

〔特集〕 流体力学と化学反応

# Droplet Microfluidics による人工細胞モデルの構築

東京工業大学 大学院総合理工学研究科知能システム科学専攻/日本学術振興会特別研究員 (PD)

森田 雅宗

東京工業大学 大学院総合理工学研究科知能システム科学専攻

杉浦 晴香

\*東京工業大学 大学院総合理工学研究科知能システム科学専攻/JST さきがけ

瀧ノ上 正浩†

## Artificial Cell Construction Based on Droplet Microfluidics

Masamune Morita, Department of Computational Intelligence and Systems Science, Tokyo Institute of Technology/Postdoctoral fellow, JSPS

Haruka Sugiura, Department of Computational Intelligence and Systems Science, Tokyo Institute of Technology

Masahiro TAKINOUE, Department of Computational Intelligence and Systems Science, Tokyo Institute of Technology/PRESTO, JST

### 1 はじめに

細胞の自律的な運動, 細胞分裂, 細胞集団の自己組織化パターンの形成, 心臓や体内時計のリズム, 自律的な情報処理など, 生命システムは興味深い現象を示す動的なシステムである. これらの動的な現象は, いずれも, 物質・エネルギーの流入と散逸が維持された非平衡開放系で実現される自己秩序化現象であることが知られている (図1). 近年, 生命システムの動的な現象をモデル化した人工細胞や人工組織, さらに, 動的な現象を応用した分子ロボットシステムの構築が行われている<sup>1,2)</sup>. これらは細胞サイズ, すなわち, 数~数百マイクロメートルのスケールでの溶液の化学反応をベースにしており, マイクロ流体力学 (Microfluidics) による流体の操作が重要な役割を果たす. 特に, マイクロメートルサイズの油中水滴を操作できる Droplet microfluidics<sup>1)</sup>が威力を発揮する.

Droplet microfluidics とは, 数~数百マイクロメートルのサイズの油中水滴を生成したり, 油中水滴の融合分裂を制御したり, ソーティング, アレイ化をしたりすることができる技術である. 近年は, Droplet microfluidics を用いて微小化学分析や生体分析・診断を可能にする Micro-Total Analysis System ( $\mu$ TAS) の構築 (たとえば, digital PCR system) や,

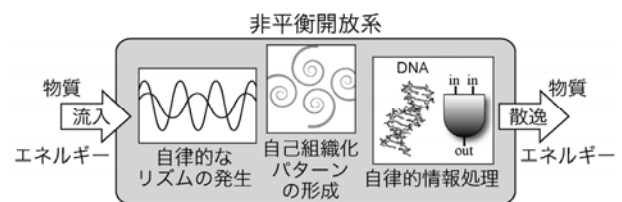


図1. 非平衡開放系で生じる自己秩序化現象.

機能性材料工学, ソフトマター物理学, 細胞操作・観察, そして, 人工細胞構築などが実現されている. 本稿では, この Droplet microfluidics を応用した人工細胞構築の現状について報告する.

### 2 油中水滴の融合分裂による非平衡開放系型人工細胞

#### 2.1 非平衡開放系から見た生命システム研究

生命科学の分野では, ゲノム情報やタンパク質立体構造などの膨大な情報がデータベース化され, それを利用した医薬研究などが目覚ましい発展を遂げている. 近年では, 人工遺伝子回路や人工細胞モデルによる構成的な研究によって, 遺伝子の発現・制御ネットワーク等, 細胞機能の動的な側面も解明されつつある. しかしながら, 従来から, 人工細胞モデルは脂質二重膜小胞 (リポソーム) や油中水滴などの人工的な細胞サイズコンパートメントを利用して構築されており, コンパートメント内の溶液は外の環境から隔離された閉鎖環境になってしまう. した

\*〒226-8502 神奈川県横浜市長津田町 4259-G3-53

† E-mail: takinoue@dis.titech.ac.jp

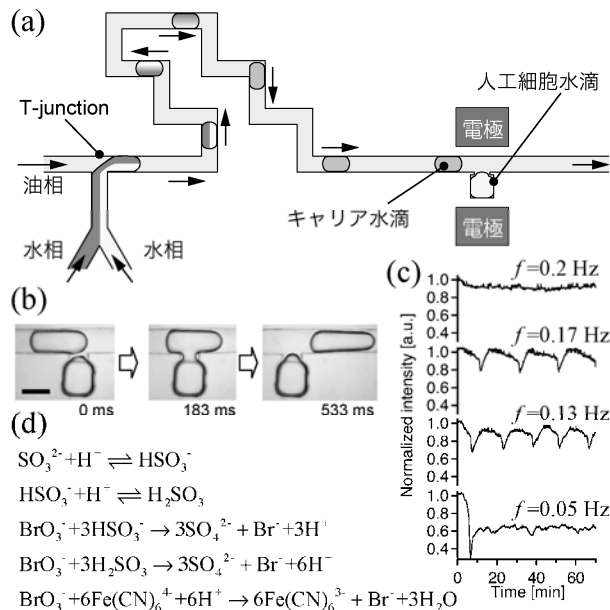


図 2 油中水滴の融合分裂による非平衡開放系型人工細胞. (a) マイクロ流体デバイスの概要. (b) 水滴融合の様子 (電圧印加時). (c) pH 振動.  $f$ : 融合分裂頻度. (d) pH 振動を示す化学反応

