

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：22303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05529

研究課題名(和文) アミノ酸残基をベースとした細胞のリアルタイムモニタリングシステムの開発

研究課題名(英文) Development of real time cytosensing based on amino acid residues

研究代表者

菅原 一晴 (Sugawara, Kazuharu)

前橋工科大学・工学部・教授

研究者番号：30271753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞センシングおよび細胞の挙動をリアルタイムでモニタリングする電気化学的測定システムを開発した。プローブとして細胞認識/電子伝達性ペプチドを設計し細胞培養・測定の足場としてタンパク質を用い細胞の検出を実施した。上記の素材に基づいて測定を行うために、本測定システムは高い生体適合性を有する。また、インキュベータ中で電気化学測定装置を伴った電極を設置して、外部からBluetoothを使ってPC制御する手法を提案した。結果として、細胞培養とリアルタイム計測環境とを共通化する時、細胞を分取して測定する方法と比較し、より正確な情報を細胞から取り出すことが可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題は、タンパク質を足場として電子伝達性/細胞認識機能をもち合わせたペプチドを基盤とした細胞センシングシステムである。この測定システムの特長は、生体中に存在する分子を用いておおかたは測定を行うものであり、新たな細胞センシングの切り口として位置付けられペプチドプローブや測定デバイスの作製に貢献すると考えられる。加えて、生体にやさしい測定システムであることから、医療分野および食品分析分野において、細胞等を用いた食物アレルギーのスクリーニングやがん予防・診断のための細胞のモニタリング、バイオマーカーの測定などへの幅広い展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we developed an electrochemical measurement system for cell sensing and real-time monitoring of cell behavior. Cell-recognition/electron-transfer peptides were designed as probes, and proteins were used as scaffolds for cell culture and measurement to detect cells. The measurement system is highly biocompatible because it is based on the above materials. We also proposed a method of setting up electrodes accompanied by an electrochemical measurement device in an incubator and controlling the PC externally via Bluetooth. When cell culture and real-time measurement environment are shared, more accurate information can be obtained from cells compared with the method of preparative measurement of cells.

研究分野：分析化学

キーワード：細胞センシング スクリーンプリント電極 電子伝達性ペプチド バイオマーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞センシングや細胞の挙動を解析するために、医療や食品分析分野では細胞培養機能を持ちリアルタイム測定ができるシステムの開発が重要な研究課題の一つとなっている。疾病の診断に関しては、細胞から分泌されるタンパク質や特定因子により細胞表面に発現される特有のレセプタを測定することが疾病の予防や早期発見に繋がる。そのため、正確に細胞の情報を引き出すことが求められる。さらに、抗がん剤が引き起こすガン細胞の細胞死のモニタリングにおいても薬剤の効果を評価する上でもリアルタイムでの測定が不可欠となっている。食品分析分野では、細胞を使ったアレルゲンのスクリーニングや食物成分の細胞への投与による機能性評価の簡便なツールの考案が望まれている。現在、実用化されている電気化学的細胞センシングや細胞の挙動のモニタリングするシステムは、培養中の細胞を一部分取し測定に供するものが多い。それらの測定システムは有用であるいっぽうで、細胞培養時と測定との環境が異なるため細胞の情報が正確に反映されない場合がある。それゆえ、細胞培養の足場となる素材と情報変換素子、情報転送装置を組み合わせたシステムが電気化学的細胞測定における次世代システムの一つとなる。このような機能を有するシステムとしては、特殊な微小くし型電極による流れ系での電気化学的測定や高価な抗体を用いた手法が報告されている。それに対して、疾病の診断や食品分析を実施する際に市販の測定装置を用い抗体不要でリアルタイム細胞測定ができるシステムは有用な低コストデバイスになる。

