

均一サイズリポソームを用いた人工群体モデル構築の試み

Attempt to construct an artificial multi-cellular model using uniform liposomes

精密工学専攻 16号 沖田拓之進
Hironoshin Okita

1. 緒言

近年、生命の最小単位である細胞の物理的性質を理解するために、成分と構造が単純な人工脂質二重膜小胞（リポソーム）を人工細胞モデルとして用いた研究が多くなされている⁽¹⁾。これらの研究では、多くの場合、相互接着や相互作用のない分散したリポソームについて評価しており、単細胞モデルとして定義される。

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生物や、その原始的な形態である群体への進化を成し遂げた⁽²⁾。多くの高等生物は多細胞生物であるため、より高度な機能を有する人工的な多細胞モデルを構築する需要が高まっている。

また、近年では正と負の電荷をもつポリマーを混合して得られる液液相分離系である、複合コアセルベート (complex coacervate) の研究が盛んになっている。複合コアセルベートは、水層内に分子の凝集体を作り、かつその内部に多様な物質を高濃度で保持できるという性質から、ドラッグデリバリーシステムなどにも利用されている⁽³⁾。これは、膜のない物質の貯蔵庫と考えることができ、その周囲にリポソームを吸着させればコアセルベートとリポソーム間での薬物輸送なども可能になると考えられる。そこで本研究では、複合コアセルベートを足場として巨大リポソームをその周囲に吸着させることで、群体生物であるボルボックス⁽⁴⁾を模倣した人工群体モデルの構築を試みた。

2. リポソームの作製

2.1. 多分散リポソームの作製

多分散リポソームは界面通過法を用いて作製した。脂質溶液 2 mg/ml (POPC:POPG:cholesterol=8:2:2) を混ぜたオイル（流動パラフィン）に内液 (Sucrose 200 mM, Calcein 100 μM の水溶液) を加えて攪拌することで W/O エマルジョンを作製した。これを外液 (Glucose 200 mM の水溶液) に積層し、遠心力で界面を通過させリポソームを作製した (Fig. 1a)。また、この方法で得たリポソームのサイズは多分散であった (Fig. 1b,c)。

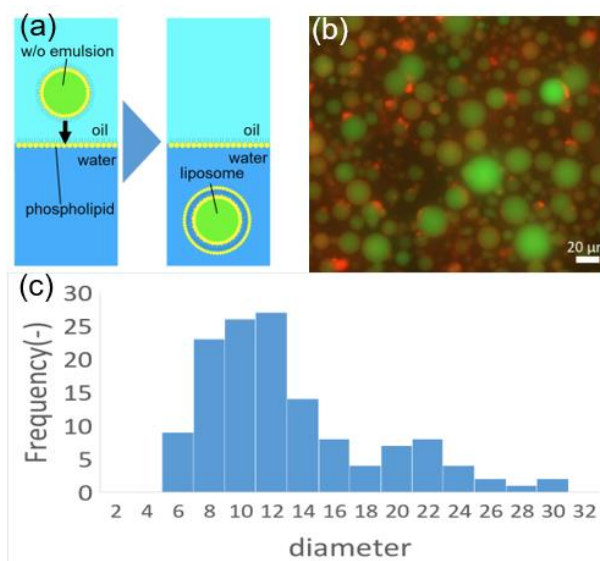


Fig. 1 (a) Schematic of the interface transfer method for giant liposome production. (b) Fluorescent microscope image of liposomes (b) and their size distribution.

2.2. 均一サイズリポソームの作製

単分散リポソームはマイクロ流体デバイスを用いた二段階フローフォーカシング法（二段階 FF 法）で作製した (Fig. 2a)。第一段階の FF 部 (Fig. 2b) では、内液の流れがオイルで切断され、W/O ドロップレットが作製される。それが、第二段階の FF 部 (Fig. 2c) において外液で包みこまれ、比較的厚いオイル層をもつ W/O/W ドロップレットが作製される。この FF 部下流のオリフィスと狭窄部において、W/O/W ドロップレットのオイル層がせん断によって分離し、オイル層が薄膜化される。さらにその下流の dewetting (逆濡れ) 領域 (Fig. 2d) において、dewetting 現象によりオイル層が分離し、リポソームが形成される。これを出口から回収し、顕微鏡観察した。W/O/W ドロップレットの内液には sucrose (1M), PVA (1%), calcein (100 μM) の水溶液、外液には glucose (1M), PVA (1%), F68 (1%) の水溶液を使用した。また、脂質には DOPC: DOPA: Cholesterol を質量比 1:1:1 で溶解させた 1-octanol を使用した。

