

# 誘電泳動力を用いた平面脂質平面膜に対する高速リポソーム導入

High speed introduction of a liposome into the planar lipid bilayer using dielectrophoretic force

○正 杉浦 広峻 (KISETC) 大崎 寿久 (KISTEC, 東大) 三村 久敏 (KISETC)  
山田 哲也 (KSIETC) 竹内 昌治 (KISTEC, 東大)

Hiroataka Sugiura is with Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology (KISTEC),  
Email: hsugiura@iis.u-tokyo.ac.jp

Toshihisa Osaki, Hisatoshi Mimura, Tetsuya Yamada, and Shoji Takeuchi are with (KISTEC)

Toshihisa Osaki and Shoji Takeuchi are with Institute of Industrial Science, the University of Tokyo

Shoji Takeuchi is with the Graduate School of Information Science and Technology, the University of Tokyo

This paper proposed a technique to introduce the membrane protein into the lab-on-chip analysis system having a planar lipid bilayer. The proposed technique utilized a dielectrophoretic force generated by the asymmetric configuration of the solid electrodes on the aqueous buffer separator. By applying the alternating current to the separator and the counter electrode, we manipulated liposomes that could host the membrane proteins on the surface. The key point for the dielectrophoretic manipulation on this system was to fabricate the liposome making the different complex permittivity. In this study, we utilized the centrifugal encapsulation technique with the polyethylene beads and the sucrose inside the liposome. In addition, we analyzed an effective configuration of the droplet separator having the taper-edge on the contour of the micropore. This configuration made a strong interpenetrating dielectrophoretic force at the lipid bilayer, and prompted the fusion of liposome into the lipid bilayer. The separator was fabricated by micromachining technique. Using the separator, we formed the lipid bilayer without evading the solid electrode on the surface. Finally, we elucidated the introduction of the liposome by monitoring with the optical microscopy.

**Key Words:** Micro/Nano Robots, Automation at Micro-Nano Scales, Dielectrophoresis,

## 1. 緒言

本研究では、膜タンパク分析プラットフォームである平面脂質二重膜を用いたデバイスにおいて、誘電泳動力を用いて、膜タンパクを導入する手法を提案する。細胞表面に存在する膜タンパクは、イオンや化学物質の輸送、信号の伝達などの重要な役割を担う。とりわけ、イオンチャネルやトランスポーター、ならびにそれらにカップリングしているタンパクなどは、パッチクランプに代表される電気生理学的な機能評価が活発に進められている。パッチクランプによる手法は、これらの膜タンパクであるチャネルの開閉を直接計測できる反面、実験の成功率は作業者の手技に大きく依存する。また、化学受容性を検証する場合、本質的に偽陽性を取り除くことが非常に難しい。そこで、近年では、Lab-on-chip デバイスのような形態で、人工的に細胞膜を再現することで膜タンパクを解析する手法が発達してきた。これは、解析対象となる膜タンパクを、精製、抽出を経て、人工細胞膜となる脂質二重膜に再構成することで、より簡単にかつ正確に膜タンパクの機能を解析、利用する方法である。我々の研究グループでは、液滴接触法(Droplet Contact Method, DCM)と呼ばれる基幹技術によって、脂質二重膜を形成し、様々の応用手法や周辺技術を発信してきた。[1] 本手法は、膜タンパクの解析や応用として、現在広く普及してきているが、課題も存在する。その一つが、膜タンパクを脂質膜に導入する手法が十分に確立されておらず、自己拡散による確率的な導入を利用している点である。そのため、計測の成功率や再現性に改善の余地があった。そこで、本研究では、誘電泳動力を用いて、リポソームを脂質膜に導入する手法を提案した。これは、既存のプラットフォームに親和性が高く、簡便な手法である。[2]

## 2. 実験、結果

### 2.1 システムの概要

図 1 に計測システムの概要と、膜タンパクの導入手法を示す。脂質二重膜を形成する機構は、アクリル板を切削した 2 対の円筒形のマイクロウェルになっており、互いに交錯した状態で配置されている。このマイクロウェルに脂質を分散させ

