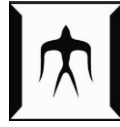


論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	人工細胞の実現に向けた小孔支持型脂質二重膜の研究
Title(English)	
著者(和文)	彭祖癸
Author(English)	Zugui Peng
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12229号, 授与年月日:2022年9月22日, 学位の種別:課程博士, 審査員:八木 透,山本 直之,柳田 保子,林 智広,石田 忠
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12229号, Conferred date:2022/9/22, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis



2022 年度 博士論文

人工細胞の実現に向けた
小孔支持型脂質二重膜の研究

東京工業大学 工学院 機械系
ライフエンジニアリングコース

氏名 ホウ ソ キ
彭 祖癸

指導教員 八木透 教授

目次

第 1 章 序論	3
1.1 はじめに	3
1.2 研究背景	4
1.2.1 人工細胞	4
1.2.2 脂質二重膜	6
1.2.3 人工脂質二重膜	7
1.2.4 小孔支持型脂質二重膜	9
1.2.5 小孔支持型脂質二重膜の形成法とその問題点	12
1.3 本研究の目的	14
1.4 本論文の構成	15
第 2 章 小孔支持型 GUV の形成手法	16
2.1 オイルフリーの GUV 形成手法	16
2.2 水和時の脂質二重膜のエネルギーバランス	19
2.3 小孔支持型 GUV の作製	20
2.4 小孔支持型 GUV の機械的強度の検証	23
2.5 膜タンパク質の導入	24
2.6 画像解析	25
2.7 本章のまとめ	26
第 3 章 形成した小孔支持型 GUV の評価	27
3.1 小孔支持型 GUV の形成効率	27
3.2 小孔支持型 GUV のサイズと脂質二重膜層数	29
3.3 小孔支持型 GUV 内の agarose の包埋率	31
3.4 小孔支持型 GUV の機械的強度の検証	32
3.5 膜タンパク質の導入	34
3.6 小孔支持型 GUV の寿命	36
3.7 提案手法が対応できる脂質種類の検討	37
3.8 本章のまとめ	38
第 4 章 小孔支持型 SLB の形成手法	39
4.1 オイルフリーの SLB 形成手法	39

4.2	自発展開時の脂質二重膜のエネルギーバランス	42
4.3	小孔支持型 SLB の形成	43
4.4	小孔支持型 SLB の展開速度の評価	45
4.5	小孔支持型 SLB の流動性の確認	46
4.6	小孔上の脂質二重膜の機械的特性の評価	47
4.6.1	フォースカーブと脂質二重膜	47
4.6.2	AFM による小孔支持型 SLB の計測	49
4.7	本章のまとめ	50
第 5 章 形成した小孔支持型 SLB の評価		51
5.1	メンブレンフィルタ上での自発展開	51
5.2	小孔支持型 SLB の展開速度	54
5.3	小孔支持型 SLB の流動性	56
5.4	小孔支持型 SLB のフォースカーブ	58
5.5	小孔支持型 SLB の見掛けのバネ定数	62
5.6	本章のまとめ	63
第 6 章 結論		64
6.1	本研究の到達点	64
6.1.1	小孔支持型 GUV	64
6.1.2	小孔支持型 SLB	66
6.2	本研究の意義と波及効果	68
参考文献		70
業績		80
謝辞		83

第 1 章 序論

1.1 はじめに

細胞は、あらゆる生物を構成する基本単位であり、一つの細胞には増殖・分化や物質合成など様々な機能をもつ要素が備わっている。近年、脂質二重膜、DNA やタンパク質などの生体分子を組み合わせる細胞の複雑な機能を再現する人工細胞の研究が注目を集めている。このような人工細胞は、非生物である物質からどのように細胞のような生命システムが作られているかを理解するためのツールとして、物質科学と生命科学の謎の解明に大きく寄与する。また工学的な視点から、細胞の機能を再現し人為的に制御できれば、これまでにない革新的なバイオデバイスを開発し、体内の物質検出・輸送から環境内の有害分子の除去まで様々な分野における運用が期待できる。

人工細胞は大きく脂質二重膜、DNA、タンパク質という 3 つの要素で構成されている。中でも、脂質二重膜は人工細胞の内外を仕切るうえ、細胞接着やシグナル伝達などさまざまなプロセスに関与するため、最も重要な役割を担っている。しかし、従来の人工細胞は生細胞のような細胞骨格構造を有しておらず、わずかな刺激でも形状が変化する問題点がある。そこで本研究では、細胞骨格の代わりに多孔質材料で脂質二重膜を支持することで、機械的安定な支持型人工細胞を創出し、さらにその性質を評価している。

本章では、脂質二重膜の性質および作製手法について述べ、脂質二重膜技術の課題を提示する。その後、本研究の対象と目的について述べ、最後に本論文の構成を示した後、本論文の道筋を示す。

1.2 研究背景

1.2.1 人工細胞

人工細胞とは、生物の細胞から分解・抽出した分子や、人工合成された分子を組み立ててできた細胞と同様の機能を有する化学的または生化学的システムである [Stano 2019]. 通常、分子の容器として球状脂質二重膜 (ベシクル) が用いられ、ベシクル内部で分子が化学反応を行うことで動作する [Walde 2010] (図 1.1).

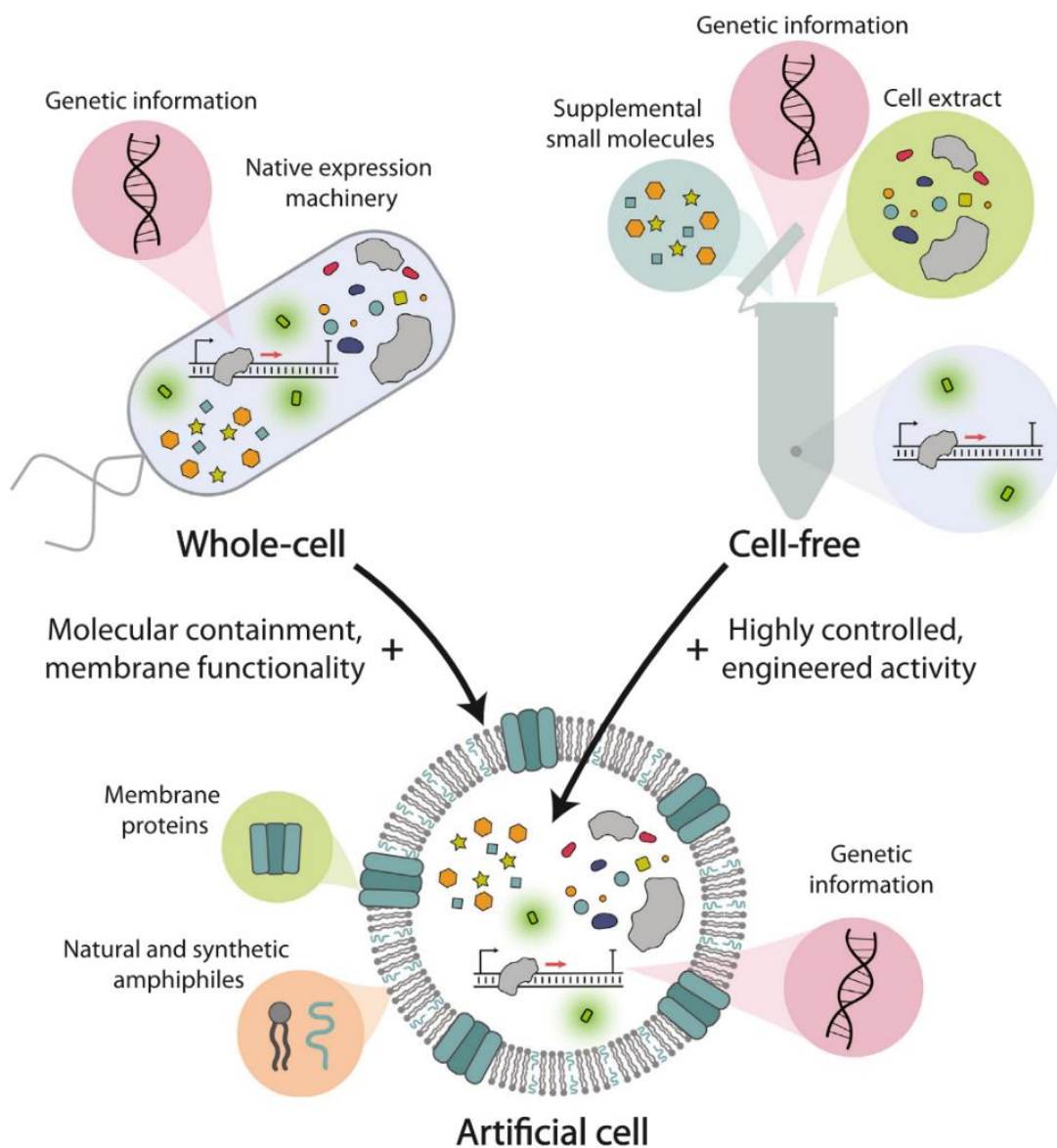


図 1.1 人工細胞の概要図. 脂質二重膜, DNA やタンパク質などの生体分子を組み合わせる [Boyd 2021].

このような人工細胞は、生命の起源を理解するためのアプローチとして研究が進められている[Sato 2022]. 生命は 40 億年ほど前に地球上に誕生したとされており、初期の生命は脂質二重膜を境界として持つ液滴であったと考えられる. 従って、人工細胞は初期生命のモデルとして、細胞の生命活動において必要な物質を網羅的に調査することに役立つ (図 1.2(a)). また、工学的な観点から、さまざまな分子を組み上げて人間が意図した通りのシステムを人工細胞内で開発することは、分子サイズのロボットを作り出すことになる. 本物の細胞と同様な検出や代謝などの機能を分子ロボット上で実現できれば、これまでにない革新的なバイオデバイスを開発し、体内の物質検出・輸送から環境内の有害分子の除去まで様々な分野に貢献できる (図 1.2(b)).

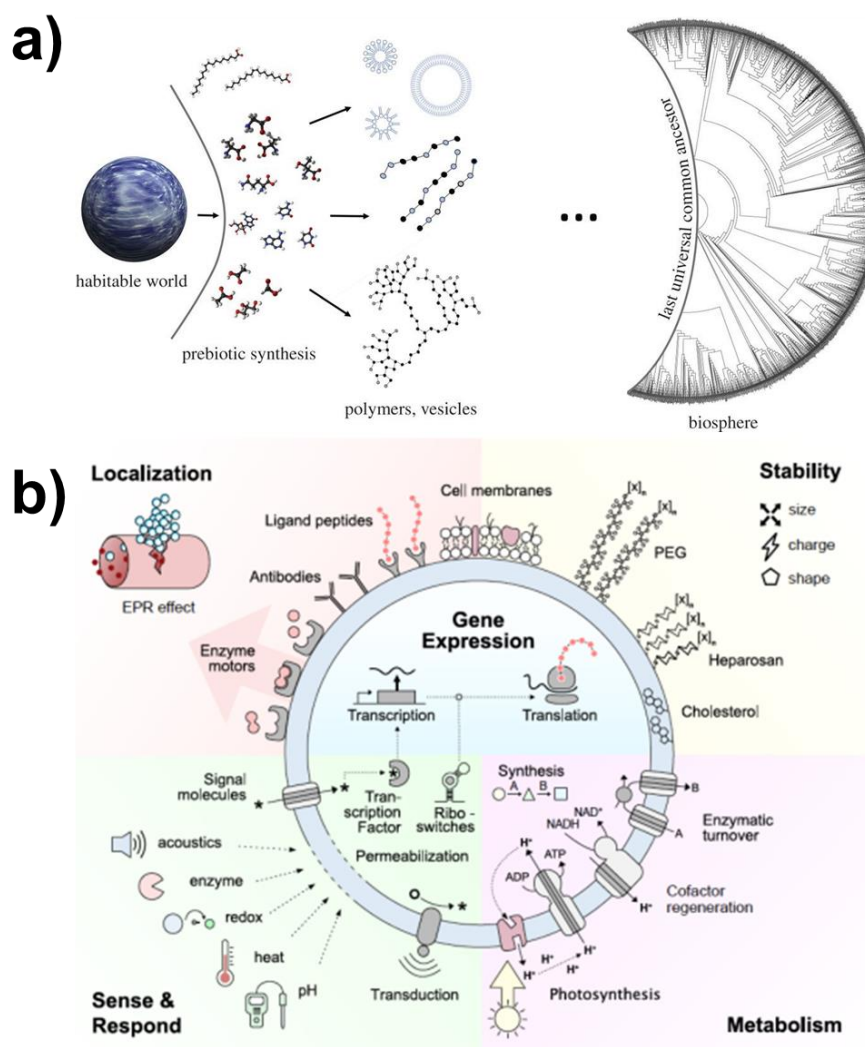


図 1.2 人工細胞と生命の起源. (a)原始地球上で、単純な分子から複雑な生命ができるまでの過程[Walker 2017]. (b)人工細胞が模倣できる生細胞の機能[Sato 2022].

1.2.2 脂質二重膜

脂質二重膜は人工細胞の内外を仕切る役割を担っている[Alberts 2014]. 脂質二重膜 1 μm 四方には約 5×10^6 のリン脂質分子が存在し, 小型の動物細胞の細胞膜は 10^9 個のリン脂質分子を含んでいる. リン脂質はすべて両媒性で, 親水性と疎水性の末端をそれぞれ持つ(図 1.3(a)). リン脂質が水性の溶媒中で自然に二重膜を形成できるのは, この両媒性に起因する. 両媒性分子を水中に分散させると, 近くの水分子が再配列して氷に似たかご状構造を作り, 非極性分子を取り囲む. この構造は周囲の水よりも規則性が高いため, より大きな自由エネルギーを有する. したがって, 水との接触を防ぐよう, 溶媒内の両媒性分子の疎水性の尾部が内側に, 親水性の頭部を水に露出するように自然に集合し, 親水性の頭部が疎水性の尾部を挟んだサンドイッチ型の脂質二重膜を形成する. 個々のリン脂質分子が脂質二重膜の平面内で自由に拡散できることが確認されている. これは脂質二重膜の流動性と呼ばれている. 脂質二重膜の流動性により, 膜上に存在する様々なタンパク質はダイナミックに移動し, 細胞膜としての機能を果たす(図 1.3(b)).

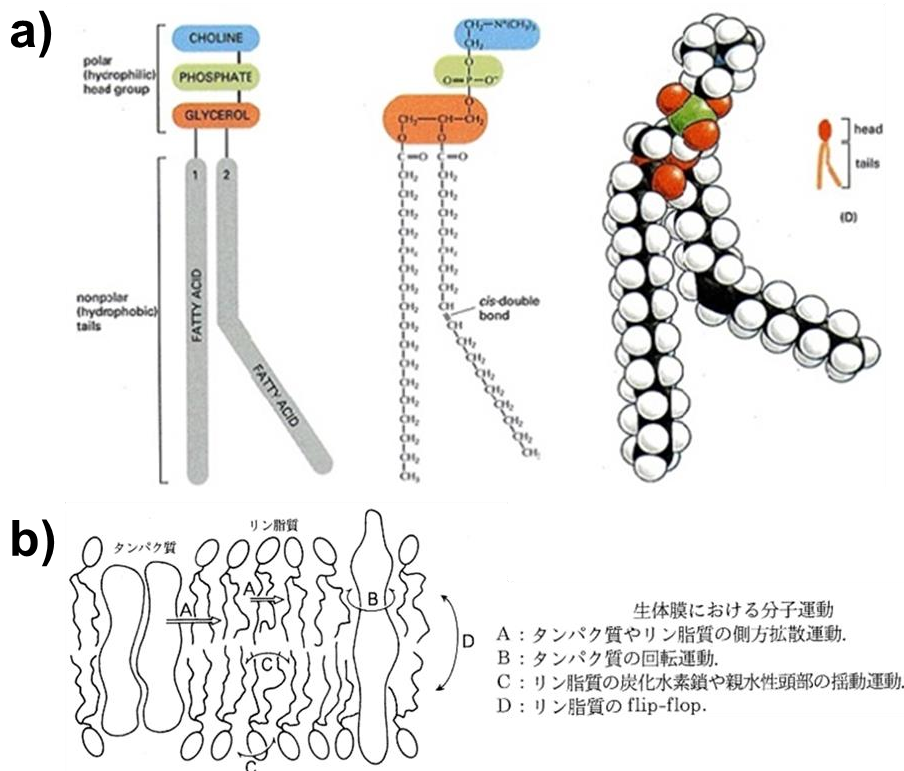


図 1.3 脂質二重膜の構造と機能. (a)リン脂質分子の構造[Alberts 2014]. (b) 脂質二重膜における分子運動[荒磯恒久 1994 (一部改編)].

1.2.3 人工脂質二重膜

人工の脂質二重膜は、球殻構造を有するベシクルと、平面状構造を有する支持型平面脂質二重膜の2種類に大別できる。本節では、それぞれについて概説する。

ベシクル

ベシクルは、脂質二重膜が閉じてできた球状構造物である。1枚膜からなるベシクルを *unilamellar vesicle* と呼び、サイズによってさらに分類できる。直径が 100 nm 以下の小さなものは *small unilamellar vesicle (SUV)*, 100~1000 nm の大きなベシクルは *large unilamellar vesicle (LUV)*, 1000 nm 以上の巨大なものは *giant unilamellar vesicle (GUV)* という。さらに多層の脂質二重膜からなる *multilamellar vesicle (MLV)* や LUV 内に複数の SUV が包まれる構造を取る *multivesicular vesicle (MVV)* も存在する (図 1.4(a))。サイズで分類する理由は、ベシクルの安定性、膜の曲率、膜を介した輸送速度などの性質がサイズに依存するためである [Jesorka 2008; Miao 1994]。ベシクルの用途もサイズに応じて人工細胞やドラッグデリバリーシステムなど多岐にわたっており、とりわけ人工細胞分野においては、生細胞とサイズが近いことから GUV を用いた研究開発が主流である [Robinson 2021; Smith 2022]。しかし、GUV は細胞膜を支持する細胞骨格構造を有していないため、機械的安定性が低く、複雑な環境下で形状を維持できない問題点がある。

支持型平面脂質二重膜

支持型平面脂質二重膜は、固体基板表面に吸着した脂質二重膜であり、英文の多くの文献では *supported lipid bilayer (SLB)* という呼称が用いられている [Castellana 2006; Tero 2012]。図 1.4(b) に SLB の模式図を示す。固体基板と脂質二重膜の間には厚み 1-2 nm の水層があり、膜の流動性を維持する。この水層が安定して存在するためには、リン脂質の頭部と基板表面の相互作用の微妙なバランスが重要である。固体基板は、一般的にガラス [Cremer 1999] やマイカ [Majd 2005] などの親水性を有する基板が用いられる。SLB は、その安定した性質から、原子間力顕微鏡 (AFM) や共焦点顕微鏡など各種分析手法との親和性が高い。そのため、膜と膜結合分子の相互作用 [Sackmann 1996; Lu 2020] や膜間の相互作用 [Hao 2018] などの膜生物物理学を研究するためのプラットフォームとして有用である。また近年では支持基板の表面エネルギーが脂質二重膜の変形を促進するという報告があり、支持基板・脂質二重膜間の相互作用と生命の起源との関係が注目されている [Gozen 2021]。しかし、脂質二重膜と支持基板の距離が近く、SLB 内にはほとんど物質を包埋できないため、人工細胞としての応用が困難である。

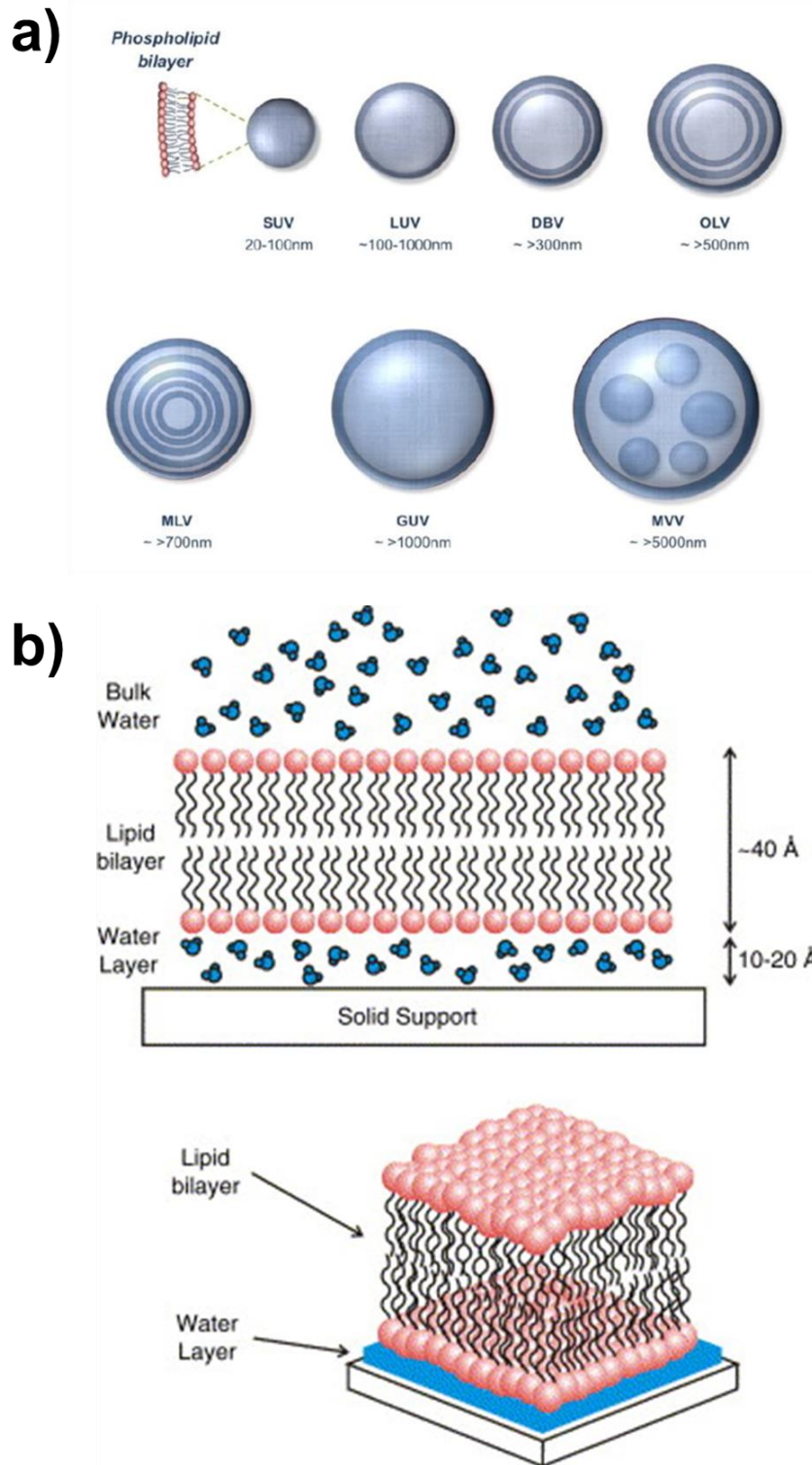


図 1.4 人工脂質二重膜の概略図. (a) ベシクルの概略図. サイズによってさらに分類でき, 1000 nm 以上の巨大なものは giant unilamellar vesicle (GUV)と呼ばれる. [Mozafari 2021]. (b) 支持型平面脂質二重膜(SLB)の概略図. 脂質二重膜が固体基板に支持され, 間に 1-2 nm の水層を挟む[Castellana 2006].

1.2.4 小孔支持型脂質二重膜

前述のように，人工細胞研究において GUV が広く使用されているが，機械的強度に課題がある．一方，SLB は機械的強度が高いものの，物質の包埋はできない．このような状況から，近年 GUV と SLB の利点を併せ持つ小孔支持型脂質二重膜が提案された [Kazakov 2017]．これは，マイクロやナノサイズの小孔を有する多孔質材料によって支持される脂質二重膜である．支持することで脂質二重膜の機械的強度が向上し，さらに小孔内に物質を封入することにより脂質二重膜内部で化学反応が可能である．以上のことから，小孔支持型脂質二重膜は，人工細胞に最も適している細胞モデルの一つとして考えられる．

小孔支持型脂質二重膜は，従来の脂質二重膜と同様，球状の小孔支持型 GUV と平面状の小孔支持型 SLB の 2 種類に分別できる．

小孔支持型 GUV

小孔支持型 GUV は，多孔質材料であるハイドロゲルを GUV に包埋することで作製できる (図 1.5(a))．ハイドロゲルは，内部に水溶液を含む 3 次元構造をもつ高分子物質である．小孔支持型 GUV に適するハイドロゲルとして，ポリアクリルアミドゲル [Helwa 2013]，DNA ゲル [Kurokawa 2017]，agarose ゲル [Katsuta 2019]などが挙げられる．特に，agarose ゲルは脂質二重膜との相互作用が少なく，汎用性の高い多孔質材料として大きな注目を集めている [Xu 1996] (図 1.5(b))．さらに，封入する agarose 溶液の濃度を調整することで，GUV の機械的安定性を簡単に制御できることも報告されている [Viallat 2004]．

小孔支持型 SLB

小孔支持型 SLB は，多孔質の支持基板上に脂質二重膜を人工的に形成したものである (図 1.5(c))．支持基板はシリコン系基板，ポリマー系基板の 2 種類ある．シリコン基板は集束イオンビーム描画や EB 描画などの MEMS 技術と高い親和性があるため，精度がコントロールされた SLB 形成に適している [Yamaura 2018]．しかし，基板の加工は大規模な装置を要求し，作製の時間的及び金銭的コストが大きい．他方，ポリカーボネート (PC) 基板をはじめとするポリマー系基板は，精度がシリコン系基板に劣るものの，比較的安値であるうえ，市販品として，孔径も 15 nm から 1200 nm まで幅広く入手できる利点がある [Aminipour 2017] (図 1.5(d))．

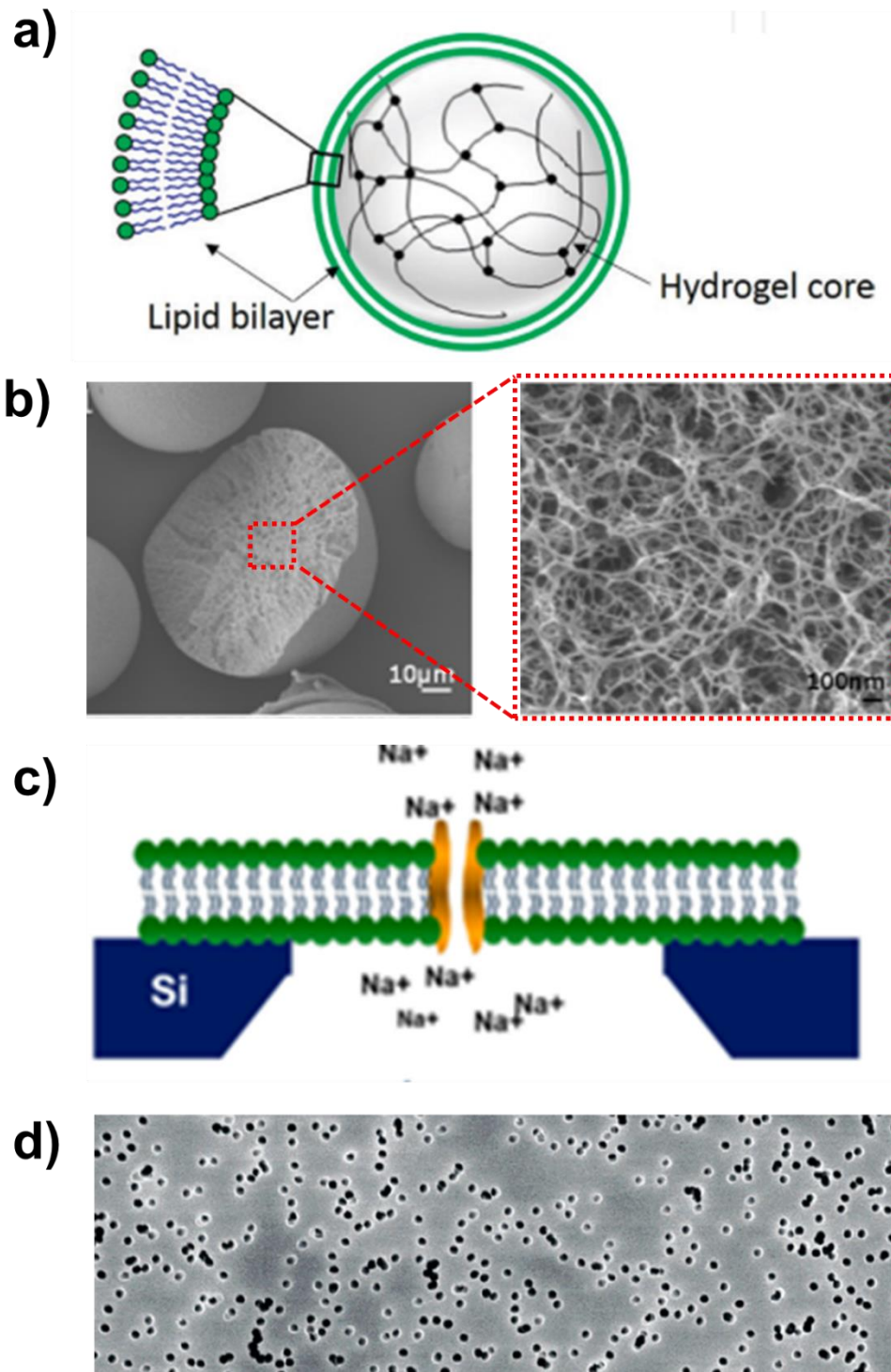


図 1.5 小孔支持型脂質二重膜の概略図. (a) 小孔支持型 GUV の概略図. 脂質二重膜内に水ゲルが内包されている[Kazakov 2017]. (b) agarose ゲルの電子顕微鏡写真[Nwekw 2017(一部改編)]. (c) 小孔支持型 SLB の概略図. 脂質二重膜が小孔上に形成される[Khan 2017]. (d) ポリカーボネート基板の電子顕微鏡写真[Favero 2005].

