

「電子・イオン制御型バイオイオントロニクス」

研究期間:2020年12月~2024年3月

研究者:三宅 丈雄

1. 研究のねらい

ヒトを始めとする生体は、酵素の多段階反応に伴う固体電子移動によって獲得した生化学エネルギーを巧みに利用し、体内のイオン分布を時空間的に制御することで高度な機能を維持し続けている。これら生体の持つ電子・イオン

制御をデバイスに搭載できれば、従来のバイオエレクトロニクスでは実現し得ない高機能化が期待できる。例えば、バイオエレクトロニクスは、生体/デバイス界面での利用が期待され、血糖値センサを始めとする数多くの生体計測デバイスが開発されてきた。ただし、その多くは生体からデバイスへの一方向に限られた情報伝達であった(図1a)。さらに、その計測手法は界面電荷(静電容量)を用いた電子制御が主であるため、ウェット環境で複雑な電子・イオン制御を行う生体には適さないのが現状であった。これに対し、溶液中のイオンをデバイスで制御し、これらイオン制御デバイスと生体のイオン制御機構を集積・連携させる技術開発は、生体機能を誘発させるイオン種(情報伝達物質を含む)をそのままキャ

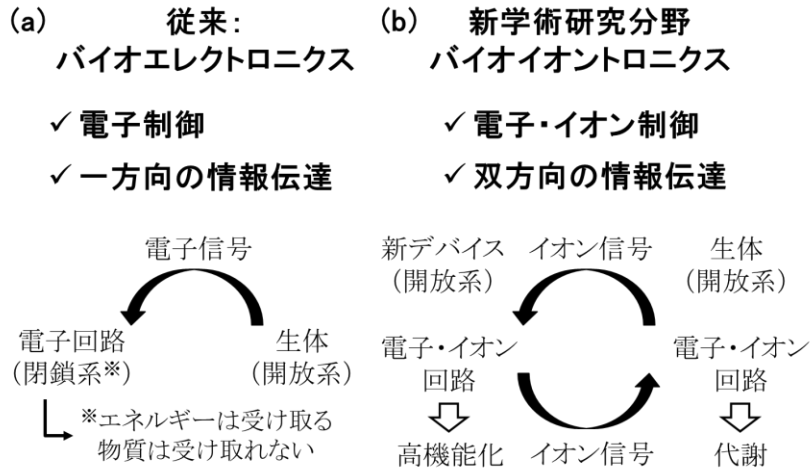


図1. 新学術分野「バイオイオントロニクス」の概略.

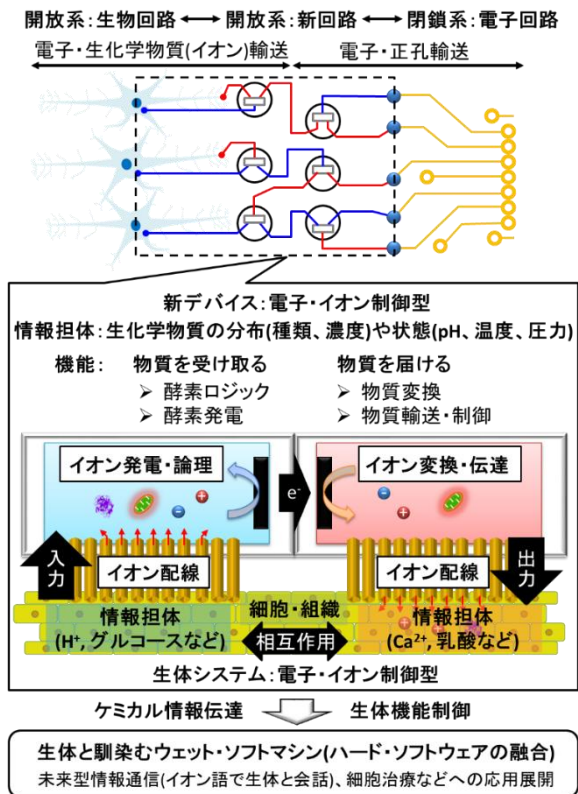


図2. 研究計画と予想されるアウトプット.

