様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２年　７月　１日現在

機関番号：２１４０１

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：１６Ｋ１４０３８

研究課題名（和文）オンチップ酵素反応解析を可能にする質量分析プレートの開発

研究課題名（英文）Development of a mass spectrometry plate for on-chip enzymatic reaction analysis

研究代表者

常盤野　哲生（Tokiwano, Tetsuo）

秋田県立大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：５０３１２３４３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　2,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では生体に適合した新規素材を開発する目的で、シリコーンポリマー（高分子）を基に、その表面に他の有機材料を加えた複合素材を作成した。シリコーンポリマーと炭素材料であるカーボンナノチューブとの複合素材では、酵素反応および反応生成物の質量分析を可能にした。またバイオマスの一種であるリグノセルロース繊維との複合素材においては、細胞接着性が高い性質を示したことから、新規培養容器に応用できる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
上記の酵素反応や生体培養に適合したポリマー素材の開発は、質量分析を用いた目的成分の簡便な高感度分析と迅速な分析手法の開発、開発素材で作成した容器内での培養細胞の接着性や増殖性、組織化の制御を可能とするものである。将来的には生命科学および再生医療分野において、代謝物解析や高度な細胞培養技術へ応用されることにより、迅速な検査手法の提供や、再生組織の効率的培養といった先端医療に役立つ基盤技術の一つとなりうると期待される。

研究成果の概要（英文）：This research aims to develop new materials suitable for living organisms by using silicone polymers as a base for composite materials were created by adding other organic materials to their surfaces. In the composite material of the silicone polymer and a carbon material, carbon nanotubes, enzymatic reactions and the mass analysis of the reaction products was made possible. In addition, in composite materials with a cellulosic biomass, lignocellulose fibers, the cell adhesion property is higher. The results showed that this method has the potential to be applied to novel culture vessels.

研究分野：天然物化学、有機合成化学

キーワード：ポリジメチルシロキサン　カーボンナノチューブ　リグノセルロースナノファイバー　レーザー脱離イオン化法　酵素反応　細胞接着

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９(共通)

１．研究開始当初の背景

本研究グループは、これまでシリコーンポリマー／カーボンナノチューブ複合素材をレーザー脱離イオン化質量分析(LDI-MS)のプレートとして使用し、脂質やペプチドなどの分析が可能であることを見いだしていた(1)。この複合素材は細胞増殖向上を示す培養容器にも使用可能であり(特開 2014-023461)、生体環境に適合した新規 LDI-MS プレートへ応用できる可能性が示されたので、従来のハードマテリアル主体のプレートとは異なるソフトマテリアル素材を基盤としたプレートの創出を目的に本研究に着手した。

生体物質の質量分析は生命活動を解明する手法の１つとして、ポストゲノム研究におけるタンパク質や代謝産物の解析に重要な役割を果たしている。中でもLDI-MSイメージング解析は、空間情報を損なわずに生体物質の分布を視覚化する手法であり、迅速分析への応用も可能であるが、生体内の主要な酵素反応分析のほとんどは合成基質を用いる蛍光検出に頼っており、酵素の本来の代謝産物を直接分析する実用的な方法は未だ開発途上にある。また多くの場合、検出以前に酵素反応後の後処理(抽出や、反応産物検出のための２次反応など)を伴うため、このステップの省略が迅速分析の課題となっていた。

本研究の開発素材は、生体環境に適合したシリコーンポリマー基盤であり、水溶液条件化の使用を可能にする。また質量分析の際にもマトリックス支援イオン化法のようなイオン化促進剤を使用しない簡便な方法であり、(a) 酵素反応後に直接質量分析に持ち込める、(b) 反応を有機溶媒の抽出操作なしで分析する、(c) ポリマーの加工性を生かした、マルチチャンバーの作製が容易、などの利点を有し、汎用性の高いプレートとして役立つ。質量分析は生命現象解明のツールとして多方面に活用されており、特に本来の基質を用いた酵素反応解析を可能にすることは、より精密な酵素反応解析を容易にすることが期待される。

２．研究の目的

本研究の目的は、生物の代謝に関わる酵素の反応・代謝物抽出・検出を単一のデバイスで行う「オンチップ解析」を可能にする質量分析プレートの開発である。シリコーンポリマーを基盤とし、ポリマー表面に他の有機材料を加えた複合素材を作製し、ソフトマテリアルの特性を生かした酵素反応分析手法を開発する。

