

# 酸化グラフェンによる有機・無機ハイブリッド GUV 創成の試み

## Attempt for production of organic-inorganic hybrid GUV using graphene oxide

精密工学専攻 34号 佐藤 雅記  
Sato Masaki

### 1. 緒言

ナノ材料としてのグラフェンは、その特異的な機械的・電氣的・および光学的性質より、様々な分野での活用が研究されている。また、このグラフェンを部分的に酸化することで得られる酸化グラフェン(graphene oxide, 以下 GO)は、グラフェンの問題点であった水和性の低さが改善され、水が主媒体であるバイオ分野での活用が多く研究されている。例として、ドラッグデリバリーシステムへの応用が広く期待されているが<sup>(1)(2)</sup>, GOは接触により細胞膜の基本要素である脂質二重膜を破壊することも報告されており<sup>(3)</sup>, その相互作用の詳細な解明が期待されている。

これまでの相互作用解析は、主に直径が 1  $\mu\text{m}$  以下の large unilamellar vesicle (LUV)<sup>(4)</sup>に対して実験およびシミュレーションを用いた検討がなされているが<sup>(5)</sup>, 細胞と同程度のサイズである giant unilamellar vesicle (GUV)との相互作用に関しては未解明の部分も多い。

本研究では、はじめに、直径が 1~数十  $\mu\text{m}$  の GUV に対して、GO が与える影響を調べた。特に、脂質膜が持つ電荷の影響、およびグラフェンと  $\pi$ - $\pi$  相互作用する pyrene を修飾した脂質の影響を調べた。次に、GO と GUV の複合構造の応用として、バイオセンサーや DDS への活用を目指し、有機-無機ハイブリッド構造 GUV の作製を試みた。

### 2. GUV の作製

GUV の作製には、界面通過法とエレクトロフォーメーション法の 2 種類を用いた。界面通過法は GUV の水和に必要な溶液量が少なく、小胞内液に希少な試料を内封する際に効率がよいこと、また、巨大分子の内封効率が良いという利点がある。エレクトロフォーメーション法は、溶媒を使わないため純粋な脂質二重膜が得られること、また、手順がシンプルで再現性が高いことが利点として挙げられる。それぞれの具体的な作製法を下に記す。

界面通過法では、脂質を溶解した流動パラフィンと小胞内液を混合することで W/O エマルションを作製し、これを小胞外液上に重層し遠心を行う。これにより、W/O エマルションが外液とオイル間の W/O 界面を通過し、GUV が得られる。また、エレクトロフォーメーション法は、導電性のあるスライドガラス(ITO ガラス)上に乾燥した脂質フィルムを作製し、フィルム上に水溶液を滴下する。これをさらに ITO ガラスで挟み、交流電場をかけることで分子に振動が発生し、脂質フィルムが剥離して球形の GUV が得られる。

### 3. GUV と酸化グラフェンの相互作用

#### 3.1. 基板に固定した GO と GUV の相互作用

##### 3.1.1. 実験方法

GO と GUV の平面同士の相互作用を確認するため、基板に固定した GO に GUV を接触させた際の吸着の有無を調べた。また、脂質の組成や、脂質に修飾された高分子を変化させることで、吸着の程度に違いが発生するかを調べた。脂質は POPC, egg-PC, DSPE-PEG, 18:1 pyrene PE を使用した。

POPC および egg-PC は脂質組成を変化させるために使用した。DSPE-PEG は修飾された高分子鎖によって GUV の表面を覆うことで GUV-GO 間の作用を軽減するため、18:1 pyrene PE は pyrene と GO 間の  $\pi$ - $\pi$  相互作用による吸着の促進のために使用した。

具体的な手順を Fig. 1 に図示した。界面通過法にて作製した内液に緑蛍光分子(calcein)を含む GUV 溶液を、GO をスピンコートしたスライドガラスと GO のないスライドガラスにて挟み込む。これを上下反転させると、GUV は外液よりも内液の比重が高いため、GUV は GO に吸着していれば上部に、吸着しなければ下部に、破壊されれば蛍光が存在しない状態になる。この状態の違いを共焦点顕微鏡にて評価した。

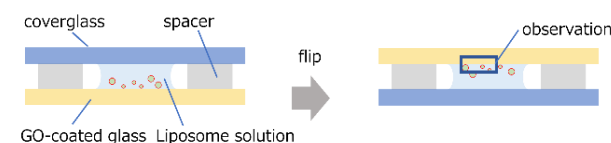


Fig. 1 Procedure of the adhesion test between coated GO and GUVs.