リアとして利用し、代謝機構(ケミカル論理回路など)との組み合わせにより複雑な動作を実現し得るため、双方向の高度な情報伝達が可能である。これらデバイスがイオン信号によって生体に働きかける新学術分野をバイオイオントロニクスと呼ぶ(図 1b)。

このような背景の中、本研究課題では、従来デバイスが実現できなかった物質輸送、電子とイオンのキャリア制御、自己発電などの新機能を実現することで、生体(主に細胞)活動をイオン信号で制御するバイオイオントロニクスデバイスを創出することを、ねらいとする(図 2)。

## 2. 研究成果

### (1) 概要

本研究課題「電子・イオン制御型バイオイオントロニクス」は、初年度(2020 年度)においては、細胞とのイオン導通を実現する細胞穿刺用複合ナノチューブ(項目1:イオン配線)の開発に取り組んだ。これは、皮膚や細胞膜のように生体素材特有の絶縁膜(脂質二分子膜)にプラグを挿すため(物質輸送を実現するため)の技術開発であった。2020-2021 年度においては、接着性細胞からデバイスに輸送された生化学燃料から電気を創る酵素発電、また、ケミカル入力信号から出力信号を導き出す演算素子(酵素ロジック)を開発した(項目2:イオン発電・論理ゲート素子)。2021-2022 年度においては、電気エネルギーから生化学物質の分布を制御し、細胞内に調節因子を輸送するイオン変換・伝達素子を開発し(項目3)、2022-2023 年度においては、これら素子を統合することで、細胞からデバイスへの情報物質の取り込みに応じて、デバイスから細胞へのケミカル情報伝達が決定される新しい原理の電子・イオン制御型バイオデバイスのプロトタイプを試作した(項目4)。加え、さきがけ研究領域内の研究者および産業界との連携に関する成果も最後に記述した。

### (2) 詳細

(項目1:イオン配線、細胞/デバイス間における生化学情報物質の輸送を実現させる技術開発)

金属と導電性高分子から構成される複合ナノチューブを開発し、本ナノチューブを細胞へ挿入するための条件および細胞内物質導入および抽出に関する成果を得た。複合ナノチューブは、3つのプロセスから作製される。まず、無電解メッキによってトラックエッチドメンブレン(ポリカーボネイト:PC)の表面に金を析出させる。その後、王水を用いて薄膜上面の金をウェットエッチングし、PCを露出させる。酸素プラズマによりPCをドライエッチングすることで、金のナノチューブを作製する。その後、3,4-ethylenedioxythiopheneモノマー(EDOT)溶液中で1V印加することで、金の表面にPEDOTの導電性高分子を重合させた。作製したPEDOT/Au複合ナノチューブを電子顕微鏡で確認したところ、重合時間を増やすことでナノチューブの内径が小さくなることを確認した(図3)。

本複合ナノチューブを用いることで、イオンの流れを電気で制御することに成功した(図3)。これまでの金属製ナノチューブでは、正負の電圧を膜に印加すると、プラスとマイナスのイオン電流を計測された。これは、イオンが双方向にナノチューブ膜を通過できることを意味する。一方、複合ナノチューブでは、正の電圧を印加した時のみイオンが流れる整流特性(イオ

的なダイオード)が確認できた。このダイオード特性は、印加電圧がわずか $\pm 100\text{mV}$  の範囲で生じることがわかった。これは、複合ナノチューブの出入口(上面と下面)が非対称なナノ構造体でできていること、かつ、その表面が帯電しているからだということで説明できる。

開発した複合ナノチューブを用いて、カルセイン低分子とGFPタンパク質をHeLa細胞に、DNAプラスミドをNIH3T3細胞に導入することに成功した。いずれの結果も $\pm 50\text{mV}$  の電気を印加すると、物質の導入効率が

促進することが確認できた。カルセイン低分子においては、導入効率 99%、細胞生存率 96.8%を実現し、GFPタンパク質においては、導入効率 84%、細胞生存率 98.5%を実現した。DNAプラスミドに関しては、約 10%のトランスフェクション率を実現した。

これら成果は、代表的な論文(原著論文)1としてまとめ、さらに、プレスリリース報告を実施した。本技術成果(複合ナノチューブ)を基にして、現在、3通の原著論文を投稿中である。

(項目2:イオン発電・論理ゲート素子、細胞からデバイスへケミカル信号を伝達する技術開発)