(1) 低極性成分(脂質など)から高極性成分(糖、ペプチドなど)の、各々に適した吸着特性をもつ複合素材を作製する。

(2) LDI-MS を利用した、リパーゼ酵素などの直接の代謝産物解析、ハイスループットスクリーニング分析手法を開発する。

(3) 複合素材による細胞増殖性に優れた培養容器を開発する。

３．研究の方法

(1) シリコーンポリマーの調製

ポリジメチルシロキサン(PDMS)は SYLGARD 184(東レ・ダウコーニング)の主剤と硬化剤を 5 : 1～30 : 1 の比率(Rc)で混合し、成形容器に分注した後、70°C で 4～10 時間の加熱硬化によりポリマーを調製した。

(2) PDMS の表面改質

調製した PDMS 表面の親水化は、スパッタ装置によるプラズマ処理、または希 HF 水溶液処理により行った。

(3) 複合素材の作製

①多層カーボンナノチューブ(MW-CNT, OD: ≤ 8 nm, Length: 10-30 μm)をメタノール中の超音波処理により分散液を調製し、表面を親水化した PDMS に分散液を滴下することで PDMS/CNT 複合素材を作製した。

②0.1，0.2，0.5 wt%に希釈したセルロースナノファイバー(CNF)またはリグノセルロースナノファイバー(L-CNF)(モノマシナリー(株))の分散液を親水化した PDMS に滴下し、PDMS/CNF、PDMS/L-CNF 複合素材を作製した。

(4) 複合素材の物性評価

PDMS の粘弾性測定は動的粘弾性装置(TA Instrument，RSA-G2)を用いた。測定条件は昇温速度 1 °C /min、荷重 1 N、温度範囲 30～60 °C、周波数 1 Hz、ひずみ振幅 0.1 %とした。測定は引張りモードで行った。素材表面の濡れ性は蒸留水の接触角により評価した。方法として素材に蒸留水を滴下後、CCD カメラ(SHONDENSHA，GR300BCM2)で撮影した。その後、画像解析ソフト Image J を用いて接触角を θ/2 法により算出した。

４．研究成果

(1) 酵素反応の LDI 質量分析に向けた、ポリジメチルシロキサン(PDMS)表面の改質の検討を行った。PDMS 素材表面のプラズマ処理またはフッ化水素(HF)水溶液処理により親水性が向上することがわかったが、その後の時間経過に伴って親水性の低下が起こった。また HF 処理時にはカーボンナノチューブ(CNT)分散の向上も見られたが、これは表面のナノ構造の変化によるもの

と推定している。親水化処理後の SEM 分析では、表面に細孔の形成が観察される場合もあったが、再現性が得られなかった。これらは親水化後の時間経過に伴い、PDMS 表面からの脱水によって疎水性の復元が起こっている可能性を推察している。素材上におけるリパーゼまたはペプチダーゼ反応は可能であるものの、ペプチドに関しては質量分析時の感度が未だ低いため、親水化に続く表面修飾も必要であることが示唆された。PDMS 調製時に、主剤と硬化剤(Rc=10：1)に加えて 5%～10%wt%のオルトケイ酸テトラエチルを混合し、硬化・成形したところ、PDMS 表面の親水性が向上し、ペプチド溶液浸時の吸着量も増加した。またアミノプロピル基を有するケイ酸添加剤の場合は成形したポリマーの強度が弱く、重合反応時にアミノ基の影響があるものと考えられた。PDMS 表面親水化後の化学修飾も試みたが、直接的にはうまくいかなかったため、表面にシリカ系担体粒子を固定した素材の作成を行った。担体粒子はシリカゲル、プロピルアミノ基、オクタデシルシリル基を有する担体粒子を使用した。PDMS 主剤と硬化剤の混合後、担体粒子を重層した後に加熱硬化して作製した。また CNT をメタノールまたは N-メチル-2-ピロリドン中で超音波処理により分散後、各担体粒子と混合したところ、プロピルアミノ基を有する単体が最もよく CNT を分散担持した。