小孔支持型 GUV と小孔支持型 SLB の比較

表 1-1 に小孔支持型 GUV と小孔支持型 SLB のそれぞれの利点、欠点とその応用先を示す。小孔支持型 GUV は、生細胞と構造が近いことから細胞の分裂などの細胞機能を再現可能であり、さらに工学的手法を組み合わせると液中の指定場所に自由に運搬でき組織化しやすい[Li 2020]ため、細胞モデルとして有用である。一方、小孔支持型 SLB は細胞分裂などの機能を再現できないものの、均一のサイズを有するものを一度に大量形成可能であり、座標も特定できる点から、人工細胞リアクターとしての応用が期待できる[Izri 2019]。したがって、人工細胞のユーザーは目的や用途に応じて両者を使い分ける必要がある。

表 1-1 小孔支持型 GUV と小孔支持型 SLB の比較

	利点	欠点	応用先
小孔支持型 GUV	<ul style="list-style-type: none">・生細胞に近い機能・組織化が可能	<ul style="list-style-type: none">・サイズが不均一・特定ができない	細胞モデル
小孔支持型 SLB	<ul style="list-style-type: none">・サイズが均一・特定が可能	<ul style="list-style-type: none">・細胞分裂などの機能を再現できない・組織化が困難	人工細胞リアクター

1.2.5 小孔支持型脂質二重膜の形成法とその問題点

小孔支持型 GUV と小孔支持型 SLB のそれぞれの形成法と、共通の問題点を下記に示す。

従来製法

小孔支持型 GUV の形成は、water-in-oil (w/o) エマルション法で行われる。w/o エマルション法では、まず水溶液をリン脂質が溶解させた有機溶媒内に分散させ、w/o エマルションを作製する。親水性相互作用により、親水性の頭部を持つリン脂質が液滴の周りに凝集し、脂質一重膜を形成する。次に、エマルションを別の水溶液の上に重ねて遠心力を印加することで、有機溶媒-水の界面を通過させる。すると、エマルション周辺の脂質一重膜と有機溶媒-水界面の脂質一重膜がお互い結合し、GUV が形成される(図 1.6(a))。w/o エマルション法は、GUV の形成率が高く、さらにサンプルを GUV 内に包埋することが容易などの利点がある。

小孔支持型 SLB の形成は、Langmuir-Blodgett 法がよく用いられる。Langmuir-Blodgett 法では、水槽を緩衝液で満たし、有機溶媒で溶かしたリン脂質を水面上に滴下する。有機溶媒が蒸発すると、リン脂質がバラバラになって水面で単分子層を形成する。形成したリン脂質分子層に対して、固体基板を液中から大気中へ、さらに大気中から液中へ往復させて転写することで、固体基板表面に SLB を転写する (図 1.6 (b))。高い相転移温度を有する 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) など、SLB 形成が比較的困難とされる脂質については、Langmuir-Blodgett 法で SLB が得られることが報告されている[Tamm 1985]。

問題点

上記の w/o エマルション法と Langmuir-Blodgett 法は小孔支持型脂質二重膜の形成法として定着したものの、形成した脂質二重膜の安定性に大きな課題が残っている。これは、脂質二重膜内での有機溶媒の残留に起因している。例えば、Funakoshi らや Kamiya らは有機溶媒が含まれている GUV が、分裂することを報告している (図 1.6(c)) [Funakoshi 2007; Kamiya 2016]。Tarun らは、残留した有機溶媒が脂質二重膜の流動性に与える影響について論述している (図 1.6(d)) [Tarun 2018]。また、膜タンパク質の機能が脂質二重膜の厚み[Marsh 2007]や疎水性[Cicuta 2007]などに影響され、残留した有機溶媒が膜タンパク質を変性させる恐れがある。したがって、現状の有機溶媒が残留する作製手法は、高機能な人工細胞の実現に最適な手法とはいえない。

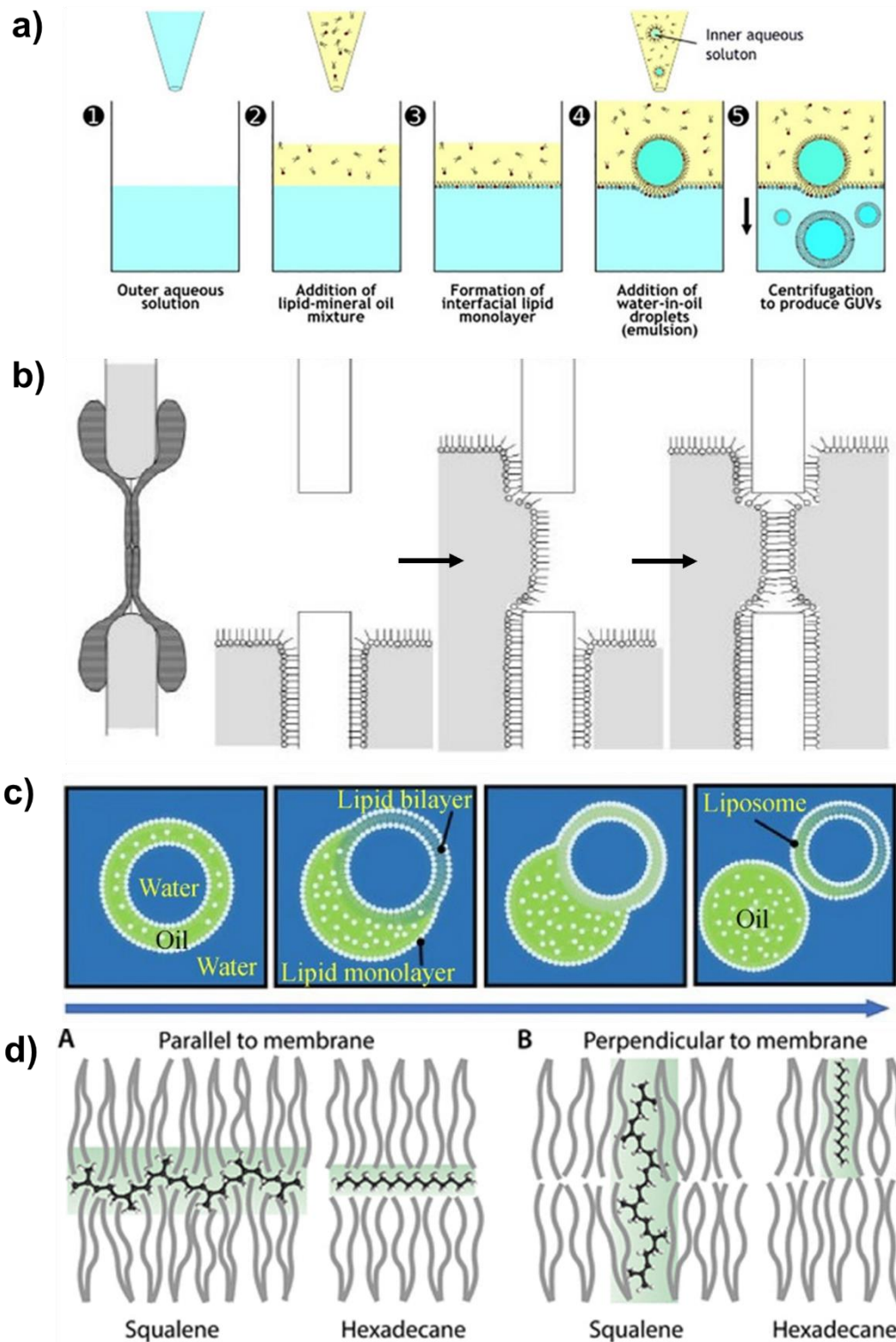


図 1.6 小孔支持型脂質二重膜の作製手法. (a) water-in-oil (w/o) エマルジョン法 [Moga 2019]. (b) Langmuir-Blodgett 法 [Guidelli 2011]. (c) 残留した有機溶媒が GUV の分裂を促進 [Song 2021]. (d) 有機溶媒と脂質二重膜間の相互作用の模式図 [Tarun 2018].

1.3 本研究の目的

前節までに、人工細胞研究において脂質二重膜の形成時のオイル残留が大きな課題であることを述べた。このような現状を鑑み、有機溶媒が完全に除去されている条件下で、有機溶媒の残らないオイルフリーの小孔支持型脂質二重膜の形成手法の開発を本研究の目的とする。目的達成のため、従来のオイルフリーのGUVとSLBそれぞれの形成手法を、多孔質材料上で膜が形成できるように適用する。また、蛍光顕微鏡や原子間力顕微鏡（AFM）を用いて、形成した脂質二重膜の性質を評価し、提案手法の有効性を検証する。さらに、形成した脂質二重膜に膜タンパク質を導入し、人工細胞としての運用可能かを検証する（図1.7）。

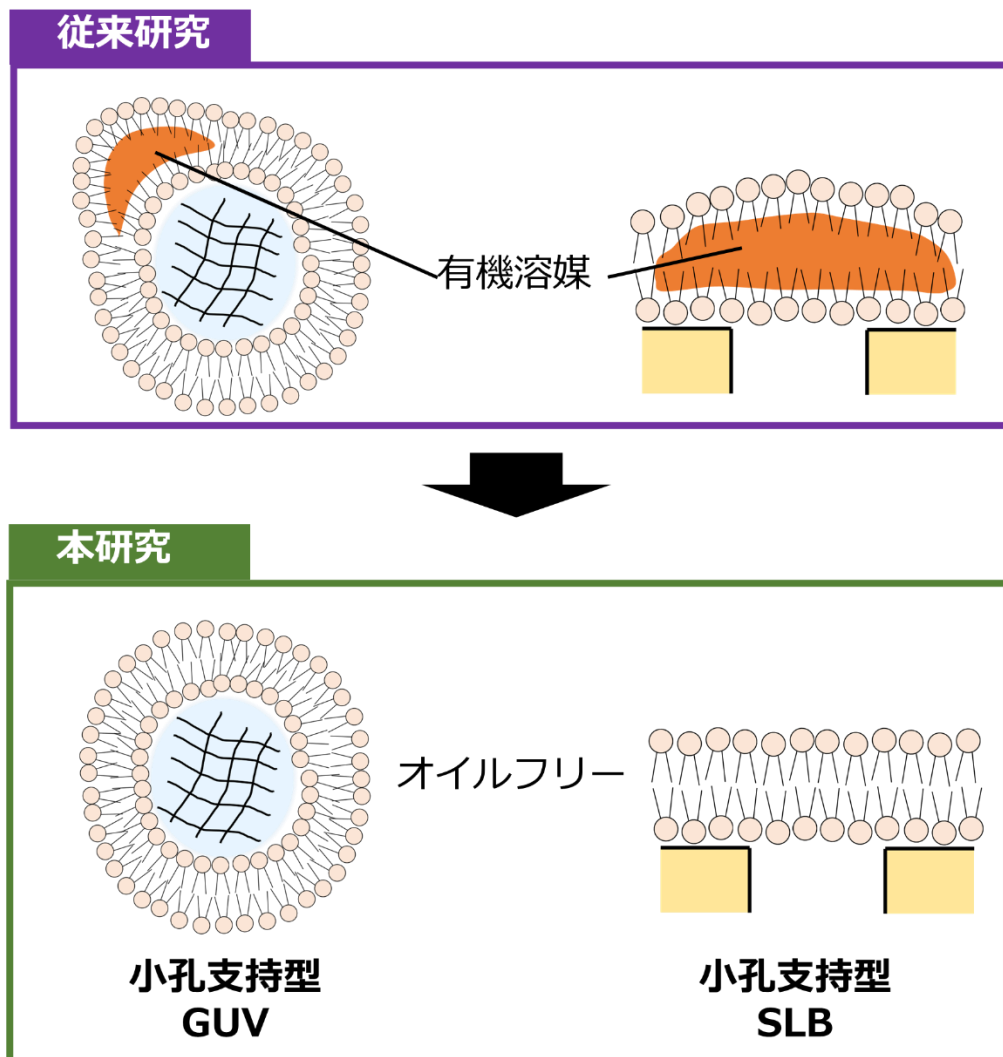


図 1.7 本研究の目的

1.4 本論文の構成

本論文の構成は以下の通りである。

第1章「序論」では、人工細胞の定義とその応用について述べる。次に人工細胞の構成要素である脂質二重膜の性質について触れ、従来の2種類の脂質二重膜であるGUVとSLBのそれぞれの利点と欠点について説明する。さらに、GUVとSLB両者の利点を兼ね備えた小孔支持型脂質二重膜について述べ、その性能向上には「有機溶媒が残留」という課題を解決する必要があることを示す。

第2章「小孔支持型GUVの形成手法」では、従来のオイルフリーのGUVの形成手法を比較し、小孔支持型GUVの形成に適した手法としてポリマーフィルム水和法を選出する。ポリマーフィルム水和法を小孔支持型GUV形成用に改良し、GUVの収率と内部の多孔質材料の包埋率が最大化できるように設計する。また、ラットの赤血球から膜タンパク質を精製し、作製したGUVに導入する手法について述べる。

第3章「形成した小孔支持型GUVの評価」では、静置水和法で形成した小孔支持型GUVの収率、適応できる脂質の種類、サイズ、膜層数、多孔質材料の包埋率、機械的強度、寿命、膜上の膜タンパク質機能、についての評価し、人工細胞として有用であることを示す。

第4章「小孔支持型SLBの形成手法」では、オイルフリーの小孔支持型SLBの形成手法として、他の手法に対して自発展開法の利点を明示し、PC基板上で自発展開法を行うことを提案する。また、蛍光顕微鏡やAFMを用いた小孔支持型SLBの性質解析方法について述べる。

第5章「形成した小孔支持型SLBの評価」では、自発展開法で形成した小孔支持型SLBの展開速度、流動性、小孔上の脂質二重膜の機械特性について評価し、手法の有用性を示す。

第6章「結論」では、各章で得られた知見を整理し、本研究で新しく得られた知見をまとめる。さらに、今後の課題と本研究がどのように社会に貢献できるか、具体的なアイデアを述べる。

第2章 小孔支持型 GUV の形成手法

2.1 オイルフリーの GUV 形成手法

オイルフリーの GUV の形成法は以下の3種類が挙げられる。

静置水和法

静置水和法は、有機溶媒（クロロホルム）で溶解させたリン脂質をガラスなどの基板上に滴下したのちに、有機溶媒を真空環境で除去することで、堆積した脂質二重膜のフィルムを作製する。この脂質フィルムに水や水溶液を添加し静置すると、脂質二重膜内外に浸透圧差が働き、脂質二重膜の一部が膨潤すると同時に、球状に閉じることで GUV が形成される(図 2.1(a)). 手法の大きな利点として、水和時にリン脂質分子の酸化がほとんど起きない点が挙げられる[Reeves 1969]. しかし、主なドライビングフォースが浸透圧のみであるため、GUV の形成までに数日かかる場合がある[Rodriguez 2005]. また実験手法自体は簡易ではあるが、堆積した脂質フィルムの膜厚や水溶液内のイオン強度などの条件を精緻に制御しないと、MLV を生成することになる[Stein 2017].

Electroformation 法

Electroformation 法は、静置水和法で作製した脂質フィルムの水和時に、電場を印加することで GUV の形成を促進する手法である(図 2.1(b)). これは、リン脂質分子間の静電相互作用や脂質二重膜の表面張力が電場を印加することで変化するためとされている[Dimitrov 1987]. また直流電場と交流電場のいずれにおいても GUV の生成が可能とされているが、交流電場下では電気浸透がより顕著であるため、GUV の形成率がさらに向上する[Dimitrov 1987]. 通常の静置水和法に比べて操作が容易であることや、高い確率で GUV が生成されることが大きな利点とされている。一方、負電荷を有するホスファチジルセリン(PS)などの脂質使用した場合や水溶液内にイオンが含まれている場合、GUV の生成率が低下する点が課題である[Walde 2010].

ポリマーフィルム水和法

ポリマーフィルム水和法では、乾燥した agarose やポリビニルアルコール(PVA)フィルム上で静置水和法を行う[Horger 2009; Weinberger 2013]. ポリマーフィルムは水溶液の脂質二重膜間への流入を促進するため、1時間の短時間だけで GUV を形成できる(図 2.1(c)). また、electroformation 法より幅広い種類の脂質分子に対応でき、さらに生理食塩水のような高いイオン濃度を持つ溶液内でも GUV の形成が可能である[Stein 2017].

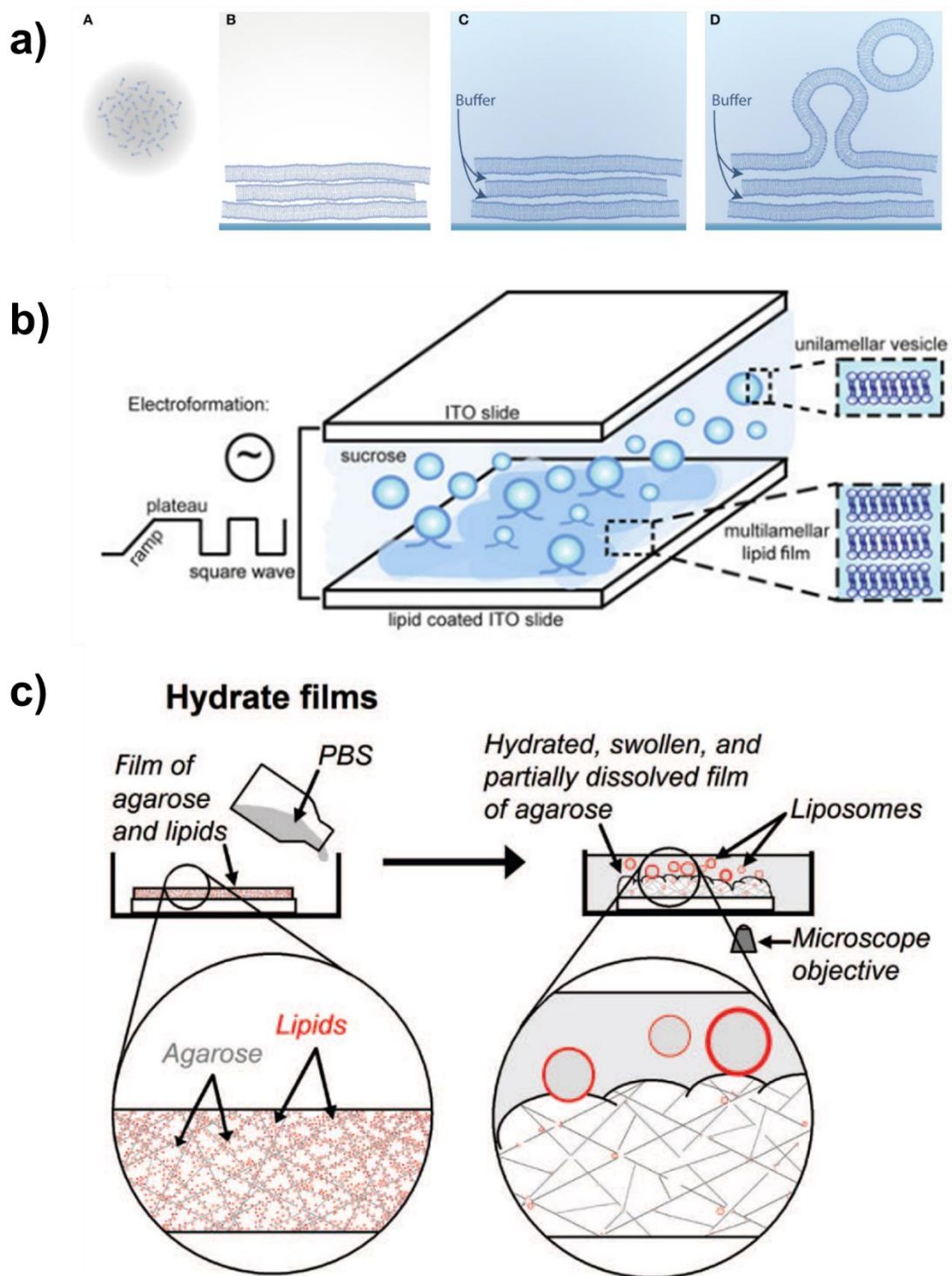


図 2.1 オイルフリーの GUUV 形成法. (a) 静置水和法 [Stein 2017]. (b) Electroformation 法 [Schmid 2017]. (c) ポリマーフィルム水和法 [Horger 2019].

各手法の比較

表 2-1 に、各手法の原理・特徴、および利点・欠点についてまとめた。静置水和法は作製に数日を要することや脂質フィルムの細かなコントロールが必要であることから、簡便な手法とは言えない。Electroformation 法は、大量に GUV を形成できるが、リン脂質組成や水溶液内のイオン濃度によっては収率が大きく下がり、汎用性に課題がある。一方、ポリマーフィルム水和法は、短時間で生理条件の塩濃度でも GUV の形成が可能であると報告されている。以上より、簡便性と汎用性の両方に優れている手法は、ポリマーフィルム水和法である。したがって、本研究ではポリマーフィルム水和法を改良し、小孔支持型 GUV の作製に適用する。

表 2-1 GUV 作製手法とその利点・欠点

手法	原理・特徴	利点	欠点
静置水和法	脂質フィルムを水や水溶液に添加し静置すると脂質二重膜内外に浸透圧差が働き、脂質二重膜の一部が膨潤すると同時に球状に閉じることで、GUV を形成できる。	脂質の制限が緩い 溶液のイオン濃度制限なし。	形成時間が長い MLV が混在 脂質フィルムのコントロールが必要。
Electroformation 法	静置水和法で作製した脂質フィルムの水和時に、電場を印加することで GUV の形成を促進させる。	操作が容易 短時間 ほぼ GUV のみ形成。	脂質の制限あり 溶液のイオン濃度制限あり。
ポリマーフィルム水和法	ガラス基板の代わりに乾燥した agarose フィルムやポリビニルアルコール(PVA) フィルム上で静置水和法を行う。	短時間 ほぼ GUV のみ形成 脂質の制限なし 溶液のイオン濃度制限なし。	ポリマーフィルムの作製が必要。

2.2 水和時の脂質二重膜のエネルギーバランス

前述のように、オイルフリーのGUV形成手法では、あらかじめ基板上に堆積した脂質フィルムを作製する必要がある。平面の脂質二重膜から球状のGUVが形成される理由は、水和時に脂質二重膜を曲げるために必要な曲げエネルギー(E_{bend})と脂質二重膜とバッファの境界に作用する界面エネルギー(E_{line})のバランス関係に起因する[Antonietti 2003].

脂質フィルムを円盤状だと仮定すると、脂質二重膜とバッファの境界に働く界面エネルギーは下記の通りである (図 2.2).

$$E_{line} = 2\pi R_D \gamma \quad (2.1)$$

ここで R_D は円盤の半径、 γ は線張力 (5-10 pN [Karatekin 2003]) である。一方脂質二重膜を曲げるためのエネルギーは

$$E_{bend} = 8\pi \kappa \quad (2.2)$$

κ は脂質二重膜の曲げ係数 (4-8 *10⁻²⁰J [Gozen 2013]) である。

ベシクルの形成は、 E_{line} が E_{bend} より大きい時にのみ起きる現象であり、形成に必要な脂質二重膜フィルムの最小半径は下記のように算出できる。

$$\frac{E_{bend}}{E_{edge}} < 1 \Rightarrow r > \frac{4\kappa}{\gamma} \quad (2.3)$$

上記の式から、ベシクルの形成に必要な脂質二重膜フィルムの最小半径は数ナノメートルであり、リン脂質分子の長さに相当する。したがって、水和時に脂質二重膜はフィルム状からよりエネルギー的に安定なベシクル構造に変化すると考えられる。

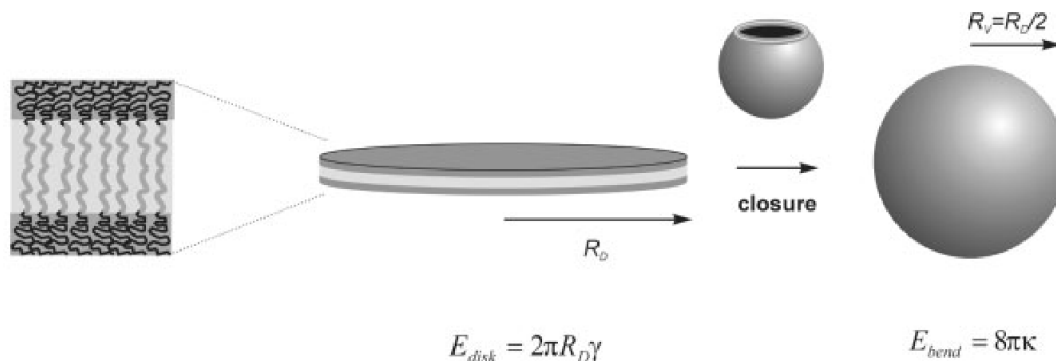


図 2.2 脂質フィルムからベシクルが形成された時の概要図[Antonietti 2003].

2.3 小孔支持型 GUV の作製

本実験で用いた試薬とその製造元を表 2-2 に示す.