多様化するウェアラブル製品への搭載に向け、酵素を修飾した電極糸の開発に取り組んだ。本酵素修飾糸は、衣類に縫い付けることが出来るため、1次元から3次元など任意の構造体を実現可能なオーダーメイド織布発電素子と言える。バイオアノードとして、乳酸酸化酵素とメディエータ(PVI-Os)を修飾したLOD/PVI-Os炭素糸を開発し、さらに、バイオカソードとしてビリルビンオキシダーゼ(BOD)をカーボンナノチューブ(親水性と疎水性を利用)で被覆した炭素糸を開発した。これら酵素繊維を編み込んだミサンガ型発電素子を開発した。ここでの技術的課題は、①恒常的に汗をミサンガに取り込むこと、②アノードとカソード間の電気的な絶縁に加え、イオニックな導通を実現することである。①の課題に関しては、汗を吸収し易い親水性繊維および水分が蒸発し易い撥水性繊維を組み合わせた多層膜を作製することで、実現させることに成功した。この吸収と蒸発する速度は、繊維素材および網目構造によって変化することを確認した。一方の②課題においては、導電性酵素繊維間に絶縁性高分子繊維を編み込むことで電気的な絶縁は実現できるが、それによって、電極間のイオン伝導率が低下し、ひいては、発電性能が低いという課題を解決する必要があった。そこで、生体適合性の高いイオン液体ゲルを繊維に取り込ませることで、汗成分のみでは $1\text{M}\Omega$ 程度あった抵抗を $5\text{k}\Omega$ 程度まで下げることに成功した。本抵抗値は、理論的な限界を示すものではなく、あくまで我々が取り組

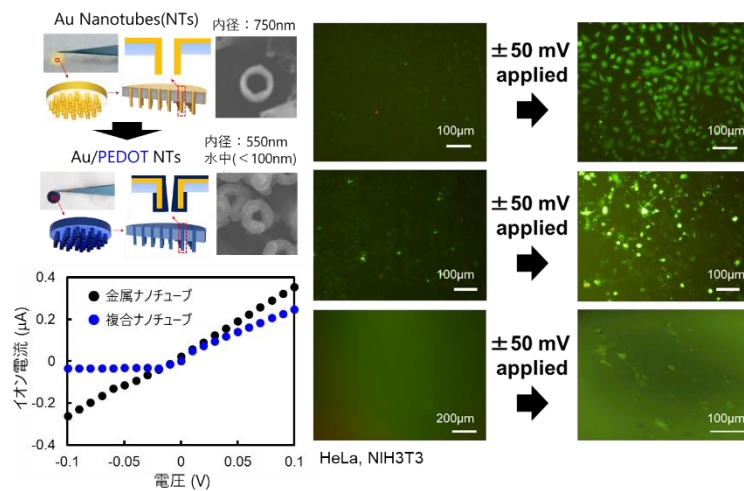


図3. 複合ナノチューブ開発と細胞内物質導入応用

んだ繊維素材、構造、コーティング方法によって得られた値である。結果、単セルとして  $55 \mu\text{W}$  at  $0.39\text{V}$  を汗に含まれる乳酸と空气中酸素を燃料として発電することに成功している。ブレスレドの構造を活かすため、全部で 6 つのセルを直列接続することで、出力電圧を  $3.6\text{V}$ 、発電性能を  $681 \mu\text{W}$  まで向上させることに成功し、市販の腕時計用電源として利用できることを確認した。これら成果は、*Biosensors and Bioelectronics*, 179, 113107, (2021).として、まとめた。

(項目3:イオン変換・伝達素子、デバイスから細胞へケミカル信号を伝達する技術開発)

図4に示すように、スルホン化ポリアニリン(SPA)を基盤とするマイクロ電極(面積:  $70 \sim 350 \mu\text{m}^2$ )を開発し、その性能( $\text{H}^+$ 選択性、電気化学的反応制御など)を評価した。本 SPA 電極は、印加電圧に応じて溶液中水素イオンを膜へ吸収する、あるいは、放出することができる。その結果、溶液中 pH の計測および制御が可能となる。我々は、本 protode 電極上に脂質二分子膜を成膜し、そこへ ATP 合成酵素およびルシフェラーゼタンパク質を組み込むことで、2つの入力信号(電気とケミカル)に応じて、生体内エネルギー源”ATP”の合成を制御し、最終的には、その活性を燐光として検出するバイオデバイスを開発した。これは、従来型電子デバイスが生体機能の読み取りのみだったのに対し、本提案デバイスでは、生体分子(酵素群)をプロトン信号を介して双方向に情報伝達できることを実証した。これら成果は、代表的な論文(原著論文)2としてまとめた。