##### 3.1.2. 実験結果

反転後の上部の顕微鏡画像および条件の詳細を Fig. 2 に示す。(a), (b)より、pyrene 脂質の有無にかかわらず GO に対する GUV の吸着が発生していること、さらに(b), (c)より、この吸着は脂質の種類に依存しないことが分かった。この吸着は、DSPE-PEG の割合を段階的に増やし作用を軽減した結果、(d)にあるように 40 wt%にて確認されなくなった。この PEG 条件下において、(e)のように一部を pyrene 付加脂質に変更したところ吸着が確認された。これは、pyrene による  $\pi$ - $\pi$  相互作用が働いたためであると考えられる。また、(a), (f)の比較において、GO では発生していた吸着がガラス表面においては起こらなかったため、基板への吸着作用は GO によってもたらされたことがわかる。

また、すべての条件において、下面にはリポソームが存在していた。これは、GUV が溶液滴下時に GO コート面に接触しなかったためと考えられる。

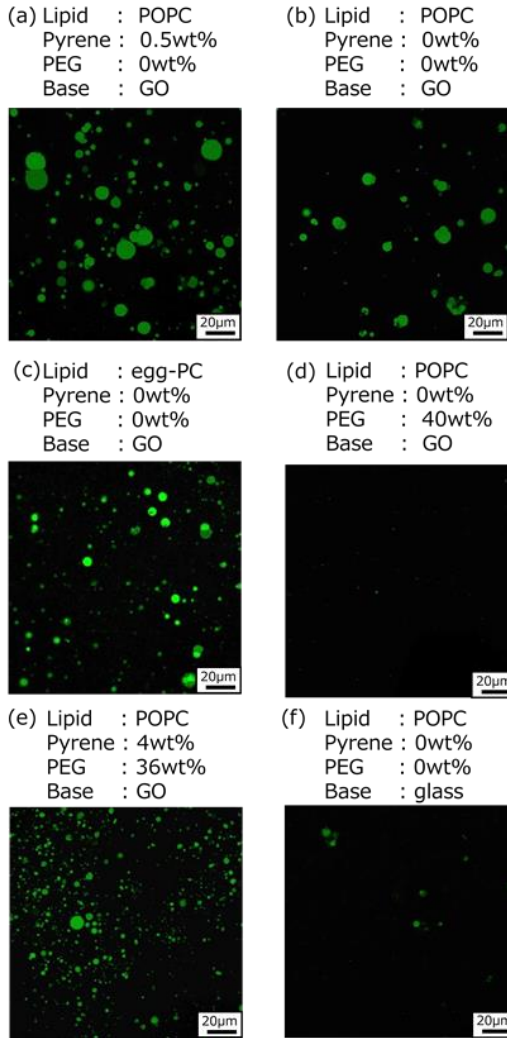


Fig. 2 Microscopic images at the top of the device.

### 3.2. GUV と遊離 GO の相互作用

#### 3.2.1. 実験方法

本実験は、GO が固定されておらず溶液中に浮遊している条件において、相互作用がどのように変化するかを確認するためにを行った。GUV の表面電荷の変化、GO サイズの変化、pyrene 脂質の含有量による変化の条件を検証した。

具体的には、以下の手順を行った。界面通過法にて作製した GUV の外液に GO を 0.1 mg/ml の濃度で追加し、攪拌することで GO と GUV を接触させた。相互作用の評価は、共焦点顕微鏡にて GUV に付加した calcein の緑蛍光と GO の赤の自家蛍光の状態の観察と、フローサイトメトリーによる小胞ごとの蛍光量の分析にて行った。