表 2-2 本実験で使用した試薬

薬品	製造元
2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC)	Tokyo Chemical Industry
1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-PC (POPC)	Cayman Chemical Company
1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine (DOPS)	Avanti
Cholesterol	Sigma
Texas Red 1,2-Dihexadecanoyl-sn-Glycero-3- Phosphoethanolamine, Triethylammonium Salt (Texas Red-DHPE)	Thermo Fisher
Agarose LM	Nakalai Tesque
Poly(vinyl alcohol) (PVA; MW=145 kDa, hydrolysis \geq 98%)	Sigma
Fluoresceinisothiocyanate isomer-I (FITC)	Dojindo
Calcein	Dojindo
PBS(-)	FUJIFILM Wako
Sucrose	FUJIFILM Wako
Glucose	FUJIFILM Wako

ポリマーフィルム水和法による小孔支持型 GUV 形成手順を図 2.3 に示す。

実験では、200 μL の 4% (w/v) agarose LM を、回転速度 1200 rpm、回転時間 120 秒間でガラス表面にコーティングした。ホットプレート上で加熱し溶液内の水分を蒸発させることでポリマーフィルムを作製した。その後、ポリマーフィルム上に 10 μL の 4 mg/mL 脂質溶液を滴下した。提案手法の汎用性を検証するため脂質は(1) DOPC, (2) 85% DOPC, 15% DOPS, (3) 70% DOPC, 30 % cholesterol の 3 種類を使用した (すべて mol%)。また、形成した GUV を可視化するため脂質二重膜を 0.5% Texas red-DHPE (Ex:596 nm; Em:615 nm) で標識した。

GUV 形成は、脂質フィルムの厚さが適切であることが求められる [Estes 2005]。これまでのプロトコルでは、脂質フィルムの厚さのコントロールに針 [Horger 2009] やスピンドルコーター [Tsai 2011] が用いられ、脂質フィルムの厚さを均一化することが推奨されてきた。本研究では当初、従来のプロトコルに従い均一な脂質フィルムで実験を行ったが、GUV の収量が低くごく僅かしか収穫できなかった。そこで、厚さが不均一な脂質膜がより小孔支持型 GUV の形成に適することを見いだした。実験では、まず針を使って脂質溶液を均一に広げ、その後針先端で脂質フィルムに傷を付けて不均一にした (図 2.3 (a))。サンプルを真空中で 30 分間乾燥させ、有機溶媒であるクロロホルムを蒸発させた。乾燥後、カバーガラス上に PDMS (ポリジメチルシロキサン) チャンバーを置き、200 μL の水和バッファーで満たした (図 2.3 (b))。水和バッファーとして 1% (w/v) agarose, 200 mM sucrose 水溶液を使用した。水和は、ポリマーフィルムの融解温度以下かつ 1% agarose LM 溶液のゲル化温度以上である 35°C で 1 時間行った。その後、ピペットで形成した GUV をフィルムから剥離収穫し、200 mM glucose 水溶液に注入した。

GUV のサイズと脂質二重膜の層数を評価するため、横河電機製の共焦点スキャナユニット CSU-X1 と Bitran 製の冷却 Charge coupled device (CCD) カメラ BU-61M を搭載した倒立顕微鏡 (Olympus, IX70) で GUV の撮影を行い、16 bit の画像を取得した。

agarose の包埋率を評価するために、先行研究を参考に agarose の蛍光標識を行った [Horger 2009]。まず、30 μL の 1% agarose 溶液と 125 μL の 10mg/mL FITC-I の DMSO を混合し、50 °C で 3 時間反応させた。その後、Slide-A-Lyzer 10K dialysis cassette (Thermo Fisher, USA) を用いて純水中で 1 週間透析を行った。透析後、2g の sucrose を溶解し、溶液の最終濃度を 1% agarose 200 mM sucrose とした。FITC で標識した agarose を用いて上記と同様な手順で GUV の形成と観察を行った。

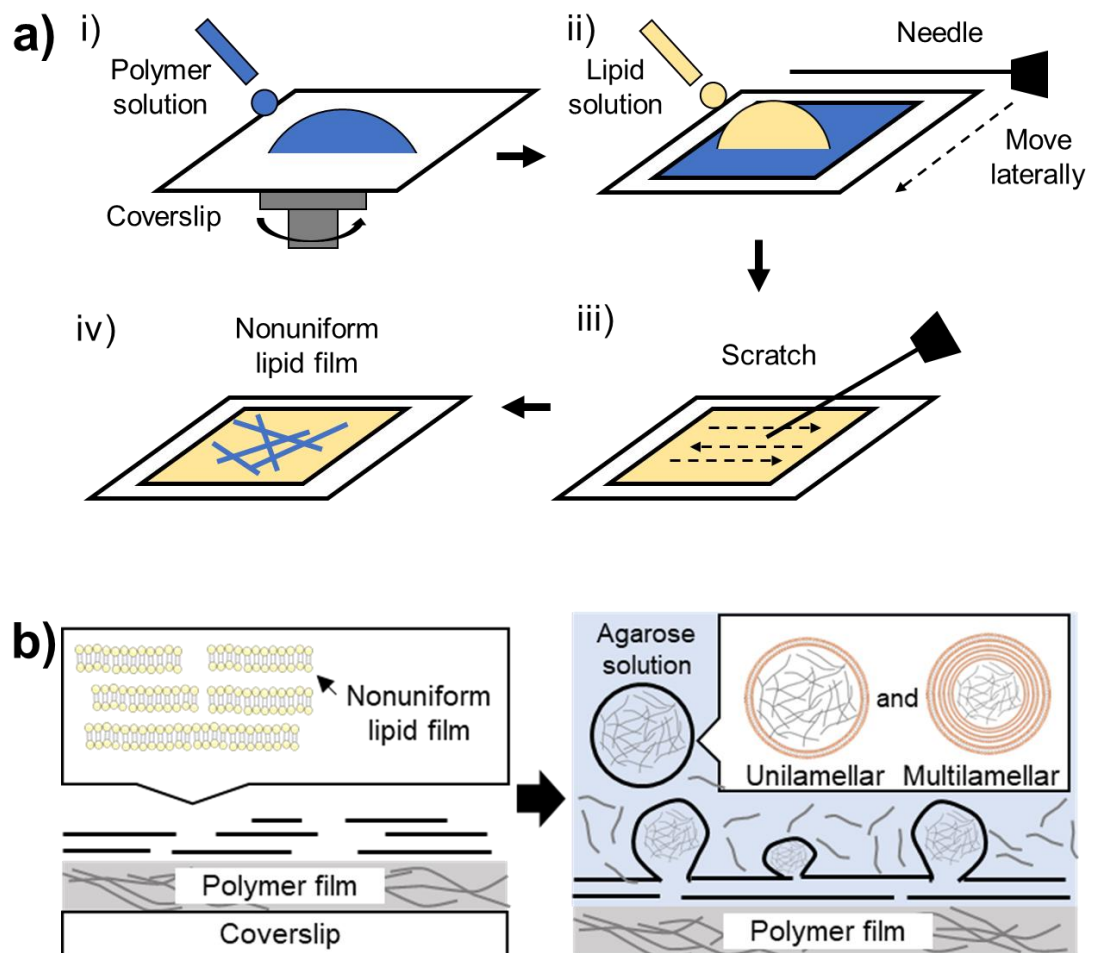


図 2.3 提案した小孔支持型 GUV 形成の模式図. (a) ポリマーフィルム上に 4mg/mL の脂質溶液を滴下し, 針で傷をつけることで不均一な厚さを有する脂質フィルムを作製した. (b) 1% (w) agarose, 200 mM sucrose 溶液で脂質フィルムを再水和. 乾燥した脂質フィルムを 1h 間水和した後, ピペットで形成した小孔支持型 GUV をポリマーフィルムから収穫した. 小孔支持型 GUV 内に, 脂質二重膜を複数層もつ MLV が混在する可能性がある.

2.4 小孔支持型 GUV の機械的強度の検証

小孔支持型 GUV の機械的強度は、Viallat らの報告に基づき、浸透圧試験で評価した [Viallat 2004]. 実験では、agarose を内包した DOPC GUV (50 μL) をカバーガラス上に滴下した後、50 μL の 1 M glucose 溶液を外部から静かに注入した. 外液の sucrose \cdot glucose の最終濃度は 600 mM であり、GUV 内部の sucrose 濃度(200 mM)より高いため、脂質二重膜の内外に浸透圧差が生じる. 注入直後から 30 分間の小孔支持型 GUV の形状変化を顕微鏡で観察した. 通常、小孔支持型 GUV は支持物のない GUV より、浸透圧差に強い耐性を示す (図 2.4) [Fujiwara 2014]. 本研究では、コントロールサンプルとして、agarose を内包していない GUV に対しても同様の試験を行った.

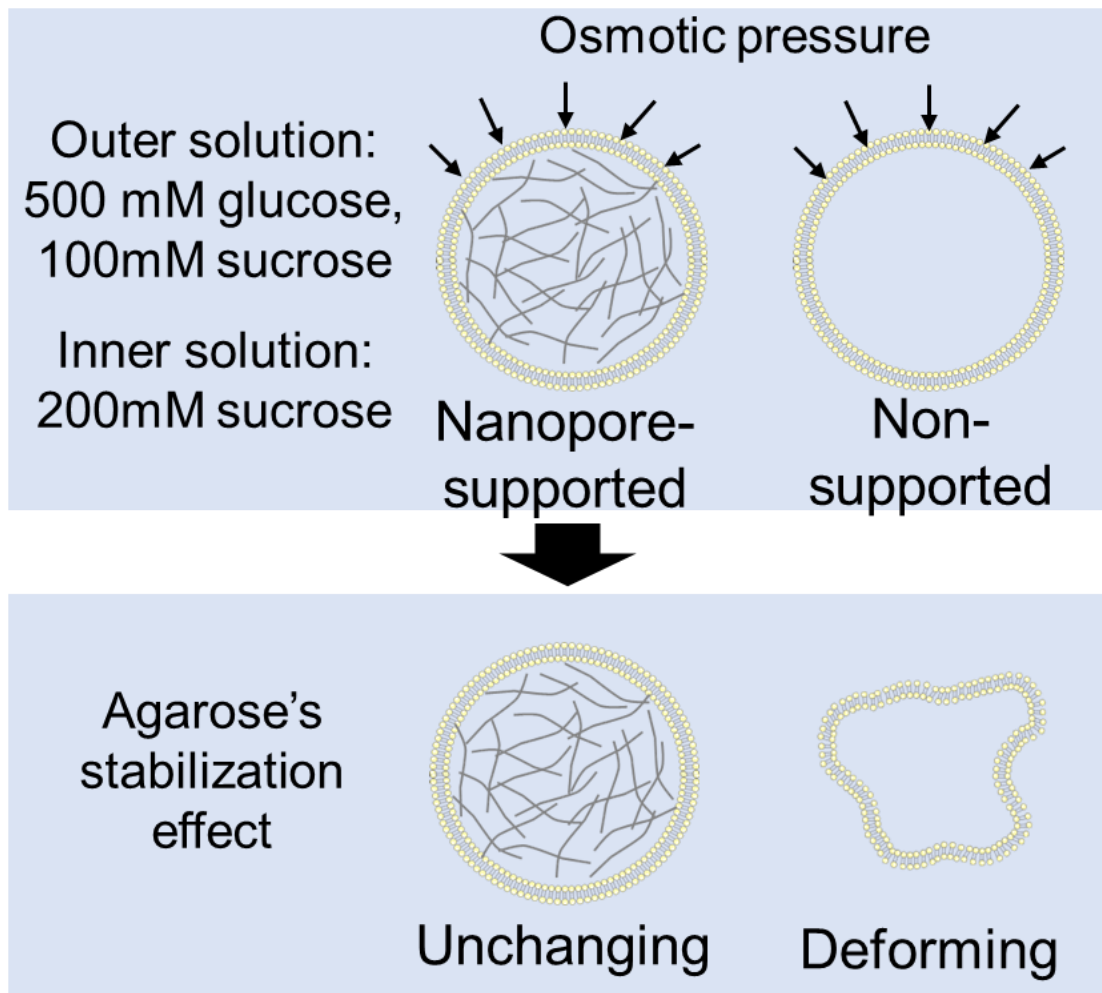


図 2.4 浸透圧試験の模式図. 小孔支持型 GUV は支持物のない GUV より浸透圧差に強い耐性を示す.

2.5 膜タンパク質の導入

膜タンパク質の精製は、Jang らの先行研究を基に行った[Jang 2019]. まず、ラットの全血を×1 PBS で洗浄した後、遠心操作（800 g, 5 分間）で血清と Buffy コートを除去し赤血球を回収した. 得られた赤血球は 1×PBS で洗浄した後、0.25×PBS に再懸濁することで 20 分間溶血させた. この後、遠心操作（800g, 5 分間）を 3 回行い、上清を除去し赤血球断片を得た. 赤血球断片液は、-80°C で保存した. 本手順は東京工業大学動物実験委員会の承認（D2019010）を受けている.

赤血球断片をポリマーフィルム内に含ませることで、小孔支持型 GUV 形成時に赤血球断片が脂質二重膜と融合し、膜タンパク質が導入される（図 2.5(a)）[Horger 2015]. 実験では、10 μL の赤血球断片液を 70 μL の 4%(w/v) agarose LM と混合し、カバーガラス上に滴下し加熱することで乾燥させた（37°C, 40 分間）. その後、モル比 99.5 : 0.5 の 4 mg/mL DOPC および texas red-DHPE 溶液 10 μL をポリマーフィルム上に塗布し、真空中で 30 分間乾燥させ、有機溶媒であるクロロホルムを蒸発させた. サンプルを 200 μL の 1 % agarose, 200 mM sucrose 水溶液で 1 時間水和し、小孔支持型 GUV を形成した. GUV をピペットで収穫した後、8 μL の 1 mM calcein (Ex:490 nm; Em:515 nm) 溶液と混合し、24 時間にわたって観察を行った. 膜タンパク質が正常に機能することができれば、calcein が脂質二重膜の外部から内部へ侵入できる（図 2.5(b)）[Mikeli 2013].

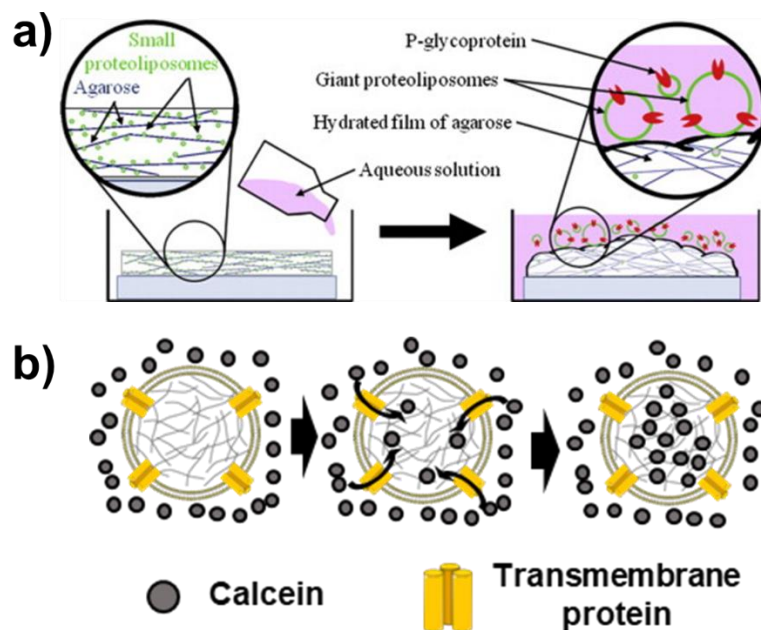


図 2.5 (a)膜タンパク質導入の模式図. ポリマーフィルム上に含まれた赤血球破片が GUV と融合[Horger 2015]. (b)膜タンパク質が機能すれば、calcein が GUV 内に侵入.

2.6 画像解析

画像解析は ImageJ を用いて行った. 形成した小孔支持型 GUV の脂質二重膜の層数を確認するために, 撮影を行い小孔支持型 GUV の輝度値を評価した. 各小孔支持型 GUV の直径方向に沿って線分を描画し, 線分上の輝度値の平均値を取得した. この輝度値は, 脂質二重膜の層数に比例する (図 2.6(a)). 先行研究を参考に, 小孔支持型 GUV の直径と輝度値のグラフをプロットした[Akashi 1996].

小孔支持型 GUV 内の agarose の包埋率の評価は, Tsai らの研究を基に行った[Tsai 2011]. まず小孔支持型 GUV 溶液を 200mM sucrose 溶液と混合し, 外側の agarose 溶液を希釈した. 希釈することで, 小孔支持型 GUV 内外の FITC 蛍光強度に差が生まれ, 内外の境界が判別できるようになる. この後, 写真撮影を行い, 取得した画像から小孔支持型 GUV 内部の 5×5 pixel 領域を Region of interest (ROI) として指定した. ROI 内の輝度値の平均値を I , agarose 原液の平均輝度値を I_0 , agarose の包埋率を I/I_0 と定義した (図 2.6(b)).

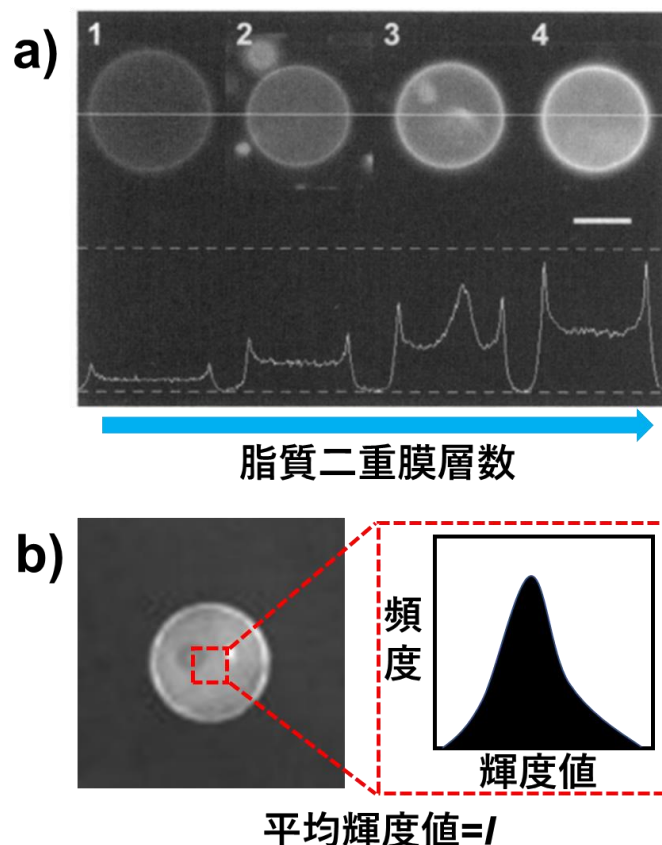


図 2.6 画像処理手法の概要. (a) 脂質二重膜の層数に比例して, GUV の輝度値が上昇. スケールバー : $25 \mu\text{m}$ [Akashi 1997]. (b) GUV 内部の 5×5 pixel 領域を ROI として指定し, ROI 内の輝度値の平均値 I を取得した .

2.7 本章のまとめ

以上のように第2章では、ポリマーフィルム水和法で小孔支持型 GUV の形成ができるように、従来手法の改良を提案した。すなわち、脂質フィルムに傷をつけて不均一化することで、小孔支持型 GUV の形成を促進するように設計した。その上、形成した小孔支持型 GUV の機械的強度を評価する浸透圧試験と、小孔支持型 GUV に膜タンパク質を導入する手法について説明した。さらに、小孔支持型 GUV の脂質二重膜層数と agarose 包埋率の評価手法について述べた。第3章ではここで提案した手法で形成した小孔支持型 GUV を評価した結果を示して、手法の有用性と汎用性を検証する。

第3章 形成した小孔支持型 GUV の評価

3.1 小孔支持型 GUV の形成効率

これまで、ポリマーフィルム水和法で GUV を形成するためのプロトコルは提案されているが、GUV 形成の正確なメカニズムについては未だ不明な点が多く [Rideu 2019], 小孔支持型 GUV の形成用のプロトコルはまだ定まっていない。そこで、本研究では小孔支持型 GUV の収率を向上させるため、従来プロトコルの改良を行った。前述のように、GUV 形成の成功には均一な脂質フィルムが必須であると考えられてきた。しかし本研究の結果から、不均一な脂質フィルムが小孔支持型 GUV の形成に有用であることがわかった。図 3.1(a)に、異なる脂質フィルム上での小孔支持型 GUV 形成の結果を示す。均一な DOPC 脂質フィルムと不均一な脂質フィルムをそれぞれ 1%の agarose を含む水溶液で 1 時間水和させたところ、均一な脂質フィルム上では小孔支持型 GUV がほとんど形成できなかったのに対して、不均一な脂質フィルム上では数千個の小孔支持型 GUV が観察できた。Stein らは、不均一な脂質フィルムが均一な脂質フィルムより、水溶液の脂質二重膜間へ流入する機会を増進させ GUV の形成を促進できると予測していたが、実験的に証明できなかった [Stein 2017]。本研究の結果から、不均一な脂質フィルムが、agarose を含む水溶液内での脂質二重膜の膨潤を促進し、小孔支持型 GUV 形成法として有用であることがわかった。

先行研究では、agarose フィルムを構成する agarose 分子が GUV 内にわずかに拡散し、小孔支持型 GUV 内の agarose の最終濃度に影響を及ぼす可能性があるとして報告している [Lira 2014]。そのため、ポリマーフィルムとして PVA を使用することが提案されている [Weinberger 2013]。本研究では、PVA ポリマー上での水和も行ったが、小孔支持型 GUV を観察できなかった (図 3.1(b))。これは、溶液の agarose 分子と PVA との相互作用が GUV 形成を阻害することが理由だと考えられる (図 3.1(c)) [Schmidt 2019; Yan 2021]。今後は、PVA 上で安定して小孔支持型 GUV を形成するための条件を探索する必要がある。

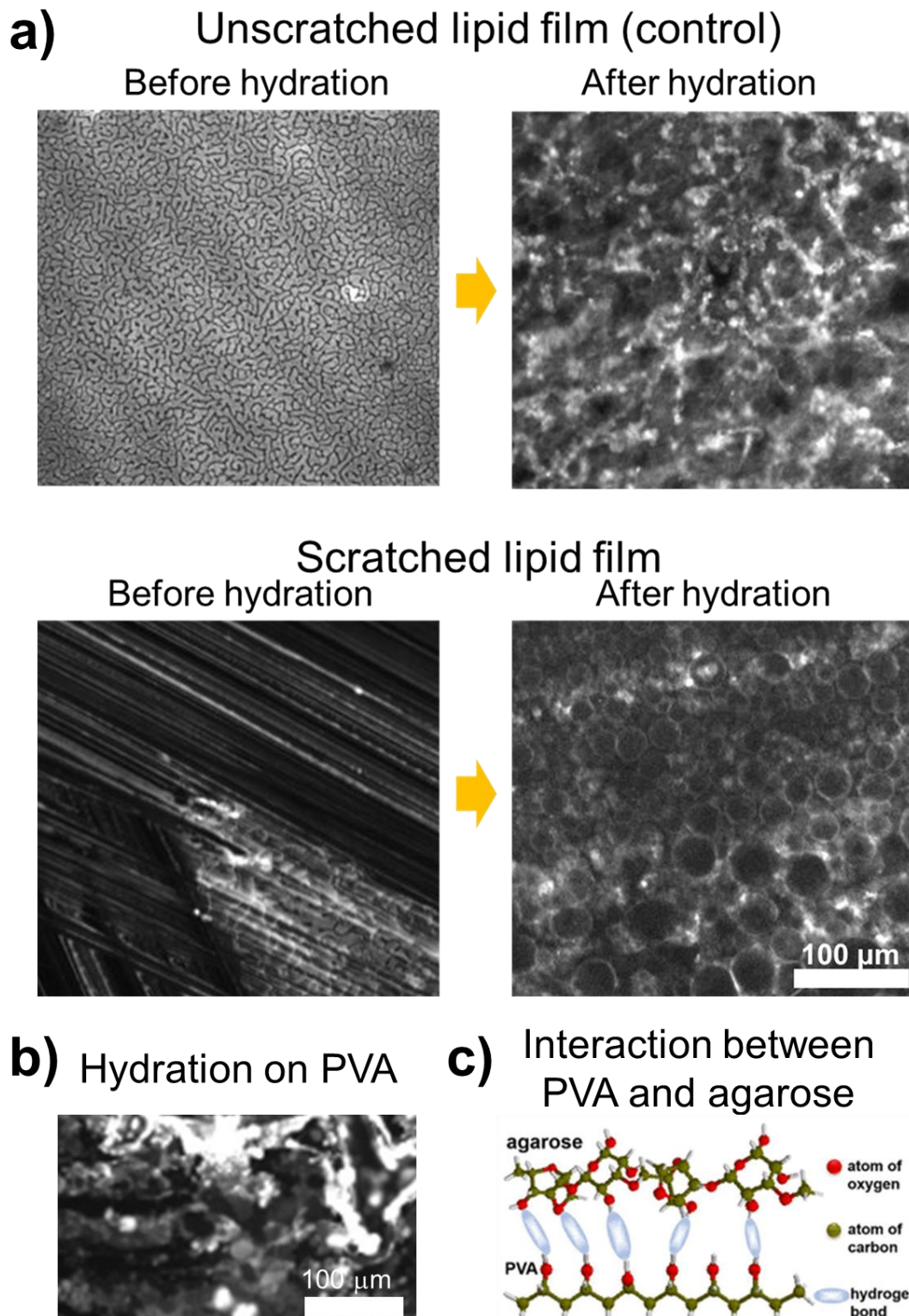


図 3.1 小孔支持型 GUV の形成. (a) 均一な脂質フィルムと不均一な脂質フィルム上でそれぞれ水和した結果. (b) PVA 上で水和を行った結果. (c) agarose と PVA の相互作用[Yan 2021].

3.2 小孔支持型 GUV のサイズと脂質二重膜層数

形成した小孔支持型 GUV のサイズと脂質二重膜の層数の評価は、ポリマーフィルムから小孔支持型 GUV を収穫した後、共焦点顕微鏡で取得した画像を解析することで行った。図 3.2(a)に収穫した小孔支持型 GUV の一例を示す。球形の小孔支持型 GUV が液中に分散していることから、ピペッティングが小孔支持型 GUV に与える機械的な損傷が極めて低いと考えられる。また、収穫した小孔支持型 GUV のサイズが不均一であることがわかった。さらに、収穫した小孔支持型 GUV のうち輝度値の高いものと低いものがあることが判明した。図 3.2(b)に、図 3.2(a)の白い点線上の輝度値を示す。輝度値の低い小孔支持型 GUV の脂質二重膜の輝度値は 1500[a.u.]前後であることに対して、輝度値の高い小孔支持型 GUV の輝度値は 3000[a.u.]である。このことから、輝度値の高いものは、脂質二重膜を二層有する MLV であると考えられる[Akashi 1996]。

図 3.2(c) に、McPhee らが報告した画像処理法を基に小孔支持型 GUV の輝度値を解析した結果を示す[McPhee 2013]。小孔支持型 GUV の輝度値は、平均値 440 [a.u.]、分散 200 [a.u.]の正規分布に従う。先行研究[Horger 2019]においても、ポリマーフィルム水合法で形成した GUV の輝度値が単峰性の正規分布に従っていることが報告されている。この点から、本研究で得られた小孔支持型 GUV のほとんどが単層の脂質二重膜を有し、MLV の割合は 1.9 %と極めて少量であることが分かる。図 3.2(d)に、収穫したすべての小孔支持型 GUV の直径とその輝度値を示す。小孔支持型 GUV の平均直径は $14.0 \pm 8.1 \mu\text{m}$ ($n=160$) である。生細胞の直径は $20 \mu\text{m}$ 前後であり、本手法で形成した小孔支持型 GUV とサイズが比較的に近い。また、小孔支持型 GUV の直径と輝度値の相関がみられず、MLV の発生に法則性がないことが考えられる。

以上のことから、本研究で提案した手法は細胞サイズの小孔支持型 GUV を一度に大量に形成することができる効率的な手法であるといえる。

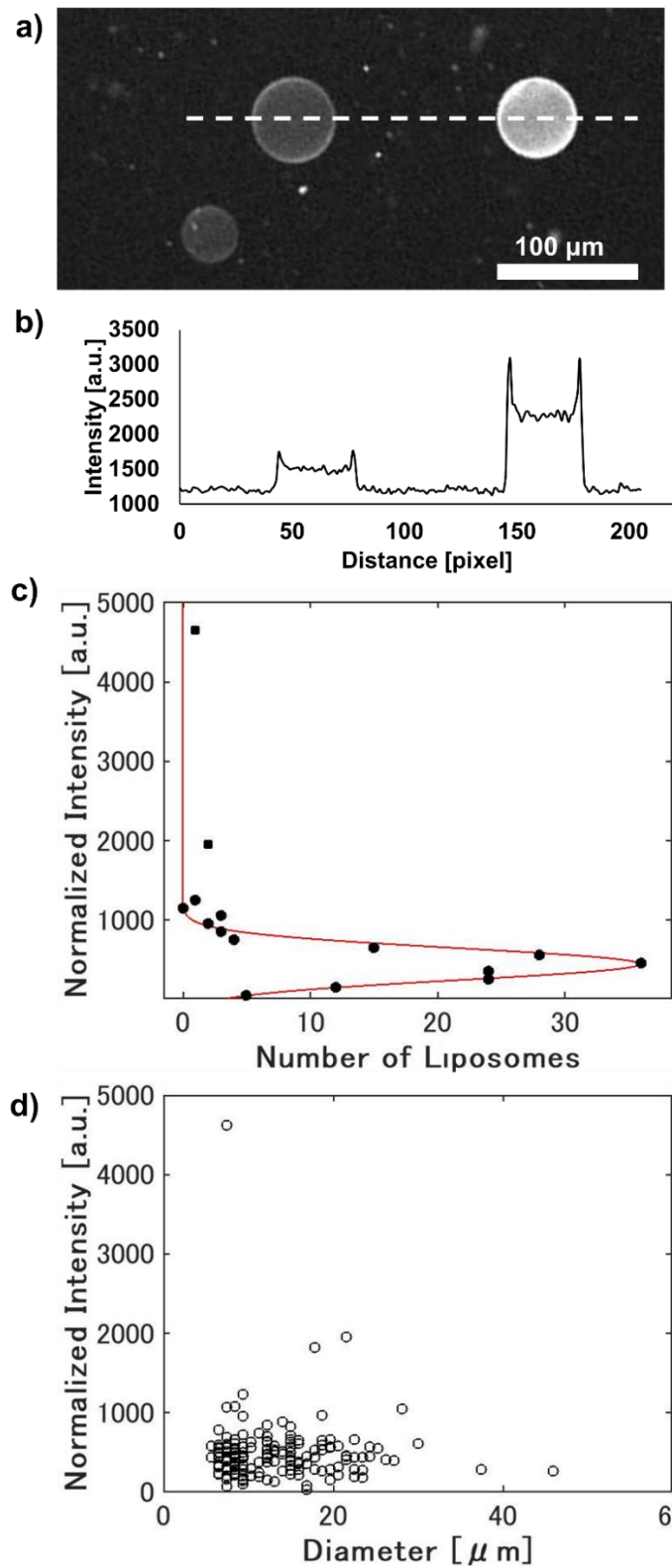


図 3.2 小孔支持型 GUV のサイズと脂質二重膜層数. (a) 収穫した小孔支持型 GUV の蛍光写真と(b) その輝度値情報. (c)小孔支持型 GUV の輝度値分布. (d)すべての小孔支持型 GUV の直径とその輝度値の関係.

3.3 小孔支持型 GUV 内の agarose の包埋率

小孔支持型 GUV 内の agarose 包埋率評価には、FITC で標識した agarose 溶液を用いており、FITC の輝度値から間接的に agarose の濃度を推定できる[Jolling 2017]. 図3.3(a)に、収穫した小孔支持型 GUV の蛍光画像を示す. 小孔支持型 GUV 外部の agarose 溶液が希釈されているため、内部がより高い FITC 輝度値を示す. 小孔支持型 GUV 内部の 5×5 pixel 領域を ROI として指定し、ROI 内の輝度値の平均値を I , agarose 原液の平均輝度値を I_0 , agarose の包埋率を I/I_0 と定義した. 図 3.3(b)に I/I_0 のヒストグラムを示す. I/I_0 の平均値は $77.9 \pm 42.8\%$ であり、60-70% にヒストグラムのピークが見られる. つまり、小孔支持型 GUV 内の agarose 濃度は、0.6-0.7% であると考えられる. また、 I/I_0 値が 100% を超える小孔支持型 GUV も観察できた. この現象のメカニズムは不明だが、先行研究においても、静置水和法で形成した GUV と MLV 内に包埋できる高分子である PEG20000 の濃度が、外液より高くなる場合があると報告されている[Dominak 2007].