2. 研究の目的

本研究課題では、細胞センシングおよび細胞の挙動解析がリアルタイムで可能な電気化学的測定システムを構築する。その取り組みとして、タンパク質を細胞培養の足場とし、細胞認識/情報伝達部位から成るペプチドを足場に固定化する。そして、細胞インキュベータ内で細胞から引き出される情報を測定するシステムを考案する。本システムは培養中の細胞を分取し測定する方法に比べ、培養状態での細胞センシングと細胞死や細胞表面のレセプタの状態変化をより正確に把握できる。細胞に働きかける試薬としては、糖質認識レセプタ結合性擬似糖質ペプチド、分化誘導に関しては Phorbol 12-myristate 13-acetate を使用する。その電気化学的応答を得るためには、チロシン、システインから成る電子伝達性ペプチドに基づくプローブを用いる。このように細胞培養・細胞認識・アミノ酸残基で統一して細胞培養環境を担保する。そして、PCと測定装置とを Bluetooth によりケーブルレス接続することで細胞をインキュベータから取り出すことなく測定を可能にする。以上の条件を満たす細胞センシングシステムを作り上げることを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

研究課題を遂行するためには、「電極・培養容器・測定用セル、小型化電気化学的測定装置などのパーツを組み合わせるハードの考案」、「細胞培養環境となるタンパク質・ペプチドおよび細胞認識、電子伝達性、電極触媒ペプチドのアミノ酸配列の検討/改良」を実現する。電極・細胞培養容器・測定用セルにおいて使用する電極としては、グラッシーカーボンプレート、光透過性金薄膜被覆(Au thin-layer)スクリーン印刷基板を選択した。細胞培養容器は、二つのテフロンブロックから成る電気化学的測定用セルであり細胞培養の機能をもたせることが特長である。一方のブロックはセルの中央部に6 mm前後の穴をあけて、電極にO-リングをのせ、もう一方のブロックの間に電極をはさみ、ネジを介して締め固定化した。測定に必要とされる溶液量は50 μ L程度であり、少量のサンプルといえる。実際の測定では、細胞培養インキュベータ中で測定セルと小型化電気化学的測定装置を配置し電極と接続する。その際、PCをインキュベータ外に設置しBluetooth接続することでケーブルレス制御とリアルタイム測定を可能とする。加えて、測定システム全体がコンパクトであるため、インキュベータ内には複数の測定装置を設置することもできる。電気化学的測定に関しては細胞内へのペプチドの取り込みに基づく電流値変化を測定するボルタンメトリー、細胞の状態変化を交流抵抗値の変化を測定するインピーダンス測定を実施する。一方、細胞培養終了後に細胞の形状を顕微鏡観察ができるようにテフロンブロックの上下に穴をあけ光透過性電極表面を観察することとした。細胞培養環境となるタンパク質・ペプチドおよび細胞認識、電子伝達性、電極触媒ペプチドのアミノ酸配列の検討/改良については、細胞培養環境となる足場の作製にタンパク質を修飾したグラッシーカーボン電極、光透過性金電極においてペプチドの両末端にシステイン残基を導入することで足場となる金表面にペプチドを固定化する。測定には電子伝達性ペプチドのアミノ酸配列が重要であり、検出感度の向上の検討と改良を行う。

4. 研究成果

(1) 最初に、細胞認識/電子伝達性/ペプチド固定化用架橋剤機能を有するペプチド修飾コラーゲン膜被覆電極によりターゲット細胞の電気化学的センシングを実施した。細胞認識ペプチドは、骨髓起源のペプチドでありヒト白血病細胞株(K562細胞)のレセプタと相互作用して分化を

もたらず。電子伝達性ペプチドは電極活性物質から電極への電子移動アクセシビリティを改善し、コラーゲン膜に固定化する架橋剤としてオリゴアラニンを用いた。電気化学的マーカージオンの酸化還元応答をコラーゲン膜のみで被覆した電極と細胞認識/電子伝達性ペプチド/コラーゲン被覆膜電極とで比較したところ、ペプチド修飾電極でマーカージオンの可逆性と電流値が改善された。数十個/mL の K562 細胞を添加した場合、細胞認識ペプチドとの結合により電子移動アクセシビリティが抑制され電流値が減少した。それに対して、電子伝達ペプチド修飾コラーゲン膜被覆電極では細胞が共存しても電流値の変化は認められなかった。また、オリゴアラニンを導入した際、ペプチドと細胞との結合が容易となり細胞の検出感度は向上した。この現象に基づいて電気化学インピーダンス分光法測定では電子移動抵抗の変化が明瞭となるため K562 細胞をセンシングができることを見出した。