#### 3.2.2. 実験結果

##### 3.2.2.1. 表面電荷の影響

電荷をもたない脂質である POPC のみの GUV と、負電荷の脂質である POPG と POPC を 1:9 で混合した組成の GUV を作製して使用した。フローサイトメトリーの散布プロットと対応する GUV の顕微鏡画像を Fig. 3 に示す。散布プロットは、横軸に GUV の内部体積の指標である calcein 蛍光、縦軸に GUV 内部の複雑性の指標である側方散乱光強度(SSC)を採用した。SSC の強度は、膜の多重性に相関する。ここで

は、一枚膜性(SSC の値が小さい)GUV 領域を GUV-1、膜多重性が高い(SSC の値が大きい)GUV 領域を GUV-2 と定義する。

電荷を変更した測定および観察結果を Fig. 4 に示す。Fig. 4(a)より、POPC のみの電荷をもたない組成では、初期状態で GUV-1 の領域に存在したベシクルが、GO との混合後にはほとんどが消失した。これは、GO によって GUV が破損したことが理由として考えられる。3.1 節において、同様の組成下では基板に固定した GO への吸着が確認された。この吸着と破壊の違いは、遊離の GO では膜に接触する際に角度を持つことができるため、エッジ部分が膜に刺さることが影響したと考えられる。また、Fig. 4(b)の POPG を含む負電荷を持つ組成では、GO 添加後も GUV-1 領域にあったベシクル数の減少が抑えられた。すなわち、負電荷を持つ GUV は破損が少ないことがわかる。これは、GO は多くのカルボキシル基を持ち、中性の水溶液中では弱く負に帯電しているため、負電荷の脂質と静電反発したためと考えられる。

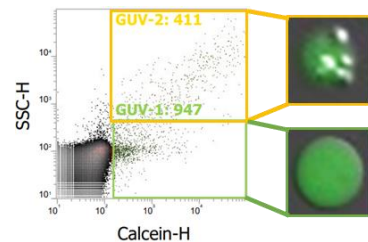


Fig. 3 Flow cytometry scatter plot and corresponding GUV micrographs

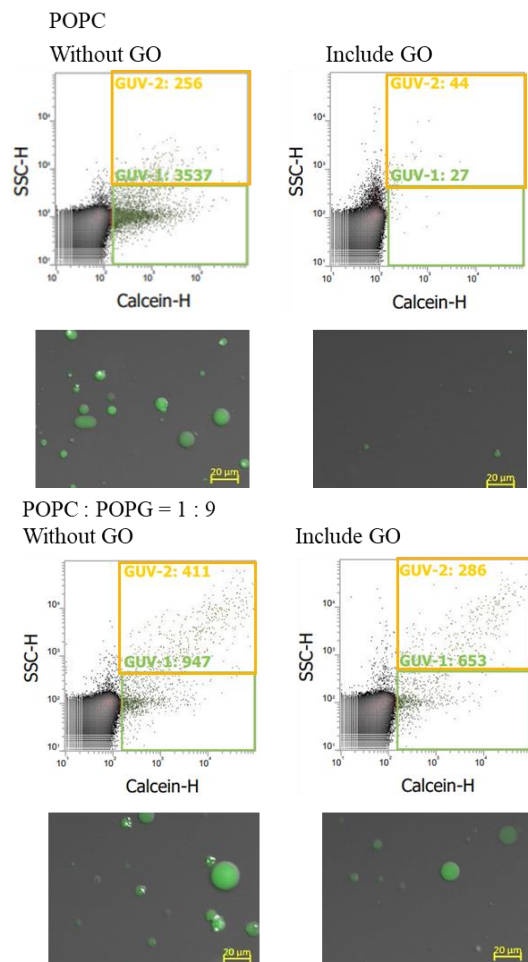


Fig. 4 Scatter plots of the internal volume and complexity of GUVs. Microscopic images are supplemented below each plot.