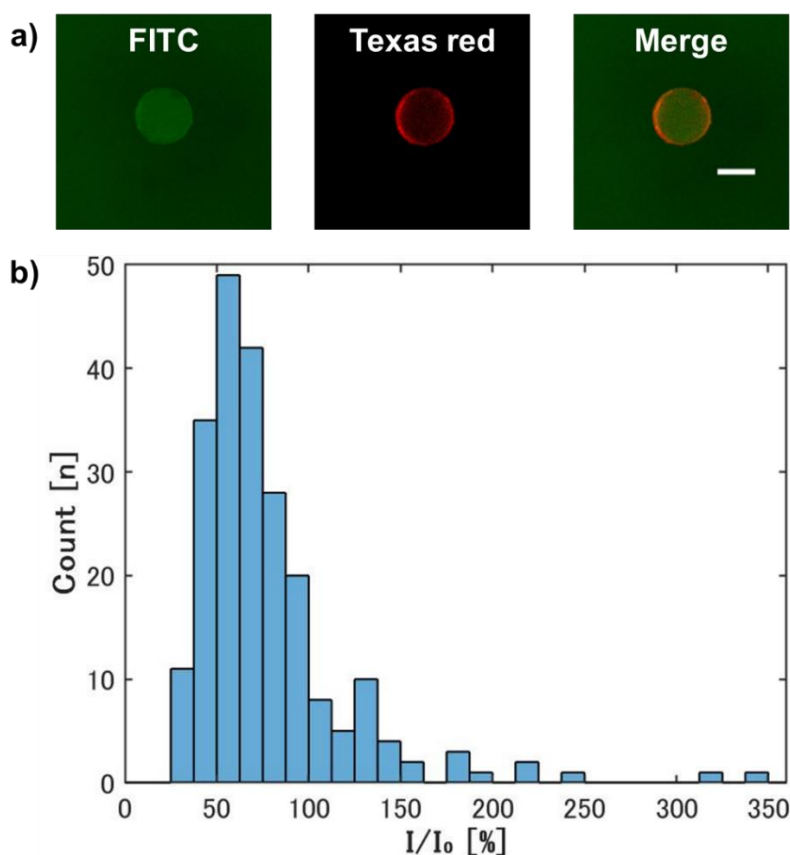


図 3.3 小孔支持型 GUV 内の agarose の包埋率. (a) FITC で標識された agarose 溶液内で形成した小孔支持型 GUV の蛍光画像. スケールバー: 50 μm . (b) 小孔支持型 GUV 内の agarose の包埋率を I/I_0 のヒストグラム ($n=223$).

3.4 小孔支持型 GUV の機械的強度の検証

小孔支持型 GUV の機械的強度の検証として、浸透圧試験を行った。前述のように、収穫した小孔支持型 GUV を 1 M glucose 溶液と混合することで内外の浸透圧差を引き起こす。agarose 包埋が脂質二重膜の機械的強度に与える影響を検証するため、小孔支持型 GUV と通常の支持物のない GUV それぞれの浸透圧試験に対する反応を比較した。

図 3.4(a) に、支持物のない GUV の浸透圧試験後の時間変化を示す。支持物のない GUV は、観察を開始した時点で既に大きく変形したことがわかった。GUV 内部で見られる高い輝度値をもつ物体は、脂質二重膜が収縮して生じた娘小胞である[Bernard 2002]。時間の経過とともに GUV が徐々に変形し、glucose 添加 15 分後の時点ではアメーバ状になった。15 分以降、脂質二重膜が再構成され、アメーバ状から球状に戻った。また、glucose を添加した 1 時間後に撮影した画像から、ほとんどの支持物のない GUV は浸透圧試験後に変形したことがわかった。

図 3.4(b)に小孔支持型 GUV の浸透圧試験の結果を示す。glucose 添加直後に、支持物のない GUV で見られたような娘小胞の生成は観察できなかった。また 30 分が経過したところ、脂質二重膜上に小さな凝集が形成されたものの、小孔支持型 GUV に大きな変形がみられず、球状を維持することができた。時間に伴って膜上で形成したリン脂質分子の凝集は、脂質二重膜の「出芽」と考えられ、GUV 内部に支持体が存在する時に見られる現象である[Fujiwara 2014]。この現象は、GUV 内に agarose が包埋されたことをさらに裏付けた。

図 3.4(c)は浸透圧試験前後の支持物のない GUV と小孔支持型 GUV の直径変化を示す。支持物のない GUV の浸透圧試験前の平均直径が $20.8 \pm 9.9 \mu\text{m}$ 、浸透圧試験後の平均直径が $8.5 \pm 4.7 \mu\text{m}$ であり、直径の減少が 48%であった ($n=103$)。一方、小孔支持型 GUV の浸透圧試験前の平均直径が $14.0 \pm 4.4 \mu\text{m}$ 、浸透圧試験後の平均直径が $10.8 \pm 5.4 \mu\text{m}$ であり、直径の減少は 39%であった ($n=169$)。液中の高分子鎖は、ゴムのように伸縮することができる[Flory 1985]。したがって、小孔支持型 GUV が支持物のない GUV より直径の減少が低い理由は、高いゴム弾性を有する agarose が脂質二重膜を支える役割として機能していると考えられる[Normand 2000]。上記の結果を踏まえて、小孔支持型 GUV はより高い機械的安定性を有するといえる。

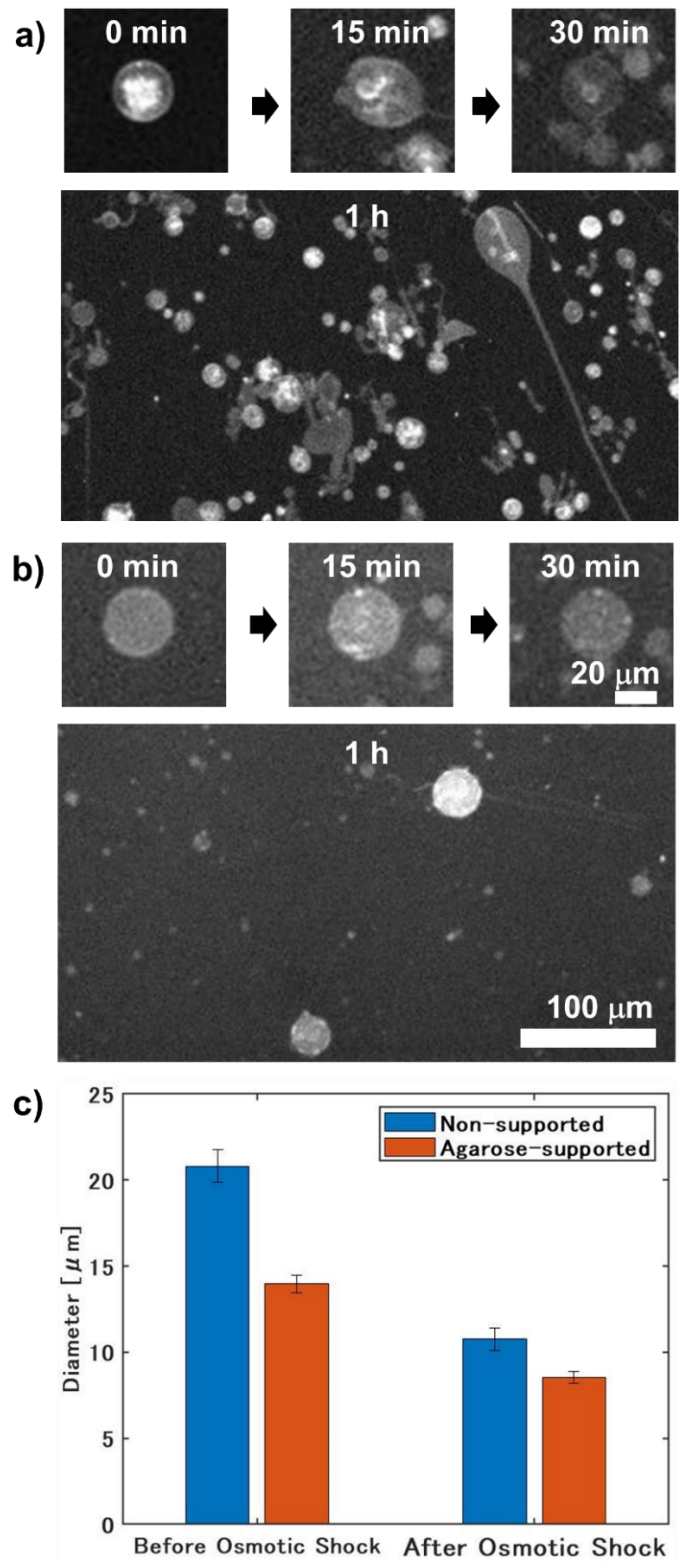


図 3.4 小孔支持型 GUV の機械的強度の検証. (a) 支持物のない GUV と (b) 小孔支持型 GUV の浸透圧試験の結果. (c) 支持物のない GUV と小孔支持型 GUV の浸透圧試験前後の直径変化.

3.5 膜タンパク質の導入

小孔支持型 GUV を人工細胞として利用するためには、脂質二重膜に導入された膜タンパク質が正常に機能することが重要である。そこで、calcein 透過性試験を行い小孔支持型 GUV 上の膜タンパク質の機能を検証した。calcein は分子量が 622.55 g/mol の緑色蛍光プローブである。通常、脂質二重膜上に膜タンパク質が存在しない場合、calcein は膜を通過できない[Lu 2015]。すなわち、小孔支持型 GUV の脂質二重膜表面に膜タンパク質が存在する場合にのみ、calcein が小孔支持型 GUV の内部に侵入できる。先行研究でも、GUV に導入された赤血球由来の膜タンパク質が calcein の GUV 内への侵入を促進できることが報告されている[Mikeli 2013]。そこで先行研究を基に、本研究では赤血球断片をポリマーフィルム内に含ませることで、小孔支持型 GUV 形成時に赤血球断片を脂質二重膜と融合させ、膜タンパク質を導入した。

図 3.5(a)に、calcein 溶液内で 24 時間インキュベートした膜タンパク質が導入された小孔支持型 GUV (RBCs) と導入されていない小孔支持型 GUV(control)の蛍光画像を示す。白い点線上の calcein 輝度値を測ったところ、RBCs 内外の calcein 濃度がほぼ同等であることがわかった。これは、calcein が脂質二重膜を透過したことを意味する。一方、control では、calcein の透過は見られなかった。図 3.5(b) は、calcein 添加後 1 時間、12 時間、24 時間後の内外の calcein 輝度値が同等だった小孔支持型 GUV の割合を示す。RBCs の場合、時間の経過とともに calcein が侵入した小孔支持型 GUV の割合が増加し続けることがわかった(n=58)。一方、control では 24 時間が経過した時点で calcein が侵入した GUV の数は 1 個のみであった(n=44)。これらの結果は、先行研究と一致し、RBCs に赤血球由来の膜タンパク質が導入されたことを示唆する [Mikeli 2013]。今後、免疫染色法などを用いてさらに検証するとともに、導入できる膜タンパク質の種類を検討する必要がある。

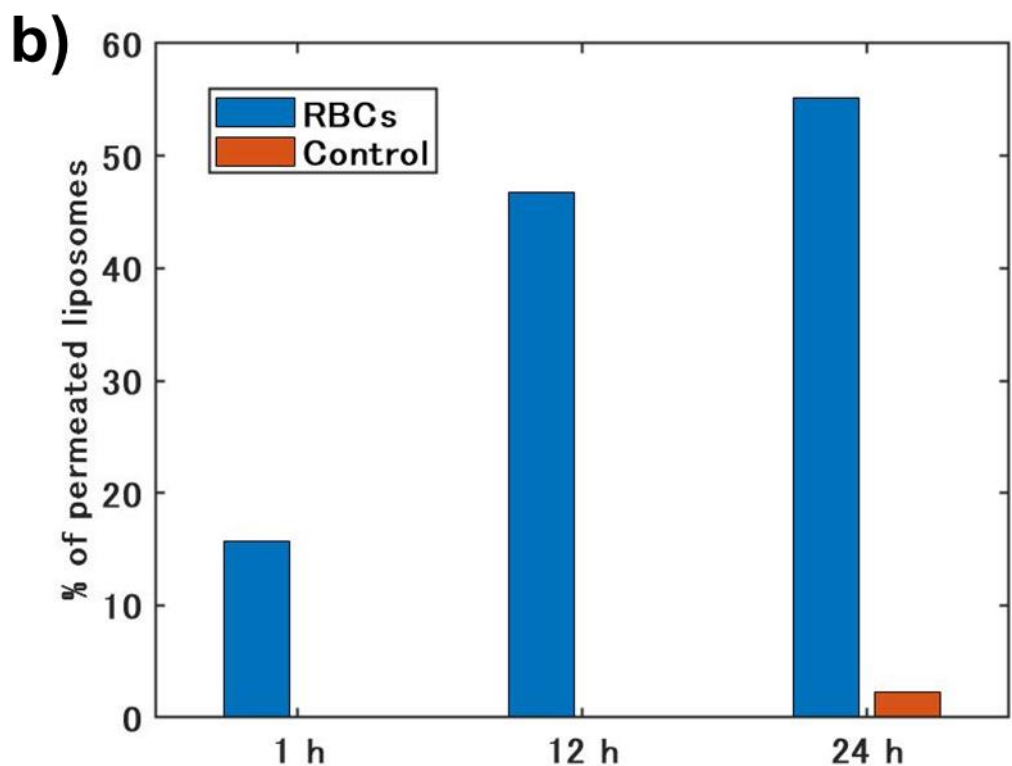
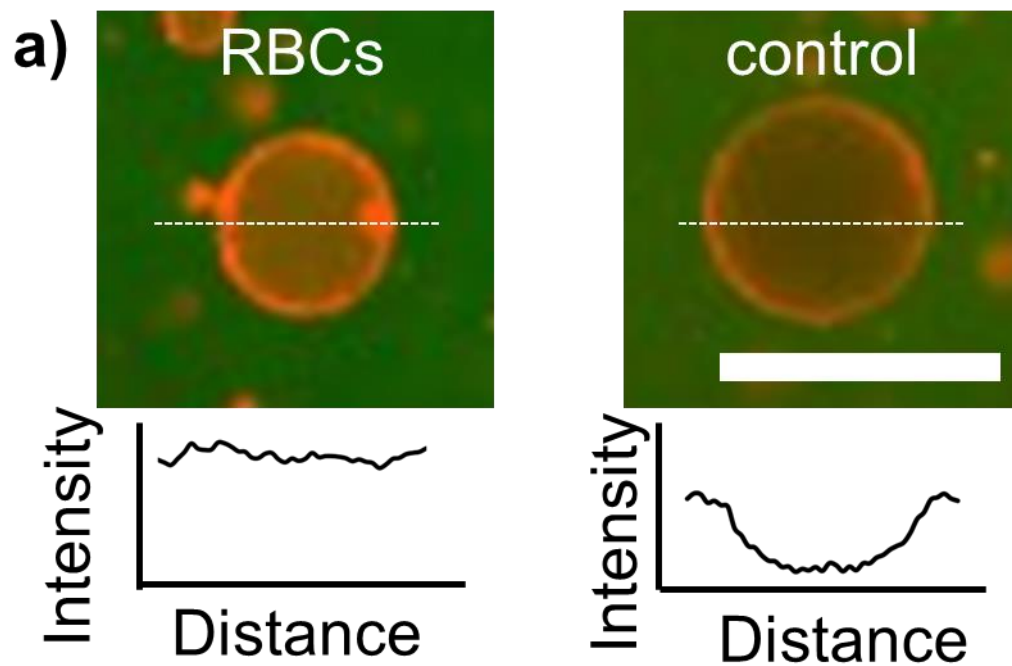


図 3.5 膜タンパク質の導入. (a) 膜タンパク質が導入された小孔支持型 GUV (RBCs) と導入されていない小孔支持型 GUV(control)の蛍光画像. スケールバー : 20 μm
 (b)calcein に侵入された小孔支持型 GUV の割合の時間変化.

3.6 小孔支持型 GUV の寿命

w/o エマルション法の課題の1つとして、形成した GUV の寿命の短さが挙げられる。先行研究では、w/o エマルションで形成された GUV が 7 日以内に破裂することが示唆されている[Kamiya 2016; Funakoshi 2007]。そこで本研究では、提案手法で形成した小孔支持型 GUV の寿命を検証した。図 3.6(a)は 4°C の冷蔵庫内で 7 日間保存した小孔支持型 GUV の蛍光画像を示し、液中に小孔支持型 GUV が点在していることがわかる。図 3.6(b)に、形成直後と 7 日後の小孔支持型 GUV の平均直径を示す。7 日後の平均直径が小さくなっていることから、一部の小孔支持型 GUV が収縮している可能性があると考えられる (n=160)。以上の結果から、提案手法で形成した小孔支持型 GUV は約 1 週間の寿命を有するものの、今後は時間の経過に伴った小孔支持型 GUV の性状変化をさらに評価する必要がある。

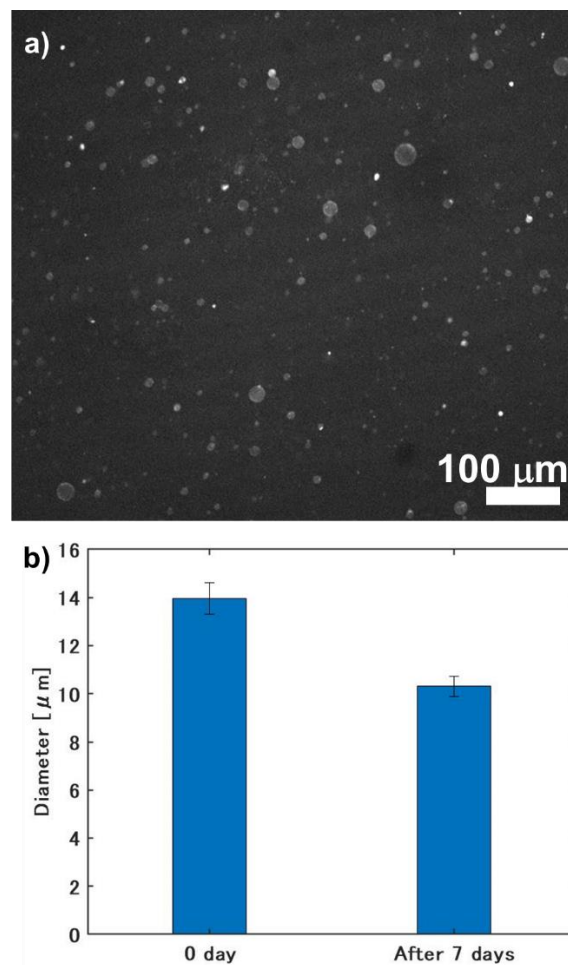


図 3.6 小孔支持型 GUV の寿命. (a) 4°C の冷蔵庫内で 7 日間保存した小孔支持型 GUV の蛍光画像. (b) 小孔支持型 GUV の直径変化.

3.7 提案手法が対応できる脂質種類の検討

人工細胞膜研究では、多種多様な脂質で構成された GUV が求められる。提案手法の汎用性を検証するため、DOPC 以外に DOPS と cholesterol を用いた GUV 形成も行った。図 3.7 に使用した脂質の分子式と、GUV の形成結果を示す。両方の状況下において、GUV の形成を確認できた (図 3.7)。形成できた GUV のサイズが異なるのは、脂質分子間の相互作用が異なるためだと考えられる。DOPS は、ホスファチジルセリン(PS)脂質の一種であり、PS は細胞膜の 18% を占め、脳機能などに関与する。PS の頭部には 2 つのネガティブチャージがあるため、分子間の反発が強く、大きな GUV ができにくいと考えられる。一方、cholesterol は 1 個のヒドロキシ基と短い非極性の炭化水素が結合した分子であり、脂質二重膜を補強する機能を持つため、大きな GUV を安定させることが可能である。以上より、形成した小孔支持型 GUV のサイズが異なるものの、本手法は複数種類の脂質に対応でき、高い汎用性を有すると考えられる。

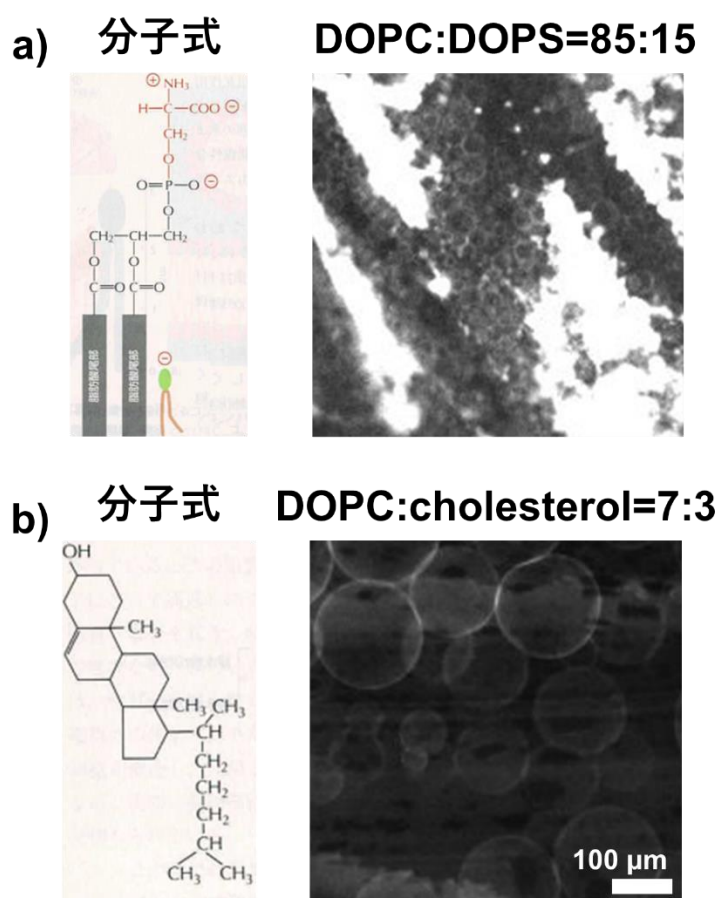


図 3.7 脂質の種類を検討。(a) PS の分子式と、形成した小孔支持型 GUV。(b) cholesterol の分子式と、形成した小孔支持型 GUV。分子式は[Alberts 2014]より引用。

3.8 本章のまとめ

以上より，第3章では，第2章で提案したポリマーフィルム水和法を用いて小孔支持型 GUV を形成する手法の検証を行った．共焦点顕微鏡による蛍光観察の結果から，脂質フィルムを傷つけることで小孔支持型 GUV の収率が大きく上昇することがわかった．またポリマーフィルムから収穫した小孔支持型 GUV の9割以上は脂質二重膜を1層のみを有することを確認した．小孔支持型 GUV 内の agarose 濃度は約 0.6-0.7% (w/v) であり，浸透圧試験下では脂質二重膜を支持し GUV の機械的強度を向上させる機能をもつことが示された．calcein 透過性試験の結果から，小孔支持型 GUV に赤血球由来の膜タンパク質を導入することに成功した．さらに，提案手法で形成した小孔支持型 GUV が約1週間の寿命を持つことがわかった．以上の結果から，第2章で提案した手法は小孔支持型 GUV の形成に有用な手法であることが考えられる．

第4章 小孔支持型 SLB の形成手法

4.1 オイルフリーの SLB 形成手法

オイルフリーの SLB の形成法は以下の2種類が挙げられる。

ベシクル融合法

ベシクル融合法は、その名の通りベシクルを固体基板表面と融合させ SLB を作製する方法である。まずリン脂質を緩衝液に懸濁させ超音波で照射することでナノサイズのベシクル(SUV)を形成する。SUV 溶液中に固体基板を浸漬すると、基板表面との相互作用で SUV が吸着する。やがて脂質二重膜が球状構造から平面状構造に転換し、SLB が形成される (図 4.1(a))。ベシクル融合法は、短時間で一度に均一で大面積の SLB を形成できる特徴をもつ。他方、形成時の諸条件を精緻に制御する必要がある。例えば、Teroらは固体基板表面のヒドロキシ基(-OH)の密度でベシクルの融合率が変化することを報告しており[Tero 2006]、Seantierらは溶液中のイオンの濃度や種類がベシクルと基板の相互作用に影響すると報告している[Seantier 2009]。また近年では、ベシクル融合法で作製した SLB のリン脂質密度が他の手法に比べて低いという指摘もある[Tamura 2019]。

自発展開法

自発展開法は、親水性基板上にリン脂質を塗布し、緩衝液に浸すと、自己組織化によって塗布したリン脂質から自発的に膜が形成される現象を利用したものである (図 4.1(b))。SLB の形成条件の違いにより下記の3種類の展開方式が挙げられる。①n-オクタデシルトリクロロシラン[Sanii 2007]やテフロン[Shaali 2015]などの疎水基板上では脂質一重膜として展開する、②親水的なガラス[Sackmann 1995]上では脂質二重膜として展開する、③溶液内のイオン強度が高いと脂質の多層膜が展開する [Sackmann 1995]。したがって、自発展開法で SLB を作製するためには適切な表面エネルギーを有する基板を用意する必要がある。これまで、自発展開法は簡便な手順で大面積の膜を生成でき、さらに SLB のパターンニングにも適する手法として報告されている[Furukawa 2011]。一方、他の手法に比べて SLB 形成に要する時間が長いことが問題点として挙げられる。

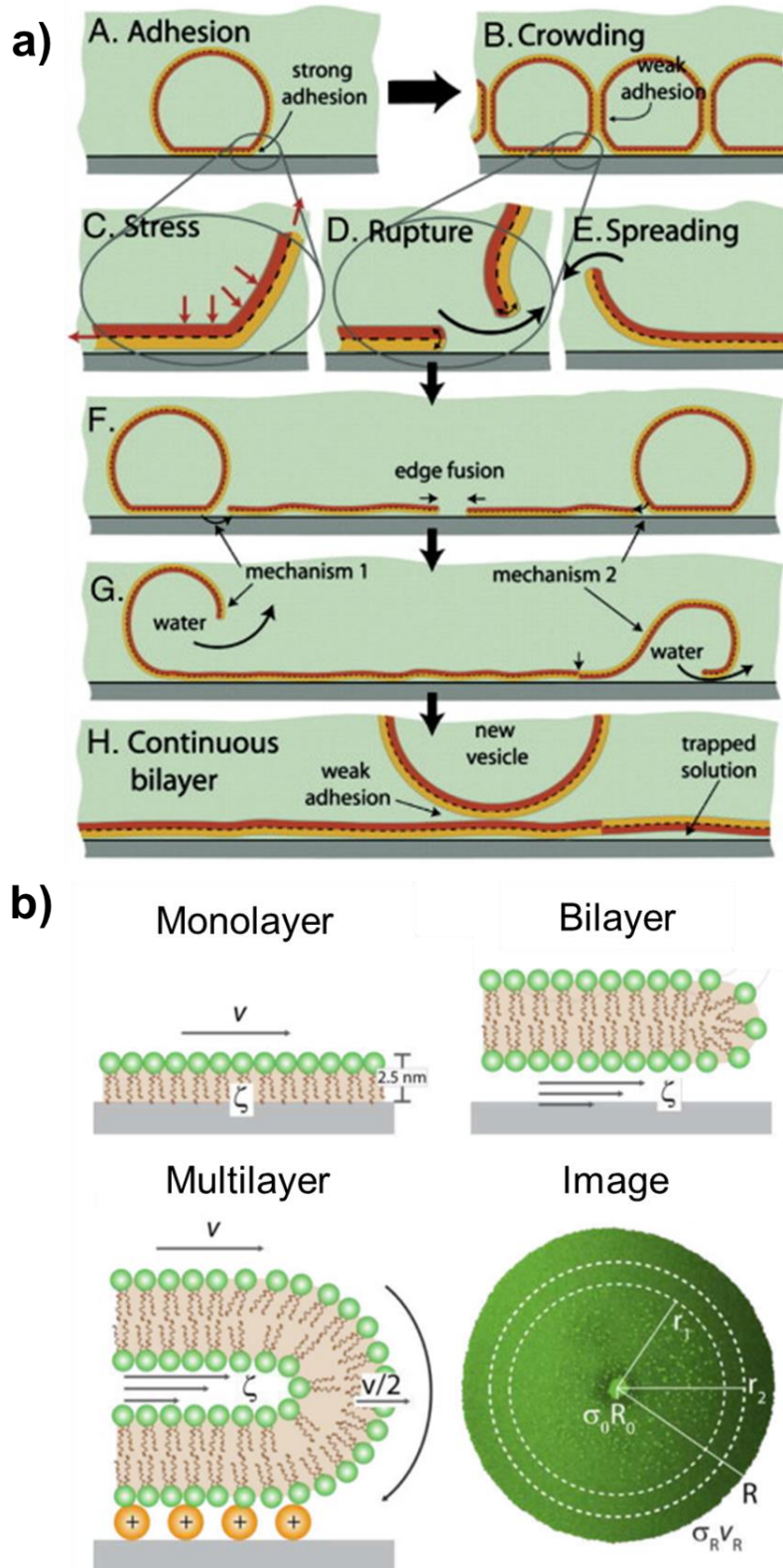


図 4.1 オイルフリーの SLB 形成手法. (a) ベシクル融合法 [Hardy 2013]. (b) 自発展開法 [Gozen 2018].

