

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：13102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K15418

研究課題名（和文）生体ナノポアプローブを用いた細胞観察プラットフォームの開発

研究課題名（英文）Cell observation platform using biological nanopore probes

研究代表者

庄司 観（Shoji, Kan）

長岡技術科学大学・技学研究院・准教授

研究者番号：80788258

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、生体ナノポアプローブを用いた細胞分泌物質計測の実現を目指し、局所分子検出が可能な生体ナノポアプローブの開発および走査型イオンコンダクタンス顕微鏡を用いた位置制御による局所分子検出実験を行った。その結果、先端径がナノメートルスケールの生体ナノポアプローブを開発することに成功し、生体分子のイメージングに成功した。さらに、合成DNAナノポアを金ニードル電極に修飾したDNAナノポアプローブを開発することで、DNAナノポアを用いた局所ナノポアセンシングの可能性を示すことができた。これらの成果をナノテクノロジー分野において著名な学術雑誌であるACS Nano誌等に発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、プローブ型の人工細胞膜システムを開発することで、これまで均一なバルク溶液中にのみ応用されてきたナノポアセンシングによる分子検出を局所的な分子検出に応用し、ナノポアセンシングによる局所分子検出の特性について検証した点である。一方、社会的意義は、本研究結果により細胞分泌物質のリアルタイム計測が可能となることで、細胞分泌が寄与する様々な疾患のメカニズム解明や創薬に寄与できることである。今後、本技術を発展させ細胞分泌物質計測の実現を目指す。

研究成果の概要（英文）：In this project, in order to realize the measurement of chemicals released from living cells, we developed biological nanopore probes that can detect local chemicals and demonstrated to detect biological chemicals with the biological nanopore probes by controlling the position of the probe with scanning ion conductance microscopy. As a result, we successfully developed the nanopore probe with nanometer scale tip size and mapped biological molecules using the probe. In addition, we developed a DNA nanopore probe that synthetic DNA nanopores are modified on a gold needle electrode and successfully offered the potential of spatially-resolved chemical detection using the DNA nanopores. These results were published in several journals including ACS Nano in the ACS.

研究分野：ナノマイクロシステム

キーワード：ナノポア 走査型イオンコンダクタンス顕微鏡 構造DNAナノテクノロジー 脂質二分子膜 生体ナノポアプローブ

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

細胞の代謝機能により放出されるペプチド・タンパク質、ホルモン、miRNA やエクソソームなどの細胞分泌物質は、各細胞間の情報伝達機能を持ち、複数種類の細胞が相互作用することにより細胞集団としてのふるまいを決定、高度な器官を構築している。さらに、分泌機能の異常が様々な疾患の原因であること、ガンなどの疾患により体内に放出される miRNA の濃度が変化することなどが知られており、細胞分泌物質をリアルタイムで計測し細胞代謝メカニズムを解明することが、細胞生物学、創薬化学、分析化学など様々な分野において重要となっている。細胞集団における細胞分泌物質を計測する方法として、Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay や Cytometric Bead Array、Polymerase Chain Reaction などが用いられてきたが、空間・時間分解能が低く時空間的に単一細胞レベルでの計測は困難であった。一方、単一細胞レベルの細胞分泌物質を計測する方法として、単一細胞を封入したマイクロドロプレット中の溶液を採取し質量分析装置で網羅的に計測する技術が開発されている。しかしながら、リアルタイムでの計測が困難であること、細胞集団における単一細胞の計測が困難であることなどの問題点が存在する。そのため、上記の細胞分泌物質計測手法では、時間経過とともに変化するヘテロジニアスな細胞集団における単一細胞の分泌物質をリアルタイムで計測し、また、細胞集団における分泌物質と比較検討することによって細胞集団における単一細胞のふるまいを観察することは困難であった。

一方で、DNA や RNA、タンパク質などの生体分子を一分子レベルで検出可能なナノポアセンシングが盛んに研究されている。ナノポアセンシングとは、ナノメートルスケールの細孔を流れるイオン電流を計測し、標的分子が細孔を通過する際に発生するブロック電流を解析することで通過した分子を検出する手法で、高時間分解能・高 SN 比で一分子を計測可能という特徴を有している。特に、ポア形成膜タンパク質を用いたナノポアセンシングでは、DNA や RNA、タンパク質などの生体分子を一分子レベルで検出・分析することが可能であり、病気診断や DNA シークエンスなどに応用され新たなバイオセンサとして注目されている。そこで、細胞近傍でナノポアセンシングを行い細胞から放出される細胞分泌物質を直接一分子レベルで計測することができれば、細胞分泌物質をリアルタイムで計測可能な技術として様々な分野において有益なツールとなると考えた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、局所的な分子をナノポアセンシングによって検出可能な探針状のナノポアセンサ(生体ナノポアプローブ)を開発することで、新たな細胞分泌物質検出手法を確立することを目的とする。さらに、本生体ナノポアプローブのナノメートルスケールの位置制御を可能とする走査型プローブ顕微鏡の開発することで局所的な細胞分泌物質の計測を実現し、マイクロ流体デバイスを用いたナノポアセンシングプラットフォームを開発することでマイクロ液滴内に包まれた単一細胞の細胞分泌物質計測を実現する。