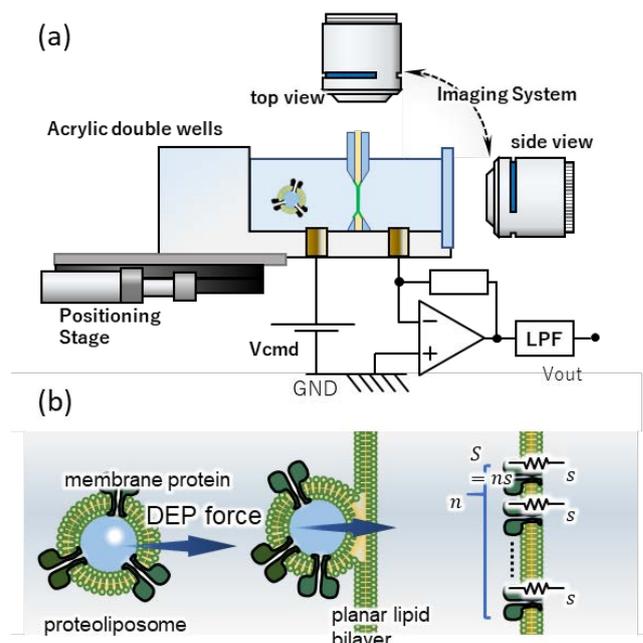


Fig. 1 (a) Overview of the membrane protein analysis and (b) conceptual of the membrane protein introduction using dielectrophoresis.

た有機溶媒を滴下し、続けて電解質を含む緩衝水溶液をそれぞれのウェルに滴下することで、水溶液の液滴が接触した領域に脂質二重膜が形成される。この脂質二重膜は、液滴に供給した膜タンパクを取り込むことができ、細胞膜と同様の環境をデバイス上に構成することができる。イオンチャネルなどの膜タンパクの機能は、イオンチャネルを流れるイオン電流の検出によって評価する。そのため、解析の際には銀塩化銀の埋込参照電極をウェルの底部に配置し、さらに電流検出のためのトランスインピーダンスアンプ、低域通過フィルタを介在させることで、pA オーダのイオン電流を計測する。膜形成の再現性向上のため、近年では、ウェルの中央に微小貫通穴を

有するセパレータを配置する傾向にある。

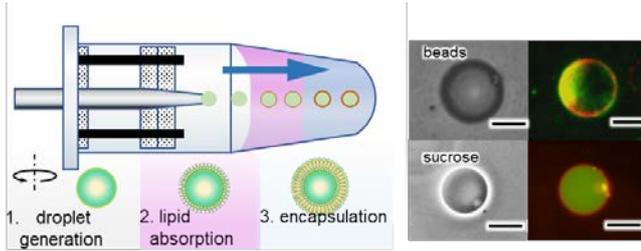


Fig. 2 Overview and results of the liposome formation using a centrifugal device.

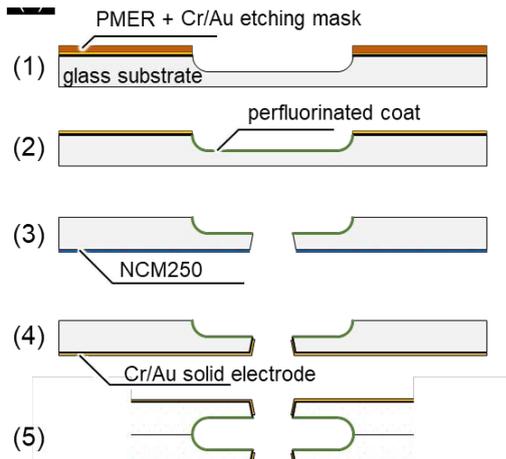


Fig. 3 Fabrication process of the separator using micromachining technique.

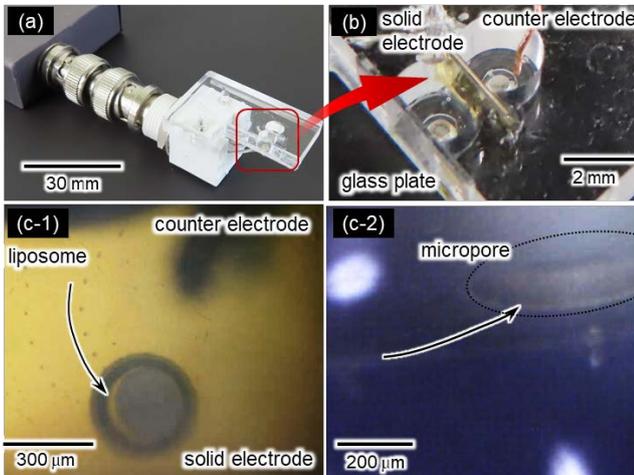


Fig. 4 (a) Experimental device configuration, (b) the composition of the electrode for DEP and (c) the result of the liposome introduction into the lipid bilayer.