各手法の比較

表 4-1 に、ベシクル融合法と自発展開法それぞれの原理・特徴、および利点・欠点についてまとめた。ベシクル融合法と自発展開法の共通の欠点として、基板の表面エネルギーなどの形成条件を精緻にコントロールすることが必要である点が挙げられる。しかし、手法の簡便さやパターンニングに対応できること、さらに形成した SLB のリン脂質分子密度がより生細胞膜に近いという観点から、簡便性と汎用性の両方に優れている手法は、自発展開法である。したがって、本研究では自発展開法を小孔支持型 SLB の作製に適用する。

表 4-1 SLB 作製手法とその利点・欠点

手法	原理・特徴	利点	欠点
ベシクル融合法	固体基板を SUV 溶液に浸漬し、基板表面と SUV の相互作用で SUV が吸着する。SUV が球状構造から平面状構造に転換し、SLB が形成される。	短時間	手順が複雑 SLB 形成条件のコントロールが必要 SLB のリン脂質分子密度が低い。
自発展開法	ガラス基板の代わりに乾燥した agarose フィルムやポリビニルアルコール(PVA) フィルム上で静置水和法を行う。	手順が簡便 SLB のパターンニングに適合 SLB のリン脂質分子密度が高い。	SLB 形成条件のコントロールが必要。

4.2 自発展開時の脂質二重膜のエネルギーバランス

脂質二重膜自発展開のドライビングフォースは脂質二重膜と支持基板間の自由エネルギー (W_{total}) であり、拡張デリャーギン・ランダウ・フェルウェー・オーバービーク (DLVO)理論で概算できる。DLVO 理論では、 W_{total} をファンデルワールス相互作用エネルギー W_{vdW} 、静電エネルギー W_{DL} と水和相互作用エネルギー W_{hyd} の合計だと考える [Nabika 2006].

$$W_{total} = W_{vdW} + W_{DL} + W_{hyd} \quad (4.1)$$

ファンデルワールス相互作用は、電気的に中性の分子、あるいは分子の中性部分同士の誘起双極子間の引力である。分子が大きいほど、電荷の偏りはダイナミックになり、大きなファンデルワールス力が働く。脂質二重膜の自発展開においては、ファンデルワールス力が主要な駆動力であり、自発展開を促進する。

静電相互作用は、2つの電荷間で働く力であり、電荷間の距離が近いほど大きな静電力が働く。電荷が同符号のとき斥力、異符号のときは引力である。脂質二重膜の自発展開においては、リン脂質分子の親水部が電気的に中性であるため、静電力による影響が極めて低いと考えられる。

水和相互作用は、分子表面の水層を剥離する時に働く斥力である。前述のように、固体基板と脂質二重膜の間には厚み 1-2 nm の水層がある。水和相互作用は、この水層の安定した構造を維持し、脂質二重膜の固体基板への接着を防ぐ。

式 (4.1) より算出した egg-PC 脂質二重膜とガラス表面の距離と自由エネルギーの関係を図 4.2 に示す[並河英紀 2007]。脂質二重膜とガラス表面の距離が 2nm 前後の場合、自由エネルギーが引力として働き、脂質二重膜が自発的に展開できる。

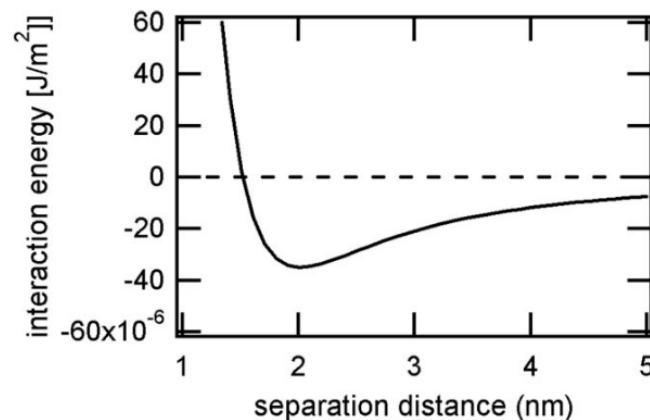


図 4.2 脂質二重膜とガラス表面の距離と自由エネルギーの関係[並河英紀 2007].

4.3 小孔支持型 SLB の形成

本実験で用いた試薬とその製造元を表 4-2 に示す.

表 4-2 本実験で使用した試薬

薬品	製造元
L- α -Phosphatidylcholine from egg yolk (egg-PC)	Sigma
Fluorescein 1,2-Dihexadecanoyl-sn-Glycero-3- Phosphoethanolamine, Triethylammonium Salt (Fluorescein-DHPE)	Thermo Fisher
Sodium chloride	Wako
Nuclepore Hydrophilic Membrane, 0.05 μm pore size, 25 mm circle	Whatman

脂質は以下の手順で準備した。まず 13 mM の L- α -Phosphatidylcholine from egg yolk (egg-PC; Sigma) 溶液および 1.3 mM の 1, 2-Dihexadecanoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine (fluorescein-DHPE; Thermo Fisher) を、それぞれ 100 μ l と 10 μ l で混合した。窒素ガスを用いて溶媒であるクロロホルムを蒸発させた後、減圧したチャンバー内で一晩静置してクロロホルムをさらに蒸発させ、粘着性の混合脂質を得た。22°C 条件下で、親水化したガラス基板(S111; Matsunami Glass Ind), PC 製メンブレンフィルタ (Nuclepore Hydrophilic Membrane, 0.05 μ m pore size, 25 mm circle, Whatman) に、それぞれ混合脂質を塗布し、全体をバッファー(100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl; pH 7. 6)に浸した。そして倒立型落射蛍光顕微鏡(IX70, Olympus) に共焦点ユニット(CSU-X1; Yokogawa Electric Co.), および光源レーザ (HPU-50101-PFS2; Furukawa Electric CO., LTD.)を取り付けた観察システムを用いて、蛍光領域が自発的に広がる様子を、5分に1枚の速度で1時間のタイムラプス撮影を行った(図4.3)。

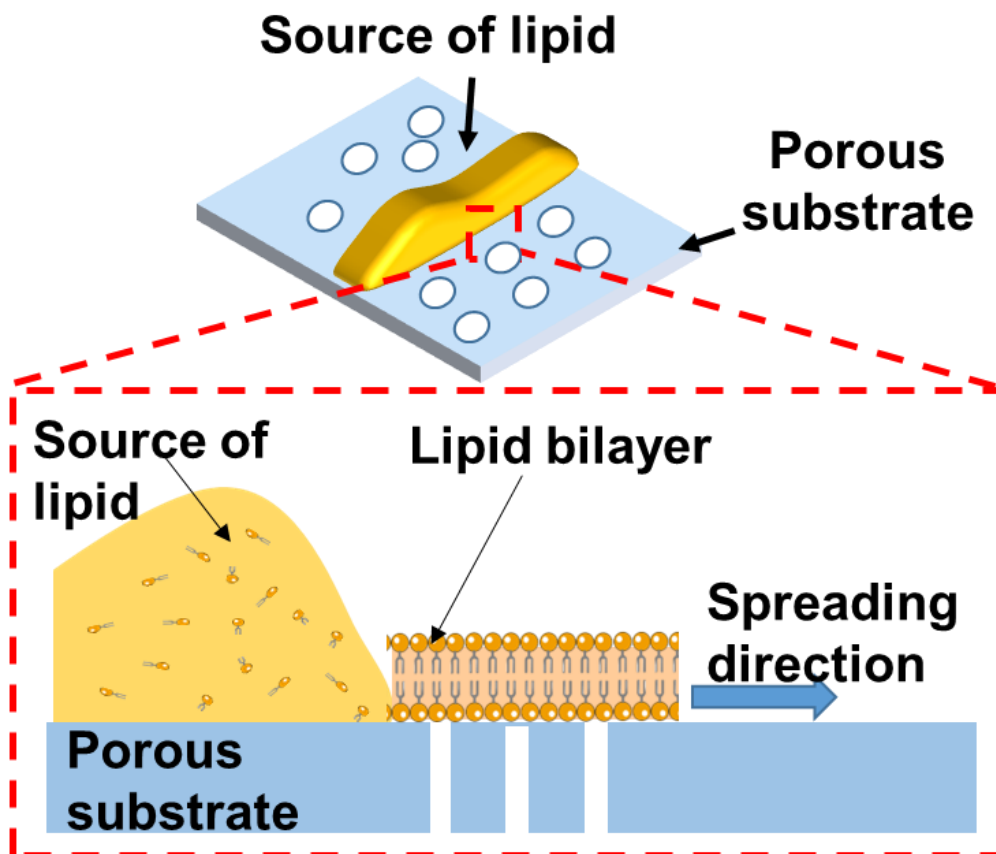


図 4.3 メンブレンフィルタ上での自発展開

4.4 小孔支持型 SLB の展開速度の評価

自発展開のドライビングフォースは SLB と支持基板間の自由エネルギーであり，自由エネルギーは展開中に SLB と支持物間に生じる摩擦力により消費される．エネルギーの保存法則およびニュートンの運動方程式より，膜の展開速度 v [m/s] と展開時間 t [s] の間には次の関係が成り立つ [Nissen 1999].

$$v = (\beta/t)^{1/2} \quad (4.2)$$

ここで β [m²/s] は展開係数と呼ばれる定数であり，SLB と支持基板間の自由エネルギーで決定される．(4.2)式から，展開時間と展開速度の両対数グラフの傾きは常に-1/2 であることがわかる (図 4.4(a)) [Radler 1995]. 小孔支持型 SLB の展開速度 v を連続した 2 枚の画像における面積の変化量 ΔS ，時間間隔 Δt および膜端部の長さ L を用いて，式 (4.3) で計算した (図 4.4(b)). v の結果を式(4.2)から得られる理論値と比較した.

$$v = \Delta S / L \Delta t \quad (4.3)$$

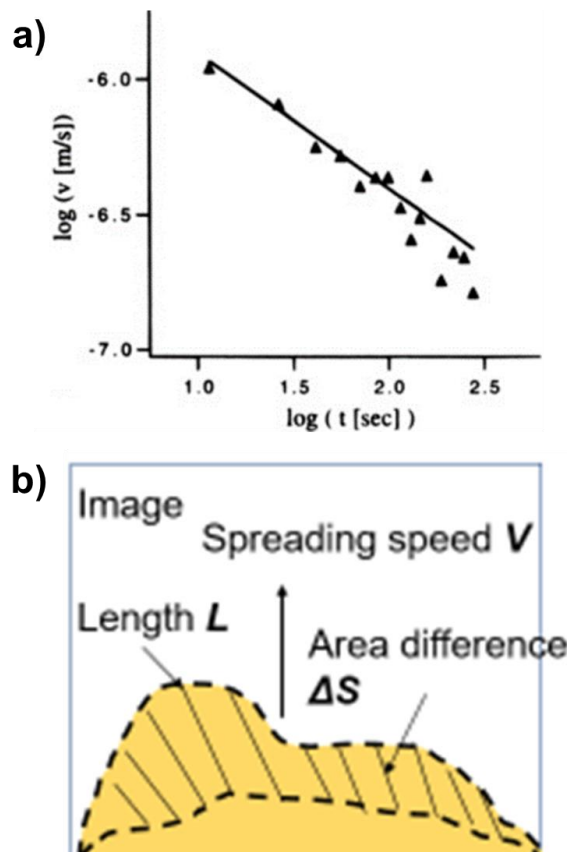


図 4.4 小孔支持型 SLB の展開速度の評価. (a) 自発展開の理論式の両対数グラフ. グラフの傾きは常に-1/2 である [Radler 1995]. (b) 小孔支持型 SLB の展開速度の計算方法.

4.5 小孔支持型 SLB の流動性の確認

SLB を構成するリン脂質分子は、相転移温度以上では高い流動性を持つ。生細胞膜においては、膜の流動性により膜タンパク質が SLB 内を素早く拡散し、細胞シグナル伝達などの機能を果たす。そこで fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) 法を用いて、形成した小孔支持型 SLB の流動性を確認した[Reits 2001]。FRAP 法では、まず SLB の特定の場所に存在する蛍光分子を退色させる。蛍光分子と結合している DHPE 脂質は流動性を持つため、退色していない蛍光標識 DHPE が周囲から退色領域に広がる。すると、退色分子と非退色分子が混在した状態になり、退色領域の蛍光輝度値が回復した様子が観察される (図 4.5)。一方、SLB に流動性がない場合は蛍光分子が拡散しないため、蛍光強度は回復しない。

形成した小孔支持型 SLB の主成分である egg-PC の相転移温度は -15°C である。そこで、本実験では 22°C 条件下で形成した小孔支持型 SLB に対して、20 倍の対物レンズから 498 nm の励起光を 20 分間照射し、生成した小孔支持型 SLB の一部を退色させた、その後、10 倍の対物レンズを用いて退色領域の蛍光輝度を 20 分間観察した。退色領域の中心付近の 8×8 pixel を ROI とし、輝度値を算出した。観察中にも励起光による退色が進むことを考慮して、非退色部分の輝度値を同時に測定した。前者を後者で除することにより、蛍光輝度の回復度を求めた。

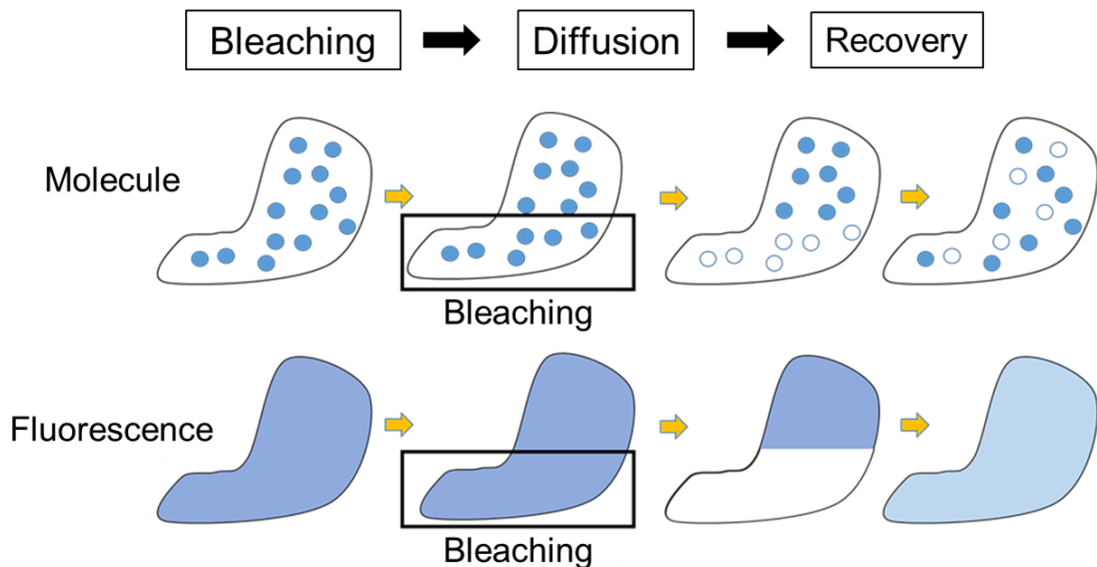


図 4.5 FRAP の模式図

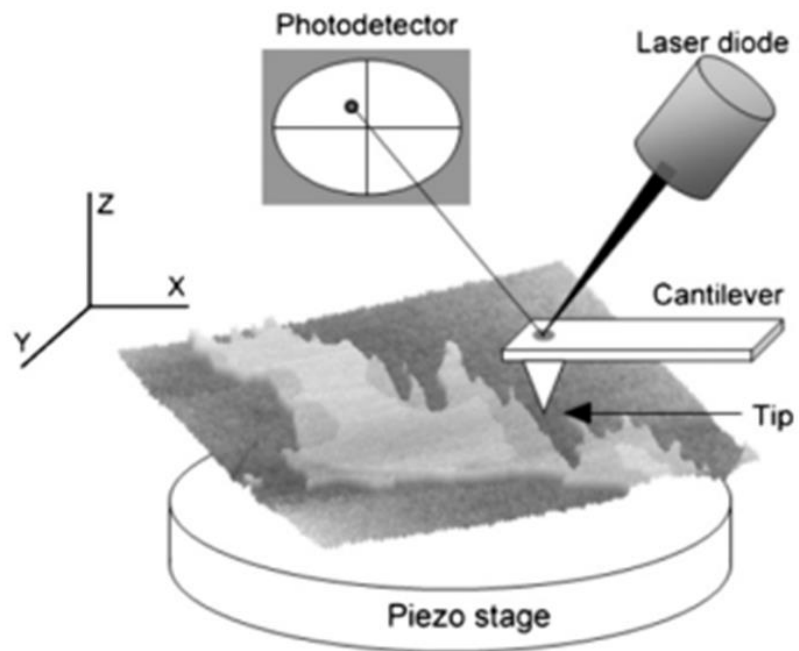
4.6 小孔上の脂質二重膜の機械的特性の評価

4.6.1 フォースカーブと脂質二重膜

原子間力顕微鏡 (AFM) は、カンチレバーに取り付けられた探針によって試料の表面を走査し、走査中のカンチレバーのたわみをモニタリングする (図 4.6(a)). 得られたたわみデータを基に、試料と探針間の引力・吸着力・試料の硬さ等の相互作用を評価し、さらに原子レベルの分解能で試料の表面構造をマッピングできる. マッピングのコントラストは、探針と試料の相互作用、探針と試料の距離、探針と試料の材料定数で構成された関数で決定される. またたわみの大きさはフックの法則に従うため、AFM の探針を上下移動させ、探針・試料間距離とカンチレバーに働く力の関係を表すフォースカーブをプロットすることで、材料のマイクロサイズの機械的特性を測定できる [Cappella 2005].

フォースカーブは、SLB の機械的特性評価にも極めて有用である [Goksu 2009]. 図 4.6(b) に典型的な SLB のフォースカーブ実験の模式図を示す. SLB に探針を近づけ、探針の先端と SLB の表面が接近すると、DLVO 力や水和力に起因する SLB と探針間の短距離相互作用が測定される. 相互作用の強度は、SLB、バッファー、AFM プローブの物理化学的性質に大きく依存し、数百 pN に及ぶ. さらに探針の先端を SLB に近づけると、両者は機械的に接触するようになる. 押し付ける力を強くすると、SLB はまず弾性的に変形し、一定の閾値を超えると探針が SLB を貫通し SLB が塑性的に変形する. SLB が貫通された時、フォースカーブにジャンプインが観られる. このジャンプインは、SLB が耐えられる押込み力の最大値を示す. 押し付け続けると、探針のたわみがさらに増加する. この時のフォースカーブの傾きは、支持基板の機械的特性を反映する. すなわち、マイカやシリコンなどの硬い基板が高い傾きを示すのに対し、PEG や agarose などの柔らかい基板のフォースカーブの傾きが相対的に低い傾向を示す. 小孔支持型 SLB の場合、SLB が小孔を跨るため、フォースカーブがより緩やかに変化する [Janshoff 2015]. ある一定の力に達した後探針を引き上げる. 引き上げ時に SLB と探針先端に接着力が働くことがある. この接着力は、フォースカーブのジャンプアウトとして観察される. 以上の一連の流れを通して、SLB の機械的特性を網羅的に評価することができる.

a)



b)

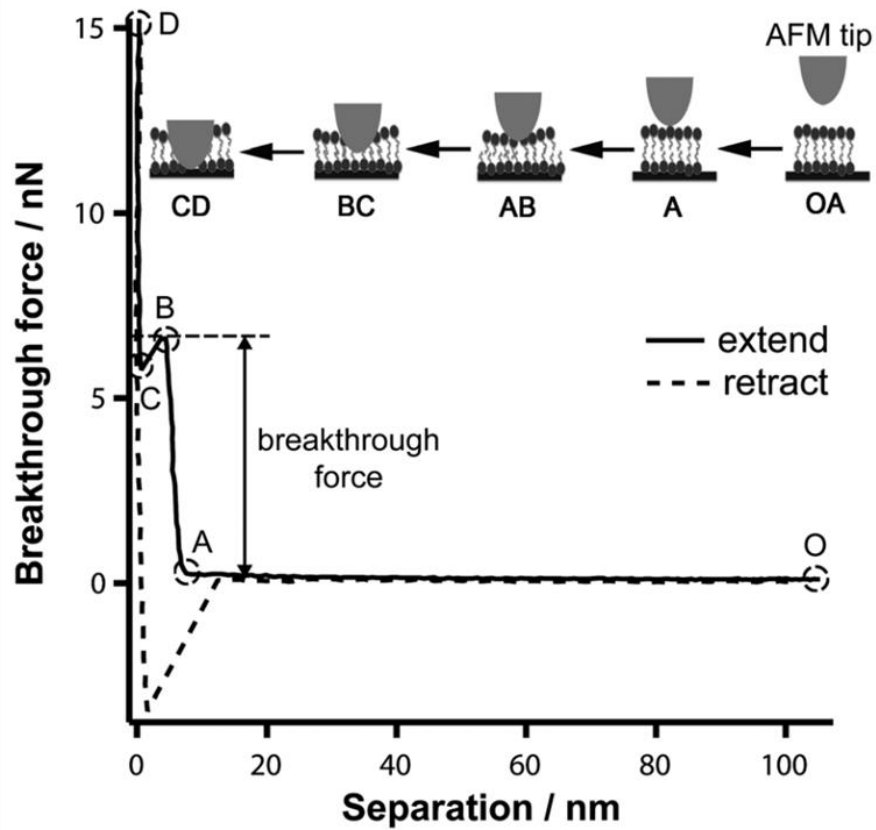


図 4.6 SLB の機械特性評価. (a) AFM 測定の様式図[Garcia-Manyes 2010]. (b) SLB のフォースカーブの代表例[Sullan 2013].

4.6.2 AFMによる小孔支持型 SLB の計測

先行研究を基に、フォースカーブ計測で直径 50 nm の小孔上の小孔支持型 SLB の機械的強度を評価した (図 4.7) [Steltenkamp 2006]. まず 22°C 条件下で、メンブレンフィルタ上で自発展開を行った. 30 分後, AFM (Cypher S; OXFORD Instruments) を用い, Olympus 製のカンチレバー AC40TS (0.8 N/m) をプローブとして AC モード (ダイナミックモード) で試料を観察した. 獲得した像から, 目視で小孔の位置を確定し, カンチレバーの先端を小孔の中央に配置した. 像を得た直後, 測定モードを DC モード (コンタクトモード) に切り替え, trigger point を 5 nN と設定し, カンチレバーを 0.2 $\mu\text{m/s}$ で小孔に接近させて, フォースカーブ測定を行った. また対照実験として, 自発展開を行ったメンブレンフィルタ表面, 自発展開を行っていないメンブレンフィルタ小孔, 自発展開を行っていないメンブレンフィルタ表面にも同様の実験を行い, それぞれのグラフを比較した. 得られたフォースカーブから, カンチレバーの移動距離と反り力の傾きを求め, その平均値及び標準偏差を計算した.

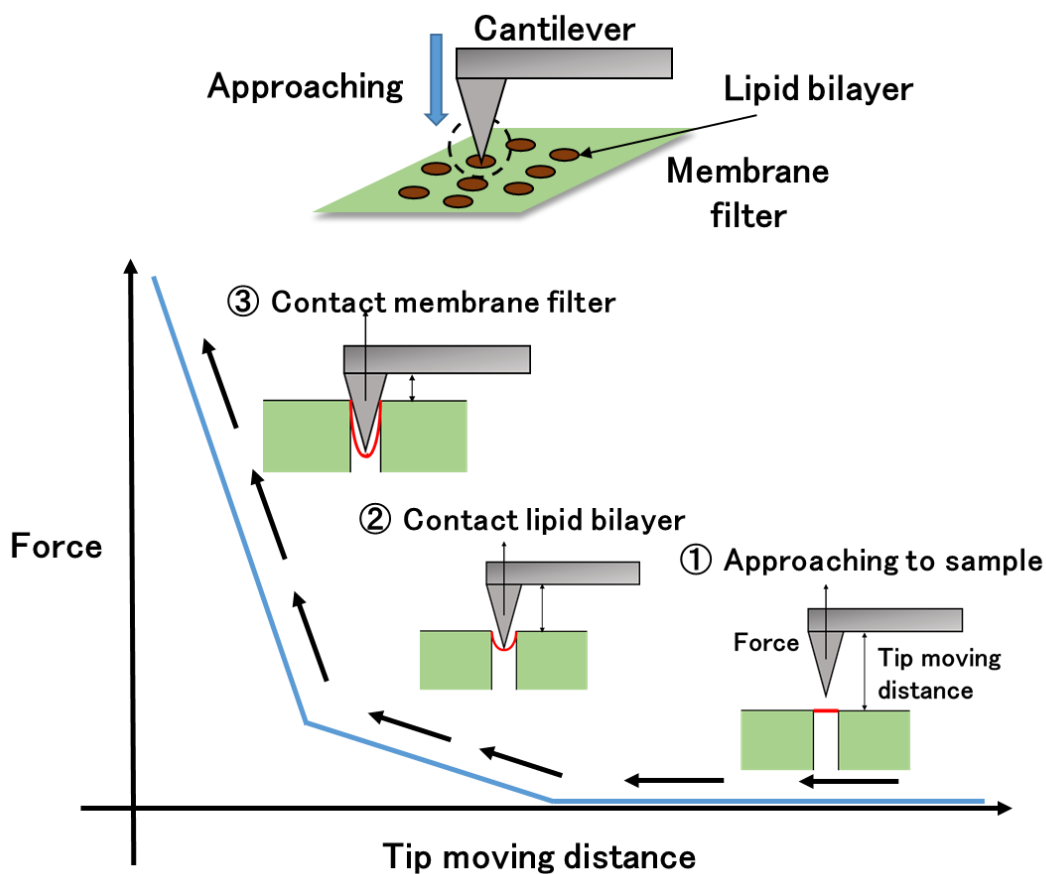


図 4.7 AFM による小孔支持型 SLB の機械的特性の評価

4.7 本章のまとめ

以上のように第4章では, 自発展開法で小孔支持型 SLB を形成する手法を提案した. すなわち, 直径 50 nm のメンブレンフィルタ上で自発展開を行うことで, SLB を形成する手法である. その上, 形成した小孔支持型 SLB の展開速度を評価する手法と, リン脂質分子の流動性を確認する FRAP 法について説明した. さらに, 小孔支持型 SLB の機械的特性の評価手法である AFM を用いたフォースカーブ計測について述べた. 第5章ではここで提案した手法で形成した小孔支持型 SLB を評価した結果を示して, 手法の有用性を検証する.

第5章 形成した小孔支持型 SLB の評価

5.1 メンブレンフィルタ上での自発展開

まず初めにメンブレンフィルタの表面形状を Field Emission-Scanning Electron Microscope [JSM-7500F]で観察したところ、大きさ約 50 nm の小孔が、フィルタ上に多く点在していた (図 5.1)。そしてメンブレンフィルタ上に大きな起伏があること (図 5.1 (a)), さらに拡大するとメンブレンフィルタ表面は一様な平滑面ではなく凹凸があること (図 5.1 (b)) が観察された。

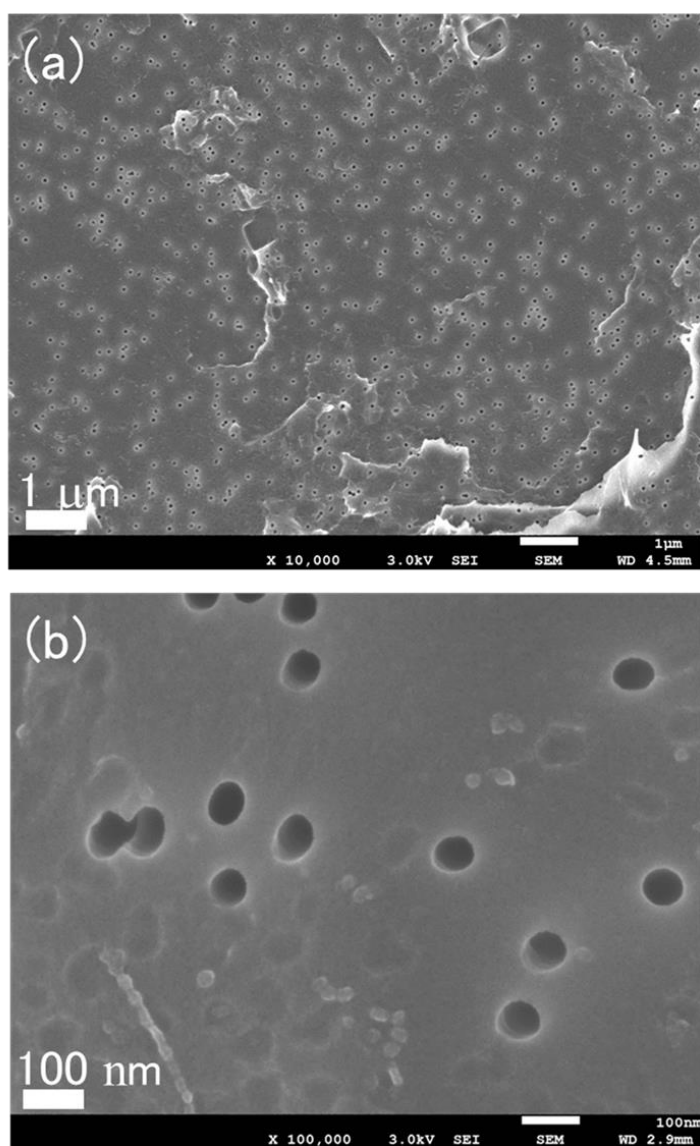


図 5.1 メンブレンフィルタの SEM 画像

22°C条件下で、メンブレンフィルタとガラス基板上で SLB の自発展開を行った直後 (0h) と 1 時間後 (1h) の蛍光画像を示す(図 5.2(a)). いずれの平面上においても、強い蛍光を発する脂質ソースから、弱い蛍光を発する領域が広がる様子が観察できた。これは、先行研究で見られた自発展開現象と一致する[Radler 1995].

