

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	巨大脂質二重膜小胞における超短カーボンナノチューブチャンネル形成の研究
Title(English)	
著者(和文)	菅野翔一郎
Author(English)	Shoichiro Kanno
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12820号, 授与年月日:2024年6月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:八木 透,柳田 保子,林 智広,高山 俊男,石田 忠
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12820号, Conferred date:2024/6/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

2024 年度
学位論文

巨大脂質二重膜小胞における
超短カーボンナノチューブ
チャンネル形成の研究

工学院機械系ライフエンジニアリングコース
菅野 翔一郎

指導教員 八木 透 教授



目次

第 1 章 緒 論.....	3
1.1 はじめに.....	3
1.2 巨大脂質二重膜小胞.....	4
1.3 GUV の応用.....	6
1.4 脂質二重膜を介した分子伝達.....	9
1.5 超短カーボンナノチューブチャンネル.....	10
1.6 本研究の目的.....	12
1.7 本論文の構成.....	13
第 2 章 超短 CNT の作製.....	15
2.1 緒言.....	15
2.2 超短 CNT の作製.....	17
2.3 超短 CNT の特性評価.....	20
2.4 脂質二重膜への超短 CNT 挿入評価.....	24
2.5 結言.....	28
第 3 章 超短 CNT 挿入による GUV 変形解析.....	29
3.1 緒言.....	29
3.2 GUV の作製.....	30
3.3 GUV への超短 CNT 曝露.....	33
3.4 脂質二重膜と超短 CNT の相互作用.....	35
3.5 GUV の変形解析.....	39
3.6 結言.....	43
第 4 章 GUV のイオン透過性評価手法の開発.....	44

4.1 緒言	44
4.2 超短 CNT 挿入 GUV の作製	47
4.3 蛍光顕微鏡を用いた GUV 膜のイオン透過性評価	48
4.3.1 原理実証	48
4.3.2 超短 CNT 濃度とイオン透過性の関係	56
4.4 結言	60
第 5 章 結論	61
5.1 本論文のまとめ	61
5.2 今後の課題と展望	63
参考文献	66
業績	76
謝辞	80

第1章 緒 論

1.1 はじめに

巨大脂質二重膜小胞 (Giant Unilamellar Vesicle; GUV) は、細胞由来の分子を内包することで、生物学的機能を模倣するボトムアップな人工細胞の構築に用いられてきた。生物学的プロセスや生命の起源の探求を目的とした人工細胞研究のみならず、GUV は外部環境から隔離された微小空間を提供可能であるため、生物学を参考にしたマイクロリアクタやバイオセンシングの開発においても重要なツールとなっている。GUV を基盤としたシステムにおいては、単一 GUV 内のシステム構築にとどまらず、GUV 内での化学反応の出力を他の GUV や細胞に入力する機能が重要である。典型的に GUV を利用したシステムにおいては、ターゲットへの分子伝達経路として、膜タンパク質などによって膜に形成したチャネルを通して GUV 外部へ分子を放出する。そのため、GUV-GUV 間、GUV-細胞間の分子情報伝達には、両者をつなぐチャネルの形成が必要となる。こうした背景に対し、数十 nm の長さに切断されたカーボンナノチューブ (Carbon Nanotube: CNT) である超短 CNT は、小胞間をつなぐチャネルを形成できることが可能である。一方で超短 CNT は GUV に形成された報告がほとんどなく、GUV への適用は未知数である。そこで本研究ではチャネル形成にともなう GUV 膜形態への影響の評価を通して、超短 CNT チャネルを有する GUV 作製における知見を得ることを目指す。さらに、超短 CNT の主な透過物質であるイオンの透過性について、チャネルを GUV に形成した状態で評価する手法の開発を行い、GUV 膜のイオン透過性評価に役立てる。以上を持って、GUV 間における超短 CNT を用いた分子伝達経路構築のための知見を得ることを目指す。

本章では GUV を基盤とする技術について説明し、GUV 間の分子伝達における超短 CNT の必要性について述べる。さらに GUV への超短 CNT チャネル形成における課題について提示した後、本研究の目的について述べ、論文全体の構成を示す。

1.2 巨大脂質二重膜小胞

脂質二重膜は細胞膜の基礎的な構造であり、脂質によって構成される二分子膜である。脂質分子が水性溶媒中で自発的に二分子膜を形成するのは、脂質の中で主な割合を占めるリン脂質分子の両親媒性に起因する。リン脂質分子は、親水性の頭部と疎水性の尾部を持ち (Figure1.1), 水性溶媒中では疎水性尾部を内側に向かい合わせて、外側に親水性頭部を向けたサンドイッチ型の構造をとる (Figure1.2)。これは、両親媒性分子を水中に分散させると、水分子はリン脂質の非極性部分とは結合せず、水分子同士で水素結合を形成することで、結果的にエネルギーが最安定となるようにリン脂質分子の疎水性部分が向かい合わせになるように集まるためである (疎水性相互作用)。脂質二重膜中において、個々の脂質分子は自由に拡散できる (脂質二重膜の流動性)。これにより、膜に存在する様々なタンパク質の移動を可能にするという細胞膜としての性質を備えている。

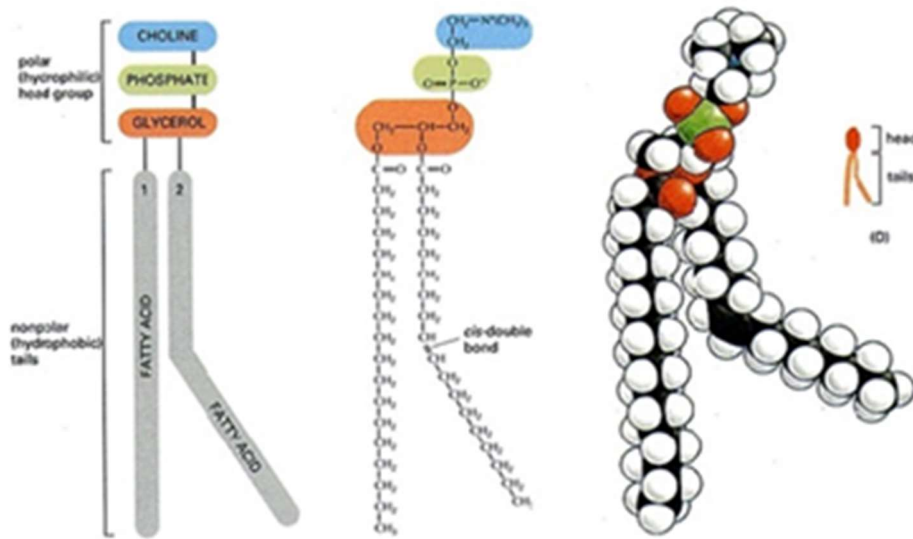


Figure1.1 Conceptual diagram of lipid molecule (phosphocholine)¹

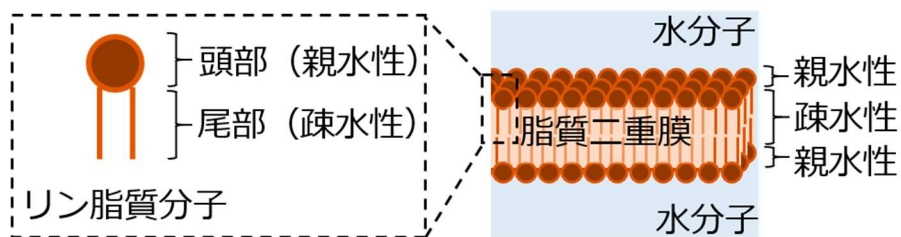


Figure1.2 Conceptual diagram of lipid bilayer.

脂質二重膜小胞は主に脂質二重膜で構成された小胞である。基板上や孔に形成される平面状の脂質二重膜とは異なり、支持体のない膜によって閉じられた独立した構造が特徴である。脂質二重膜小胞はその粒径と層数によって、膜が単層で粒径が 100 nm 以下の Small Unilamellar Vesicle (SUV), 100 nm ~ 1 μm の Large Unilamellar Vesicle (LUV), 1 μm 以上の Giant Unilamellar Vesicle (GUV), そして多層の膜を持つ Multilamellar Vesicle (MLV), Multivesicular Vesicle (MVV) に分けられる (Figure1.3) ^{2,3}.

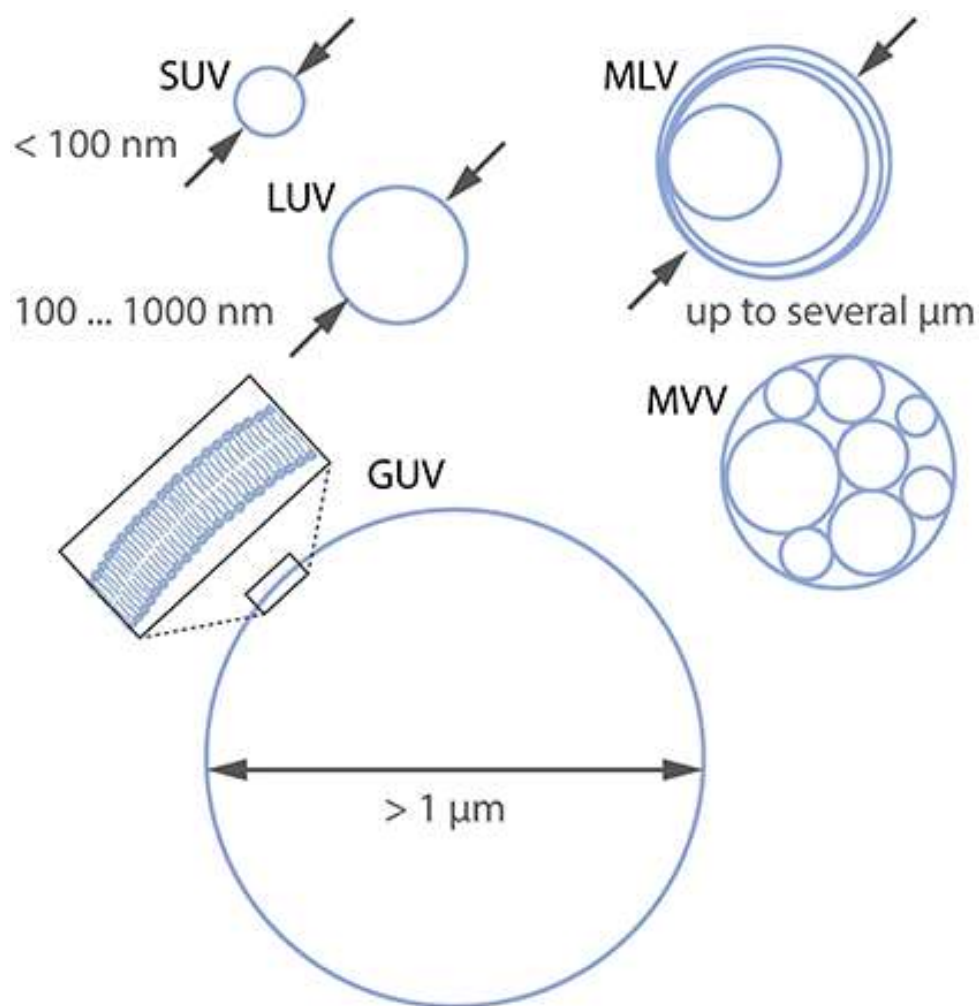


Figure1.3 Conceptual diagram of lipid bilayer vesicles².

1.3 GUV の応用

GUV は粒径が細胞と同様の大きさであるために細胞膜のモデルとして、長らく膜特性の評価⁴、タンパク質と膜の相互作用の観察⁵等へ用いられてきた。合成生物学の分野では、GUV が脂質二重膜によって外部環境から隔離された環境を提供できるため、生体細胞由来あるいは合成分子を内包した GUV がボトムアップ型の人工細胞の骨組みとして多用されている。人工細胞は生物学的プロセスや生命の起源の探求を目的として作製され、代謝、分裂、分子検知、遺伝子発現といった生細胞の特定の機能を再現可能である (Figure1.4)^{6,7}。

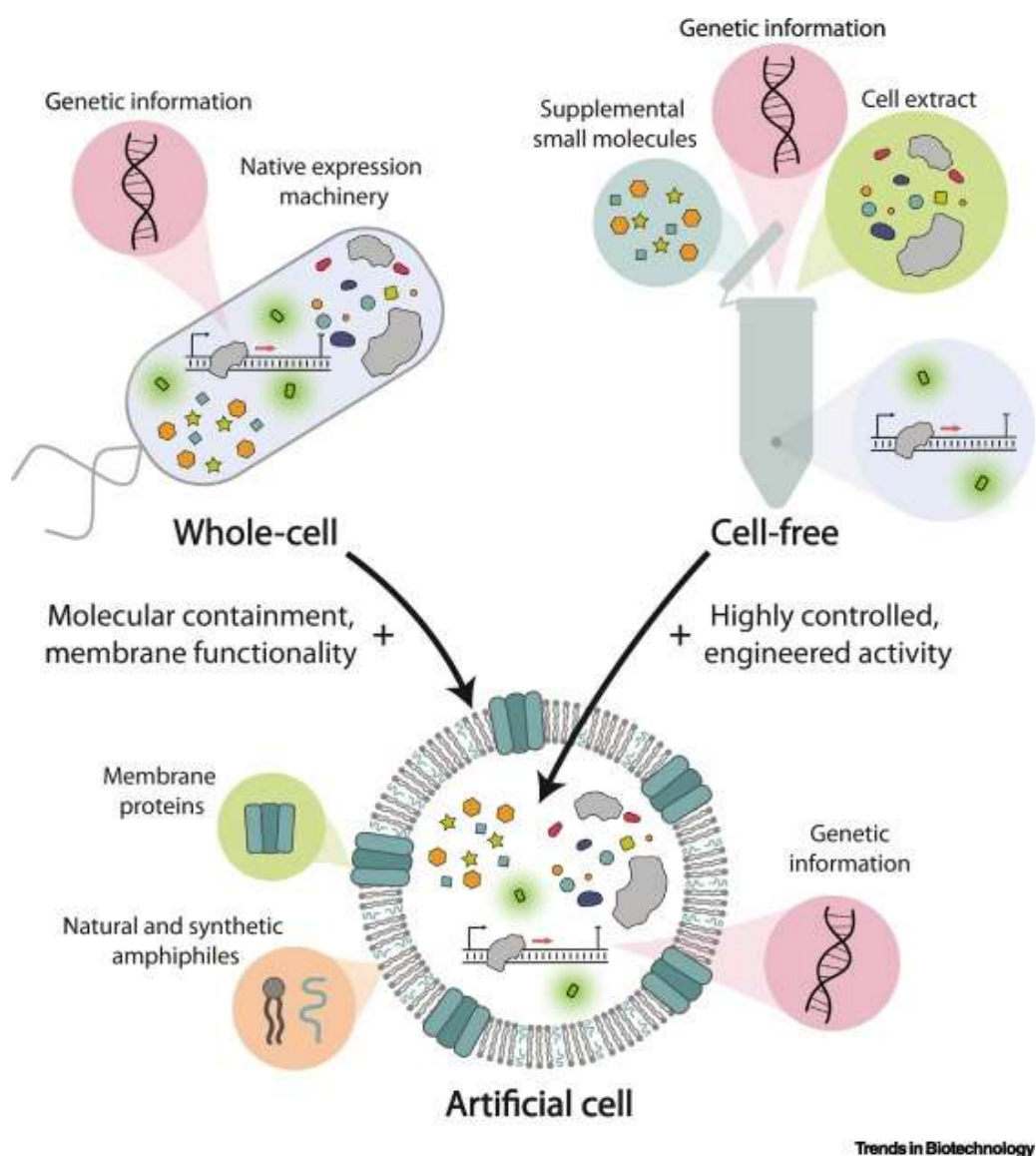


Figure1.4 Conceptual diagram of artificial cell⁸.

生細胞の機能以外にも、内部に所望の機能と特性を持つように GUV 内に化学反応プロセスを構築することで、薬物送達⁹、分子検知¹⁰⁻¹²、タンパク質合成^{13, 14}等の機能を達成する分子システムの研究が行われており、生分解性と生体適合性を有する革新的なバイオデバイスへの応用が期待できる (Figure1.5)。近年では、個々の GUV 内でのシステム構築のみならず、細胞組織における細胞間コミュニケーションを模倣した小胞間での分子コミュニケーションに焦点が当たっている^{15, 16}。独立した反応区画である複数の GUV 間で分子伝達を行うことで、カスケード反応のような複雑な化学反応経路を開発できる。また医薬品・医療機器開発の新しいアプローチとして GUV・生細胞間の分子コミュニケーションも検討されている。そのため、GUV-GUV^{17, 18}あるいは小胞-細胞¹⁹間の分子伝達システムの構築に取り組む研究が行われてきた (Figure1.6)。

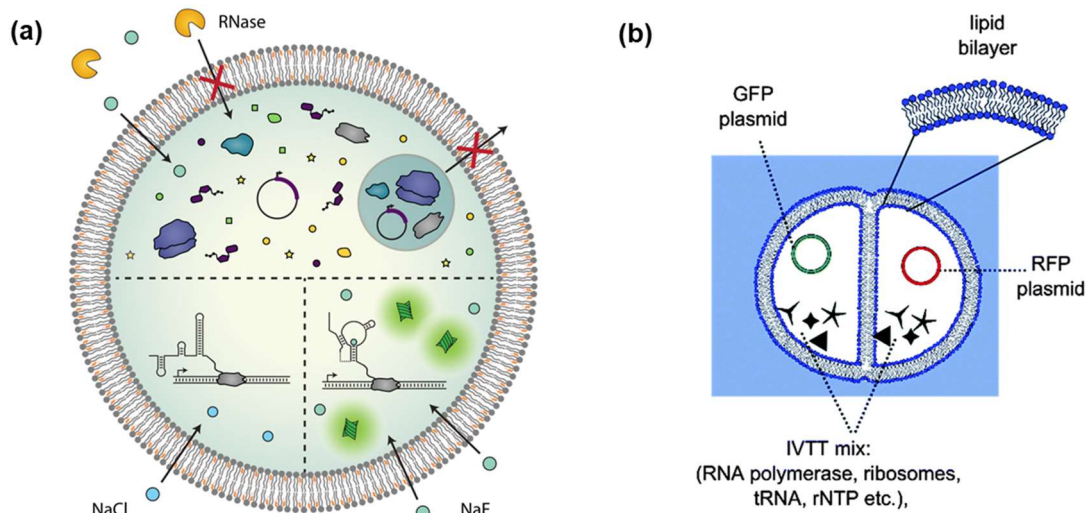


Figure1.5 Conceptual diagrams of GUV-based devices. (a) GUV designed to detect sodium fluoride¹¹. (b) Compartmentalized GUV for individual protein synthesis¹⁴.

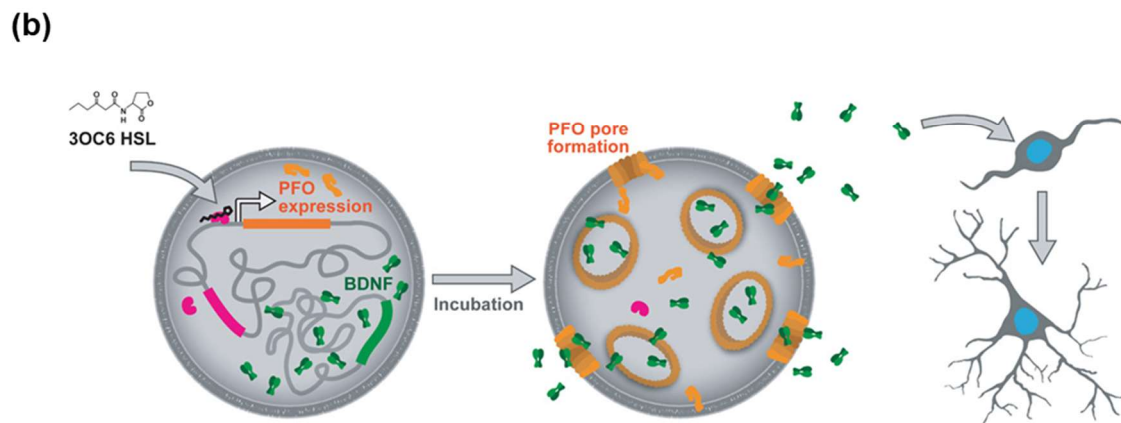
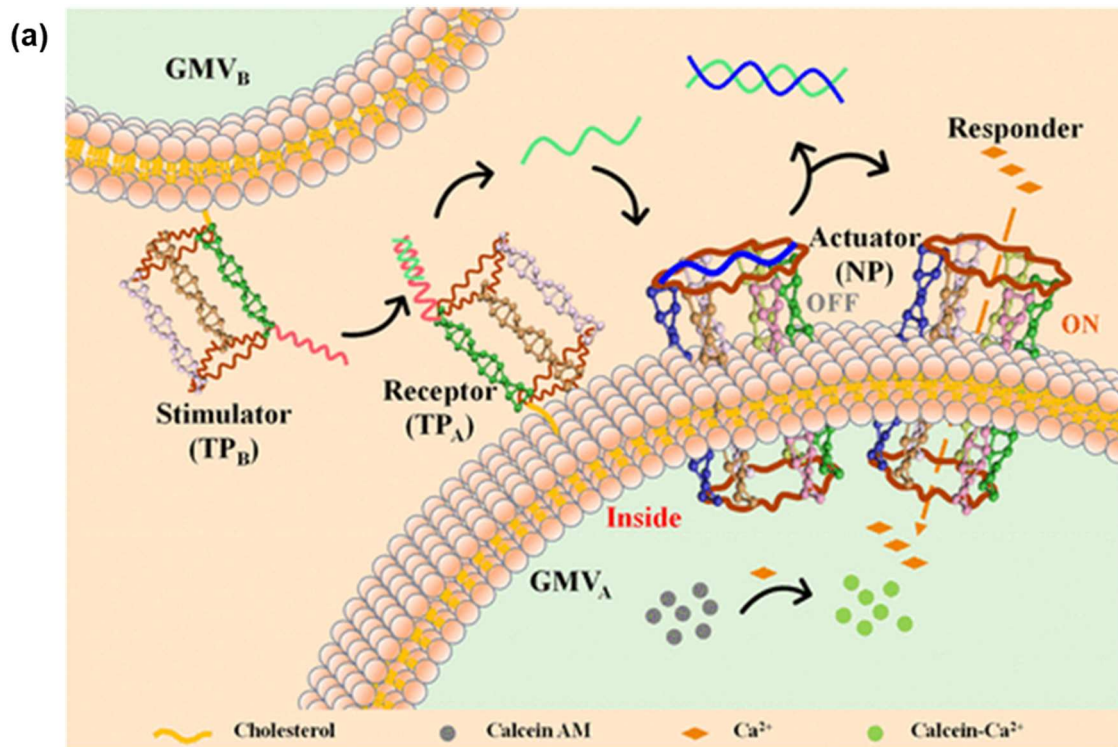


Figure 1.6 Conceptual diagrams of molecular transfer systems between (a) GUV-GUV¹⁸ or (b) GUV-cell²⁰.

1.4 脂質二重膜を介した分子伝達

GUV-GUV, GUV-細胞間の分子伝達において, GUV 内での化学反応の出力を他の GUV や細胞に入力するには脂質二重膜を介して物質が拡散する必要がある. 典型的に GUV を利用したシステムにおいては, 標的への分子伝達経路として, ナノメートル径の孔であるチャンネルを膜に形成する α -hemolysin などの膜タンパク質を通して, GUV 外部へ分子を放出する. 分子が GUV から放出されると, 標的に到達するために拡散する. この過程で分子が外部環境へも分散し, 標的に到達する分子信号は減衰する. したがって, 分子シグナルの効率的な利用を達成するには, 送り手である GUV と標的との間に外部への拡散を含まない直接的な分子伝達経路を構築する必要がある. このような経路としては生体内に存在するギャップ結合がある. ギャップ結合はコネキシンという膜タンパク質によって構成され, 隣接した細胞間をつなぐチャンネルを形成する¹. ギャップ結合を GUV と細胞間に形成し, 標的選択的薬物送達システムとして利用する研究も存在するものの^{21,22}, コネキシンはその半減期の短さ²³や発現の難しさにより, GUV を基盤としたシステムへの適用は困難である.

一方でチャンネルは, ペプチド²⁴, 合成材料²⁵, DNA²⁶など, タンパク質以外の材料で人工的に作製することが可能である. これまでに, 生体中に存在するチャンネルタンパク質の機能を模倣する, もしくは意図したとおりの機能を発揮するように設計されたチャンネルが開発されてきた. その中でコネキシンの細胞間を接続して分子伝達を行う機能を模した人工チャンネルも開発された.

1.5 超短カーボンナノチューブチャネル

CNT はギャップ結合様の分子伝達経路を構築できることが知られている²⁷。CNT は直径数~数十 nm の中空チューブ状の炭素素材である²⁸。炭素の六員環構造でできたグラファイト層を丸めたような構造を持っており、特有の機械的,物理的,化学的特性を有する²⁹。構造としては、炭素原子の層が一つの単層カーボンナノチューブ (Single-walled Carbon Nanotube: SWCNT) と、同心円状に複数の層が重なった多層カーボンナノチューブ (Multi-walled Carbon Nanotube: MWCNT) に大別される (Figure1.7)³⁰。近年では数~数十 nm の長さに切断された超短 CNT が、細胞膜や人工細胞膜といった脂質二重膜に自発的に挿入できることが報告された (Figure1.8)³¹。さらに中空構造内部を通して分子が透過できるという CNT の性質を利用して、人工的なチャネルとして利用でき、イオンや小分子の透過、電気泳動を利用した単鎖 DNA の輸送が可能である。さらに脂質二重膜の厚さである 4 nm よりもチャネルの長さが長い超短 CNT は¹、他の人工チャネルとは異なり小胞間をまたぐように挿入でき³¹、その状態でカルシウムイオン (Ca^{2+}) がチャネルを通して拡散することが報告されている²⁷。

これまでの超短 CNT に関わる研究はチャネルとしての機能や、膜との相互作用といったナノスケールでの現象について焦点が当たっていたこともあり、透過電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope: TEM) 観察や光学計測が行いやすい数百 nm 径の LUV や、電氣的計測や原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscope: AFM) 観察と相性のよい平面膜といった形態が、超短 CNT を挿入する脂質二重膜として選択されてきた³¹⁻³⁵。一方で超短 CNT を GUV に挿入してチャネルとして利用した試みはほとんどない。したがって、GUV への超短 CNT チャネルの適用はいまだ未知数である。特に平面膜とは異なる閉じた構造体であり、LUV とは曲率が異なる GUV において超短 CNT が及ぼす膜形態への影響を調査することは重要である。また GUV において超短 CNT がチャネルを形成し、分子透過、特に超短 CNT を透過できる物質として代表的なイオンの透過が可能であることを計測するための手法開発も必要となる。

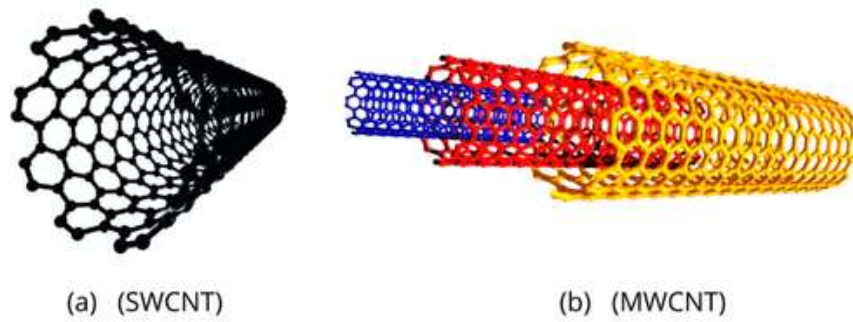


Figure 1.7 Conceptual diagrams of CNT. (a)SWCNT. (b)MWCNT³⁰.

