3P317

キネシンにより駆動される微小管のマイクロパターン内での運動解析

○新田 高洋¹、平野 元久¹、Henry Hess² (¹岐阜大・工・数理デザイン、²U. of Florida, Dept. of Materials Sci. and Eng.)

マイクロパターン上にキネシンを配置した基板を用いることで、in vitro motility assayにおける微小管運動を制御することが可能となった(Hiratsuka et al., Biophys. J. 2001)。これにより分子やナノ粒子を載せて輸送する“分子シャトル”として微小管を利用する可能性が拓けた。現在までに、直線チャネル、十字チャネル、濃縮装置、整流装置などの様々な素子がつくられ、各素子のパフォーマンスが定量的に測定されるようになってきた。しかし、現状では素子内での微小管の運動を予測することができていないため、設計の段階で素子のパフォーマンスを予測することができない。そこで我々は、素子内での微小管運動を予測するために、キネシン・微小管系 in vitro motility assayの長時間観察を行って、時間平均速度とその分布、運動性拡散係数、微小管の軌跡の相関長といった微小管運動の基本特性を明らかにし(Nitta and Hess, Nano Lett. 2005)、この実験データにもとづいてマイクロパターン内での微小管運動の解析を行い、素子のパフォーマンスについての実験結果との比較を行った。

T. Nitta, M. Hirano and H. Hess : Analyzing motions of microtubules gliding on kinesin motors in micro-fabricated patterns

3P319

細胞のサイズ・形状に依存しないエレクトロポレーション法の開発

○黒澤 修¹、小穴 英廣²、和気 佳史²、松岡 達³、野間 昭典³、小寺 秀俊⁴、鷲津 正夫² (¹(株)アドバンス、²東大・機械工学専攻、³京大・生理学教室、⁴京大・マイクロエンジニアリング専攻)

エレクトロポレーションは、細胞にパルス電界を印加して、細胞膜の可逆的破壊を生じさせ、膜が自復する過程において、遺伝子等の外来物質を細胞内に取り込ませる手法である。膜の可逆的破壊は、膜電圧が約1V付近の狭い範囲にある時のみに生ずることが知られている。通常のエレクトロポレーションは、細胞懸濁液に一樣なパルス電界を印加して行いが、この場合、膜電圧は細胞径に比例するため、大きい細胞は過度の膜電圧が生じて破壊されてしまい、一方、小さい細胞に対しては膜電圧が低いため物質導入が行われないことになる。また、非球形の細胞に対しては、膜電圧が細胞の配向に依存するため、可逆的な膜破壊を再現性良く生じさせることは困難である。この点に鑑み、本研究においては、微細加工技術に基づいた、細胞の大きさや形状に依存しないエレクトロポレーション法の開発を行った。絶縁性薄膜上に細胞の直径の数分の一程度のオリフィスを作製し、細胞を吸引固定後、薄膜の両側にパルス電圧を印加する。この手法によれば、オリフィスの作る電界集中により、印加電圧のほとんどが、オリフィスに固定された膜にかかることになる。従って、細胞の大きさ・形状に依存せず、1V程度のパルス電圧の印加により、ここの膜に可逆的破壊が生じ、また、パルス電圧を繰り返し印加しても細胞の破壊につながることはない。実験によれば、球状の浮遊細胞(U937細胞)あるいは扁平状の細胞(モルモット心室筋細胞)をオリフィスに固定後、5msec-10msecで1V-2Vのパルス列を印加することにより、生細胞膜不透過のインターカラーターYO-PRO-1がほぼ100%の効率で導入されることが確認された。本研究は、NEDO「細胞内ネットワークのダイナミズム解析技術開発」プロジェクトの助成を受けて行われたものです。ここに謝意を表します。

O.Kurosawa, H.Oana, Y.Wake, S.Matsuoka, A.Noma and H.Kotera, M.Washizu : Novel electroporation method having no dependence on cell size or shape

