

「生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術」  
平成 16 年度採択研究代表者

生田 幸士

(名古屋大学大学院工学研究科 教授)

「光駆動ナノマシンを用いた新原理バイオ計測ツールの研究」

## 1. 研究実施の概要

本研究の最終目的は、申請者らが基本概念を独自に提案し、作製技術と実証モデルの開発に成功している「光駆動マイクロ・ナノマシン」を基盤とした「細胞生物学研究用のナノマニピュレータ」と、同様に概念提案から始めた「新原理バイオ化学 IC チップ群」の開発にある。

前者に関しては、昨年度までの実証研究に加え、本年度は生物学の各分野に応用を加速するための計測精度、制御などの性能向上と並行し、光駆動ナノマシンの裾野を広げるため、より基礎的、学術的知見獲得にも重点を置いて研究を進めた。

後者のバイオ化学 IC チップは、指の上に乗るサイズ（フィンガートップ）のマイクロ合成装置とマイクロ分析装置の両者を開発することを目的としている。本年度は、すでに一部成功していた細胞内蛋白分析用の化学 IC チップ群がすべて完成し、分析のすべての工程が超微量で、かつ従来困難であった前処理工程までマイクロスケールで実行できるマイクロ分析装置が完成した。細胞破壊から分離・回収までトータルで実行できることが実証された。

マイクロ合成系に関しても、無細胞蛋白合成系にマイクロポンプや光センサ、温度制御チップ、さらに多分岐切り換え分注チップまで含むより汎用性が高い化学 IC チップ群の開発に成功した。

## 2. 研究実施内容

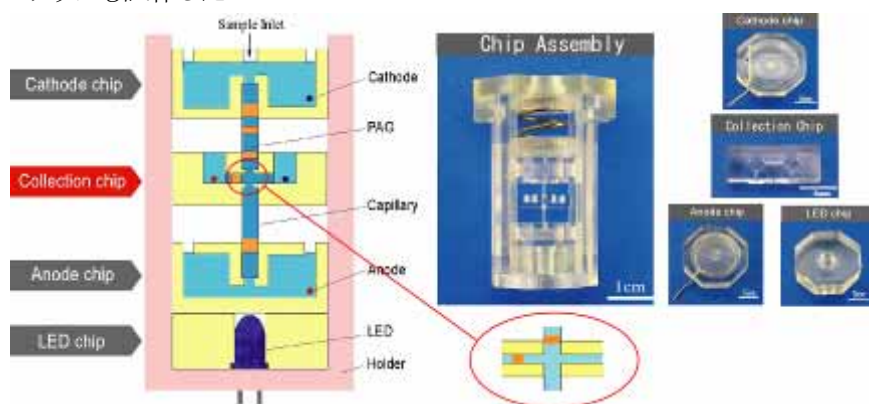
### 1. 新原理バイオ化学ICチップファミリーとトータルシステムの開発

バイオ化学 IC チップから構成された革新的なバイオ計測、合成システムの実現に不可欠な新しい新原理バイオ化学 IC チップ群を、チップセットファミリーとして開発した。すでに一部はシステムとして結合し、トータル装置としての機能検証まで到達した。

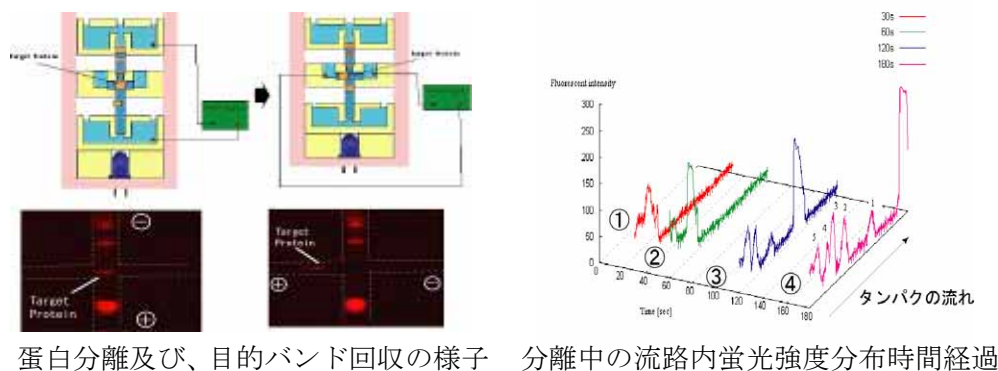
### 1) 細胞内蛋白分離用化学ICシステムの開発

分析の全工程で試料を微量のまま分離、分析することは、従来のマイクロ化学分析デバイスでは不可能であった。(普通は大量の試料と前処理工程が必要である) この問題の抜本的な解決策として、本研究室では複数種の化学ICチップ群から成る「細胞内蛋白分離用化学ICシステム」の開発と機能検証実験に成功した。

