

「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)

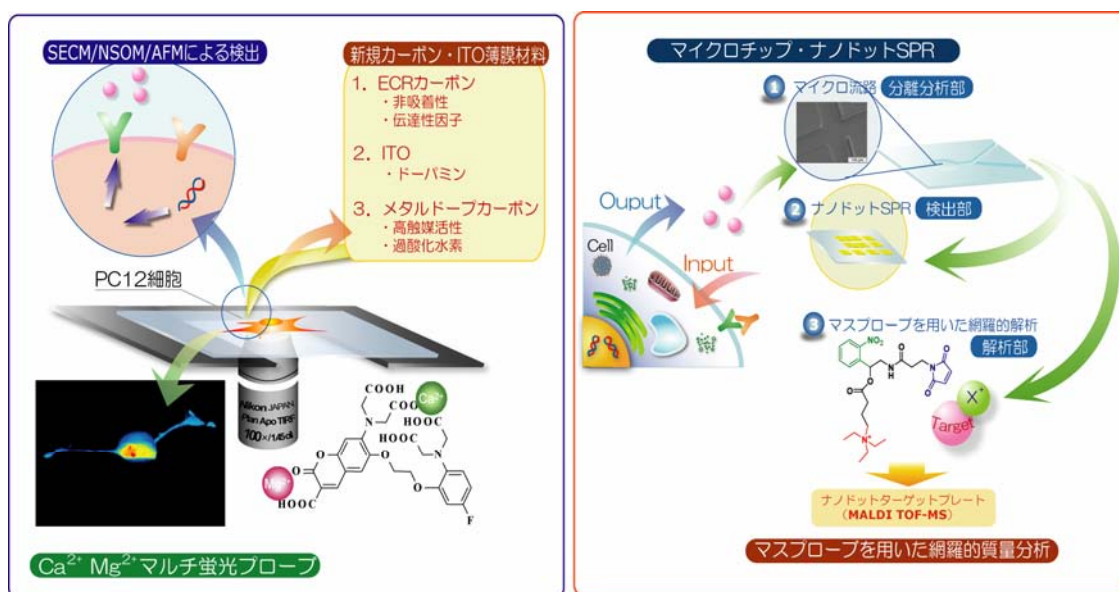
「ナノケミカルプローブの創製とバイオ・医療計測」

1. 研究実施の概要

当チーム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い、これまでに新規プローブの開発を行ってきた。H17年度はこれらの3つのテーマに基づくプローブの連携を見据えつつ、それぞれの機能を有する各種プローブの応用研究を行った。

蛍光プローブとしては、マルチプローブを用いた細胞のマルチイメージング法の開発を行った。質量分析用プローブの創製として、質量解析の際の高感度解析のためのプローブを用いたトータルアナリシス方法の開発を行い、同時ナノドットターゲットプレートの開発を行った。また、電気化学プローブについては、生細胞での高分解能イメージングを達成するために、プローブである光ファイバーナノ電極の微小化を行った。

今後はこれまでに開発をしてきたプローブを用い、「細胞のリアルタイム測定システム」と、「細胞応答観察システム」の両者の開発を行う。



2. 研究実施内容

(研究目的、方法、結論など、研究実施の具体的内容について、1～2ページ程度にまとめてください。図、表、写真等を含めていただいても結構です。)

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、最小限の侵襲性で、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、これまでにカルシウムマグネシウムマルチ蛍光プローブ KCM-1 のデザインと合成を行ってきた。平成 17 年度は開発した KCM-1 を細胞内に投与し、細胞内カルシウムとマグネシウムの同時イメージングを行った。細胞内条件では KCM-1 は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、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。

さらなる展開として、新規なマルチプローブの基礎設計、およびナノ電極・光プローブとの連携に関する基礎実験を行った。さらにバイオ・医療への応用を拡大していく。

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により、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を行った。また、一方分子量の大きい生体関連分子の高感度測定用として、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、タンパク質用のマスプローブの開発を行い、タンパク質の定量の測定方法の確立を行った。また、一部の金属イオンの測定のためのプローブの開発を行い、トータルアナリシスを目指してきた。

平成 17 年度はタンパク質測定法をより簡便にするために、簡易的な測定方法の開発を行うとともに、生体関連分子として測定の需要の高い、1 価の金属イオン分子測定のためのマスプローブの新たな合成を行い、トータルアナリシスを目指した。また、これまでは測定感度の上昇を主に分子プローブを用いて達成してきたが、平成 17 年度は新たに装置におけるイオン化効率と再現性の上昇を目指した、MALDI TOF MS 用の新規ターゲットプレートの開発を行い、これらの効果を評価した。MALDI TOF MS は高分子の生体物質の質量分