図 5.2(a)の右側に 1h 時の蛍光画像内の白い点線上の fluorescein 輝度値を示す。黒い矢印は SLB 先端を表す。いずれの平面上においても、fluorescein 輝度値が SLB と支持基板の境界で急激に下落したことがわかる。これは、SLB の展開のみで見られる現象であり、脂質一重膜が展開する場合、fluorescein 輝度値は緩やかに下落すると報告されている (図 5.2(b)) [Sanii 2007]. したがって、メンブレンフィルタ上で展開した蛍光領域は SLB であると考えられる。また、ガラス上では SLB 内部から先端へ向かって fluorescein 輝度値が徐々に上昇し、メンブレンフィルタ上では徐々に降下したことが判明した。SLB 内の fluorescein の分布は、SLB・fluorescein・支持基板間の相互作用によって決定される。ガラス表面上では、fluorescein は脂質密度の低い SLB 先端に密集することが報告されている[Nissen 1999]. したがってメンブレンフィルタ上の SLB の脂質密度の分布がガラス上とは異なる可能性があり、さらに調査する必要がある。

ガラス表面でのみ、強い蛍光を発する脂質多層膜の展開を確認できた。4.1 節で述べたように、自発展開法では溶液内のイオン強度が高いと脂質の多層膜が展開する。本研究で使用したバッファー内には 100 mM の NaCl が含まれており、同様なバッファーを使用してシリコン基板上で自発展開を行った先行研究においても脂質二重膜の展開が観察されている。一方、メンブレンフィルタ上での脂質多層膜の展開が見られなかったのは、メンブレンフィルタの凹凸する地形に起因すると考えられる。これは、脂質多層膜が凹凸表面で展開する時に曲げエネルギーがエネルギーバリアとして働き、展開を阻害するためである (図 5.2(c)) [Suzuki 2005]. 提案手法の安定化を目指し、今後脂質多層膜の展開と表面性状の関係を数値化する必要がある。

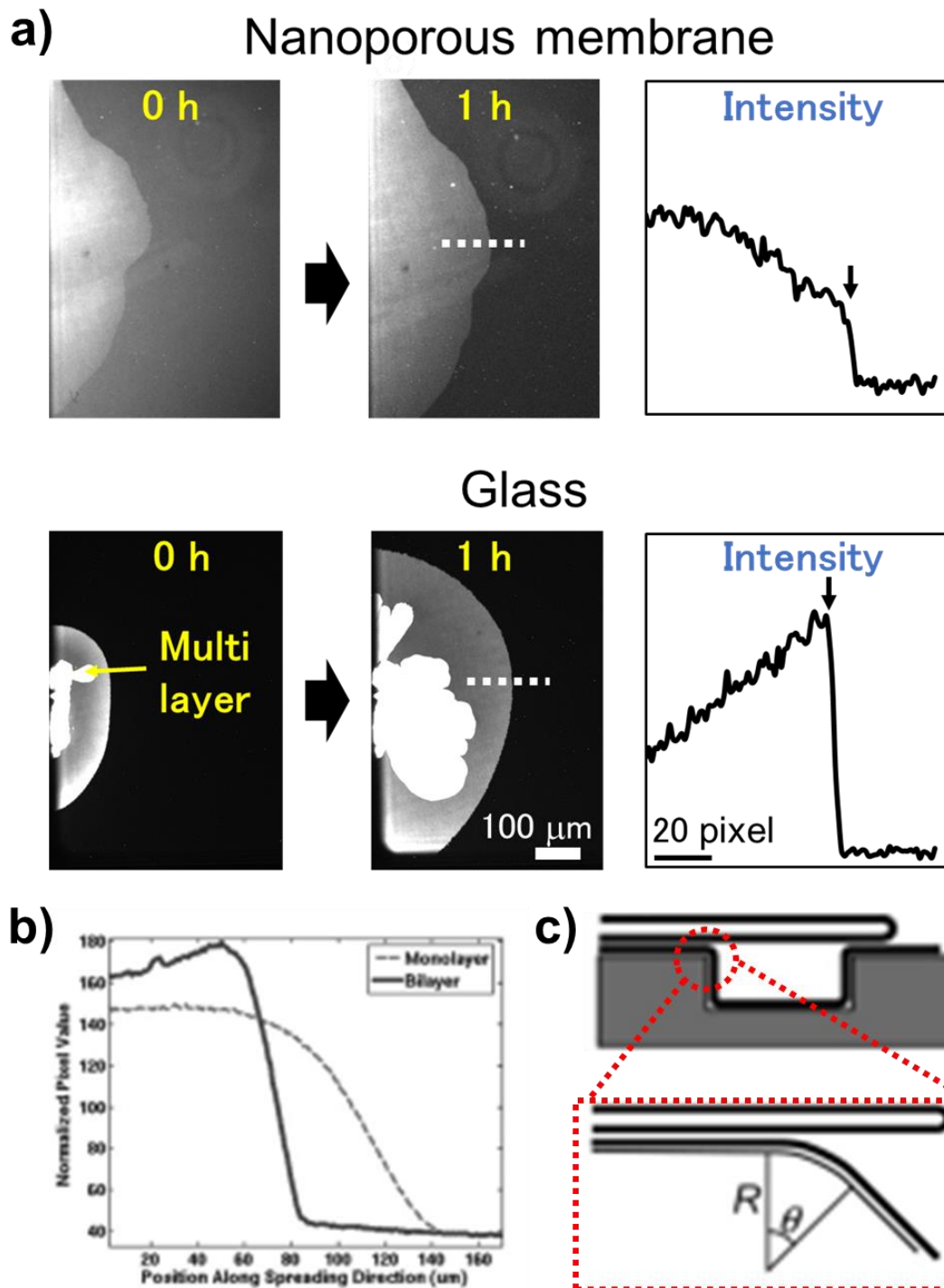


図 5.2 メンブレンフィルタ上での自発展開. (a)メンブレンフィルタとガラス上でそれぞれ自発展開を行った結果. (b) 先行研究で報告された, 自発展開した脂質一重膜と二重膜それぞれの先端の蛍光輝度値変化[Sanii 2007]. (c)脂質多層膜が凹凸した表面で展開する時の模式図. 曲げエネルギーはエネルギーバリアとして働く [Suzuki 2005].

5.2 小孔支持型 SLB の展開速度

撮影画像から算出した SLB の展開速度の代表例を両対数グラフに示した(図 5.3(a)). 直線は最小二乗法を用いて算出した近似直線を表す. いずれの平面上でも, 開始から 1 時間後に弱い蛍光領域の展開速度が低下した. 22°C条件下では, メンブレンフィルタ上およびガラス基板上の速度の近似直線の傾きは, メンブレンフィルタ上で -0.51 ± 0.15 (n=4), ガラス基板上で -0.53 ± 0.013 (n=3)であった. 33°C条件下ではメンブレンフィルタ上での近似直線の傾きは -0.55 , ガラス基板上での近似直線の傾きは -0.36 であった. メンブレンフィルタ上ではいずれの温度条件下においても傾きが -0.5 に近い値であったが, ガラス上では 33°C時の展開速度の傾きは -0.36 と理論値とは離れた値であった. 理論値と測定値が異なった理由の 1 つとして, 展開膜が画像の端に達する前後で, 面積の変化量と先端部の長さから求める展開速度が変化したことが挙げられる. 今後サンプル数を増やし, さらに精査する.

SLB の展開速度は, ガラス基板上では, 22°Cに $0.100\text{-}0.010 \mu\text{m/s}$, 33°Cに $0.170\text{-}0.050 \mu\text{m/s}$, メンブレンフィルタ表面上では, 22°Cに $0.040\text{-}0.001 \mu\text{m/s}$, 33°Cに $0.060\text{-}0.015 \mu\text{m/s}$ であった. ガラス上での SLB の展開速度は, 先行研究の egg-PC を用いたシリコン上での SLB の展開速度と近い値を示した[Furukawa 2007]. 一方, メンブレンフィルタ上の SLB の展開速度がガラス上より低いことが判明した. 理由として, メンブレンフィルタ表面の親水性がガラスより低い点が挙げられる. 先行研究では SLB の展開速度が基板表面の親水性に比例することが報告されている[Radler 1995]. 本研究で使用された基板の水接触角を評価したところ, メンブレンフィルタが 50° , ガラスが 5° であり, SLB の展開速度の結果は先行研究と合致する. また, いずれの平面上でも温度が高いほど展開速度が高いことが示唆された. これは温度を上げたことにより, 脂質二重膜内のリン脂質分子拡散が速くなり, より高い流動性を示したと考えられる (図 5.3 (b)) [Seifert 2001]. そのため今後は, メンブレンフィルタの親水化や適切な温度設定を検討し, 大面積の脂質二重膜をより短時間に形成することを目指す.

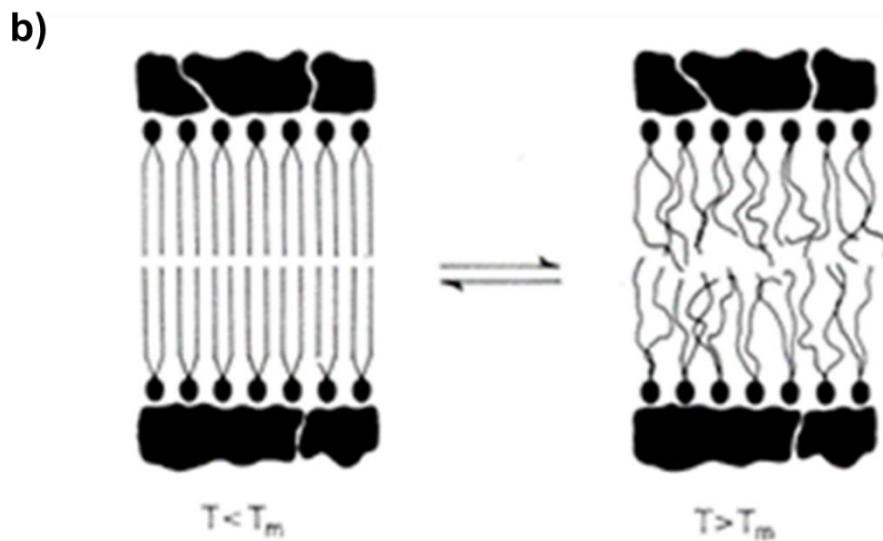
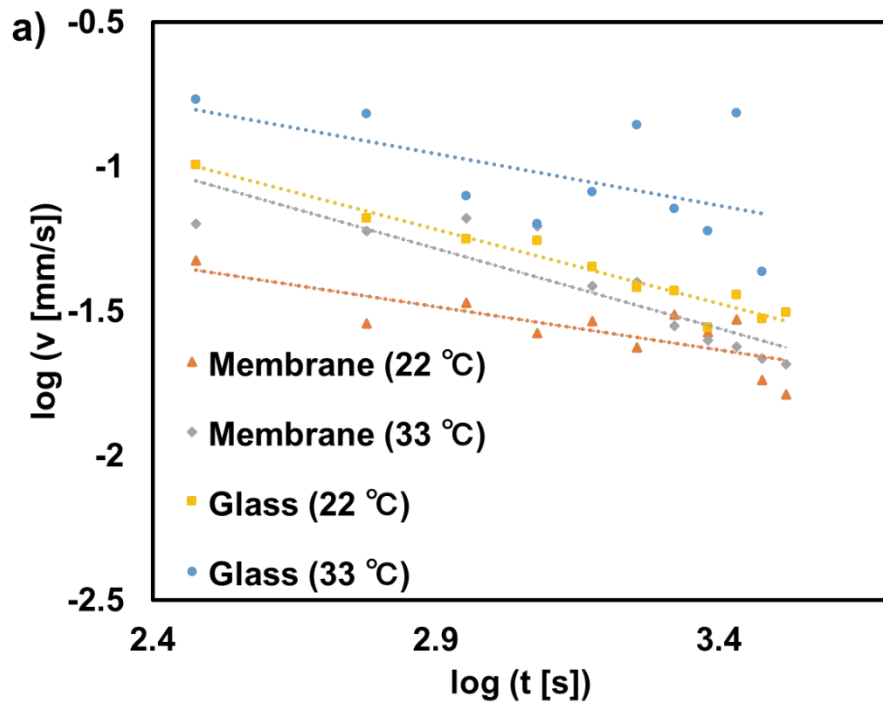


図 5.3 小孔支持型 SLB の展開速度. (a)それぞれの条件下での SLB の展開速度. ▲ :
 メンブレンフィルタ, 22°C. ◆ : メンブレンフィルタ, 33°C. ■ : ガラス, 22°C. ● :
 ガラス, 33°C. (b) 温度の上昇とリン脂質分子の流動性の関係[坂本明郎 1998].

5.3 小孔支持型 SLB の流動性

図 5.4 に FRAP 実験の結果を示す。白い点線は退色領域を表す。通常、FRAP 実験の退色領域は直径 10-20 μm の円形が好ましいとされているが[Kang 2012], 設備条件上微小の円形にレーザーのフォーカスを合わせることが困難だった。そのため本実験では、FRAP を SLB の流動性を定性的に評価する手法として使用する。

励起光照射後、メンブレンフィルタ上に 0.100mm^2 の退色領域、ガラス基板上に 0.112mm^2 の領域が観察された。1200 s 後、いずれの平面上においても、退色領域の蛍光輝度が回復した。この点から、得られた小孔支持型 SLB が流動性を有し、人工細胞として有用であるといえる。

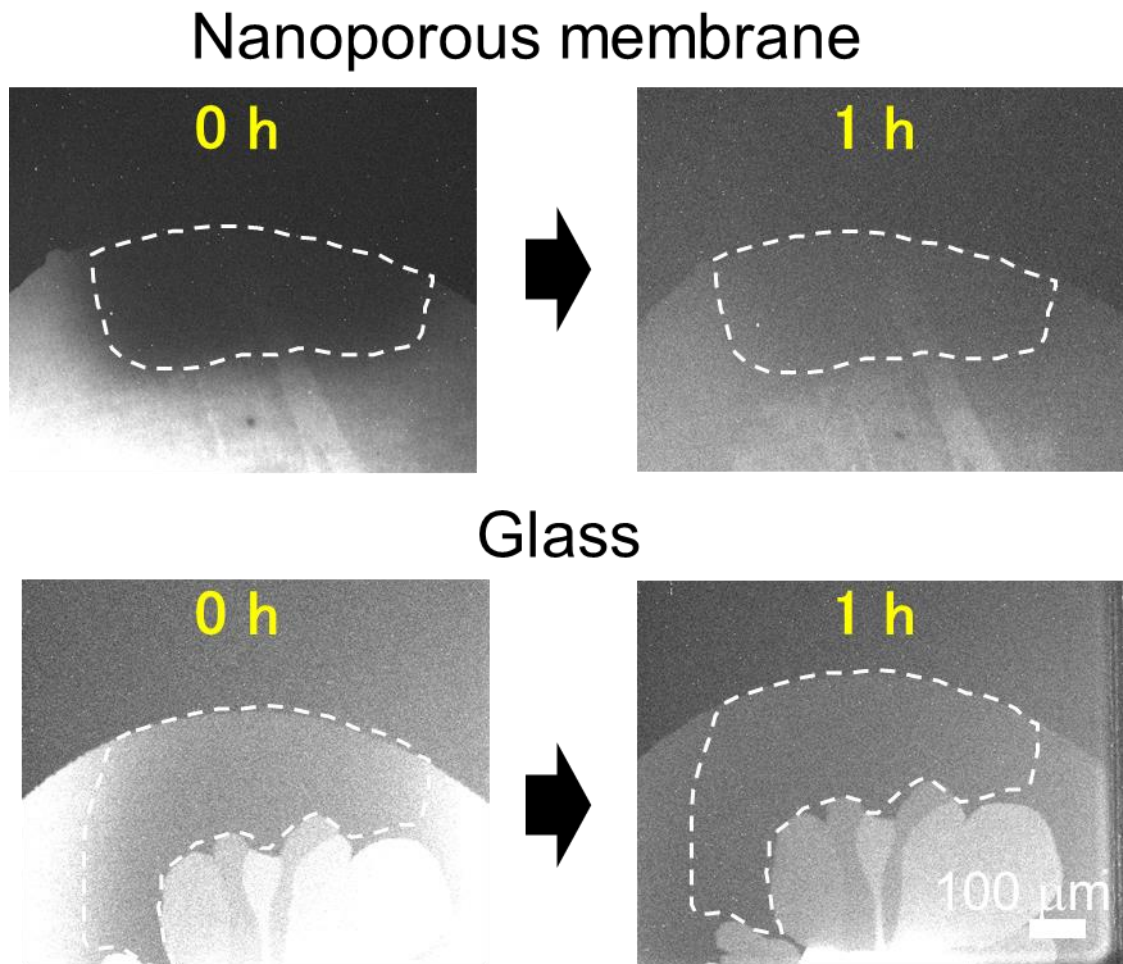


図 5.4 レーザ照射後の退色領域

図 5.5 に退色領域の蛍光輝度回復度の時間変化を示す。ガラス基板上では輝度値が 81 %まで退色したが、830 s 後に 100 %まで回復した。一方、メンブレンフィルタ上では蛍光輝度の上昇が見られたものの、1200 s 後に 100 %までは回復しなかった。この結果は、ガラス基板上での回復速度はメンブレンフィルタ上より高いことを示唆し、5.3 節で得られた SLB の展開速度の結果と一致する。一方、本実験では装置の制約により、通常の FRAP 実験で求められる試料の流動性を表す拡散係数を算出できなかった。今後は装置の改良を目指し、得られた小孔支持型 SLB の流動性を定量的に評価する。

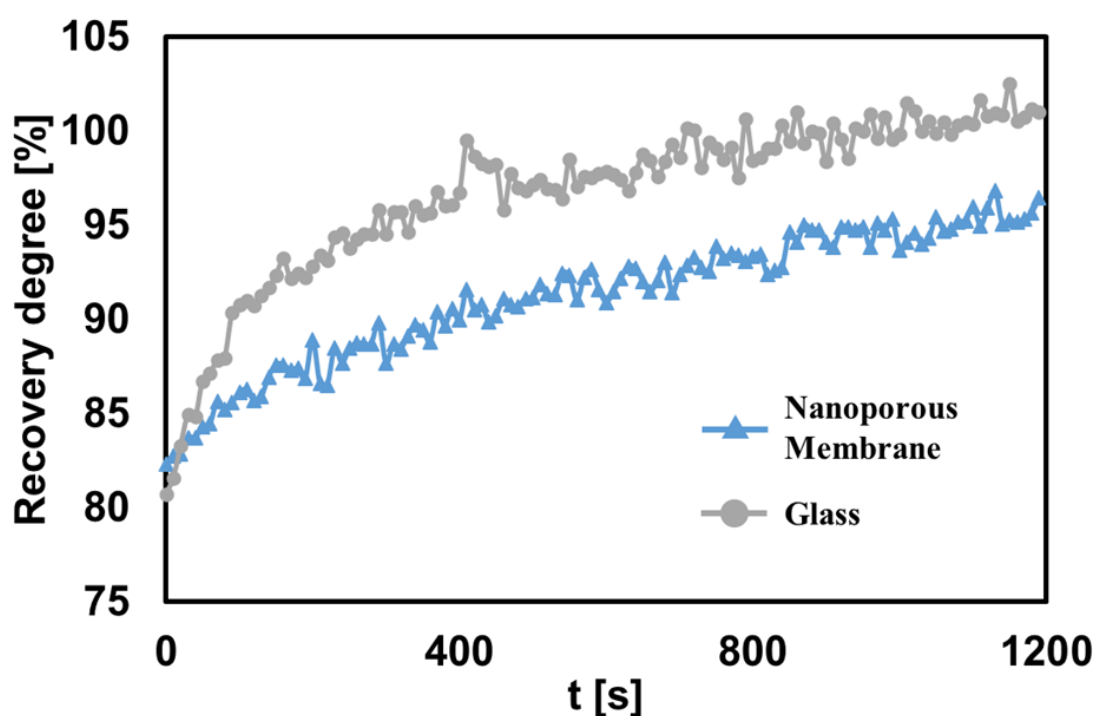


図 5.5 退色領域の蛍光輝度回復度の時間変化

5.4 小孔支持型 SLB のフォースカーブ

図 5.6 に AC モードで得たフォースカーブ測定を行った前後の像を示す。試料のドリフトが極めて小さいことが分かる。

図 5.7 は自発展開を行っていないメンブレンフィルタ表面と小孔，図 5.8 は自発展開を行ったメンブレンフィルタ表面と小孔のフォースカーブを示す。図 5.6 の結果だけを見ると，小孔部分には脂質二重膜が存在するか否か判断がつかない。しかし図 5.7, 5.8 に示す trigger point でのピエゾモータの変位は，自発展開を行っていないメンブレンフィルタ表面 $90.3 \pm 5.1 \text{ nm}$ (n=9)，小孔 $80.7 \pm 8.9 \text{ nm}$ (n=10)，自発展開を行ったメンブレンフィルタ表面 $73.3 \pm 6.5 \text{ nm}$ (n=28)，小孔 $133.3 \pm 22.4 \text{ nm}$ (n=35)であり，自発展開を行った小孔のピエゾモータの変位は，他の試料よりはるかに大きい。また，往復曲線のギャップが他の試料に比べて大きいため，自発展開を行った小孔がより塑性的に変形したと考えられる。さらに，自発展開を行った試料のみ復路曲線にジャンプアウトが見られ，試料は粘着性の表面であることが分かった。

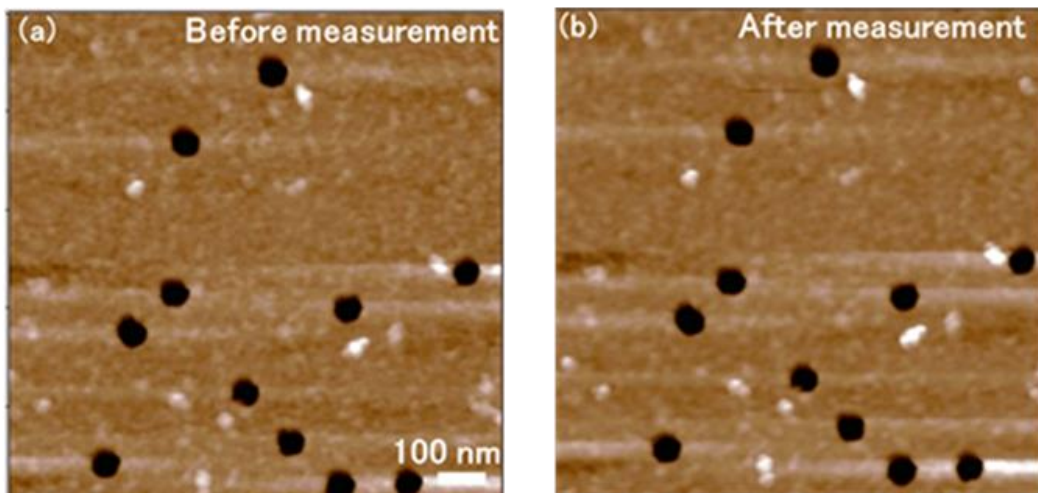


図 5.6 フォースカーブ測定前後の小孔の像

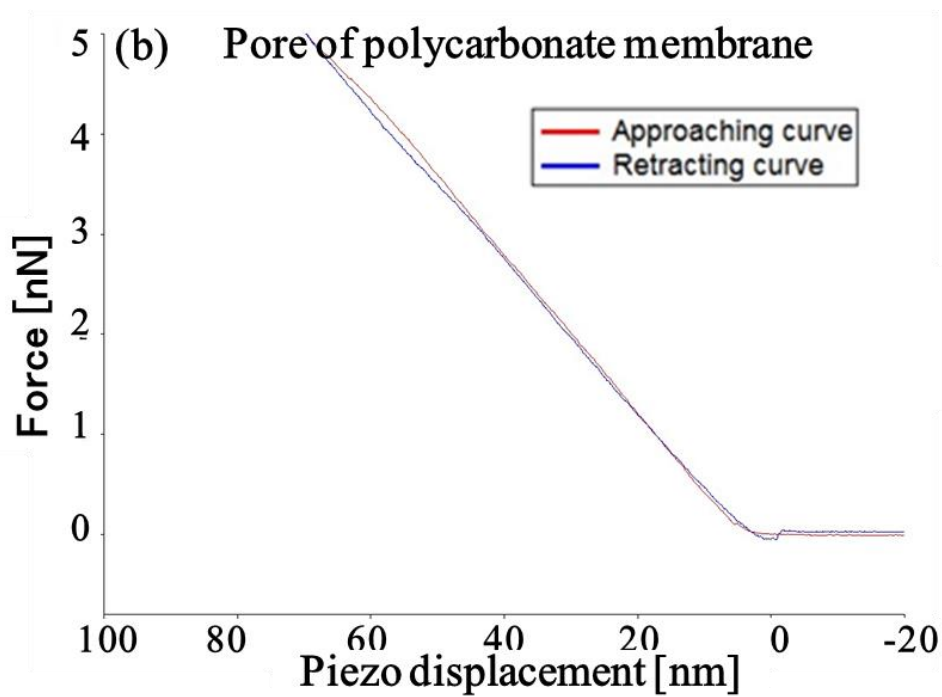
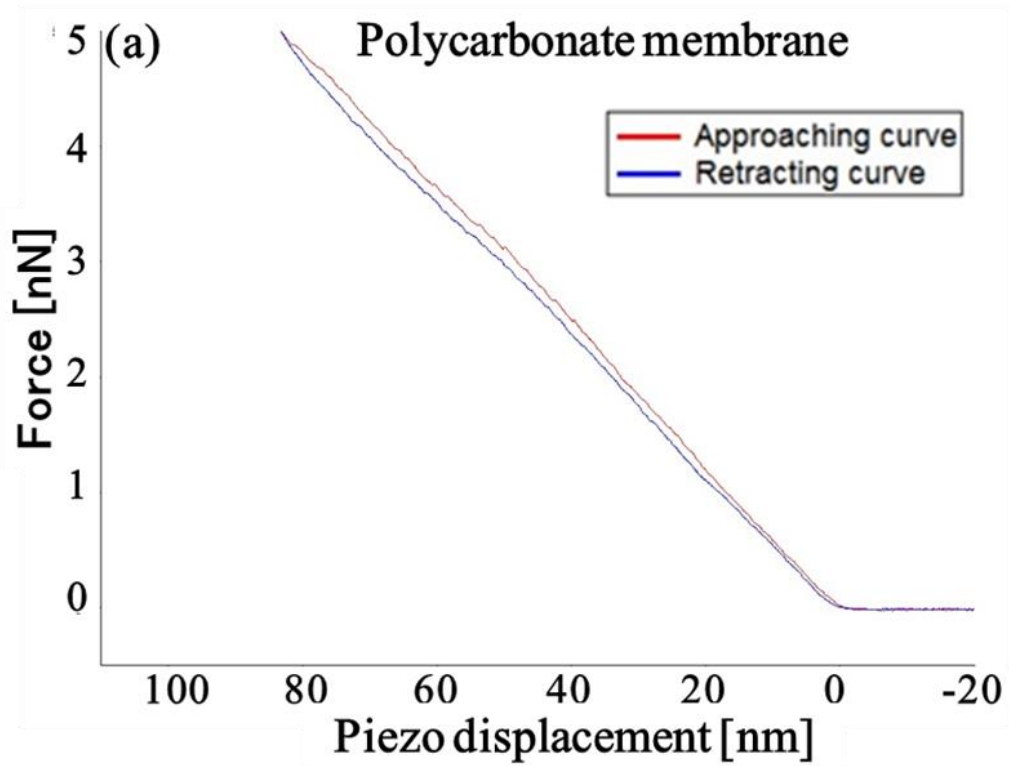


図 5.7 自発展開を行っていないメンブレンフィルタのそれぞれのフォースカーブ.
 (a)メンブレンフィルタ表面 (b)メンブレンフィルタ小孔.

