

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H02577

研究課題名（和文）マイクロ/ナノ空間の電気化学的pH制御技術の開発と細胞内ATP合成制御への応用

研究課題名（英文）Electrochemical pH control technology in micro/nano space and its bioapplication

研究代表者

三宅 丈雄（Miyake, Takeo）

早稲田大学・理工学術院（情報生産システム研究科・センター）・教授

研究者番号：50551529

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、研究者らがこれまでに開発してきた水素イオンと親和性の高い有機Protode電極を利用し、その近傍に好熱菌由来ATP合成酵素を含むリポソーム、あるいは、ATP合成活性の単離ミトコンドリアを設置することで、ATP合成酵素によるATP合成機能を包括的に評価し（酵素分子レベルから細胞内レベルにおいて理解）、デバイスによってプロトン駆動力を制御し、ひいてはATP合成を制御できるインタラクティブバイオ界面を構築することに取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで工学分野では、ミトコンドリアの仕組みを利用して化学エネルギー（グルコースなど）から電気を創るバイオ燃料電池の開発が盛んであった。しかし本来ミトコンドリアの機能は、電気化学ポテンシャルの差（グルコース/酸素）を利用してATP分子の化学エネルギー源を体内に貯蔵しておくことである。このバイオ素材（ミトコンドリア）の機能をプロトン（H⁺）を介してデバイスで制御すべく、申請者は溶液中のH⁺濃度（pH）を制御できる有機電極“バイオトランスデューサー”を開発し、本デバイスとミトコンドリアを有機的に統合させることで双方向の情報伝達（pH計測・pH刺激）を実現させる学術的意義を有する。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have developed organic Protode electrodes with high affinity for hydrogen ions (proton), and placed liposomes containing ATP synthase from thermophilic bacteria or isolated mitochondria with ATP synthesis activity in their vicinity. We have comprehensively evaluated the ATP synthase function (from the enzyme molecular level to the intracellular level) and worked to construct an interactive biointerface where the device can control the proton driving force and thus ATP synthesis in biology.

研究分野：バイオプロトニクス

キーワード：pH制御 バイオプロトニクス ATP合成酵素 電気化学 バイオトランスデューサー ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

これまで工学分野では、ミトコンドリアの仕組みを利用して化学エネルギー(グルコースなど)から電気を創るバイオ燃料電池の開発が盛んであった。しかし本来ミトコンドリアの機能は、電気化学ポテンシャルの差(グルコース/酸素)を利用して ATP 分子の化学エネルギー源を体内に貯蔵しておくことである。この過程を分子レベルで考察すると、膜の内側で酸化反応が生じ、このエネルギーを使って膜の内外にプロトンの濃度勾配を生じさせる。それに伴い酸化還元反応を誘発させ、電子移動が細胞膜中タンパク質を介して行われる。最後に高濃度のプロトンが低濃度の膜内側に移動することで ATP が合成される仕組みである。このバイオ素材(ミトコンドリア)の機能をプロトン(H⁺)を介してデバイスで制御すべく、我々は溶液中の H⁺濃度(pH)の計測と同時に、電気化学的に H⁺濃度を制御できる有機電極“バイオトランスデューサ”を開発し、本デバイスとミトコンドリアを有機的に統合させることで双方向の情報伝達(pH 計測・pH 刺激)を実現させる新学術研究“バイオプロトニクス”を世界に先駆けて取り組んでいる。

2. 研究の目的

本研究では、我々がこれまでに開発してきた水素イオンと親和性の高い有機 Protode 電極を利用し、その近傍に好熱菌由来 ATP 合成酵素を含むリポソーム、あるいは、ATP 合成活性の高いブタ心臓由来の心筋細胞中ミトコンドリアを設置することで、ATP 合成酵素による ATP 合成機能を包括的に評価し(酵素分子レベルから細胞内レベルにおいて理解)、デバイスによってプロトン駆動力を制御し、ひいては ATP 合成を制御できるインタラクティブバイオ界面を構築することを研究目的とする。

3. 研究の方法

本研究課題「マイクロ/ナノ空間の電気化学的 pH 制御技術の開発と細胞内 ATP 合成制御への応用」は、4 年で完成させる計画を立て、初年度(2019 年度)においては、我々が独自開発した pH 制御有機電極のマイクロパターニングおよび性能向上に取り組んだ。2020-2021 年度においては、マイクロ有機電極上に研究分担者が独自開発した ATP 合成酵素を含む脂質二分子膜を形成し、ナノ間隙内 pH を電気化学的に制御することで ATP 合成制御を実現させた(図 1 a「研究課題 1」)。2021-2022 年度において、楕円型マイクロ有機電極上で細胞を培養し、プロトン刺激によってマイクロスケールの細胞内機能を制御することにも成功した(図 1 b「研究課題 2」)。

