

Title	非接触バイオリアクターによるプラスチックを使わないバイオ実験システムの開発
Sub Title	Development of a plastic-free bioreaction system using a non-contact reactor
Author	松原, 輝彦(Matsubara, Teruhiko)
Publisher	福澤基金運営委員会
Publication year	2024
Jtitle	福澤諭吉記念慶應義塾学事振興基金事業報告集 (2023.)
JaLC DOI	
Abstract	生体物質や細胞を液滴に入れて音響浮揚させることにより、固相の反応容器との接触がない非接触界面を有する新規な反応場として、高効率反応プロセスを創成する研究を行なっている。以前の研究において、接着性細胞であるHuh-7細胞に効率良く遺伝子導入が可能であることを明らかにしていたことから、接着細胞と比較して遺伝子導入効率の低い浮遊細胞への導入を試みた。遺伝子導入試薬であるリポフェクトアミンとプラスミドの複合体を形成し、3種の浮遊細胞への遺伝子導入を行なった。その結果、神経系PC12細胞において、既存の試験管内と比較し、ルシフェラーゼおよび緑色蛍光タンパク質の数倍高い遺伝子発現が観察された。エンドサイトーシス阻害剤処理を行ったところ、プラスミドは複数の経路で遺伝子が導入されていることが明らかになった。さらにトリパンプルを用いた細胞を染色したところ、音響浮揚によって細胞膜の攪乱が誘導され、高効率な遺伝子導入に寄与している可能性が示された。さらに、病原性タンパク質を浮揚液滴内でファージ提示法による親和性選択を行った。微粒子にタンパク質を固定化し、ランダムなペプチドライブラリーを含むファージと相互作用させ、結合しているファージを回収した。また同時に、同じタンパク質を固定化した微粒子を用いて、試験管内で操作を行い、音響浮揚環境の効果を明らかにすることとした。その結果、試験管内で行った操作では、標的とするタンパク質に結合するファージプールが得られたものの、化学合成したペプチドは結合活性を示さなかった。一方で、浮揚液滴内で同じ操作をして得られたファージから同定されたペプチドは、標的タンパク質に結合活性を示した。これらの成果は、音響浮揚が既存の試験管と比較して、優れた成果を示すバイオ反応環境であることを示唆する。 We have been developing a non-contact bioreactor using levitation technology, instead of a conventional reaction vessel with solid-phase. Previous research revealed that it was possible to efficient transfection of plasmid into Huh-7 cells that is one of adherent cells. In this study, we attempted to introduce genes into floating cells using levitation. This is because floating cells are known to have lower gene transfer efficiency than adherent cells. A target gene-containing plasmid was mixed with lipofectamine as a gene delivery reagent to form a complex and the complex was introduced into three floating cells. The gene expression of luciferase and green fluorescent protein was observed in nervous PC12 cells, the expression efficiency in levitated droplet was greater than that in conventional tube. In addition, treatment with an endocytosis inhibitor revealed that the plasmid were introduced into cells through multiple routes. Furthermore, affinity selection against pathogenic proteins using phage display method in floating droplets eas performed. Phages containing a random peptide library were interacted with proteins immobilized on microparticles in levitated droplet, and bound phages were recovered. Peptides identified from phages in floating droplets showed binding activity to the target protein. These results suggest that acoustic levitation has a potential to be a novel bioreaction environment that exhibits superior results compared to conventional test tubes.
Notes	申請種類：福澤基金研究補助
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO12003001-20230001-0008