3. 研究の方法

上記の研究目的を達成するために、以下の方法により研究を実施した。

- (1) 安定したイオン電流計測が可能な生体ナノポアプローブの開発
従来研究において申請者が開発した生体ナノポアプローブでは金ナノニードル電極を使用していたため電極表面の電気二重層の充電によりイオン電流が減衰するという課題が存在した。そこで本研究では、銀塩化銀マイクロ電極を用いた生体ナノポアプローブおよびゲル充填ナノピペットを用いた生体ナノポアプローブを開発した。
- (2) 生体ナノポアプローブを用いた走査型イオンコンダクタンス顕微鏡の構築
生体ナノポアプローブの位置制御をナノメートルスケールで実施するために、生体ナノポアプローブを用いた走査型イオンコンダクタンス顕微鏡を構築した。
- (3) 合成 DNA ナノポアを用いた DNA ナノポアプローブの開発
ナノポアセンシングにより選択的な分子検出を実現するためには、ポアサイズの最適化やポアの機能化が必要不可欠である。そこで本研究では、構造 DNA ナノテクノロジー技術を用いて構築した合成 DNA ナノポアをプローブ先端に固定化した DNA ナノポアプローブを開発した。

4. 研究成果

- (1) 安定したイオン電流計測が可能な生体ナノポアプローブの開発
 - 銀塩化銀マイクロ電極を用いた生体ナノポアプローブ
従来研究にて開発した金ニードル電極を用いた生体ナノポアプローブでは、電極表面の電気二重層のチャージアップによるイオン電流の減衰が発生するという課題が存在した。そこで本

研究では参照電極として使用される銀塩化銀マイクロ電極を用いた生体ナノポアプローブの開発を試みた(図1a)。銀塩化銀マイクロ電極をイオン電流計測が可能な生体ナノポアプローブとして使用するためには、電解質溶液を保持する微小空間後電極先端に構築する必要がある。そこで本研究では、ガラス管にマイクロ銀ワイヤが封入された銀マイクロ電極を作製後、ウェットエッチングにより銀線を除去することで電極先端に微小空間が構築されたマイクロ電極を作製した。一方、微小空間サイズは、脂質二分子膜形成の歩留まりおよびイオン濃度変化による電流減衰に影響することが考えられるため、本研究では、微小空間サイズが異なるマイクロ電極を作製し、イオン電流の減衰に関してチャンネル電流計測により評価した(図1b)。

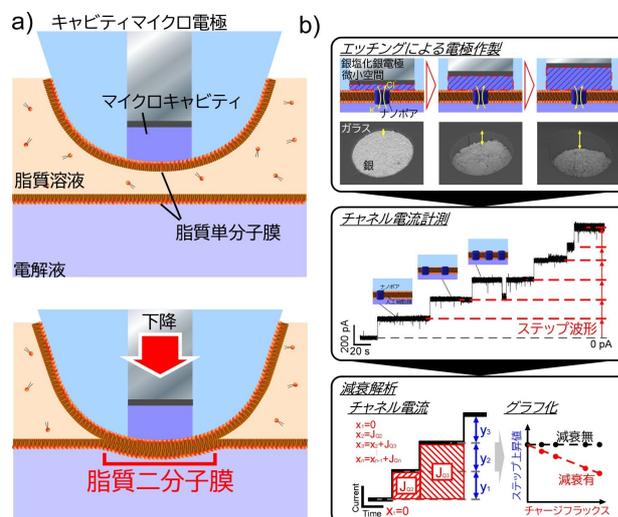


図1 a) 銀塩化銀マイクロ電極を用いた脂質二分子膜の形成 b) 微小空間サイズに対するイオン電流の減衰評価。

その結果、微小空間の体積を 300 pL 以上とすることでイオン電流の減衰を低減することが可能であることが分かった。さらに、本マイクロ電極を用いたナノポアセンシング実験にも成功しており本生体ナノポアプローブを用いた局所分子検出の可能性を示すことができた。