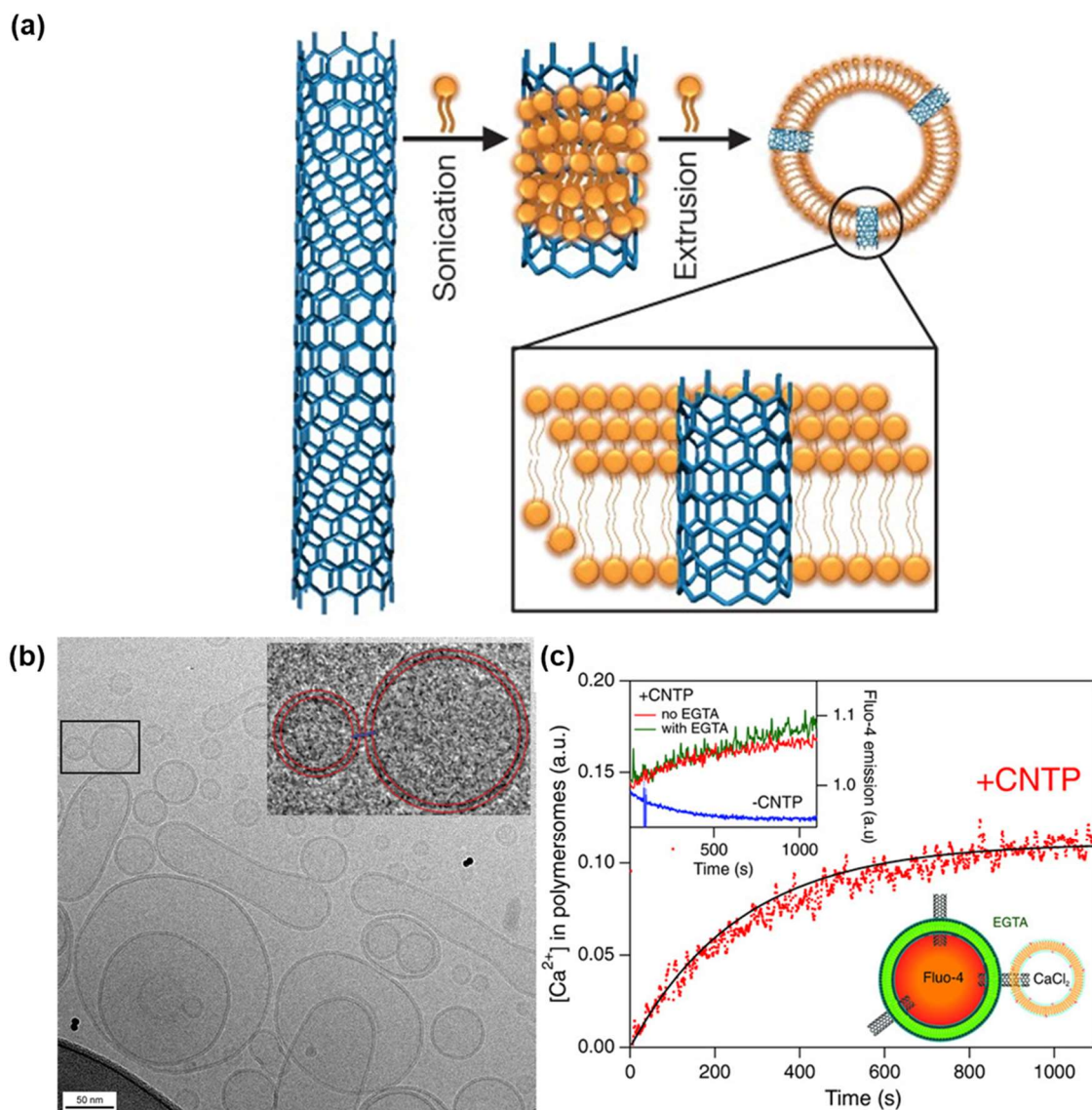


Figure 1.8 Ultrashort CNT. (a) Conceptual diagrams of ultrashort CNT³¹. (b) Cryo-transmission electron microscope image of LUVs connected by ultrashort CNTs³¹. (c) Transport of Ca^{2+} between two vesicles through ultrashort CNTs²⁷.

1.6 本研究の目的

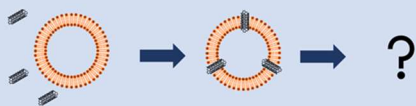
前節までに、GUV を基盤としたデバイスにおける小胞間の分子伝達経路において超短 CNT チャンネルが有用であるものの、GUV における超短 CNT の形成についての試みがほとんどないことが課題であることを述べた。したがって、GUV における超短 CNT チャンネルの形成を本研究の目的とする。目的達成にあたり、まず超短 CNT が GUV の膜形態に及ぼす影響について、蛍光顕微鏡による GUV の膜形状観察を行うことで、そのメカニズムについて考察する。さらに GUV における超短 CNT チャンネルのイオン透過性能を評価するために、蛍光プローブと蛍光顕微鏡を用いた計測手法を開発する。(Figure1.9).

GUV間の分子コミュニケーションにおける 超短CNTチャンネルの有用性



GUV膜への超短CNTチャンネル形成

超短CNT挿入によって
誘引されるGUVの変形解析



超短CNT挿入GUVの
イオン透過性評価手法の開発

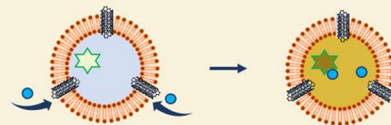


Figure 1.9 Research purpose in the thesis.

1.7 本論文の構成

本論文の構成を以下に示す。

第1章「緒論」では、脂質二重膜を起点として GUV の定義とその応用について述べる。そして GUV の応用用途である人工細胞、そしてそこから派生する GUV ベースのデバイスにおいて、GUV-GUV もしくは GUV-細胞間の分子伝達経路構築が重要であることを示し、その有望な材料として、脂質二重膜小胞間にチャンネルを構築可能な、ナノスケールの長さに切断した CNT である、超短 CNT について説明する。さらに超短 CNT のこれまでの研究の流れについて説明し、GUV への超短 CNT 適用の知見が不足していることを指摘し、課題を提示する。特に先述の分子伝達経路構築のために、超短 CNT の挿入が GUV 膜形態に及ぼす影響の解析、および超短 CNT を GUV に適用した際の膜のイオン透過性の評価法の開発が必要であることを述べる。

第2章「超短 CNT の作製」では、GUV に超短 CNT チャンネルを形成するための前段階として、超短 CNT を作製する。自発的な脂質二重膜への挿入を可能とするために、超音波破碎による切断とともに脂質分子の物理吸着による水性溶媒中での分散を手法として採用する。作製した超短 CNT の長さに対しては、TEM 観察、AFM 観察、動的光散乱法 (Dynamic Light Scattering: DLS) による分析を行い、作製した超短 CNT の大きさについて評価を行う。また電気生理学的計測により、超短 CNT の脂質二重膜におけるチャンネル形成能力について評価する。

第3章「超短 CNT 挿入による GUV 変形解析」では、超短 CNT の挿入が膜形態に及ぼす影響について評価するために、超短 CNT を暴露した GUV 膜の顕微鏡観察を行う。また膜と超短 GUV 間に起こる相互作用を評価するために電気生理学的評価と、蛍光標識脂質分子によりラベリングした超短 CNT の空間分布評価を行う。そして GUV 膜の変形について、膜変形モデルと照らし合わせた考察を行い、超短 CNT が GUV 膜に及ぼす影響についてのメカニズムについて検討を行う。

第4章「GUV のイオン透過性評価手法の開発」では、GUV 膜における超短 CNT によるイオン透過を評価することを目的とする。そのために蛍光プローブを内包した GUV と蛍光顕微鏡を用いた、GUV 膜の形態観察と内部蛍光強度の測定を並行して行い、GUV 膜における Ca^{2+} 透過を評価し、蛍光顕微鏡を用いた本アプローチの原理実証を行う。さらに本手法を用い、超短 CNT 導入量が及ぼす GUV 膜のイオン透過性への影響について行った評価について述べる。

第5章「結論」では、各章で得られた知見をまとめ、残された課題とその解決の方針を示す。さらに本研究によって得られた知見がGUVを用いたデバイスに及ぼす貢献について説明し、本研究が実社会に及ぼす波及効果について述べる。

第2章 超短 CNT の作製

2.1 緒言

CNT の中空構造内における物質透過は、エポキシ樹脂ブロック中に埋め込んだ MWCNT にて初めて実験的に観察された (Figure 2.1(a))³⁶.これに続いて、化学気相成長による垂直配向したCNTを樹脂やセラミックス蒸着によって閉じ込めたCNT膜 (Figure 2.1(b))^{37,38} や、低密度で成長させたCNTを内部に構成した流体デバイス (Figure 2.1(c))^{39,40} を用いて、主にマイクロメートルオーダーの長さのCNTの物質透過特性の研究がおこなわれてきた。これに対し、ナノメートルオーダーの長さの超短CNTを脂質二重膜に挿入し、チャンネルとして利用する実験的な試みはLiuらの研究によって行われた⁴¹. 厚さが5 nm以下である脂質二重膜への挿入を考慮して、濃硫酸・硝酸の混酸中での超音波処理により長さ10 nmほどに切断された親水化CNTは膜に挿入され、一本鎖DNAを輸送できることが確認された (Figure 2.1(d)). しかしながらCNTを膜に挿入するために使用された、ガラス製のマイクロピペットでサンプルを注入する手法であるマイクロインジェクションでは、効率的なCNTの膜挿入に課題があった。近年では、超音波破碎による物理的切断により作製した超短CNT表面をリン脂質分子によってコーティングする手法により、超短CNTの自発的な脂質二重膜への挿入手法が可能になった³¹. なお脂質分子による孔の閉塞は、超短CNTの開口部に存在するカルボキシ基が持つ負電荷によって、抑制されると考えられている。

本章ではGUVに超短CNTチャンネルを形成するための前段階として、超音波処理による単層CNTの切断により超短CNTを作製する。さらにTEM観察、AFM観察、DLS分析、ラマン分光法を用いて、超短CNTのサイズを代表とする超短CNTの特性評価を行う。最後に電気生理学的計測法により、今回作製した超短CNTの脂質二重膜におけるチャンネル形成能力について考察する。

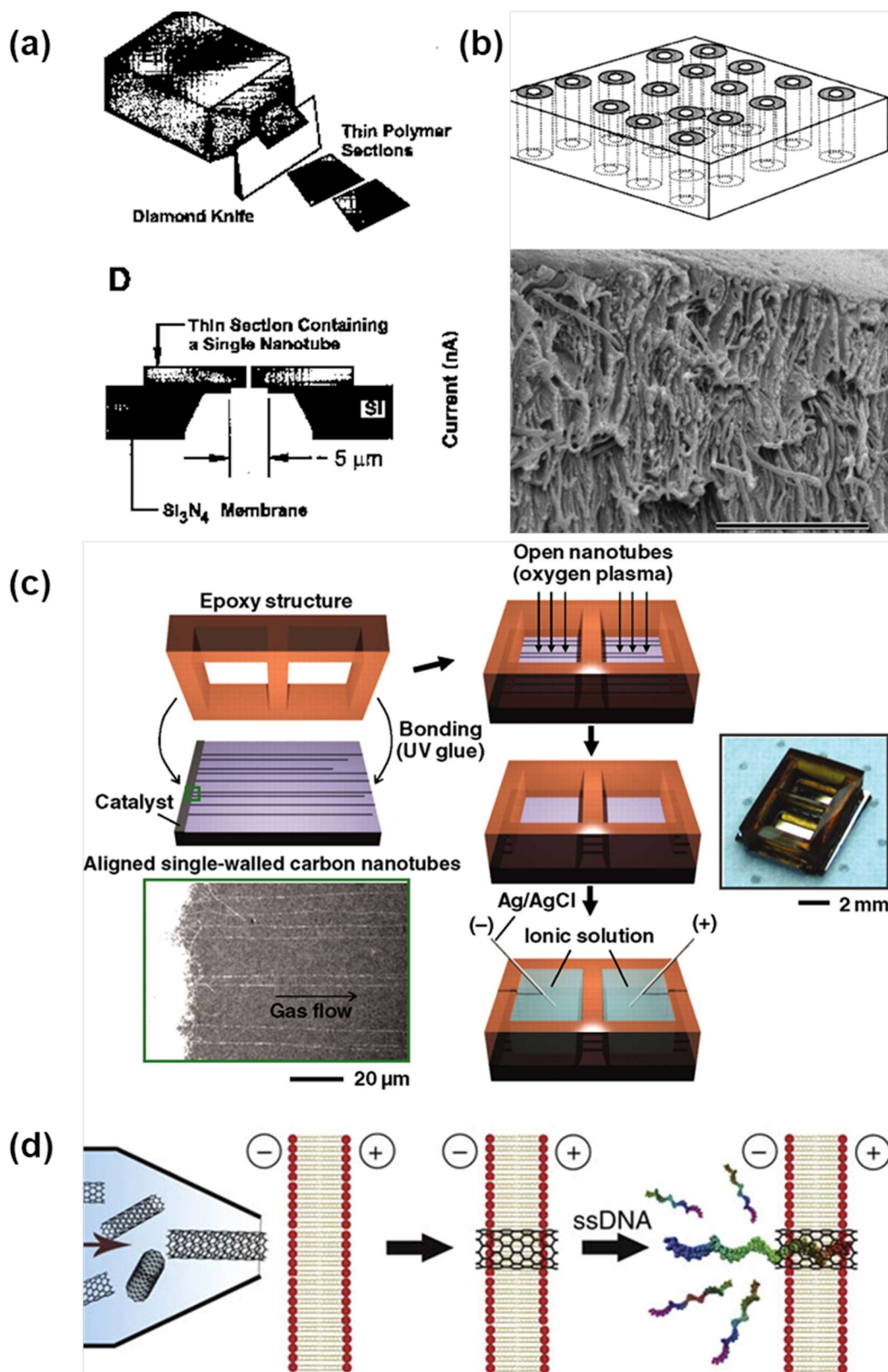


Figure 2.1 Methods of using CNT as a channel. (a) Epoxy block slices with embedded CNTs³⁶. (b) Vertically oriented CNT⁵. (c) Fluidic device with CNT inside⁶. (d) Microinjection of ultrashort CNT⁴¹.

2.2 超短 CNT の作製

CNT を数～数十 nm の長さに切断するため、両親媒性であるリン脂質の表面吸着によって疎水性の CNT を水溶媒中に分散させた先行研究⁴²に倣い、CNT をリン脂質とともに水溶媒中で超音波破碎した (Figure 2.2). CNT には直径 1.5 nm の SWCNT (D1.5L1-5-S, NanoLab) を用いた. まず 1.0 mg の CNT を 430 °C で熱処理し、非晶質成分を除去した. その後 CNT を 7.0 mL の超純水とともに、内壁にリン脂質 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) の膜を形成した 20 mL のサンプル管瓶に入れ、脂質膜が剥がれるまで攪拌した. 脂質膜はクロロホルム溶媒中の 10 mg/mL DOPC 溶液 3.6 mL をサンプル管瓶中に N₂ ガス流下で乾燥させ、その後、真空チャンバ内で一晚静置して形成した. その後、7.0 mL の超純水をサンプル管瓶内に加え、超音波洗浄器 (2510, BRANSON) で 45 分間分散処理を行った. 続いて超音波ホモジナイザー (Sonifier@ SFX250, BRANSON) による破碎処理を 16 時間行い、CNT を切断した (ホーン径 : 12.7 mm, 振幅 : 55 μm, 周期 : 1 または 4 秒, デューティー比 : 75 %). 最後に、CNT 分散液を遠心分離機 (Avanti J-26S XP, Beckman Coulter) で 10250 ×g , 1 時間, または遠心分離機 (High Speed Micro Centrifuge , Four E's Scientific) で 15000 rpm, 21 分, 遠心分離にかけて沈殿物を除去することで超短 CNT を分離した. また添加した脂質分子の影響を調査するため、CNT を添加せずに DOPC のみに対し同様の超音波処理した試料 (Lipid) を別途用意した. これらの試料は 4°C で保存した.

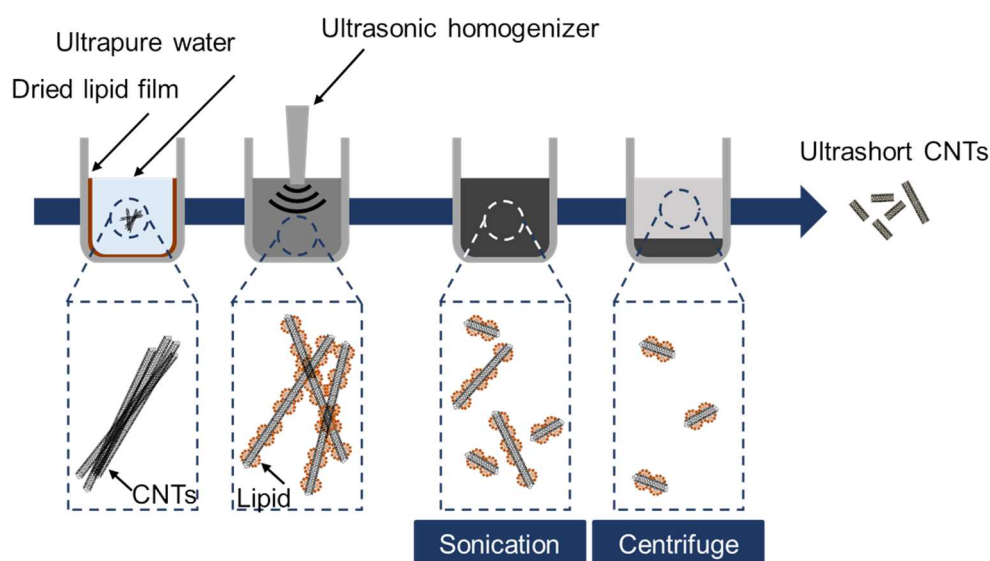


Figure 2.2 Conceptual diagrams of process for cutting carbon nanotubes.

切断された CNT の長さを計測するために、TEM 観察、AFM 観察、DLS 分析を行った。TEM 観察には、透過型電子顕微鏡 (JEM-2010F, 日本電子) を用いた。超短 CNT 分散液をマイクログリッド上に滴下し、加速電圧 200 kV にて観察を行った。DLS 分析においては、DLS 分析装置 (SZ100, HORIBA) を用いた。10 倍に薄めた超短 CNT 分散液を石英ガラスセル内に入れ、液中での平均粒径を計測した。

AFM 計測においては、超短 CNT を吸着させたマイカ表面の計測を行い、トポグラフィー像を撮像した。サンプルは、先行研究の方法³¹に従い、マイカ上にカチオンポリマーである Poly-L-lysine をコーティングすることによって、負に帯電した超短 CNT とマイカ表面の吸着を促進した (Figure 2.3)⁴³。まず 0.01 w/v% Poly-L-lysine (Nacalai Tesque) 溶液をマイカ表面上に滴下し、1 分間静置した。余分な基板上的 Poly-L-lysine を 500 μL の超純水で 4 回洗浄した後、30 分空気中で乾燥させた。その後マイカ基板上に超短 CNT 分散液 10 μL を滴下し 2 分間静置した後、400 μL の超純水で 6 回洗浄して余分な分散液を洗い流した。30 分空気中で乾燥させたのち、カンチレバー (AC 240 TS, Olympus) を用いて大気下でのタッピングモードによりマイカ基板表面のトポグラフィー像を撮像した。続いて得られたトポグラフィー像に対し画像解析ソフト ImageJ を用いて二値化処理を行い、画像中の粒子輪郭線上にある任意の 2 点を結ぶ直線のうち、もっとも長い距離を超短 CNT の長さとして計測した。なお二値化処理において、隣接した粒子が単一粒子としてみなされた場合は計測対象から除外した。

さらに分散液中の超短 CNT の物性を評価するためにラマン分光法による評価を行った⁴²。まず、150 μL の超短 CNT 分散液をカバーガラス上に滴下し、その後、真空チャンバ内で水分をすべて蒸発させた。調製したサンプルに対し、波長 532 nm のレーザーを照射し、ラマン分光光度計でラマンスペクトルを測定した。

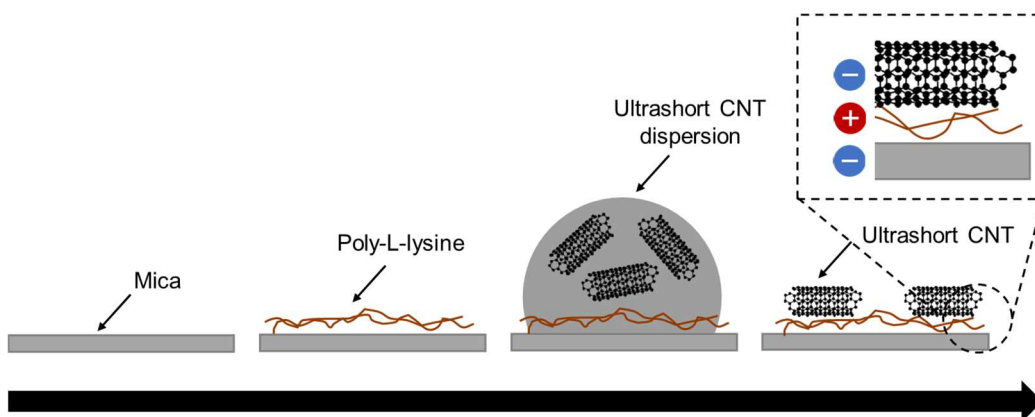


Figure 2.3 Conceptual diagrams of AFM measurement.

超短 CNT が自発的に脂質二重膜に挿入され、かつ電荷を透過できることを確認するために、超短 CNT の存在下で脂質二重膜を形成し、膜に固定電圧をかけた状態で電流計測を行った (Figure 2.4) ⁴⁴. まず, Ag/AgCl 電極の先端に, 1 M KCl と 10 mM HEPES を含む 1 μ L の agarose 溶液を塗布した. Hexadecane に溶解した 60 mg/mL 1,2-Diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DPhPC) 溶液をチャンバに注ぎ, 電極先端のゲルがコーティングされた部分を脂質に浸して脂質をゲルに付着させた. その後, 電極を脂質溶液から取り出し, ゲル部分に 800 nL の水溶液 (150 mM KCl, 10mM HEPES, 1/100 希釈超短 CNT 分散液) を滴下し, 液滴を形成した. 液滴が安定したところで, 再び電極を脂質溶液に 2 分間浸し, 脂質分子の単層膜を形成させた. 電極は 2 つ用意し, 1 つはグラウンドに, もう 1 つはパッチクランプアンプ (Axopatch 200B, Axon Instruments Inc.) に接続した. 脂質二重膜の形成後, 2 つの電極の先端の液滴を接触させて脂質二重膜を形成させた後, 電極間の電圧を 50mV に固定し, 電流を測定した. 得られた電流値から各測定点のコンダクタンスを算出した.

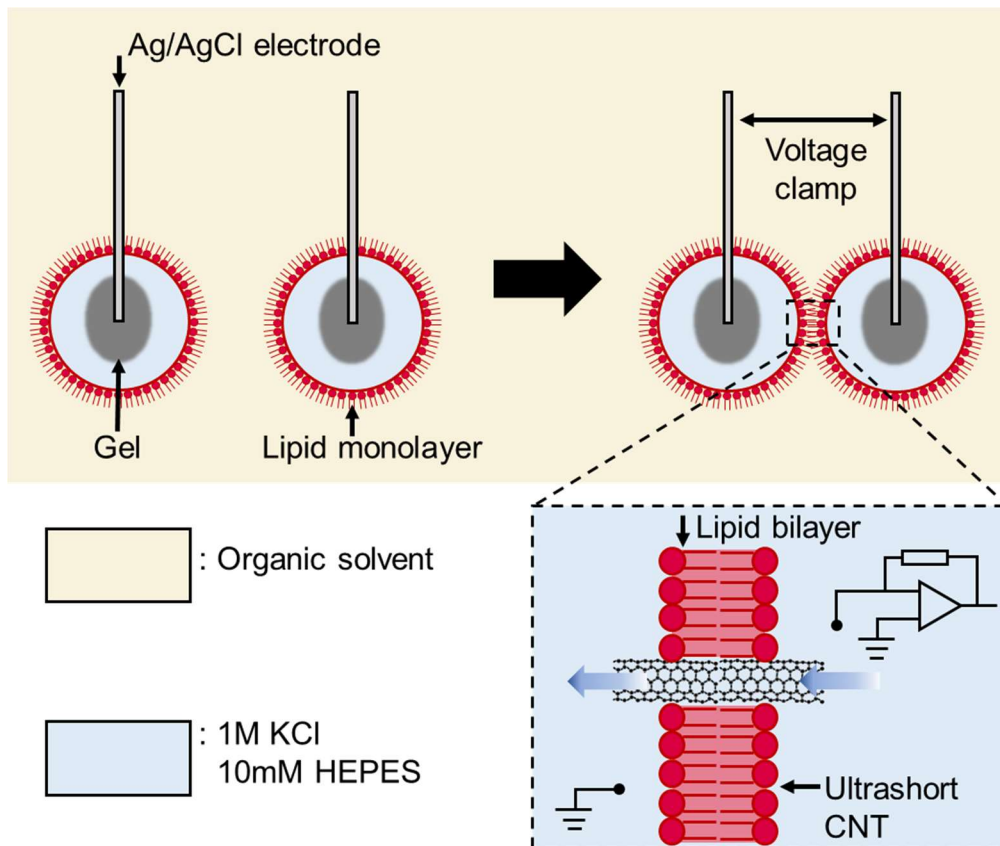


Figure 2.4 Schematic diagram of the evaluation of lipid bilayer insertion of ultrashort CNTs.

2.3 超短 CNT の特性評価

撮像した超短 CNT の TEM 画像を Figure2.5 に示す。以前に報告されているように、線状のカーボンナノチューブ (Figure2.5(a), (b)) が観察された³¹。CNT の長さは約 5 ~ 10 nm であったが、添加した脂質分子によるノイズのため、正確な長さを測定することはできなかった。また白枠で示した Figure2.5(c)のように数十 nm の長さのものも存在した。また AFM によって得たマイカ上の超短 CNT のトポグラフィ像を Figure2.6(a) に、計測した超短 CNT 長さのヒストグラムを Figure2.6(b)に示す。Figure2.6(a)にて点線で示したようにマイカ上に CNT が観察され、Figure2.6(b)より 60 nm 以下の範囲に分布があることがわかった。さらに DLS 分析によって 3 回計測した超短 CNT のキュムラント径の分布を Figure2.7 に示す。横軸は算出された粒径、縦軸は各粒径における頻度であり、灰色線は各データ、黒色線はその平均の粒径分布を示す。3 回の計測における各ピークはそれぞれ 36.8 nm, 37.2 nm, 37.7 nm であった。以上の結果より超音波破碎により切断した超短 CNT の長さは 0 ~ 60 nm の範囲に切断されていることがわかった。なお DLS 分析においては、解析の段階で粒子形状が球状粒子であると仮定して粒径が算出されていることは留意する必要がある。

超短 CNT の長さについては、5~30 nm 長さの超短 CNT が膜内に挿入されることが電子顕微鏡観察によって報告されていることを考慮すると³¹、本研究における超短 CNT 切断によって膜挿入に必要な CNT 長が得られたと考えられるものの、その長さ分布が広いと考えられる。30 nm を超える長さの超短 CNT については、分子動力学シミュレーションにおいて予測されているように、膜挿入不能であるか、挿入後に膜内部の疎水性部分へ埋没すると考えられる⁴⁵。

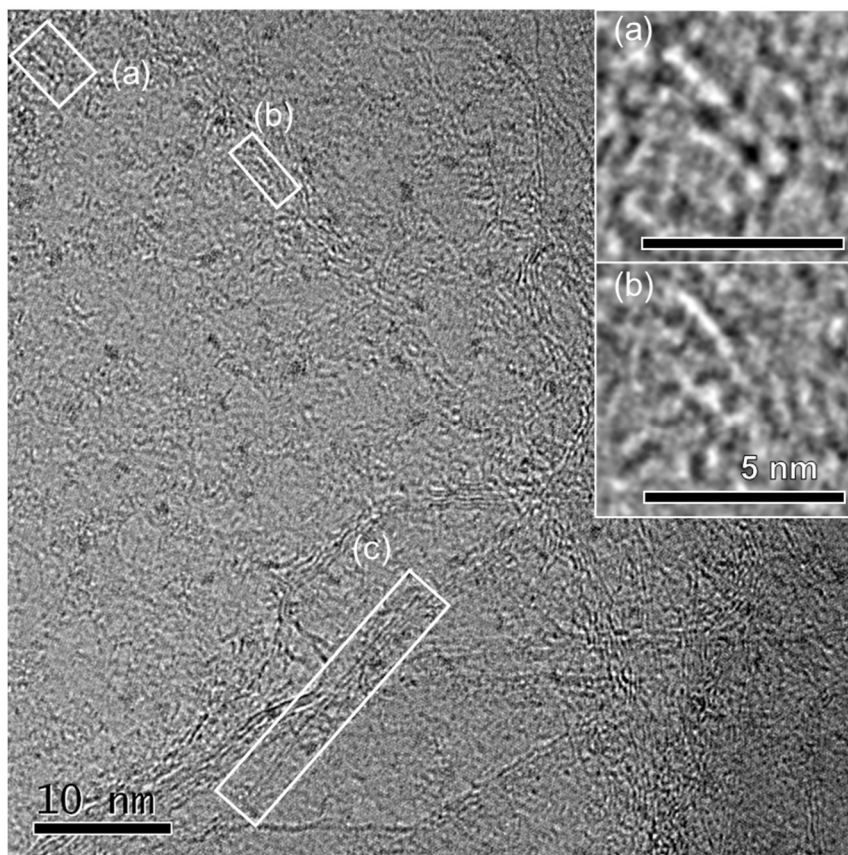


Figure 2.5 TEM image of ultrashort CNTs.

