

# 研究報告書

## 「非平衡人工細胞モデルの時空間ダイナミクス定量解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 27 年 3 月

研究者: 瀧ノ上 正浩

### 1. 研究のねらい

生命システムを「非平衡な条件下で時間発展し続ける分子集合体」として捉える視点が重要であることは、従来から指摘されている。しかしながら、非平衡開放系の理論的基盤が完全には整備されていないことに加え、細胞サイズの非平衡環境を創り出す技術が構築されていないことから、生命システムに対して上記のような視点を持って、定量的な研究を遂行することは、現状では難しい。細胞サイズの非平衡環境を創り出す技術は、非平衡な条件下で時間発展し続ける分子集合体という視点での定量的な生命科学を可能にし、現状の人工細胞研究をさらに発展させることができる。今後、細胞が持つ複雑な機能を再構成して生命システムの神秘に迫っていくために、また、細胞をモデルとした複雑高機能な分子システムを設計・新規構築・制御するために、このような技術が必要不可欠である。そこで、本研究では、非平衡な条件下に置かれた人工細胞の時空間ダイナミクスを定量的に調べることができるような基盤的な技術を構築し、人工細胞研究をはじめとする構成的アプローチの生命科学をさらに加速させることを目指す。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究では、非平衡な条件下に置かれた人工細胞の時空間ダイナミクスを定量的に解析するための基盤技術を構築し、構成的アプローチの生命科学をさらに加速することを目指して研究を行った。生命システムは、「非平衡な条件下で時間発展し続ける分子集合体」として捉えることが重要である。しかし、従来は、マイクロサイズの非平衡環境を制御する技術が存在しなかったことから、このような視点で生命システムを定量的に研究することは難しかった。そこで、本研究では、非平衡な条件下にある人工細胞を創り、その時空間ダイナミクスを定量的に調べることができる技術を構築した。

具体的には、マイクロ流路を利用し、マイクロサイズのドロップレット(油中水滴)を人工細胞リアクタとし、水滴の融合分裂によって人工細胞に非平衡性を与えることに成功した。また、融合分裂の頻度を制御することで、非平衡性を制御し、人工細胞内で、分子濃度振動を示す非線形化学反応を制御することに成功した。マイクロ流体デバイスの開発とともに、数学的な定式化を行い、本デバイスに限らず一般的に設計・構築できる枠組みを確立できた。また、細胞サイズの微小マイクロドロップレットを生成する新規手法の構築にも成功した。

今後は、本研究成果の非平衡人工細胞システムを、生命システムが持つ複雑な機能の制御・再構成や、設計・新規構築を実現し促進できる、基盤的な技術・枠組みとなるようにさらに発展させる。これにより、生体高分子の反応ネットワークを制御し、非平衡な条件下にある生命現象の時空間ダイナミクスの解明につなげることができると考えられる。

## (2) 詳細

研究テーマ A「非平衡開放系型人工細胞のためのドロップレット融合分裂マイクロ流体デバイスの開発」(原著論文 1)

非平衡な条件下で時間発展し続ける動的な人工細胞の構築には、物質の流入出のある人工細胞の構築が不可欠である。しかしながら、従来の人工細胞は小胞に反応系を閉じ込めてしまい、物質の流入出を制御することが不可能であった。本研究では、マイクロ流体工学を利用し、ドロップレット(油中水滴)の融合と分裂を制御する仕組みを構築し、非平衡開放系型的人工細胞の構築と、その中での非線形非平衡化学反応の制御を目指した。

図 1a は開発したマイクロ流体デバイスの模式図を示している。人工細胞となる反应用的ドロップレット(Reactor droplet)は、流路に固定されており、反応物質の輸送を担うドロップレット(Carrier droplet)は T-junction 流路の部分で生成される。生成された carrier droplet 内の溶液はジグザグ流路で攪拌され、均一になった後に、reactor droplet のところまで運ばれる。図 1b に、実際に開発したデバイスの概観写真を示す。アクリル製の流路で、人工細胞を固定する部分は約 800  $\mu\text{m}$  四方で、その両側は電圧印加用電極で挟まれている。電圧を印加しない時は、carrier と reactor のドロップレットは融合しないが、電圧を印加すると融合分裂を起こすことが示された(図 1c)。図 2a は、電圧印加パターンの制御による融合分裂の頻度の制御の方法を示している。融合分裂の頻度が高い程、reactor droplet への物質流入量は大きく、低い程少なくなる。この方法により、実際に物質流入量を変化させ、人工細胞となる reactor droplet の中での非線形非平衡化学反応(pH 振動反応)の振る舞いを制御した(図 2b)。頻度

