

「医療に向けた化学・生物系分子を利用したバイオ素子・システムの創製」
平成14年度採択研究代表者

鈴木 孝治

(慶應義塾大学理工学部 教授)

「ナノケミカルプローブの創製とバイオ・医療計測」

1. 研究実施の概要

当グループではバイオや医療の発展に貢献できるケミカルプローブの創製を目的とし、蛍光プローブ、質量分析用プローブ及び電気化学用プローブの3つのテーマに基づいて研究を行っている。H15年度はそれぞれの機能を有する各種プローブの作製に重点をおいて研究を行った。

蛍光プローブとしては、マグネシウム検出用プローブ及び、マグネシウムカルシウム同時検出用プローブの作製を行った。質量分析用プローブの創製として、質量分析計を用いた高感度解析のためのプローブの作製を行った。低分子用のアダクティブマスプローブ及び生体関連分子のための、光開裂型マスプローブの作製を行った。また、電気化学プローブについて、細胞レベルでの薬剤のスクリーニング、バイオアッセイで必要になる細胞機能を物質レベルでリアルタイムに測定できるセンサーの開発を目的に、センシング方法とセンサー用新規電極材料及びナノサイズ電極の研究を行った。

2. 研究実施内容

蛍光プローブ

マグネシウムイオンは最も高濃度の細胞内二価カチオンであり、またカルシウムイオンは最も変化量の大きな二価カチオンである。しかし、それらの細胞内での作用、相関についての詳細はわかっていない。蛍光イメージングは高速、簡便、高感度であることから細胞内の物質の測定に広く用いられている。そこで、本研究では一分子でマグネシウムイオンとカルシウムイオンの両方に応答し、さらにそれぞれに対して異なる蛍光応答を有するような蛍光プローブ「カルシウムマグネシウムマルチ蛍光プローブ」の作製を行った分子設計においては、分子軌道計算(Gaussian98)およびそれぞれの配位サイトの基礎的な実験から、分子プローブの二価カチオンとの結合部位の種類及びその位置、水溶性官能基の選択、蛍光色素の選択を行い、有効な構造を考察した。さらに有効な合成ス

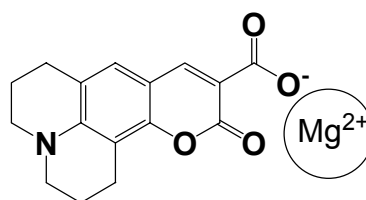


図1 マグネシウム蛍光プローブKMG-20

キームの検討を行い、蛍光色素としてクマリンを用い、色素のアクセプターサイトにマグネシウムイオンを認識する部位としてチャージド β ジケトン構造を用いた分子がプローブとして有効に用いられると判断した。図1にはマグネシウム蛍光プローブの例を示す。このような分子はマグネシウムイオンが β ジケトン部位に配位すると蛍光スペクトルが長波長シフトする。本研究ではさらに、カルシウムイオンが配位すると短波長シフトするような分子の合成を行い、細胞内条件において蛍光測定を行い、企図した物性を得た。この分子は異なる励起/蛍光波長のデータを解析することで、各二価カチオンを同時に定量することができる。このような新規蛍光プローブの開発により、生体内のカルシウムイオンおよびマグネシウムイオンの役割が詳細に解明されていくと期待している。

質量解析プローブ

質量分析計は非常に簡易的な測定ができ、定量測定などの検出端として有効に用いることができる。我々は低分子化合物の検出のため、試料と特異的に共有結合により結合し、強制的に電荷を与えるようなアダクティブマスペローブの作製を行い、核酸塩基、その他低分子化合物の質量分析計における高感度検出に成功した。一方分子量の大きい生体関連分子は未だ質量分析計を用いて高感度測定をすることは困難であった。我々は様々な我々は種類を無数に増やすことのできる分子量(=おもり)をラベルとして用いることで、質量分析計を用いて定量的に生体関連分子の定量などに着眼した。マスペローブは光による切出しが可能な「おもり」を試料にあらかじめ付加しておき、切り出された「おもり」の数を、質量分析計を用いて数えることで、網羅的かつ定量的解析を行うことができるようデザインされたプローブである。それぞれのマスペローブは特定の分子量をもつ標識部位と、UV照射により切断される光開裂部位、標識部位が高い感度で質量分析計にて測定されるためのイオン化部位と、試料との結合部位を有する。これまでに実際に我々は複数のアダクティブマスペローブを作成し、試料中のタンパク質抗原の定量に成功した。

