

「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)

「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。H16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、タンパク質及び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。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

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。細胞内のシグナル伝達は複数物質の動態からなり、それを観測するマルチカラーイメージングの重要性が増大している。多数の測定対象を一度に測定する分子を開発することで、最小限の浸襲性で、複数指示薬のスペクトルの重なりや代謝、局在の影響を解消することができると提案している。細胞内のカルシウムイオンは細胞内シグナルのセカンドメッセンジャーとして重要であり、また最も変化量の大きな二価カチオンである。また、マグネシウムイオンは細胞内のさまざまな現象の補要素として働く、最も高濃度の細胞内二価カチオンであり、カルシウム及びマグネシウムの競合的作用についての詳細はわかっていない。

開発したカルシウムマグネシウムマルチ蛍光プローブKCM-1は、細胞内条件でカルシウムイオン濃度を増加させると吸収蛍光波長のブルーシフト、マグネシウムイオン濃度上昇によって吸収蛍光波長のレッドシフトを示し、スペクトルの解析によってそれらの濃度を定量可能である。KCM-1をアセトキシメチルエステルに誘導することで細胞内への投与に成

功し、蛍光顕微鏡下において、細胞内のカルシウムとマグネシウムの濃度を同時にイメージングすることに成功した。また、ミトコンドリア脱分極局在FCCPを投与することで、細胞内のカルシウム及びマグネシウム濃度が上昇する現象を観測できた。このことから、はじめて一つのプローブ分子による細胞内の多数物質の測定を実現したといえる。また、ミトコンドリアが細胞内の二価カチオンを貯蔵していることを見出した。

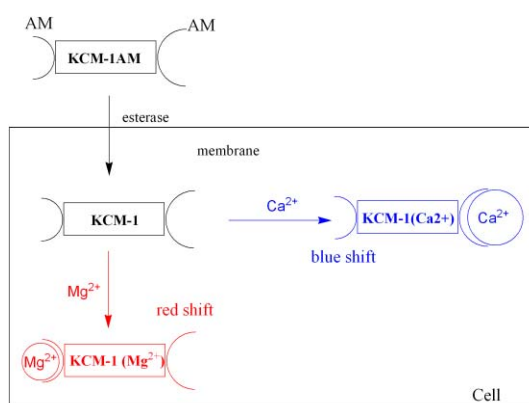


図1 KCM-1の模式図

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。我々は様々な分子の効率のいい質量解析を目的としたマスプローブの開発と、これを用いた測定方法であるMPAI法 (Mass-probe aided ionization) の確立を行っている。これまでに、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プ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てきた。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。我々は本研究計画において、様々な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用いられるタンパク質用のマスプローブの開発を行った。これらのタンパク質用マスプ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ようにデザインされている (図2)。実際にこれまでにタンパク質用マスプローブとしてKMP-174およびKMP-188の二種類のプローブの合成に成功した。これら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。さらに粒子を用いた測定方法の確立を行い、これまでに実際に、KMP-174およびKMP-188を用いて、固定化したHELおよびOVAの

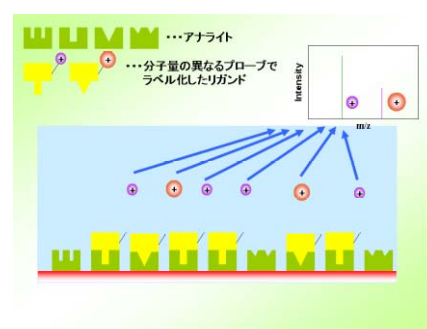


図2 タンパク質用マスプローブの模式図

定量を行い、直線性の高い結果を得ることができた。また、我々はタンパク質のみでなく、人体へ悪影響を及ぼす重金属の定量を行うための質量分析マスプローブの設計と開発を行っている (図3)。重金属イオンは様々なイオン価数をとるが、質量解析においてはすべて1価に統一して定量することが望ましい。我々は Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Hg^{2+} などの遷移金属を補足

する部位とイオンの価数を調整する部位を連結した重金属用マスプローブを設計した。これらの様々なマスプローブを合わせてトータルで、MPAI法により、様々な物質の同時解析することを目指す。