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

2023年度 福澤基金研究補助研究成果実績報告書

研究代表者	所属	理工学部	職名	准教授	補助額	1,500千円
	氏名	松原 輝彦	氏名（英語）	Teruhiko Matsubara		
研究課題（日本語）						
非接触バイオリアクターによるプラスチックを使わないバイオ実験システムの開発						
研究課題（英訳）						
Development of a plastic-free bioreaction system using a non-contact reactor						
研究組織						
氏 名 Name		所属・学科・職名 Affiliation, department, and position				
松原 輝彦（Teruhiko Matsubara）		理工学部・生命情報学科・准教授				
1. 研究成果実績の概要						
生体物質や細胞を液滴に入れて音響浮揚させることにより、固相の反応容器との接触がない非接触界面を有する新規な反応場として、高効率反応プロセスを創成する研究を行なっている。以前の研究において、接着性細胞であるHuh-7細胞に効率良く遺伝子導入が可能であることを明らかにしていたことから、接着細胞と比較して遺伝子導入効率の低い浮遊細胞への導入を試みた。遺伝子導入試薬であるリポフェクトアミンとプラスミドの複合体を形成し、3種の浮遊細胞への遺伝子導入を行なった。その結果、神経系PC12細胞において、既存の試験管内と比較し、ルシフェラーゼおよび緑色蛍光タンパク質の数倍高い遺伝子発現が観察された。エンドサイトーシス阻害剤処理を行ったところ、プラスミドは複数の経路で遺伝子が導入されていることが明らかになった。さらにトリパンブルーを用いた細胞を染色したところ、音響浮揚によって細胞膜の攪乱が誘導され、高効率な遺伝子導入に寄与している可能性が示された。さらに、病原性タンパク質を浮揚液滴内でファージ提示法による親和性選択を行った。微粒子にタンパク質を固定化し、ランダムなペプチドライブラリーを含むファージと相互作用させ、結合しているファージを回収した。また同時に、同じタンパク質を固定化した微粒子を用いて、試験管内で操作を行い、音響浮揚環境の効果を明らかにすることとした。その結果、試験管内で行った操作では、標的とするタンパク質に結合するファージプールが得られたものの、化学合成したペプチドは結合活性を示さなかった。一方で、浮揚液滴内で同じ操作をして得られたファージから同定されたペプチドは、標的タンパク質に結合活性を示した。これらの成果は、音響浮揚が既存の試験管と比較して、優れた成果を示すバイオ反応環境であることを示唆する。						
2. 研究成果実績の概要（英訳）						
We have been developing a non-contact bioreactor using levitation technology, instead of a conventional reaction vessel with solid-phase. Previous research revealed that it was possible to efficient transfection of plasmid into Huh-7 cells that is one of adherent cells. In this study, we attempted to introduce genes into floating cells using levitation. This is because floating cells are known to have lower gene transfer efficiency than adherent cells. A target gene-containing plasmid was mixed with lipofectamine as a gene delivery reagent to form a complex and the complex was introduced into three floating cells. The gene expression of luciferase and green fluorescent protein was observed in nervous PC12 cells, the expression efficiency in levitated droplet was greater than that in conventional tube. In addition, treatment with an endocytosis inhibitor revealed that the plasmid were introduced into cells through multiple routes. Furthermore, affinity selection against pathogenic proteins using phage display method in floating droplets eas performed. Phages containing a random peptide library were interacted with proteins immobilized on microparticles in levitated droplet, and bound phages were recovered. Peptides identified from phages in floating droplets showed binding activity to the target protein. These results suggest that acoustic levitation has a potential to be a novel bioreaction environment that exhibits superior results compared to conventional test tubes.						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 （著者・講演者）	発表課題 名 （著書名・演題）	発表学術誌名 （著書発行所・講演学会）				学術誌 発行年 月 （著書 発行年 月・講 演年月）
奥田 真由・松原 輝彦・佐藤 智典	音響浮揚させた液滴内における遺伝子増幅法の開発	第3回ヘルステック・デバイス・フォーラム 2023				2023年7月

松原 輝彦・新井 公 大・佐藤 智典	音響浮揚 させた非 接触液滴 内におけ る細胞へ の遺伝子 導入	第32回ソノケミストリー討論会	2023 年12月
-----------------------	--	-----------------	--------------