溶液を加え振動攪拌し、W/O エマルジョン液滴を作製した。これを試験管内で外部水溶液に重層し、遠心機を用いて液滴を外水相へ移動させた。この過程において、液滴が外水相と油相の W/O 界面に形成されたリン脂質単分子層を通過するときに、脂質二重膜が形成される。この結果、直径が 5~20 μm 程度のリポソーム群を得た。

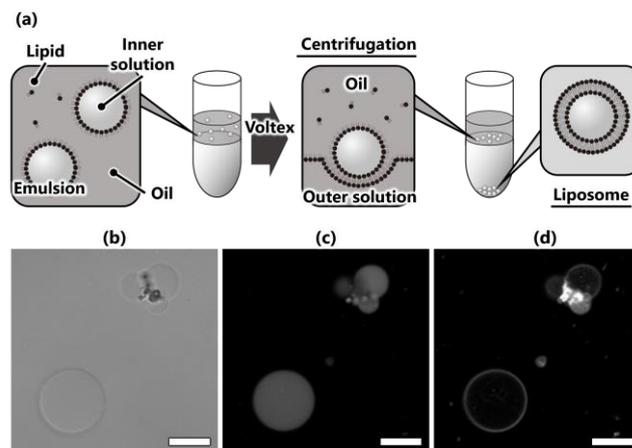


Fig. 1 Schematic of the W/O emulsion transfer method. (b) Bright field image of liposomes. (c-d) Fluorescence image of inner solution and membrane obtained by a laser scanning confocal microscope. (Scale: 20 μm)

2.2. エクストルージョン法による LUV の作製

LUV を調整するために、エクストルージョン (押し出し) 法を用いた。エクストルージョン法は、リポソーム懸濁液を特定の大きさの微細孔に通すことで、孔と同程度の大きさに再調整する手法である⁽³⁾。まず、界面通過法で作製したリポソームの懸濁液を片方のシリンジに入れ、2 μm 孔をもつトラックエッチ膜を通過するように押し出して、反対側のシリンジに収める。この操作を 3 回行った後にシリンジに残った懸濁液を回収し、直径 2 μm 前後のリポソーム群を得た (Fig. 2)。

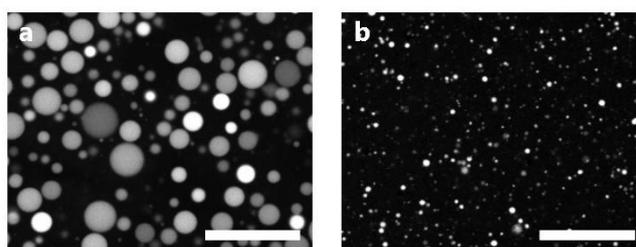


Fig. 2 Microscopic images (a) before and (b) after extrusion. (Scale: 20 μm)

3. リポソームの電気融合

リポソームの膜融合を誘発するには様々な方法があるが、任意のタイミングで膜融合を起こすことができる、特別な溶液組成を必要としない、反応が高速である等の理由から、本研究では電気融合法を採用した。

3.1. 電気融合の原理

脂質膜は、薄い誘電体層と見なせ、リポソーム溶液に交流電圧を印加すると電気分極が起こる。電気的に中性なリポソームでは、内部および外部溶液中のイオンが電気的に駆動されて帯電し、近接している複数のリポソームが引き寄せ合って電場の向きと平行に数珠状に配列する（この現象は誘電泳動（DEP: dielectrophoresis）と呼ばれる）⁴⁾。その後、直流電圧を印加し、膜両側に閾値を超える電荷が蓄積されると、物理的な膜破壊が起こる。隣接した脂質膜において、破壊された部分の脂質が再構成されると、膜融合が起こる。その結果、複数のリポソームが結合し、内水相が混合する（Fig. 3）。

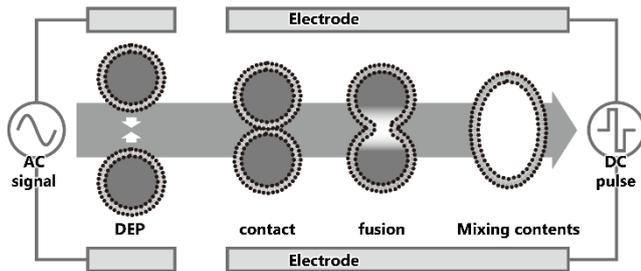


Fig. 3 Schematic of the electrofusion process.