電気化学プローブ

ナノ電極・光プローブ: 生体細胞において、細胞内イオンとその放出物質の運動性を把握するこ

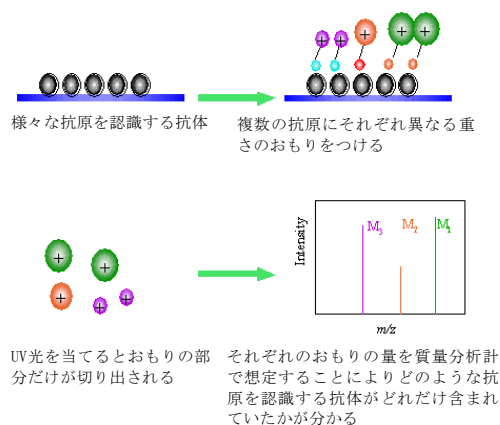


図2 アダクティブマスペローブを用いたタンパク質相互作用の解析の模式図

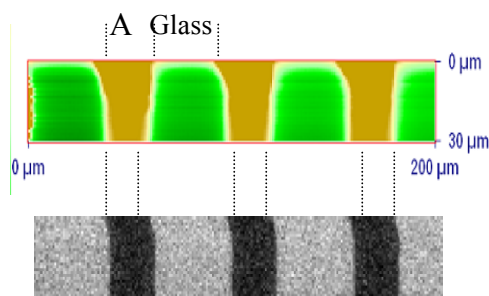


図3 光ファイバーナノ電極プローブを用いた櫛型パターン電極象。上：電気化学像、下：光学観察像

とは、細胞内もしくは細胞間シグナル伝達を解析するのに重要であるが、これまでリアルタイム同時測定はできず、それらの相関・連動性を解析することは困難であった。今回開発した光ファイバーナノ電極を用いれば、光ファイバーによるレーザー励起/蛍光によるイオン動態観察と、電気化学的測定法による細胞間隙のシグナル伝達物質の観察を同時に行うことが可能となる。この光ファイバーナノ電極プローブを用いて2次元スキャンした像を図3に示す。試料として楕円パターン電極（金；25 μm 幅、ガラス；35 μm 幅）を用いた。電気化学イメージングにおいては導電体（金）と不導体（ガラス）の識別が、光学イメージングにおいては金・ガラスの透過度の違いが明確にイメージングできており、このナノ電極の有用性が示された。また回折限界を超えた空間分解能を達成し、NSOMとしての機能をも有することが明らかとなった。

ナノパターンSPR検出法：細胞間シグナル伝達、ホルモン類による細胞応答を測定するためには、分子間相互作用測定を行う必要がある。特にリアルタイム・連続測定を行う場合には、生体分子間の特異的結合をラベル化試薬を使わずに高感度に測定する必要がある。このためにナノ周期構造を持つ電極を作製し、生体分子の特異的結合を電極表面の屈折率測定から可能なことを確かめた。

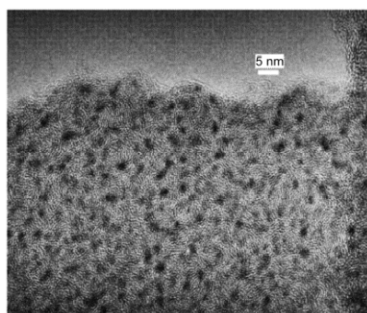


図4 IrNDCの透過電子顕微鏡像

ナノ金属粒子分散カーボン電極を使ったバイオセンシング：細胞レベルで代謝物を測定するには、微量測定と高感度測定を両立する必要がある。このために、マイクロ流路と機能性電極を使ったバイオセンサーが使われてきた。しかし、細胞応答の極初期の段階や放出量の少ない代謝物の測定にはさらに高感度化が必要である。高感度化には一般的には化学的に増幅・濃縮する方法があるが、我々はスパッタ法で作製したカーボン薄膜を用いるとバックグラウンドノイズレベルが下がることによって高感度化を図ることができことに注目した。バックグラウンド

レベルの低い材料への触媒活性の高いナノサイズの金属微粒子埋め込みを高い再現性と機械的強度で行うことができるスパッタ法を用いて、高感度測定が可能なセンサ用電極材料を作製した。今期では、イリジウム金属微粒子が高度に分散したカーボン電極（IrNDC）を作製した。図のように、スパッタ法で作製したIrNDCは乱れたグラファイト構造に1～3 nmのイリジウム粒子が埋め込まれた構造をとっている。表面はきわめて平滑で電気化学測定で低いノイズレベルを示す。このIrNDCとイリジウム金属電極の電気化学活性を比較したところ、IrNDCではノイズの大きな原因のひとつである、電気二重層への充電電流の少ない電流電位曲線（CV）を得た。これを応用し、測定妨害物質である高濃度のアスコルビン酸中でグルタミン酸を測定することができた。

DNA検出用電気化学マイクロチップ：DNA分析マイクロチップは日立、島津をはじめとする分析装置会社で製品化されているが、その多くは光学的検出手法を取り入れている。光学的検出手法を用いると光学系の扱いから装置の小型化が難しい。本研究では、装置の