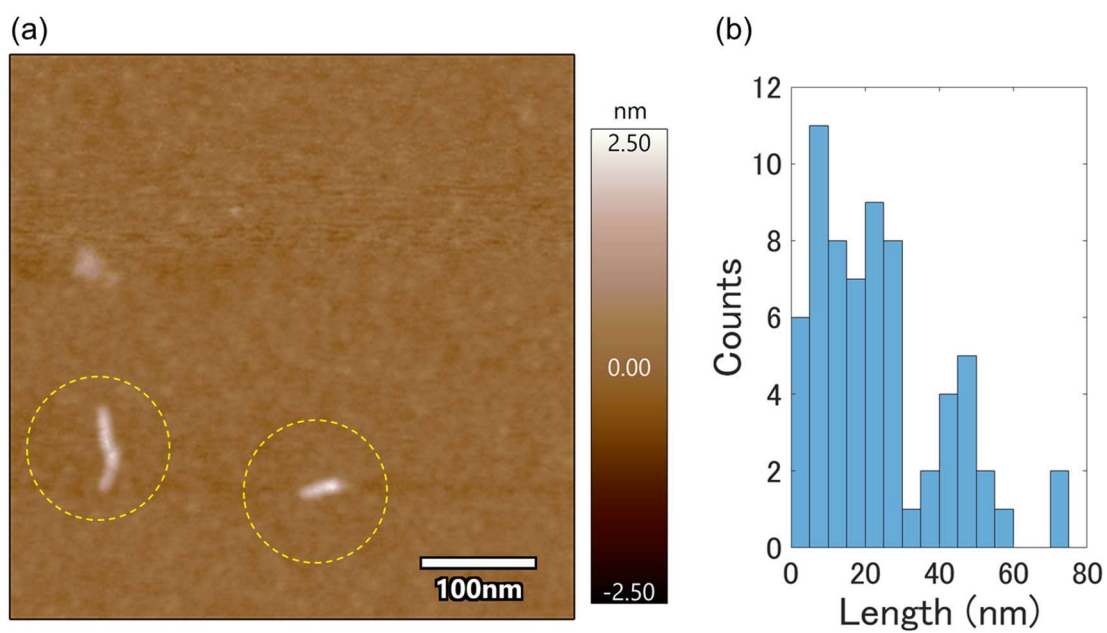


Figure 2.6 (a) Topographic image of ultrashort CNTs on mica. (b) Histogram of ultrashort CNT length ($n = 67$).

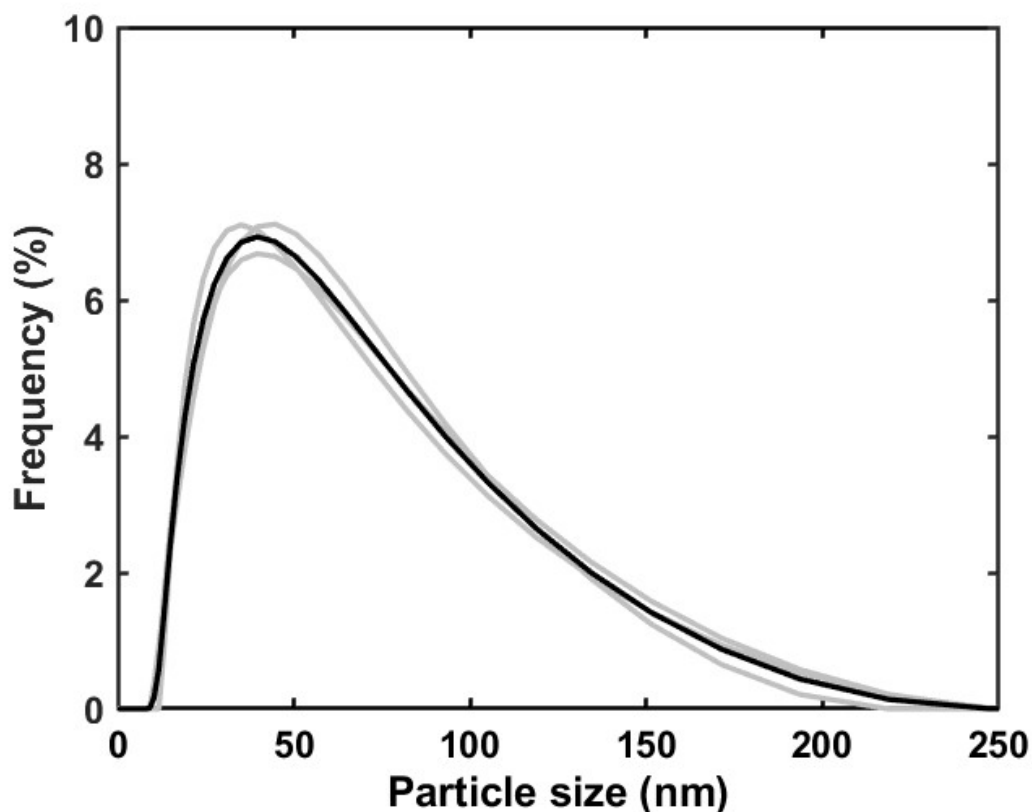


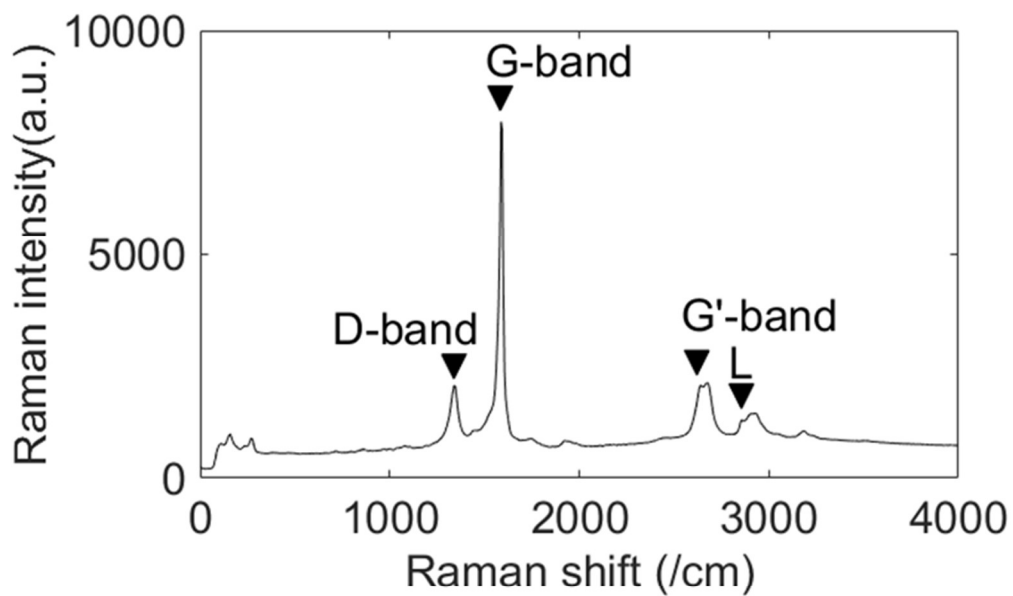
Figure 2.7 Particle size distribution of ultrashort CNTs by DLS analysis

Figure2.8(a)は、乾燥 CNT 分散液のラマンスペクトルである（3 回測定したスペクトルの平均値）。ここでは CNT 特有のバンド特性（1590/cm 付近の G バンド、2600/cm 付近の G'-バンド、1310 /cm 付近の D バンド）と、2800 /cm 付近に脂質特有のピーク（Figure2.8(a)中の "L"）が確認できた。これにより、分散液中に CNT と脂質が存在することが確認された。また Figure2.8(b)はラマンスペクトルを低波数領域（50~350/cm）について拡大したものである。ここではチューブ直径が全対称的に伸縮する振動モードに対応する Radial Breathing Mode (RBM) がみられた。RBM のピーク位置 ω_{RBM} [cm⁻¹]と CNT の直径 d [nm]は反比例の関係にあり、実験的に以下の式 (2-1) の関係が成り立つことが知られている⁴⁶。

$$d = 248/\omega_{\text{RBM}} \quad (2-1)$$

算出した直径をグラフ横軸（Figure2.8(b)上部)に記載した。ここから今回使用した CNT の直径は、0.9 nm と 1.6 nm であると推定される。

(a)



(b)

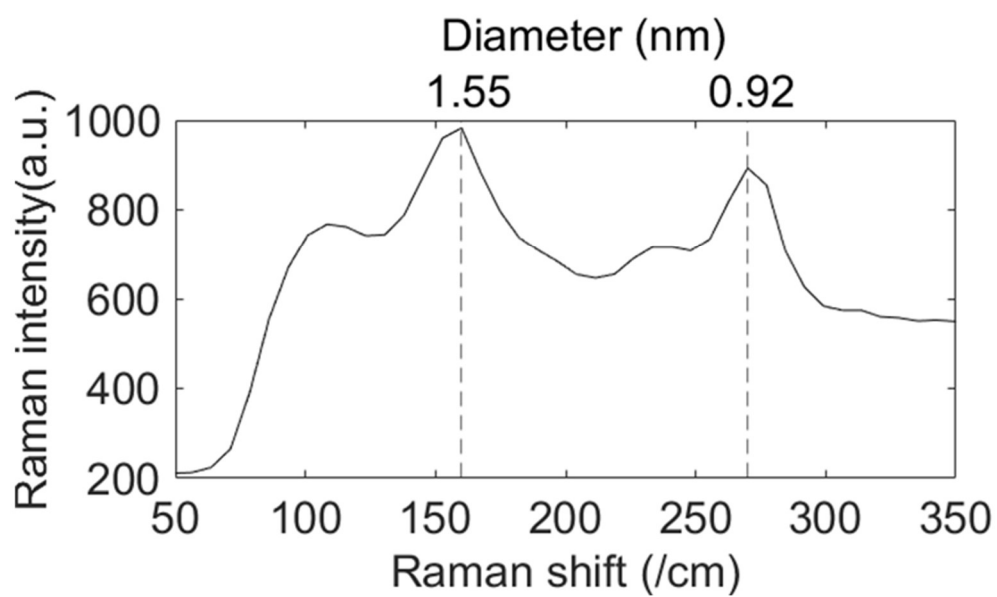


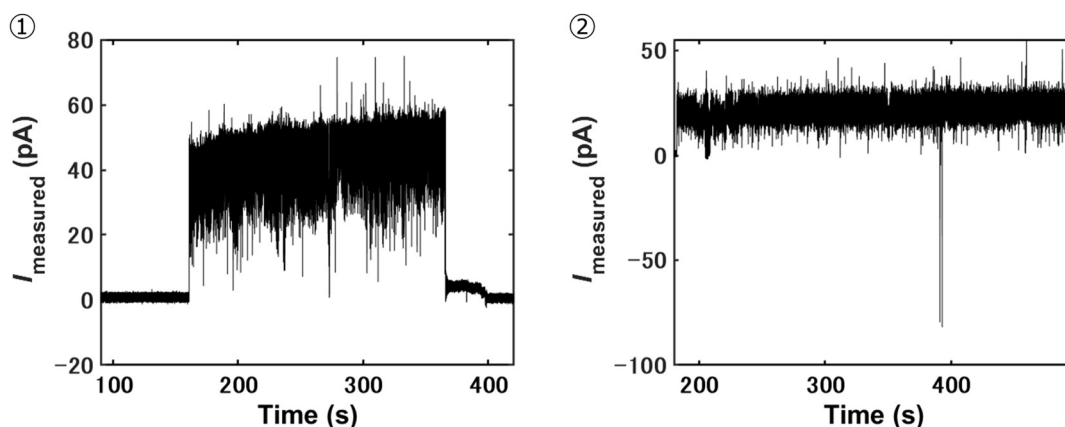
Figure 2.8 Raman spectrum of dried ultrashort CNTs dispersion. (a) high frequency region. (b) low frequency region.

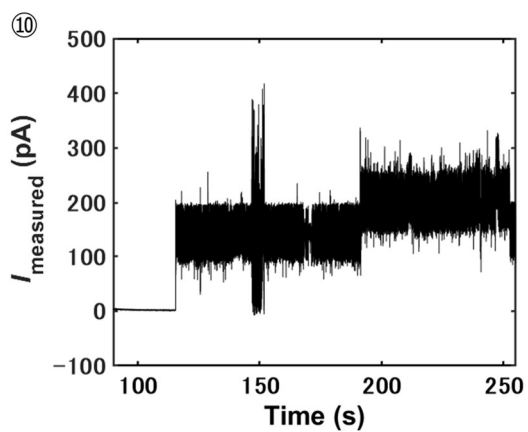
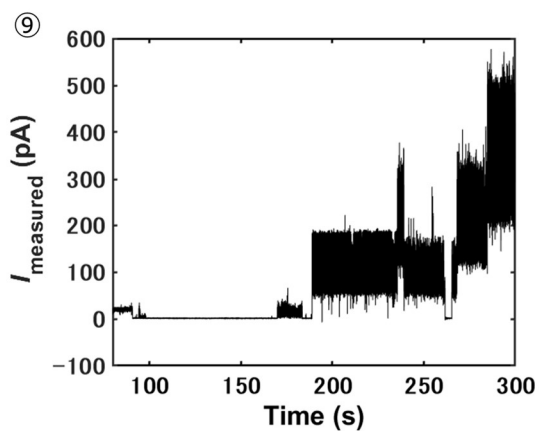
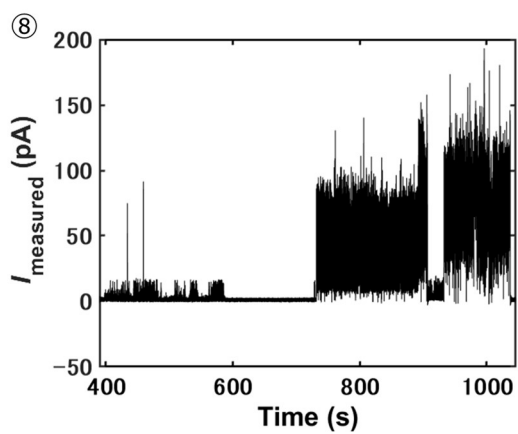
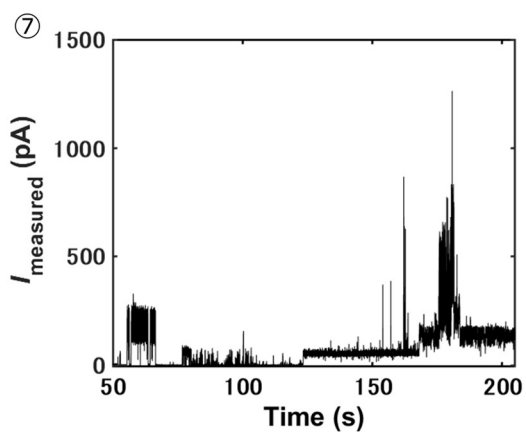
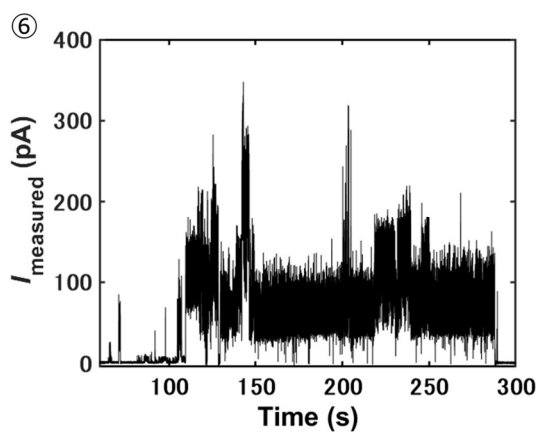
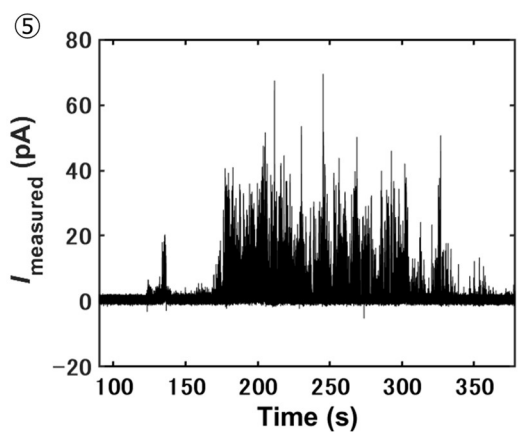
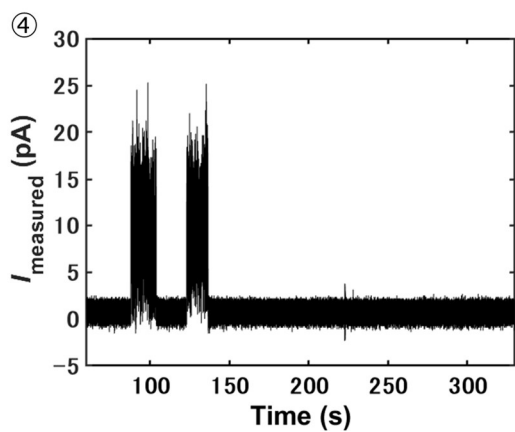
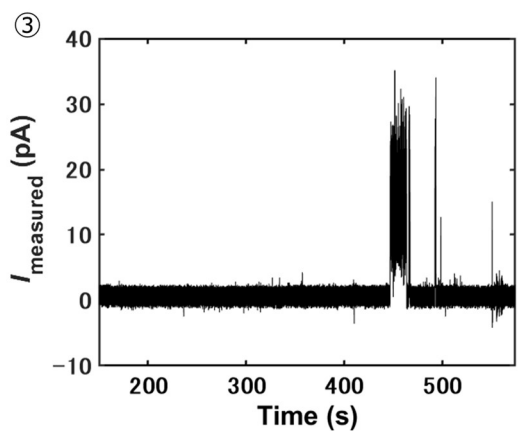
2.4 脂質二重膜への超短 CNT 挿入評価

実験中に得られた電流値の時間変化のグラフを Figure2.9 に示す(各 15 回). 横軸は計測時間, 縦軸は計測した電流値 I_{measured} を示す. 計測の際の機器操作に起因するノイズについては手動で除外した. Figure2.9 の電流波形に示すように, 複数のステップ状の電流変化が観察された. このステップ状の電流変化は脂質二重膜の電気伝導率が瞬間的に増加したことを示しており, 脂質二重膜に超短 CNT が挿入されてチャンネルが形成されたことを示唆する³¹. Figure2.10 は, この脂質二重膜のコンダクタンス G [S]を, 各測定データ点において固定電圧値 V_{clamp} [V]と電流測定値 I_{measured} [A]から以下の式 (2-2) から算出し, ヒストグラムにしたものである.

$$G = \frac{I_{\text{measured}}}{V_{\text{clamp}}} \quad (2-2)$$

縦軸は, 横軸のコンダクタンスの各ビン (幅=0.05 nS) に収まるデータの数を示している. 0.1 nS 以下のデータは, ベースラインを含むデータとして除外し, 5.0 nS より大きいコンダクタンスのデータについてもデータ数が比較的少ないために除外した. ヒストグラムより 0.4, 1.0, 1.9, 2.6 nS にピークがあることがわかる. この多峰性の分布は超短 CNT の複数挿入による離散的なコンダクタンスの増加を示唆している. したがって 0.4 nS のピークは単一超短 CNT のコンダクタンスに起因すると考えられる. この値は直径 1.5 nm の超短 CNT のコンダクタンスの既報値である 0.6 nS と同様のオーダーを示す³¹. なおピークの間隔が等間隔でない点については, 直径 0.9 nm と 1.6 nm の 2 種類の CNT が混在していることが理由として考えられる. 径によって電荷の透過性は異なるため, 2 つの離散的な分布が重なった結果だと考えられる.





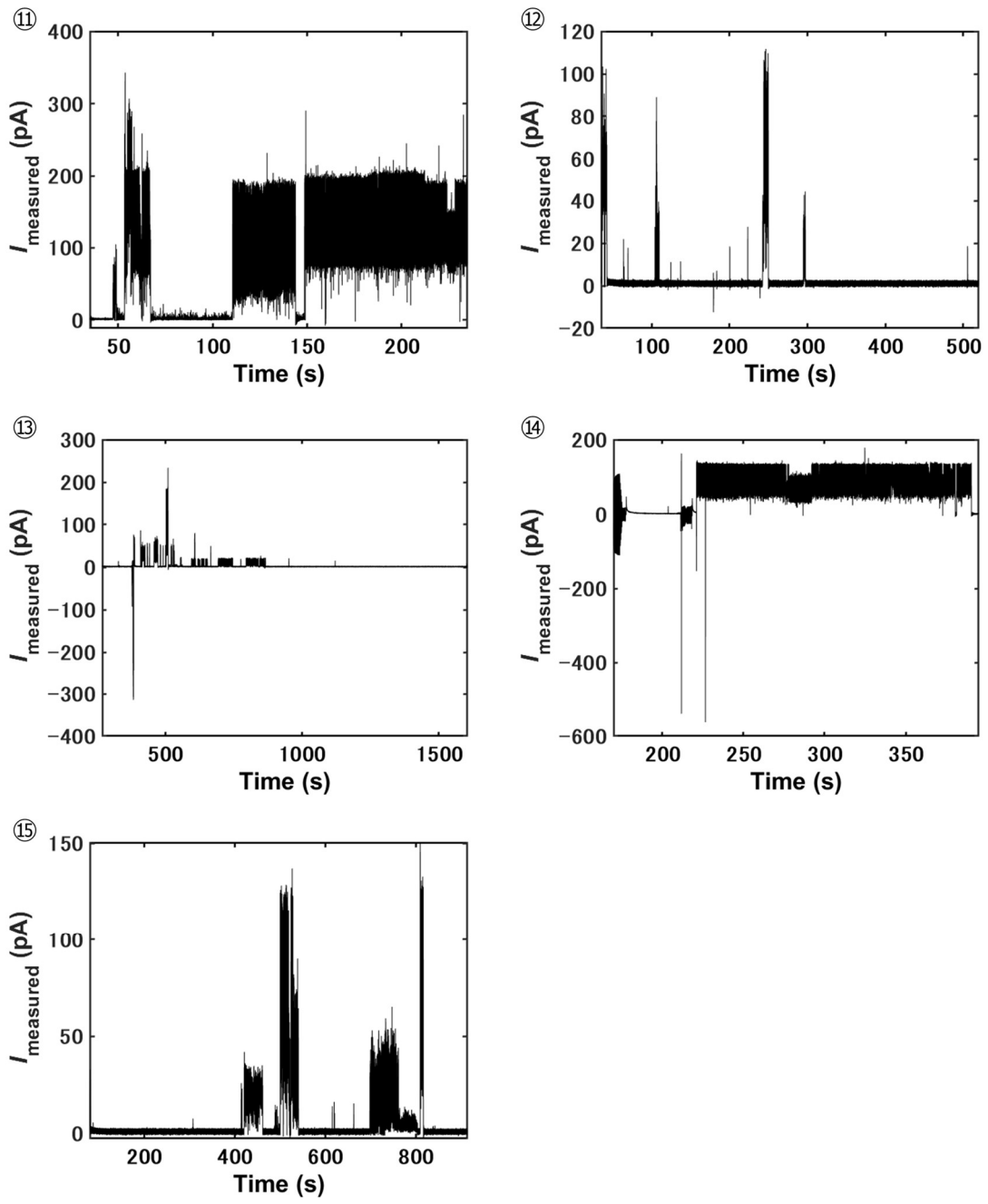


Figure 2.9 Time variation of measured current value.

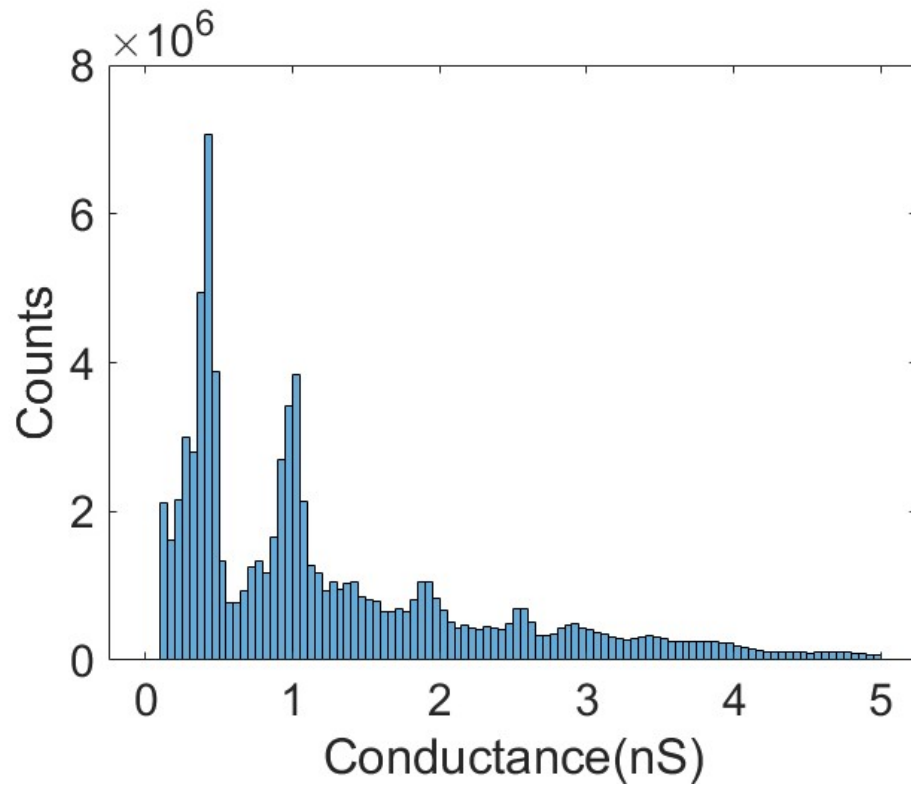


Figure 2.10 Histogram of the measured ultrashort CNTs conductance.

2.5 結言

本章では GUV に超短 CNT チャンネルを形成するための前段階として、超短 CNT を作製した。自発的な脂質二重膜への挿入を可能とするために、超音波破碎による切断とともに DOPC による物理吸着による水性溶媒中での分散を手法として採用した。作製した超短 CNT の長さに対しては、TEM 観察 AFM 観察、DLS 分析を行うことで、CNT が 60 nm 以下の範囲に切断されていることがわかった。この長さ分布は膜挿入可能な長さを含むものの、その長さ分布は広いと考えられる。また超短 CNT のラマンスペクトルを得たところ、CNT のみならず脂質分子固有のスペクトルが観察され、分散液中に脂質分子と CNT が存在することがわかった。さらに CNT の RBM より超短 CNT の直径が 0.9 nm と 1.46nm であることが推定できた。最後に、超短 CNT を曝露した脂質二重膜に固定電圧を印加した状態での電流計測により、超短 CNT の脂質二重膜におけるチャンネル形成能力について評価したところ、チャンネル形成を示唆するステップ状の電流波形が観察された。さらにヒストグラムにおけるコンダクタンスの離散的な分布より単一超短 CNT のコンダクタンスが 0.4 nS であることが推定された。この数値は既報の値と同様のオーダーを示しており、超短 CNT が膜に挿入されたことが示唆された。以上より、今回作製した超短 CNT は、数~数十 nm に切断されており、脂質二重膜に自発的に挿入できる特性を持つことを確認できた。

第3章 超短 CNT 挿入による GUV 変形解析

3.1 緒言

CNT は脂質二重膜を崩壊・変形させる場合があり，細胞や人工脂質二重膜を利用したデバイスへの適用の際に留意する必要がある．GUV に MWCNT を組み込ませた研究⁴⁷では膜と CNT の疎水部が引き寄せあい，GUV 膜同士の融合につながった (Figure 3.1)．また SWCNT と脂質二重膜の間に静電相互作用が発生する場合には，SWCNT の膜への吸着による GUV の崩壊が報告されている⁴⁸．これら既存研究の多くは超短 CNT よりも長い数百 nm～数 μm の長さの CNT を対象としてきたが，脂質による被覆がされた数～数十 nm 長の超短 CNT とでは脂質二重膜への挿入とそれに伴う膜への転移の過程が異なるとされている⁴⁹．膜に対し水平方向に埋め込まれる長い CNT には，脂質分子の疎水性尾部との疎水性相互作用が働く．一方で膜に鉛直方向へ挿入される超短 CNT は疎水性相互作用以外に，チューブ縁の親水性基と脂質分子の親水性頭部に親水性相互作用が働くと考えられている³¹．しかし超短 CNT が膜形態に及ぼす影響についての研究報告はない．

そこで本章では，超短 CNT の GUV への適用に向け，超短 CNT が脂質二重膜の形態に与える影響を評価する．そのために，GUV に超短 CNT を曝露し，膜形態の変化を蛍光顕微鏡によって評価した．また超短 CNT を曝露した脂質二重膜を横切るイオン電流を測定して，超短 CNT の膜挿入を評価した．

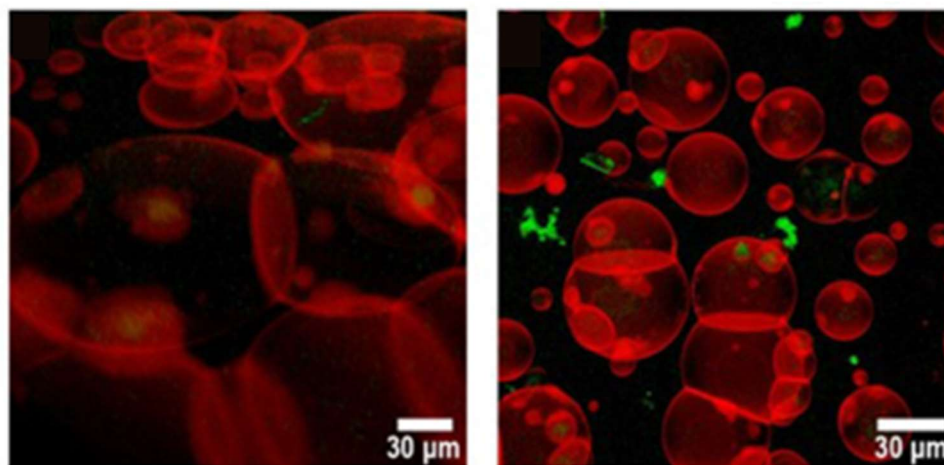


Figure 3.1 Confocal images of GUVs with CNTs embedded in the membrane (adapted from Pérez-Luna⁴⁷).