(2) ヒト急性単球性白血病由来細胞 (THP-1 細胞) においては単球走化性タンパク (MCP-1) を構成する幾つかの特定のペプチド配列を選択した。それらのペプチドに電子伝達性ペプチドを導入し電子移動抵抗を測定した。その際には、二酸化炭素インキュベータに測定セルを設置して、リアルタイムで計測した。ターゲット細胞とペプチド配列に依存する結合力は Fox らが報告 (J. Med. Chem. 2002, 45, 360 - 370) した結果と同様な傾向がみられている。測定手法で用いられたペプチドとコラーゲンはアミノ酸残基から成っており環境負荷が小さく生体適合性の高いシステムとなっている。

(3) 細胞認識/電子伝達性ペプチドをコラーゲン膜に修飾した電極によるターゲット細胞のセンシングを進めている。ターゲット細胞である THP-1 細胞に選択性を有する細胞認識ペプチドである EICADPKQKWWQYYYYC を用い、細胞培地にリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を加えリアルタイムで細胞をモニタリングするため可能性を評価した。RPMI-1640 培地と PBS との混合比をかえることで細胞が生存し電気化学的測定が可能な比率に関する知見を得ることができた。加えて、その比率を変えることで細胞の増殖をコントロールすることが可能であり、ターゲット細胞数を測定できることを明確にした。

(4) がん細胞を検出するために、光学的に透明でペプチドプローブを修飾したスクリーン印刷金電極を設計した。循環腫瘍細胞 (CTC) を感知し、血管内での動きをモニターする能力は、がん診断に重要である。CTC のモデルとして、その起源から THP-1 細胞を選択した。THP-1 細胞をセンシングするために電子伝達性/細胞認識/電子伝達性ペプチドをスクリーン印刷電極上に自己集積膜として修飾したデバイスを考案した。そのペプチド配列は N-、C-末端にシステイン残基を導入した CYYYY/EICADP/YYYYC であった。これは上記に述べた高い細胞認識機能を示した THP-1 細胞認識ペプチドである EICADPKQKWWQ の EICADP に注目し合成したものであった。比較対象として EICADPYYYYC のスクリーン印刷電極への固定化を行い、1 個のシステイン形態の残基を介して自己組織化された単分子膜を作製した。その結果、両末端のシステイン残基により、CY₄EICADPYYYYC の細胞認識部位がブリッジ型構造で修飾された。CYYYY/EICADP/YYYYC はこの 2 つの YYYYYC 部位をもつため、EICADPYYYYC より細胞センシングのための性能が優れていた。CYYYY/EICADP/YYYYC を用いた検量線は、25 ~ 2,000 個/mL の範囲で直線的であり、LOD は 8 個/mL であった。THP-1 とペプチドとの選択性を確認するために、K562 細胞を 2,000 cells/mL の濃度で CYYYY/EICADP/YYYYC 修飾電極と反応させたところ、ペプチドに基づく電極応答の変化は認められなかった。また、ネガティブコントロールとして K562 細胞を認識するペプチド配列である CYYYY/FRPRIMTP/YYYYC 固定化電極に関しても THP-1 細胞による電極応答の変化は生じなかった。それゆえ、提案した電極は新たなサイトセンシングを可能とするデバイスとなる。

(4) 電気化学的サイトセンシングを簡便で迅速に達成するために、グルコース認識タンパク質である小麦由来レクチン (Wheat germ agglutinin) とマンノースおよびグルコースと選択的に結合するタチナタマメ由来レクチン (Concanavalin A) に His-tag ペプチドに電子伝達性ペプチド (HHHHHHYYYYC) を導入したタンパク質プローブを合成した。ヒト組織球形リンパ腫由来細胞 (U937 細胞) と THP-1 細胞ターゲット細胞としたところ各細胞表面に存在するグルコース残基またはマンノース残基と先のプローブが選択的に相互作用することがわかった。それゆえ、プローブに結合した際に電子伝達性ペプチドの電極応答の変化を利用することでターゲット細胞のセンシングが達成された。