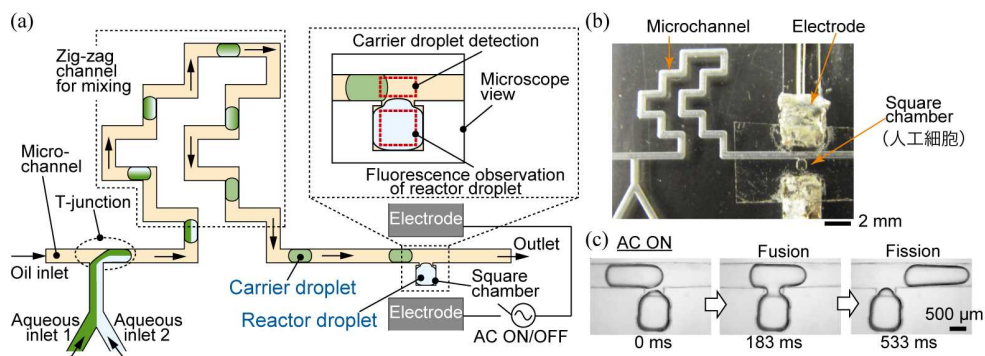


図 1. 非平衡開放系型人工細胞のためのドロップレット融合分裂マイクロ流体デバイス。(a) 模式図。(b) 実際に開発したデバイスの写真。(c) 電圧印加時の融合分裂の様子。

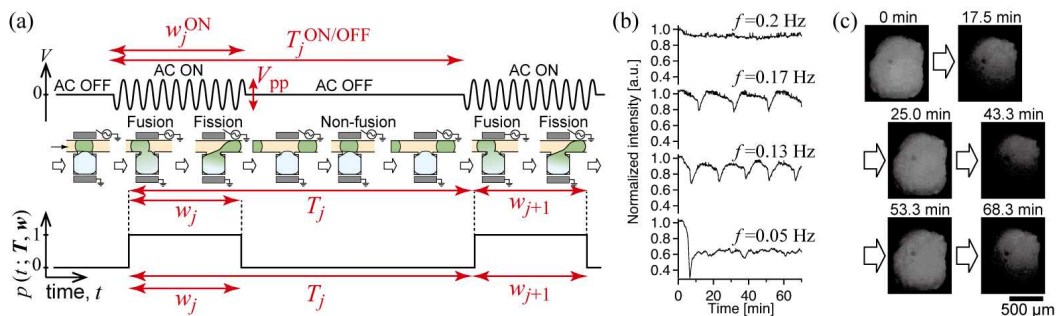


図 2. ドロップレット融合分裂制御による非線形化学反応(pH 振動)の制御。(a) 電圧印加による融合分裂制御。(b) pH 振動の制御。 $f$ : 融合頻度。(c) 振動時の人工細胞蛍光強度の変化。

が高すぎる場合、低すぎる場合は、反応が定常点に収束するが、その中間的な値で、pH の振動が観察された(図 2b, c)。このように、当初の目的通り、人工細胞ドロップレット内での動的な非線形化学反応の制御と定量的な解析に成功した。

研究テーマ B「小胞融合分裂による非平衡開放系の反応系の数学的な定式化」(原著論文 1)

上記のドロップレット融合分裂制御デバイスのメカニズムを数学的に定式化し、本デバイスの形状や構成に依存しない一般的な概念の構築を目的とした。

一般に、融合分裂が起こっている人工細胞小胞の中での化学反応は、離散的な常微分方程式系で  $du_i / dt = f_i(\mathbf{u}) + p(t; \mathbf{T}, \mathbf{w}) \cdot k_i(c_i - u_i)$  と書ける。ここで、 $u_i$  は人工細胞小胞内の分子濃度、 $c_i$  はキャリア小胞内の分子濃度、 $k_i$  は融合時の分子の拡散速度、 $f_i$  は化学反応、 $p(t; \mathbf{T}, \mathbf{w})$  は離散的な関数で融合分裂パターン ( $\mathbf{T}$ : 融合周期、 $\mathbf{w}$ : 融合時間) である。 $p(t; \mathbf{T}, \mathbf{w})$  を Fourier 級数展開することによって、 $p(t; \mathbf{T}, \mathbf{w}) \approx w/T$  であることが示される。これは、物質流入出速度が、融合頻度によって制御できることを示しており、さらに一般的には、 $\mathbf{T}$  をうまく生成することによって、任意の関数の物質流入出速度を実現できるということを示している。このような制御の仕組みを pulse-density modulation と呼ぶ。実際に、本研究では、ホワイトノイズ、正弦波、矩形波、鋸歯状波などの関数形を持つ物質流入出速度を実現し、これらによって非線形化学振動を制御できることを示した。

研究テーマ C「細胞サイズの微小ドロップレット生成デバイスの開発」(原著論文 2)