1.1. 膜融合の検出方法

本研究では、リポソームの膜融合に伴う内液混合の検出方法として、錯体形成による蛍光回復反応を用いた⁶⁾。Calcein は通常緑色の蛍光を示す蛍光分子であるが、 Co^{2+} が同時に存在する場合、これと錯体を形成して蛍光を消失する。さらに、Calcein- Co^{2+} 錯体を含む溶液にキレート剤（EDTA）を加えると、 Co^{2+} とEDTAが錯体を形成することでCalceinが遊離し、その蛍光が再び現れる（Fig. 4）。本研究では、Calceinと Co^{2+} を内液に含むリポソーム、EDTAを内液に含むリポソームの2種類を用意した。これらの内部溶液が混合した際はリポソーム内部にCalceinの蛍光が現れるため、膜融合を検出できる（Fig. 4）。

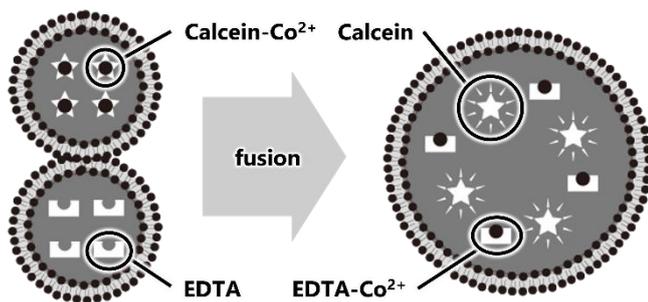


Fig. 4 Schematic of the detection system of the liposome fusion.

4. シリコン電極デバイス

リポソームの移動や凝集を避け、融合を定量的に評価することを目的として、リポソームを固定した状態で電気刺激を印加できる導電性のシリコンウェハを電極とした電気融合デバイスを作製した。

Fig. 5 にデバイスの概要図を示す。デバイス底面にはリポソームをトラップする穴状のチャンバーを設け、印加電圧の阻害を防ぐために電界方向の細い溝構造でチャンバー同士を繋いだ。チャンバー構造の両側には、導電性Siの電極を配置した。

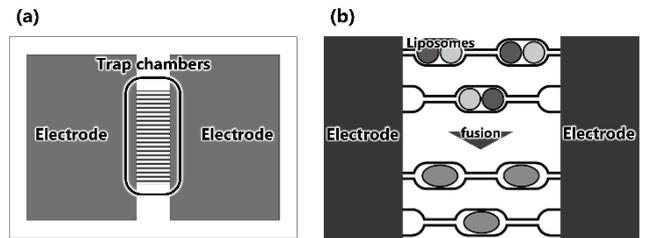


Fig. 5 Schematic of Device concept. (a) Overview, (b) Closeup view of microchambers connected with trench structures.