(5) 細胞培地である RPMI-1640 (L-グルタミン、フェノールレッド含有) とリン酸緩衝液を混合し 24 時間から 72 時間培養した。この培養時間において、一定の混合溶媒では THP-1 細胞の増殖や死滅が見かけ上、ほとんど起こらない比率を見出した。その確認にあたってペプチド修飾電極により電気化学的マーカージオンのインピーダンス測定により 100 - 1,000 cells/mL の細胞を加えた場合において細胞数を見積もったところ、細胞数の値が変化しないことから上記の判断をした。一方で、この溶媒比を選択し細胞分化剤として知られる Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を共存させ THP-1 細胞の様子を観察したところ 15% 程度の分化が認められた。加え

て、細胞培地に対してリン酸緩衝液の比率を大きくすると分化の割合は低下し、72 時間以内に THP-1 細胞の死滅が起こることも明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Ishizaki Sora, Kuramitz Hideki, Sugawara Kazuharu	4. 巻 34
2. 論文標題 Voltammetric Sensing of Soybean Agglutinin Using an Electrode Modified with Electron transfer, Carbohydrate mimetic/Cross linker peptide collagen Film	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Electroanalysis	6. 最初と最後の頁 464 ~ 473
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/elan.202100380	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 Sugawara Kazuharu, Ishizaki Sora, Kikuchi Soya, Kuramitz Hideki, Kadoya Toshihiko	4. 巻 33
2. 論文標題 Construction of Protein Probe with a His tag and an Electron transfer Peptide for a Target Protein Sensing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Electroanalysis	6. 最初と最後の頁 975 ~ 986
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/elan.202060338	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 Kazuharu Sugawara, Sora Ishizaki, Hideki Kuramitz, Toshihiko Kadoya	4. 巻 32
2. 論文標題 Electrochemical Sensing of Ovalbumin Based on the Interaction between Lysozyme Origin/Tyrosine rich Peptides Modified on Magnetic Beads and Oligothreonine/Ovalbumin origin Peptide	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Electroanalysis	6. 最初と最後の頁 207 ~ 216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/elan.201900336	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 Kazuharu Sugawara, Sora Ishizaki, Keito Kodaira Hideki Kuramitz, Toshihiko Kadoya	4. 巻 In press
2. 論文標題 Fabrication of a cell-recognition/electron-transfer/cross-linker, peptide-immobilized electrode for the sensing of K562 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.aca.2020.03.048	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20件(うち招待講演 0件/うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Kenta Takebayashi, Sora Ishizaki, Keito Kodaira, Kazuharu Sugawara
2. 発表標題 Construction of a sensor for soybean agglutinin using electron-transfer carbohydrate-mimetic peptide/collagen film-modified electrode
3. 学会等名 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuharu Sugawara, Hideki Kuramitz, Toshihiko Kadoya
2. 発表標題 Electrochemical sensing of galactose recognition protein using probe protein with His-tag and an electron transfer peptide
3. 学会等名 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toshitake Kawai, Takuma Matsuura, Rui Kitai, Kazuto Sazawa, Takuya Okazaki, Akira Taguchi, Kazuharu Sugawara, Hideki Kuramitz
2. 発表標題 Development of fiber optic sensor based on electrochemical-surface plasmon resonance (EC-SPR) using Au plated colloidal gold modified-optical fiber
3. 学会等名 RSC Tokyo International Conference 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Rui Kitai, Toshitake Kawai, Kazuto Sazawa, Kazuharu Sugawara, Hideki Kuramitz