3P318

ギャップジャンクション機能搭載型人工細胞の構築

○野村 M. 慎一郎^{1,3}、金田 誠^{2,3}、近藤 智之¹、中浜 健一²、森田 育男^{2,3}、秋吉 一成^{1,3} (¹東医歯大・生材研、²東医歯大・歯・分子細胞機能、³21世紀COE)

タンパク質を合成する細胞サイズリボソーム系による人工細胞の機能解析と利用に関する研究を展開している。今回は細胞間にギャップジャンクション(GJ)を形成する膜タンパク質、コネキシン(Cx43)に着目した。Cx43は4回膜貫通型の膜タンパク質であり、6量体のチャネル同士が結合して異なる細胞をつなぐGJを形成する。このGJは1.8kDa以下の物質を単純拡散によって直接輸送し、細胞間の情報伝達に重要な役割を担っている。本研究では無細胞タンパク質合成系によって細胞サイズリボソーム存在下で合成されたCx43膜タンパク質のリボソーム膜への直接組み込みとその機能について検討した。ウサギ網状血球抽出液にCx43プラスミドを加えた溶液により細胞サイズリボソームを形成し、膜タンパク質の合成を行った。発現したCx43の膜への局在は、遠心分離されたリボソーム膜画分からWestern Blotにより確認された。このリボソームが、Cx43を発現した哺乳細胞との間で蛍光色素(Calcein)を双方向に輸送可能であることが共焦点顕微鏡観察により確認された。さらにGJを介した薬剤輸送モデルとして、このリボソーム中に細胞内シグナル伝達経路(NF κ B)を阻害するペプチド(NBD)を封入して細胞と共培養する実験を行った。その結果、リボソームとの間にGJを形成した細胞ではNF κ B経路が高効率で阻害されることが確認された。リボソームと生細胞間に直接チャネルを形成して相互の物質輸送を実現する手法はこれまでに例がない。本系は、水溶性ペプチドをエンドサイトーシスを介さずに細胞質内に直接輸送するという全く新しいリボソームDDSとして機能することが明らかになった。細胞と対話しつつ薬剤の生産徐放を行う実用的人工細胞への一歩として期待できる。

S.-i.M.Nomura, M.Kaneda, S.Kondoh, K.Nakahama, I.Morita and K.Akiyoshi : Artificial cells equipped with cellular connection mechanism

3P320

マイクロ流体デバイスにおける微細加工技術を用いた細胞整列化のための最適流路形状の検討

○服部 明弘、安田 賢二(東大院・総合文化)

【目的】近年、微細加工技術を用いてガラスやシリコンなどの基板内に微細な流路を形成し、細胞など微粒子の計測・分離を行ったり、微小領域において物質の混合や化学反応を行なったりする流体デバイスの研究開発が多分野で進められている。

このような微小流路を流れる微粒子の計測においては、微粒子を1つずつ識別し、かつ、一個単位で計測、刺激を与えるためには、微粒子が流路中で整列し、かつ適切な一定間隔で流れることが重要である。多くのデバイスではマイクロ流路の特性である、低いレイノルズ数を利用して、層流を合流させることで微粒子の整列化を図っている。しかし、ほとんどの場合微粒子を流す流路と、シース用の流路の流れが揃わないという問題があった。そこで我々は、重力を用いて流路中の微粒子を整列させる流路形状について検討したので報告する。

【方法】ガラス基板上に光硬化性樹脂を用いて幅50 μ m、深さ25 μ mの流路に左右からシース用流路が合流する構造を形成したものを流体チップとして用いた。シリンジポンプなどの送液装置に代わる液駆動源としては、上流側の液面を下流側よりも高くすることで、液面の高さの差に基づく圧力差を利用することとした。

【結果】シース用流路形状を最適化することで、50 μ mの流路幅に分布していた微粒子の流れを5 μ mの幅まで狭み込むことができた。本会ではこれら流路形状と実際の細胞の整列効果について詳細に報告する。

A.Hattori and K.Yasuda : Investigation of optimal design of microfluidic devices for alignment of single cells using microfabrication technique.