### 3.2.2.2. GO のサイズの影響

先行研究により LUV-GO 間の相互作用において、GO のサイズが大きいほど LUV が残存する割合が低いことが報告されている<sup>(6)</sup>。そのため、GUV においても同様の現象が起こるかを検証した。GUV の組成は電荷をもたない POPC のみを使用し、GO の平均サイズは 90 nm, 500 nm, 5 μm を使用した。フローサイトメトリーの結果およびその際の GUV-1 の残存率を Fig. 5 に示す。

Fig. 5 (a), (b) より、GO のサイズが小さいほど残存する GUV が増加しており、GUV の残存に GO のサイズが関連していることがわかる。GO が脂質に吸着する性質を持つため、GO のサイズが大きいほど球状の GUV 脂質膜を大きくゆがめ、GUV を破壊したと考えられる。また、Fig. 5(a) より GUV-1 の減少量に対し GUV-2 の減少量が小さく、純粋な一枚膜でない GV は GO による影響を受けにくいことが推測される。

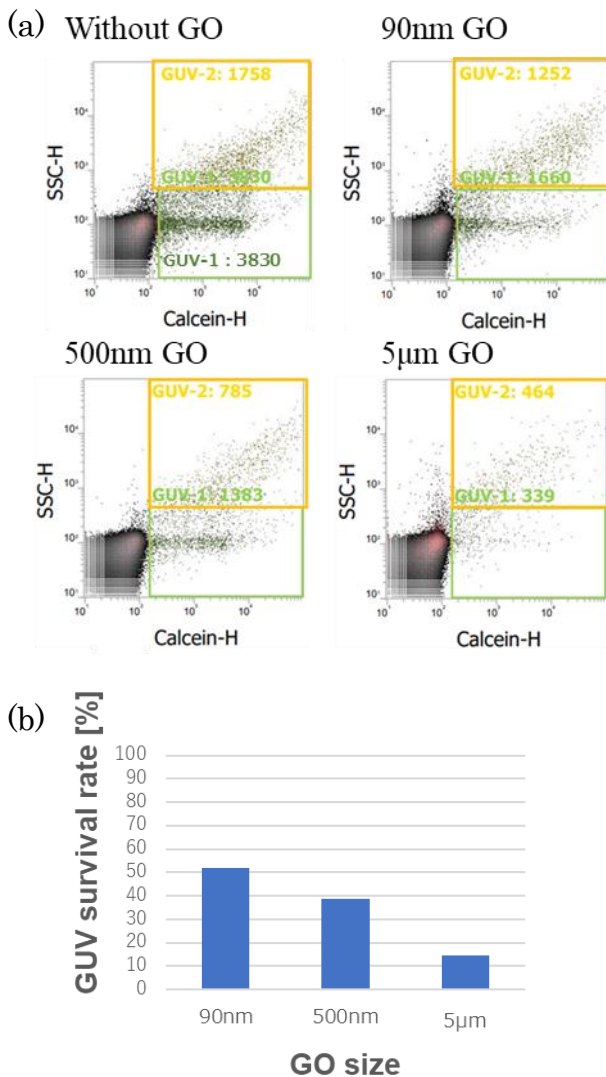


Fig.5 (a) Scatter plots of the flow cytometry measurements for different GO sizes. (b) Relation between GUV survival rate and GO size.

### 3.2.2.3. pyrene 脂質濃度の影響

GUV の組成として、GO との相互作用が起こりにくかった POPC:POPG=9:1 の負電荷 GUV を基本組成とし、pyrene 脂質を脂質の 1.5 および 3 mol% 添加した影響を調べた。GO サイズには 500 nm を選択した。

フローサイトメトリーの結果および GUV-1 の残存率のグラフを Fig. 6 に示す。特に Fig. 6 (b) の結果より、pyrene 濃度が高いほど残存率が低いことが確認できた。これは、pyrene 脂質によって GUV と GO の相互作用が促進されたためと考えられる。