がって、化学反応が平衡状態へ収束するまでの過渡現象としての動的な振る舞いしか観測することができない。つまり、従来の人工細胞モデルでは、非平衡な条件下で時間発展し続けるという生命システムの本質に迫ることができない。ここでは、油中水滴に持続的な物質の流入出を実現し、非平衡性を維持できる人工細胞モデル（非平衡開放系型人工細胞）の構築に関して解説する。

## 2.2 物質の流入出のある非平衡開放系型人工細胞

非平衡開放系型人工細胞は、図 2a に示したようなマイクロ流体デバイス<sup>3,4)</sup>によって実現できる。人工細胞となる油中水滴は、マイクロ流路の側面にあるウェルに固定されている。一方、人工細胞に物質を供給する油中水滴（以下、キャリア水滴）は、T-junction 流路と呼ばれる流路部分で生成される。T-junction 流路では、均一サイズの水滴を大量に生成することができる。油相の流れがせん断応力によって水相を引きちぎるようにして水滴を生成するため、油水界面の界面張力や、油相・水相の流速などによって、できる水滴の大きさを制御することができる。

キャリア水滴には、生成時に複数の水溶液を内包することができる。マイクロ流路中は、低 Reynolds 数であるため、流体は層流を成してしまい、水滴内の溶液は容易には混合されないが、図 2 a にあるようなジグザグ型の流路を通過させることでキャリア

水滴内の溶液の攪拌ができる。

生成・攪拌がなされたキャリア水滴は、その後、人工細胞水滴のところまで運ばれ、融合時に両者の水滴の間で物質を拡散的に交換する。これにより、人工細胞水滴へ基質を供給するとともに、人工細胞内で化学反応によって生成された分子の一部が排出される。最後に、キャリア水滴は、油相の流れのせん断応力によって、人工細胞から分裂させられる。このような、キャリア水滴の融合分裂プロセスの繰り返しによって、人工細胞に物質流入出を実現し、非平衡性を維持させることができる。

この融合分裂は、交流電圧の印加で制御することができる。油相には界面活性剤が含まれており、2 つの水滴は接触しても自発的には融合しないが、電圧が印加されている場合、不安定化し融合する（図 2b）。融合分裂頻度が高い場合は物質の流入出が多く、逆に低い場合は流入出量が低いというように、流入出量を電氣的に制御できる。ある種のパルス変調制御であると考えられる。

図 2c は、融合分裂頻度を変えて、物質流入出量を制御し、人工細胞内での化学反応を制御した実験データである。人工細胞内部の化学反応は、自己触媒反応を含むネガティブフィードバック反応ネットワークであり、生物のリズム現象によく見られる反応のタイプである。具体的には、モデルとして pH 振動反応（図 2d）という化学反応系を用いた。図 2c にあるように、物質流入出量が多い場合、少ない場合は、反応がある定常点に収束してしまうが、その中間の適切な物質流入出量が維持されている場合は、人工細胞の水滴内で pH の振動が発生している。これは、リミットサイクル振動の一つで、時間的な自己秩序化現象であることが知られている。このように、油中水滴の人工細胞に非平衡性を持たせ、それを制御することで、動的な現象を制御できるということが示された。

## 3 遠心式キャピラリーマイクロ流体デバイスによる人工細胞の構築

人工細胞の構築では、細胞サイズの油中水滴とリポソームの 2 種類が利用されている。マイクロ流体力学の発展により、均一サイズを有する細胞サイズの油中水滴やリポソームを一度に大量に生成する手法が次々と開発されている。我々は、高重力下において液体が封入された微細ガラス管からの微小液滴生成に着目し、遠心型マイクロ流体デバイスを開発

した<sup>5)</sup>。ここでは、遠心型マイクロ流体デバイスによる油中水滴とリポソーム作製法について解説する。

### 3.1 脂質膜小胞（リポソーム）による人工細胞

我々の開発した方法<sup>6,7)</sup> (図 3a) は、まず、1.5 mL の試験管チューブ内にリン脂質が溶けた油と水による単層膜の界面を形成させる。次に、ガラス管を固定した固定具をチューブ内にセットし卓上型小型遠心機で遠心する。遠心力によりガラス管から射出した水滴は、サイズの異なる 2 種類の液滴（大：70-90  $\mu\text{m}$ ，小：5-30  $\mu\text{m}$ ）を形成し、リン脂質が溶けた油相に入り、油中水滴となる。次に、リン脂質で覆われた油中水滴は、油と水の界面にできた単層膜を通過することで、リポソームとなる。界面を通過する際に、小さい油中水滴ほど通過しやすいという物理的特性を利用することで、細胞サイズ（5-30  $\mu\text{m}$ ）のリポソームが得られる（図 3b）。