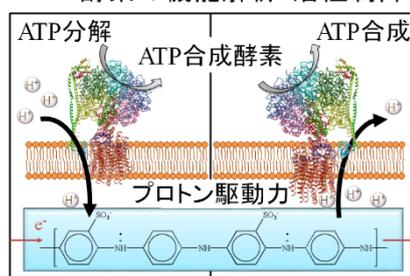
4. 研究成果

1. pH 制御有機電極のマイクロパターニングおよび性能向上

本研究では、対象が 2 次元平坦性を求める脂質二分子膜中 ATP 合成酵素(課題 1)と高い緩衝作用を有する細胞内ミトコンドリア(課題 2)と異なるため、電極形状や要求性能が変わってくる。課題 1 においては、脂質二分子膜を形成するための電極平坦性に加え、ATP 分解に伴うプロトン抽出(外から内)と ATP 合成を誘発するプロトン注入(内から外)を電気化学的に SPA 電極で制御する微小空間(ナノ間隙: SPA 電極と ATP 合成酵素包含二分子膜)・微小電流制御システムが必要となる。対して、課題 2 においては、細胞培養に用いられる 20-50 mM 緩衝液中でマイクロスケールの細胞内ミトコンドリア pH を制御するため、SPA 電極で誘発させるプロトン反応($n(H^+) = \sum I t / F$, I=プロトン電流, t=時間, F=ファラデー定数)を改善する必要がある。培養液濃度と細胞容量を鑑み、本研究では、カーボンナノチューブを電極上に修飾することで比表面積の大きな SPA 有機電極を作製し、水素イオン選択性を失うことなく pH 制御が実現し得ることを電気化学計測によって評価した。詳細は、以下の 2 および 3 に示す。

2. 電気化学式 pH 制御による細胞膜 ATP 合成酵素機能の制御

- (a) 研究課題1. 細胞膜中ATP合成
 - ✓ ナノ間隙内pH制御, 平坦性
 - ✓ 酵素の機能解析・活性制御



- (b) 研究課題2. 細胞内ミトコンドリア
 - ✓ マイクロ空間のpH制御
 - ✓ 機能解析・活性制御

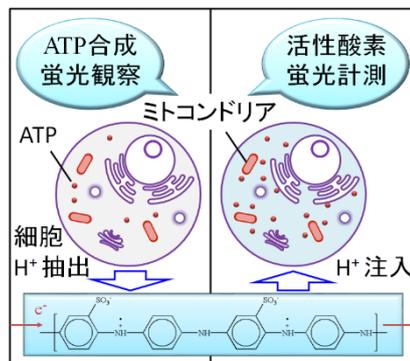


図 1. 本研究の提案課題

ここでは、ATPの加水分解によってバルク溶液中からSPA有機電極へ流れ込むプロトン流を発生させ、リン脂質膜とSPA電極のナノ間隙におけるpH計測に加え、プロトン電流を計測した。これにより膜内外におけるプロトン濃度勾配を把握し、さらに負電圧の印加によって生じるプロトン電流(プロトンの抽出)を計測することでATP合成酵素の活性を評価できる。一方、電圧を正に印加するとSPAからナノ間隙へプロトンが注入され、それに伴う膜内外のプロトン濃度勾配の発生により合成されるATP濃度を計測することで、リン脂質膜に存在するATP合成酵素機能を制御する。