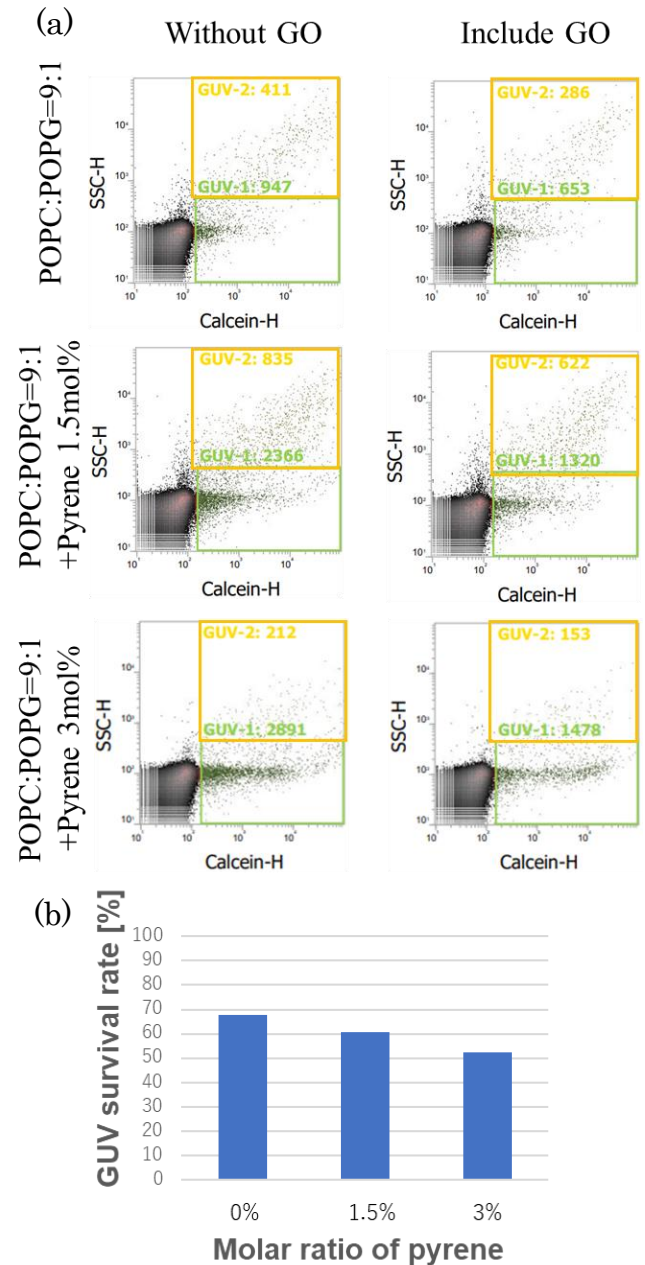


Fig. 6 (a) Scatter plots of the flow cytometry measurements for different molar ratio of pyrene-grafted lipid. (b) Relation between GUV survival rate and molar ratio of pyrene.

## 4. GO 付加 GUV の作製

### 4.1. 実験方法

GO を接触させた際、GUV は浮遊 GO に対しては破損、固定された GO に対しては吸着した。本章では、エレクトロフォーメーション法において、GO を付加した ITO ガラス上に脂質フィルムを作製することで、GO 付加 GUV が作製可能かを検証した。脂質組成は POPC のみとし、GO のサイズは 90 nm を使用した。また、ガラスに GO を付加（コーティング）する際には、GO のガラス剥離を促進する目的で、GO 溶液に水溶性高分子の PVA を 1 w/v% 付加した。GUV に対する GO の付加は、GO の赤色自家蛍光が GUV 膜（または内部）に確認できるかを蛍光顕微鏡にて観察し、評価を行った。

### 4.2. 実験結果

ITO ガラスへの GO コートの有無を変えた際の GUV の観察結果を次の Fig. 7(a), (b) に示す。(a) より、GO がいない条件でも一部の GUV において赤の蛍光が確認できることがわかる。これは、GO の蛍光が弱くレーザー強度を上げた結果、本来蛍光を持たない脂質も微弱な蛍光を発したことが原因だと考えられる、また、この赤蛍光は、(a) 左下の拡大図のように、脂質の膜が厚く、多重膜であると想定される GUV のみで観察された。一枚膜であると考えられる (a) 右下の拡大図のような GUV では赤蛍光は観察されなかった。一方、(b) の GO をコートした条件では、GO なしの条件と比較して、GUV のサイズが大きく、赤蛍光は多重膜と思われる GUV 以外でも観察され、GO 有り無しによる差が確認された。