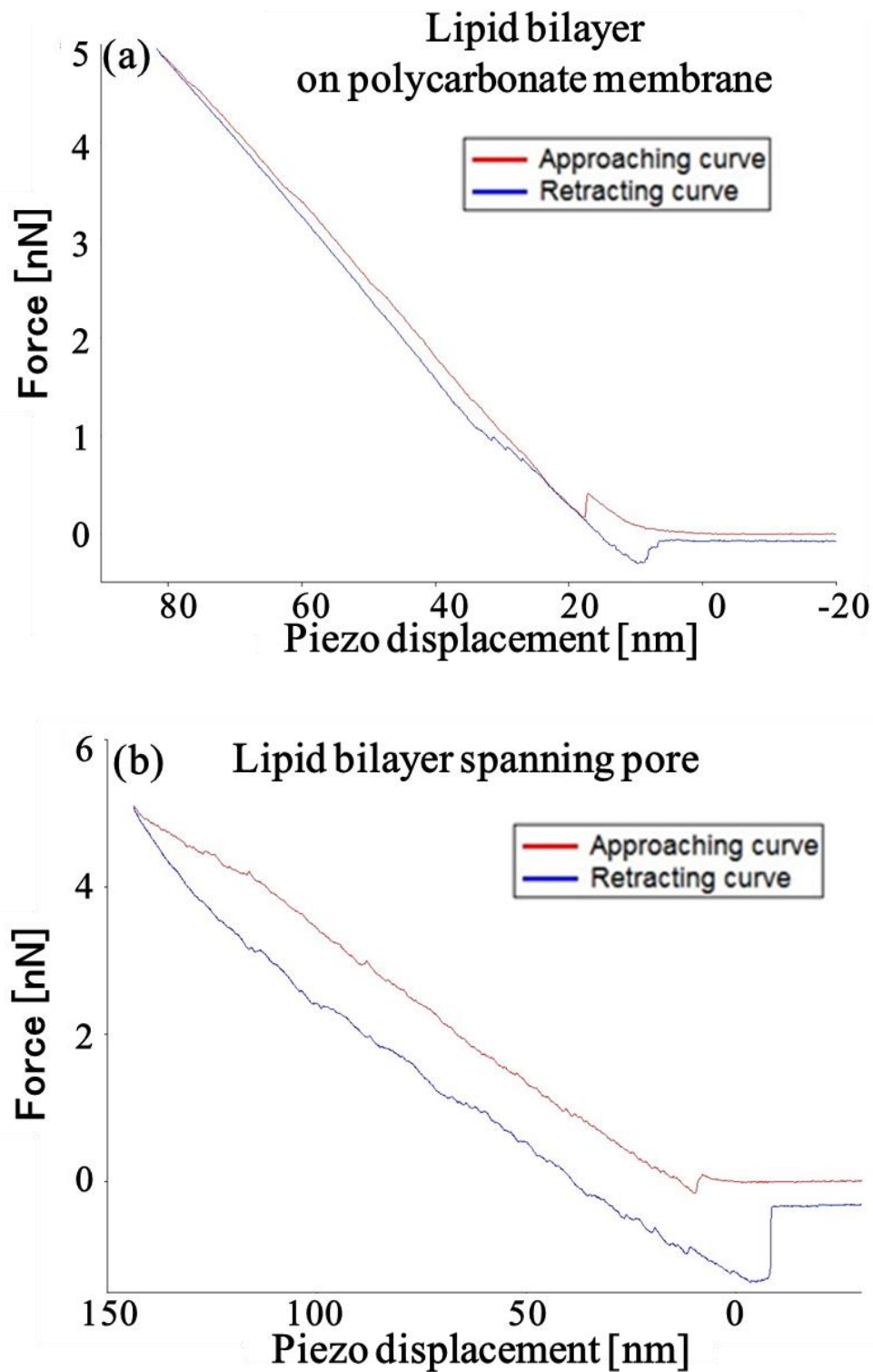


図 5.8 自発展開を行ったサンプルのそれぞれのフォースカーブ. (a)メンブレンフィルタ表面 (b)メンブレンフィルタ小孔.

カンチレバーの先端は放物線であると想定すると(図 5.9), 脂質二重膜のない小孔に対して, カンチレバーが力を受けて小孔内に侵入できるまでの最大深さ h^{max} は以下の式で表せる⁽⁴⁹⁾

$$h^{max} = R_{pore}^2 / 2R_{tip} \quad (5.1)$$

ここで R_{pore} は小孔の半径, R_{tip} はカンチレバーの先端半径である. 本研究では, 小孔の半径 $R_{pore} = 25 \text{ nm}$, カンチレバーの先端半径 $R_{tip} = 8 \text{ nm}$ から, $h^{max} = 39 \text{ nm}$ と算出できる. 一方, フォースカーブ測定時におけるピエゾモータの移動距離の平均値は, 自発展開を行った小孔上では 133.3 nm ($n=35$), 自発展開を行っていない小孔上では 80.7 nm ($n=10$) であり, 両者の差 42.6 nm はカンチレバーの先端が脂質二重膜に接触してから小孔の縁に接触するまでの距離を示している. この値が先に算出した h^{max} に近く, 自発展開を行った小孔のフォースカーブが塑性的に変化したことから, 小孔上に脂質二重膜が存在, つまり小孔支持型 SLB が形成されたと考えている. なお先行研究では, 自発展開する脂質二重膜が 100 nm 程度の構造をなぞるように展開することが報告されている [Furukawa 2007]. 本研究で用いた 50 nm 程度の小孔でも同様に膜が展開したと考えられるが, 今回得られたデータからだけでは判断できない. 膜の形成過程については, さらなる検討が必要と思われる.

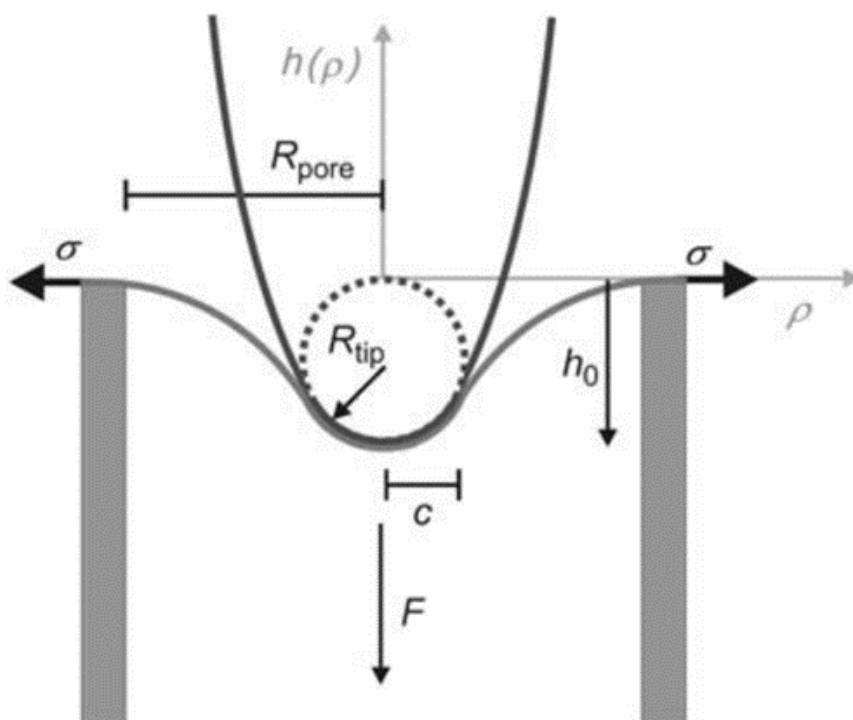


図 5.9 フォースカーブ測定時のイメージ図[Steltenkamp 2006]

5.5 小孔支持型 SLB の見掛けのバネ定数

図 5.10 に各試料の見掛けのバネ定数を示す。フォースカーブの傾きが試料の“見掛けのバネ定数” k に相当する。自発展開を行っていないメンブレンフィルタ表面、自発展開を行っていない小孔、および自発展開を行ったメンブレンフィルタ表面、自発展開を行った小孔上の見掛けのバネ定数は、それぞれ 0.053 ± 0.003 N/m ($n=9$), 0.062 ± 0.007 N/m ($n=10$), 0.068 ± 0.006 N/m ($n=28$), 0.039 ± 0.007 N/m ($n=35$)であり、小孔支持型 SLB の見掛けのバネ定数が最も小さいという結果を得た。これは、柔らかい小孔支持型 SLB の特徴と一致する。先行研究では、Langmuir-Blodgett 法を用いて直径 225 nm の小孔上で形成した 1,2-Diphytanoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholine (DPhPC)小孔支持型 SLB の見掛けのバネ定数が 0.048 ± 0.015 N/m であると報告している[Mey 2009]。小孔支持型 SLB の見掛けのバネ定数は、脂質や支持基板の性状に影響されるため単純な比較は困難ではあるが、本研究で提案した手法で形成した小孔支持型 SLB は先行研究と同等な機械的強度を有していると考えられる。今後は、異なる種類の脂質や基板が提案手法で形成した小孔支持型 SLB の機械的特性に与える影響を探索する必要がある。

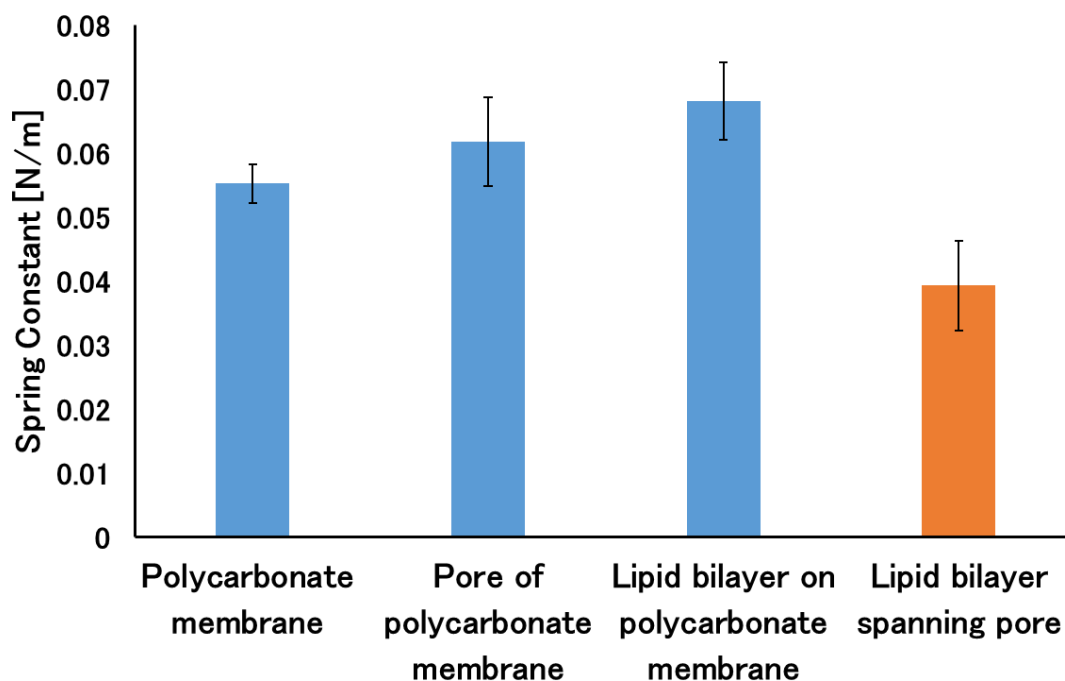


図 5.10 各試料の見掛けのバネ定数

5.6 本章のまとめ

以上より，第 5 章では，第 4 章で提案した自発展開法を用いて小孔支持型 SLB を形成する手法の検証を行った．共焦点顕微鏡による蛍光観察の結果から，多孔質基板であるメンブレンフィルタ上に SLB が展開したことがわかった．またメンブレンフィルタ上の SLB がガラス上より展開速度が低いことを確認した．FRAP 実験の結果から，メンブレンフィルタ上の SLB が流動性を有していることが判明した．さらに自発展開を行ったメンブレンフィルタの小孔にフォースカーブ計測を行ったところ，フォースカーブの形状や探針の侵入距離から，小孔上に脂質二重膜が存在すること，つまり小孔支持型 SLB が形成されたことが示唆された．形成した小孔支持型 SLB の見掛けのバネ定数は 0.039 ± 0.007 N/m であり，先行研究と同等な機械的強度を有していることがわかった．以上の結果から，第 4 章で提案した手法は小孔支持型 SLB の形成に有用な手法であると考えられる．

第6章 結論

6.1 本研究の到達点

本研究の目的は、高い機能性と安定性を有する人工細胞の実現に向けて、オイルフリーの小孔支持型脂質二重膜の形成法を確立することであった。具体的に、ポリマーフィルム水和を用いた小孔支持型 GUV 形成法および自発展開を利用した小孔支持型 SLB 形成法を開発した。それぞれの特徴と課題を以下に示す。

6.1.1 小孔支持型 GUV

第2章で従来のポリマーフィルム水和法を小孔支持型 GUV の形成に適用させるため、不均一な脂質フィルムで水和を行うことを提案し、その有用性を第3章で検証した。結果からは、従来の均一な脂質フィルムより小孔支持型 GUV の収率が大きく上昇したこと、収穫した小孔支持型 GUV の9割以上は脂質二重膜を1層のみを有すること、内包した agarose が脂質二重膜を支持できること、膜タンパク質が導入できること、提案手法が複数種類の脂質に適用できること、が検証された。

本研究で開発した手法は以下のような特徴と課題を有する。

特徴

1点目は、オイルフリーの小孔支持型 GUV の形成手法を創出できた点である。これまでに提案された小孔支持型 GUV の作製手法は、w/o エマルション法を使用したものがほとんどであり、脂質二重膜内で有機溶媒が残留する課題があった。そこで本研究では、有機溶媒を完全に除去できるポリマーフィルム法を小孔支持型 GUV の作製に適用し、オイルフリーの小孔支持型 GUV が形成できるようになった。

2点目は、形成した小孔支持型 GUV が高い機械的強度を有する点である。小孔支持型 GUV の利点は、内部に包埋された支持物が細胞骨格のように脂質二重膜を支えられることであり、実現するためには、十分な量の多孔質材料を包埋することが求められている。本研究で開発した手法で包埋できる agarose の濃度は約 0.6-0.7% であり、浸透圧実験では形成した小孔支持型 GUV が支持物のない GUV より高い機械的強度を示した。この結果は、本手法で形成した小孔支持型 GUV は支持物を内包する利点を活かせるといえる。

3点目は、簡易な手法で膜タンパク質を導入できる点である。小孔支持型 GUV を人工細胞として運用するためには、膜タンパク質を導入することが不可欠である。従来手法では、界面活性剤を用いて膜タンパク質を小孔支持型 GUV 内に再構成する手法が主流である[Dezi 2013]。一方、ポリマーフィルムの利点の1つとして界面活性剤を用いずに膜タンパク質を導入できる点が報告されている[Horger 2015]。Calcein 透過性試験から、本研究で提案した手法で界面活性剤を使用しないで膜タンパク質を小孔支持型 GUV に導入できることが判明した。

4点目は、提案手法が複数種類の脂質に対応できる点である。細胞膜は多種多様な脂質からなり、各組織によって脂質の組成が異なる。したがって、様々な脂質に対応できる小孔支持型 GUV 形成手法は、人工細胞の創製を目指した上での理想的な手法といえる。本研究で提案した手法は、DOPC 以外に DOPS と cholesterol を用いた小孔支持型 GUV の形成に成功した点から、高い汎用性があるといえる。

課題

1点目は、MLV が形成される可能性がある点である。提案手法で小孔支持型 GUV を形成したところ、副産物として約 1.9 %の MLV が形成されたことがわかった。ポリマーフィルム水和法の性質上、MLV の形成の回避は困難であり、MLV 形成の割合は、脂質フィルムの作製時の操作によって前後する可能性がある。よって、本手法で形成した小孔支持型 GUV を研究開発に利用する場合、MLV の存在を考慮する必要がある。

2点目は、対応できる多孔質材料の種類が不明な点である。本研究では多孔質材料として agarose を使用したが、agarose は小孔支持型 GUV の内部に満遍なく分布するため、DNA や酵素などの大分子の運動を阻害する恐れがある。また、agarose 支持は低張液条件下で脂質二重膜を支持することが困難である。近年では、温度に応じてサイズが変化する cross-linked poly(N-iso-propylacrylamide) (pNIPAM)ゲル[Saleem 2011]や脂質二重膜と強い結合を持つ DNA ゲル[Kurosawa 2017]が多孔質材料として提案されており、agarose より人工細胞に適している可能性がある。そこで今後、本研究で提案した手法は DNA ゲルなどを含め他の種類の多孔質材料に対応できるかについて検証する必要がある。

3点目は、サイズの制御が困難な点である。w/o エマルション法では、マイクロ流体デバイスと組み合わせることによって GUV のサイズを制御することが可能である[Lu 2015]。一方、PC メンブレンフィルタを利用してポリマーフィルム水和法で形成された GUV のサイズを制御する手法が提案されているが、サイズ分布のばらつきが大きい[Liu

2020]. 小孔支持型 GUV を人工細胞として運用する場合、サイズのコントロールが不可欠なため、今後はサイズ制御の手法を開発していかなければならない。

4 点目は、導入した膜タンパク質の性状が不明な点である。本研究では calcein 透過性試験を用いて赤血球から抽出した膜タンパク質の機能を検証したが、calcein を運搬した膜タンパク質の種類の特異性や膜タンパク質の挿入された方向の確認を行わなかった。また赤血球から抽出した膜タンパク質の内、小孔支持型 GUV に導入できたものの割合を求めることができなかった。今後はパッチクランプ法や免疫染色法を用いて、導入した膜タンパク質の性状を検証する必要がある。

6.1.2 小孔支持型 SLB

第 4 章で自発展開を多孔質基板である PC 基板上で行うことで小孔支持型 SLB を形成する手法を提案し、その有用性を第 5 章で検証した。結果からは、多孔質基板上で SLB が展開できること、SLB の展開速度は理論式と一致し、かつ温度で制御できること、展開した SLB が流動性を有すること、SLB が小孔上に存在し、すなわち小孔支持型 SLB が形成されたこと、形成した小孔支持型 SLB が Langmuir-Blodgett 法で形成したものと同等な機械的強度を有する可能性があること、が検証された。

本研究で開発した手法は以下のような特徴と課題を有する。

特徴

1 点目は、オイルフリーの小孔支持型 SLB をより簡易な手法で形成できた点である。従来では、ベシクル融合法を用いてオイルフリーの小孔支持型 SLB 法が提案されているものの、形成時間はベシクルの作製時間を含めると 3 時間以上を要する。一方、本研究で提案した手法は 1 時間以内に小孔支持型 SLB を形成可能であり、形成時間を大幅に短縮できた。

2 点目は、小孔支持型 SLB の形成速度を制御できる点である。37°C 下での展開速度が 22°C 下より高いという結果より、温度を変更させることで小孔支持型 SLB の形成速度を制御できることがわかった。したがって、本手法で小孔支持型 SLB の形成を行う場合、所定の大きさのものを決められた時間内に得られることが期待できる。また、自発展開法は微細加工技術と組み合わせることで SLB のパターンニングを容易に行える特性 [Shaali 2015] から、形成時の温度をコントロールすることで、より精細なパターンを作製できる可能性がある。

3点目は、脂質二重膜の固体表面上での新しい挙動を見出した点である。近年、原始地球上の固体物質の表面はリン脂質分子が自己組織化する「場」であることから、脂質二重膜と固体表面の相互作用が生命誕生の謎を紐解く鍵として注目されている[Koksal 2019]。本研究が発見した、「脂質二重膜がナノサイズの小孔を有する表面を跨いで広がる現象」はこれまでに報告されておらず、生命の起源研究に新たな視点を提供できる。

課題

1点目は、小孔支持型 SLB の形成速度に影響する条件を精査できなかったことである。自発展開法では、SLB の展開速度は、温度、バッファのイオン濃度、脂質の種類、支持基板の表面粗さや表面エネルギーなど様々な要因で決定される[Nabika 2006]。本研究では温度に注目し一定の成果をあげることができたが、その他の条件を検証できなかった。今後は上記の要因が小孔支持型 SLB の形成速度に与える影響を明らかにし、提案手法を包括的に理解することが求められる。

2点目は、小孔上での脂質二重膜展開のダイナミクスを解明できていないことである。本研究では、小孔支持型 SLB の存在を確認できたものの、小孔上で脂質二重膜がどのような過程を経て形成されたかについての知見を得られなかった。このダイナミクスの解明は、本研究の価値を高めるための重要な課題である。今後は、高速原子間力顕微鏡やシミュレーションなどの評価手法を取り入れることにより、この課題を解決することが望まれる。

3点目は、小孔支持型 SLB の機械的強度に影響する条件が判明されていないことである。本研究で得られた小孔支持型 SLB の見掛けのバネ定数は 0.039 ± 0.007 N/m であり、先行研究[Mey 2009]に近い値となった。一方、小孔支持型 SLB の機械的強度は脂質の種類、小孔の直径や支持基板の機械的強度など、多くの要素の影響を受ける[Steltenkamp 2006]。したがって、本研究で提案した手法の有用性を総合的に評価するためには、上記の要素を検証することが望ましい。

4点目は、膜タンパク質の機能を検討していないこと。小孔支持型 SLB の運用においても、膜タンパク質を導入し、小孔内部と外部環境間の物質・情報交換を実現することが最重要課題である[Watanabe 2014]。本研究で形成した小孔支持型 SLB の小孔はナノサイズであるため、通常の共焦点顕微鏡を用いた膜タンパク質機能の評価が難しい。今後はパッチクランプ法や電気化学インピーダンス分光法を含めた電氣的な手法を用いて、形成した小孔支持型 SLB 上の膜タンパク質の機能を検証することが必要である。

6.2 本研究の意義と波及効果

基礎科学における意義

人工細胞研究は、細胞と同様の機能を有する化学的または生化学的システムを創出することを目的とする。したがって、本来の細胞膜に含まれないデカンなどの有機溶媒は、人工細胞の機能に与える影響が未知数であり、脂質二重膜から完全に除去することが望ましい。本研究で示した手法は、オイルフリーの小孔支持型脂質二重膜を形成できる方法であり、人工細胞研究を加速させる役割が期待できる。また、人工細胞を利用した脂質二重膜の研究は、細胞の生存にとって不可欠な役割を果たす細胞膜の性質を理解する上で重要な意義を持つ。有機溶媒を含む小孔支持型脂質二重膜は、必ずしも脂質二重膜の本当の性質を反映できるとは限らない。そこで、本研究で提案した手法を用いれば、自然な状態下での脂質二重膜を調査できることが特徴である。さらに、細胞膜表面には糖鎖やタンパク質など無数の高分子が存在し、高分子材料と脂質二重膜の相互作用を知ることが不可欠である。本研究では、agarose と PC の 2 種類の材料と脂質二重膜の相互作用を評価した。特に、「脂質二重膜が PC 基板の小孔を跨いで広がる」という知見はこれまでに報告されておらず、細胞膜研究に新たな視点を提供したといえる。

工学における意義

人工細胞は、生体分子材料で作られているため、医療分野との親和性が高く、体内での診療デバイスとしての運用が期待されている。より複雑な機能を持たせるためには、膜タンパク質の導入が不可欠である。しかし、脂質二重膜内に残留した有機溶媒が膜タンパク質を変性させ、正常に機能できなくすることが報告されている。そのため本研究は、人工細胞に導入できる膜タンパク質の種類を増やし、より高度な機能をもつ人工細胞の創出につながったと考えられる。これは Sustainable Development Goals (SDGs) の「すべての人に健康と福祉を」という世界的トレンドとも一致し、本研究の成果はこのトレンドを支える技術になる。また、人工細胞を工学的に応用するためには、その量産技術の確立が必要とされる。そこで本研究で得られた知見は、量産技術開発時のヒントになり、形成時のコストの削減や効率の向上にもつながる可能性がある。

将来性

米国では、National Science Foundation (NSF) の大型予算「NSF’ S 10 BIG IDEAS」の一つとして、「Understanding the Rules of Life: Building a Synthetic Cell」プロジェクトが実施されている。また欧州では「The European Synthetic Cell Initiative」が発足され、人工細胞の研究が世界的に活性化している。こうした中で、日本においても、人工細胞技術にいち早く取り組み、優位性を確立させることが急務であるとされつつある。とりわけ近年では、NEDO 次世代人工知能・ロボット要素技術開発「生体分子を用いたロボットの研究開発」や科研費学術変革領域研究(A)「分子サイバネティクス ー化学の力によるミニマル人工脳の構築」などの関連プロジェクトが活発に実施されている。こうした中、人工細胞作製手法の一つとして、本研究で提案した手法は今後ますます有用性が増してくる。また、細胞膜は伝統的な分野でありながら、その性質はまだ十分に解明されていなく、関連研究の論文出版数は年々増加している。日本では 1977 年に國武豊喜博士が世界ではじめて人工的な脂質二重膜の形成を報告[Kunitake 1977]してから、脂質二重膜分野が伝統的な強みとされてきた。本研究で得られた知見は下支えになり、未来に渡って脂質二重膜研究の発展に貢献できる可能性を秘めている (図 6.1)。

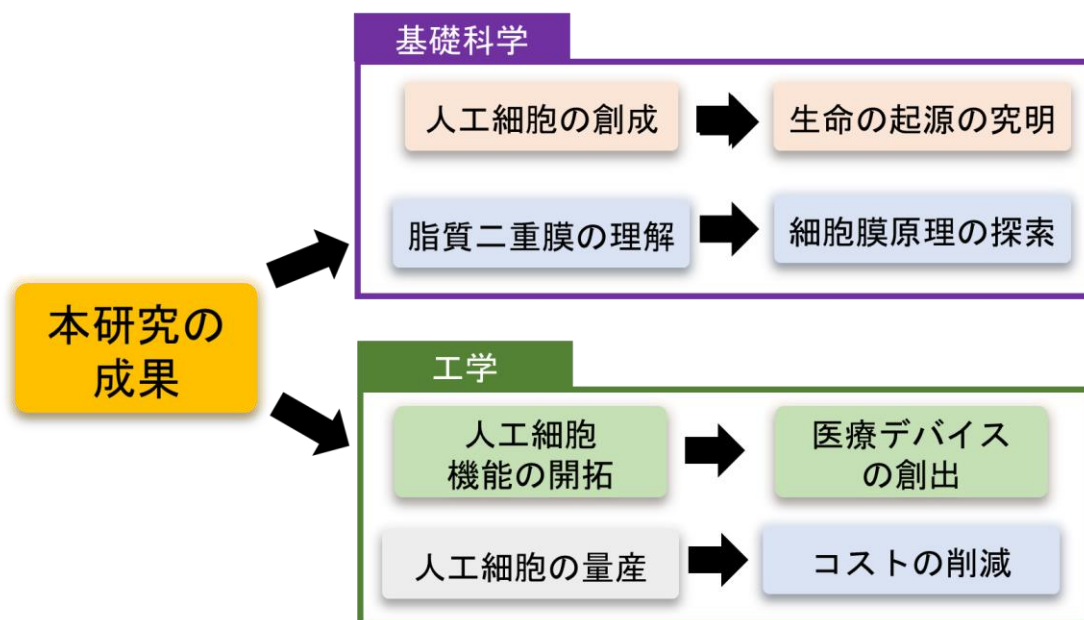


図 6.1 提案手法の今後の展望

参考文献

- Alberts B., Bray D., Lewos J., Raff M., Roberts K., Waston J., : “Molecular Biology of THE CELL 6th edition” , *Garland Science*, 2014
- Antonietti. M.; Forster. S.,” Vesicles and liposomes: A self-assembly principle beyond lipids”, *Advanced Materials*, Vol. 15, pp. 1323-1333, 2003
- Bernard. A.; Guedeau-Boudeveille. M.; Jullien. L.; Meglio. J.,” Raspberry vesicles,” *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, Vol. 1567, pp. 1-5, 2002
- Boyd. M.; Kamat. N.,” Designing artificial cells towards a new generation of biosensors”, *Trends in Biotechnology*, Vol. 39, pp. 927-939, 2021
- Cappella. B.; Kappl. M.,” Force measurements with the atomic force microscope : Technique , interpretation and applications,” *Surface Science Reports*, Vol. 59, pp. 1-152, 2005
- Castellana E., Cremer P., : “ Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design”, *Surface Science Reports*, Vol. 61, No.10, pp. 429 -444, 2006
- Cicuta. P.; Keller. S.; Veatch. S.,” Diffusion of liquid domains in lipid bilayer membranes”, *Journal of Physical Chemistry B*, Vol. 111, pp. 3328-3331, 2007
- Cremer P., Boxer G., : “ Formation and spreading of lipid bilayers on planar glass supports”, *The Journal of Physical Chemistry B*, Vol. 103, No.13, pp. 2554 -2559, 1999
- Dezi. M.; Di Cicco. A.; Bassereau. P.; Levy. D.,” Detergent-mediated incorporation of transmembrane proteins in giant unilamellar vesicles with controlled physiological contents”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, Vol. 110, pp. 7276-7281, 2013
- Dimitrov. S.; Angelova. I.,” Lipid swelling and liposome formation on solid surfaces in external electric fields.”, *Progress in Colloid & Polymer Science*, 2005
- Dominak. L.; Keating. C.,” Polymer encapsulation within giant lipid vesicles”, *Langmuir*, Vol. 23, pp.

