

西澤松彦

東北大学工学研究科 教授

電気化学的な異種材料ナノ集積化技術の開拓とバイオデバイス応用

§1. 研究実施体制

(1)「西澤」グループ(東北大学Ⅰ)

① 研究代表者: 西澤 松彦 (東北大学工学研究科、教授)

② 研究項目

- ・オンデマンドバイオ操作システムの開発
- ・細胞アッセイシステムの開発
- ・バイオ電池の開発と応用

(2)「神崎」グループ(東北大学Ⅱ)

① 主たる共同研究者: 神崎 展 (東北大学医工学研究科、准教授)

② 研究項目

- ・収縮型筋管細胞のマイクロ培養システムの開発
- ・2型糖尿病の薬剤スクリーニング系の開発
- ・ヒト由来細胞を用いる収縮型筋細胞の作製と応用

(3)「安川」グループ(兵庫県立大学)

① 主たる共同研究者: 安川 智之 (兵庫県立大学物質理学研究科、准教授)

② 研究項目

- ・誘電泳動による細胞および微粒子の配列
- ・細胞の代謝活性評価用センサの開発

§2. 研究実施内容 (文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

本研究課題の目的は、タンパク質や細胞の接着、有機・無機材料の析出、といった界面の組織化現象を局所に誘導する技術の開発と、それによる異種材料の融合・集積化による、(1)オンデマンド集積流路型バイオシステム、(2)ハイブリッド細胞チップ、(3)バイオ有機電子素子の開発である。H23年度における(1)~(3)それぞれの進捗のポイントは以下であった。

(1) バイオ材料の組織化を誘導する「バイオリソグラフィシステム」の2次試作を実施した。

(2) ハイドロゲル表面に形成する導電性高分子 PEDOT の抵抗率が2桁低下して、筋管細胞の評価などの応用研究に進む準備が整った。また、蛍光ナノ粒子によるインシュリン応答性 GLUT4 挙動の解析手法が確立した。

(3) 果実や動物が内包するバイオ燃料(果糖や血糖)で発電する刺入タイプの小型バイオ電池を作製した。また、畠グループ(産総研)との共同研究により、酵素を高密度内包した CNTF 電極の作製法を確立し、昨年度の果糖酸化に続き、グルコースの酸化でも高出力を得た。

今後は、開発した新技術を組み合わせ、用途を定めたナノシステムの実現を目指してプロジェクト最終成果への道筋を得たい。

(1) オンデマンドバイオ集積・流路型バイオチップシステム

① 高感度迅速なイムノアッセイシステム(安川)

流路内の誘電泳動を利用して細胞表面抗原の迅速検出を試みた。まず、正の誘電泳動(p-DEP)によりバンド電極にヒト骨髄球性白血病細胞(HL-60細胞)を捕集し、抗原抗体反応による固定化を促す。次に、負の誘電泳動(n-DEP)を用いて未固定の細胞をバンド電極上からギャップ領域に分離した。

その結果、固定・分離に要する時間は1分程度であり、マイクロプレートを用いた通常の細胞アッセイ(30分)と比較して劇的な短縮を達成した¹⁰⁾。さらに、この方法は検出対象抗原のラベルや未反応細胞の除去操作を必要としない高いスループットを有する。

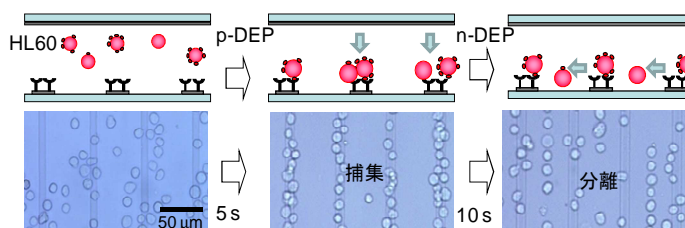


図1 正の誘電泳動(p-DEP)と負の誘電泳動(n-DEP)によるCD33発現HL-60の分離固定

② バイオリソグラフィ2次試作機の作製(西澤・長峯)

2次試作機の作製をプレジジョン・システム・サイエンスと協力して行った。これまで蓄積した電気化学バイオリソグラフィや誘電泳動の条件に加えて、流路内を観察する自由度、およびバイオゲルシートの作製機能(温度制御)などを追加した。