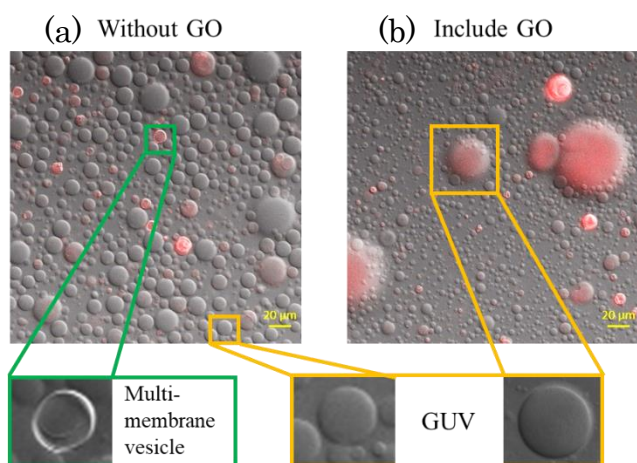


Fig. 7 Microscopic images of GUVs formed by the electroformation method (a) with and (b) without GO coating on the ITO glass.

## 5. 結言

本研究では、GUV と GO の間に発生する吸着および膜破壊を主とした相互作用の調査と、バイオセンサーなどに応用が期待される GO 付加 GUV の作製を試みた。固定 GO と GUV 相互作用の調査では、GO に対して脂質全般が吸着し、それを DEPE-PEG によって軽減できること、また pyrene 脂

質により吸着の強化が可能であること確認できた。浮遊 GO と GUV の相互作用の調査では、GO が固定されていないことで、GO のエッジによる GUV の破壊が主な作用として生じることが推察された。また、膜破壊は、膜に負電荷を付与することと、GO のサイズを小さくすることで低減されることが確認された。

GO 付加 GUV の作製の試みでは、GO の自家蛍光を計測できるレーザー強度では、脂質の凝集体も赤蛍光を示してしまい、GO の明確な局在が確認されなかった。

本研究において確認された GUV と GO 間の作用は、GUV と GO を使用した実験系、具体的には GUV に GO によるバイオセンサーを搭載する際などでの活用が期待できる。

## 6. 参考文献

- [1] Zhanjun Gu, Shuang Zhu, Liang Yan, Feng Zhao, Yuliang Zhao. “Graphene-Based Smart Platforms for Combined Cancer Therapy”, *Adv. Mat.*, **31-9** (2018), 1800662.
- [2] Rajendra Prasad, Amit S. Yadav, Mahadeo Gorain, Deepak S. Chauhan, Gopal C. Kundu, Rohit Srivastava, and Kaliaperumal Selvaraj, “Graphene Oxide Supported Liposomes as Red Emissive Theranostics for Phototriggered Tissue Visualization and Tumor Regression”, *ACS Appl. Bio Mater.*, **2** (2019), pp. 3312-3320.
- [3] Amedea B. Seabra, Amauri J. Paula, Renata de Lima, Oswaldo L. Alves, Nelson Durán, “Nanotoxicity of Graphene and Graphene Oxide”, *Chem. Res. Toxicol.*, **27-2** (2014), pp. 159-168.
- [4] Po-Jung Jimmy Huang, Feng Wang, and Juewen Liu, “Liposome/Graphene Oxide Interaction Studied by Isothermal Titration Calorimetry”, *Langmuir*, **32-10** (2016), pp. 2458-2463.
- [5] Elle Puigpelat, Jordi Ignés-Mullol, Francesc Sagués, Ramon Reigada, “Interaction of Graphene Nanoparticles and Lipid Membranes Displaying Different Liquid Orderings: A Molecular Dynamics Study”, *Langmuir* **35-50** (2019), pp. 16661-16668.
- [6] Rickard Frost, Gustav Edman Jönsson, Dinko Chakarov, Sofia Svedhem, Bengt Kasemo, “Graphene Oxide and Lipid Membranes: Interactions and Nanocomposite Structures”, *Nano Lett* **12-7** (2012), pp-3356-3362.