7148-7154, 2007

Estes. D.; Mayer. M.,” Electroformation of giant liposomes from spin-coated films of lipids”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 42, pp. 154-164, 2005

Favero. G.; Campanella. L.; Cavallo. S.; D’Annibale. A.; Perrella. M.; Mattei. E.; Ferri. T.,” Glutamate receptor incorporated in a mixed hybrid bilayer lipid membrane array, as a sensing element of a biosensor working under flowing conditions”, *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 127, pp. 8103-8111, 2005

Flory. P.,” Molecular theory of rubber elasticity”, *Polymer Journal*, Vol. 17, pp. 1-12, 1985

Fujiwara. K.; Yanagisawa. M.,” Generation of giant unilamellar liposomes containing biomacromolecules at physiological intracellular concentrations using hypertonic conditions”, *ACS Synthetic Biology*, Vol. 3, pp. 870-874, 2014

Funakoshi. K.; Suzuki. H.; Takeuchi. S.,” Formation of giant lipid vesiclelike compartments from a planar lipid membrane by a pulsed jet flow”, *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 129, pp. 12608-12609, 2007

Furukawa, K.; Aiba, T., “Supported lipid bilayer composition microarray fabricated by pattern-guided self-spreading”, *Langmuir*, Vol. 27, pp. 7341–7344, 2011

Garcia-Manyes. S.; Sanz. F.,” Nanomechanics of lipid bilayers by force spectroscopy with AFM: A perspective”, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, Vol. 1798, pp. 741-749, 2010

Goksu. E.; Vanegas. J.; Blanchette. C.; Lin. W.; Longo. M., ” AFM for structure and dynamics of biomembranes”, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, Vol. 1788, pp. 254-266, 2009

Gozen. I.,” Did solid surfaces enable the origin of life?”, *Life*, Vol. 11, pp. 2-9, 2021

Gozen. I.,” The self-spreading double bilayer Advances in lipid membrane nanotechnology”, *Chalmers University of Technology*, 2013

Gozen. I.; Dommersnes. P.; Jesorka. A.,” Lipid self-spreading on solid substrates”, *Intech open*, 2018

Guidelli. R.; Becucci. L.,” Electrochemistry of Biomimetic Membranes”, *Applications of*

Electrochemistry and Nanotechnology in Biology and Medicine II, pp. 147-266, 2011

Hao, W.; Han, J.; Chu, Y.; Huang, L.; Sun, J.; Zhuang, Y.; Li, X.; Ma, H.; Chen, Y.; Dai, J. “Lower fluidity of supported lipid bilayers promotes neuronal differentiation of neural stem cells by enhancing focal adhesion formation”, *Biomaterials*, Vol. 161, pp. 106–116, 2018.

Hardy, G.; Nayak, R.; Zauscher, S.,” Model cell membranes: Techniques to form complex biomimetic supported lipid bilayers via vesicle fusion”, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, Vol. 18, pp. 448-458, 2013

Helwa, Y.; Dave, N.; Liu, J.,” Electrostatically directed liposome adsorption, internalization and fusion on hydrogel microparticles”, *Softer Matter*, Vol. 9, pp. 6151-6158, 2013

Horger, K.; Estes, D.; Capone, R.; Mayer, M.,” Films of agarose enable rapid formation of giant liposomes in solutions of physiologic ionic strength”, *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 131, pp. 1810-1819, 2009

Horger, K.; Liu, H.; Rao, D.; Shukla, S.; Sept, D.; Ambudkar, S.; Mayer, M.,” Hydrogel-assisted functional reconstitution of human P-glycoprotein (ABCB1) in giant liposomes”, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, Vol. 1848, pp. 643-653, 2015

Izri, Z.; Grenne, D.; Noireaux, V.; Maeda, Y.,” Gene expression in on-chip membrane-bound artificial cells”, *ACS Synthetic Biology*, Vol. 8, pp. 1705-1712, 2019

Jang, H.; Cho, Y.; Granick, S.,” Biologically-active unilamellar vesicles from red blood cells”, *Biomaterials Science*, Vol. 105, pp. 1393-1398, 2019

Janshoff, A.; Steinem, C.,” Mechanics of lipid bilayers: What do we learn from pore-spanning membranes?”, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, Vol. 1853, pp. 2977-2983, 2015

Jesorka, A.; Orwar, O.,” Liposome: Technologies and analytical applications”, *Annual Review of Analytical Chemistry*, Vol. 1, pp. 802-832, 2008

Johson, J.; Ha, T.; Chu, S.; Boxer, S.,” Early steps of supported bilayer formation probed by single vesicle fluorescence assays”, *Biophysical Journal*, Vol. 83, pp. 3371-3379, 2002

Jolling. K.; Vandeven. M.; Eynden. J.; Ameloot. M.; Kerkhove. E.,” Implementation of high quality and easy to use peltier cooled camera: A cost-conscious alternative for assessing isolated perfused mouse proximal tubule fluid absorption properties and apoptosis”, *Journal of Microscopy-Oxford*, Vol. 228, pp. 264-271, 2007

Kamiya. K.; Kawano. R.; Osaki. T.; Akiyoshi. K.; Takeuchi. S.,” Cell-sized asymmetric lipid vesicles facilitate the investigation of asymmetric membranes”, *Nature Chemistry*, Vol. 8, pp. 881-889, 2016

Kang. M.; Day. C.; Kenworthy. A.; DiBenedetto. E.,” Simplified equation to extract diffusion coefficients from confocal FRAP data”, *Traffic*, Vol. 13, pp. 1589-1600, 2012

Karatgekin. E.; Sandre. O.; Guitouni. H.; Borghi. N.; Puech. P.; Brochard-Wyart. F.,” Cascades of transient pores in giant vesicles: Line tension and transport”, *Biophysical Journal*, Vol. 84, pp. 1734-1739, 2003

Katsuta. S.; Okano. T.; Koiwai. K.; Suzuki. H.,” Ejection of large particulate materials from giant unilamellar vesicles induced by electropulsation”, *Langmuir*, Vol. 35, pp. 13196-13024, 2019

Kazakov.,” Lipobeads”, *Intechopen*, 2017

Khan. M.; Dosoky. N.; Mustafa. G.; Patel. D.; Berdiev. B.; Williams. J.,” Electrophysiology of epithelial sodium channel (ENaC) embedded in supported lipid bilayer using a single nanopore chip”, *Langmuir*, Vol. 33, pp. 13680-13688, 2017

Koksal. E.; Liese. S.; Kantarci. I.; Olsson. R.; Carlson. A.; Gozen. I.,” Nanotube-mediated path to protocell formation”, *ACS Nano*, Vol. 13, pp. 6867-6878, 2019

Kunitake. T.; Okahata. Y.,” A totally synthetic bilayer membrane”, *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 99, pp. 3860-3861, 1977

Kurosawa. C.; Fujiwara. K.; Morita. M.; Kawamata. I.; Kawagishi. Y.; Sakai. A.; Murayama. Y.; Nomura. S.; Murata. S.; Takinoue. M.; Yanagisawa. M.,” DNA cytoskeleton for stabilizing artificial cells”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 114, pp. 7228-7233, 2017

Li. Q.; Li. S.; Zhang. X.; Xu. W.; Han.X.,” Programmed magnetic manipulation of vesicles into

spatially coded prototissue architectures arrays”, *Nature Communications*, Vol. 11, pp. 1-9, 2020

Lira. R.; Dimova. R.; Riske. K,” Article giant unilamellar vesicles formed by hybrid films of agarose and lipids display altered mechanical properties”, *Biophysical Journal*, Vol. 107, pp. 1609-1619, 2014

Liu. Z.; Cui. J.; Zhan. P,” Rapid access to giant unilamellar liposomes with upper size control: Membrane-gated, gel-assisted lipid hydration”, *Langmuir*, Vol. 36, pp. 13193-13200, 2020

Lu, J.; Mazidi, H.; Ding, T.; Zhang, O.; Lew, M. D., “Single-Molecule 3D orientation imaging reveals nanoscale compositional heterogeneity in lipid membranes”, *Angewandte Chemie International Edition*. Vol. 59, pp. 17572–17579, 2020

Lu. L.; Schertzer. J.; Chiarot. P,” Continuous microfluidic fabrication of synthetic asymmetric vesicles,”, *Lab on a Chip*, Vol. 15, pp. 3591-3599, 2015

Lu. L.; Schertzer. J.; Chiarot. P,” Continuous microfluidic fabrication of synthetic asymmetric vesicles”, *Lab on a chip*, Vol. 15, pp. 3591-3599, 2015

Majd, S.; Mayer, M., “Hydrogel stamping of arrays of supported lipid bilayers with various lipid compositions for the screening of drug-membrane and protein-membrane interactions”, *Angewandte Chemie International Edition*, Vol. 44, pp. 6697–6700, 2005

Marsh. D.; Jost. M.; Peggion. C.; Toniolo. C,” Lipid chain-length dependence for incorporation of alamethicin in membranes: Electron paramagnetic resonance studies on TOAC-spin labeled analogs”, *Biophysical Journal*, Vol. 92, pp. 4002-4011, 2007

Marsh. D.; Jost. M.; Peggion. C.; Toniolo. C,” Lipid chain-length dependence for incorporation of alamethicin in membranes: Electron paramagnetic resonance studies on TOAC-spin labeled analogs”, *Biophysical Journal*, Vol. 92, pp. 4002-4011, 2007

McPhee. C.; Zorinants. G.; Langbein. W.; Borri. P,” Measuring the lamellarity of giant lipid vesicles with differential interference contrast microscopy”, *Biophysical Journal*, Vol. 105, pp. 1414-1420, 2013

Mey. I.; Stephan. M.; Schmitt. E.; Muller. M.; Amar. M.; Steinem. C.; Janshoff. A,” Local membrane mechanics of pore-spanning bilayers”, *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 131, pp. 7031-

7039, 2009

Miao. L.; Seifert. M.; Wortis. M.; Dobreiner. H.,” Budding transitions of fluid-bilayer vesicles: The effect of area-difference elasticity”, *Physical Review E*, Vol. 49, pp. 5389-5407, 1994

Mikeli. M.; Praper. T.; Demic. R.; Hodnik. V.; Turk. T.; Anderluh. G.,” Electroformation of giant unilamellar vesicles from erythrocyte membranes under low-salt conditions”, *Analytical Biochemistry*, Vol. 3, pp. 1-13, 2013

Moga. A.; Yandrapalli. N.; Dimova. R.; Robinson. T.,” Optimization of the inverted emulsion method for high-yield production of biomimetic giant unilamellar vesicles”, *ChemBioChem*, Vol. 20, pp. 2674-2682, 2019

Mozafari. M.; Mazaheri. E.; Dormiani. K.,” Simple equations pertaining to the particle number and surface area of metallic, polymeric, lipidic and vesicular nanocarriers”, *Scientia Pharmaceutica*, Vol. 89, pp. 1-8, 2021

Nabika. H.; Fukasawa. A.; Murakoshi. K.,” Control of the structure of self-spreading lipid membrane by changing electrolyte concentration”, *Langmuir*, Vol. 22, pp. 10927-10931, 2006

Nissen, J.; Gritsch. S.; Wiegand. G.; Radler, J.,” Wetting of phospholipid membranes on hydrophilic surfaces - Concepts towards self-healing membranes”, *European Physical Journal B*, Vol. 10, pp. 335-344, 1999

Normand. V.; Lootens. D.; Amici. E.; Plucknett. K.; Aymard. P.,” New insight into agarose gel mechanical properties,”, *Biomacromolecules*, Vol. 1, pp. 730-738, 2000

Nweke. M.; Turmaine. M.; McCartney. G.; Bracewell. D.,” Drying techniques for the visualization of agarose-based chromatography media by scanning electron microscopy”, *Biotechnology Journal*, Vol. 12, pp. 1-5, 2017

Reeves. P.; Dowben. M.,” Formation and properties of thin-walled phospholipid vesicles.”, *Journal of Cellular Physiology*, Vol. 73, pp. 49-60, 1969

Reits. E.; Neefies. J.,” From fixed to FRAP: Measuring protein mobility and activity in living cells,”, *Nature Cell Biology*, Vol. 3, pp. E145-E147, 2001

Rideu. E.; Wurm. F.; Landfester. K.,” Self-assembly of giant unilamellar vesicles by film hydration methodologies”, *Advanced Biosystems*, Vol. 3, pp. 1-13, 2019

Robinson, A.; Venero. O.; Adamala. K.,” Toward synthetic life: Biomimetic synthetic cell communication”, *Current Opinion in Chemical Biology*, Vol. 64, pp. 165-173, 2021

Rodriguez. N.; Pincet. F.; Cribier. S.,” Giant vesicles formed by gentle hydration and electroformation: A comparison by fluorescence microscopy.”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 42, pp. 125-130, 2005

Sackmann, J., “Supported membranes: scientific and practical applications”, *Science*, Vol. 271, pp. 43–48, 1995

Saleem. Q.; Liu. B.; Gradinaru. C.; Macdonald. P,” Lipogels: Single-lipid-bilayer-enclosed hydrogel spheres”, *Biomacromolecules*, Vol. 12, pp. 2364-2374, 2011

Sanderson, J., “Resolving the kinetics of lipid, protein and peptide diffusion in membranes”, *Molecular Membrane Biology*, Vol. 29, pp. 118–143, 2012

Sanii. B.; Patrickh. A.,” Surface-energy dependent spreading of lipid monolayers and bilayers,”, *Soft Matter*, Vol. 3, pp. 974-977, 2007

Sato. W.; Zajkowski. T.; Moser. F.; Adamala. K.,” Synthetic cells in biomedical applications”, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, Vol. 14, pp. 1-21, 2022

Schmid. E.; Richmond. D.; Fletcher. D.,” Reconstitution of proteins on electroformed giant unilamellar vesicles”, *Methods in Cell Biology*, Vol. 128, pp. 319-338, 2015

Schmidt. B.,” Hydrophilic polymers”, *Polymers*, Vol. 11, pp. 1-5, 2019

Seantier. B.; Kasemo. B.,” Influence of mono- and divalent ions on the formation of supported phospholipid bilayers via vesicle adsorption,”, *Langmuir*, Vol. 25, pp. 5767-5772, 2009

Shaali. M.; Lara-Avila. S.; Dommersnes. P.; Ainla. A.; Kubatkin. S; Jesorka. A.,” Nanopatterning of Mobile Lipid Monolayers on Electron-Beam-Sculpted Teflon AF Surfaces,”, *ACS Nano*, Vol. 9, pp. 1271-1279, 2015

Shaali. M.; Lara-Avila. S.; Dommersnes. P.; Ainla. A.; Kubatkin. S.; Jesorka. A.,” Nanopatterning of mobile lipid monolayers on electron-beam-sculpted teflon AF surfaces”, *ACS Nano*, Vol. 9, pp. 1271-1279, 2015

Smith, J.; Chowdhry. R.; Booth. M.,” Controlling synthetic cell-cell communication”, *Frontiers in Molecular Biosciences*, Vol. 8, pp. 1-9, 2022

Song. X.; Zhou. Z.; Yu. Y.; Deng. N.,” Microfluidic production of liposomes through liquid-liquid phase separation in ternary droplets”, *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 2021

Stano. P.,” Is research on “synthetic cells” moving to the next level?”, *Life*, Vol. 9, pp. 2-29, 2019

Stein, H.; Spindler. N.; Bonakdar. N.; Wang. C.; Sandoghdar. V.,” Production of isolated giant unilamellar vesicles under high salt concentrations”, *Frontiers in Physiology*, Vol. 8, pp. 1-16, 2017

Steltenkamp. S.; Muller. M.; Desemo. M.; Hennesthal. C.; Steinem. C.; Janshoff. A.,” Mechanical properties of pore-spanning lipid bilayers probed by atomic force microscopy”, *Biophysical Journal*, Vol. 91, pp. 217-226, 2006

Sullan. R.; Shi. W.; Chan. H.; Li. J.; Walker. G.,” Mechanical stability of phase-segregated multicomponent lipid bilayers enhanced by PS-b-PEO diblock copolymers”, *Soft Matter*, Vol. 9, pp. 6245-6253, 2013

Suzuki. K.; Masuhara.H.,” Groove-spanning behavior of lipid membranes on microfabricated silicon substrates”, *Langmuir*, Vol. 21, pp. 6487-6494, 2005

Swaay. D.; demello. A.,” Giant vesicles: Preparations and applications”, *Lab on a Chip*, Vol. 13, pp. 752-767, 2013

Tamm, L.; McConnell, H., “Supported phospholipid bilayers”, *Biophysical Journal*, Vol. 47, No. 1 pp. 105–113, 1985

Tamura, F.; Tanimoto, Y.; Nagai, R.; Hayashi, F.; Morigaki, K., “Self-spreading of phospholipid bilayer in a patterned framework of polymeric bilayer”, *Langmuir*, Vol. 35, 149696–114703, 2019

Tarun. O.; Eremchev. M.; Roke. S.,” Interaction of oil and lipids in freestanding lipid bilayer

membranes studied with label-free high-throughput wide-field second-harmonic microscopy”, *Langmuir*, Vol. 34, pp. 11305-11310, 2018

Tero R., : “ Substrate effects on the formation process, structure and physicochemical properties of supported lipid bilayers”, *Materials*, Vol. 5, No.12, pp. 2658 -2680, 2012

Tero. R.; Watanabe. H.; Urisu. T.,” Supported phospholipid bilayer formation on hydrophilicity-controlled silicon dioxide surfaces”, *Physical Chemistry Chemical Physics*, Vol. 8, pp. 3885-3894, 2006

Tsai. F.; Stuhmann. M.; Koenderink. G.,” Encapsulation of active cytoskeletal protein networks in cell-sized liposomes”, *Langmuir*, Vol. 27, pp. 10061-10071, 2011

Tsuji. G.; Sunami. T.; Ichihashi. N.,” Production of giant unilamellar vesicles by the water-in-oil emulsion-transfer method without high internal concentrations of sugars”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 126, pp. 540-545, 2018

Viallat. A.; Dalous. J.; Abkarian. M.,” Giant lipid vesicles filled with a gel: shape instability induced by osmotic shrinkage”, *Biophysical Journal*, Vol. 86, pp. 2179-2187, 2004

Walde. P.,” Building artificial cells and protocell models: Experimental approaches with lipid vesicles”, *BioEssays*, Vol. 32, pp. 296-303, 2010

Walde. P.; Cosentino. K.; Engel. H.; Stano. P.,” Giant vesicles: Preparations and applications”, *ChemBioChem*, Vol. 11, pp. 848-865, 2010

Walker. S.; Packard. N.; Cody. G.,” Re-conceptualizing the origins of life”, *Philosophical Transactions A*, Vol. 375, pp. 1-10, 2017

Watanabe. R.; Soga. N.; Fujita. D.; Tabata. K.; Yamauchi. L.; Kim. S.; Asanuma. D.; Kamiya. M.; Urano. Y.; Suga. H.; Noji. H.,” Arrayed lipid bilayer chambers allow single-molecule analysis of membrane transporter activity”, *Nature Communications*, Vol. 5, pp. 1-8, 2014

Weinberger. A.; Tsai. F.; Koenderink. G.; Schmidt. T.; Itri. R.,” Gel-assisted formation of giant unilamellar vesicles”, *Biophysical Journal*, Vol. 105, pp. 154-164, 2013

Xu. X.; Ottova. A.; Tien. H.,” Biophysical aspects of agar-gel supported bilayer lipid membranes: a new method for forming and studying planar bilayer lipid membranes”, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, Vol. 39, pp. 285-289, 1996

Yan. T.; Zhou. Y.; Zhang. X.; Li. D.; Guo. X.; Yang. D.,” Hydrogen bond interpenetrated agarose/PVA network: A highly ionic conductive and flame-retardant gel polymer electrolyte”, *ACS Applied Materials and Interfaces*, Vol. 13, pp. 9856-9864, 2021

荒磯恒久：“膜脂質の流動性と膜タンパク質の動態”，*膜*, Vol.19, No. 1, pp. 3-13, 1994

坂西明郎：“脂質膜の相転移レオロジー”，*日本バイオレオロジー学会誌*, Vol.12, No. 2, pp. 90-98, 1998

並河英紀，瀧本麦，佐々木敦史，深沢明久，村越敬：“二次元規則配列金属ナノギャップによる脂質二分子膜の自発展開ダイナミクス制御と分子分別現象の発現”，*表面科学*, Vol.28, No. 9, pp. 518-624, 2007

業績

1) 学術雑誌等に発表した論文

- [1] **Z. Peng**, K. Shimba, Y. Miyamoto, T. Yagi. “A Study of the Effects of Plasma Surface Treatment on Lipid Bilayers Self-Spreading on a Polydimethylsiloxane Substrate under Different Treatment Times”, *Langmuir*, Vol. 141, vol.37, 36, pp.10732-10740, 2021.8.
- [2] **Z. Peng**, K. Wada, K. Shimba, Y. Miyamoto, T. Yagi. “Formation of Agarose-supported Liposomes by Polymer-assisted Method toward Biosensor”, *IEEJ Transactions on Electrical and Electronic Engineering*, Vol. 141, No. 5, pp.646 - 653, 2021.
- [3] S. Kanno, **Z. Peng**, K. Shimba, Y. Miyamoto, T. Yagi. “Functional Analysis of Liposomes Containing Single-Walled Carbon Nanotubes (SWNTs) by Fluorescence Microscopy, “Formation of Agarose-supported Liposomes by Polymer-assisted Method toward Biosensor”, *IEEJ Transactions on Electrical and Electronic Engineering*, Vol. 141, No. 5, pp. 620 – 626, May, 2021.
- [4] Y. Kiriwara, H. Miyata, **Z. Peng**, K. Shimba, Y. Miyamoto, K. Shimizu, H. Honda, T. Yagi. “Effect of Magnetic Nanoparticle Internalization on Cell Density in Skeletal Muscle Tissue”, *IEEJ Transactions on Electrical and Electronic Engineering*, Vol. 141, No. 7, pp. 795-801, May, 2021.
- [5] H. Miyata, **Z. Peng**, K. Shimba, Y. Miyamoto, T. Yagi. “Development of Novel ECM which has Stiffness Difference based on Hydrogel Beads”, *Electronics and Communications in Japan*, Vol. 141, No. 5, pp. 607–613, 2021.
- [6] **Z. Peng**, K. Shimba, Y. Miyamoto, T. Yagi. “Nanopore-spanning lipid bilayer formed by self-spreading method”, *Electronics and Communications in Japan*, Vol. 102, No. 12, pp. 47–54, 2019.

2) 国際会議における発表

- [1] **Z. Peng**, S. Kanno, K. Shimba, Y. Miyamoto, T. Yagi, “Preparation of Size-controlled Giant Vesicles under Physiological Condition”, Proceedings of 42nd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Montreal (EMBC), 2020
- [2] **Z. Peng**, K. Shimba, Y. Miyamoto, T. Yagi, “Preparation of giant lipobeads using a gel-assisted swelling method”, 12 th Biomedical Engineering International Conference (BMEiCON), 2019

[3] **Z. Peng**, K. Shimba, Y. Miyamoto, T. Yagi, “Nanopore-spanning lipid bilayer formed by self-spreading method”, 11th Biomedical Engineering International Conference (BMEiCON), 2018

[4] **Z. Peng**, K. Shimba, Y. Miyamoto, T. Yagi, ” Self-Spreading of Lipid Bilayer on Microfabricated Hydrogel Pattern toward Biosensor Application”, International Conference on BioSensors, BioElectronics, BioMedical Devices, BioMEMS/NEMS and Applications (Bio4Apps), 2017

3) 国内会議における発表

①筆頭または登壇者

[1] 「生体適合性が高い細胞内刺激電極の実現に向けた 細胞膜貫通 DNA ナノチューブの開発」, **彭祖癸**, 榛葉 健太, 宮本 義孝, 八木 透, 2021 年電気学会 電子・情報・システム部門大会, 富山, 2021.9

[2] 「PDMS 表面における脂質膜の自発展開」, **彭祖癸**, 榛葉 健太, 宮本 義孝, 八木 透, 第 68 回 応用物理学会春季学術講演会, オンライン, 2021.5

[3] 「均一サイズを有する人工細胞の作製技術に関する研究」, **彭祖癸**, 榛葉 健太, 宮本 義孝, 八木 透, 生体医工学会関東支部若手研究者発表会 2020, オンライン, 2020.12

[4] 「Size control of giant liposomes by a hydrogel-coated microarray chip」, **彭祖癸**, 榛葉 健太, 宮本 義孝, 八木 透, 第 59 回日本生体医工学会大会, 岡山, 2020.5

[5] 「支持基板親水性が脂質二重膜の自発展開層数における影響の検討」, **彭祖癸**, 榛葉 健太, 宮本 義孝, 八木 透, 第 67 回 応用物理学会春季学術講演会, 東京, 2020.3

[6] 「自発展開法を利用した PDMS 表面上での脂質膜の層数制御」, **彭祖癸**, 榛葉 健太, 宮本 義孝, 八木 透, 生体医工学会関東支部若手研究者発表会 2019, 東京, 2019. 12

[7] 「Gel-supported giant liposome formed by hybrid films of agarose and lipids」, **彭祖癸**, 榛葉 健太, 宮本 義孝, 八木 透, 2019 年 電気学会 電子・情報・システム部門大会, 沖縄, 2019.9

[8] 「親水化 PDMS 表面上での基板支持型脂質二重膜のパターニング」, **彭祖癸**, 榛葉 健太, 宮本 義孝, 八木 透, 第 66 回 応用物理学会春季学術講演会, 東京, 2019.3

[9] 「親水化 PDMS 上での自発展開法による脂質二重膜の作製」, **彭祖癸**, 榛葉 健太, 宮本 義孝, 八木 透, 生体医工学会関東支部若手研究者発表会 2018, 東京, 2018.12

[10] 「ノナポア支持型脂質二重膜の自発展開法」, **彭祖癸**, 榛葉 健太, 宮本 義孝, 八木 透, 平成 30 年度電気学会 電子情報システム部門大会, 札幌, 2018.9

[11] 「自発展開法による多孔質フィルム支持型脂質二重膜の形成」, **彭祖癸**, 榛葉 健太, 宮本 義孝, 八木 透, 平成 29 年度電気学会 医用・生体工学研究会, 東京, 2018.3

[12] 「膜タンパク質アッセイ系を目指したゲル支持二重膜の自発展開法の開発」, **彭祖癸**, 榛葉 健太, 宮本 義孝, 八木 透, 第 17 回再生医療学会総会, 東京, 2018.3

[13] 「自発展開法によるハイドロゲル上への人工脂質二重膜の形成」, **彭祖癸**, 榛葉 健

太, 宮本 義孝, 八木 透, 平成 29 年度電気学会 電子情報システム部門大会, 高松, 2017.9

②その他

[1] 「放出促進剤を内包するリポソームと超音波を用いた DDS に関する研究」, 田貝 優紀音, 梶江 佳乃, **彭祖癸**, 榛葉 健太, 宮本 義孝, 柴田 孝, 八木 透, 2021 年電気学会 電子・情報・システム部門大会, 富山, 2021.9

[2] 「磁性粒子を用いた ECM ハイドロゲルの細胞挙動に関する研究」, 下村 裕哉, 桐原 佑司, **彭祖癸**, 榛葉健太, 宮本義孝, 八木 透, 2021 年電気学会 電子・情報・システム部門大会, 富山, 2021.9

[3] 「生物電池の開発に向けた液滴ネットワークの電気特性に関する研究」, 本郷 光太郎, **彭祖癸**, 榛葉 健太, 宮本 義孝, 八木 透, 第 60 回日本生体医工学会大会, 京都, 2020.6

(他 22 件)

4) 受賞歴

[1] 2019 電気学会 電子・情報・システム部門大会 Outstanding Presentation Award, **彭祖癸**, 2019.9

5) 外部研究資金獲得実績

[1] 文部科学省 科学研究費補助金 日本学術振興会特別研究員奨励費, 「DNA ナノチューブを利用した高い生体適合性を有する細胞内刺激電極アレイの研究開発」, **研究代表者**, 2021-2023

[2] 村田学術振興財団 研究調査助成, 「DNA ナノチューブのブレインマシンインターフェースへの応用の開拓」, **研究代表者**, 2021-2022

[3] 電気通信普及財団 研究調査助成, 「革新的なブレインマシンインターフェースの創出に向けた細胞内刺激電極の研究開発」, **研究代表者**, 2021-2022

[4] 立石科学技術振興財団 研究助成 (C), 「人工細胞膜と受容体タンパク質を利用した脳神経インタフェースの開発」, **研究代表者**, 2020-2023

謝辞

本研究を進めるに当たり、多くの方々にお世話になりました。

八木透教授には、学士課程から6年にわたりご支援とご指導を賜りました。研究者としての考え方だけでなく、教育者としての心構えや技術者としての生き方など、先生から教わったことを数えだすときりがないほど沢山あります。これらのすべてが、間違いなく今の自分につながっていると思います。本当にありがとうございました。

林智広准教授には、私をインターンシップ生として温かく受け入れていただきました。林研では界面科学に関する様々な知識と技術だけでなく、研究室の運営の仕方や論文のまとめ方など様々なことを学ばせていただきました。また、**林研の皆様**には研究を進める上で、様々なタイミングで助けていただきました。林研でのインターンシップ生活は私にとって貴重な財産だと思います。深く感謝申し上げます。

国立成育医療研究センター 宮本義孝上級研究員には、本研究のゼロから見ていただきました。医療関係従事者ならではの視点から、研究の様々な方向への発展性を示してくださいました。また、研究者としてのキャリアについて何度も相談させていただきました。私の学生生活に彩りを与えてくださったことに深く感謝の意を表します。

東京大学 榛葉健太助教には、研究に関わるすべてを一から教えていただきました。元々学部卒で就職することを考えていた私は、先生の研究に対する情熱に憧れて、研究者の道を志しました。夢の原点を与えてくださったこと、心より感謝を申し上げます。今後も、共同研究などで一緒にお仕事ができたら幸いです。

清水優史名誉教授には、何度も食事をご一緒にさせていただき、多くの人生哲学を学ばせていただきました。研究で躓いて落ち込んだ時、先生のお言葉を思い出して立ち直ったことが多々ありました。深謝申し上げます。

オープンファシリティセンターの皆様には、実験装置の原理や実験のテクニックなどについて沢山のことを教わりました。本研究は皆様なしでは決して完成できなかったと思います。厚く御礼申し上げます。

八木研究室の先輩、同期および後輩の皆様には、様々な場面で助けていただきました。皆様のおかげで、充実した研究生活をできたと思います。大変感謝しております。

最後に、いつも温かく支えてくれた両親に心より感謝いたします。

ありがとうございました。

2022年6月