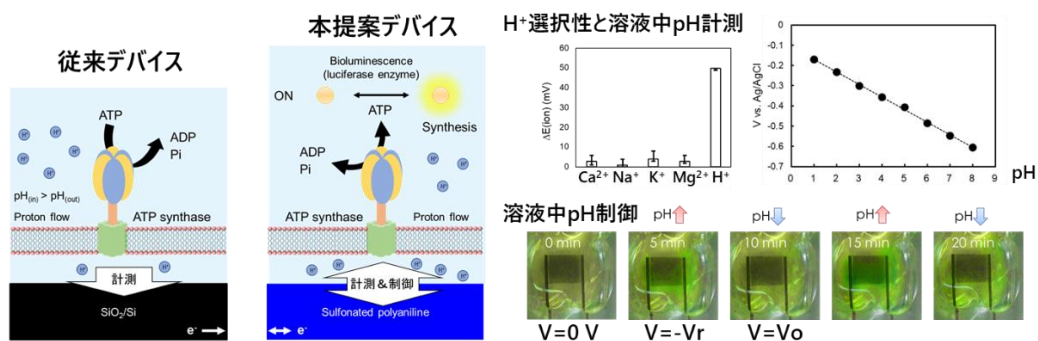


図4. 従来型電子デバイスと本提案デバイス(プロトニクス)との性能比較

また本技術は、項目2でも活用できるロジック素子として活用することも可能となる。すなわち、図 5 に示すように、入力①ADP と入力②印加電圧の組み合わせを ATP 酵素修飾プロトン電極(バイオトランスデューサー)に印加すると、入力①と②が On の時のみ出力信号がえられる AND 論理回路として利用することができます。さらに、本 ATP 酵素修飾プロトン電極にプロトン伝導性チャネルとして知られる Gramicidin A を加えると、入力①ADP と入力② $\text{Ca}^{2+}$  の組み合わせによって、XOR 論理回路を実現することに成功した。従って、様々な機能性分子を本ト

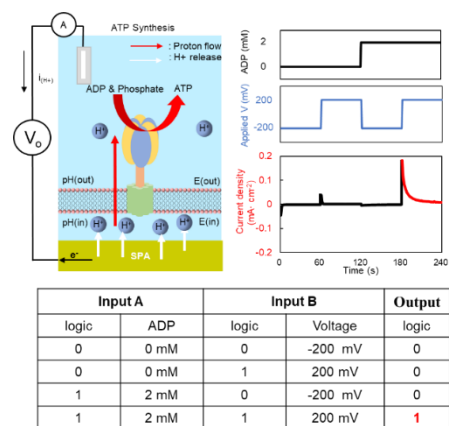


図5. ケミカルロジック回路



ンスデューサーに加えることで、 $H^+$ 伝導を制御する複雑なロジック回路を実現できると考えている。

(項目4: 電子・イオン制御型バイオデバイス、細胞からデバイスへの入力信号(生化学情報物質)に応じて、デバイスから細胞への出力信号(生化学情報物質)を伝達する技術開発)

スルホン化ポリアニリン(SPA)電極を用いることで、溶液中のプロトン( $H^+$ )信号を電気化学的に制御し(溶液中 pH 濃度を電気で制御)、さらに、 $H^+$ 信号を細胞に届けることで細胞活性を高めることに成功した(図 6)。対して、プロトンと相互作用しない PEDOT(poly(3,4-ethylenedioxythiophene))電極では、同程度の電気信号(電圧および電荷量と同じに設定)を印加しても細胞活性を変化させることはできなかった。

実験方法としては、印加電圧 $\pm 0.6V$ を SPA 電極にかけることで、溶液中 pH を変化させ、その間、細胞内の機能変化を蛍光色素で評価した。細胞内 pH を BCECF、ミトコンドリア膜電位を TMRE、ミトコンドリアによる活性酸素量を MitoSOX、カルシウム濃度を Fluo-4 で評価した。その結果、SPS/CNT 電極では、電圧の印加に応じて、各蛍光色から蛍光強度が変化するのに対し、PEDOT 電極では、強度の変化は見られなかった。従って、溶液中 pH 濃度を変化させることで、細胞内 pH が変化し、それに応じて細胞内の膜電位やカルシウム濃度などが変化することが分かった。これら成果は、代表的な論文(原著論文)3としてまとめた。