析に有利であるが、スペクトルが得られにくい場合があり、その再現性が問題となることもある。われわれはターゲットプレートとして、シリコン基板に金属の微細加工を施した新規ターゲットプレートを作製し、イオン化と再現性の向上に成功した。このターゲットプレートはナノドット SPR の基板上に組み込むことが可能である。今後質量分析および SPR の両方に用いることのできる基板を作製し、新たな分子間相互作用解析ツールの開発を行い、細胞応答解析への展開を行う。

電気化学プローブ

ナノ電極・光プローブ:昨年度我々は、走査型電気化学・近接場光学・原子間力顕微鏡 (SECM/NSOM/AFM) の開発を行い、櫛型パターン電極ならびに細胞イメージングを報告してきた。本年度は、生細胞での高分解能イメージングを達成するために、プローブである光ファイバーナノ電極の微小化をおこなった。特に生細胞イメージングにおいてプローブの微小化は、「細胞へのダメージの軽減」・「ばね定数の低減」・「近接場開口の微小化による開口径制御」のアドバンテージを有する。微細化は電極胴体部分を化学的エッチングによりおこなった。その結果、電極胴体部直径において $125\ \mu\text{m}$ から $50\ \mu\text{m}$ まで微細化することが可能となった。また、ばね定数として 1000N/m から 50N/m まで低減することができ、これは細胞のようなソフトマテリアルに対してより最適化された値となった。つぎに電極径を CV (サイクリックボルタモグラム) により確認したところ、 $100\ \text{nm}$ にコントロールされていることが確認された。最後に分解能評価のために $100\ \text{nm}$ 径蛍光ナノスフェアの観察をおこなったところ、コンスタントにナノスフェアを形状・近接場光同時観察することに成功した。

ナノ薄膜電極材料の開発:昨年度、ボロンドープダイヤモンド電極に準じる電位窓を有し、充電電流も小さい ECR (Electron cyclotron resonance) スパッタカーボン電極を開発し、DNA を構成する 4 種の核酸塩基、ヌクレオチドの定量を行うことができることを報告した。また、ドーパミンの選択性の高い IT0 スパッタ薄膜を開発した。今年度 ECR カーボン電極について、電極表面の組成と電気化学特性の関係を調べ、 sp^3 結合が多いカーボン膜では、電極表面の酸素濃度が極めて低く $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ やドーパミンなどの電子移動が遅いことが分かった。また、細胞分泌物質の例として酸化電位の高いヒスタミンを計測したところダイヤモンド電極を凌駕する検出限界が得られ、生体分子計測に関して高い感度が得られることを確認した。更に、オリグヌクレオチド、ビスフェノール A、NADHなどを計測すると市販のグラッシーカーボン電極では、反応生成物の電極表面への不可逆的な吸着により急速に電流値が低下し再現性良い測定が困難なのに対して、ECR カーボン薄膜では、NADH などの低分子では、殆ど電極特性の低下が見られなかった。また、オリグヌクレオチドについても数回の測定で顕著な特性の劣化は観測されなかった。これは、膜が極めて平坦なことや、酸素濃度が低い為に電極表面と測定対象分子との間の相互作用が弱く、かつ表面が化学反応に対してより不活性なため反応生成物が電極上に吸着しにくいものと予想している。この効果は、今後薄膜をプローブ上に形成し、細胞測定用プローブを形成する際にプローブ

ブの安定性、再現性の面で極めて大きな利点を有する。実際に直線型のガラスファイバースプローブの表面に ECR カーボンを堆積させたナノプローブの試作を行った。

次に ITO 薄膜については、ドーパミンに対する DOPAC、L-アスコルビン酸、尿酸など多くの妨害分子との選択性を調べ、いずれの妨害分子に対してもリン酸緩衝溶液中で 100 倍以上の高い選択性を達成した。本 ITO 電極では、従来の ITO 薄膜と異なりリン酸イオンが表面に強く吸着し、アニオン性の妨害分子を電極表面から静電的に除去しているものと考え、カルシウムイオンを加えてリン酸を除去すると妨害分子の応答が回復することから、選択性のメカニズムが解明された。今後 ITO 薄膜についてもナノプローブ上への形成と細胞計測への応用を行う予定である。

その他のツール：

ナノパターン SPR：生体分子相互作用測定の高感度、16 年度までにナノサイズの金の配列構造を利用した分子間相互作用測定法を検討し、分子間相互作用を屈折率の変化として測定し、スペクトルと回折像から動作を確認した。今年度は金ナノドットに抗体や DNA を固定して、これらの特異的結合の測定を行った。その結果、金ナノドットに吸着した IgG の特異反応によるスペクトルのシフトが得られた。さらに、この感度（シフト）を上げ、ドット配列の回折効果による測定に適したナノドット基板を作製し基本動作を確認した。次年度は、同様にナノドット構造により効率化が図られる質量分析法と、ナノドットパターンを共通化した生体分子相互作用測定システムをめざす。