⑵ PDMS 素材上で多検体の LDI 質量分析に対応するため、ウェルアレイ基盤の作成を行った。アルミ製の金型を設計して作製した(Fig. 1-A)。、PDMS 主剤と硬化剤を混合し分注した後で硬化させ、サイズ 3mm×3mm×深さ 1mm のウェルを 5×5 個並べた PDMS 基盤を形成できる。スパッタ装置を使用してウェルアレイ基盤上の細孔境界周辺に白金またはカーボンを蒸着した素材も試作したものの、PDMS 表面から蒸着薄膜が剥がれやすいため、今後の改善が必要である。さらに、ウェルアレイ基盤を質量分析装置へ導入するため、専用のアダプターを作成した。一般的に用いられているレーザー脱離イオン化質量分析装置の分析用プレートでは厚みのある素材または試料を載せることができないため、作成基盤を使用するためにはプレート平面に対して垂直方向の高さの調整が必要である。種々検討の結果、通常の分析平面から掘り下げた形状のアダプターを設計し、アルミニウム削り出しにより作成した。装置導入については装置メーカーが提供している TLC 用フレームを流用することにし、フレームに固定可能なアダプターを作製した(Fig. 1-B)。

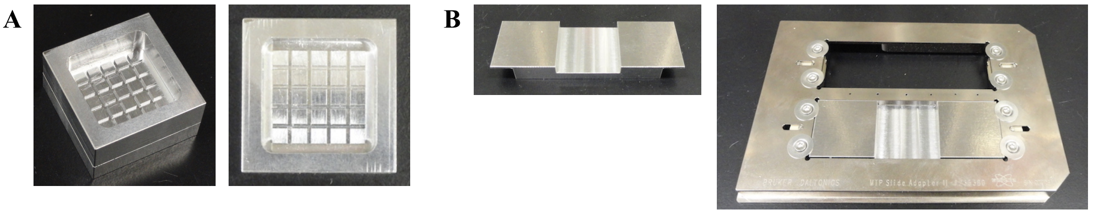


Fig. 1. (A) Aluminium mold for PDMS multiwell plate, (B) Platform to adopt in TLC-MALDI frame.

(3) ポリジメチルシロキサン(PDMS)を基盤として、カーボンナノチューブ(CNT)、セルロースナノファイバー(CNF)またはリグノセルロースナノファイバー(L-CNF)複合素材の作製を検討し、化合物吸着や細胞接着を指標とした物性評価を行った。PDMS 調製時の主剤と硬化剤の混合比を Rc とする。各 Rc で調製した PDMS 試験片の貯蔵弾性率を Table 1 に示した。PDMS は Rc の増加に伴い貯蔵弾性率の低下を示した。また CNF および L-CNF との複合素材表面の濡れ性評価について、表面の蒸留水の接触角を Fig. 2 に示した。CNF の濃度に関わらず CNF/PDMS 素材では高弾性である Rc=5，10 の接触角が 90°以下の親水性を示した。一方で Rc=20 では接触角が増大し、疎水化した。Mix(CNF+L-CNF)/PDMS 素材および L-CNF/PDMS 素材においても Rc に伴う濡れ性の傾向は同様であった。また、CNF/PDMS と比較して、L-CNF/PDMS は比較的接触角が大きくなった。

(4) セルロースナノファイバー(CNF)はヒドロゲルによる細胞培養が報告されており[2]、セルロース系繊維が有効な培養素材となる可能性が示されている。さらに CNF と濡れ性が異なるリグノセルロースナノファイバー(L-CNF)[3]は、培養素材としての検討はほとんどなされていない。そこで PDMS と CNF または L-CNF 複合素材容器における細胞培養実験を検討した。培養細胞にはヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)を使用した。培養 24 時間後 4%パラホルムアルデヒドで細胞を固定し、細胞核の染色後、素材表面における細胞の蛍光顕微鏡画像から細胞密度を算出して細胞接着性を評価した。その結果、L-CNF/PDMS および Mix/PDMS 素材では Rc の増加に伴って細胞接着数が減少する傾向であった。そのため、HUVEC の接着性は素材の弾性率の影響を受けており、L-CNF だけでなく PDMS にも接着している可能性がある。一方 CNF/PDMS 素材では、細胞接着数の相違はほとんど見られなかったことから、CNF/PDMS 素材表面の HUVEC は CNF のみに接着している可能性がある。
各素材における濡れ性と細胞接着数の関係については、L-CNF/PDMS および Mix/PDMS 素材に培養した HUVEC は接触角 60°付近で接着数が最大となり、接触角が大きくなると減少した。一方 CNF/PDMS 素材では、濡れ性の相違による細胞接着数への影響は見られなかった。また