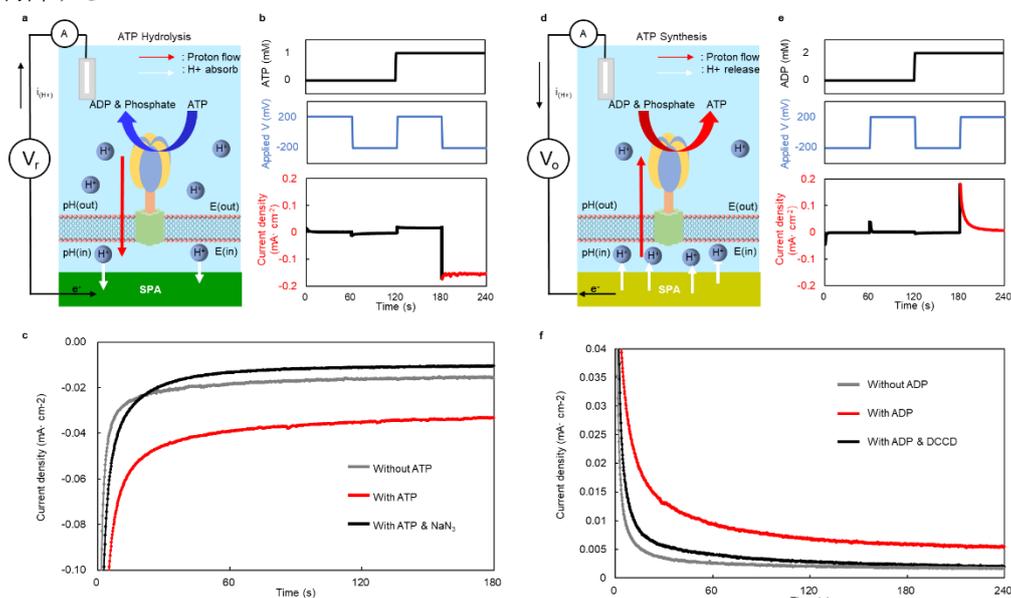


図2. ATP合成酵素の活性評価(a-c), ATP合成酵素の機能制御(d-f).
 これら成果は、以下に示す国際論文としてまとめた。
 Advanced Materials Technologies, 7, 2100729, 2022.

3. 電気化学式pH制御による細胞内ATP合成制御

ここでは、プロトン選択性を有するSPA/CNT電極を用いて細胞の機能が制御できるかを評価した。電圧印加によって、プロトン信号が細胞に届けられたことを証明するため、イオン電荷(キャパシタ容量)で細胞を刺激するためのPEDOT電極による実験も行った。実験方法としては、上述した印加電圧±0.6Vを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、SPA/CNT電極では、電圧の印加に応じて、各蛍光色素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、それに伴っ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、以下に示す国際論文としてまとめた。
 Bioelectrochemistry, 147, 108202, 2022.

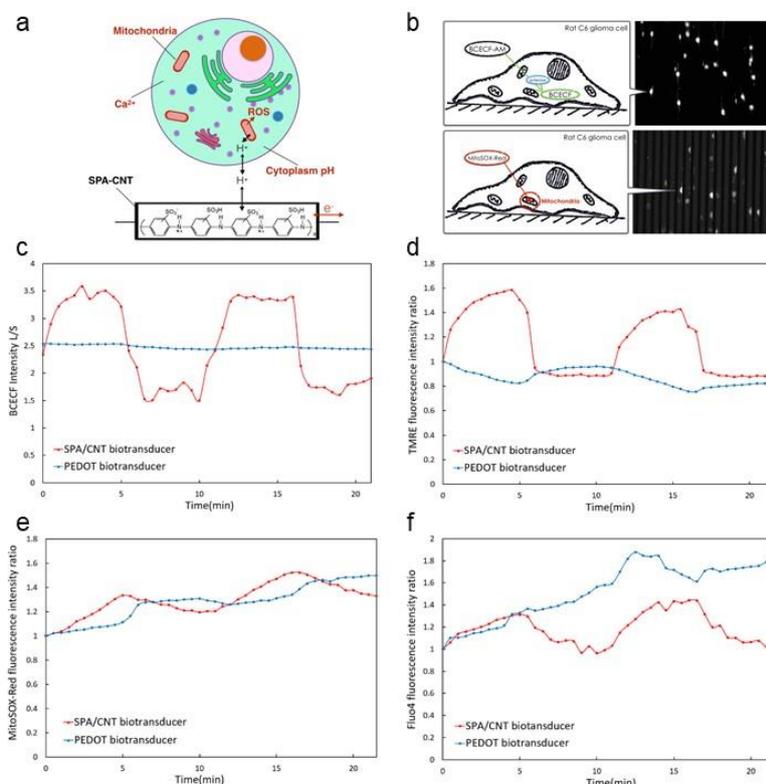


図3. SPA/CNT電極を用いた細胞機能制御(PEDOT電極による結果を含む)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Yukun Chen, Mingyin Cui, Chenliang Lin, Bingfu Liu, Noriyo Mitome, Takeo Miyake,	4. 巻 7
2. 論文標題 Enzymatic Bioluminescence Modulation with an ATP Synthase Integrated Biotransducer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Advanced Materials Technologies	6. 最初と最後の頁 2100729
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/admt.202100729	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 -