2.2.1. PDMS 流路の作製

マイクロ流体デバイスは、フォトリソグラフィ技術によって作製した鋳型を透明シリコンゴム(PDMS)へ転写することで作製した。始めに、シリコンウェハ上にフォトリソグリスト(mr-DWL 40)をスピコートして流路のデザイン通りになるように露光・現像し、鋳型を作製した。次に、PDMSの注型により構造を転写した後、マイクロ流路の送液口、およびドロップレット・GUV回収口に直径 0.75 mm の穴を開けた。PDMS をスピコートしたスライドガラスとマイクロ流体デバイスに酸素プラズマ処理を施し、120°C に設定したホットプレートで加熱することで接合した。

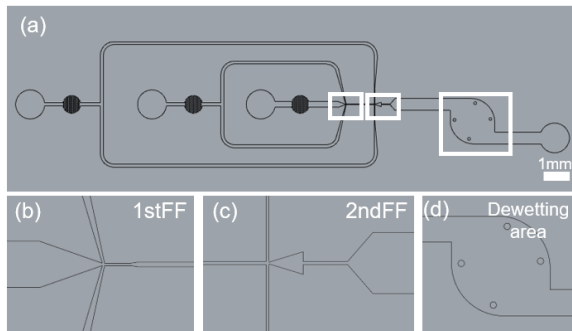


Fig. 2 (a) Overall design of the fabricated microchannel. (b) First and (c) second flow-focusing (FF) sections and (d) the dewetting area.

2.2.2. 親水化処理

W/O/W ドロップレットを作製するためには、マイクロ流路内における二段階目の FF 部以降を親水性にさせる必要がある。本実験で使用するデバイスは PDMS で作製しているために、流路内の全面が疎水性である。これを部分的に親水性にするために、高分子である PVA (ポリビニルアルコール) を PDMS 流路内壁に部分的にコーティングした。本実験で用いる流路は、外液を流す流路のみ親水性にする必要があるため、この部分に PVA 溶液を送液することで親水性に塗り分けた。この時、内液とオイルが流れる流路に PVA が侵入することを防ぐため、PVA の送液中には内液とオイルの送液口から空気を流した。10 分間インキュベートした後、急激に空気の圧力を印加し、その勢いで流路内に残った PVA 溶液を排出させた。それでも残留した PVA 溶液は、流路の入り口と出口からポンプで吸い出すことによって完全に除去した。その後 120°C に設定したホットプレート上で 10 分間乾燥させた。この手順を 3 回繰り返すことで流路内における必要な部分を親水化させた。

2.2.3. マイクロ流体デバイスによる GUV の作製

本研究では、W/O/W ドロップレットの内液成分と外液成分の二種類の水溶液、および GUV 膜の主成分である脂質を溶解させたオイルを、圧力ポンプを用いてマイ

クロ流体デバイスに送液した。顕微鏡の観察画面を見ながら PC によって印加する各溶液の圧力値を微調節し、適切な流動状態を得た(Fig. 3a)。

作製した液滴は、デバイス出口のチューブ先端から両面テープを貼り付けたカバーガラスに直接滴下し、小さいカバーガラスで閉じることで観察用サンプルを作製した。倒立顕微鏡または共焦点顕微鏡を用い、得られた GUV の蛍光観察を行った(Fig. 3b)。画像解析によりサイズ分布を解析したところ、Fig. 3(c)に示すように、平均直径が約 13 μm の均一なリボソームの作製に成功した。