4.1. シミュレーションを用いた溝構造の検討

COMSOL を用いた数値シミュレーションによって、溝構造が印加した電界に及ぼす影響を検討した。チャンバー間に溝構造を設けない場合、チャンバー内には電界勾配がほとんど生じないことがわかった（Fig. 6a）。また、設ける溝幅が狭い場合はトラップチャンバー内の電界勾配が小さいが、溝幅を広げるほどチャンバー内の電界勾配が大きくなること示された（Fig. 6b-d）。

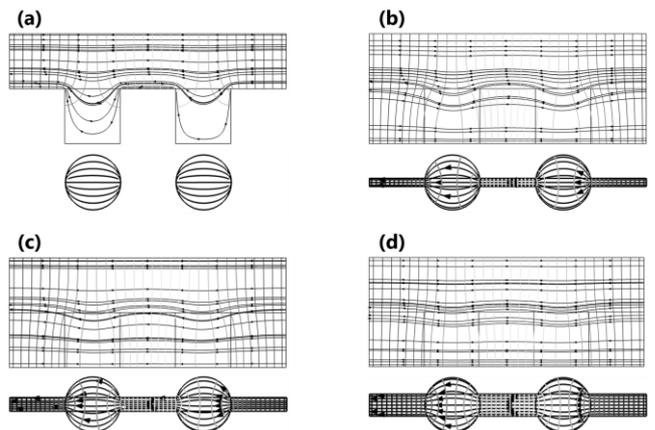


Fig. 6 Numerical simulation results of the electric field. (a) No trench, (b-d) With trench (b) $W = 3/20D$, (c) $W = 1/4D$, (d) $W = 2/5D$).

4.2. 電気融合デバイスの作製手順

Fig. 7 に作製手順を示す。まず、シリコンウェハの片面に、ディープエッチングによってマイクロチャンバーの反転レプリカを作製し、これをガラス上にスピンコートしたPDMS層に押し付けた。PDMSを硬化させた後、シリコンウェハの反対面から、ディープエッチングにより電極部分を残してチャンバーが露出するまでシリコンを除去し、Si電極とPDMSマイクロチャンバーを併せたデバイスを作製した。Fig. 8 に実際に作製したデバイスの外観及びSEM画像を示す。これらの画像より、Si電極とマイクロチャンバーが造形されていることがわかる。

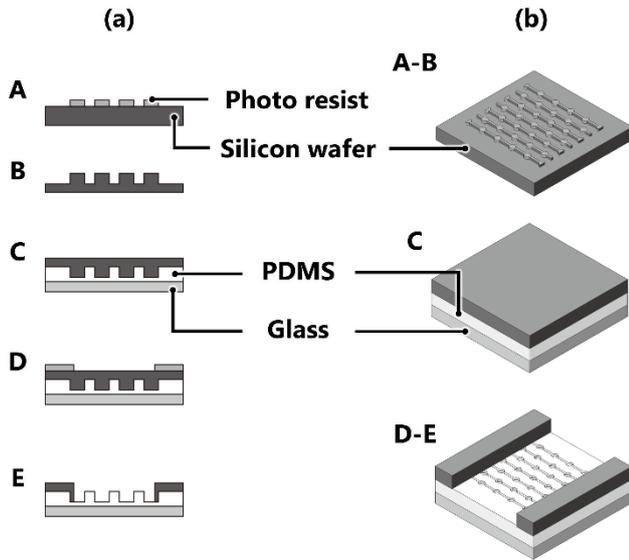


Fig. 7 Device fabrication process. (a) Cross-sectional view. A Photoresist patterning. B Si etching. C Pressing to PDMS layer. D Photoresist patterning. E Si etching. (b) Bird's-eye view.

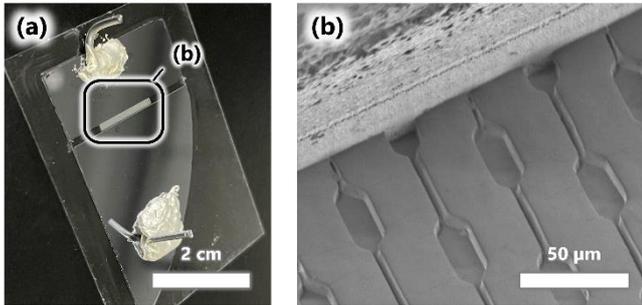


Fig. 8 (a) Overview of the fabricated device. (b) SEM image of the Si electrode and microchambers with connecting trenches.