次に、本作製法によって得られたリポソーム膜の物理的性質である脂質二重膜形成について解析した。膜貫通タンパク質の一つである  $\alpha$  ヘモリシタンパク質をリポソーム膜の外側から添加すると、 $\alpha$  ヘモリシタンパク質は、膜に吸着し膜上でナノポアを形成する。図 3c にあるように、膜上のナノポアを介して物質が膜内外の流入出を繰り返すことにより、膜内外の位相差が解消される。 $\alpha$  ヘモリシタンパク質は脂質二重膜にのみナノポアを形成することが確認されており、このことから、本手法によって得られるリポソームは脂質二重膜性を維持していることがわかる。

さらに、近年、人工細胞研究で良く利用されている、リポソーム内に無細胞翻訳系を封入し、緑色蛍光タンパク質（GFP）合成を試みた（図 3d）。リポソーム内で転写・翻訳系（DNA $\rightarrow$ RNA $\rightarrow$ タンパク質）の反応を行い、リポソーム内で GFP による蛍光が観察された。本手法を用いても、リポソーム内でのタンパク質の合成など生化学反応系の観察は可能であることが示された。この他に、油相中に様々な脂質を混合することで膜表面上のドメイン構造形成（相分離現象）や脂質二重膜の外層と内層の非対称構造（生体膜と類似）を有したリポソームなどを作製でき、より細胞らしい高次の機能を有した新たな人工細胞モデル系の構築が期待できる。

### 3.2 油中水滴による人工細胞

3.1 で使用したデバイスでは、水滴は大小 2 種類の大きさを有する水滴を形成する。これは、Dripping

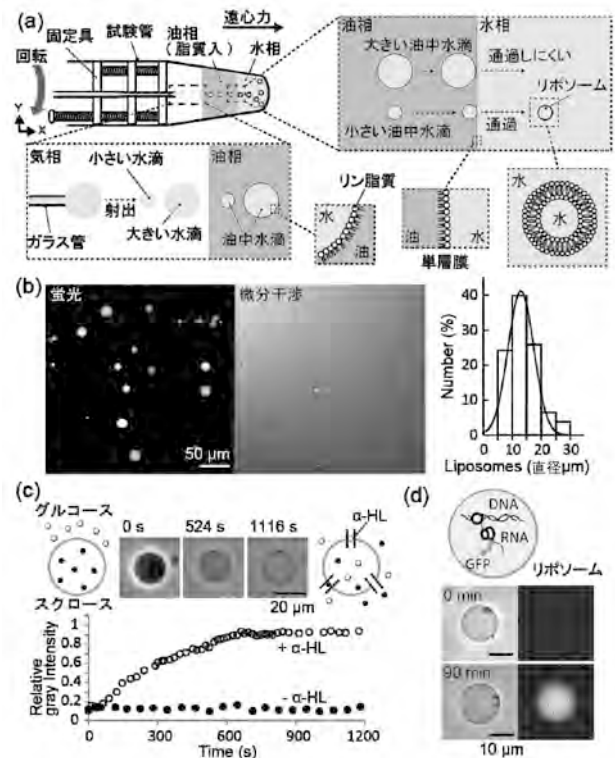


図 3 遠心式キャピラリーマイクロ流体デバイスによる細胞サイズリポソームの作製. (a) 遠心式マイクロ流体デバイスの模式図とリポソーム作製プロセスの模式図. (b) リポソームの蛍光と微分干渉画像およびサイズ分布. (c)  $\alpha$ ヘモリシンのナノポア形成過程のリアルタイム観察. (d) リポソーム内での GFP 発現

と呼ばれるメカニズムで水滴が形成されていることを示している。Dripping において、大きい水滴のサイズは、Tate の法則  $d_w \propto (\sigma d_o / \rho G)^{1/3}$  ( $d_w$ : 水滴の大きさ、 $\sigma$ : 表面張力、 $d_o$ : ガラス管の口径、 $\rho$ : 水溶液の密度、 $G$ : 重力) で決まり、小さい水滴は、大きい水滴に付随するサテライトのため大きさを制御することが難しい。ガラス管の口径と同じ大きさの水滴を得るには、Jetting と呼ばれるメカニズムでガラス管から水溶液が射出される必要がある。Jetting により、水滴のサイズを制御するために、我々はデバイスの構造を改良し、太さの異なるガラス管を重ね合わせた二重管構造のデバイスを構築した（図 4a）<sup>8)</sup>。外側のガラス管に界面活性剤を混入した油を、内側のガラス管に水を封入する。遠心力により、油と水を同時に押し出すことで Jetting が起こるか確認した。