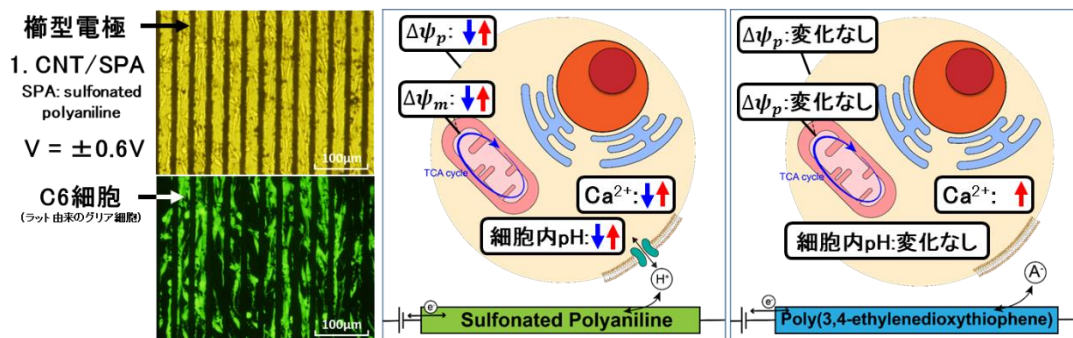


図 6. プロトン信号を用いた細胞機能制御の実現

(さきがけ研究領域内成果)

京都大学廣谷潤先生と共同で MXene2次元ナノシート上での細胞培養および電気化学計測を実施している。さらに、MXene 足場を利用することで細胞の集合体(スフェロイド)形成が促進されることを確認している。

また、東京農工大学田畑美幸先生と共同で、細胞にナノ注射器を刺入し、その後生成されたエクソソームあるいはマイクロベシクルをバイオセンサで計測するシステムを構築している。

(産業界や海外との連携)

項目1にて開発した細胞穿刺用複合ナノチューブは、大学発スタートアップとして、起業することに成功した(2021年7月ハインツテック株式会社設立)。細胞などの生体に任意の物質導入できる本技術は、細胞治療などの医学分野に加え、酵母などの微生物を用いた合成生物学(産業応用: バイオマニュファクチャリング)への発展が期待できる。また、メリーランド大学

のベントレー先生と共同研究を実施するため、2024年1月25日から2月29日まで先方のラボに訪問し、電気遺伝学に関わる研究を実施した。また、当研究室学生の訪問に関する記事が、先方の大学で掲載された(<https://fischellinstitute.umd.edu/news/story/fischell-institute-spotlight-daniella-gatus>)。

### 3. 今後の展開

本研究課題では、バイオイオントロニクスという新しい学術分野に挑戦し、そこで必要な基礎技術(イオン配線、イオン発電・論理ゲート、イオン変換・伝達など)に取り組んだ。本技術は、生体とデバイス界面で利用するための基盤技術となるため、対象を細胞のみならず、生体組織(眼、皮膚、脳など)への発展させることを考えている。さらに、現状は個人で研究活動することが多かったが、今後は国内外のチームを作りながら研究活動を飛躍させたいと考えてる。

また、本研究課題で開発した複合ナノチューブは、細胞への物質導入あるいは抽出を実現する唯一の手法(ナノ注射器)であるため、本技術シーズを社会に役立てるための活動にも取り組んでいきたいと考えている。

### 4. 自己評価

当初の想定よりも実現したこと、できなかったことがはっきりした結果となった。想定よりも実現できたことは、研究論文1において偶然の発見があったことに加え、そのシーズ技術を使った実用化が加速したこと、また、さきがけの支援によって研究環境を充実させることができた。これは、独立した研究室を運営する上で大変ありがたい支援であった。さらに、研究室内に外国人の講師および助教が2名加わったことで、研究室内に疑似的な海外共同研究を実施できた点で、研究活動の飛躍につながった。本成果報告に間に合わなかった原著論文も多く存在するため、事後報告の際に追加したいと考えている。また、さきがけ研究者交流会に2回参加したが、そこで共同研究までに発展することはなかった。一方、情報担体内では、新材料や計測手法を組み合わせた新たな研究課題に挑戦することができたが、開始時期が遅くなってしまったため、研究成果としてまとめるまでに至らなかったのが残念である。海外研究者との共同研究に関しても、さきがけ当初はコロナ禍であったため、進めることができなかった。ただし、最終年度の1月末に渡米し、共同研究を実施した。今後の成果につながると確信している。

### 5. 主な研究成果リスト

#### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 4件、主な成果3本を掲載

1. Bowen Zhang, Dinuo Zheng, Shi Yiming, Kazuhiro Oyama, Masahiro Ito, Masaomi Ikari, Takanori Kigawa, Tsutomu Mikawa, Takeo Miyake, "High-Efficient and Dosage-Controllable Intracellular Cargo Delivery through Electrochemical Metal–Organic Hybrid Nanogates", *Small Science*, 1, 2100069, 2021.