細胞サイズの非平衡環境を創り出すためには、ドロップレットサイズを細胞と同程度の微小サイズにする必要がある。また、生体分子反応の導入を行う場合、貴重で高価な生体分子サンプルを効率良く内包して微小ドロップレットを作る必要がある。従来のマイクロ流体デバイスを利用すると、送液のためのシリンジやチューブ(送液用の管)にデッドボリュームが発生してしまうので、送液にシリンジポンプやチューブを必要としないマイクロ流体デバイスの構築を行い、従来の問題点を解決することを目指した。

図 3 は本研究で開発したマイクロ流体デバイスの概要図である。このデバイスは、細いガラス管 (Inner capillary) が太いガラス管 (Outer capillary) に挿入された 2 重管が、1.5mL のディスプレイザブルマイクロチューブに固定された構造をしている。マイクロチューブの底と Outer capillary には油層が装填され、Inner capillary には、ドロップレットに内包されるサンプルの水溶液が装填される。マイクロチューブごと卓上小型遠心機で遠心力 (1, 600G) をかけると 2 重管の中の油層と水相が流れ出し、Plateau-Rayleigh 不安定性により微小ドロップレットが生成される。ドロップレットの直径は、Inner capillary の先端直径とほぼ同じになる。Inner capillary に装填するサンプル量は 0.1-2  $\mu\text{L}$  程度であり、少サンプルで十分な量のドロップレットを生成できる。図 4a は実際に生成された細胞サイズドロップレットの直径制御 (約 7-14  $\mu\text{m}$ ) の様子であり、図 4b は、その細胞サイズドロップレット内でのタンパク質 (緑色蛍光タンパク質、GFP) 発現実験の結果である。本デバイスで作製されたドロップレットで生化学反応実験が可能であり、目的とするドロップレットの生成に成功した。

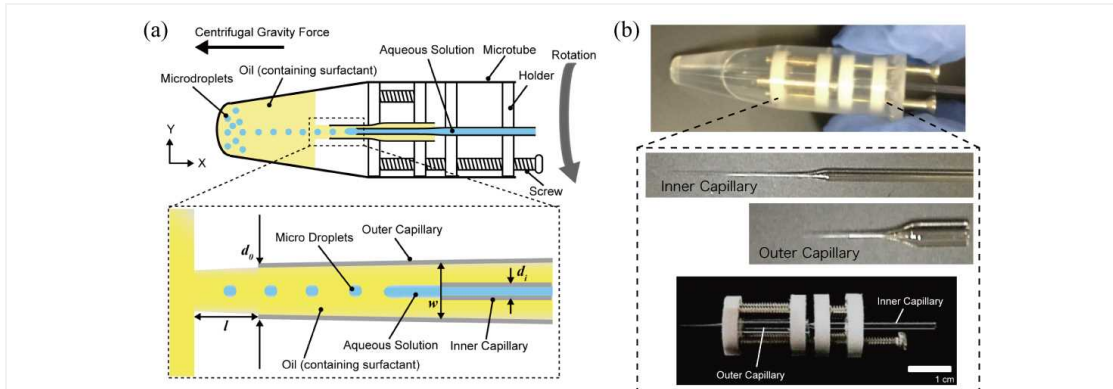


図 3. 細胞サイズドロプレット生成デバイス。(a)デバイスの模式図。細いガラス管 (Inner capillary) が太いガラス管 (Outer capillary) に挿入された 2 重管が、マイクロチューブに固定されている。上が全体像。下が 2 重管内の拡大図。(b)実際のマイクロ流体デバイスの写真。

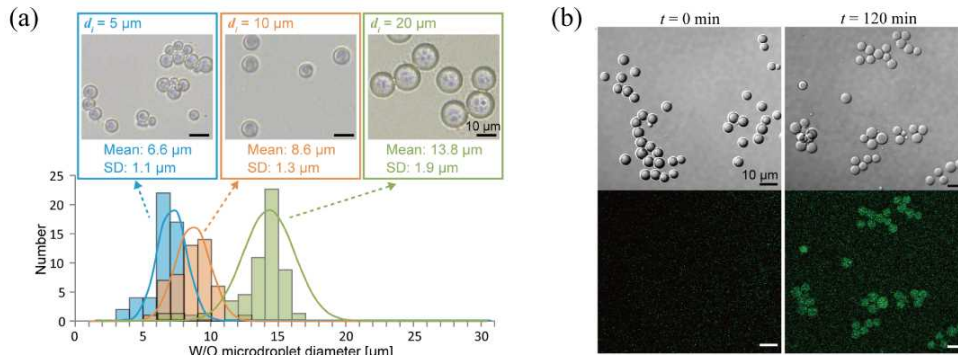


図 4. 細胞サイズドロプレットの生成とドロプレット内での生化学反応。(a)サイズ制御。Inner capillary の直径とドロプレットの直径は同程度にできる。(b)GFP 発現実験。