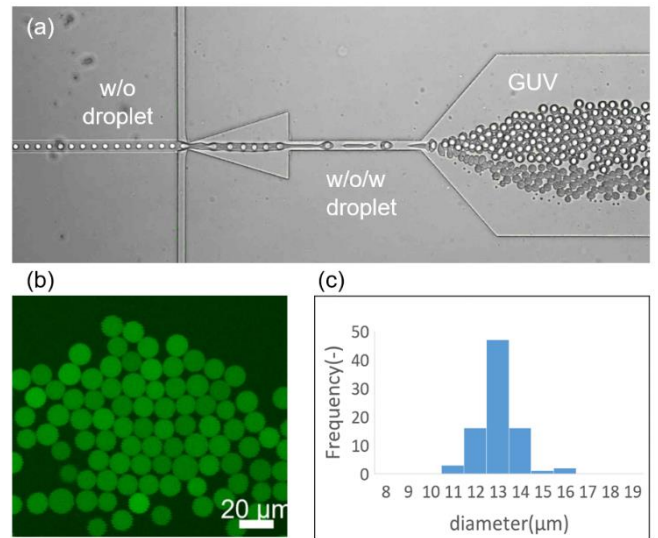


Fig. 3 (a) Preparation of W/O/W droplets in the microchannel. (b) Fluorescence image of the prepared GUV (Calcein). (c) Size distribution of GUVs fabricated in microchannel.

3. 複合コアセルベートの作製

3.1. 多分散コアセルベートの作製

負電荷を持つアデノシン三リン酸(ATP, 5mM)と正電荷を持つ高分子であるポリリジン(PLL, 15mM)を混合することでコアセルベート溶液を作製した^(5,6)。溶液には Ph を一定に保つためのバッファ(Tris-HCL, pH7.5, 50mM)や比重調整のための glucose (200mM)が含まれている。この溶液を、中央をくりぬいた両面テープを 3 枚貼り付けたカバーガラスに滴下し、その上から別のカバーガラスを被せて観察した。近隣のコアセルベート液滴同士が融合することで一定のサイズまで大きくなった(Fig. 4ab)。

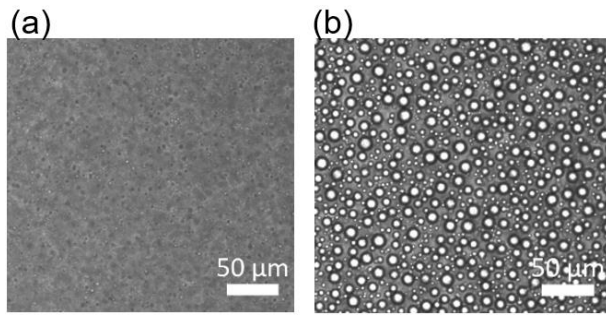


Fig. 4 Microscope images of polydisperse coacervate droplets. (a) Initial state and (b) after 10 minutes.

3. 2. 均一サイズコアセルベートの作製

3. 2. 1. マイクロウェルアレイの作製

コアセルベートを充填させるためのマイクロウェルもフォトソグラフィ技術を用いて作製した。マイクロ流路を作製したときと同じ手順で鋳型を作製し、その後PDMSを滴下して1000 rpmで回転させることで鋳型にPDMSを薄くスピコートした。これにカバーガラスを被せてベイクした後にはがすことでマイクロウェルアレイを作製した(Fig. 6a)。さらに、コアセルベートがマイクロウェル面に濡れ広がることを防ぐため、PDMSの表面にポリマーブラシを形成するPVAを塗布した。また、滴下するコアセルベート溶液やリポソーム溶液の容積を確保するためにPDMSリング(内径5 mm, 高さ2 mm)を作製し、カバーガラス上に酸素プラズマ処理をして接合した(Fig. 5)。

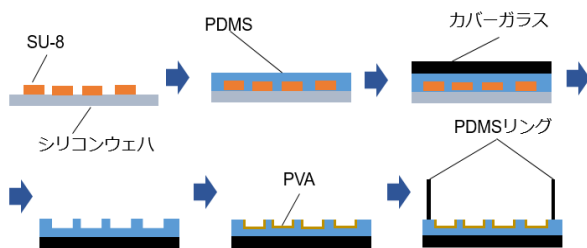


Fig. 5 Microwell production flow for accumulating uniformly sized coacervates.