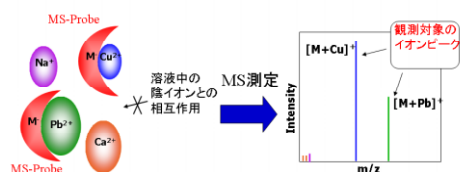


図3 重金属用マスプローブの模式図

電気化学プローブ

ナノ電極・光プローブ:我々は、多角的な生体

細胞イメージングを目指した電気化学・近接場光学・原子間力同時イメージング可能なプローブを新たに作製した。このプローブはカンチレバー方式により原子間力を検出するためにベント型形状として作製した。このベント型光ファイバーナノ電極をプローブとして、走査型電気化学/近接場光学/原子間力顕微鏡 (SECM/NSOM/AFM) を新たに開発した。試料としてガラス上に作製した金楯型薄膜電極 (くしの幅; 1 μm 幅、ギャップ; 2 μm) を用いた。その結果、電気化学イメージングにおいては導電体 (金) と絶縁体 (ガラス) の識別が、近接場光学イメージングにおいては金・ガラスの透過観察、また原子間力イメージングにおいてはその凹凸像が鮮明に観察することが可能であった。それぞれの分解能は電気化学; 80nm、近接場光学; 30 nm、原子間力; 100 nmとそれぞれ個別の顕微鏡と比較しても妥当な値を得ることができた。ベント型光ファイバープローブを用いて神経類似細胞 (PC12細胞) の軸策末端のAFM像を見たところ、通常の光学観察 (コンフォーカルレーザー顕微鏡を含む。) では観察困難なファイバー末端の形状が明瞭に観察することができた。特に活性サイトであるバリコシティが観察されていることから、光ファイバーナノ電極のプローブとしての有用性が示された。

ナノ薄膜電極材料の開発:カーボン薄膜やITO電極の組成やナノオーダーの構造を制御し、生体分子検出に適した新規電気化学プローブ用材料の研究を行っている。今回本チームとNTTアフティ社の協力によりECR (Electron cyclotron resonance) スパッタ法を用いて、sp³結合を多く含み (~50%)、ダイヤモンド並に堅く、表面が極めて平坦なカーボン薄膜を開発した。得られた膜は、ドーブ無しで導電性を示し、ボロンドープダイヤモンドと同等の電位窓を有しており、充電電流も極めて小さく高感度な電気化学測定に適することが分かった。図4に透過型電子顕微鏡写真を示す。膜は、屈曲した構造を有しており、通常のグラファイト構造とは異なることが分かった。電位窓が広いことから、

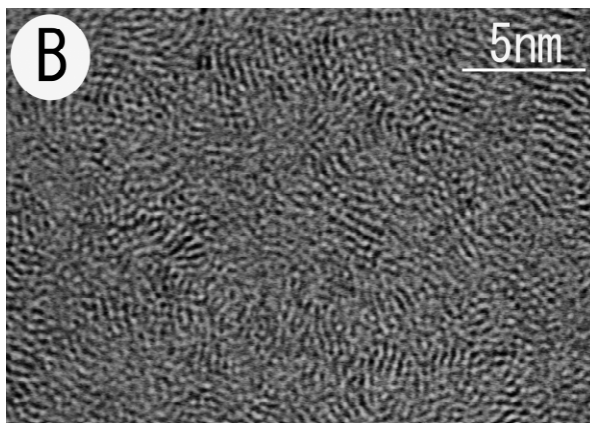


図4 開発したECRスパッタカーボン薄膜電極TEM写真

核酸誘導体の直接酸化により通常のカーボン電極では計測が困難な、C（シトシン）やT（チミン）の核酸塩基も計測できた。特にほとんどのDNA塩基誘導体に関しても酸化電位を高電位領域にて検出可能であった。また電極表面に非特異吸着しやすいG（グアニン）・A（アデニン）誘導体に対しても、原子レベルで平坦な表面の効果により電気化学酸化による非特異的吸着も大きく抑制できることを確認した。

一方、ナノサイズの金属微粒子を埋め込んだ炭素電極の研究過程で、炭素電極の代わりにITOを使い、その製膜条件を検討したところ、ドーパミンの酸化に対して、ドーパミンの代謝物やアスコルビン酸の酸化速度の遅い電極を作製できた。この電極を使って生体中の夾雑物の中から目的分子を選択的に検出する電極にできることを見出した。

内毒素のセンシング：ECRスパッタカーボン薄膜電極の生体分子プローブへの応用を目的として、低い検出限界が必要なグラム陰性細菌の外膜成分であるリポ多糖（LPS）センサーの開発を開始した。LPSは、血液中に極微量でも混入すると発熱作用やショック死を引き起こす内毒素である。そのため発酵・遺伝子組換え技術による非経口医薬品の製造工程では、宿主細胞壁からのLPS混入量を高感度にモニタリングする必要がある。今回、LPSを簡便かつ高感度で測定する電気化学的測定法を考案した。LPSは電気化学的に不活性であるため、LPSの多糖部分に着目し、糖との錯体形成能を有する酸化還元種を用い、その錯体形成に伴う電解電流の変化からLPSの定量を行った。また、酵素反応と組み合わせることによりLPSを1 µg/mlの検出限界が得られた。今後は、更なる高感度検出のため、より高活性な酵素固定化の方法、およびECRカーボン薄膜など高感度化が期待できる新材料の応用を検討する。