具体的には、細胞や微小組織破壊用のホモジナイザーチップ、マイクロポンプチップ、インジェクションチップ、電気泳動機能を持つ蛋白分離チップ、コネクッションチップから構成されている。さらにこれを発展させたリアルタイム分析チップを試作した。結果、特定の細胞内蛋白を数分で分離回収することにも成功した。化学ICチップ内に観察用光源にLEDを内蔵し、光学的にモニターする機能を持つチップも試作した。



蛋白分離回収チップシステム構成図及び各チップ写真



蛋白分離及び、目的バンド回収の様子 分離中の流路内蛍光強度分布時間経過

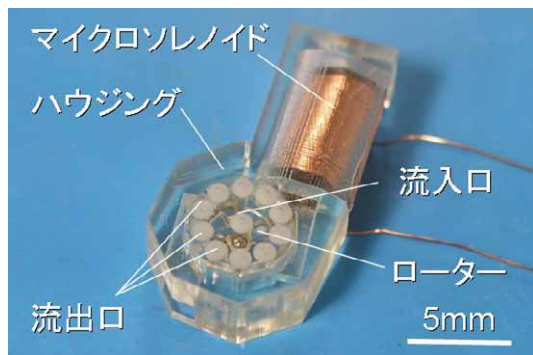
### 2) 無細胞蛋白合成用化学ICシステムの開発

すでに実証に成功している無細胞蛋白合成用の化学ICチップ群に、温度制御チップ、切り替えバルブチップ等、新規機能チップを新開発し、恒温槽など大型の装置内への設置を不要とした。すでに実証したルシファラーゼやGFPだけでなく、より汎用的な生化学合成系として機能を向上させただけでなく、真にチップだけで合成が可能なシステムの基盤が構築できた。

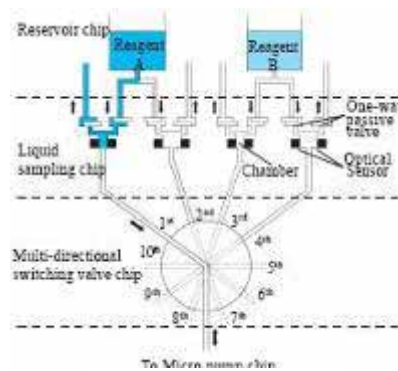
### 3) マイクロ分注化学ICチップの開発

大阪工業大学の長谷川研究室との共同研究で、「マイクロ分注化学ICチップ」を開発した。チッ

プは、直径 10mm の小型サイズながら、1入力に10出力の流路選択が可能な、自動切換バルブを内蔵する。このチップは、多くのマイクロ化学分析研究者から実現が切望されてきた、マルチ分注機能を、マイクロ化学デバイスの世界にもたらす意義を持つ。このチップの出現でマイクロ分析手法が大幅に広がり、今後、マイクロ化学分析の汎用的な基幹チップになると期待される。



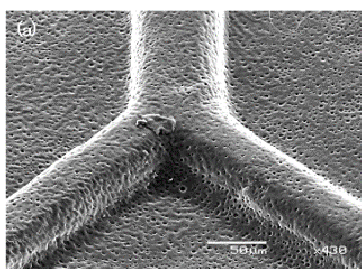
自動マルチ分岐マイクロ分注チップ



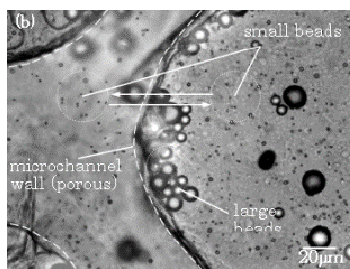
分注チップの原理

#### 4) 薄膜マイクロ流路を用いた生分解型毛細血管チップの開発

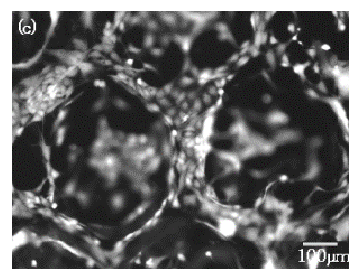
我々が独自に提案、開発してきた、薄膜マイクロ流路の応用として、現在、再生医療で隘路となっている、生体外での大きな組織培養を実現するための、生分解型毛細血管チップの開発を進めている。すでに、生分解性薄膜からなる任意形状の立体構造を数 $\mu\text{m}$ の分解能で作製できることを実証している。本年度は、デバイスの材料として、直径 $1\mu\text{m}$ 程度の微細孔を有する多孔質ポリ乳酸薄膜(厚さ $5\mu\text{m}$ )を相分離法により作製し、この薄膜を用いて、内径 $50\mu\text{m}$ の微小流路ネットワークを有する新たなチップの作製に成功した。さらに、このチップが、微小循環系に求められる、サイズ選択的透過性と細胞培養適合性を有することを実証した。この成果は、in vitroでの立体的組織再生の基盤となるものである。