● ハイドロゲル充填ガラスナノピペットを用いた生体ナノポアプローブの開発

上記、銀塩化銀マイクロ電極を用いた生体ナノポアプローブはプローブ先端径が約 100 μm 程度と細胞に対して大きいため、ハイドロゲル充填ガラスナノピペットを用いた生体ナノポアプローブを開発することで、ナノメートルスケールの空間分解能を有する生体ナノポアプローブの開発を試みた。具体的には、マイクロピペットプレーを用いて先端外径が約 800 nm、内径が約 500 nm 程度のガラスナノピペットを作製し、熱可塑性のアガロースゲルもしくは光硬化性の PEGDMA ゲル溶液を充填し硬化させることで作製した。その後、本ナノピペットを電解溶液と脂質溶液が層となった浴溶液に挿入することでピペット先端に脂質二分子膜を形成した(図2a)。その後、電解質溶液にポア形成膜タンパク質を加えイオン電流計測を実施した結果、どちらのプローブにおいてもポア形成膜タンパク質が脂質二分子膜に再構築したことによる電流上昇を確認することができた(図2b, c)。

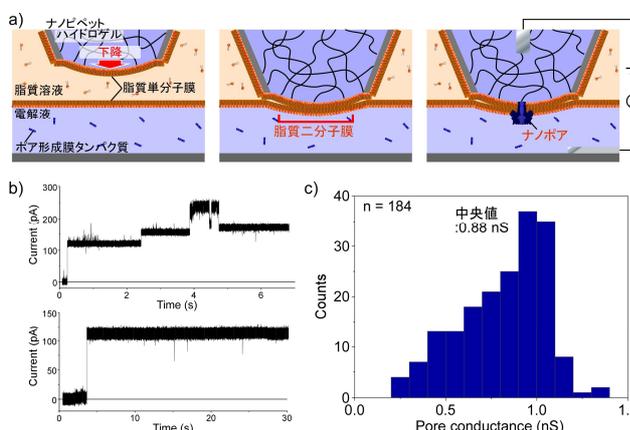


図2 a) ゲル充填ナノピペットを用いた脂質二分子膜の形成 b) ポア形成膜タンパク質の再構築によるイオン電流上昇 c) ポアコンダクタンスのヒストグラム。

(2) 生体ナノポアプローブを用いた走査型イオンコンダクタンス顕微鏡の構築

上記のように、ゲル充填ナノピペットを用いた生体ナノポアプローブの開発に成功したので、自作の走査型イオンコンダクタンス顕微鏡(SICM)にゲル充填ナノピペットを搭載し、マイクロメートルスケールの細孔から拡散によって放出される一本鎖DNAの検出実験を実施した(図3)。実験手順を以下に示す。まず、細孔とプローブ位置のキャリブレーションを行うために、ナノピペットのアプローチカー

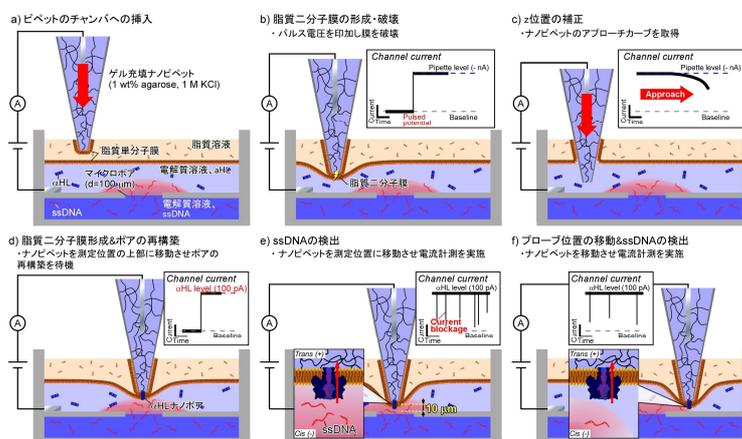


図3 生体ナノポアプローブを用いた局所分子検出実験の手順

ブを取得した(図 3a-c)。アプローチカーブとは、ピペット-試料間の距離に対するイオン電流変化を取得したものであり、ピペットサイズおよびピペットの抵抗値から概算される理論値と比較することでピペット-試料間の距離を計測することができる。具体的には、パルス電圧を印加することでピペット先端に形成された脂質二分子膜を割った後に、イオン電流を計測しながらz軸ピエゾステージによりピペットを降下させることで取得した。ピペット位置のキャリブレーション後、プローブを上下動させることで再度脂質二分子膜を形成し、ポア形成膜タンパク質が再構築されるのを待機した(図 3d)。ナノポア構築後、プローブを測定位置に移動させることで分子検出を行った(図 3e,f)。

