

「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

(應義塾大学理工学部 教授)

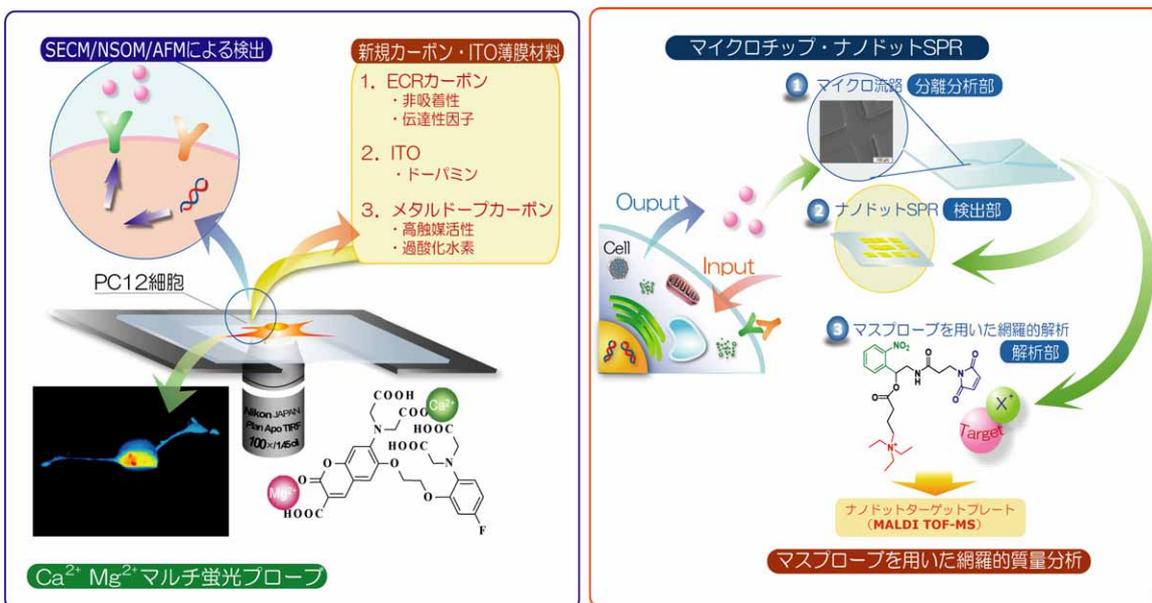
「ナノケミカルプローブの創製とバイオ・医療計測」

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い、これまでに新規プローブの開発を行ってきた。平成17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

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、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18年度 KCM-1 を PC12 細胞内に投与し、FCCP 投与に伴う細胞内 Ca^{2+} および Mg^{2+} の応答を観察した。KCM-1 は Ca^{2+} 濃度を上昇により吸収蛍光波長がブルーシフト、 Mg^{2+} 濃度上昇によって吸収蛍光波長のレッドシフトを示すため、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 (図1)。この観察により、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という知見を得ることができた。

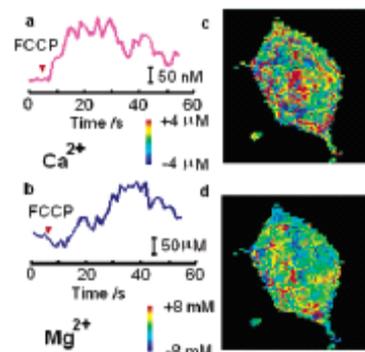


図1 FCCP 刺激に伴う PC12 細胞質内の応答 (a) Ca^{2+} (b) Mg^{2+} (c) Ca^{2+} のイメージング像 (d) Mg^{2+} のイメージング像

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、生体分子のトータルアナリシスを目指してきた。平成18年度はタンパク質測定法をより高感度に行うための、高感度タンパク質用マスプローブの開発を行った。このマスプローブは光開裂による切断の際に、従来生じていたカルボキシルではなく、水酸基を生じ、より高感度測定が可能となる。これまでに開発したタンパク質測定用マスプローブを図2に示す。

また、マスプローブをトータルアナリシスに応用するために、マスプローブを用いた MALDI-MS 測定を実現した。通常 MALDI-MS 測定には、マトリクスを介して、試料分子を効率的にイオン化する必要があるが、マスプローブはあらかじめイオン化された分子であるため、これを用いることで、タンパク質などの検出がマトリクスなしで行える。

一方、質量分析を用いたトータルアナリシスのためのツールとして、SPR-MS基板の作製を行った。この基板は、ナノサイズの微細加工を施すことで、局所SPRの測定と、MALDI-MSによる質量分析のおよびSPRの両方に用いることができる。この基板は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が期待される。