3.2 GUV の作製

GUV の代表的な作製手法には主に静置水和法 (Gentle hydration method), エレクトロフォーメーション法 (Electroformation method), 界面通過法 (Water-in-oil emulsion-transfer method) の3つがある。

静置水和法は GUV 作製における古典的な手法である。ガラス基板上に堆積させた乾燥リン脂質層に緩衝溶液を加えると、脂質層内外に発生する浸透圧差により膜の一部が膨潤し、小胞を形成する (Figure3.2(a))⁵⁰。静置水和法は GUV 形成にあたり、脂質分子の酸化が発生しないことが利点である一方で⁵¹、脂質二重膜の膨潤の駆動力が浸透圧のみであるため、形成までに数日ほどの時間がかかる場合がある⁵²。この手法の派生として、ポリマーフィルム水和法 (Polymer-assisted swelling method) がある。この手法ではガラス基板と堆積脂質層の間に乾燥した agarose や polyvinyl alcohol (PVA) のポリマーフィルム層を設ける^{53,54}。このポリマーフィルムにより緩衝溶液の流入が促進されることで、静置水和法の課題であった GUV の形成時間が 1 時間ほどに短縮可能になった。また後述のエレクトロフォーメーション法では困難であった高いイオン強度を持つ溶液中での GUV 作製が可能である^{2,53,55}。

エレクトロフォーメーション法では上記の堆積させた乾燥リン脂質二重膜に電場を印加することにより GUV の形成を行う (Figure3.2(b))⁵⁶⁻⁵⁸。この手法では電場の印加が電場の脂質分子間の静電相互作用や脂質二重膜の表面張力に作用し GUV の形成を促進するとされているが⁵⁹、電界によって脂質の化学的組成が変化する可能性が言及されている⁶⁰。また脂質の電荷や水和時の緩衝溶液のイオン強度によって GUV の生成が困難になる場合がある⁶¹。

界面通過法では、上記の手法とは異なり水性溶媒と油性溶媒の界面を利用する (Figure3.2(c))。まずリン脂質を含む有機溶媒 (鉱油, 流動パラフィン等) と水溶液 (GUV 内部の水溶液) を混合して油層中に脂質の単分子層を有した液滴を生成する。この液滴を含んだ有機溶媒を別の水溶液 (GUV 外部の水溶液) の上に配置すると界面に脂質の単分子層ができる。その後、液滴は油層よりも密度が高いため沈降していき、場合により遠心分離をかけることで、界面を通過する。これにより液滴表面に脂質二重膜が形成され GUV が形成される。この手法をマイクロ流体デバイスと組み合わせて大量に GUV を作製するアプローチも存在する^{62,63}。界面通過法は標的分子の GUV 内部への封入率が高いことや GUV の脂質二重膜の内外層を異なる種類のリン脂質で非対称化できるこ

とが利点である⁶⁴。一方で脂質二重膜内に油層由来の残留溶媒が混入する可能性があり⁶¹、GUVの分裂^{62,65}、膜の流動性⁶⁶、厚み⁶⁷、疎水性⁶⁸に影響を与える。

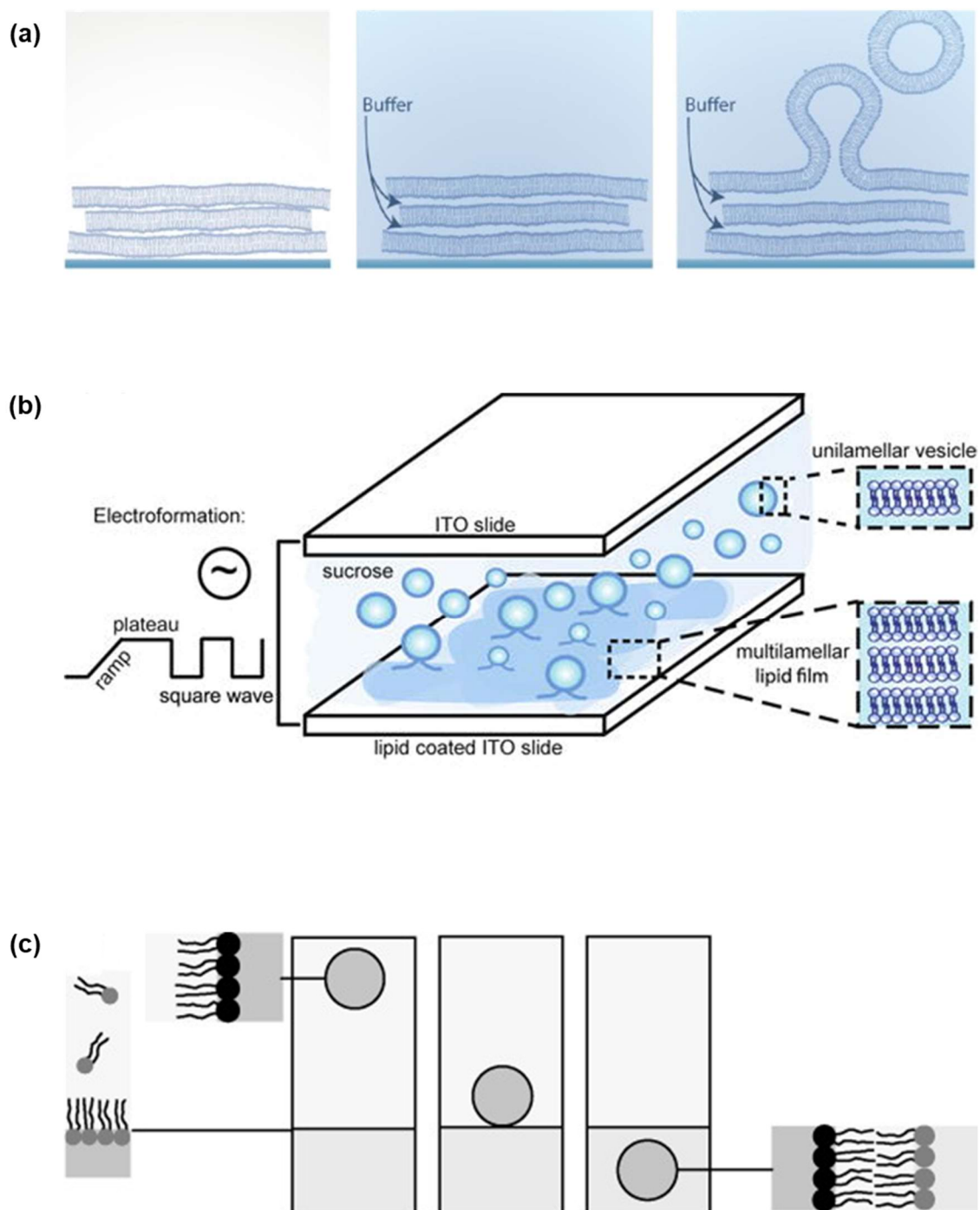


Figure 3.2 GUV growth methods. (a) gentle hydration method². (b) electroformation method⁶⁹. (c) water-in-oil emulsion-transfer method⁶¹.

本研究においては GUV を作製するにあたり，脂質分子の酸化がなく膜物性への影響が少ない，polyvinyl alcohol ゲルを用いたポリマーフィルム水和法を用いて作製した (Figure3.3) ⁵⁴. まず，5.0 w/w% PVA 水溶液 50 μ L をカバーガラス上に塗布し，50°C で 2 時間以上乾燥させた．次に，乾燥したゲル膜上に脂質溶液 10 μ L を塗布した．脂質溶液は，クロロホルム中 1.0 mg/mL の DOPC に対し，モル比 100 : 1 になるように蛍光色素標識脂質 (Texas RedTM 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt; Texas Red-DHPE) を混合した．その後カバーガラスを真空チャンバ内で 15 分間静置し，残留溶媒を完全に蒸発させた．カバーガラス上にポリジメチルシロキサン (SILPOT, DuPont Toray Specialty Materials K.K.; PDMS) 製のチャンバを取り付けた後，10 mM HEPES (pH 7.3) を 150 μ L 加えて脂質を水和させることで GUV を作製した．

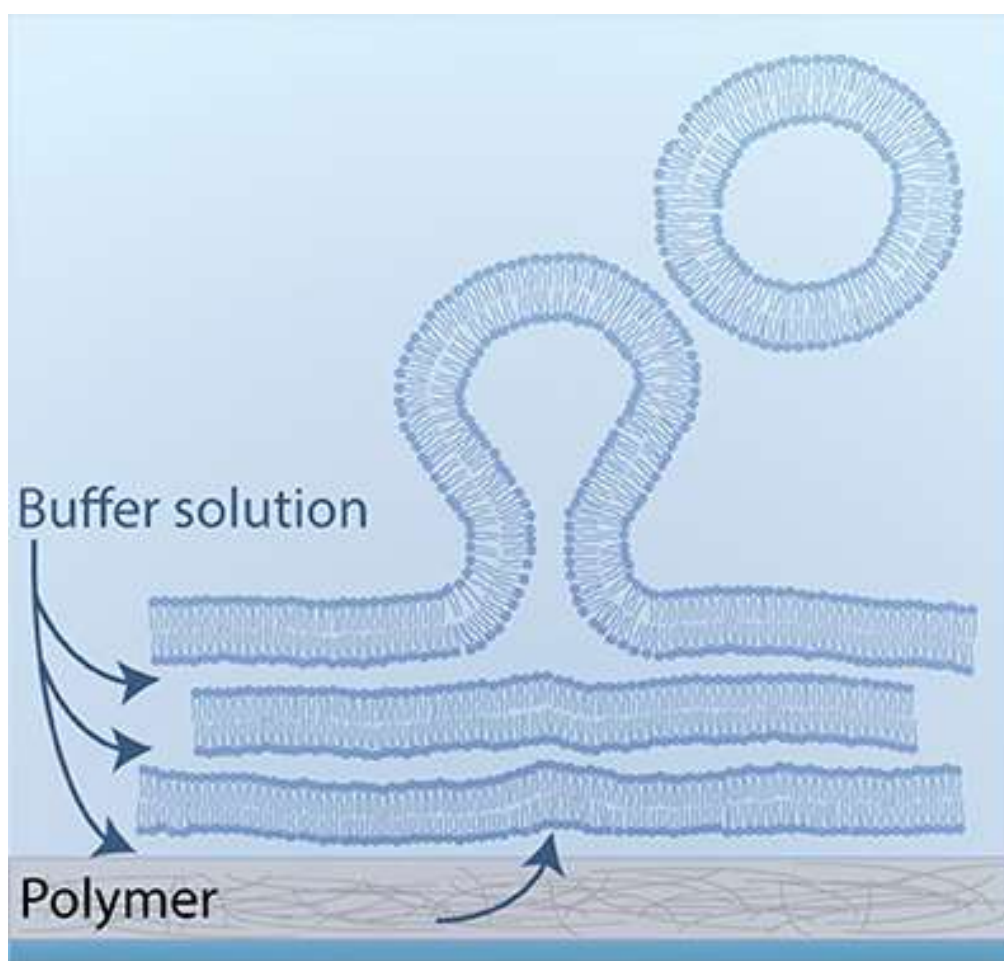


Figure 3.3 Schematic illustration of polymer-assisted swelling²

3.3 GUV への超短 CNT 曝露

超短 CNT の挿入による膜形態への影響を評価するために、作製した GUV に超短 CNT を曝露し、蛍光顕微鏡で膜の形態を観察した。観察には、独自に設計した流路付きチャンバ (Figure 3.4) を使用した。このチャンバは、流路部をレーザー加工機で切り抜いた厚さ 1 μm のパラフィルムを 2 枚のカバーガラスで挟み、はんだごてで溶着することで作製した。カバーガラスは GUV の吸着を防ぐためにカゼイン (Wako) によるコーティング処理を行った⁷⁰。3.0 μL の GUV 溶液をチャンバに加えた後、1.0 μL の CNT 分散液を別の開口部から加え、CNT を GUV に曝露させた。最後にサンプルの蒸発を防ぐため、全ての開口部をシリコングリス (DuPont Toray Specialty Materials) によって密閉した。なお CNT 分散液には GUV 内外の浸透圧を調整するため最終濃度が 10 mM になるように pH 7.3 の HEPES 溶液を加えた。また超短 CNT 濃度に変化をつけるため、希釈していない試料 (High concentration) に対し 4 倍に希釈した試料 (Low concentration) を用意した。さらに対照条件として、最終濃度が 10 mM になるように pH 7.3 の HEPES 溶液を加えた Lipid サンプルを加える場合 (Lipid) と 10 mM HEPES (pH 7.3) 溶液のみを加える場合 (Control) の 2 条件を設定した。撮影には、共焦点スキャナユニット (CSU-X1, Yokogawa Electric) に接続した蛍光顕微鏡 (IX70, Olympus) を用いた。使用した対物レンズの倍率は 10 倍である。波長 561nm のレーザー (85-YCA-025-040, CVI Melles Griot) で Texas Red を励起し、CCD カメラ (BU-60, BITRAN) で蛍光を検出した。画像は、超短 CNT 曝露後 29 分間、10 秒おきに撮影した。

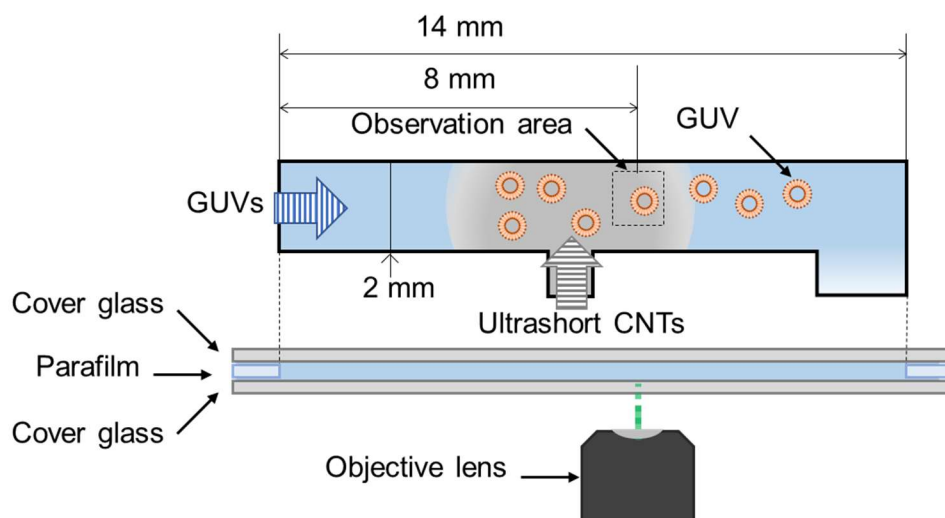


Figure 3.4 Schematic diagram of fluorescence observation.

Figure3.5 に, 今回の実験において典型的な変形をした GUV の蛍光顕微鏡画像を示す. 点線で示すように GUV は当初球形であり, 時間の経過とともに体積が一定である GUV の粒径が増加したことから扁平な形状に変形したことがわかる. 最終的には二つ以上の小胞が連結した形状に変形した. 小胞同士が完全に分裂しているかは確認できなかった. また一部では 1 ~ 2 秒の短い時間で GUV が崩壊し観察できなくなる現象も確認されたが, GUV 膜同士の融合は確認されなかった.

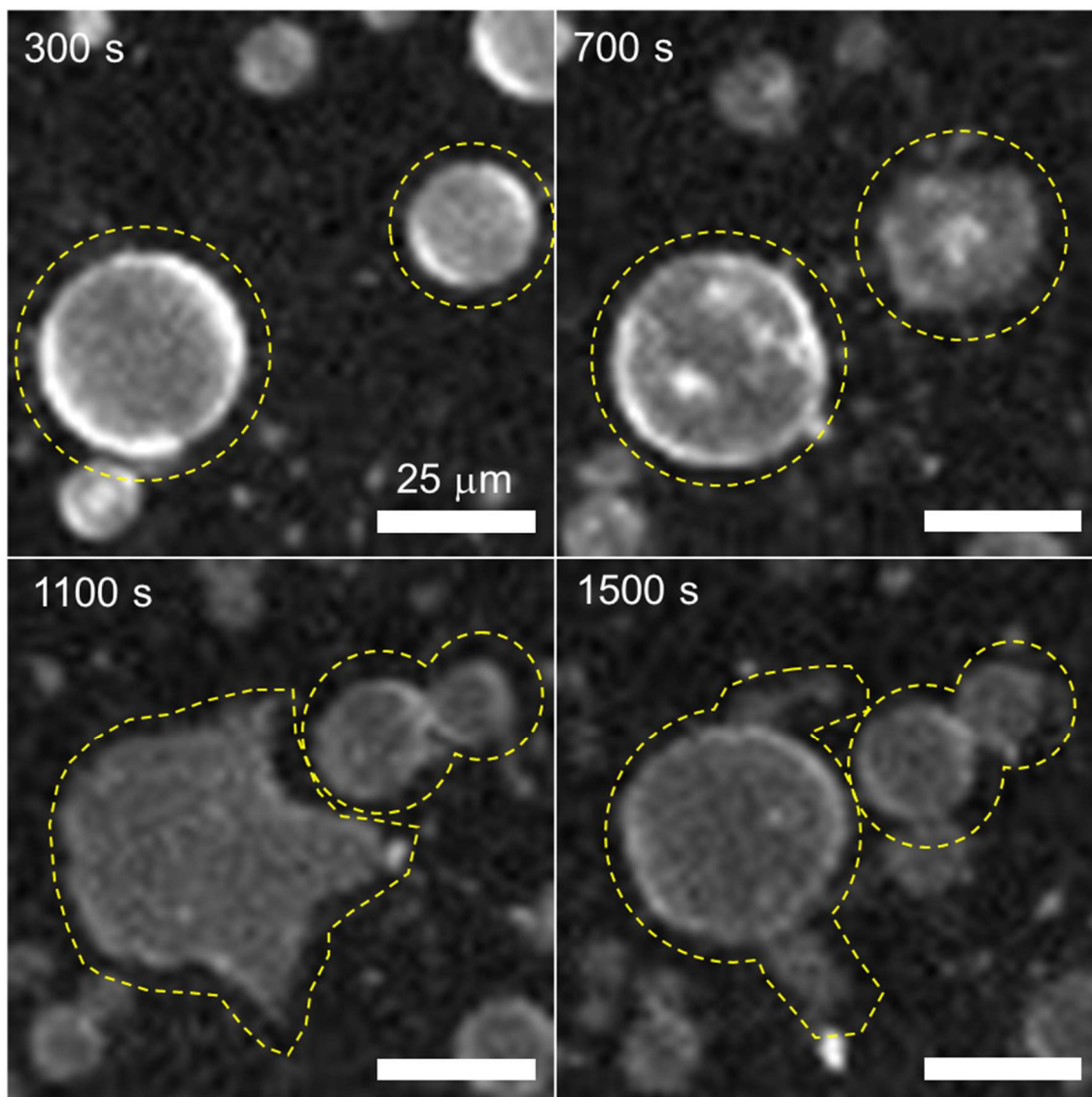


Figure 3.5 Fluorescence microscope images of GUVs exposed to ultrashort CNTs (Scale bar: 25 μm).

3.4 脂質二重膜と超短 CNT の相互作用

超短 CNT と GUV 膜の相互作用を評価するために、超短 CNT を曝露した脂質二重膜を横切るイオン電流を測定した。超短 CNT が膜挿入すると、CNT を流れるイオン電流が計測される。基本的な操作は 2.2 節のコンダクタンス計測に準ずるが、本節の実験では脂質二重膜は GUV と同じリン脂質である DOPC によって構成された。まず、直径 0.2 mm の銀塩化銀ワイヤ電極の先端に agarose ゲル (1.0 w/v% agarose, 1 M KCl, 10 mM HEPES (pH 7.3)) 1 μ L をコーティングした。さらに 1.0 mg/mL DOPC n-デカン溶液中に、電極先端を浸してゲルに脂質を付着させた。その後、電極を脂質溶液から取り出し、ゲル部に 800 nL の液滴を形成した。液滴安定後に、電極を再び脂質溶液に浸し、液滴表面に脂質分子の単層膜を形成させた。液滴の組成は 1M KCl, 10mM HEPES (pH 7.3) であり、250 倍に希釈した超短 CNT 分散液を含んでいた。対照条件として液滴の組成が、1M KCl, 10mM HEPES (pH 7.3) に 250 倍に希釈した Lipid サンプルを加えた場合 (Lipid) と、1 M KCl, 10mM HEPES (pH 7.3) のみで構成される場合 (Control) の 2 条件を設定した。電極は 2 つ用意し、一方を接地し、もう一方をパッチクランプアンプ (Axopatch 200B, Axon Instruments) に接続した。2 つの液滴を接触させて脂質二重膜を形成し、電極間に 50 mV の電圧を印加した際の電流を測定した。

Figure 3.6 に各条件における代表的な電流波形とコンダクタンスのヒストグラムを示す ((a) : 超短 CNT, (b) : Lipid, (c) : Control)。ヒストグラムは、横軸のコンダクタンスの各ビン (幅=0.01nS) に収まるデータ点数をプロットし、バーの累計高さが 1 になるように正規化したものである。なおコンダクタンスの計算は記録した全点の電流値に対して行った。Figure 3.6 の電流波形において、(a) ではステップ状の電流変化が見られた一方で、(b) ではスパイク状の電流波形が観察された。(c) では顕著な電流変化は観察されなかった。またヒストグラムにおいて、(c) は 0 nS を中心とした急峻なピークを持つことから、膜によってギガオーム以上の抵抗で絶縁がなされていることがわかった。一方で、(a), (b) ではコンダクタンスの分布が (c) よりも広がっていることから、超短 CNT と Lipid では膜を介してイオン電流が流れていたことがわかった。さらに超短 CNT では 0.06 nS と 0.19 nS 付近 (Figure 3.6 (a), 矢印) にピークが観察された。ヒストグラムにおけるピークは単一の超短 CNT のコンダクタンスを示していることから、低い方のピーク値を基線として考えると、この超短 CNT のコンダクタンスは 0.13 nS であったことがわかる。

この値は先行研究³¹で報告された値である 0.6 nS より低い³¹が、今回使用した超短 CNT 長さが既報の超短 CNT 長さよりも長く、コンダクタンス値が低下したものと考えられる。以上の電流波形とコンダクタンスより、曝露した超短 CNT が脂質膜に自発的に挿入されたことが示された。

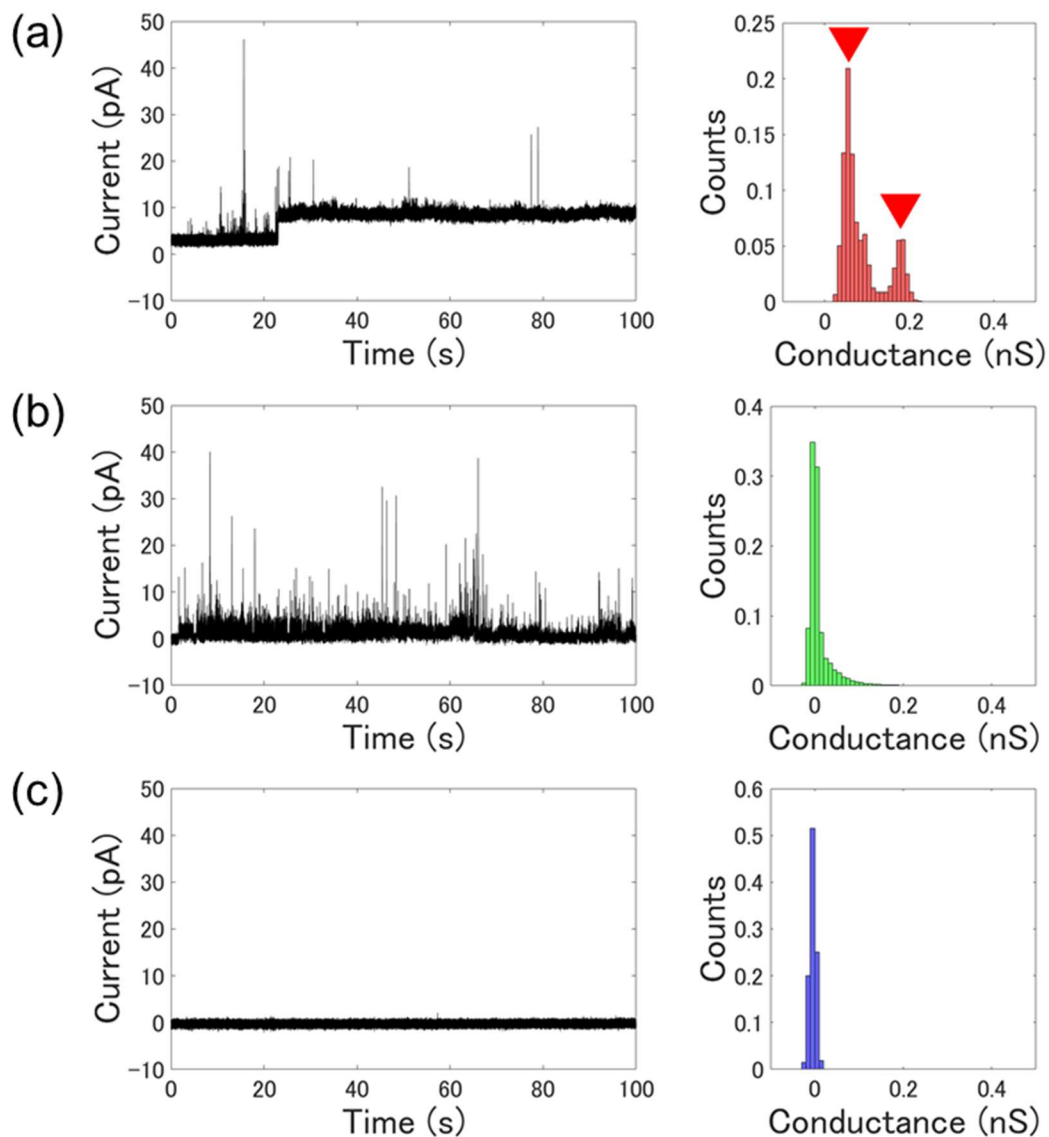


Figure 3.6 Current traces and histograms of conductance values((a)UCNT, (b)Lipid, (c)Control).