2. 発表標題 Development of fluorescence electrochemical analysis based on hydrodynamic voltammetry in a micro-droplet using rotating disk electrode
3. 学会等名 RSC Tokyo International Conference 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keito Kodaira, Toshihiko Kadoya, Hideki Kuramitz, Kazuharu Sugawara
2. 発表標題 Construction of cell recognition-electron transfer peptides for electrochemical impedance spectrometric sensing of target cells
3. 学会等名 RSC Tokyo International Conference 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小平 景人、門屋 利彦 ² 、倉光 英樹、菅原 一晴
2. 発表標題 急性単球性白血病由来細胞検出のためのペプチド-スクリーンプリント電極の構築
3. 学会等名 日本分析化学会7第70年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松浦 匠真、花森 慎之介、岡崎 琢也、佐澤 和人、田口 明、菅原 一晴、倉光 英樹
2. 発表標題 電気化学 - 局在表面プラズモン共鳴を利用したニードル型光ファイバーセンサーの開発
3. 学会等名 日本分析化学会7第70年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹林健太、小平景人、石崎空、倉光英樹、門屋利彦、菅原一晴
2. 発表標題 核酸/ペプチドダブルアプタマーによるボルタメトリーのサイトセンシング
3. 学会等名 第81回分析化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keito Kodaira , Sora Ishizaki , Hideki Kuramitz, Toshihiko Kadoya, Kazuharu Sugawara
2. 発表標題 Development of sensing system of K562 cells using an electrode with a cell-recognition/electron-transfer/cross-linker, peptide
3. 学会等名 RSC Tokyo International Conference 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石崎空、小平 景人、倉光 英樹、門屋 利彦、菅原 一晴
2. 発表標題 ガラクトース擬似糖鎖電子伝達性ペプチド固定化電極を用いた血清中におけるガレクチンの微量分析
3. 学会等名 日本分析化学会第69 年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小平 景人、石崎 空、竹林 健太、倉光 英樹、門屋利彦、菅原一晴
2. 発表標題 ペプチド修飾電極によるヒト急性単球性白血病由来細胞のセンシング法の開発
3. 学会等名 日本分析化学会第69 年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石崎 空、小平 景人、冬木 裕人、門屋 利彦、倉光 英樹、菅原 一晴
2. 発表標題 ガラクトース認識タンパク質検出のための電気化学的センサの構築
3. 学会等名 第80回分析化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小平 景人、石崎 空、門屋 利彦、倉光 英樹、菅原 一晴
2. 発表標題 細胞認識-電子伝達性ペプチドを用いたインピーダンス測定によるターゲット細胞の検出
3. 学会等名 第80回分析化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松浦 匠真、岡崎 琢也、佐澤 和人、波多 宣子、田口 明、菅原 一晴、倉光 英樹
2. 発表標題 局在表面プラズモン共鳴を利用したプローブ型電気化学-光ファイバーセンサーの開発
3. 学会等名 第80回分析化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松浦 匠真、岡崎 琢也、佐澤 和人、波多 宣子、田口 明、菅原 一晴、倉光 英樹
2. 発表標題 局在表面プラズモン共鳴を利用したプローブ型電気化学-光ファイバーセンサーの開発
3. 学会等名 日本化学会2019年度 北陸地区講演会と研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuharu Sugawara, Sora Ishizaki, oshihiko Kadoya, ideki Kuramitz
2. 発表標題 Development of electrochemical ovalbumin sensing system using the interaction between oligothreonine/ovalbumin-origin peptide and lysozyme origin/tyrosine-rich peptides modified on magnetic beads
3. 学会等名 RSC Tokyo International Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐澤 和人、波多 宣子、田口 明、菅原 一晴、倉光 英樹
2. 発表標題 ITOを被覆した光ファイバーによる金属イオンの分光電気化学センシング
3. 学会等名 日本分析化学会第68年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅原 一晴、石崎 空、倉光 英樹、門屋 利彦
2. 発表標題 ターゲット細胞センシングのための細胞認識/電子伝達性ペプチド固定化電極の構築
3. 学会等名 日本分析化学会第68年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石崎 空、倉光 英樹、門屋 利彦、菅原 一晴
2. 発表標題 擬似糖鎖/電子伝達性ペプチドと大豆由来レクチン間の相互作用の電気化学的評価
3. 学会等名 日本分析化学会第68年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石崎 空、倉光 英樹、門屋 利彦、菅原 一晴
2. 発表標題 ペプチド-コラーゲン膜固定化電極による大豆由来タンパク質を検出するセンサの開発
3. 学会等名 日本分析化学会 第79回分析化学討論会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

前橋工科大学 菅原一晴
<https://www.acoffice.jp/mi thp/KgApp?resId=S000037>
Kazuharu Sugawara

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------