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、複数の分子間相互作用測定を行う必要がある。そこで、金アイランドのナノ周期構造を使ったSPRを使い分子間相互作用に伴う屈折率の変化を光反射のパターンとして検出する方法を開発している。このための測定系を構築し、周期構造と感度の関係を調べ、抗体やDNAをターゲットにするための測定の条件を検討した。

DNA検出用電気化学マイクロチップ：本研究チームで開発した各種薄膜電極、光学素子を検出器に利用し、DNAなどの生体分子分離検出を微小空間で行うための微小流路作製技術及び検出技術の検討を行った。従来、微小流路作製においてはガラスやシリコンなど半導体加工技術が利用できる素材が使われてきた。本研究では製品としての質を維持し、且つ低コスト化のために、ポリマー素材を利用した流路の作製を検討した。検出システムの小型化を目指すために電気化学検出を採用し、微小流路構造中に電気化学検出用の電極を内蔵させ、液の流れがある場合にも電流値を大きく取り出せる電極配置や構造について検討を行った。その結果、感光性フィルムを採用することで微小流路の壁構造を形成し、かつ上下面のポリマー基板を接合する接着層としての役割を果たせる簡便なプロセスが確立した。また、微小櫛形電極と平板電極を組み合わせ、上記ポリマー基板の流路面に配置することで検出電流値を向上させることに成功した。今後は新電極材料を利用した高感度化、測定対象の拡大を行う。

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

産業総合研究所グループ

- ① 研究分担グループ長：丹羽 修（産業総合研究所生物機能工学部門、副部門長リーダー）
- ② 研究分担：生体分子検出用ナノ構造電極の開発

NTT MI研グループ

- ① 研究分担グループ長：岩崎 弦（NTTマイクロシステムインテグレーション研究所 主任研究員）
- 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

- Yoshio Suzuki, Noriyuki Tanji, Chikako Ikeda, Aki Honda, Kenji Ookubo, Daniel Citterio, Koji 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*, 20, 475-482 (2004).
- Daniel Citterio, Mio Omagari, Takashi Kawada, Shin-chi Sasaki, Yoshio Suzuki and Koji Suzuki, "Chromogenic betaine larists for highly selective calcium ion sensing in aqueous environment", *Analytica Chimica Acta*, 504, 227-234 (2004).
- S. Sasaki, S. Ozawa, D. Citterio, K. Yamada and K. Suzuki, "Organic tin compounds combined with anionic additives- an ionophore system leading to a phosphate ion-selective electrode", *Talanta*, 63, 131-134 (2004).
- Dan Mikami, Toshifumi Ohki, Ken Yamaji, Saeko Ishihara, Daniel Citterio, Masafumi Hagiwara and Koji Suzuki, "Quantification of Ternary Mixtures od Heavy Metal Cations from Metallochromic Absorbance Spectra Using Neural Network Inversion", *Analytical Chemistry*, 76, No.79, 5726-5733 (2004).
- Hirokazu Komatsu, Naoko Iwasawa, Daniel Citterio, Yoshio Suzuki, Takeshi Kubota, Kentaro Tokuno, Yoshiichiro Kitamura, Kotaro Oka, Koji Suzuki,

"Design and Synthesis of Highly-Sensitive and -Selective Fluorescein-Derived Magnesium Fluorescent Probes and Application to Intracellular 3D-Mg²⁺ Imaging", Journal of the American Chemical Society, 126, No.50, 16353-16360 (2004),

- Kazuyshi Kurihara, Hiroyuki Ohkawa, Yuzuru Iwasaki, Osamu Niwa, Tatsuya Tobita, Koji Suzuki, "Fiber-optic conical microsensors for surface plasmon resonance using chemically etched single-mode fiber", Analytica Chimica Acta, 523, 165-170 (2004).
- Takeshi Ito, Kenichi Maruyama, Kazuharu Sobue, Seishiro Ohya, Osamu Niwa, and Koji Suzuki, "Electrochemical Behavior of Parallel Opposed Dual Electrode in a Microchannel", Electroanalysis, **16**, 2035-2041 (2004)

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：11件（CREST研究期間累積件数：0件）