

フェムトリポソームが拓く革新的1分子定量解析
～ 微小かつ均一なりポソームの作製とデジタルバイオ分析への応用 ～

1. 発表者

- 曾我 直樹 (研究当時：東京大学 大学院工学系研究科 応用化学専攻 助教)
太田 陽 (研究当時：東京大学 大学院工学系研究科 応用化学専攻 修士課程2年)
中嶋 康太 (東京大学 大学院工学系研究科 応用化学専攻 修士課程2年)
渡邊 力也 (研究当時：東京大学 大学院工学系研究科 応用化学専攻 講師)
上野 博史 (東京大学 大学院工学系研究科 応用化学専攻 助教)
野地 博行* (東京大学 大学院工学系研究科 応用化学専攻 教授)

*：責任著者

2. 発表のポイント

- ◆ 研究室独自の微細加工デバイスを用いて、堅牢でハイスループトなりポソーム作製技術を開発しました(図1)。
- ◆ 本技術で作製したリポソーム(フェムトリポソーム)は、微小かつ均一であり(図2)、デジタルバイオ分析用のプラットフォームとして極めて有望です。
- ◆ このフェムトリポソームを作製したことで、膜輸送タンパク質の活性の1分子デジタル計測や1分子DNAからの無細胞デジタル遺伝子発現に成功しました。

3. 発表概要

東京大学大学院工学系研究科の野地博行教授らのグループは、独自のマイクロアレイデバイス技術を用いた革新的なデジタルバイオ分析法(注1)を開発し、これまでに世界最高感度のデジタルELISA法やデジタルインフルエンザウイルス検出法などを発表してきました。このデジタルバイオ分析法は、1分子レベルの超高感度なバイオ分析法として近年注目されており、多数の研究者の参入によりその適応範囲が大きく展開されています。しかしながら、この手法の対象は水溶性タンパク質が主で、膜タンパク質への応用は限られていました。膜タンパク質活性計測のツールとしてはリポソームが良く用いられており、リポソームを用いたデジタルバイオ分析の手法が期待されていますが、従来のリポソーム作製法(注2)は粒子径や均一性に問題があり、膜タンパク質の定量的なデジタルバイオ分析に使用することは困難でした。今回、本研究グループは、デジタルバイオ分析用のプラットフォームとして利用可能な、微小かつ均一なりポソーム(フェムトリポソーム)(注3)の堅牢でハイスループトな作製技術を開発しました。そして、このフェムトリポソームを用いて、膜輸送タンパク質の定量的デジタルバイオ分析を実現し、フェムトリポソームが膜タンパク質のデジタルバイオ分析のプラットフォームとして極めて有望であることを実証しました。さらに、フ

フェムトリポソーム内に無細胞タンパク質発現系 (PURE system) を封入し、1分子DNAからのタンパク質のデジタル遺伝子発現を実現することにも成功したことから、今後、デジタルバイオ分析に加え、人工細胞創生の基礎研究やバイオ分子生産の実用化に向けたプラットフォーム技術として広範にわたる応用が期待されます。

4. 発表内容

● 研究の背景

デジタルバイオ分析は、タンパク質・核酸・ウイルスなどのバイオ分子を1分子あるいは1粒子単位で検出する新たな概念の定量分析法です。私たちは、独自開発した微小リアクタアレイデバイスを用いて各種のデジタルバイオ分析法を確立し、この研究分野を世界で牽引してきました。しかし、現在のデジタルバイオ分析技術は、測定対象が水溶性バイオ分子や親水性粒子に限定されており、分子生物学や医療分野からの要望が大きい膜タンパク質についてはデバイスとの非特異的な疎水相互作用を回避することが難しく、デジタルバイオ分析法は実用化されていません。近年、この問題に対処するため、リポソームを用いて膜タンパク質などの疎水性分子のデジタルバイオ分析を行う手法が注目されていますが、従来のリポソーム作製法では微小で均一なリポソームを短時間で大量に作製することが難しく、本手法を実用化するうえでのボトルネックとなっていました。

● 研究の内容

上述の背景のもと、私たちは研究室で長年培ってきた世界トップクラスの人工細胞リアクタ技術 (マイクロアレイデバイス) を活用して、微小 (フェムトリッターサイズ、微生物とほぼ同じ体積) かつ均一なリポソーム作製技術の開発を目指しました。私たちが開発目標としたデジタルバイオ分析用のフェムトリポソームには、微小性と均一性の両立が求められますが、表面をポリエチレングリコール修飾した研究室独自のwater-in-oil (W/O) droplet arrayデバイスを用いることがブレークスルーとなり、フェムトリッターサイズの微小 (直径0.6-5.3 μm の範囲でコントロール可能) かつ均一 (変動係数5-15%) なリポソームの堅牢なハイスループット (毎時180,000粒子) 作製技術を開発することに成功しました。