さらに超短 CNT に付着した脂質分子と GUV 膜の相互作用を評価するために、蛍光標識脂質を吸着させた超短 CNT を曝露した際の GUV を蛍光顕微鏡によって観察し、蛍光脂質の空間分布を評価した。基本的に超短 CNT および対象条件である Lipid の作製法は 2 章に準ずるが、蛍光標識脂質である N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (NBD-PE) を適用するため、使用する脂質組成を DOPC:NBD-PE=99:1 に変更した。また蛍光顕微鏡観察も 3.3 節に準ずる。なお NBD は波長 488 nm のレーザーで励起し、対応するフィルタを通して CCD カメラ (BU-60, BITRAN) で蛍光を検出した。画像は、超短 CNT 曝露後 29 分間、30 秒おきに撮影し、各条件 3 回ずつ行った。

Figure3.7 に NBD-PE 吸着超短 CNT を曝露した際の GUV の蛍光顕微鏡像を示す。Figure3.7(a), (c), (e) が超短 CNT (High concentration) を暴露した際の各試行における顕微鏡像であり、Figure3.7(b), (d), (f) が Lipid サンプルを暴露した際の各試行における顕微鏡像である。点線で囲われた領域は GUV が存在する箇所を示す。Figure3.7(a), (c), (e) では GUV 膜周縁部に背景より高い蛍光が観察されるのに対し、Figure3.7(b), (d), (f) においては観察されなかった。この傾向は定性的ではあるものの図で示した以外の GUV に対しても観察された。このことは CNT に付着した脂質分子が GUV 膜に集積したことを示しており、超短 CNT の挿入は、CNT のみでなく付着した脂質分子も GUV 膜に対し影響することを示唆している。

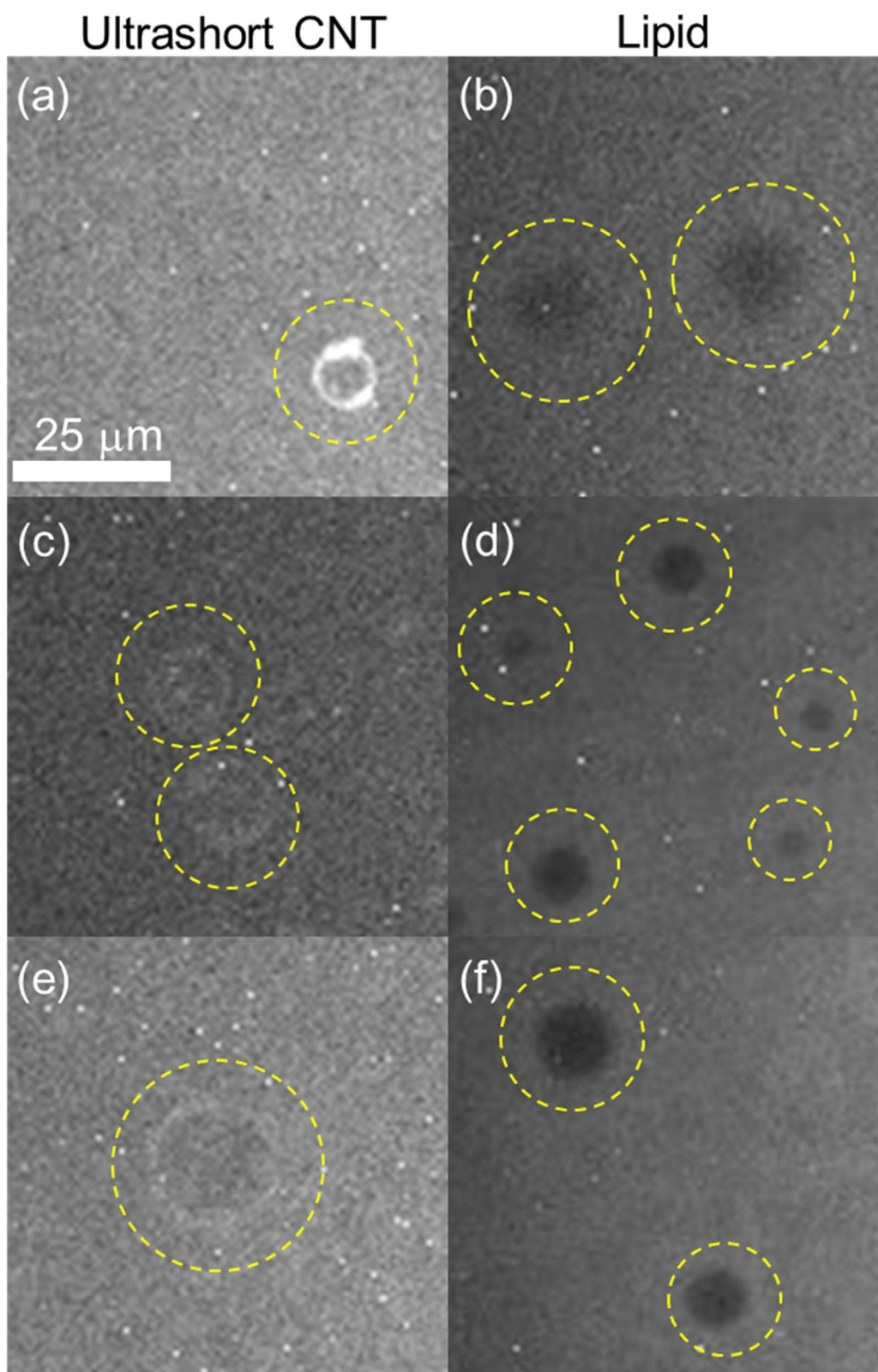


Figure 3.7 Fluorescence microscope images of GUVs exposed to ultrashort CNTs coated with fluorescent-labeled lipid molecules (Scale bar: 25 μm).

3.5 GUV の変形解析

GUV の膜変形と時間の関係を調べるため、タイムラプス画像における GUV 膜の形状評価を行った。GUV の形状は同様の膜変形を解析した先行研究⁷¹を参考に、形状を楕円近似し、その長軸と短軸のアスペクト比で評価した。集計には、チャンバ内の対流がおさまる超短 CNT 曝露後 50 秒後からの画像を使用した。さらに解像度の観点から画像中において、面積が 38 ピクセル以上の GUV (直径 10 μm 以上の球形 GUV の面積に相当) を集計対象とした。なお GUV 同士の重なり等により単一 GUV のアスペクト比が算出できない GUV は除外した。Figure 3.8 に各 CNT 濃度 (赤線 : High concentration, 黄線 : Low concentration, 緑線 : Lipid, 青線 : Control) における画像中 GUV の平均アスペクト比の時間変化を示す。横軸は超短 CNT 曝露後からの経過時間を示している。超短 CNT を曝露しない場合 (Lipid, Control) と比較すると、超短 CNT を曝露した場合 (High concentration, Low concentration) では、平均アスペクト比が時間経過とともに上昇した。また High concentration と Low concentration では、CNT 濃度が高い High concentration の方が平均アスペクト比の増加開始時間が早かった (High concentration: 170 秒, Low concentration: 350 秒)。なお超短 CNT の曝露が GUV の平均アスペクト比の増加へ影響したかを検討するため、曝露後 1730 秒後のデータにおいて Bonferroni 法により「調整化された有意水準 (α')」を求め、各比較ペアの Welch の t 検定結果の確率値に対して α' (0.003) で多重比較検定を行った。その結果、High concentration, Low concentration, Lipid, Control 間の比較において、超短 CNT を曝露した場合 (High concentration, Low concentration) の GUV アスペクト比はいずれも曝露していない場合 (Lipid, Control) に比べ有意に高かった。

膜変形以外によると思われる GUV の崩壊について、Table 3.1 に崩壊した GUV の数と崩壊までに経過した平均時間、および崩壊率を示す。なお集計対象は膜変形解析に用いた GUV 群で、崩壊率は曝露後 50 秒後の GUV 数に対する割合を示している。表より GUV の崩壊は CNT または脂質を曝露した時のみに発生し、その崩壊率はいずれも 15 % 以下で、崩壊する時間は平均して曝露後 4 分以内であった。なお GUV 膜同士の融合は観察されなかった。

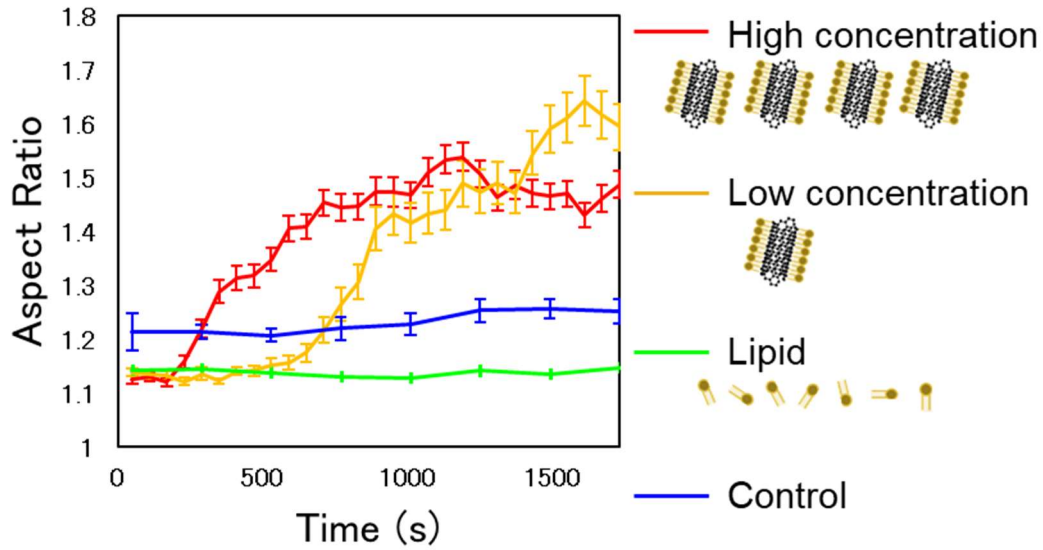


Figure 3.8 Time variation of mean GUVs aspect ratio ($n = 99 \sim 351$, Error bar: SE).

Table 3.1 Number of collapsed GUVs and mean time of collapse (SE).

	High conc.	Low conc.	Lipid	Control
Count	13	12	3	0
Mean time (s)	104 ± 25	180 ± 68	203 ± 74	N/A
Destruction rate (%)	6.1	12.1	1.7	0

典型的に見られた GUV 膜変形については，超短 CNT を曝露しない場合（Lipid, Control）と比較すると，超短 CNT を曝露した場合（High concentration, Low concentration）では，曝露後 1730 秒後の GUV のアスペクト比が有意に高かったことから，超短 CNT の曝露が原因であることがわかる．また GUV アスペクト比は一定時間経過した後に増加するが，その時間は超短 CNT 濃度が高い方が短い．このことは GUV 膜変形に超短 CNT の濃度依存性が存在することを示す．変形した GUV の形態は球形から扁平状を経て最後には複数の小胞が連結したような形状に変化した．この変形を，脂質分子の二重層によって構成される GUV の形状を説明する際に用いられる，面積差弾性（Area difference elasticity, ADE）モデル⁷²を使って考察する．ADE モデルでは，GUV の形状は余剰面積 ξ と固有面積差 Δa_0 という 2 つのパラメータによって決定される．ここで換算体積 ξ は GUV 体積に対する表面積の比を表す無次元パラメータであり，

$$\xi \equiv \frac{R_s}{R_v} - 1 \quad (3-1)$$

で記述される．なお R_s と R_v は，GUV と同じ膜表面積と体積を持つ球の半径に相当し，GUV の膜表面積を S ，体積を V とした場合，

$$R_s = \left(\frac{S}{4\pi}\right)^{\frac{1}{2}} \quad (3-2)$$

$$R_v = \left(\frac{3V}{4\pi}\right)^{\frac{1}{3}} \quad (3-3)$$

となる．また固有面積差 Δa_0 は

$$\Delta a_0 = (N_{\text{out}} - N_{\text{in}})a_0 \quad (3-4)$$

で記述される．なお， a_0 は分子の断面積， N_{out} と N_{in} はそれぞれ二重膜の外層と内層の脂質分子の数を表す⁷³．ここで GUV が球形から複数の連結した小胞に変形する場合，余剰面積 ξ と固有面積差 Δa_0 が増加することが知られている⁷⁴．ここで余剰面積 ξ は GUV 表面積の増加または GUV 体積減少によって増加する．本実験において GUV 表面積の増加の原因は超短 CNT の膜挿入が考えられる．一方で体積減少の原因は，GUV 外に添加した超短 CNT サンプルが含む残留脂質の存在によって GUV 膜に浸透圧差が生じ，GUV 外が高張になったことが挙げられる．しかし脂質分子のみを GUV に曝露した Lipid 条件では膜変形が観察されなかったため，今回の実験では GUV 膜への浸透圧差の影響は少なく，GUV の表面積が増加したことが余剰面積 ξ 増加の原因と考えられる．固有面積差 Δa_0 に関しては，二重膜外層面積の増加または二重膜内層面積の減少によって発生する．本実験では外部から超短 CNT が曝露されているため，二重膜外層面積の増加が固有面積差 Δa_0 増加の要因であると考えられる．実験によって確認された超短 CNT の膜挿入や CNT 吸着脂質の膜への集積と，ADE モデルによる以上の知見を統括すると，超短 CNT による GUV 膜変形のメカニズムは，次のように考えられる (Figure3.9)．すなわち脂質分子が表面に吸着した超短 CNT が膜に挿入されると，膜に CNT と脂質分子が補充され，膜面積の増加につながる．さらに，今回の実験系では超短 CNT を GUV 外から曝露しているため，膜の内層よりも外層に脂質分子が補充され固有面積差 Δa_0 が増加したと予想される．同様のメカニズムは，GUV 外部からの PEG 脂質⁷¹ や人工ペプチド⁷⁵ の膜挿入によっても観察される．なお増加した余剰面積 ξ と固有面積差 Δa_0 は脂質二重膜内層・外層間の脂質分子移動 (フリップフロップ) によって解消されるが，その半減期は DOPC においては数時間から数日とされており⁷⁶，今回の実験系では無視できる現象と考えられる．

膜崩壊は，超短 CNT と脂質の曝露時に観察されたため，超短 CNT や脂質分子，切断過程に混入した超音波ホモジナイザー由来の金属粒子が影響したと思われる．膜を横切

るイオン電流を計測した際に、超短 CNT と Lipid 条件においてイオン電流が計測されたことから、膜との相互作用により生じた膜構造の乱れが崩壊を誘引した可能性がある。一方で、GUV 崩壊までの平均時間が曝露後 4 分以内であることから、曝露時に発生した観察チャンバ内の対流が引き起こしたせん断力による崩壊の影響は除外できない。

GUV 膜同士の融合が確認されなかった理由については、一つに CNT 長さが挙げられる。GUV の膜融合は疎水性 CNT によって膜分子が引き寄せられることによって発生する⁴⁷。GUV 同士が引き寄せられるには、超短 CNT の場合、数～数十 nm の間隔で GUV が密着した状況が必要である。そのため数百 nm～数 μm の長さの CNT の場合と比較した場合、超短 CNT では膜融合する確率は低い。しかしながら超短 CNT 挿入後に生じた小胞同士のように、本実験でも密着した GUV は確認されている。この場合、膜融合が観察されなかった理由として GUV の小胞サイズが挙げられる。数十～数百 nm サイズの SUV では超短 CNT も膜融合を引き起こすことが報告されているが、小胞サイズが増加して秩序立った膜構造が形成されるのに従い、膜融合が発生しにくくなることが予測されている^{77, 78}。今回使用した GUV は直径 10 μm 以上と SUV より小胞サイズが大きいため、小胞が密着した状態であっても膜融合が進行しなかったと考えられる。

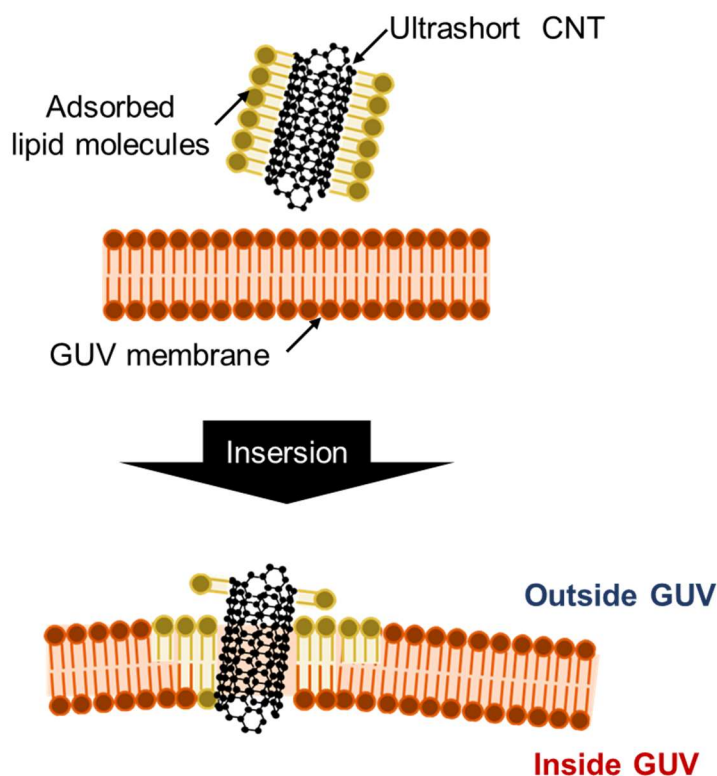


Figure 3.9 Schematic of membrane insertion of Ultrashort CNTs.

3.6 結言

本章では, GUV を用いて超短 CNT が脂質二重膜の変形に及ぼす影響を蛍光顕微鏡による観察にて評価した. 結果として, 超短 CNT が GUV の形状を球形から連結した小胞へと変形させることが示された. また超短 CNT の膜挿入を電気生理学的手法により確認し, 蛍光標識によって超短 CNT に吸着した脂質分子の GUV 膜への集積を確認した. さらにその変形形態を ADE モデルと比較することにより, GUV の膜面積と曲率の増加が超短 CNT の膜挿入により発生していることが示唆された. よってこのことから膜の融合を引き起こす長い CNT とは異なり, 超短 CNT では膜挿入によって脂質分子やペプチドの膜挿入と同様な膜変形メカニズムを持つことが考えられる. 以上により GUV への超短 CNT 組み込み時における膜変形を制御するための知見を得ることができた. さらに本研究では顕微鏡観察でのリアルタイムな観察が可能なマイクロスケールの GUV を観察対象にしたことにより, これまでのナノスケールの観察では観察されていなかった超短 CNT による膜形態変化を新たに発見することができた. 一方で, 今回考察した膜変形メカニズムの実証のためには, 超短 CNT に吸着した脂質分子の GUV 膜への取り込みについて, 本研究で計測した膜への集積だけではなく, いまだ未評価である膜内層・外層への非対称的な取り込みについて検証する必要がある.

第4章 GUVのイオン透過性評価手法の開発

4.1 緒言

イオンは超短 CNT チャンネルの代表的な透過物質である。GUV-GUV 間、GUV-細胞間におけるイオン透過は、小胞間でのイオン濃度勾配を利用したバイオバッテリー⁷⁹や神経との電気化学通信⁸⁰等のバイオエレクトロニクスデバイスの開発に役立てることが期待できる。こうした背景から、GUVに形成した超短 CNT チャンネルのイオン透過性を評価することは重要である。GUV 膜に形成した超短 CNT チャンネルのイオン透過性評価手法としては、パッチクランプ法がある⁸¹。パッチクランプ法は、先端径が数 μm のガラスピペット電極を細胞膜に密着させて電極・細胞間に電氣的シールを確保することで、細胞中のイオンチャンネル等を通る電流を計測する手法である。先行研究ではパッチクランプ法の中でも電極を細胞膜上に密着させるセルアタッチ法を GUV に適用し、膜中に形成した超短 CNT を通るイオン電流を計測し、そのイオン透過性を評価した³¹。しかしセルアタッチ法はピペットで密着させた膜領域に存在するチャンネルの透過性を評価する手法であり、GUV 全体に形成した超短 CNT チャンネルを通りたいイオン透過を確認することはできない。ガラスピペット電極により膜を局所的に破壊し電極内と GUV 内を接続するホールセル法 (Figure 4.1(a)) も存在するが、GUV の崩壊を防ぐためにピペット内表面の改質と内圧調整が必須であり (Figure 4.1(b),(c))⁸²、計測法の習得には困難が伴う。また計測後の GUV は破壊されるという課題がある。GUV 以外の粒径の脂質二重膜小胞において超短 CNT を介したイオン透過過程は、小胞内に封入した蛍光プローブを利用して計測されてきた (Figure 4.1(d))²⁷。透過した分子に反応して蛍光強度変化を示す蛍光プローブの蛍光強度変化を蛍光分光光度計で測定することによりイオン透過の評価が可能である。しかし、本手法は、主に用いられる直径 200 nm 以下の LUV と比較して溶液中で沈殿しやすい GUV に対しては適用されることはない。一方 LUV においても、その形状を直接観察することはできないことが課題となる。LUV においては超短 CNT が LUV 同士の融合を促進することや前章の研究において超短 CNT の挿入によって GUV が変形を起こしたことを考慮すると、蛍光強度の変化が超短 CNT によるものなのか、GUV の変形によるものなのかを判断することは困難である。従って、その透過過程のメカニズムは不明のままである。そこで本章では、蛍光プローブを内包した GUV を蛍光顕微鏡下によって観察し、顕微鏡像から GUV の蛍光強度を計測

することにより，超短 CNT を介したイオン透過の過程を観察する新しいアプローチを提案した．GUV のサイズが大きいため，顕微鏡で容易にその形状を観察することができる．まず先行研究において超短 CNT での透過が確認されている Ca^{2+} を対象として蛍光顕微鏡を用いた本アプローチの原理実証を行い，その後，本手法を用い GUV への超短 CNT 導入濃度による Ca^{2+} の透過過程の変化を評価した．

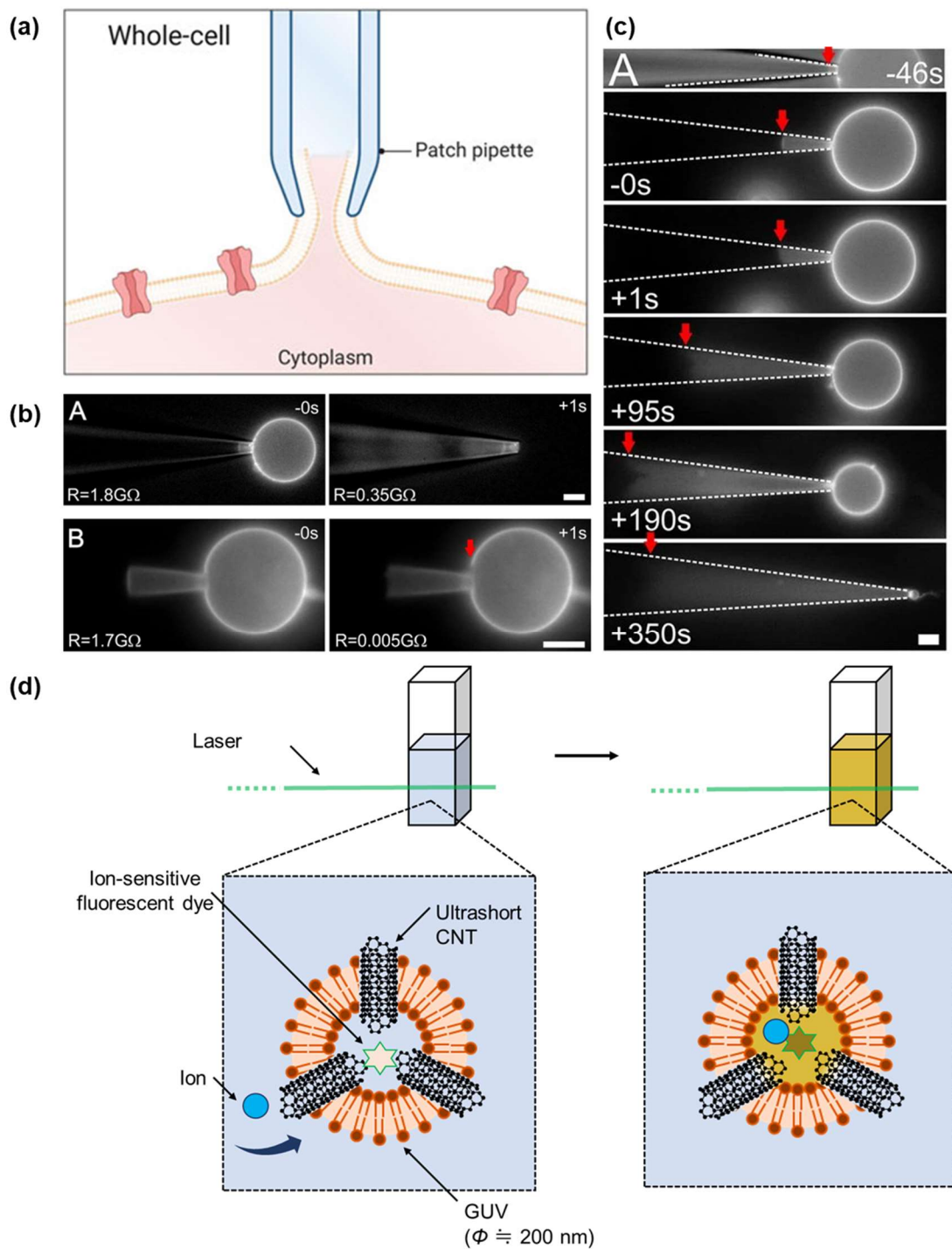


Figure 4.1 (a)Whole-cell patch clamp method⁸³. (b)Diffusion and pore formation of GUV lipid membranes by intra-pipette pressure in whole-GUV patch clamp method⁸². (c)Diffusion of GUV lipid film into pipette in whole-GUV patch clamp method⁸². (d)Evaluation of ion permeability of ultrashort CNTs in LUV membranes using fluorescence spectrophotometry.

4.2 超短 CNT 挿入 GUV の作製

GUV の作製は、3.2 節で行った PVA ゲルを用いたポリマーフィルム水和法を用いた。まずプラズマ照射によって親水化したカバーガラス上に、5 w/w% の PVA 溶液 100 μL を滴下した。その後 1200 rpm で 2 分間スピコートした。被覆した PVA ゲルを 50°C のホットプレート上で 2 時間乾燥させた後、その上に 3 mg/mL の脂質溶液 80 μL を 1200 rpm で 5 分間スピコートした。脂質溶液の組成は、モル比で DOPC : Texas Red-DHPE = 100 : 0.15 であった。スピコートした脂質を -0.08 MPa の真空チャンバ内で 15 分間放置し、溶媒を蒸発させた。脂質をコートしたカバーガラスの上に PDMS で作製したチャンバを置き、Table 4.1 に示した溶液 B または溶液 C を 150 μL 充填し、1 時間かけて脂質を水和して GUV を形成させた。溶液 B, C には Ca^{2+} 感受性蛍光プローブである Fluo-4 を溶解させた。超短 CNT が膜に挿入された GUV (超短 CNT-GUV) を用意する場合には、超短 CNT を含む溶液 B を用いた。対照実験に用いる超短 CNT 未挿入の GUV (Control) を用意する場合には溶液 C を使用した。

Table 4.1 Compositions of the buffer solutions inside and outside GUVs.