### 3. 今後の展開

本研究によって、人工細胞の中で非線形非平衡化学反応を実現・制御する手法が確立された。今後は、人工遺伝子回路などの生体分子反応システムを制御し、より実細胞に近いシステムの設計・構築・制御が展開できると考えられる。また、このシステムは、人工細胞としての利用のみならず、一般に、マイクロスケールの非平衡開放系のチャンバーとして利用できるため、一細胞レベルでの細胞制御や観察を実現する新規デバイスへの発展も可能になると考えられる。従来は難しかった細胞サイズでの非平衡性の制御技術が細胞・組織・個体に関する生物学の新しい計測手法としてさらに展開できると考えられる。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

[研究目的の達成状況]

本研究課題では、非平衡開放系型の人工細胞を実現するための基盤技術の構築を目標に

研究を行った。研究成果に示した通り、非平衡開放系型の人工細胞を実現するためのマイクロ流体デバイスの開発に成功し、数学的な定式化にも成功した。また、実際に非線形非平衡化学反応の制御にも成功した。従って、概ね重要な目的を達成したと考えられる。細胞機能の理解や制御を行うためには、単純な非線形非平衡化学反応だけでなく、人工遺伝子回路等の生化学反応の実現も必要になると考えられるので、この点に関しては、さらなる研究を進める必要があると考えている。

[研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)]

研究費は、マイクロ流体デバイス作製のための大型装置とクリーンルーム設置、非平衡開放系型人工細胞の長時間タイムラプス観察のための顕微鏡システム、および、専属の研究補助者の雇用に充てた。このような研究実施体制・環境を研究スタート時点で構築することができたので、集中して効率良く研究課題を遂行することができたと考えられる。

[研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込み含む)]

科学技術への波及効果としては、従来難しかったマイクロメートルスケールでの非平衡開放系化学反応の制御技術が確立できたので、人工細胞構築のみならず、一細胞レベルでの制御や非平衡環境下での一分子レベルでの計測、非平衡条件下での物質生産・材料開発などに応用できると考えられる。社会・経済への波及効果としては、今後、アレイ化・チップ化・自動化などの技術と組み合わせて、創薬スクリーニングなどへの応用が可能になるのではないかと考えられる。したがって、全体としては、今後の科学技術・社会・経済への貢献ができる基盤技術の構築に成功したと考えられる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

マイクロ流路を利用し、マイクロサイズのドロップレット(油中水滴)を人工細胞リアクタとする独自の構想から、水滴の融合分裂によって人工細胞に非平衡性を与えることに成功しました。また、融合分裂の頻度を制御することで、非平衡性を制御し、人工細胞内で、分子濃度振動を示す非線形化学反応を制御することに成功しました。

このような成果から、細胞レベルで生体の非平衡を制御することにより、生命のさまざまな現象、機能、形態などの研究に、貢献することが期待できます。このデバイスの普及や人工細胞モデルを用いた共同研究が広がることを楽しみに致しております。

## 5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- |  |
|--|
| 1. Masahiro Takinoue, in preparation   |
| 2. Hitoyoshi Yamashita, Masamune Morita, Haruka Sugiura, Kei Fujiwara, Hiroaki Onoe, Masahiro Takinoue, "Generation of Monodisperse Cell-Sized Microdroplets using a |

Centrifuge-Based Axisymmetric Co-Flowing Microfluidic Device”, Journal of Bioscience and Bioengineering, 2014.Oct.22. pii: S1389-1723(14) 00354-5

(2)特許出願

研究期間累積件数:1件(非公開)

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

受賞

1. 平成25年度「東工大挑戦的研究賞」学長特別賞(2013年10月17日)
2. 第2回「明日の象徴」研究者部門(2013年10月2日)

主な著作物・解説等

1. 瀧ノ上正浩, “自律性を備えた人工細胞を創出し、生命と物質の境界を探る”(インタビュー形式の解説記事), Nature Digest, vol.9, no.2, pp.26-27 (2012).
2. 瀧ノ上正浩, “細胞に見立てた水滴のふるまいから、生命の物理的な原理を探る”(生命の最先端研究・生命の物理学(1)), Newton 別冊「やさしくわかる 生命の科学」, pp.102-103 (2014).

主な国際招待講演

1. Masahiro Takinoue, “Microfluidic technologies toward the construction of nonequilibrium artificial cells and molecular robots”, Seminar of Division of Biomedical Engineering in MIT-Harvard Medical School, Invited Talk, Nov. 4, 2013, Boston, USA