本研究は、上記の一般的なプラットフォーム技術に加えて、誘電泳動力を生成する構造を持つセパレータと、誘電泳動力を受ける膜タンパク導入の担体であるリポソームについて、実験的検討をおこない、導入の実証を行った。

## 2.2 誘電泳動による膜タンパク導入手法

誘電泳動によって液中の物体を操作するためには、操作対象の物体は、環境と異なる複素誘電率を有する必要がある。本システムでは、多くの場合、膜タンパクをリポソームと呼ばれる球殻形状の脂質二重膜に再構成した状態で供給するため、

リポソームの複素誘電率を調整する必要がある。リポソームの複素誘電率は、通常の場合内部が水溶液のため、環境とほぼ同一の値となる。そこで、本研究では、複素誘電率調整のために、遠心式のリポソーム形成手法によって、リポソームの内部に高濃度のスクロース溶液を内包させる方法と、そのスクロース溶液に更にポリスチレンビーズを内包させる方法を利用する。これは、遠心チューブにガラスキャピラリを把持し、遠心チューブに貯められた脂質分散オイル、緩衝液に向けて水滴を打ち込む方法である。したがって、ガラスキャピラリに蓄えられた液体が、最終的に形成されたリポソームの内水層になる。図2に、形成したリポソームの位相差画像と蛍光画像を示す。位相差画像では、内水層のスクロースの屈折率が大きいため、リポソームは暗色を呈する。蛍光画像では、蛍光染色した表層の脂質が赤く見るとともに、内水層に染色したカルセインが緑に見える。ビーズの入ったものでは、内水層の染色に変えて、100 nm と 500 nm の蛍光ビーズを使用したため、高濃度の緑色の輝点が観察できる。作製できたリポソームは単分散ではないが、およそ 10  $\mu\text{m}$  オーダであった。平板電極で誘電泳動の極性を調べたところ、いずれも 1MHz までは負の誘電泳動を示し、10MHz で誘電泳動は抑制された。高周波における正の誘電泳動は装置の性能限界から、本研究では観測できなかった。

誘電泳動力を形成するもう一つの要素は、対象物に対して与える電解の強度の勾配である。本研究では、非対称な電場を形成するため、液滴を分断し、脂質二重膜を形成するセパレータに傾斜付きの穴を形成する方法を採用した。これにより、負の誘電泳動によって、リポソームが脂質二重膜に向かって引き寄せられるようにした。セパレータの両表面には、クロム、金のベタ電極を形成し、更に両側の電極が結合して膜タンパク解析ができなくなるのを防ぐため、中間にスリットを設けた。膜形成用の脂質分散オイルは、このスリットから供給した。これにより、電極がオイルで覆われて、電解勾配が変動することを回避した。セパレータの作製工程は図3の通りである。

上記の機構を用いて、誘電泳動を用いたリポソームの脂質二重膜に向けた導入の実証実験を行った。実験に用いた機構と、実験動画を図4に示す。実験動画より、リポソームが脂質膜の存在する領域に向けて引き寄せられるのがわかる。例えば図3(c-1)の軌道で導入されたリポソームは、図示した移動区間を 6.3 秒で動いており、これは従来の自己拡散を期待する導入手法より、非常に高速である。

## 謝辞

本研究の一部は、JST・START, JPMJST1811 の支援、ならびに、JSPS 科研費、研究活動スタート支援 JP19K23505 の支援を受けたものである。

## 参考文献

- [1] K. Funakoshi, H. Suzuki, S. Takeuchi, "Lipid Bilayer Formation by Contacting Monolayers in a Microfluidic Device for Membrane Protein Analysis," *Analytical Chemistry*, 78, 24, 8169-8174, 2006
- [2] T. Osaki, S. Takeuchi, "Dielectrophoresis-based liposome delivery to a planar lipid membrane for efficient membrane protein reconstitution," *Proc of IEEE MEMS*, 11241147, 2010
- [3] M. Morita, H. Onoe, M. Yanagisawa, H. Ito, M. Ichikawa, K. Fujiwara, H. Saito, M. Takinoue "Droplet-Shooting and Size-Filtration (DSSF) Method for Synthesis of Cell-Sized Liposomes with Controlled Lipid Compositions," *ChemBioChem*, 16, 2029-2035, 2015.