		Outside GUV	Inside GUV	
		Buffer A	Buffer B	Buffer C
Solute	Fluo-4	0 mM	22 mM	22 mM
	CaCl_2	60 mM	0 mM	0 mM
	HEPES	10 mM	10 mM	10 mM
	EDTA	1 mM	1 mM	1 mM
	Sucrose	0 mM	200 mM	200 mM
	Glucose	20 mM	0 mM	0 mM
Solvent		Pure water	Ultrashort CNT dispersion	Pure water

4.3 蛍光顕微鏡を用いた GUV 膜のイオン透過性評価

4.3.1 原理実証

Fluo-4 内包 GUV の蛍光顕微鏡観察により、GUV 膜中の超短 CNT を介したイオンの透過を観察した (Figure4.2)。まず、カバーガラス上に GUV 懸濁液 (2.5 μL) をピペティングし、 Ca^{2+} を含む溶液 A を 22.5 μL 加えた。共焦点スキャナユニット (CSU-X1, Yokogawa Electric) を接続した蛍光顕微鏡 (IX 70, Olympus) を用いて、GUV の蛍光強度の変化を観察した。使用した対物レンズの倍率は 10 倍であった。Fluo-4 の励起には波長 488 nm のレーザーを、Texas Red-DHPE の励起には波長 561 nm のレーザーを使用した。蛍光の検出は、各波長用のフィルタを介して CCD カメラ (BU-60, BITRAN CORPORATION) で行った。カバーガラスは、GUV が広がったり破裂したりするのを防ぐために、カゼイン (Wako) でコーティングした⁷⁰。GUV が完全に沈降した 3 分後、1 フレーム/分の速度でタイムラプス画像を撮影した。撮影時には、サンプルに励起光 (波長 : 488 nm) を照射した。GUV 内部の Ca^{2+} 濃度が変化したかどうかを調べるために、画像中の GUV の内部 5×5 ピクセルの領域から、各 GUV の平均蛍光強度を算出した。また、蛍光強度の時間変化を評価するために、 Ca^{2+} を添加する前の GUV 内の蛍光強度も別途測定した。さらに、蛍光強度の増加を比較するために、脂質二重膜にナノサイズの孔を形成する膜タンパク質である α -hemolysin を外液に添加した場合 (α -hemolysin-GUV) の蛍光強度の増加を測定した。これは、Control 条件において GUV 懸濁液と混合する際に、溶液 A に α -hemolysin を 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で添加することで行った。

また本手法では、GUV 中の蛍光物質に励起光を照射して蛍光を発生させた。そこで励起光による光退色が蛍光強度に与える影響を評価した。上記の蛍光顕微鏡観察において GUV 懸濁液の代わりに溶液 C を用いた実験を行った。なお Ca^{2+} を含む溶液 A を添加してから 15 分後までサンプルにレーザーを照射せずに静置し、15 分後に 488nm のレーザーを照射して 1 枚だけ蛍光画像を撮影した。撮影した 100×100 ピクセル領域 ($n = 5$) の蛍光強度と、GUV 撮像時の画像における GUV のない 100×100 ピクセルの領域 ($n = 6$) とを測定し、それぞれの平均値を比較した。

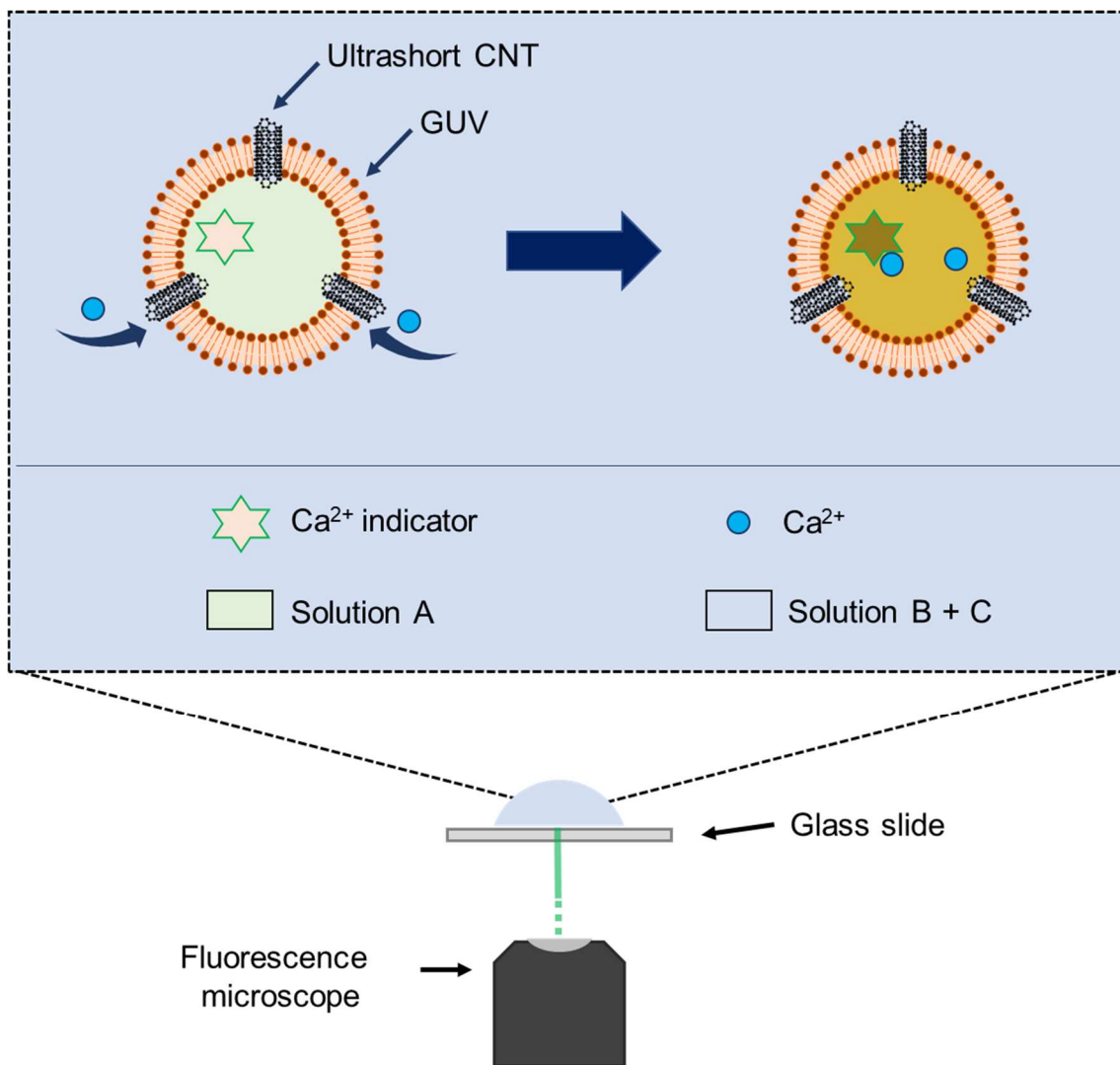


Figure 4.2 Schematic of membrane insertion of Ultrashort CNTs.

Figure4.3(a), (b)は、超短 CNT-GUV の明視野での顕微鏡像である。また、Figure4.3(c)は Figure4.3(b)の GUV に波長 561 nm のレーザーを照射した際の蛍光顕微鏡像である。GUV 膜に含まれる蛍光標識された脂質の蛍光によって GUV が小胞の形をとっていることがわかった。超短 CNT-GUV の平均粒径は $17\ \mu\text{m}$ (Max = $34\ \mu\text{m}$, Min = $9\ \mu\text{m}$, $n = 115$) であった。このことから超短 CNT 分散液を水和液に混合した状態であっても、ポリマーフィルム水和法で GUV が形成可能であることが示された。Control の平均粒径は $24\ \mu\text{m}$ (Max = $50\ \mu\text{m}$, Min = $10\ \mu\text{m}$, $n = 79$) であった。

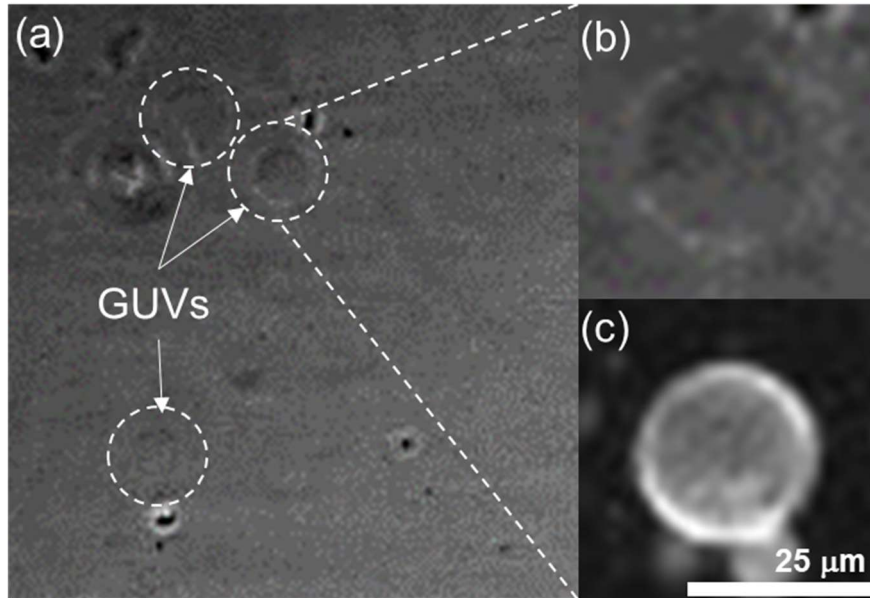


Figure 4.3 Confocal and fluorescence microscope image of ultrashort CNT-GUVs.

Figure4.4 は、超短 CNT-GUV (Figure4.4(a), (b)), Control (Figure4.4(c), (d), (e), (f)) と α -hemolysin-GUV (Figure4.4(g), (h)) の、 Ca^{2+} を添加してから 3 分後および 10 分後の蛍光顕微鏡像である。これらの画像を比較すると、超短 CNT-GUV と Control の蛍光強度は、3 分から 10 分間に減少していることがわかった。緩衝液を添加してから 3 分後の超短 CNT-GUV に着目すると、GUV 内部の蛍光強度が背景よりも高くなっており (Figure4.4(a)), Ca^{2+} が GUV の外側から内側に透過されたことを示唆している。同様に、 α -hemolysin-GUV も背景に比べて高い蛍光強度を示した。Control においては、Figure4.4(e)に示すように背景と比較して低い蛍光強度を示していたが、一方で比較的高い内部蛍光強度を示したものもあった (Figure4.4(c))。

Figure4.5 は、 Ca^{2+} を含む外溶液を添加してから 15 分後までの GUV の蛍光強度の変化を示すグラフである。グラフの縦軸は、 Ca^{2+} を含まない GUV の平均蛍光強度で除した GUV 内の蛍光強度を示す。また、 α -hemolysin-GUV の Ca^{2+} 未添加時の蛍光強度には、Control のデータを用いた。グラフ内の赤線と黒線は、それぞれ超短 CNT-GUV と Control の平均蛍光強度の時間経過を表しており、青線は α -hemolysin-GUV の平均蛍光強度の時間変化を示す。Table4.2 に、蛍光強度測定に用いた各条件の GUV のサンプル数と粒子径を示す。GUV の大きさが異なることによる蛍光強度の変化を避けるために、すべての蛍光強度測定に 20 ~ 23 μm の粒径の GUV を選択した。

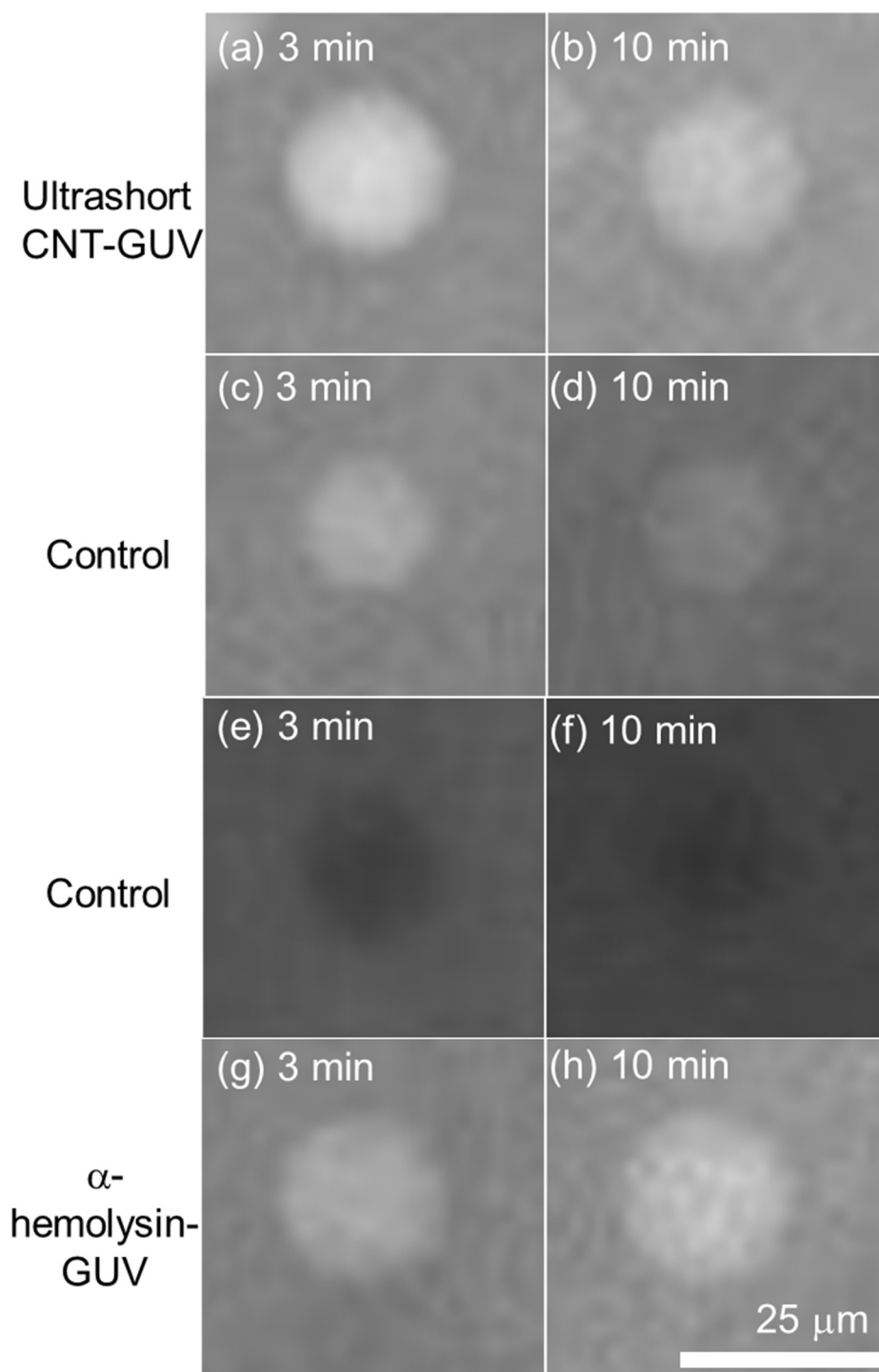


Figure 4.4 Fluorescence microscope images of an ultrashort CNT-GUV, control, and a α -hemolysin-GUV.

Figure4.5 のグラフより、超短 CNT-GUV, Control, α -hemolysin-GUV の蛍光強度が Ca^{2+} 添加前と比較して高いことがわかった。また、3 種類の GUV の蛍光強度の平均値を比較すると、時間変化傾向に違いが見られた。Control の蛍光強度は安定して Ca^{2+} を添加する前の GUV の 3.0 ~ 3.2 倍の蛍光強度を示した。一方、超短 CNT-GUV の蛍光強度は、当初 Ca^{2+} 添加前の GUV の 6.0 倍であったが、その後 5.2 倍に減少した。また、 α -hemolysin-GUV の平均蛍光強度は 4.3 倍から 3.8 倍に変化した。これらの結果は、超短 CNT-GUV や α -hemolysin-GUV では、Control よりも多くの Ca^{2+} が流入した一方で最終的には蛍光強度が減少したことを示している。

Figure4.6 は、すべての測定でレーザーを照射した場合（「All laser」グループ、 $n = 6$ ）と、1 回だけレーザーを照射した場合（「One laser」グループ、 $n = 5$ ）の背景領域の蛍光強度を示したものである。エラーバーは標準誤差を示す。両群の蛍光強度を Wilcoxon 検定により有意水準 5% で比較したところ、有意な差は認められなかった ($p > 0.05$)。

本実験では Ca^{2+} の GUV 内部への流入により、超短 CNT-GUV の内部の蛍光強度が時間経過とともに増加すると予想していたが、実際は Figure4.5 に示すように減少した。これは Ca^{2+} 透過に伴う蛍光強度の増加が Ca^{2+} を添加してから 3 分以内に起こり、計測した Ca^{2+} 添加 3 ~ 15 分後の間では蛍光強度の減少していたためと考えられる。蛍光強度の増加は、 Ca^{2+} 添加 3 分後の超短 CNT-GUV の蛍光強度が Ca^{2+} 添加前の内部蛍光強度の 6 倍であったことから判断できる。蛍光強度の低下については、レーザー照射による Fluo-4 の光退色が一因として考えられる。しかし Figure4.6 のグラフより、撮影時のレーザー照射の回数が、有意に背景の蛍光強度に影響を与えているとはいえなかった。

Figure4.4, 4.5 における GUV 内部蛍光強度の増加は、 Ca^{2+} が GUV の外側から内側に透過されたことを示唆している。これらの測定後のサンプルを顕微鏡で観察したところ、GUV の破裂による膜の破壊は見られなかった。以上の結果から GUV と蛍光顕微鏡を用いて、超短 CNT におけるイオンの透過過程を間接的に観察できることがわかった。一方、実験方法については、実験開始後 3 分間の測定ができないことが原因で、その間に発生する蛍光強度の上昇が確認できていないと考えられる。これはカバーガラス上に GUV を静止させるのに時間を要するためであり、サンプル中での対流を抑える措置が必要である。

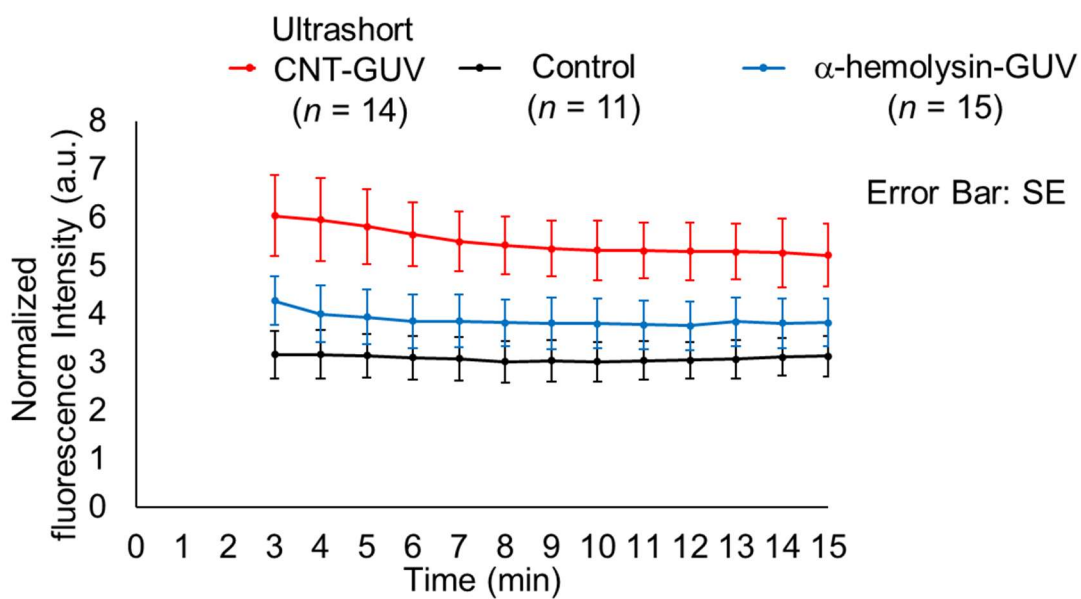


Figure 4.5 Time variation in fluorescence intensity inside GUVs.

Table 4.2 Particle size and number of GUV samples studied under each fluorescence intensity measurement condition.

	n	mean (μm)	max (μm)	min (μm)
Ultrashort CNT-GUV	14	21	23	21
Ultrashort CNT-GUV (Before addition of Ca^{2+})	15	21	23	21
Control	11	22	23	21
Control (Before addition of Ca^{2+})	12	22	23	21
α -hemolysin-GUV	15	22	23	21

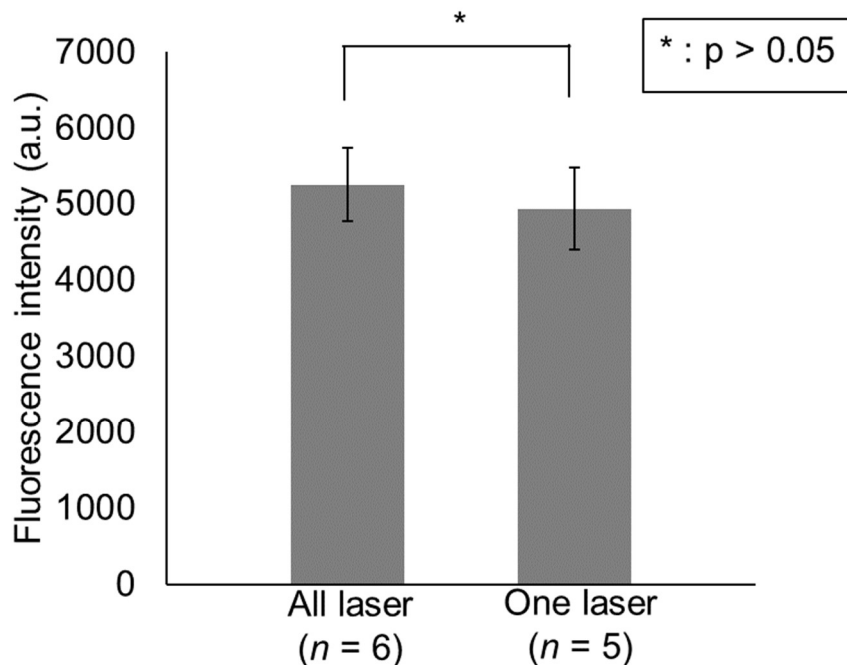


Figure 4.6 Difference in background fluorescence intensity depending on the number of laser irradiations.

また Figure4.4 において Control では予想されていなかった GUV 内部への Ca^{2+} 流入が示された. 蛍光強度が上昇する前に GUV の明らかな変形が観察されなかったことから, Ca^{2+} の流入は GUV 膜のナノサイズの欠陥に起因すると考えられる. GUV の膜はイオンを透過しないと考えられているが, 脂質二重膜に欠陥があると Ca^{2+} が通過する. 先行研究において, ポリマーフィルム水和法では膜内に PVA が残留した GUV が生成され, 膜の特性に影響を与えることが報告されている (Figure4.7) ^{84, 85}. したがって, この残留 PVA 分子が GUV の膜に欠陥を生じさせ, イオンの流入を引き起こしている可能性がある. もう一つの原因としては, GUV の膜に発生する浸透圧が考えられる. 本実験では, GUV の内外で浸透圧が発生しないように緩衝液の濃度を調整しているが, 何らかの原因で浸透圧が発生し, 浸透圧によって膜に孔が開いた可能性がある ⁸⁶.

Figure4.5 のグラフでは, 超短 CNT-GUV と α -hemolysin-GUV の蛍光強度は, Control の蛍光強度よりも高く, その後, 時間の経過とともに減少している. Control より比較的高い蛍光強度を示したことから超短 CNT は α -hemolysin と同様に GUV への Ca^{2+} 流入を促

進したと考えられる。また超短 CNT-GUV と同様に α -hemolysin-GUV の蛍光強度は測定開始時と比較して測定終了時に約 90%に減少したが α -hemolysin のナノ孔は Fluo-4 を透過できる点を考慮すると GUV から Fluo-4 が流出したためと考えられる⁸⁷。

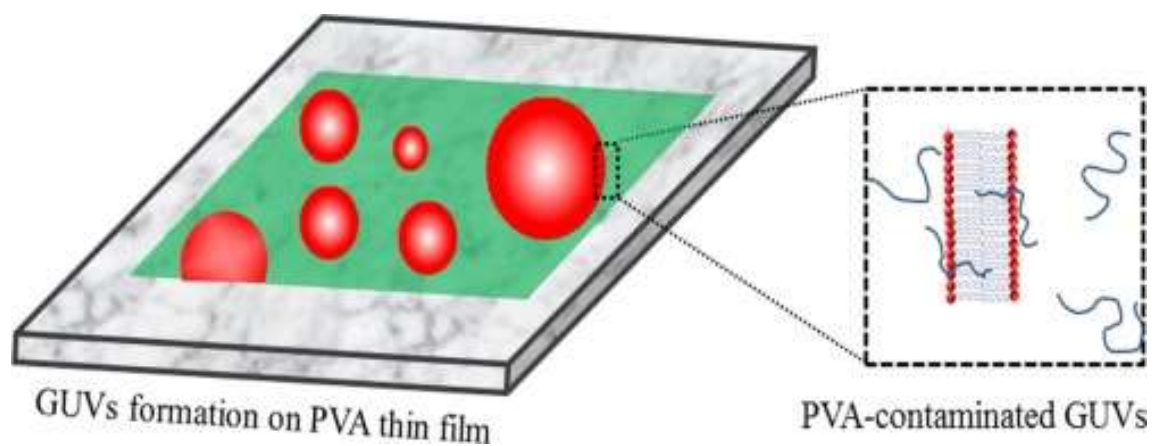


Figure 4.7 Residual polymer molecules in the membrane in polymer-assisted swelling method⁸⁴.

4.3.2 超短 CNT 濃度とイオン透過性の関係

前項では Fluo-4 内包 GUV と蛍光顕微鏡を用いることで、膜の形状を観察しながら、GUV に内包された Fluo-4 の蛍光強度が増加することを確認した。この結果は、 Ca^{2+} が超短 CNT を介して GUV 内に透過されたことを示唆しており、超短 CNT のイオン透過過程を間接的に観察することができることを示した。本項では、提案手法を用い GUV 形成時の超短 CNT 濃度を变化させた際の GUV 膜のイオン透過性を評価する。

GUV の作製は、前項と同様にポリマーフィルム水和法により作製した。まず、5 w/w% PVA 溶液 50 μL をカバーガラス上に塗布した。塗布した PVA ゲルを 50°C で 2 時間乾燥させた後、1 mg/mL の脂質溶液を 10 μL 塗布した。脂質溶液の組成は、DOPC : texas red-DHPE = 100 : 0.15 のモル比であった。カバーガラスを真空チャンバ内に 15 分間放置し、コーティング脂質の溶媒を蒸発させた。GUV 膜に超短 CNT を組み込むため、Table4.3 に示す溶液 A を 150 μL 滴下し、約 1 時間水和して GUV を調製した。溶液 A は、GUV 膜に超短 CNT を組み込むための超短 CNT 分散液を含む。超短 CNT 濃度は、超短 CNT 分散液の 1/10, 1/30, 1/100 に希釈したものをを用いた。対照実験として、超短 CNT を含まない GUV (Control) も調製した。

膜中の GUV と超短 CNT を介したイオンの透過も前項の方法に従った。ただし、前項の手法では、蛍光強度の上昇が溶液の対流による GUV の移動によって観察できなかったため、観察するサンプルの体積を調整した。具体的にはまず、GUV 懸濁液 (2 μL) をカバーガラス上に滴下した。さらに、Table4.3 に示す溶液 B を 9 μL 加え、GUV をカバーガラス上に静置した。約 5 分間静置した後、 Ca^{2+} を含む溶液 C を 9 μL 添加した。なお溶液 C に含まれる Ca^{2+} の濃度は前項の実験から変更した。GUV 内外の Ca^{2+} 濃度差が膜の力学的性質を変化させ、膜に孔を生じさせる要因と考えられるため⁸⁸、生体内環境に近い Ca^{2+} 濃度に変更して同様の測定を行った。以上の操作を 4 種類の GUV サンプルである、1/10 超短 CNT (1/10 希釈した超短 CNT 分散液で水和した GUV)、1/30 超短 CNT (1/30 希釈した超短 CNT 分散液で水和した GUV)、1/100 超短 CNT (1/100 に希釈した超短 CNT 分散液で水和した GUV)、Control に対して行った。

作製した GUV に波長 561 nm のレーザーを照射し、膜の形態を観察した。Figure4.8(a)~(d)に、4 種類の GUV 試料 ((a) 1/10 超短 CNT, (b) 1/30 超短 CNT, (c) 1/100 超短 CNT, (d) Control) の蛍光画像を示す。図に示すように、すべてのサンプルで GUV の形成が確認できた。ほとんどの試料で膜の極端な変形は観察されなかったが、超短 CNT の濃度が最も高かった 1/10 超短 CNT では、Figure4.8(a)に示すように、

GUVの変形が観察された。後述する GUV の蛍光強度測定では、変形した GUV を除外し、変形していない GUV の蛍光強度を測定した。測定は膜の観察が容易な粒径 20 μm 以上の GUV で行った。Table 4.4 に測定した GUV のサンプル数と粒子径を示す。

GUV に 488 nm のレーザーを照射し、GUV 中の Fluo-4 の蛍光強度を経時的に測定した結果を Figure 4.9 のグラフに示す。横軸は Ca^{2+} を含む溶液 C 添加後の経過時間である。縦軸は GUV 内の蛍光強度を示す。数値は測定開始時からの GUV 内の蛍光強度増加値を測定開始時の GUV 内の蛍光強度値で除した値である。赤線は 1/10 超短 CNT の平均蛍光強度、青線は 1/30 超短 CNT の平均蛍光強度、緑線は 1/100 超短 CNT の平均蛍光強度、黒線は Control の平均蛍光強度を示す。

超短 CNT を添加した 3 種類の GUV の蛍光強度は、Control の蛍光強度よりも高かった。これは、超短 CNT が Ca^{2+} の透過を促進したことを示唆する。一方、脂質二重膜は Ca^{2+} を透過させないため、Control では 蛍光強度が増加しないことが予想されるが、Figure 4.9 が示すように蛍光強度は上昇している。これは、前項でも触れた膜中の欠陥や GUV 外の Fluo-4 が Ca^{2+} と反応した蛍光によるためと考えられる。

超短 CNT 濃度が Ca^{2+} 透過性に与える影響については、超短 CNT 濃度が高いほど、GUV 中の超短 CNT の挿入率が高くなり、 Ca^{2+} 透過性が高くなると予想されたが、結果は異なった。Figure 4.9 に示すように、1/100 超短 CNT は 1/10 超短 CNT や 1/30 超短 CNT よりも Ca^{2+} を透過している。この点から、GUV 形成時の超短 CNT の濃度と GUV 膜への超短 CNT の取り込み率は比例しないことが示唆される。特に比較的高濃度の超短 CNT サンプルの場合では、膜中にある超短 CNT がチャンネルを形成できなかった、または超短 CNT を多数含んだ GUV を形成できていなかったことが考えられる。そのため今後は GUV 膜中に存在する超短 CNT と Ca^{2+} 透過性の関係について着目する必要がある。

Table 4.3 Compositions of the buffer solutions inside and outside GUVs.