3. 2. 2. 複合コアセルベートの充填

作製したマイクロウェルアレイにコアセルベート溶液を滴下して(Fig. 8a)一時間静置した。時間経過に伴ってコアセルベートが集合、合体してウェル内が満たされることで均一サイズのコアセルベートを作製した(Fig. 7b,c)。また、集合を促進するために途中でPDMSリング内の上部の溶液をピペットで吸い取り、新たなコアセルベート溶液を滴下するといった作業を行った。さらに、顕微鏡での観察を行いやすくするために観察の直前にリング内の溶液を吸い取ってパuffaを置換する作業も行った(glucose 200 mM, Tris-HCL(Ph7.5) 50mM)。

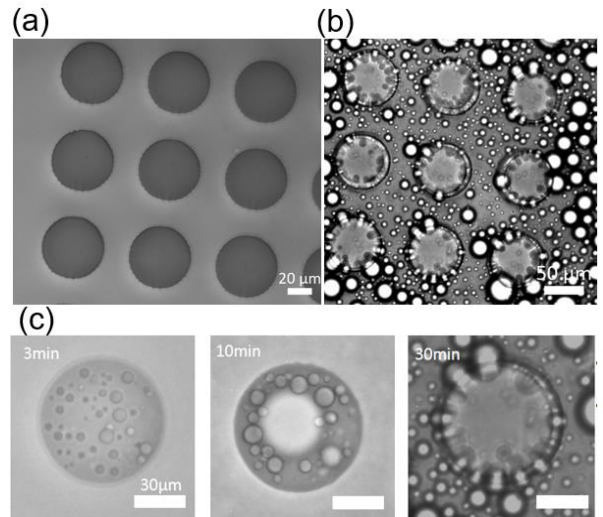


Fig. 6 (a) Microscope image of the fabricated microwell array. (b) Coacervate droplets at one hour after dropping the solution. The inside volume of the microwell is filled. (c) Time evolution of coacervate droplets being filled into a microwell.

4. 複合コアセルベートとリポソームの吸着

本実験の組成では複合コアセルベートの表面は正に帯電している。そのため、リポソームの表面を負に帯電させること(POPGがアニオン性脂質)で、静電力による吸着を促した。

4. 1. 多分散リポソームと多分散コアセルベートの吸着

3.1節にてカバーガラス上に作製した多分散コアセルベートに多分散リポソーム溶液を滴下して、その相互作用を観察した。この時コアセルベート及びリポソームが浸透圧により破壊することを防ぐため、両溶液のglucoseの濃度は200 mMに統一した。

その結果、Fig. 7に示すように、静電相互作用によるコアセルベートとリポソームの吸着が観察された。リポソームとコアセルベート両方に膜変形が見られたが、コアセルベートの方がより大きく変形していたが、これはリポソームの方がコアセルベートより膜が頑丈であるからだと考えられる。

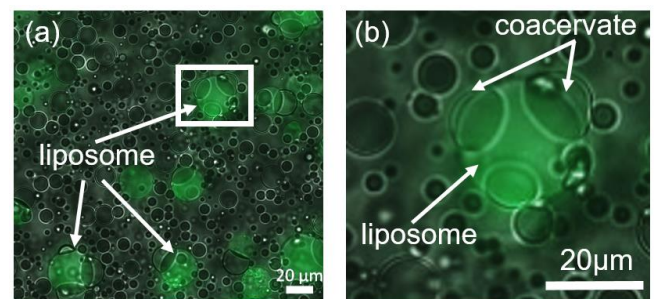


Fig. 7 (a) Microscopic images of adsorption between polydisperse liposomes and polydisperse coacervates. (b) An enlarged view.

4. 2. 多分散リポソームと単分散コアセルベートの吸着

3.2 節にてマイクロウェル内に作製した均一サイズのコアセルベート溶液の上部を吸い取ったのち、作製した多分散リポソーム溶液を滴下した(Fig. 8). 10 分ほど静置してリポソームの沈殿を待った後、顕微鏡で観察を行った。

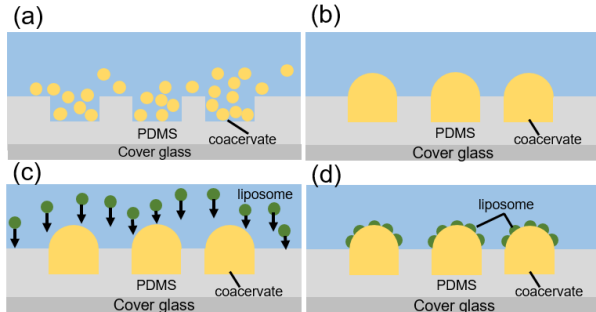


Fig. 8 (a) Sedimentation and accumulation of coacervate droplets into the well. (b) Wells are filled with coacervate. (c) Introduction of the polydisperse liposome solution. (d) Adsorption between liposomes and coacervate droplets by the electrostatic interaction.