5. GUV の電気融合の定量評価

はじめに、GUV 同士の融合実験を行った。チャンバーのデザインは、Fig. 9 に示すように、15–20 μm のリポソームが2つ並んでトラップされる大きさに設計した。また、チャンバーをつなぐ溝の有無による融合率の違いも検証した。

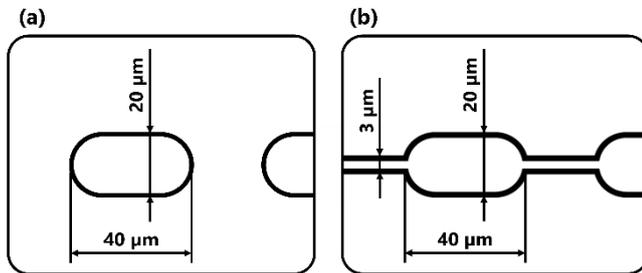


Fig. 9 Design parameters of microchambers. (a) Separated chambers. (b) Chambers connected by trenches.

5.1. 実験方法

まず、デバイスの電極間にリポソーム懸濁液を滴下し、10分程度静置してリポソームをデバイス底面まで沈殿させた。続いて、0.15 kV/cm の交流電圧を45秒間印加し、さらに5分程度静置してリポ

ソームを完全にチャンバー内に落とし込んだ。この状態を融合操作前として、顕微鏡画像を取得した。その後、チャンバー内にトラップされたリポソームを接触させるために、0.15 kV/cm の交流電圧を5秒間印加し、直後に5.0 kV/cm の直流パルスをおよそ0.2秒間隔で3回与えた。10–20秒静置して内封溶液を十分反応させた後、融合操作後の顕微鏡画像を取得した。

5.2. 結果

融合操作前後の画像を Fig. 10 (a–c) に示す。電圧印可前の画像では2種類のリポソームが含まれていたチャンバー内において、電圧印可後の画像からは Calcein 蛍光が強く現れていることが確認できる。このことから、チャンバー内での電気融合および内水相の混合が起こったと判断した。Fig. 10 (d) に、溝構造の有無による融合率の違いを示す。融合率は、(融合操作後に緑色蛍光が現れたチャンバー数 / 融合操作前に2種類のリポソームが同時にトラップされていたチャンバー数) と定義した。溝構造を設けたデバイスでは60%に近い融合率が得られた一方で、溝を設けなかったデバイスでは30%弱にとどまった。このことから、電界方向に設けた溝が電圧印可の障害を避け、電気融合実験における融合率を上げるために有効であることが示唆された。

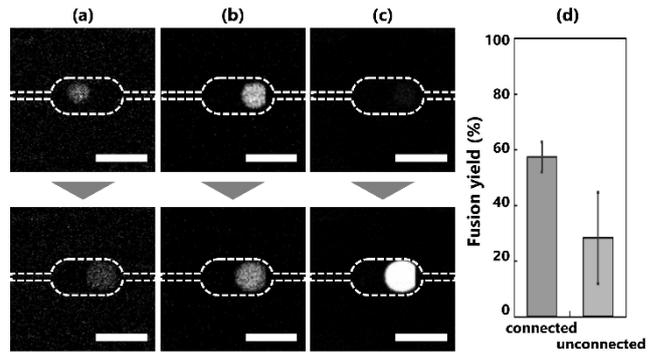


Fig. 10 Fusion of GUVs. (a) Inner marker (cascade blue) of GUVs containing calcein- Co^{2+} . (b) Inner marker (rhodamine) of GUVs containing EDTA. (c) Calcein fluorescence. Upper and lower images show GUVs before and after the electrofusion signal, respectively. (Scale: 20 μm) (d) Fusion yield.