1. 著者名 Mingyin Cui, Momoka Takahashi, Yukun Chen, Bingfu Liu, Yoshihiro Ohta, Takeo Miyake	4. 巻 147
2. 論文標題 pH modulation in adhesive cells with a protonic biotransducer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioelectrochemistry	6. 最初と最後の頁 108202
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bioelechem.2022.108202	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 -

1. 著者名 Noriyo Mitome is a corresponding author, Shintaroh Kubo, Sumie Ohta, Hikaru Takashima, Yuto Shigefuji, Toru Niina, Shoji Takada is a corresponding author	4. 巻 10
2. 論文標題 Cooperation among c-subunits of FoF1-ATP synthase in rotation-coupled proton translocation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e69096
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.69096	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14件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 三宅丈雄
2. 発表標題 生体とイオン信号でつながるバイオイオントロニクス/Ion controlling biodevices for interactive communication with biology
3. 学会等名 第31回日本MRS年次大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yukun Chen , Mingyin Cui , Bingfu Liu , Noriyo Mitome, Takeo Miyake
2. 発表標題 Electrochemical control of enzyme cascade reactions with a protonic biotransducer
3. 学会等名 34th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yukun Chen, MingYin Cui, Noriyo Mitome, Takeo Miyake
2. 発表標題 Proton-mediated control of enzymatic cascade reactions by an electric biotransducer.
3. 学会等名 第82回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mingyin Cui, Yukun Chen, Bingfu Liu, Dingxiang Chen, Takeo Miyake
2. 発表標題 Intracellular pH modulation with a protonic biotransducer
3. 学会等名 第82回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三宅丈雄
2. 発表標題 生体とイオン信号でつながるバイオイオン트로ニクス
3. 学会等名 第70回高分子討論会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mingyin Cui , Bingfu Liu, Yoshihiro Ota, Takeo Miyake
2. 発表標題 pH modulation in adhesive cells with a protonic biotransducer
3. 学会等名 第81回応用物理学会 春季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 5.Hui Ma, Kazuhiro Oyama, Bowen Zhang, Takeo Miyake
2. 発表標題 High efficient macromolecule delivery into adhesive cells with metallic nanotube membranes
3. 学会等名 第81回応用物理学会 春季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三宅丈雄
2. 発表標題 生体素材とイオンでつながるバイオイオントロニクス
3. 学会等名 第30回日本MRS年次大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeo Miyake
2. 発表標題 Bioiontronic devices for interactive communication with biology
3. 学会等名 ISIPS2020（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三宅丈雄
2. 発表標題 Bioiontronic devices for interactive communication with biology
3. 学会等名 International Intellectual Property Interlligence Medical Summit & ICI Annual Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chen Yukun, Cui Mingyin, Lin Chenliang, Noriyo Mitome, Takeo Miyake
2. 発表標題 H ⁺ -mediated control of ATP synthase reaction at a biotransducer/lipid bilayer interface
3. 学会等名 第80回応用物理学会 秋季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mingyin Cui , Yukun Chen, Chenliang Lin, Takeo Miyake
2. 発表標題 H ⁺ -mediated Control of ATP Synthesis in Mitochondria with Biotrasducer
3. 学会等名 32nd International Microprocesses and Nanotechnology Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Noriyo Mitome, Shintaro Kubo, Sumie Ohta, Hikaru Takashima, Yuto Shigefuji, Toru Niina, Shoji Takada
2. 発表標題 Demonstration of coopereation among c-subunits of FoF1-ATP synhtase in rotation-coupled proton translocation by hetero-mutated c10- ring
3. 学会等名 Pacifichem2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三留規誉、久保進太郎、太田澄恵、高嶋ひかる、重藤優斗、新稲亮、高田彰二
2. 発表標題 FoF1-ATP合成酵素のプロトン輸送と共役した回転における c サブユニット間の共同性
3. 学会等名 2021年度日本生化学会大会
4. 発表年 2021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	太田 善浩 (Ohta Yoshihiro) (10223843)	東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授 (12605)	
研究分担者	三留 規誉 (Mitome Noriyo) (90431981)	常葉大学・教育学部・准教授 (33801)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------