この装置によって、流路内でのタンパク質・細胞・微粒子の捕集・配列は勿論のこと、それらのゲルシートへの固定がほぼ半自動でできるようになった。また、導電性高分子電極を配線したハイドロゲルシートの作製も可能であり、(2)のハイブリッド細胞チップの研究に使用する予定である。

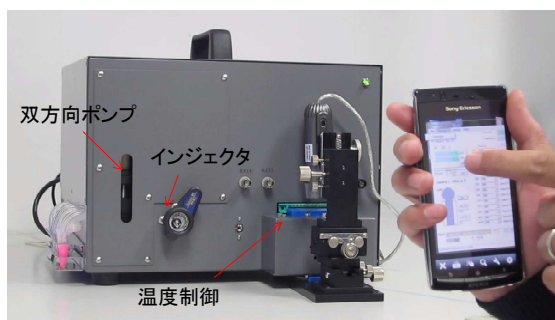


図2 バイオリソグラフィー2次試作機の外観

(2) ハイブリッド細胞チップ

①ハイドロゲルへの電極作製(西澤・長峯)

昨年度、ハイドロゲルの表面に、導電性高分子 PEDOT による電極を作製する新手法を開発した。しかし、ゲル内部に重合される PEDOT の密度が低いため、表面抵抗率が $10\text{k}\Omega/\square$ 程度と高かった。今年度は、応用研究へ逸る気持ちを抑えて電気特性の改善に取り組み、2段階で重合する方法を開発した²⁾。先ず Pt 電極上に高密度で低抵抗の PEDOT フィルムを形成し、これをゲル内に成長する PEDOT で固定する方法であり、これによって $50\Omega/\square$ 程度と実用に耐える電極が作製できた。

H24 年度は、この特性改善されたゲル電極を用いて筋管細胞シート(H22 年度開発)の機能解析を本格的に進める予定である。

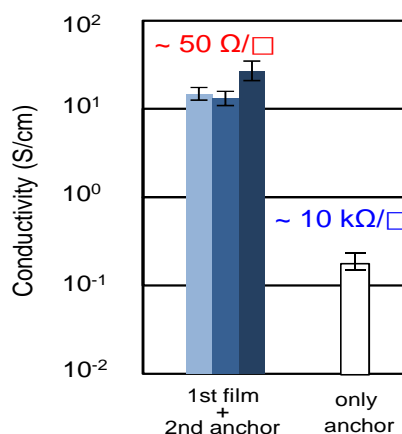


図3 (左)2段階重合法による PEDOT 電極の導電率(濃淡は1段目の重合の溶媒の違い)。(右)1段階重合による昨年度の PEDOT 電極。

②蛍光ナノ粒子を利用した次世代インスリン応答性評価法の開発 (神崎)

昨年度までに確立した「蛍光ナノ粒子(Qdot)による GLUT4 挙動解析手法」と既存の分子生物学的手法を組み合わせることにより、インスリン応答性 GLUT4 小胞輸送制御系に関わる分子基盤を世界で初めて「ナノメートルスケール」で解明することに成功した⁵⁾。さらにインスリン抵抗性病態では GLUT4 の選別輸送(ソーティング)に障害があることも明らかにし、この単一分子視覚化ナノ計測技術と新概念に基づいた分子動態解析法は全く新しい生細胞機能評価方法として、広範な応用が可能であることを証明した。また、骨格筋における TUG 関連蛋白質と GLUT4 制御の機能的関連性について解析した⁶⁾。