その結果、各測定位置において異なる阻害頻度が確認され、阻害頻度と DNA 濃度の検量線より DNA 濃度を計算した結果、細孔から離れるにつれて DNA 濃度が低下していることが分かった(図 4)。本システムにおける DNA 濃度を有限要素法シミュレーションにより計算した結果、実験結果と同様に細孔から離れるにつれて濃度が低下することが確認でき、生体ナノポアプローブを用いた局所分子検出システムによって、局所的な DNA 濃度が計測できたと考えられる。

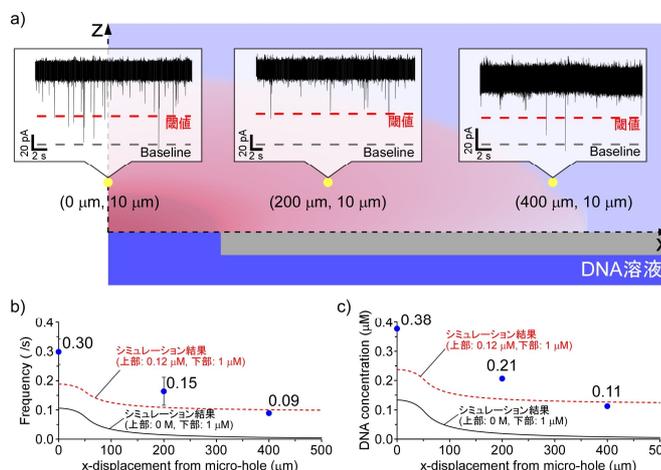


図 4 a) 各計測位置で得られたチャネル電流シグナル b) 阻害頻度 c) 得られた阻害頻度から計算した DNA 濃度。

(3) 合成 DNA ナノポアを用いた DNA ナノポアプローブの開発

構造 DNA ナノテクノロジー技術によって構築される合成 DNA ナノポアは、デザイン性が高く機能化が可能であるため、ポア形成膜タンパク質を用いた生体ナノポアの代替となるナノポアとして期待されている。しかしながら、脂質二分子膜への挿入効率が低く、また、膜挿入のために必要不可欠である疎水性分子修飾が構造体の凝集を引き起こすため構造体の形成効率が低いことが課題であった。そこで、DNA ナノポアを修飾した金ニードル電極の表面に脂質二分子膜を形成することができれば、DNA ナノポアを物理的に脂質二分子膜に挿入できるのではないかと考えた。そこで本研究では、金-チオール結合によって金ニードル電極に結合可能な DNA ナノポア構造体を新たに設計し、DNA ナノポア修飾金電極を用いて脂質二分子膜形成実験を行った(図 5)。

その結果、脂質二分子膜形成直後にステップ状の電流上昇シグナルが確認された(図 6a)。また、得られた電流上昇シグナルからポアのコンダクタンスを計算した結果、DNA ナノポアのサイズから計算される理論コンダクタンス値と同等のコンダクタンスピークを得ることができた(図 6b)。さらに本システムでは、DNA ナノポアの疎水修飾が不要であることが実験的に証明され、従来研究の課題であった、疎水分子修飾による構造体の凝集を防ぐことに成功した。