導電性高分子で被覆された金属製ナノチューブシートを開発し、電気を掛けることで電気浸透流を誘発し、その結果、細胞膜を通過する物質の輸送速度を促進させることを発見した。さら

にこの電気浸透流現象を利用することで、安全かつ効率良く細胞内に物質を導入できることを確認した。その成果は、さまざまな機能性物質を細胞内に導入することで新たな細胞の種を作り、再生医療や細胞治療に応用することが期待される。

2. Yukun Chen, Mingyin Cui, Chenliang Lin, Bingfu Liu, Noriyo Mitome, Takeo Miyake, "Enzymatic Bioluminescence Modulation with an ATP Synthase Integrated Biotransducer", *Advanced Materials Technologies*, 7, 2100729, 2022.

スルホン化ポリアニリン(SPA)を電気化学的に重合したマイクロ電極を作製し、印加電圧に応じて溶液中水素イオンを膜へ吸収する、あるいは、放出することができるバイオトランスデューサーを開発した。本マイクロ電極上に脂質二分子膜を成膜し、そこへ ATP 合成酵素およびルシフェラーゼタンパク質を組み込むことで、2つの入力信号(電気とケミカル)に応じて、生体内エネルギー源”ATP”の合成を制御し、最終的には、その活性を燐光として検出するバイオデバイスを開発した。これは、デバイスと生体分子(酵素群)がプロトン信号で双方向に情報伝達を行った取り組みと言える。

3. Mingyin Cui, Momoka Takahashi, Yukun Chen, Bingfu Liu, Yoshihiro Ohta, Takeo Miyake, "pH modulation in adhesive cells with a protonic biotransducer", *Bioelectrochemistry*, 147, 108202, 2022.

スルホン化ポリアニリン(SPA)電極を用いることで、溶液中のプロトン(H<sup>+</sup>)信号を電気化学的に制御し(溶液中 pH 濃度を電気で制御)、さらに、H<sup>+</sup>信号を細胞に届けることで細胞活性を高めることに成功した。対して、プロトンと相互作用しない PEDOT(poly(3,4-ethylenedioxythiophene))電極では、同程度の電気信号(電圧および電荷量を同じに設定)を印加しても細胞活性を変化させることはできなかった。すなわち、プロトン信号を介してデバイスと生体(細胞)が情報伝達することができ、さらに、細胞機能をデバイスで制御することに成功している。

## (2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件(特許公開前のものも含む)

## (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

(学会発表: 主な発表 5 件選出)

1. 招待講演、三宅丈雄、電子・イオン制御型バイオイオントロンクスの開拓、第 33 回日本 MRS 年次大会デジタルヘルスマネジメントのためのバイオセンシングシステム、2023年11月14日
2. 招待講演、三宅丈雄、“複合ナノチューブを用いた電動ナノ注射器の開発”拠点成果発表、第 199 回産業交流サロン「ひびきのサロン」北九州市立大学「超高齢化社会に対応する先制医療工学研究拠点」シンポジウム、バイオテクノロジーと情報技術の融合による新しい産業の創生、2022年10月28日
3. 招待講演、三宅丈雄、“人工トンネリングナノチューブによる細胞内情報伝達と機能制御”、第 83 回応用物理学会秋季学術講演会 シンポジウム、プラズマエレクトロニクス分科会、2022年9月21日

4. 招待講演、三宅丈雄、「生体とイオン信号でつながるバイオイオン트로ニクス/Ion controlling biodevices for interactive communication with biology」, 2021年12月14日, 第31回日本MRS年次大会

5. 招待講演、三宅丈雄、「生体とイオン信号でつながるバイオイオン트로ニクス」、第70回高分子討論会(オンライン開催), 口頭発表, 公益財団法人高分子学会, 2021年9月7日

(受賞)

該当なし

(著作物)

1. 三宅丈雄、「Hybrid Nanotubes (HyNTs(ハインツ)):北九州から大学発スタートアップ始動」応物系スタートアップ、応用物理、92巻、5号、p305-308, 2023.

2. 三宅丈雄、Mehes Gabor、「バイオ燃料電池」、電気設備学会学会誌、第42巻 Vol.8, P527 (29)、2022.

3. 三宅丈雄、「効率よく細胞へ物質導入」、医薬経済、10, 15, P20-23, 2021.

プレスリリース

1. 細胞用電動ナノ注射器「電気浸透流ナノポンプ」を開発ー細胞治療に向けた新たな細胞内物質導入機器ー, 2021年9月10日