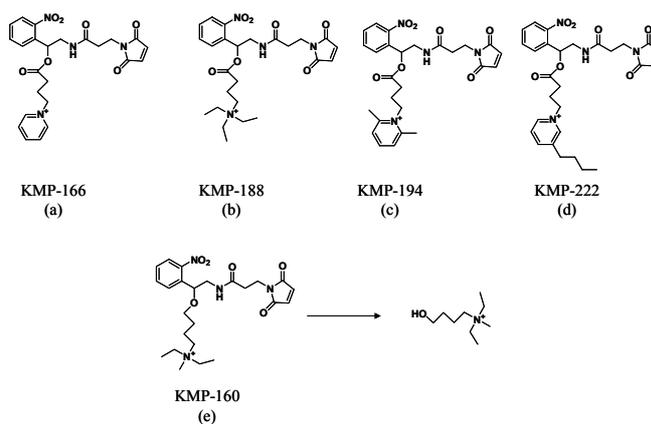


図2 これまでに開発したタンパク質測定用マスプローブ

電気化学プローブ

ナノ電極・光プローブ: ナノ電極・光プローブ:

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すでに報告してきた。本年度は、生細胞 PC12 の SECM/NSOM モードによる同時イメージングを行った。つまり、SECM ではメディアータ中にてネガティブフィードバックモードを用いることで、電気化学応答に由来する形状を、また、NSOM では Ca^{2+} を選択的に捕捉する蛍光色素 (Fluo-4) をラベル化した生細胞 PC12 をイルミネーション-コレクションモードにて近接場光学応答を取得した。実際の測定系においては AFM モードにてアプローチした後、Constant height SECM/NSOM モードにてイメージングを行った。この結果、SECM ネガティブフィードバックモードによる電流値減少と NSOM イルミネーション-コレクションモードによる蛍光強度増大が軸索部位において良い対応が見られた。さらに、軸索レベルにて蛍光強度に分布があることが確認された。この分布の領域はすでに報告した AFM モードでのバリコシティのサイズ (約 800 nm) と同じであるため、この Constant height SECM/NSOM モードにおいてもバリコシティオーダーでの解析が可能であることが示唆された。これにより SECM/NSOM/AFM がマルチモードでのバイオアプリケーションイメージングに適応可能であることが示された。今後、刺激を加えた際のバリコシティでの蛍光ラベル化イオンの近接場光学応答やカテコール

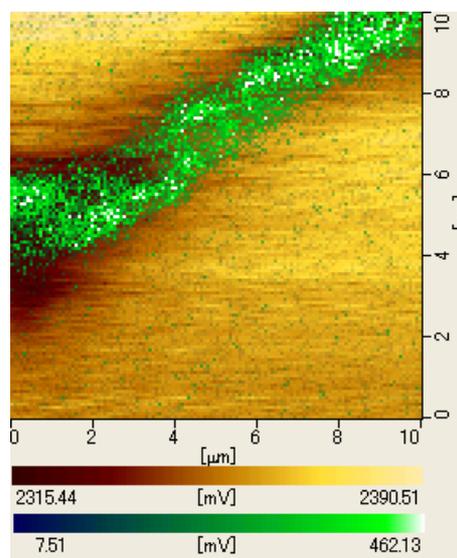


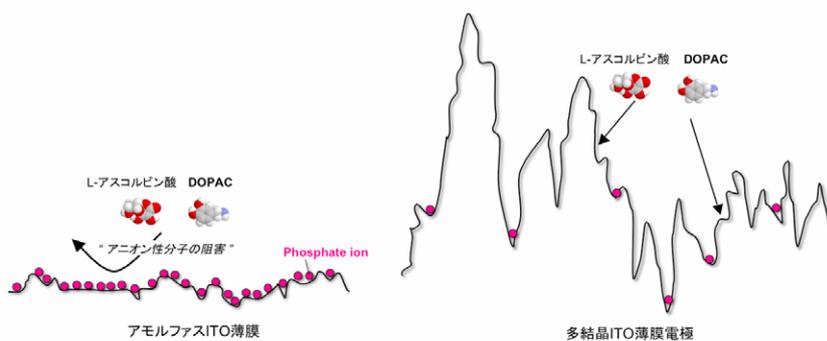
図3 PC12 電気化学・近接場光学同時イメージング、黄色: 電気化学応答 (形状)、緑: 近接場光学応答 (Ca^{2+} 分布)