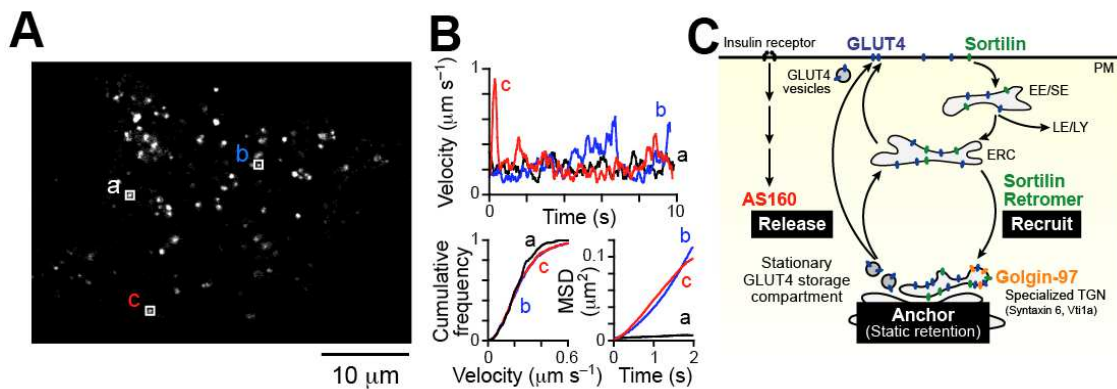


図4 (A, B) Qdot 標識 GLUT4 の単一分子蛍光と各分子挙動のナノ計測解析の1例。(C) 本新手法によってインスリン応答性 GLUT4 輸送制御システムの分子基盤をはじめて明らかにした。

(3) バイオ有機電子素子の開発

① 挿入型バイオ燃料電池によるエネルギーハーベスティング (西澤・三宅)

果実や動物が内包するバイオ燃料 (果糖や血糖) で発電する刺入タイプの小型バイオ電池を作製した¹⁾。バイオ燃料を酸化するアノード電極を刺入用のニードル内に作製することに成功し、一方、酸素を還元するカソード電極はガス拡散型にして大気中の酸素を活用する構造とした。これらの、ニードルアノードとガス拡散カソードを組み合わせ、電解質ハイドロゲルをパッケージングして内部のイオン導通を確保した。

ブドウの実や白ウサギの耳下静脈に刺入した発電実験によって、 $\sim 0.3\text{mW}$ 程度の出力が再現性良く得られた。ブドウに関しては、LED とキャパシタからなるデバイスと組み合わせ、糖度に応じて点滅速度が変わる自己発電式の糖度モニターとして動作することが確認できた。

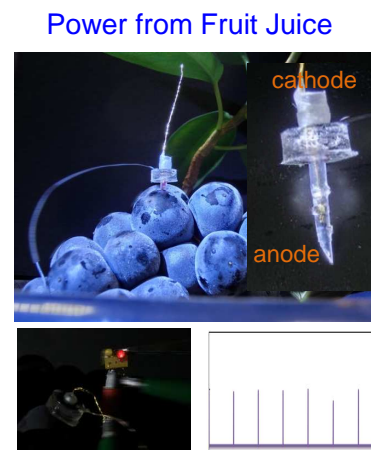


図5 刺入型の酵素バイオ電池 (左下は自己発電式の糖度計)

② カーボンナノチューブフォレスト (CNTF) によるフレキシブル酵素電極

(西澤・三宅 (東北大)、島・山田 (産総研))

産総研グループが作製した CNTF (チューブ間隔 16nm) に酵素溶液を染み込ませてから乾燥収縮させる方法で、高密度で酵素が内包された酵素電極が作製可能である。昨年度は、直接電子移動が可能なフルクトースデヒドロゲナーゼとラッカーゼの内包に成功して果糖水溶液から世界最高の出力密度で発電できた。本年度はさらに、メディエータ分子を共内包するプロセスの開発に取り組み、グルコースオキシダーゼを高効率で働かせることができるようになり、 $50\text{mA}/\text{cm}^2$ を超える圧倒的な高電流密度が得られるようになった (論文投稿中)。医療デバイスへの応用を進める。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