図 4b にあるように、ガラス管の口径とほぼ同じ大きさで、かつサイズ均一性を有する油中水滴の作製に成功した。これは、Jetting により水滴が形成されていることを示す。さらに、図 4c にあるように、こ

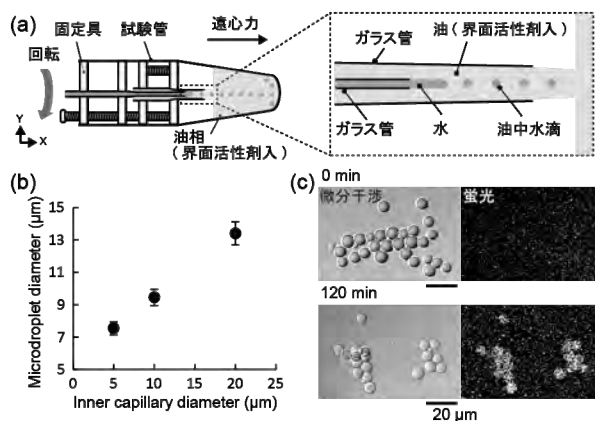


図 4 遠心式キャピラリーマイクロ流体デバイスによる細胞サイズ油中水滴の作製. (a)デバイスの模式図と Jetting 現象の模式図. (b)ガラス管の口径と油中水滴のサイズ相関. (c)油中水滴内での GFP 発現

ちらでも油中水滴内でタンパク質発現を行う実験に成功しており、油中水滴を用いた人工細胞研究への応用の可能性を示した。今後は、こちらのデバイスでもリポソーム作製へ応用したいと考えている。

#### 4 おわりに

本稿では、Droplet microfluidics を利用した様々な人工細胞の構築手法に関して解説した。細胞は、マイクロスケールの流体と化学反応が協同的に作用することで複雑で動的な自己秩序化現象を示す典型的な例である。今後も、マイクロ流体力学は、このような動的な現象をモデル化し応用した、人工細胞や分子ロボットなどの微小かつ複雑高機能な自律型分子システムの開発に役に立つと考えられる。

#### 謝辞

これらの研究は、山下仁義氏（東京工業大学）、尾上弘晃講師、藤原慶助教（慶應義塾大学）、柳澤実穂准教授（東京農工大学）、齊藤博英教授（京都大学）、伊藤弘明氏、市川正敏講師（京都大学）、北畑裕之准教授（千葉大学）、森義仁教授（お茶の水女子大学）との共同研究である。また、JST さきがけ「細胞機能の構成的な理解と制御」、新学術領域「分子ロボティクス」、科研費・基盤研究 (B) (26280097)、(S) (22220001)、挑戦的萌芽研究 (26540150)、特別研究員奨励費 (2610002) の助成によってなされた。

#### 引用文献

1) Takinoue, M. & Takeuchi, S.: Droplet microfluidics for the study of artificial cells, *Anal. Bioanal. Chem.*,

400 (2011) 1705-1716.

2) Hagiya, M., Konagaya, A., Kobayashi, S., Saito, H. & Murata, S.: Molecular Robots with Sensors and Intelligence. *Acc. Chem. Res.*, 47 (2014) 1681-1690.

3) Takinoue, M., Onoe, H. & Takeuchi, S.: Fusion and fission control of picoliter-sized microdroplets for changing the solution concentration of microreactors, *Small*, 6 (2010) 2374-2377.

4) Takinoue, M., Sugiura, H., Kitahata, H. & Mori, Y. (2015) in preparation.

5) Maeda, K., Onoe, H., Takinoue, M., & Takeuchi, S.: Controlled synthesis of 3D multi-compartmental particles with centrifuge-based microdroplet formation from a multi-barrelled capillary, *Adv. Mater.*, 24 (2012) 1340-1346.

6) Morita, M., Onoe, H., Yanagisawa, M., Fujiwara, K., Saito, H., & Takinoue, M.: The rapid synthesis of cell-sized liposomes by centrifuge-based microfluidic device, *Proc. microTAS*, (2014) 336-338.

7) Morita, M., Onoe, H., Yanagisawa, M., Ito H., Ichikawa M., Fujiwara, K., Saito, H., & Takinoue, M. (2015) submitted.

8) Yamashita, H., Morita, M., Sugiura, H., Fujiwara, K., Onoe, H., & Takinoue, M.: Generation of Monodisperse Cell-Sized Microdroplets using a Centrifuge-Based Axisymmetric Co-Flowing Microfluidic Device, *J. Biosci. Bioeng.*, (2015) in press.