Fig. 9 に示すように、マイクロウェルアレイ上に作製した均一サイズコアセルベートの周囲に沈殿したリポソームが吸着する様子が観察された。一方で、リポソームが沈殿する過程で脂質膜が破壊され、凝集してしまう様子も観察できた。また、沈殿する過程の中で溶液中に漂っていたコアセルベートと吸着、融合し一つの強大な塊になってしまう現象も確認できた。これはコアセルベート溶液のバッファを置換する作業時にコアセルベートが残ったことが原因だと考えられる。しかし、ピペットで無理に溶液中に残存するコアセルベートを除去しようとすると、ウェルに封入した均一サイズコアセルベートも外れてしまうため今後改良の余地があると考えられる。

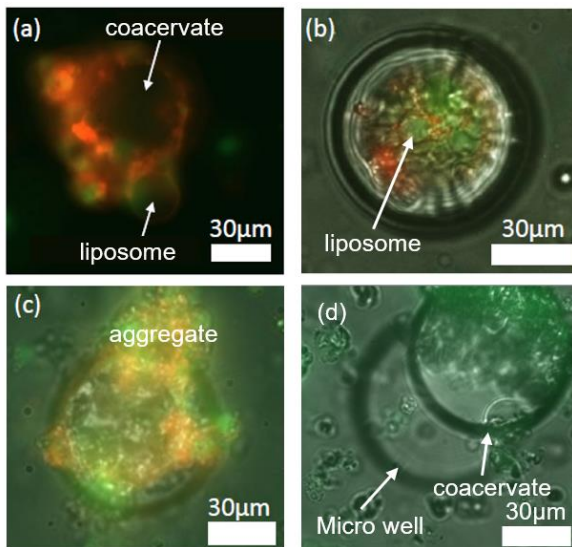


Fig. 9(a) Microscope images showing liposomes adsorbed on uniform-sized coacervates (green: calcein in the internal core of liposomes, red: DiIc(18) showing the lipid membrane).(b) Liposomes adsorbed on the top surface of accumulated coacervates. (c)Aggregates formed by destruction of lipid membranes. (d) Coacervate dislodged from the well during solution manipulation.

5. 結言

本研究では正に帯電した複合コアセルベートの足場に、負に帯電したリポソームを吸着させることで、人工群体モデルの構築を試みた。また、サイズが均一なコアセルベートおよびリポソームを作製することでより再現性の高い実験系の基礎を構築した。今後は単分散リポソームと単分散コアセルベートの吸着による均一人工群体モデルの作製や、吸着したリポソーム間での物質輸送などを検討していくことで、バイオテクノロジーの発展に寄与が期待される。

6. 参考文献

- (1) Okano, T., Inoue K., Koseki K., Suzuki, H., Deformation Modes of Giant Unilamellar Vesicles Encapsulating Biopolymers, *ACS Synth. Biol.*, **7**(2018)pp 739-747.
- (2) 西井一郎, ボルボックスの形態形成運動の分子メカニズム, *化学と生物*, **47**(2009) pp176-184.
- (3) Johnson, N. R., and Wang, Y., Coacervate delivery systems for proteins and small molecule drugs, *Expert Opinion on Drug Delivery*, **11-12**(2014) pp.1829-1832.
- (4) Unmen, J. G., Volvox and volvocine green algae, *EvoDevo*, **11-13** (2020).
- (5) Liu, Z., Chen, J., Bai, Q., Lin, Y. and Liang, D., Coacervate Formed by an ATP-Binding Aptamer and Its Dynamic Behavior under Nonequilibrium Conditions, *Langmuir*, **38-20** (2022) pp.6425-6434.
- (6) Karoui, H., Seck, M. J. and Martin, N., Self-programmed enzyme phase separation and multiphase coacervate droplet organization, *Chemical Science*, **12** (2021) pp. 2794-2802.