アミン類の直接検出を行う予定である。

ナノ薄膜電極材料の開発：

昨年度までにボロンドープダイヤモンド電極に準じる電位窓を有し、平坦性に優れる ECR(Electron Cyclotron Resonance)スパッタカーボン薄膜電極を開発し、特に酸化電位が高く吸着性の高いオリゴヌクレオチドやヒスタミンなどの生体分子を、直接電気化学的に極めて安定に定量できることを実証した。また、ドーパミンに対して選択性の高い ITO スパッタ薄膜を開発し、その選択性発現の原因が、アモルファス状態の表面 ITO 構造に起因することを解明した。今年度 ECR カーボン電極について、脱水素酵素（デヒドロゲナーゼ）の補酵素である NADPH の測定について検討を行った。市販の GC 電極で NADPH の連続測定を行うと、その酸化生成物である NADP^+ が電極表面に吸着してしまい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 スパッタカーボン電極では NADP^+ がほとんど吸着しないため、NADPH の連続測定に対して再現性の高い結果が得られた。この結果を踏まえて ECR カーボン薄膜電極上にデヒドロゲナーゼを含む酵素を固定化し、神経抑制物質である γ -アミノ酪酸（GABA）の検出を検討したところ、市販のカーボン電極を凌駕する検出限界が得られ、実際に酵素を用いた GABA の測定においても高感度、および連続測定に対する高安定性が得られることを実証した。この電極表面の汚染を抑制する効果は、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の安定性、再現性の面で極めて大きな利点となる。

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イオンを含む緩衝溶液中で 300 倍以上



の高い選択性を達成した。この原因として、本 ITO 電極は、平坦性の高いアモルファス構造を有しており、その表面にはリン酸イオンの吸着サイトであるヒドロキシル基が多く存在していることが明らかとなった。その結果、アモルファス ITO 薄膜表面では、従来の多結晶性 ITO 薄膜と異なり、リン酸イオンが高密度に吸着することで、アニオン性の妨害分子を電極表面から静電的に著しく除去していることが明らかとなった。さらに本特性はペンシル型のガラスファイバーナノプローブ上へ薄膜形成した場合でも同様に示される事が明らかとなっており、細胞から放出される微量のドーパミンの測定に対しても高感度・高選択的に検出可能であることが示唆された。

今年度は、細胞応答計測を目的に、上記 ECR カーボン薄膜や ITO 薄膜を微小な光ファイバー上にスパッタを行いナノプローブとし、実際に本ナノプローブを用いて PC12 や肥満細胞への薬物等への刺激と放出される生体分子（ドーパミン・ヒスタミン）の細胞近傍の極微領域のリアルタイム分子計測を実証する。

その他のツール：

ナノパターン SPR：17年度までにナノサイズの金の配列構造を利用した **Localized surface plasmon resonance (LSPR)** 効果を使った分子間相互作用測定をモデル物質で確認した。今年度は金ナノドットをより測定に適した形状に変更し、これをマイクロ流路に組み込み、屈折率の変化を連続して測定した。また、このデバイスを使い炎症系伝達物質であるインターロイキン類の測定を行った。その結果、抗インターロイキンを固定化したナノドット素子を使って、この抗体に特異的なインターロイキンの検出を、流路中のナノドット基板のスペクトルシフトから行うことができた。さらに、SPR測定に引き続き質量分析方と組み合わせて測定を行うことに成功した。

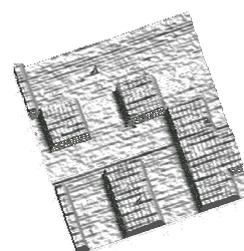


図5 LSPR 基板の AFM 像

マイクロ流体デバイス：マイクロ流体デバイス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。マイクロ流体デバイス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。従来は、シリコンやガラス基板にドライまたはウエットエッチングにより微小流路を作製してきた。そのため、貴金属薄膜を犠牲層に利用したり工程が複雑になるなどの影響によりコスト削減が難しかった。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、感光性シートを利用した流路の作製を検討した。感光性シートはプリント基板配線加工用の犠牲層として使われてきたため安価であり、本研究では感光性シートを微小流路の構造体及び接合層として利用することでビルドアップ型の作製方法を取ることができた。この技術を利用して微小空間にダム構造を形成し、生体物質を固定化した担体を導入することでマイクロカラムとして機能するマイクロ流体デバイスを開発した（図）。また、カラム下流に電気化学検出器を設けることで検出機能も内蔵することが可能であった。グルコースをモデルとして測定を行ったところ、2桁に及ぶ良好な検量線を得ることができた（図6）。