DNA 検出用電気化学マイクロチップ：微小流路は本研究グループで開発している様々な検出システムをつなぐ役割を果たす。微小流路を用いることで分析に必要なサンプル量を激減できることが可能である。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、且つ低コスト化および量産化に適応するために、ポリマー素材を利用した流路の作製を検討した。ポリマーを素材とした場合、主に射出成型やインプリント法が用いられており、これらには高精度の金型が必要である。本研究では、母型にシートレジストを採用し、母型にメッキ処理を行うことでニッケル金型を得た。シートレジストは、プリント配線板の加工用途として安価であり、しかも厚みが均一であるという特性を持つため、作製された金型も平坦であることが確認された。実際に、この手法を用いて微小流路パターンを PMMA 基板に転写したところ良好な流路パターンを形成することが確認された（図）。さらに、この技術を用いて DNA 電気泳動用デバイスを作製し、その特性を評価したところ、流路の化学的処理を行わずとも既製品と同等の分離能を有することが確認された。

3. 研究実施体制

「慶大理工」グループ

- ①研究分担グループ長：鈴木 孝治（慶應義塾大学理工学部慶大理工、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（産業技術総合研究所産総研 生物機能工学研究部門、部門長）
- ②研究項目：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：岩崎 弦（日本電信電話株式会社 NTT MI 研、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

「神奈川産業総合研究所」グループ

- ①研究分担グループ長：伊藤 健（神奈川県産業技術総合研究所産総研、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（原著論文）発表

- Hirokazu Komatsu, Takahiro Miki, Yukio Fujiwara, Daniel Citterio, Takeshi Kubota, Yutaka Shindo, Yoshichiro Kitamura, Masafumi Hagiwara, Kotaro Oka and Koji Suzuki "Single molecular multi analyte (Ca, Mg) fluorescent probes and applications to bioimaging", Journal of the American Chemical Society, 117(31), 10798-10799(2005)
- Hirokazu Komatsu, Daniel Citterio, Yukio Fujiwara, Katsuya Minamihashi, Yoshio Araki, Masafumi Hagiwara and Koji Suzuki "Single Molecular Multianalyte Sensor:Jewel Pendant Ligand", Organic Letters, 7(14), 2875-2859(2005)
- Kenichi Maruyama, Hiroyuki Ohkawa, Shou Ogawa, Akio Ueda, Osamu Niwa, Koji Suzuki "Fabrication and characterization of a nanometer-sized optical fiber electrode based on selective chemical etching for scanning electrochemical/optical microscopy", Anal Chem, 78 (6), 1904-1912 (2006)
- Aki Honda, Hideki Sonobe, Akiko Ogata and Koji Suzuki "Improved Method of the MALDI-TOF Analysis of DNA with Nanodots Sample Target Plate", Chemical Communications, 42, 5340-5342(2005)
- Aki Honda, Yoshio Suzuki, Koji Suzuki "Mass Probe-assisted Ionization Method for Total Analysis of Biomolecules With Electrospray Ionization-Mass Spectrometry ", The Chemical Record, 6, 100-106 (2006)

- Aki Honda, Hiroki Hifumi, Yuya Honma, Noriyuki Tanji, Yoshio Suzuki, Koji Suzuki, "Semicomprehensive and Semiquantitative Determination of Proteins with Mass Probes", Chemistry Letters, 35, 290-291 (2006)
- Koji Yamada, Yuki Nomura, Daniel Citterio, Naoko Iwasawa and Koji Suzuki "Highly Sodium-Selective Fluoroionophore Based on Conformational Restriction of Oligoethyleneglycol-bridged Binary Boron-dipyrromethene", Journal of the American Chemical Society, 127 (19), 6956-6957(2005)
- Ishihara S, Ikeda A, Citterio D, Maruyama K, Hagiwara M, Suzuki K, "Smart chemical taste sensor for determination and prediction of taste qualities based on a two-phase optimized radial basis function network", Anal. Chem., 24, 7908-7915 (2005)
- Takeshi Kubota, Yutaka Shindo, Kentaro Tokuno, Hirokazu Komatsu, Hiroto Ogawa, Susumu Kudo, Yoshiichiro Kitamura, Koji Suzuki and Kotaro Oka "Mitochondria are intracellular magnesium stores: investigation by simultaneous fluorescent imagings in PC12 cells", Biochemical and Biophysical Acta, 1744, 19-28(2005)
- Yoshio Suzuki, Koji Suzuki "Optical Sensors for Ions and Protein Based on Digital Color Analysis", Springer Ser Chem Sens Biosens, 3, 343-365(2005)
- Shin-ichi Sasaki, Gou Monma, Daniel Citterio, Koji Yamada and Koji Suzuki "Fluorescence Enhancement Detection of Underivatized Amino Acids Using a Trifluoroacetophenone-Based Tripodal Fluoroionophore", CHIMIA, 59, 204-208(2005)

(2) 特許出願

H17 年度出願件数 : 2 件 (CREST 研究期間累積件数 : 10 件)