6. GUV と LUV の融合

続いて、1 μm 以下の生体膜小胞解析への応用を見据え、GUV と LUV の融合実験を行った。Fig. 11 (a) に、本実験に用いたデバイスの模式図を示す。本実験では、リアクターのモデルである GUV を直径 20 μm のチャンバーに個別にトラップし、周囲に生体膜小胞のモデルである LUV を撒布した状態で電圧を印加し、膜融合を試みた。このアプローチにより、リアクターとしての GUV 同士の融合が起こらず、GUV と LUV の融合の定量評価が可能となる。

6.1. 実験方法

実験手順は GUV 同士の融合実験に倣うが、本実験では、直流電圧値を 7–10 kV/cm、デバイスのチャンバー間をつなぐ溝の幅を 3–8 μm (Fig. 11 (b–c)) として実験を行った。

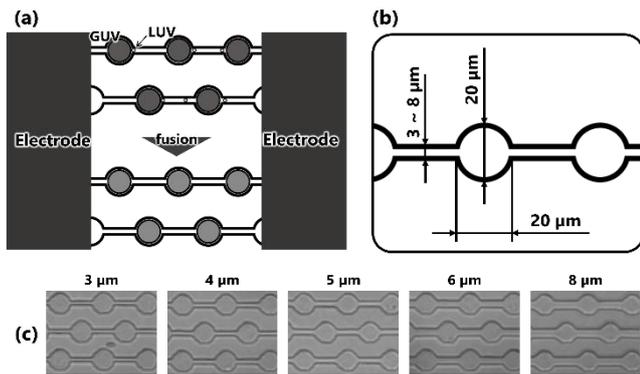


Fig. 11 (a) Schematic of the microfluidic device for electrofusion of GUV and LUV. (b) Design of the microchambers connected with a trench. (c) Microscopic images of microchambers with different trench widths.

6.2. 結果

GUV と LUV の電気融合実験の結果を (Fig. 12) に示す. 電圧印可前の画像から, GUV が個別にトラップされ, 周りに LUV が撒布されている様子がみられた. 電圧印加後の画像では, GUV の内部に Calcein 蛍光が強く現れたため, チャンバー内の GUV と LUV が融合し, 内水相の混合が生じたと判断した.

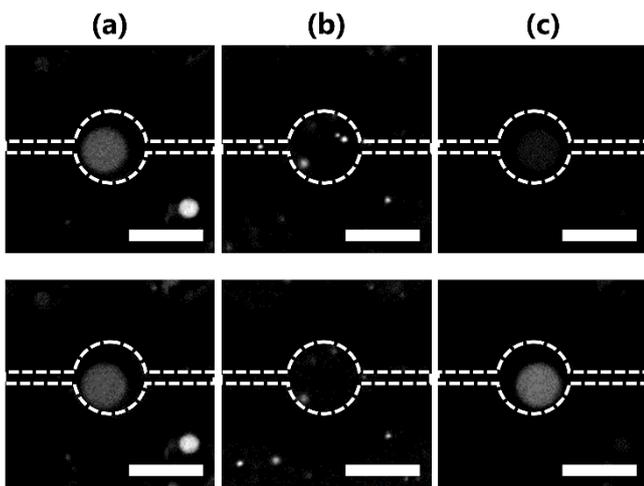


Fig. 12 Fusion of GUVs and LUVs. (a) Inner marker (TA647) of GUVs containing calcein- Co^{2+} . (b) Inner marker (rhodamine) of LUVs containing EDTA. (c) Calcein fluorescence. Upper and lower images show GUVs before and after the electrofusion signal, respectively. (Scale : 20 μm)

本実験では, 融合率と破壊率を, それぞれ (融合操作後に緑色蛍光の現れたチャンバー/融合操作前に GUV がトラップされていたチャンバー), (融合操作後に GUV が消失したチャンバー/融合操作前に GUV がトラップされていたチャンバー) と定義して求めた.