また、このフェムトリポソームを利用することで、疎水性タンパク質の定量的デジタルバイオ分析を行うことが可能か検証するために、1分子の α 溶血素ナノポアあるいは F_0F_1 ATP合成酵素をフェムトリポソームに埋め込み、両分子のトランスポーター活性を定量しました。その結果、両分子の活性はそれぞれ、10ターンオーバー/秒、20ターンオーバー/秒と測定され、以前に私たちが別法で測定した実験データとよく一致しました。さらに、フェムトリポソーム内にタンパク質発現系の混合液を封入することにより、1分子DNAからのタンパク質のデ

デジタル遺伝子発現に成功し、フェムトリポソームがデジタルバイオ分析のプラットフォーム技術として極めて有望であることが実証されました。

● 今後の展望

本研究成果は、微小で均一なフェムトリポソームが、膜タンパク質の1分子定量解析から無細胞系の合成生物学まで応用範囲が非常に広いことを示しています。フェムトリポソームの体積や表面積は天然微生物のそれらとほぼ同じであり、今後、より複雑な生体分子反応を再構成した人工細胞創生への応用研究が期待されます。また、このフェムトリポソームのプラットフォーム技術に立脚した、酵素や機能性タンパク質の進化分子工学への研究展開も考えられます。さらに、将来的には、バイオ産業における有用物質生産への応用も期待されます。

● 本研究の助成事業

本研究は、以下の事業の支援を受けて実施しました。

◆ 科学技術振興機構（JST）戦略的創造研究推進事業 CREST

研究領域：「ゲノムスケールのDNA設計・合成による細胞制御技術の創出」（研究総括：塩見春彦）

研究課題：「長鎖DNA合成と自律型人工細胞創出のための人工細胞リアクタシステム」（研究代表者：野地博行）

◆ 日本学術振興会（JSPS）科学研究費助成事業 基盤研究（S）

研究課題：「on-chip型人工細胞リアクタによる次世代型デジタルバイオアッセイの開発」（研究代表者：野地博行）

研究課題番号：19H05624

5. 発表雑誌

雑誌名：ACS Nano（オンライン版：米国東部夏時間 2020年8月30日掲載済み）

論文タイトル：Monodisperse Liposomes with Femtoliter Volume Enable Quantitative Digital Bioassays of Membrane Transporters and Cell-Free Gene Expression

著者：Naoki Soga, Akira Ota, Kota Nakajima, Rikiya Watanabe, Hiroshi Ueno and Hiroyuki Noji*（*：責任著者）

6. 問い合わせ先

<研究に関すること>

東京大学 大学院工学系研究科 応用化学専攻
教授 野地 博行 (のじ ひろゆき)

<報道対応>

東京大学 大学院工学系研究科 広報室

科学技術振興機構 広報課

<JST 事業に関すること>

科学技術振興機構 戦略研究推進部 ライフイノベーショングループ
保田 睦子 (やすだ むつこ)

7. 用語解説

注1 : デジタルバイオ分析

蛍光基質を用いた酵素の1分子計測を一例として、マイクロアレイデバイスを用いたデジタルバイオ分析の原理について簡単に説明する。最初に、デジタルバイオ分析では、酵素反応溶液を多数の微小空間に分画し、確率的に0または1分子の酵素を閉じ込めて酵素反応を同時並行的に行う。そして、蛍光シグナルの有無を指標にして酵素分子数を蛍光顕微鏡で1つずつカウントする(デジタルカウンティング)。従来のアナログ式のバイオ分析では、段階希釈した既知量の酵素をスタンダードとして用いて検体と同一条件で同時に酵素反応を行い、スタンダードの検量線から検体中の酵素量を算出する必要があるが、デジタルバイオ分析ではデジタルカウンティングによる絶対定量が可能であり、原理的には検量線の作成が不要となる。微小空間内での酵素反応は酵素1分子あたりの反応液体積がアナログ分析よりも極めて小さいため、蛍光シグナルの上昇速度が著しく速く(S/N比が高く)、ダイナミックレンジが広いというメリットがある。マイクロアレイデバイスの代わりにリポソーム内の微小空間を用いてデジタルバイオ分析を行う方法も開発されている。