CNF/PDMS および L-CNF/PDMS 素材が同様の接触角でも L-CNF/PDMS 素材のほうが細胞接着数が多くなり、Mix/PDMS 素材では CNF/PDMS 素材と L-CNF/PDMS 素材の間の接着数であったことから、L-CNF には細胞接着に有効な官能基があると考えられる。
CNF/PDMS および L-CNF/PDMS 基材に接着した HUVEC の様子を Fig. 3 に示す。CNF/PDMS 基材に比べて、L-CNF/PMDS 基材の HUVEC は伸張した。また L-CNF/PDMS 基材に培養した HUVEC では、ストレスファイバ(SF)の形成が見られた。SF はアクチンフィラメントとミオシンから構成される繊維束であり、その役割は細胞牽引力の発生や基材との細胞接着に関与しているとされる。このことからも L-CNF/PDMS 基材の HUVEC は細胞接着性が高くなることが示唆された。

Table 1. Storage modulus of PDMS.

Rc (-)	5	10	20
貯蔵弾性率（kPa）	2782.0	2076.5	548.6

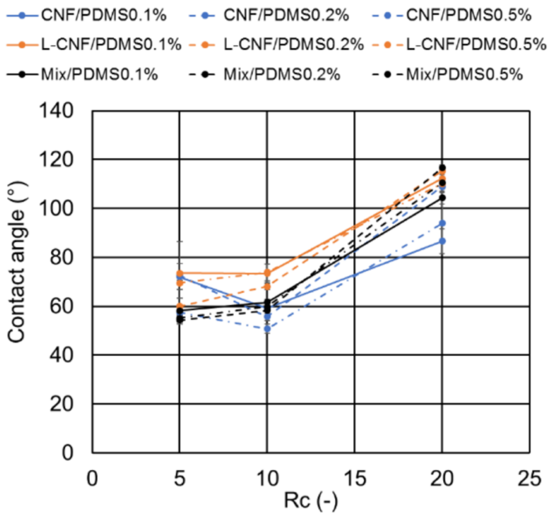
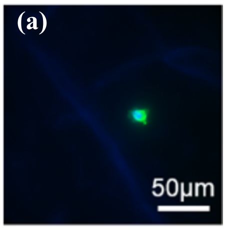
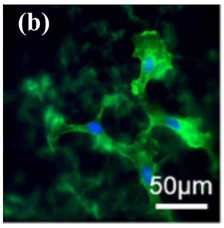


Fig. 2　Contact angle of CNF/PDMS, L-CNF/PDMS and Mix/PDMS substrate.



(a) CNF/PDMS 0.5%



(b) L-CNF/PDMS 0.5%

Fig. 3. Representative images of HUVEC cultured on CNF/PDMS, L-CNF/PDMS substrates.

＜引用文献＞
① 常盤野哲生，伊藤一志，尾﨑紀昭，秋田県立大学ウェブジャーナル B (3), (2016), pp.58-62.
② Madhushree Bhattacharya *et al*., *Journal of Controlled Release* (164), (2012), pp.291-298.
③ Xuan Wang *et al*., *BioResources* (9), (2014), pp.3211-3224.

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計1件（うち査読付論文　1件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　0件）

１．著者名 伊藤一志	４．巻 28
２．論文標題 培養基材の3次元表面構造による細胞応答	５．発行年 2017年
３．雑誌名 日本素材物性学会誌	６．最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

〔学会発表〕　計2件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 矢田瑞樹，邱 建輝，伊藤一志，境 英一，平岩佑都
２．発表標題 リグノセルロースナノファイバー基材とヒト培養血管内皮細胞の接着性
３．学会等名 日本機械学会東北支部第53期秋季講演会
４．発表年 2017年

１．発表者名 倉田一，伊藤一志，邱建輝，境英一，森英明
２．発表標題 細胞パターニングした培養血管内皮細胞の形状および細胞骨格に及ぼす培養基質の硬さの影響
３．学会等名 プラスチック成形加工学会第24回秋季大会
４．発表年 2016年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	伊藤　一志 (Ito Kazushi) (30507116)	秋田県立大学・システム科学技術学部・准教授 (21401)	