融合実験の結果 (Fig. 13 (a)) より, パルスの電圧値が高いほど融合率が高くなる傾向がみられた. また, チャンバーを接続する溝幅が広いほど, 融合率が高い傾向がみられた. また, 破壊率の結果 (Fig. (b)) より, パルスの電圧値が高いほど破壊率が高いが, チャンバーを接続する溝幅に関しては有意な影響がないことがわかった. この結果より, 溝内に GUV が侵入しない範囲で, 可能な限り広い溝を設けることで, 高い融合収率を得られるとことがわかる. また, 融

合に用いる電圧値は, 大きすぎると GUV が破壊されるため, 適切な電圧値があることがわかった.

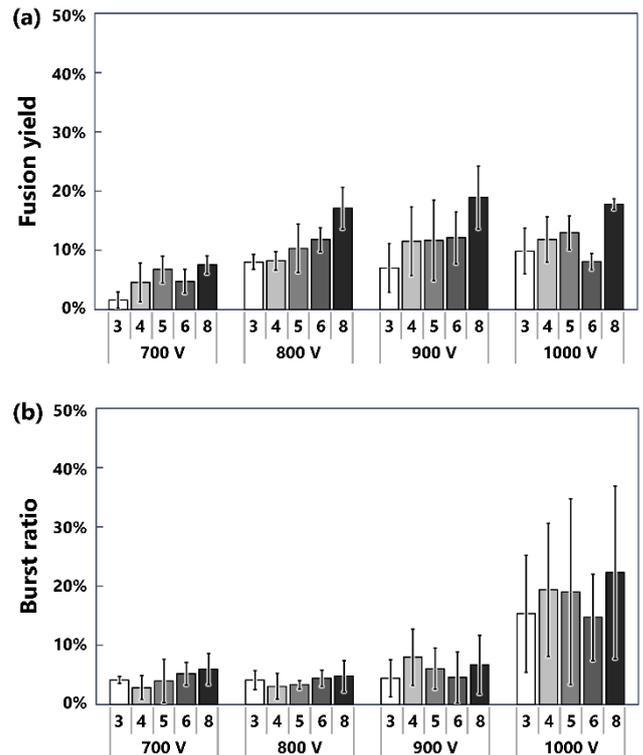


Fig. 13 (a) Fusion yield and (b) burst ratio of GUV-LUV fusion experiment for various pulse amplitudes and trench width.

7. 結言

本研究では, マイクロチャンバーと電極を有する小胞の電気融合デバイスを開発し, その性能を評価した. 融合実験では, 小胞をマイクロチャンバーにトラップすることで, 融合率の定量評価が可能となることを示した. このとき, チャンバーを接続する溝を設けることが有効であり, 溝幅を広げることでさらに高い融合率が得られることを示した. 今後は, バイオマーカーの検出への応用を目指し, GUV と生体膜小胞との融合を試みる.

参考文献

- (1) Akbarzadeh A., Rezaei-Sadabady R., Davaran S., Joo S. W., Zarghami N., Hanifehpour Y., Samiei M., Kouhi M., and Nejati-Koshki K., Liposome: classification, preparation, and applications, *Nanoscale Research Letters*, **8**-102 (2013).
- (2) Tsugane M., and Suzuki H., Sizing of giant unilamellar vesicles using a metal mesh with a high opening ratio, *Scientific Reports*, 9214-8 (2018).
- (3) Shinohara K., Okita T., Tsugane M., Kondo T., and Suzuki H., Sizing of giant unilamellar vesicles using a metal mesh with a high opening ratio, *Chemistry and Physics of Lipids*, 2021.
- (4) Pohl H. A., Pollock K., and Crane J. S., Dielectrophoretic force: A comparison of theory and experiment, *Journal of Biological Physics*, **6** (1978), pp.133-160.
- (5) Sunami T., Shimada K., Tsuji G., and Fujii S., Flow Cytometric Analysis To Evaluate Morphological Changes in Giant Liposomes As Observed in Electrofusion Experiments, *Langmuir*, **34** (2018), pp.88-96.