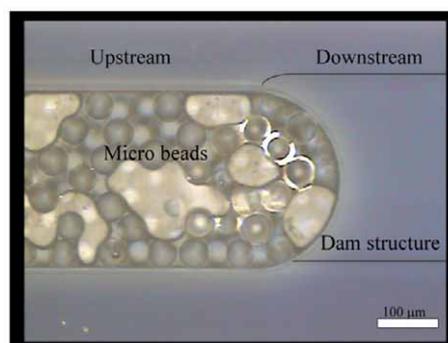


図6 ダム構造にトラップされた担体

3. 研究実施体制

(1)「慶大理工」グループ

①研究者名

鈴木 孝治 (慶應義塾大学理工学部 教授)

②研究項目

・各種プローブの創製と応用

(2)「産総研」グループ

①研究者名

丹羽 修 ((独)産業技術総合研究所生物機能工学研究部門 主任研究員)

②研究項目

・生体分子検出用ナノ構造電極の開発

(3)「NTT MI研」グループ

①研究者名

岩崎 弦 (日本電信電話(株)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

・ナノ微細加工SPR検出の開発

(4)「神産センター」グループ

①研究者名

伊藤 健 (神奈川県産業技術センター電子技術部電子デバイスチーム 主任研究員)

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

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

(1)「慶大理工」グループ

- Komatsu H, Miyachi M, Fujii E, Citterio D, Yamada K, Sato Y, Kurihara K, Kawaguchi H, Suzuki K "SPR sensor signal amplification based on dye-doped polymer particles", SCIENCE AND TECHNOLOGY OF ADVANCED MATERIALS, 7 (2), 150-155(2006).
- Hiroki Hifumi, Seiichi Yamaoka, Akihiro Tanimoto, Daniel Citterio, Koji Suzuki "Gadolinium-Based Hybrid Nanoparticles as a Positive MR Contrast Agent", Journal of the American Chemical Society Communication, 128, 15090-15091(2006).
- D. Citterio, J. Takeda, M. Kosugi, H. Hisamoto, S. Sasaki, H. Komatsu, K. Suzuki "pH-Independent Fluorescent Chemosensor for Highly Selective Lithium Ion Sensing",

Analytical Chemistry, 7(3), 1237–1242(2007).

(2)「産総研」グループ

- Osamu Niwa, Jianbo Jia, Yukari Sato, Dai Kato, Ryoji Kurita, Kenichi Maruyama, Koji Suzuki, Shigeru Hirono “Electrochemical Performance of Angstrom Level Flat Sputtered Carbon Film Consisting of sp² and sp³ Mixed Bonds”, J. Am. Chem. Soc., 128, 7144–7145(2006).
- Jianbo Jia, Dai Kato, Ryoji Kurita, Yukari Sato, Kenichi Maruyama, Koji Suzuki, Shigeru Hirono, Toshihiro Ando, Osamu Niwa “Structure and Electrochemical Properties of Carbon Films Prepared by Electron Cyclotron Resonance (ECR) Sputtering Method”, Anal. Chem., 79, 98–105(2007).
- Dai Kato, Seiichiro Iijima, Ryoji Kurita, Yukari Sato, Jianbo Jia, Soichi Yabuki, Fumio Mizutani, Osamu Niwa “Electrochemically Amplified Detection for Lipopolysaccharide Using Ferrocenylboronic Acid”, Biosens. Bioelectron., 22, 1527–1531(2007).

(3)「NTT MI研」グループ

- Yuzuru Iwasaki¹, Tatsuya Tobita, Kazuyoshi Kurihara, Tsutomu Horiuchi¹, Koji Suzuki and Osamu Niwa, “Imaging of flow pattern in micro flow channel using surface plasmon resonance”, Meas. Sci. Technol., 17, 3184–3188(2006).

(4)「神産センター」グループ

- Ito T., Kawaguchi T., Miyoshi H., Maruyama K, Kaneko S., Ohya S., Iwasaki Y., Niwa O. and Suzuki K. “Characterization of the Microfluidic Device Fabricated by Using Photosensitive Sheet”, Journal of Micromechanics and Microengineering, 17, 432–438(2007).
- Ito T., Kunimatsu M., Kaneko S., Ohya S., and Suzuki K. “Microfluidic Device for the Detection of Glucose Using a Micro Direct Methanol Fuel Cell as an Amperometric Detection Power Source”, Analytical Chemistry, 79, 1725–1730(2007).

(2) 特許出願

平成 18年度特許出願: 3件 (CREST 研究期間累積件数: 18 件)