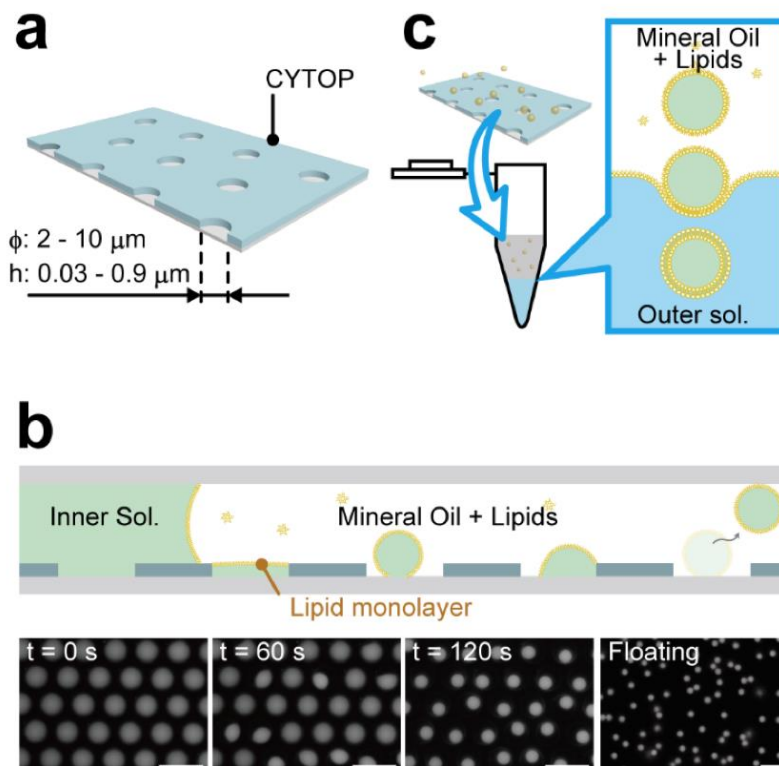
注2：従来のリポソーム作製法

従来のリポソーム作製法には、reverse-phase evaporation法、electroformation法、emulsion transfer法、thin-film hydration法などがあるが、いずれも粒子系のバラツキが大きい。これらの方法で作製したリポソームは、size-extrusion処理により、均一性は多少改善されるが（変動係数20-40%）、光学顕微鏡下での定量分析には粒子が小さすぎる（10-100 nm）。一方、flow-focus デバイスやpulsed jet flow システムを用いれば、均一なリポソーム（変動係数 4%以下）を作製できるが、このような手法で調製されたリポソームの粒子は、通常10 μm以上であり、膜タンパクのトランスポーター活性のデジタルバイオ分析には粒子が大きすぎる。

注3：フェムトリポソーム

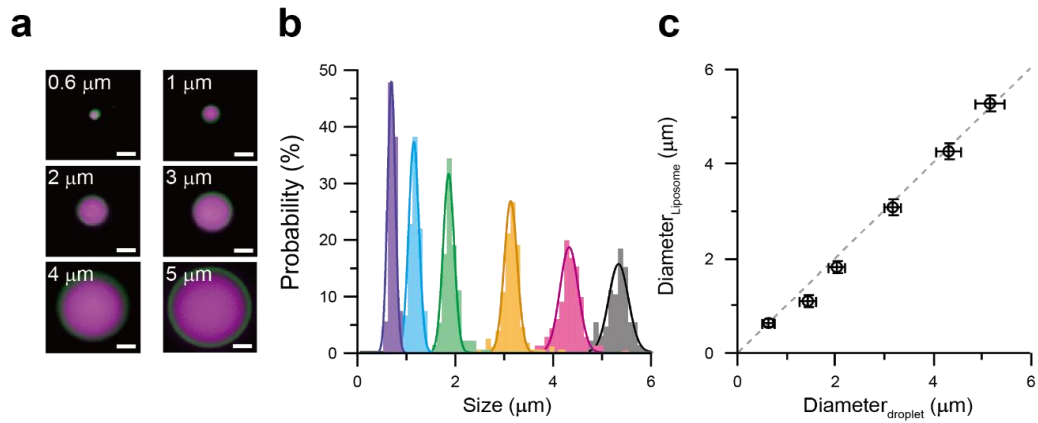
サブ・フェムトリッターからフェムトリッターの体積を有するリポソームの総称。1フェムトリッター (fL) は、1リッター (L) の 10^{-15} 倍。フェムトリポソームの体積や表面積は、天然微生物とほぼ同じであり、デジタルバイオ分析に加え、人工細胞創生に向けた研究ツールとしても有用である。

8. 添付資料



(図1) フェムトリポソームの作製法

(a) 10,000個超のマイクロアレイチャンバー（直径：2.2-9.8 μm 、高さ：26-910 nm）の概略図。(b) 単分散エマルジョン液滴の製造プロセスの概略図（上）および実際の蛍光画像（下）。最初にデバイス内を内部溶液（緑色）で満たし、次に過剰な内部溶液を鉱油（白色）でフラッシュすると、5分以内に液滴が自然形成されチャンバーから遊離することが確認された。(c) エマルジョン透過法の模式図。液滴を含む鉱油を外部溶液（水色）の上に重層し、界面通過法により形成されたりポソームを遠心分離管の底から回収した。



(図2) フェムトリポソームの平均粒子系と粒度分布

(a) 種々の直径のフェムトリポソームの代表的な蛍光画像。リポソーム内腔 (マゼンタ) と脂質二重層 (緑) を蛍光イメージングした。スケールバーの長さは各1 μm 。 (b) フェムトリポソームの粒度分布。実線は個々のヒストグラムのガウスフィッティングであり、その平均と偏差は、左から 0.64 ± 0.1 、 1.1 ± 0.1 、 1.8 ± 0.2 、 3.1 ± 0.2 、 4.3 ± 0.2 、 5.3 ± 0.3 μm 。 (c) 液滴直径とリポソーム直径の相関図。エラーバーは標準偏差を示す。灰色の破線は相関係数が1.0の線形近似を示す。