小型化が容易な電気化学的検出手法を取り入れる。平成15年度は新規の電気化学検出手法の開発を行った。電気化学的に酸化還元活性のある超微量物質の測定には今までに楕円電極を用いる手法が取り入れられてきた。しかしながら、電極サイズが数 μm と非常に微細なために加工が難しかった。そこで加工が簡便かつ簡単に測定できる技術の開発を行い(図5)電極を流路を挟んで対向させることで酸化還元反応を増幅させる電気化学検出系を考案し、作製に成功した。今後はNDC電極を用いてさらに微小化し、高感度化を進める。

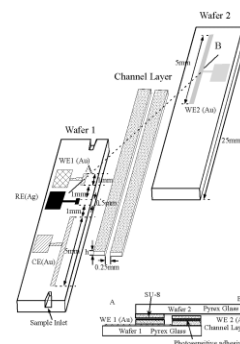


図5 対向電極マイクロチップ

3. 研究実施体制

慶応義塾大学理工学部グループ

- ① 研究分担グループ長：鈴木 孝治（慶応義塾大学理工学部 教授）
- ② 研究項目：蛍光プローブ、質量検出用プローブ及びナノ電極・光プローブの創製

NTT MI研グループ

- ① 研究分担グループ長：丹羽 修（NTTマイクロシステムインテグレーション研究所 主幹研究員）
- ② 研究項目：ナノ微粒子のマイクロチップへの応用とSPR検出

神奈川産総研グループ

- ① 研究分担グループ長：伊藤 健（神奈川産総研 技師）
- ② 研究項目：DNA検出用電気化学マイクロチップの作製と評価に関する研究

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- Takuji Shoda, Kazuya Kikuchi, Hirotatsu Kojima, Yasuteru Urano, Hirokazu Komatsu, Koji Suzuki, Tetsuo Nagano, “Development of selective, visible light-excitable, Fluorescent Magnesium Ion Probes with ad Novel Fluorescence switching mechanism”, *Analyst*, 2003, 128, 719-723
- Y. Suzuki, N. Tanji, C. Ikeda, A. Honda, K. Ookubo, D. Citterio, K. Suzuki, “Design and Synthesis of Labeling Reagents (MS probes) for Highly Sensitive Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Their Application to the Detection of Carbonyl, Alcohol, Carboxylic Acid and Primary Amine Samples”, *Analytical Science*, (2004) 20: 475-482
- Honda, A. Ametani, T. Matsumoto, A Iwaya, H. Kano, S. Hachimura, K. Ohkawa,

- S. Kaminogawa, K. Suzuki, E. E. Sercarz, V. Kumar, "Vaccination with an immunodominant peptide of bovine type II collagen induces an anti-TCR response and modulates the onset and severity of collagen-induced arthritis", *International Immunology* 16, 737-45, (2004)
- Takeshi Kubota, Kantaro Tokuno, Jun Nakagawa, Yohiichiro Kitamura, Hiroto Ogawa, Yoshio Suzuki, Koji Suzuki and Kotaro Oka, "Na/Mg²⁺ transporter acts as a Mg²⁺ buffering mechanism in PC12 cells", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 303, 332-336, (2003)
- Daniel Citterio, Mio Omagari, Takashi Kawada, Shin-chi Sasaki, Yoshio Suzuki and Koji Suzuki, "Chromogenic betaine lactams for highly selective calcium ion sensing in aqueous environment", *Anal. Chem. Acta.*, (2003)
- Zuki, Nobuo Nakano and Koji Suzuki, "Probe Sick House Syndrome Gas Monitoring System Based on Novel Colorimetric Reagents for the Highly Selective and Sensitive Detection of Formaldehyde", *Environ Sci Technol.*, 37, 5695-5700
- Yasunobu sato, Shinichi Ikegami, Koji Suzuki and Haruma Kawaguchi, "Hydrogel-microsphere-enhanced surface plasmon resonance for the detection of K-ras point mutation employment peptide nucleic acid", *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*, 114, 8, 603-820
- Eiji Fujii, Kaori Nakamura, Shin-ichi Sasaki, Daniel Citterio, Kazuyoshi Kurihar and Koji Suzuki, "Application of the Absorption-based surface Plasmon Resonance Principle to the Determination of Glucose Using an Enzyme Reaction", *Instrumentation Science and Technology*, 31, 343-356
- Yasunobu Sato, Yuko Sto, Aya Okumura, Koji Suzuki, Harum Kawaguchi, "Flow-stress-induced discrimination of a K-ras point mutation by sandwiched polymer microsphere-enhanced surface plasmon resonance", *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 100, pp1-14
- T. You, O. Niwa, R. Kurita, Y. Iwasaki, K. Hayashi, K. Suzuki, S. Hirono, "Reductive H₂O₂ Detection at Nanoparticle Iridium/Carbon Film Electrode and Its Application as L-Glutamate Enzyme Sensor", *Electroanalysis* 2004, 16, 54-59

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：7件（CREST研究期間累積件数：7件）