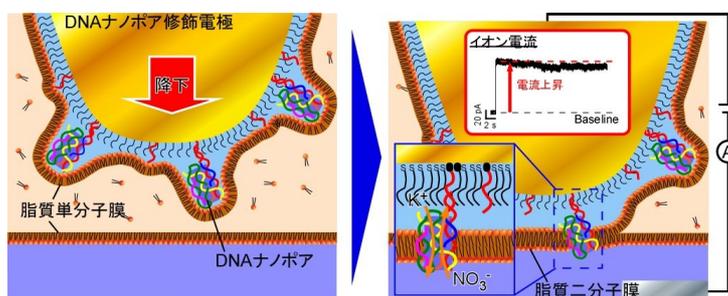


図 5 DNA ナノポア修飾電極を用いた脂質二分子膜形成

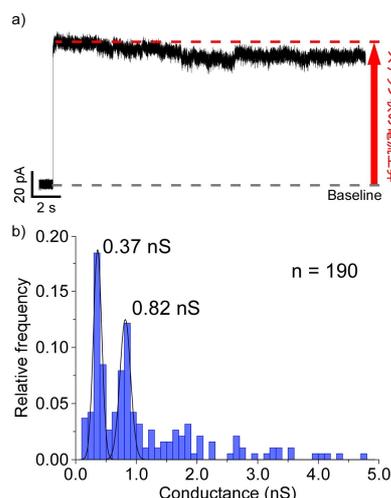


図 6 a) DNA ナノポアのイオン電流 b) ポアコンダクタンスのヒストグラム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yoshihara Ryo, Nomi Shuta, Shoji Kan	4. 巻 5
2. 論文標題 Nanopore Probes Using Hydrogel-Filled Nanopipettes as Sensors for Chemical Imaging	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Applied Nano Materials	6. 最初と最後の頁 15808 ~ 15816
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsnm.2c03947	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 Ikarashi Shogo, Akai Hiromu, Koiwa Hiroki, Izawa Yukihiro, Takahashi Jun, Mabuchi Takuya, Shoji Kan	4. 巻 17
2. 論文標題 DNA Nanopore-Tethered Gold Needle Electrodes for Channel Current Recording	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ACS Nano	6. 最初と最後の頁 10598 ~ 10607
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsnano.3c01565	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 Hasegawa Naru, Shoji Kan	4. 巻 147
2. 論文標題 Microcavity volume control on a tip of Ag/AgCl electrodes for stable channel current measurements of biological nanopores	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Analyst	6. 最初と最後の頁 1191 ~ 1198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D2AN00014H	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 Shoji Kan, Kawano Ryuji, White Ryan J.	4. 巻 92
2. 論文標題 Recessed Ag/AgCl Microelectrode-Supported Lipid Bilayer for Nanopore Sensing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 10856 ~ 10862
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.0c02720	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 該当する

1. 著者名 Shoji Kan, Kawano Ryuji, White Ryan J.	4. 巻 36
2. 論文標題 Analysis of Membrane Protein Deinsertion-Associated Currents with Nanoneedle-Supported Bilayers to Discover Pore Formation Mechanisms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 10012 ~ 10021
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.0c00833	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 該当する

1. 著者名 Shoji Kan, Kawano Ryuji	4. 巻 11
2. 論文標題 Recent Advances in Liposome-Based Molecular Robots	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 788 ~ 788
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/mi11090788	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kan Shoji, Ryuji Kawano	4. 巻 19
2. 論文標題 Osmotic-engine-driven liposomes in microfluidic channels	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Lab on a Chip	6. 最初と最後の頁 3472-3480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9LC00788A	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 Masaki Matsushita, Kan Shoji, Natsumi Takai, Ryuji Kawano	4. 巻 124
2. 論文標題 Biological Nanopore Probe: Probing of Viscous Solutions in a Confined Nanospace	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 2410-2416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.9b11096	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26件(うち招待講演 6件/うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Kan Shoji
2. 発表標題 Artificial Cell Membrane Systems Leading to a Cell-Machine Interface
3. 学会等名 32nd 2021 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiromu Akai, Kan Shoji
2. 発表標題 Development of molecule-gated DNA nanopore for biomolecular measurement
3. 学会等名 International Workshop on Molecular Cybernetics (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryo Yoshihara, Kan Shoji
2. 発表標題 Biological Nanopore Probe for SICM Applications
3. 学会等名 The 25th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shoji Kan
2. 発表標題 Biological Nanopore Probes for Spatially Resolved Nanopore Sensing
3. 学会等名 2020 Nanopore Electrochemistry Meeting (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Kan Shoji (Editor: Charles G. Cranfield)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 10
3. 書名 De-Insertion Current Analysis of Pore-Forming Peptides and Proteins Using Gold Electrode-Supported Lipid Bilayer	

1. 著者名 Yasuga Hiroki, Shoji Kan, Kawano Ryuji (Editor: Katz Evgeny)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 WILEY VCH GmbH	5. 総ページ数 17
3. 書名 Chapter 17, Nanopore Decoding for DNA Computing (DNA- and RNA-Based Computing Systems)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>マイクロ電極を用いた簡易ナノポアセンサーの開発 https://www.nagaokaut.ac.jp/kenkyu/research/research/r2/research-news-200803.html 脂質二分子膜の引き剥がしによる膜タンパク質のポア形成メカニズムの解析 https://www.nagaokaut.ac.jp/kenkyu/research/research/r2/research-news-200911.html DNAナノポアの高効率膜挿入手法の開発 https://www.nagaokaut.ac.jp/shincyaku/202305/30.html</p>
--

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