	Solution		
	A	B	C
Fluo-4	5 μM	0 μM	0 μM
CaCl_2	0 mM	0 mM	1 mM
EDTA	1 mM	1 mM	1 mM
Sucrose	200 mM	0 mM	0 mM
Glucose	0 mM	200 mM	197 mM
Ultrashort CNTs	diluted to 1/10, 1/30, 1/100		

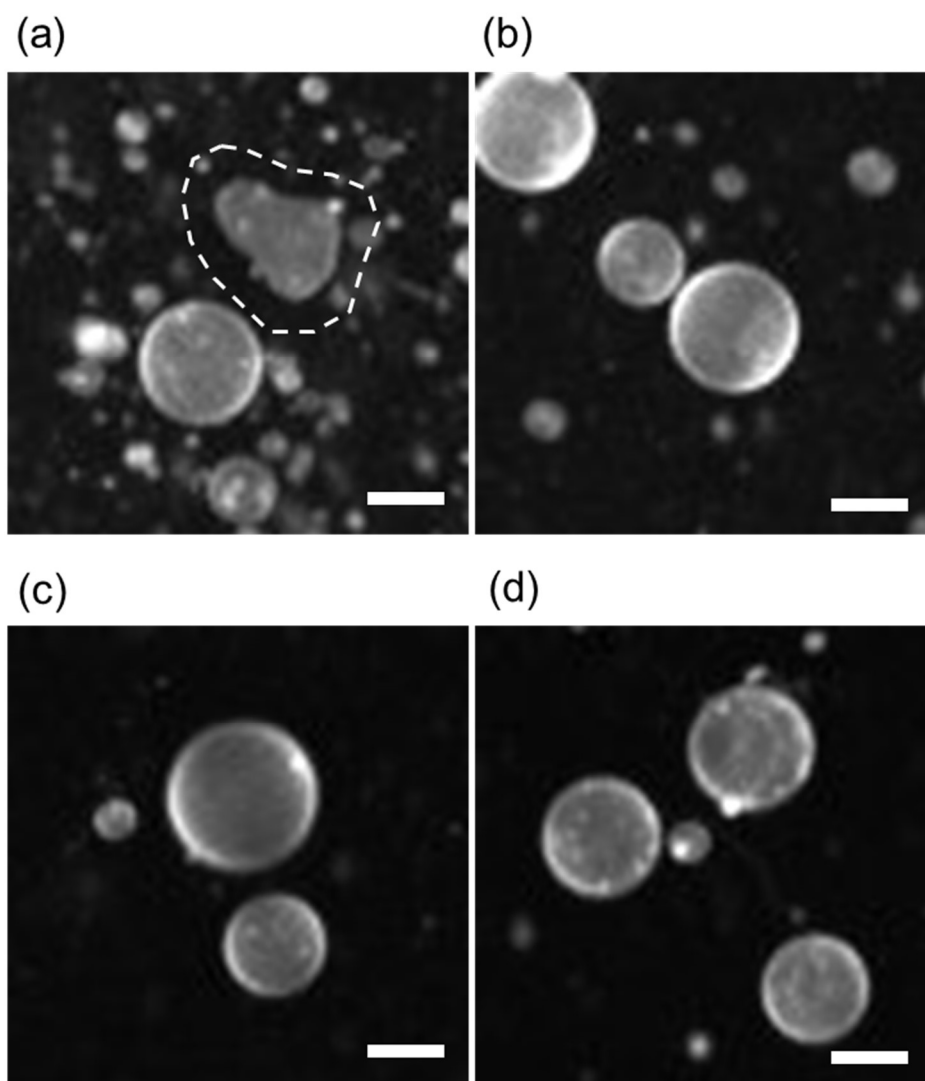


Figure 4.8 Fluorescence microscope images of GUVs (Scale bar: 20 μm)

Table 4.4 Particle size and number of GUV samples.

	<i>n</i>	Mean (μm)	Max (μm)	Min (μm)
1/10 ultrashort CNT	54	25	34	20
1/30 ultrashort CNT	54	26	41	20
1/100 ultrashort CNT	62	28	66	20
Control	57	29	55	20

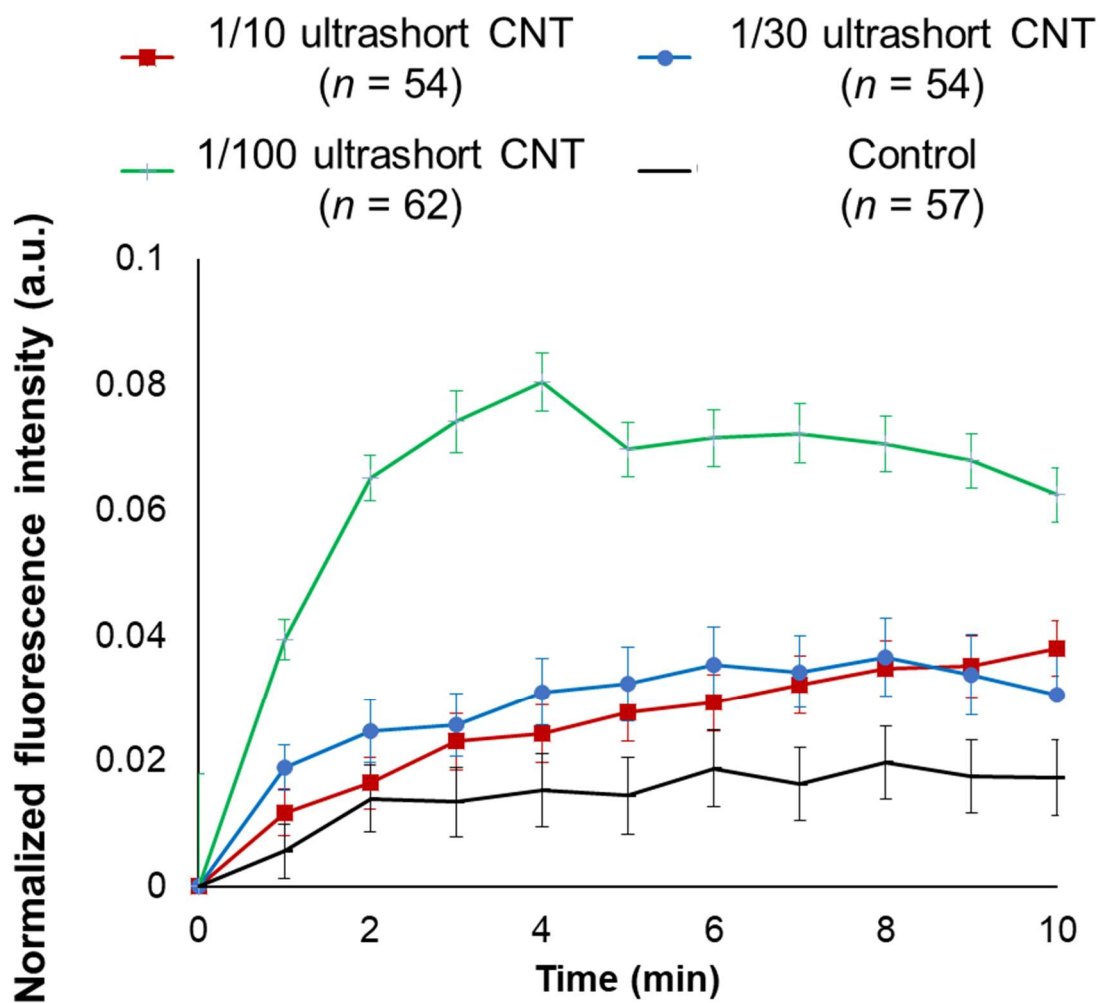


Figure 4.9 Time variation in fluorescence intensity in GUVs (Error bar: SE).

4.4 結言

本研究では、GUV-GUV間、GUV-細胞間におけるイオン透過をバイオエレクトロニクスデバイスの開発に役立てることを前提に、GUVに形成した超短CNTチャネルのイオン透過性の評価手法を提案した。提案した蛍光プローブを内包したGUVと蛍光顕微鏡観察を組み合わせた評価手法は、既存のパッチクランプ法と比べ、膜へ機械的な干渉がなく比較的操作が簡便であるという点で新規性がある。本研究ではCa²⁺感受性蛍光プローブを内包したGUVにて提案手法の実証を行い、膜中に挿入した超短CNTチャネルのCa²⁺透過を確認することができた。またGUV膜の形態観察と内部蛍光強度の測定を並行して行った結果、超短CNTによるGUV膜の変形に起因するイオン透過の可能性を排除した評価が可能になった。さらに、超短CNTの添加濃度を変えてGUVを作製し、GUV膜のCa²⁺透過性の違いを評価した。添加する超短CNTの濃度を上げると膜中のチャネル数が増加してCa²⁺の透過性が上昇すると考えられたが、添加する超短CNT濃度とCa²⁺の透過性の間に相関は見られなかった。比較的高濃度の超短CNTサンプルの場合では、膜中にある超短CNTがチャネルを形成できなかった、または超短CNTを多数含んだGUVを形成できていなかったことが考えられる。そのため今後はGUV膜中に存在する超短CNTとCa²⁺透過性の関係について着目する必要がある。

第 5 章 結論

5.1 本論文のまとめ

GUV は外部環境から隔離された微小空間を提供可能であるため、生物学的プロセスや生命の起源の探求を目的とした人工細胞研究のみならず、生物学を参考にしたマイクロリアクタやバイオセンシングの開発においても重要なツールとなっている。GUV を基盤としたデバイスにおいて、複雑な化学反応系の構築や細胞との通信のために、単一 GUV 内のシステム構築にとどまらず、GUV 内での化学反応の出力を他の GUV や細胞に入力する機能が重要となる。典型的に GUV を利用したシステムにおいてはチャネルを通じた外部への分子信号拡散によって行われるが、標的への信号の減衰が発生するため、GUV-GUV 間、GUV-細胞間の分子情報伝達には、両者をつなぐチャネルの形成が必要となる。GUV ベースのデバイスにおける小胞間の分子伝達経路において超短 CNT チャネルが有用であるものの、GUV における超短 CNT の形成についての試みがほとんどないことが課題であった。そこで本研究では、GUV における超短 CNT チャネルの形成を本研究の目的とし、目的達成にあたり課題となる、超短 CNT 挿入が GUV の膜形態に及ぼす影響評価および、GUV における超短 CNT チャネルのイオン透過能評価手法の開発を行った。以下に各章で得た結論についてまとめる。

第 2 章「超短 CNT の作製」では、GUV に超短 CNT チャネルを形成するための前段階として、超短 CNT を作製した。自発的な脂質二重膜への挿入を可能とするために、超音波破碎による切断とともに DOPC による物理吸着による水性溶媒中での分散を手法として採用した。作製した超短 CNT の長さに対しては、TEM 観察 AFM 観察、DLS 分析を行うことで、CNT が 60 nm 以下の範囲に切断されていることを確認した。切断によって膜挿入に必要な CNT 長が得られたと考えられるものの、その長さ分布は広く、30 nm を超える長さの超短 CNT については、膜挿入不能であるか、挿入後に膜内部の疎水性部分へ埋没すると考えられる。また超短 CNT のラマンスペクトルを得たところ、CNT のみならず脂質分子固有のスペクトルが観察され、分散液中に脂質分子と CNT の存在を確認できた。さらに CNT の RBM より超短 CNT の直径が 0.9 nm と 1.6 nm であることが推定できた。最後に、超短 CNT を曝露した脂質二重膜に固定電圧を印加した状態での電流計測により、超短 CNT の脂質二重膜におけるチャネル形成能力について評価したところ、チャネル形成を示唆するステップ状の電流波形が観察された。さらに

ヒストグラムにおけるコンダクタンスの離散的な分布より単一超短 CNT のコンダクタンスが 0.4 nS であることが推定された。この数値は既報の値と同様のオーダーを示しており、超短 CNT が膜に挿入されたことが示唆された。以上より、今回作製した超短 CNT は数～数十 nm に切断されており、脂質二重膜に自発的に挿入できる特性を持つことを確認した。

第 3 章「超短 CNT 挿入による GUV 変形解析」では、GUV を用いて超短 CNT が脂質二重膜の変形に及ぼす影響を調査することを目的とした。そのために蛍光顕微鏡による観察にて超短 CNT に曝露した GUV の膜形状を評価した。結果として、超短 CNT が GUV の形状を球形から連結した小胞へと変形させることが示された。また超短 CNT の膜挿入を電気生理学的手法により確認し、蛍光標識によって超短 CNT に吸着した脂質分子の GUV 膜への集積を確認した。さらにその変形形態を、膜全体の弾性エネルギーによる膜変形モデルと比較することで、GUV の膜面積と曲率の増加が超短 CNT の膜挿入により発生していることが示唆された。このことから膜の崩壊や融合を引き起こす長い CNT とは異なり、超短 CNT では膜挿入によって脂質分子やペプチドの膜挿入と同様な膜変形メカニズムを持つことが考えられる。以上により GUV への超短 CNT 組み込み時における膜変形を制御するための知見を得ることができた。さらに本研究では顕微鏡観察でのリアルタイムな観察が可能なマイクロスケールの GUV を観察対象にしたことにより、これまでのナノスケールの観察では観察されていなかった超短 CNT による膜形態変化を新たに発見することができた。

第 4 章「GUV のイオン透過性評価手法の開発」では、GUV に形成した超短 CNT チャネルのイオン透過性の評価手法を提案した。提案した蛍光プローブを内包した GUV と蛍光顕微鏡観察を組み合わせた評価手法は、既存のパッチクランプ法と比べ、膜へ機械的な干渉がなく比較的操作が簡便であるという点で新規性がある。本研究では Ca^{2+} 感受性蛍光プローブを内包した GUV にて提案手法の実証を行い、膜中に挿入した超短 CNT チャネルの Ca^{2+} 透過を確認することができた。また GUV 膜の形態観察と内部蛍光強度の測定を並行して行った結果、超短 CNT による GUV 膜の変形に起因するイオン透過の可能性を排除した評価が可能になった。さらに、超短 CNT の添加濃度を変えて GUV を作製し、GUV 膜の Ca^{2+} 透過性の違いを評価した。添加する超短 CNT の濃度を上げると膜中のチャネル数が増加して Ca^{2+} の透過性が上昇すると考えられたが、添加する超短 CNT 濃度と Ca^{2+} の透過性の間に相関は見られなかった。そのため、今後は GUV 膜中に存在する超短 CNT と Ca^{2+} 透過性の関係について着目する必要があると分かった。

5.2 今後の課題と展望

本研究で形成した GUV 膜中の超短 CNT について、GUV ベースのデバイスとしての課題を以下に示す。

(1) CNT 長さの不均一性

本研究で用いた超短 CNT は 60 nm 以下の長さ分布を有しているが、これは先行研究³¹で報告されている脂質二重膜の挿入に適しているとされる 10 nm 前後の長さ以外の CNT を有していることを意味する。脂質分子でコーティングされた 1 μm 長さの CNT は膜に挿入しないことがわかっているものの、数十 nm の長さの CNT についてはチャネルを形成できるかは不明である。分子動力学シミュレーションによる研究でそれらの CNT は脂質二重膜に挿入できないか、膜内部の疎水性部分に埋め込まれると予測されているため⁴⁵、今回脂質二重膜に曝露した超短 CNT は挿入されなかったものも存在したと考えられる。そのため、今後は実際に TEM 等で GUV 膜内に存在する超短 CNT の膜に対する姿勢を観察する必要がある。とくに脂質小胞の観察に用いられるネガティブ染色法では CNT の観察が困難であるため、染色工程がなく生体材料の撮像が可能な低温電子顕微鏡法の適用が考えられる。また、サンプル中の超短 CNT 長さの均一性についても、密度勾配遠心やクロマトグラフィーにより特定長さの CNT の抽出を行うことで検討していく。

(2) CNT 挿入数の計測

単一超短 CNT の透過性については 2 章の電気生理学的測定によって単一 CNT のコンダクタンスから評価を行った。しかしこの測定では 3,4 章で GUV に曝露した CNT 濃度での曝露をしていないため、GUV 膜中の CNT の数は推定できない。今回の電気生理学的測定に用いた平面膜は油層中水滴の油水界面に形成した脂質の単分子膜を利用したもののだが、高濃度の超短 CNT を添加した場合には液滴同士の融合が発生しやすくなり計測が非常に困難であった。そのため有機溶媒を使用しない脂質二重膜に超短 CNT を曝露し、曝露 CNT 濃度と透過性の関係性から GUV における挿入された CNT 数を推測していく。

(3) 膜形状の正確な測定

今回 GUV の膜形状の計測においては変形の指標として、GUV を楕円近似した際の長軸短軸のアスペクト比を使用した。変形過程を簡易的に評価する際にはアスペクト比で可能であるものの、GUV の体積や表面積の変化の定量的評価は未実施であった。今

後は GUV の共焦点顕微鏡で撮像した二次元スライス画像から GUV の三次元構造を再構成し、モデルと比較することが必要となる。

(4) 膜内外の脂質分布の測定

3 章では蛍光標識した脂質分子を用いて、超短 CNT に付着した脂質分子の GUV 膜での集積を評価したが、脂質二重膜内層・外層における集積の分布の検証は未実施であった。今後は、超短 CNT 吸着脂質と GUV 膜の膜分子に対してそれぞれドナーとアクセプターとなる蛍光分子で標識し、超短 CNT を挿入した際の蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence Resonance Energy Transfer: FRET) を利用して評価を行う必要がある。膜の内層・外層一方のみを蛍光標識した際の、超短 CNT 挿入後の GUV 膜の蛍光強度変化を評価することで、分布の非対称性を評価することができると考えられる。

(5) CNT による GUV 間の接続

先行研究等では 10 ~ 20 nm 長の超短 CNT がナノスケールの小胞を接続したことが報告されているものの、本研究では GUV-GUV 間を超短 CNT で接続しての分子伝達は計測していない。しかしながら脂質二重膜の厚さが約 4 nm であり、膜間の水層の厚さが 1 nm 以上であると仮定すると GUV 間の接続には 9 nm 以上の長さの超短 CNT が必要であると考えられ、本研究で作製した超短 CNT は密着した GUV 間を接続するのに十分な長さを有していると考えられる。今後は超短 CNT チャンネルを形成した GUV と他の GUV を隣接させることで、GUV 間の分子伝達路形成を行い、本研究で確立した GUV における超短 CNT チャンネルの形成手法およびイオン透過性評価手法を用いて評価・検討を行う。また今回使用した CNT の径は 1 nm 前後であるが他の径の CNT を利用することで透過できる物質の種類が変更できると考えられる。さらにチャンネルの開孔部は現状空いたままであるが、GUV ベースのデバイスに使用するにあたって透過性のスイッチングが必要になる。超短 CNT は開口部の電荷を変更することによって荷電物質の透過性の変更が可能である。また開口部に化学修飾を行うことが可能であるため⁸⁹、蓋状構造を結合することで透過性のスイッチングの検討を行う。

以上の課題を解決することで、今後、GUV 間の効率的な分子伝達経路を通して、複数の GUV 間ネットワークを利用した複雑な化学反応が設計できる。超短 CNT チャンネルはイオンを透過できるため、小胞間でのイオン濃度勾配を利用したバイオバッテリーや神経との電気化学通信等の革新的なバイオエレクトロニクスデバイスの開発に役立つことが期待できる。また小分子の透過や電気泳動を利用した鎖 DNA の輸送が可

能であるため、マイクロリアクタの高機能化を通して、生物工学分野において貢献できる。

さらに国内では学術変革領域 (A)「分子サイバネティクス—化学の力によるミニマル人工脳の構築」のプロジェクトの例に挙げられるように、センサ、プロセッサ、アクチュエータ等の機能をもつ分子システムを実装した GUV などの小胞を結合することにより、化学計算機能による人工知能研究が行われている⁹⁰。この点においても各機能を持つ小胞間の分子透過をつかさどる超短 CNT チャネル形成は、新しい生分解性と情報処理能力を兼ね備えた知能デバイス実装に貢献できるといえる (Figure5.1)。



Figure 5.1 Future outlook on the thesis.

参考文献

- (1) Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Morgan, D.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. Molecular Biology of the Cell, Sixth Edition. *Molecular Biology of the Cell, Sixth Edition* **2015**, 1-1342.
- (2) Stein, H.; Spindler, S.; Bonakdar, N.; Wang, C.; Sandoghdar, V. Production of Isolated Giant Unilamellar Vesicles under High Salt Concentrations. *Frontiers in Physiology* **2017**, 8. DOI: 10.3389/fphys.2017.00063.
- (3) Mozafari, M. R.; Mazaheri, E.; Dormiani, K. Simple Equations Pertaining to the Particle Number and Surface Area of Metallic, Polymeric, Lipidic and Vesicular Nanocarriers. *Scientia Pharmaceutica* **2021**, 89 (2). DOI: 10.3390/scipharm89020015.
- (4) Vitkova, V.; Mader, M.; Podgorski, T. Deformation of vesicles flowing through capillaries. *Europhysics Letters* **2004**, 68 (3), 398-404. DOI: 10.1209/epl/i2004-10211-9.
- (5) Nomura, F.; Inaba, T.; Ishikawa, S.; Nagata, M.; Takahashi, S.; Hotani, H.; Takiguchi, K. Microscopic observations reveal that fusogenic peptides induce liposome shrinkage prior to membrane fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, 101 (10), 3420-3425. DOI: 10.1073/pnas.0304660101.
- (6) Jiang, W. T.; Wu, Z. Y.; Gao, Z.; Wan, M. M.; Zhou, M.; Mao, C.; Shen, J. Artificial Cells: Past, Present and Future. *Acs Nano* **2022**, 16 (10), 15705-15733. DOI: 10.1021/acsnano.2c06104.
- (7) Sato, W.; Zajkowski, T.; Moser, F.; Adamala, K. P. Synthetic cells in biomedical applications. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2022**, 14 (2). DOI: 10.1002/wnan.1761.
- (8) Boyd, M. A.; Kamat, N. P. Designing Artificial Cells towards a New Generation of Biosensors. *Trends in Biotechnology* **2021**, 39 (9), 927-939. DOI: 10.1016/j.tibtech.2020.12.002.
- (9) Stauffer, O.; Antona, S.; Zhang, D.; Csatári, J.; Schröter, M.; Janiesch, J. W.; Fabritz, S.; Berger, I.; Platzman, I.; Spatz, J. P. Microfluidic production and characterization of biofunctionalized giant unilamellar vesicles for targeted intracellular cargo delivery. *Biomaterials* **2021**, 264. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2020.120203.
- (10) Bally, M.; Bailey, K.; Sugihara, K.; Grieshaber, D.; Vörös, J.; Städler, B. Liposome and

- Lipid Bilayer Arrays Towards Biosensing Applications. *Small* **2010**, *6* (22), 2481-2497. DOI: 10.1002/sml.201000644.
- (11) Boyd, M. A.; Thavarajah, W.; Lucks, J. B.; Kamat, N. P. Robust and tunable performance of a cell-free biosensor encapsulated in lipid vesicles. *Science Advances* **2023**, *9* (1). DOI: 10.1126/sciadv.add6605.
- (12) Peng, R. Z.; Xu, L. J.; Wang, H. J.; Lyu, Y. F.; Wang, D.; Bi, C.; Cui, C.; Fan, C. H.; Liu, Q. L.; Zhang, X. B.; et al. DNA-based artificial molecular signaling system that mimics basic elements of reception and response. *Nature Communications* **2020**, *11* (1). DOI: 10.1038/s41467-020-14739-6.
- (13) Noireaux, V.; Libchaber, A. A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101* (51), 17669-17674. DOI: 10.1073/pnas.0408236101.
- (14) Elani, Y.; Law, R. V.; Ces, O. Protein synthesis in artificial cells: using compartmentalisation for spatial organisation in vesicle bioreactors. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2015**, *17* (24), 15534-15537. DOI: 10.1039/c4cp05933f.
- (15) Cho, E. H. E.; Lu, Y. Compartmentalizing Cell-Free Systems: Toward Creating Life-Like Artificial Cells and Beyond. *Acs Synthetic Biology* **2020**, *9* (11), 2881-2901. DOI: 10.1021/acssynbio.0c00433.
- (16) Menendez, D. B.; Senthivel, V. R.; Isalan, M. Sender-receiver systems and applying information theory for quantitative synthetic biology. *Current Opinion in Biotechnology* **2015**, *31*, 101-107. DOI: 10.1016/j.copbio.2014.08.005.
- (17) Buddingh, B. C.; Elzinga, J.; van Hest, J. C. M. Intercellular communication between artificial cells by allosteric amplification of a molecular signal. *Nature Communications* **2020**, *11* (1). DOI: 10.1038/s41467-020-15482-8.
- (18) Yang, Q. X.; Guo, Z. Z.; Liu, H.; Peng, R. Z.; Xu, L. J.; Bi, C.; He, Y. Q.; Liu, Q. L.; Tan, W. H. A Cascade Signaling Network between Artificial Cells Switching Activity of Synthetic Transmembrane Channels. *Journal of the American Chemical Society* **2021**, *143* (1), 232-240. DOI: 10.1021/jacs.0c09558.
- (19) Lentini, R.; Martín, N. Y.; Forlin, M.; Belmonte, L.; Fontana, J.; Cornella, M.; Martini, L.; Tamburini, S.; Bentley, W. E.; Jousson, O.; et al. Two-Way Chemical Communication between Artificial and Natural Cells. *Acs Central Science* **2017**, *3* (2), 117-123. DOI:

- 10.1021/acscentsci.6b00330.
- (20) Toparlak, Ö.; Zasso, J.; Bridi, S.; Dalla Serra, M.; Macchi, P.; Conti, L.; Baudet, M. L.; Mansy, S. S. Artificial cells drive neural differentiation. *Science Advances* **2020**, *6* (38). DOI: 10.1126/sciadv.abb4920.
- (21) Kaneda, M.; Nomura, S. M.; Ichinose, S.; Kondo, S.; Nakahama, K.; Akiyoshi, K.; Morita, I. Direct formation of proteo-liposomes by *in vitro* synthesis and cellular cytosolic delivery with connexin-expressing liposomes. *Biomaterials* **2009**, *30* (23-24), 3971-3977. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.04.006.
- (22) Lu, M.; Zhao, X. Y.; Xing, H. N.; Liu, H.; Lang, L.; Yang, T. Z.; Xun, Z.; Wang, D. K.; Ding, P. T. Cell-free synthesis of connexin 43-integrated exosome-mimetic nanoparticles for siRNA delivery. *Acta Biomaterialia* **2019**, *96*, 517-536. DOI: 10.1016/j.actbio.2019.07.006.
- (23) Laird, D. W. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochemical Journal* **2006**, *394*, 527-543. DOI: 10.1042/bj20051922.
- (24) Shimizu, K.; Mijiddorj, B.; Usami, M.; Mizoguchi, I.; Yoshida, S.; Akayama, S.; Hamada, Y.; Ohyama, A.; Usui, K.; Kawamura, I.; et al. De novo design of a nanopore for single-molecule detection that incorporates a β -hairpin peptide. *Nature Nanotechnology* **2022**, *17* (1), 67-+. DOI: 10.1038/s41565-021-01008-w.
- (25) Sasaki, R.; Sato, K.; Tabata, K. V.; Noji, H.; Kinbara, K. Synthetic Ion Channel Formed by Multiblock Amphiphile with Anisotropic Dual-Stimuli-Responsiveness. *Journal of the American Chemical Society* **2021**, *143* (3), 1348-1355. DOI: 10.1021/jacs.0c09470.
- (26) Lanphere, C.; Ciccone, J.; Dorey, A.; Hagleitner-Ertugrul, N.; Knyazev, D.; Haider, S.; Howorka, S. Triggered Assembly of a DNA-Based Membrane Channel. *Journal of the American Chemical Society* **2022**, *144* (10), 4333-4344. DOI: 10.1021/jacs.1c06598.
- (27) Sanborn, J. R.; Chen, X.; Yao, Y. C.; Hammons, J. A.; Tunuguntla, R. H.; Zhang, Y. L.; Newcomb, C. C.; Soltis, J. A.; De Yoreo, J. J.; Van Buuren, A.; et al. Carbon Nanotube Porins in Amphiphilic Block Copolymers as Fully Synthetic Mimics of Biological Membranes. *Advanced Materials* **2018**, *30* (51). DOI: 10.1002/adma.201803355.
- (28) Iijima, S. HELICAL MICROTUBULES OF GRAPHITIC CARBON. *Nature* **1991**, *354* (6348), 56-58. DOI: 10.1038/354056a0.
- (29) Maheswaran, R.; Shanmugavel, B. P. A Critical Review of the Role of Carbon Nanotubes