多孔質薄膜マイクロ流路



サイズ選択的透過性の実証



細胞培養適合性の実証

### 3. 研究実施体制

#### (1)「生田幸士」グループ

①研究分担グループ長：生田 幸士(名古屋大学大学院工学研究科 教授)

#### ②研究項目

- ・細胞小器官操作のための光駆動ナノマニピュレータ・光駆動バイオ化学ICの開発
- ・開発したデバイスの生命現象解明手段としての適用
- ・近接場細胞観察手法を用いた計測システムの構築

### 4. 研究成果の発表等

#### (1)論文発表(原著論文)

- 生田幸士, 佐竹宣彦, 大橋竜也, 柴田真由子, 全工程微量サンプル蛋白分析用化学 I C チップ群の開発, 生体医工学, 44(4), 2007, 印刷中
- 長谷川忠大, 中嶋健一郎, 生田幸士, 多分岐切換用ロータリー型マイクロバルブチップ (第1報) ロータリー機構を利用した多分岐切換原理の実証, 日本機械学会論文集 C 編, 73(727), 811-816, 2007
- S. Ito, A. Majumdar, H. Kume, K. Shimokata, K. Naruse, K.R. Lutchen, D. Stamenovic, B. Suki, Viscoelastic and dynamic nonlinear properties of airway smooth muscle tissue: roles of mechanical force and the cytoskeleton, Am. J. Physiol., 290(6), L1227-1237, 2006
- H. Takeda, K. Komori, N. Nishikimi, Y. Nimura, M. Sokabe, K. Naruse, Bi-phasic activation of eNOS in response to uni-axial cyclic stretch is mediated by differential mechanisms in BAECs, Life Sci., 79(3), 233-239, 2006
- S. Ito, H. Kume, T. Oguma, Y. Ito, M. Kondo, K. Shimokata, B. Suki, K. Naruse, Roles of stretch-activated cation channel and Rho-kinase in the spontaneous contraction of airway smooth muscle, Eur J Pharmacol, 15:552(1-3), 135-42, 2006
- M. Kajiya, M. Hirota, Y. Inai, T. Kiyooka, T. Morimoto, T. Iwasaki, K. Endo, S. Mohri, J. Shimizu, T. Yada, Y. Ogasawara, K. Naruse, T. Ohe, F. Kajiya, Impaired NO-mediated vasodilation with increased superoxide but robust EDHF function in right ventricular arterial microvessels of pulmonary hypertensive rats, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 掲載決定
- T. Miyashita, H. Tatsumi, K. Hayakawa, N. Mori, M. Sokabe, Large Na<sup>+</sup> influx and high Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in mitochondria-rich epithelial cells of the inner ear endolymphatic sac, Eur. J. Physiology, 453, 905-913, 2007
- M. Toyota, T. Furuichi, H. Tatsumi, M. Sokabe, Hypergravity induced Ca ion increase in Arabidopsis., Adv. Air. Space Res., 掲載決定

- Y. Nakagawa, T. Katagiri, K. Shinozaki, Zhi Qi, H. Tatsumi, T. Furuichi, A. Kishigami, M. Sokabe, I. Kojima, S. Sato, T. Kato, S. Tabata, K. Iida, A. Terashima, M. Nakano, M. Ikeda, T. Yamanaka, H. Iida, Arabidopsis plasma membrane protein crucial for  $\text{Ca}^{2+}$  influx and touch sensing in roots, PRNAS 104, 3639-3644, 2007
- H. Hirata, H. Tatsumi, M. Sokabe, Dynamics of Actin Filaments during Tension-Dependent Formation of Actin Bundles, Biochimica Biophysica Acta (BBA - General Subjects), 印刷中
- 生田幸士, 加藤大香士, 大栄広樹, 篠原一彦, 低侵襲手術用サージェリレコーダの開発と動物実験による機能検証, 生体医工学, 45(1), 2007, 印刷中

## (2) 特許出願

平成 18 年度特許出願: 0 件 (CREST 研究期間累積件数: 1 件)