1. T. Miyake, K. Haneda, N. Nagai, Y. Yatagawa, H. Ohnami, S. Yoshino, T. Abe and M. Nishizawa, “Enzymatic Biofuel Cells Designed for Direct Power Generation from Biofluids in Living Organisms”, *Energy & Environmental Science*, vol. 4, pp. 5008-5012, 2011. (DOI: 10.1039/C1EE02200H)
2. Y. Ido, D. Takahashi, M. Sasaki, K. Nagamine, T. Miyake, P. Jasinski and M. Nishizawa, “Conducting Polymer Microelectrodes Anchored to Hydrogel Films”, *ACS Macro Lett.*, vol. 1, pp. 400–403, 2012. (DOI: 10.1021/mz2002406)
3. K. Nagamine, S. Ito, M. Takeda, S. Otani and M. Nishizawa, “Oxygen Responsive Microparticles- Patterned Hydrogel Sheet for Enzyme Activity Imaging”, *Electrochemistry*. (in press)
4. K. Haneda, S. Yoshino, T. Ofuji, T. Miyake and M. Nishizawa, “Sheet-Shaped Biofuel Cell Constructed from Enzyme-Modified Nanoengineered Carbon Fabric”, *Electrochimica Acta*. (in press) (DOI: 10.1016/j.electacta.2012.01.112)
5. H. Hatakeyama and M. Kanzaki, “Molecular basis of insulin-responsive GLUT4 trafficking systems revealed by single molecule imaging”, *Traffic*, vol. 12, pp. 1805-1820, 2011. (DOI: 10.1111/j.1600-0854.2011.01279.x.)
6. CM. Castorena, JG. MacKrell, JS. Bogan, M. Kanzaki and DG. Cartee, “Clustering of GLUT4, TUG and RUVBL2 Protein Levels Correlate with Myosin Heavy Chain Isoform Pattern in Skeletal Muscles, but AS160 and TBC1D1 Levels Do Not”, *J. Appl. Physiol.*, vol. 111, pp. 1106-1117, 2011. (DOI: 10.1152/jappphysiol.00631.2011)
7. TS. Matsui R. Kaunas, M. Kanzaki, M. Sato and S. Deguchi, “Nonmuscle myosin II induces disassembly of actin stress fibers independently of myosin light chain dephosphorylation”, *Interface Focus*, vol. 1, pp. 754-766, 2011. (DOI: 10.1098/rsfs.2011.0031)
8. Y. Takahashi, T. Miyamoto, H. Shiku, K. Ino, T. Yasukawa, R. Asano, I. Kumagai and T. Matsue, “Electrochemical Detection of Receptor-mediated Endocytosis by Scanning Electrochemical Microscopy”, *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 13, pp.

16569-16573, 2011. (DOI: 10.1039/C1CP21886G).

9. J. R.-Azcón, T. Yasukawa and F. Mizutani, “Immunodevice for simultaneous detection of two relevant tumor markers based on separation of different microparticles by dielectrophoresis”, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 28, pp. 443-449, 2011. (DOI: 10.1016/j.bios.2011.07.073).
10. H. Hatanaka, T. Yasukawa and F. Mizutani, “Detection of surface antigens on living cells through incorporation of immunorecognition into the distinct positioning of cells with positive and negative dielectrophoresis” *Anal. Chem.*, vol. 83, pp. 7207-7212, 2011. (DOI: org/10.1021/ac201789m).
11. M. Koide, T. Yasukawa, Y. Horiguchi, K. Nagamine, H. Shiku, T. Matsue and T. Itayama, “Microfluidic Devices for Electrochemical Measurement of Photosynthetic Activity of Cyanobacteria *Microcystis* Cells”, *Anal. Sci.*, vol. 28, pp. 69-72, 2012. (DOI: 10.2116/analsci.28.69)
12. Y. Hirano, T. Yasukawa, Y. Mase, D. Oyamatsu, H. Shiku, F. Mizutani and T. Matsue, “Imaging of Enzyme Reactions Captured via Immuno-recognition by Scanning Electrochemical Microscopy with Distance Control System”, *Electrochemistry*, vol. 80, pp. 30-32, 2012. (DOI:org/10.5796/electrochemistry.80.30)
13. T. Yasukawa, Y. Yoshimura and F. Mizutani, “Microsensors for Glucose in High Concentration Range by Controlling Oxygen Concentration”, *Electrochemistry*, vol. 80, pp. 15-17, 2012. (DOI: 10.5796/electrochemistry.80.15)
14. M. Yamamoto, T. Yasukawa, M. Suzuki, S. Kosuge, H. Shiku, T. Matsue and F. Mizutani, “Patterning with Particles Using Three-Dimensional Interdigitated Array Electrodes with Negative Dielectrophoresis and Its Application to Simple Immunosensing”, *Electrochim. Acta.* (in press) (DOI: org/10.1016/j.electacta.2012.02.109)

(3-2) 知財出願

- ① 平成23年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 4 件)