- in the Progress of Next-Generation Electronic Applications. *Journal of Electronic Materials* **2022**, *51* (6), 2786-2800. DOI: 10.1007/s11664-022-09516-8.
- (30) Brito, C. L.; Silva, J. V.; Gonzaga, R. V.; La-Scalea, M. A.; Giarolla, J.; Ferreira, E. I. A Review on Carbon Nanotubes Family of Nanomaterials and Their Health Field. *Acs Omega* **2024**, *9* (8), 8687-8708. DOI: 10.1021/acsomega.3c08824.
- (31) Geng, J.; Kim, K.; Zhang, J. F.; Escalada, A.; Tunuguntla, R.; Comolli, L. R.; Allen, F. I.; Shnyrova, A. V.; Cho, K. R.; Munoz, D.; et al. Stochastic transport through carbon nanotubes in lipid bilayers and live cell membranes. *Nature* **2014**, *514* (7524), 612-+. DOI: 10.1038/nature13817.
- (32) Tran, I. C.; Tunuguntla, R. H.; Kim, K.; Lee, J. R. I.; Willey, T. M.; Weiss, T. M.; Noy, A.; van Buuren, T. Structure of Carbon Nanotube Porins in Lipid Bilayers: An in Situ Small-Angle X-ray Scattering (SAXS) Study. *Nano Letters* **2016**, *16* (7), 4019-4024. DOI: 10.1021/acs.nanolett.6b00466.
- (33) Tunuguntla, R. H.; Allen, F. I.; Kim, K.; Belliveau, A.; Noy, A. Ultrafast proton transport in sub-1-nm diameter carbon nanotube porins. *Nature Nanotechnology* **2016**, *11* (7), 639-+. DOI: 10.1038/nnano.2016.43.
- (34) Sullivan, K.; Zhang, Y. L.; Lopez, J.; Lowe, M.; Noy, A. Carbon nanotube porin diffusion in mixed composition supported lipid bilayers. *Scientific Reports* **2020**, *10* (1). DOI: 10.1038/s41598-020-68059-2.
- (35) Zhang, Y. L.; Tunuguntla, R. H.; Choi, P. O.; Noy, A. Real-time dynamics of carbon nanotube porins in supported lipid membranes visualized by high-speed atomic force microscopy. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* **2017**, *372* (1726). DOI: 10.1098/rstb.2016.0226.
- (36) Sun, L.; Crooks, R. M. Single carbon nanotube membranes: A well-defined model for studying mass transport through nanoporous materials. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122* (49), 12340-12345. DOI: 10.1021/ja002429w.
- (37) Holt, J. K.; Park, H. G.; Wang, Y. M.; Stadermann, M.; Artyukhin, A. B.; Grigoropoulos, C. P.; Noy, A.; Bakajin, O. Fast mass transport through sub-2-nanometer carbon nanotubes. *Science* **2006**, *312* (5776), 1034-1037. DOI: 10.1126/science.1126298.
- (38) Hinds, B. J.; Chopra, N.; Rantell, T.; Andrews, R.; Gavalas, V.; Bachas, L. G. Aligned multiwalled carbon nanotube membranes. *Science* **2004**, *303* (5654), 62-65. DOI:

- 10.1126/science.1092048.
- (39) Lee, C. Y.; Choi, W.; Han, J. H.; Strano, M. S. Coherence Resonance in a Single-Walled Carbon Nanotube Ion Channel. *Science* **2010**, *329* (5997), 1320-1324. DOI: 10.1126/science.1193383.
- (40) Liu, H. T.; He, J.; Tang, J. Y.; Liu, H.; Pang, P.; Cao, D.; Krstic, P.; Joseph, S.; Lindsay, S.; Nuckolls, C. Translocation of Single-Stranded DNA Through Single-Walled Carbon Nanotubes. *Science* **2010**, *327* (5961), 64-67. DOI: 10.1126/science.1181799.
- (41) Liu, L.; Yang, C.; Zhao, K.; Li, J. Y.; Wu, H. C. Ultrashort single-walled carbon nanotubes in a lipid bilayer as a new nanopore sensor. *Nature Communications* **2013**, *4*. DOI: 10.1038/ncomms3989.
- (42) Tunuguntla, R. H.; Escalada, A.; Frolov, V. A.; Noy, A. Synthesis, lipid membrane incorporation, and ion permeability testing of carbon nanotube porins. *Nature Protocols* **2016**, *11* (10), 2029-2047. DOI: 10.1038/nprot.2016.119.
- (43) Umeda, K.; Kobayashi, K.; Oyabu, N.; Matsushige, K.; Yamada, H. Molecular-scale quantitative charge density measurement of biological molecule by frequency modulation atomic force microscopy in aqueous solutions. *Nanotechnology* **2015**, *26* (28). DOI: 10.1088/0957-4484/26/28/285103.
- (44) Leptihn, S.; Castell, O. K.; Cronin, B.; Lee, E. H.; Gross, L. C. M.; Marshall, D. P.; Thompson, J. R.; Holden, M.; Wallace, M. I. Constructing droplet interface bilayers from the contact of aqueous droplets in oil. *Nature Protocols* **2013**, *8* (6), 1048-1057. DOI: 10.1038/nprot.2013.061.
- (45) Choi, M. K.; Kim, H.; Lee, B. H.; Kim, T.; Rho, J.; Kim, M. K.; Kim, K. Understanding carbon nanotube channel formation in the lipid membrane. *Nanotechnology* **2018**, *29* (11). DOI: 10.1088/1361-6528/aaa77b.
- (46) Han, Z. J.; Yick, S.; Levchenko, I.; Tam, E.; Yajadda, M. M. A.; Kumar, S.; Martin, P. J.; Furman, S.; Ostrikov, K. Controlled synthesis of a large fraction of metallic single-walled carbon nanotube and semiconducting carbon nanowire networks. *Nanoscale* **2011**, *3* (8), 3214-3220. DOI: 10.1039/c1nr10327j.
- (47) Pérez-Luna, V.; Moreno-Aguilar, C.; Arauz-Lara, J. L.; Aranda-Espinoza, S.; Quintana, M. Interactions of Functionalized Multi-Wall Carbon Nanotubes with Giant Phospholipid Vesicles as Model Cellular Membrane System. *Scientific Reports* **2018**, *8*. DOI:

- 10.1038/s41598-018-36531-9.
- (48) Jiang, W.; Wang, Q.; Qu, X. L.; Wang, L. X.; Wei, X. R.; Zhu, D. Q.; Yang, K. Effects of charge and surface defects of multi-walled carbon nanotubes on the disruption of model cell membranes. *Science of the Total Environment* **2017**, *574*, 771-780. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.09.150.
- (49) Guo, Y. C.; Werner, M.; Seemann, R.; Baulin, V. A.; Fleury, J. B. Tension-Induced Translocation of an Ultrashort Carbon Nanotube through a Phospholipid Bilayer. *Acs Nano* **2018**, *12* (12), 12042-12049. DOI: 10.1021/acsnano.8b04657.
- (50) Bangham, A. D.; Horne, R. W. NEGATIVE STAINING OF PHOSPHOLIPIDS + THEIR STRUCTURAL MODIFICATION BY-SURFACE ACTIVE AGENTS AS OBSERVED IN ELECTRON MICROSCOPE. *Journal of Molecular Biology* **1964**, *8* (5), 660-&. DOI: 10.1016/s0022-2836(64)80115-7.
- (51) Reeves, J. P.; Dowben, R. M. FORMATION AND PROPERTIES OF THIN-WALLED PHOSPHOLIPID VESICLES. *Journal of Cellular Physiology* **1969**, *73* (1), 49-&. DOI: 10.1002/jcp.1040730108.
- (52) Rodriguez, N.; Pincet, F.; Cribier, S. Giant vesicles formed by gentle hydration and electroformation: A comparison by fluorescence microscopy. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2005**, *42* (2), 125-130. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2005.01.010.
- (53) Horger, K. S.; Estes, D. J.; 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* **2009**, *131* (5), 1810-1819. DOI: 10.1021/ja805625u.
- (54) Weinberger, A.; Tsai, F. C.; Koenderink, G. H.; Schmidt, T. F.; Itri, R.; Meier, W.; Schmatko, T.; Schröder, A.; Marques, C. Gel-Assisted Formation of Giant Unilamellar Vesicles. *Biophysical Journal* **2013**, *105* (1), 154-164. DOI: 10.1016/j.bpj.2013.05.024.
- (55) Peruzzi, J.; Gutierrez, M. G.; Mansfield, K.; Malmstadt, N. Dynamics of Hydrogel-Assisted Giant Unilamellar Vesicle Formation from Unsaturated Lipid Systems. *Langmuir* **2016**, *32* (48), 12702-12709. DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b01889.
- (56) Angelova, M. I.; Dimitrov, D. S. LIPOSOME ELECTROFORMATION. *Faraday Discussions* **1986**, *81*, 303-+. DOI: 10.1039/dc9868100303.
- (57) Estes, D. J.; Mayer, M. Electroformation of giant liposomes from spin-coated films of lipids. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2005**, *42* (2), 115-123. DOI:

10.1016/j.colsurfb.2005.01.016.

- (58) Peterlin, P.; Arrigler, V. Electroformation in a flow chamber with solution exchange as a means of preparation of flaccid giant vesicles. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2008**, *64* (1), 77-87. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2008.01.004.
- (59) Dimitrov, D. S.; Angelova, M. I. LIPID SWELLING AND LIPOSOME FORMATION MEDIATED BY ELECTRIC-FIELDS. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **1988**, *19* (2), 323-336. DOI: 10.1016/0302-4598(88)80013-8.
- (60) Zhou, Y.; Berry, C. K.; Storer, P. A.; Raphael, R. M. Peroxidation of polyunsaturated phosphatidyl-choline lipids during electroformation. *Biomaterials* **2007**, *28* (6), 1298-1306. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.10.016.
- (61) Walde, P.; Cosentino, K.; Engel, H.; Stano, P. Giant Vesicles: Preparations and Applications. *Chembiochem* **2010**, *11* (7), 848-865. DOI: 10.1002/cbic.201000010.
- (62) Kamiya, K.; Kawano, R.; Osaki, T.; Akiyoshi, K.; Takeuchi, S. Cell-sized asymmetric lipid vesicles facilitate the investigation of asymmetric membranes. *Nature Chemistry* **2016**, *8* (9), 881-889. DOI: 10.1038/nchem.2537.
- (63) Yandrapalli, N.; Petit, J.; Bäumchen, O.; Robinson, T. Surfactant-free production of biomimetic giant unilamellar vesicles using PDMS-based microfluidics. *Communications Chemistry* **2021**, *4* (1). DOI: 10.1038/s42004-021-00530-1.
- (64) Pautot, S.; Frisken, B. J.; Weitz, D. A. Production of unilamellar vesicles using an inverted emulsion. *Langmuir* **2003**, *19* (7), 2870-2879. DOI: 10.1021/la026100v.
- (65) 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* **2007**, *129* (42), 12608-+. DOI: 10.1021/ja074029f.
- (66) Tarun, O. B.; Eremchev, M. Y.; Roke, S. Interaction of Oil and Lipids in Freestanding Lipid Bilayer Membranes Studied with Label-Free High-Throughput Wide-Field Second-Harmonic Microscopy. *Langmuir* **2018**, *34* (38), 11305-11310. DOI: 10.1021/acs.langmuir.8b01790.
- (67) 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* **2007**, *92* (11), 4002-4011. DOI: 10.1529/biophysj.107.104026.

- (68) Cicuta, P.; Keller, S. L.; Veatch, S. L. Diffusion of liquid domains in lipid bilayer membranes. *Journal of Physical Chemistry B* **2007**, *111* (13), 3328-3331. DOI: 10.1021/jp0702088.
- (69) Schmid, E. M.; Richmond, D. L.; Fletcher, D. A. Reconstitution of proteins on electroformed giant unilamellar vesicles. *Building a Cell from Its Component Parts* **2015**, *128*, 319-338. DOI: 10.1016/bs.mcb.2015.02.004.
- (70) Garten, M.; Aimon, S.; Bassereau, P.; Toombes, G. E. S. Reconstitution of a Transmembrane Protein, the Voltage-gated Ion Channel, KvAP, into Giant Unilamellar Vesicles for Microscopy and Patch Clamp Studies. *Jove-Journal of Visualized Experiments* **2015**, (95). DOI: 10.3791/52281.
- (71) Tsuda, S.; Sakakura, T.; Fujii, S.; Suzuki, H.; Yomo, T. Shape Transformations of Lipid Vesicles by Insertion of Bulky-Head Lipids. *Plos One* **2015**, *10* (7). DOI: 10.1371/journal.pone.0132963.
- (72) Seifert, U. Configurations of fluid membranes and vesicles. *Advances in Physics* **1997**, *46* (1), 13-137. DOI: 10.1080/00018739700101488.
- (73) Yanagisawa, M.; Imai, M.; Taniguchi, T. Shape deformation of ternary vesicles coupled with phase separation. *Physical Review Letters* **2008**, *100* (14). DOI: 10.1103/PhysRevLett.100.148102.
- (74) Imai, M.; Sakuma, Y.; Kurisu, M.; Walde, P. From vesicles toward protocells and minimal cells. *Soft Matter* **2022**, *18* (26), 4823-4849. DOI: 10.1039/d1sm01695d.
- (75) Tanaka, T.; Sano, R.; Yamashita, Y.; Yamazaki, M. Shape changes and vesicle fission of giant unilamellar vesicles of liquid-ordered phase membrane induced by lysophosphatidylcholine. *Langmuir* **2004**, *20* (22), 9526-9534. DOI: 10.1021/la049481g.
- (76) Papadopoulos, A.; Vehring, S.; López-Montero, I.; Kutschenko, L.; Stöckl, M.; Devaux, P. F.; Kozlov, M.; Pomorski, T.; Herrmann, A. Flippase activity detected with unlabeled lipids by shape changes of giant unilamellar vesicles. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282* (21), 15559-15568. DOI: 10.1074/jbc.M604740200.
- (77) Ho, N. T.; Siggel, M.; Camacho, K. V.; Bhaskara, R. M.; Hicks, J. M.; Yao, Y. C.; Zhang, Y. L.; Köfinger, J.; Hummer, G.; Noy, A. Membrane fusion and drug delivery with carbon nanotube porins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2021**, *118* (19). DOI: 10.1073/pnas.2016974118.

- (78) Bhaskara, R. M.; Linker, S. M.; Vögele, M.; Köfinger, J.; Hummer, G. Carbon Nanotubes Mediate Fusion of Lipid Vesicles. *Acs Nano* **2017**, *11* (2), 1273-1280. DOI: 10.1021/acsnano.6b05434.
- (79) Zhang, Y. J.; Riexinger, J.; Yang, X. Y.; Mikhailova, E.; Jin, Y. C.; Zhou, L. N.; Bayley, H. A microscale soft ionic power source modulates neuronal network activity. *Nature* **2023**, *620* (7976), 1001-+. DOI: 10.1038/s41586-023-06295-y.
- (80) Hoskin, C. E. G.; Schild, V. R.; Vinals, J.; Bayley, H. Parallel transmission in a synthetic nerve. *Nature Chemistry* **2022**, *14* (6), 650-+. DOI: 10.1038/s41557-022-00916-1.
- (81) Neher, E.; Sakmann, B. SINGLE-CHANNEL CURRENTS RECORDED FROM MEMBRANE OF DENERVATED FROG MUSCLE-FIBERS. *Nature* **1976**, *260* (5554), 799-802. DOI: 10.1038/260799a0.
- (82) Garten, M.; Mosgaard, L. D.; Bornschlögl, T.; Dieudonné, S.; Bassereau, P.; Toombes, G. E. S. Whole-GUV patch-clamping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2017**, *114* (2), 328-333. DOI: 10.1073/pnas.1609142114.
- (83) Ahmadi, S.; Benard-Valle, M.; Boddum, K.; Cardoso, F. C.; King, G. F.; Laustsen, A. H.; Ljungars, A. From squid giant axon to automated patch-clamp: electrophysiology in venom and antivenom research. *Frontiers in Pharmacology* **2023**, *14*. DOI: 10.3389/fphar.2023.1249336.
- (84) Dao, T. P. T.; Fauquignon, M.; Fernandes, F.; Ibarboure, E.; Vax, A.; Prieto, M.; Le Meins, J. F. Membrane properties of giant polymer and lipid vesicles obtained by electroformation and pva gel-assisted hydration methods. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **2017**, *533*, 347-353. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2017.09.005.
- (85) Lira, R. B.; Dimova, R.; Riske, K. A. Giant Unilamellar Vesicles Formed by Hybrid Films of Agarose and Lipids Display Altered Mechanical Properties. *Biophysical Journal* **2014**, *107* (7), 1609-1619. DOI: 10.1016/j.bpj.2014.08.009.
- (86) Shibly, S. U. A.; Ghatak, C.; Karal, M. A. S.; Moniruzzaman, M.; Yamazaki, M. Experimental Estimation of Membrane Tension Induced by Osmotic Pressure. *Biophysical Journal* **2016**, *111* (10), 2190-2201. DOI: 10.1016/j.bpj.2016.09.043.
- (87) Sumitomo, K.; McAllister, A.; Tamba, Y.; Kashimura, Y.; Tanaka, A.; Shinozaki, Y.; Torimitsu, K. Ca²⁺ ion transport through channels formed by α -hemolysin analyzed using a microwell array on a Si substrate. *Biosensors & Bioelectronics* **2012**, *31*

- (1), 445-450. DOI: 10.1016/j.bios.2011.11.010.
- (88) Balantic, K.; Weiss, V. U.; Allmaier, G.; Kramar, P. Calcium ion effect on phospholipid bilayers as cell membrane analogues. *Bioelectrochemistry* **2022**, *143*. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2021.107988.
- (89) Tunuguntla, R. H.; Hu, A. Y.; Zhang, Y. L.; Noy, A. Impact of PEG additives and pore rim functionalization on water transport through sub-1 nm carbon nanotube porins. *Faraday Discussions* **2018**, *209*, 359-369. DOI: 10.1039/c8fd00068a.
- (90) Murata, S.; Toyota, T.; Nomura, S. M.; Nakakuki, T.; Kuzuya, A. Molecular Cybernetics: Challenges toward Cellular Chemical AI. *Advanced Functional Materials* **2022**, *32* (37). DOI: 10.1002/adfm.202201866.

業績

[学術雑誌発表論文]

1. **Kanno, S.**, Peng, Z., Shimba, K., Miyamoto, Y., Yagi, T. Functional Analysis of Liposomes Containing Single-Walled Carbon Nanotubes (SWNTs) by Fluorescence Microscopy, IEEJ Transactions on Electronics, Information and Systems, Vol.141, No.5, pp.620-626, 2021.
2. Miyamoto, Y., Koshidaka, Y., Murase, K., **Kanno, S.**, Noguchi, H., Miyado, K., Ikeya, T., Suzuki, S., Yagi, T., Teramoto, N., Hayashi, S. Functional Evaluation of 3D Liver Models Labeled with Polysaccharide Functionalized Magnetic Nanoparticles, Materials, Vol. 15, No. 21, Nov. 2022.
3. Peng, Z., Yagi, T., **Kanno, S.** Neural Interface for Biohybrid Prosthetic Hands to Realize Sensory and Moter Functions, Journal of Robotics and Mechatronics, Vol.34, No.2, pp.316-318, 2022.
4. **菅野 翔一朗**, 彭 祖癸, 榛葉 健太, 宮本 義孝, 八木 透. 脂質二重膜への超短カーボンナノチューブ挿入が及ぼす膜形態への影響, 電気学会論文誌C (電子・情報・システム部門誌) , Vol.144, No.5, 2024.

[国際会議における発表]

1. Peng, Z., **Kanno, S.**, Shimba, K., Miyamoto, Y., Yagi, T. Preparation of Size-controlled Giant Vesicles under Physiological Condition, IEEE EMBC 2020, MoAT16.6, Virtual, July 2020.
2. **Kanno, S.**, Peng, Z., Shimba, K., Miyamoto, Y., Yagi, T. Effect on membrane permeability of the amount of carbon nanotubes introduced into liposomes, BMEiCON2021, 1570763414, Virtual, Nov. 2021.
3. **Kanno, S.**, Peng, Z., Shimba, K., Miyamoto, Y., Yagi, T. Transmembrane Carbon Nanotubes for Intracellular Stimulation, BMEiCON2022, 1570844483, Thai, Nov. 2022.
4. **Kanno, S.**, Shimba, K., Miyamoto, Y., Yagi, T. Effect of CNT Length on Channel Formation in Lipid Bilayers, BMEiCON2023, 1570943288, Tokyo, Oct. 2023.
5. Shimomura, Y., **Kanno, S.**, Shimba, K., Miyamoto, Y., Yagi, T. Position-controllable cell culture substrate for adherent cells, BMEiCON2023, 1570943406, Tokyo, Oct. 2023.
6. Wardcharoen, K., **Kanno, S.**, Shimba, K., Miyamoto, Y., Yagi, T. A study on the characteristics of CNT for the development of a long-term neural recording, 1570943399, Tokyo, Oct. 2023.
7. Tagai, Y., **Kanno, S.**, Peng, Z., Shimba, K., Miyamoto, Y., Yagi, T. A Research on DNA Nanotube Controlled to Open and Close by Ultrasound, BMEiCON2023, 1570943428, Tokyo, Oct. 2023.

[国内学会における発表]

① 筆頭または登壇者

1. 菅野翔一朗, 彭祖癸, 榛葉健太, 宮本義孝, 八木透. 静置水和法による 単層カーボンナノチューブ・リポソームデバイスの作製, 生体医工学会関東支部若手研究者発表会 2019, C-3-04, 東京, Nov. 2019.
2. 菅野翔一朗, 彭祖癸, 榛葉健太, 宮本義孝, 八木透. 蛍光顕微鏡によるカーボンナノチューブの物質輸送過程の評価, 電気学会電子・情報・システム部門 (C 部門) マグネティックス/医用・生体工学合同研究会, MAG-20-031/MBE-20-016, 東京, Mar. 2020.
3. 菅野翔一朗, 彭祖癸, 榛葉健太, 宮本義孝, 八木透. カーボンナノチューブのナノサイズ孔を用いた神経インタフェース用電極の開発, 日本生体医工学会関東支部若手研究者発表会, B-4-04, オンライン, Dec. 2020.
4. **Kanno, S.**, Peng, Z., Shimba, K., Miyamoto, Y., Yagi, T. Evaluation of ion permeability of single-walled carbon nanotubes using giant liposomes and fluorescence microscopy, 2021 Annual Conference on Electronics, Information and Systems Institute of Electrical Engineers of Japan (IEEJ), SS2-3, Virtual, Sept. 2021.
5. 菅野翔一朗, 彭祖癸, 榛葉健太, 宮本義孝, 八木透. リポソームに導入されたカーボンナノチューブの量が膜透過性に及ぼす影響について, 日本生体医工学会関東支部若手研究者発表会 2021, C-4-04, オンライン, Dec. 2021.
6. 菅野翔一朗, 彭祖癸, 榛葉健太, 宮本義孝, 八木透. 脂質二重膜への超短カーボンナノチューブの組み込みによる膜形態への影響, 2022 年 電気学会 電子・情報・システム部門大会, TC3-10, 広島, Sep. 2022.
7. 菅野翔一朗, 彭祖癸, 榛葉健太, 宮本義孝, 八木透. カーボンナノチューブの膜挿入が脂質二重膜の形態に及ぼす影響について, 日本生体医工学会関東支部 若手研究者発表会 2022, A-2-4, Dec. 2022.
8. 菅野翔一朗, 彭祖癸, 榛葉健太, 宮本義孝, 八木透. 超短カーボンナノチューブの挿入によって誘引される人工脂質二重膜小胞の変形に関する研究, 2023 年 電気学会 電子・情報・システム部門大会, TC3-1-4, 北海道, Aug. 2023.
9. 菅野翔一朗, 彭祖癸, 榛葉健太, 宮本義孝, 八木透. 単層カーボンナノチューブによる人工ギャップ結合の形成, 2019 年 電気学会 電子・情報・システム部門大会, PS2-6, 沖縄, Sep 2019.
10. **Kanno, S.**, Peng, Z., Shimba, K., Miyamoto, Y., Yagi, T. Development of bio-interface device by carbon nanotube (CNTs)-liposomes, The 59th Annual Conference of Japanese Society for Medical and Biological Engineering, PO-2-020, Virtual, May 2020.

②その他

1. WARDCHAROEN KITTAWAT, 彭祖癸, 菅野翔一朗, 榛葉健太, 宮本義孝, 八木

- 透. 神経プローブの電極としての CNT の生体適合性に関する研究, 日本生体医工学会関東支部若手研究者発表会 2022, B-2-5, Dec. 2022.
2. ワードチャローン キッタワット, 菅野 翔一朗, 榛葉 健太, 宮本 義孝, 八木 透. CNT 電極を用いた長期間の神経細胞の活動記録を目的とする神経プローブの開発に関する研究, 電気学会電子・情報・システム部門 (C 部門) マグネティックス/医用・生体工学合同研究会, MBE-23-036, Mar. 2023.
 3. ワードチャローン キッタワット, 菅野 翔一朗, 榛葉 健太, 宮本 義孝, 八木 透. 神経プローブ開発のための CNT の生体適合性・電気的特性に関する研究, 第 62 回日本生体医工学会大会, May 2023.
 4. Wardcharoen, K., Kanno, S., Shimba, K., Miyamoto, Y., Yagi, T. A Study on the Biocompatibility and Electrical Properties of CNT to Develop a Long-Term Neural Probe, 2023 Annual Conference on Electronics, Information and Systems Institute of Electrical Engineers of Japan (IEEJ), SS1-1-3, Hokkaido, Aug. 2023.
 5. Tagai, Y., Kanno, S., Peng, Z., Shimba, K., Miyamoto, Y., Yagi, T. Development of ultrasound-controllable DNA nanotubes, 2023 Annual Conference on Electronics, Information and Systems Institute of Electrical Engineers of Japan (IEEJ), SS1-1-7, Hokkaido, Aug. 2023.
 6. ワードチャローン キッタワット, 菅野 翔一朗, 榛葉 健太, 宮本 義孝, 八木 透. 長期間で生体信号を記録するデバイスの開発に向けたカーボンナノチューブの特性に関する研究, 日本生体医工学会関東支部 若手研究者発表会 2023, B-1-4, Dec. 2023.
 7. 田貝優紀音, 吉崎翔大, 菅野翔一朗, 彭祖癸, 榛葉健太, 宮本義孝, 柴田孝, 八木透. 超音波を用いた開閉制御が可能な DNA ナノチューブに関する研究, 日本生体医工学会関東支部 若手研究者発表会 2023, C-4-1, Dec. 2023.
 8. 下村裕哉, 佐藤颯, 菅野翔一朗, 榛葉健太, 宮本義孝, 八木透. 位置制御を可能とする培養基板に関する研究, 日本生体医工学会関東支部 若手研究者発表会 2023, B-4-5, Dec. 2023.
 9. 豊浦達貴, 岡安悠杜, 下村裕哉, 菅野翔一朗, 榛葉健太, 宮本義孝, 八木透. 培養筋アクチュエータにおける培養日数と収縮率に関する研究, 日本生体医工学会関東支部 若手研究者発表会 2023, E-4-3, Dec. 2023.
 10. 吉崎翔大, 田貝優紀音, 菅野翔一朗, 彭祖癸, 榛葉健太, 宮本義孝, 八木透. 超音波照射によって物質輸送が可能となる DNA ナノチューブの開発, 日本生体医工学会関東支部 若手研究者発表会 2023, C-4-2, Dec. 2023.
 11. 佐藤颯, 下村裕哉, 菅野翔一朗, 榛葉健太, 宮本義孝, 八木透. 正六角形型培養基板上での接着細胞に関する研究, 日本生体医工学会関東支部 若手研究者発表会 2023, E-2-2, Dec. 2023.

[受賞]

1. Kanno, S., 2021 Annual Conference on Electronics, Information and Systems Institute of Electrical Engineers of Japan (IEEJ), Outstanding Student Presentation Award

2. 菅野翔一朗, 日本生体医工学会関東支部若手研究者発表会 2021, 優秀論文発表賞

[外部資金獲得実績]

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, 「カーボンナノチューブを利用した電気シナプス型電極による長時間細胞内刺激の実現」, **研究代表者**, 1800 千円, 2023-2024
2. 立石科学技術振興財団 研究助成 (C), 「カーボンナノチューブを利用した電気シナプス型電極による神経インタフェースの実現」, **研究代表者**, 1695 千円, 2021-2024

謝辞

本論文を執筆するにあたり丁寧なご指導, 並びに多大なご支援をいただきました指導教員の工学院機械系八木透教授に心からお礼申し上げます. 学会発表や論文執筆, 研究会など様々な経験をさせていただきただけでなく, 先生の指導を受ける中で研究を楽しむというスタンスを学ぶことができたことに感謝しています.

研究室のミーティングや学会において, 大変お世話になりました国立研究開発法人国立成育医療研究センターの宮本義孝先生, 東京大学大学院 新領域創成科学研究科の榛葉健太准教授に厚くお礼申し上げます. 宮本先生には細胞培養や有機化学といった観点から非常に参考になるアドバイスをいただきました. 榛葉先生からは神経工学の観点から鋭い指摘をいただいただけでなく, 研究における論理的な考え方についても教えていただきました.

博士論文の審査員として貴重なお時間をいただきました, 柳田保子教授, 高山俊男准教授, 石田忠准教授, 林智広准教授に感謝いたします.

本研究を行うにあたり, 共用機器の利用申請や実験のサポートをしてくださった生命理工学院ライフサイエンス推進機器共同利用室および, オープンファシリティセンタ分析部門の皆さまに御礼申し上げます.

日ごろから明るく過ごしやすい研究室環境を提供してくださった八木研究室の学生の皆さんには感謝申し上げます. 特に Zugu PENG さんからは研究室所属時より研究について手取り足取り教えていただきました, ここにお礼申し上げます.

最後に, 金銭面, 生活面において常に支えてきてくれた家族に感謝申し上げます.

2024年6月 菅野 翔一朗