

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20750068

研究課題名（和文）細胞膜動態を解析するための新規機能性マイクロ電極の開発

研究課題名（英文）Development of functional microelectrode for evaluation of cell membrane function

研究代表者

平野 悠（HIRANO YU）

独立行政法人産業技術総合研究所・ゲノムファクトリー研究部門・研究員

研究者番号：70415735

研究成果の概要（和文）：

走査型電気化学顕微鏡(SECM)は、マイクロ電極をプローブとすることで生きている細胞を評価することができる。本研究では、細胞膜の状態を評価するための機能性マイクロ電極および、一細胞を長時間、連続観察可能な SECM システムの開発を行った。開発したシステムでは、細胞を対象に 3 分間隔で 24 時間以上の連続した観察が可能となり、低温下における細胞高さの経時変化を測定できた。

研究成果の概要（英文）：

We constructed a functional microelectrode and a fully automated time-lapse scanning electrochemical microscopy (SECM) system to monitor a topographic change of single cell. This SECM system allowed us to observe the single cellular response by long-term automatic scanning and will be applicable for analysis to other cellular activities and topographies.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：電気化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：電気化学、走査型電気化学顕微鏡、SECM、一細胞分析、走査型プローブ顕微鏡、マイクロ電極

## 1. 研究開始当初の背景

走査型電気化学顕微鏡(SECM)は微小な電極(マイクロ電極)をプローブとし、試料表面に接近させて2次元的に走査することによって表面の局所領域における電気化学反応を

検出・誘起することが可能なシステムである。これは走査型トンネル顕微鏡(STM)や原子間力顕微鏡(AFM)など、他の走査型プローブ顕微鏡には無い特長であることから、その用途を拡大しつつある。

細胞工学、再生医療や細胞を利用した薬剤スクリーニング技術の発展に伴って、細胞を評価する技術の開発が求められている。従来の方法では、多数の細胞を対象として測定するため細胞動態の解析は困難であった。SECMを利用すると、細胞近傍の酸素、神経伝達物質等の測定や、電子メディエータを利用した細胞内酵素活性と形状の評価が可能となる。しかしながら、単一細胞が消費や放出する分子は極めて微量であり、電子メディエータを用いた細胞内酵素活性の測定でも、対象となる細胞が限定され応用は困難であった。

我々は、これまでに PIEZO 駆動の高精度な XYZ ステージ、倒立顕微鏡、ポテンシオスタットなどを組み合わせて独自の SECM システムを開発してきた。また、このシステムを利用して、プローブ位置の nm 単位の制御や、プローブへ印加する電位を走査する新たなシステムを構築してきた。電気化学測定では、活性を保持したまま電極へ酵素を固定化することで、酵素の選択性を利用して電極で反応する物質を限定し、触媒機能を利用して信号強度を増幅することが可能である。マイクロ電極でも、電極へ酵素の固定化を行い SECM 測定へ応用されている。しかしながら、限られた酵素系しか検討されておらず、単一細胞を対象とした測定は行われていない。一方、細胞が受けるダメージは、培養上清中の乳酸脱水素(LDH)酵素の活性を測定することで評価できる。LDH はほぼ全ての哺乳細胞が細胞内酵素として発現しており、細胞が膜にダメージを受けると細胞内から放出される。従来法では、LDH 活性を乳酸がピルビン酸に酸化される際に生成する NADH と、ジアホラーゼにより黄色テトラゾリウム塩を還元し、その時に生じる赤色ホルマザンの吸光度から評価する。この時、障害を受けた細胞の数の増加は、培養上清中の LDH 酵素活性の増加として測定される。

近年、低温における細胞保存技術が注目を集めている。細胞や臓器などの生体材料を保存して利用する場合、保存後の品質低下が重大な影響を与えるため、機能を保ったままで長時間保存できる方法の開発が求められている。現在、医療現場では生体から摘出された臓器や細胞を、低温環境下で代謝活性を抑制することで保存している。この時、低温ストレスから細胞を保護するために、ユーロ・コリンズ液やユニバーシティ・ウィスコンシン液などの保存液が使われる。これらの溶液には、低温で細胞保護効果を有する成分が添加されており、他にも様々な組成の保存液が開発されている。また、トレハロースや不凍タンパク質のような低温で細胞保護効果を有する物質も報告されている。しかしながら、低温下での細胞の動態解析は困難であるた

め、これらの保護効果の作用機序はほとんど解明されておらず、大半の臓器は 24 時間以上保存することが不可能である。そこで、低温下において細胞膜動態の解析を実現できれば、低温により細胞が受ける障害のプロセスの解明が進むだけでなく、新たな保存液の開発にも応用できると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、NADH の酸化反応を触媒するジアホラーゼを電極表面に固定化し、細胞から放出される LDH を定量可能な機能性マイクロ電極を開発する。この電極を利用して、一細胞単位で細胞膜動態を高感度に解析することを目指す。また、低温下で測定可能な SECM システムの開発を行い、機能性マイクロ電極を利用して一細胞単位で低温保存した細胞が受ける障害を解析することを目指す。

## 3. 研究の方法

### 3-1 機能性マイクロ電極の作製

【マイクロ電極の作製】引き伸ばしたガラス細管にエッチングにより細線化した Au、Pt 線を挿入し、ガラスを加熱、溶融させる。その後先端を研磨することによって先端径が 1-20  $\mu\text{m}$  程度のディスク電極を作製した。ここでは、酵素を固定化した際の電流応答を考慮して電極形状の検討を行った。

【マイクロ電極上への酵素の固定化】標識末端にアミノ基またはカルボキシル基を有するチオール分子を利用してマイクロ電極表面を修飾し、架橋剤により酵素の固定化を行った。作製した電極の NADH に対する濃度依存性などの特性を電気化学計測により明らかにし、溶液中の LDH 酵素濃度に対する電流応答を測定した。

### 3-2 低温下で測定可能な SECM システムの開発

【SECM システムの開発】SECM を低温保存細胞の評価へ応用するために、測定中、溶液の温度をモニターし 0 前後に温度を制御するシステムを構築した。温度制御は、倒立顕微鏡を含む SECM システムの XYZ ステージ上に、サンプルを囲むようにアイスバスを設置し、低温恒温水循環装置からの冷却液を還流させることで行った(図 1)。細胞を 0 前後の低温で保存する場合、保存中の温度変化は最小限にする必要がある。また、長時間(24 時間以上)継続して測定可能であることが望ましい。そこで、本システムでは、24 時間の低温保存中の温度変化を  $\pm 0.5$  以内となるよう設計した。

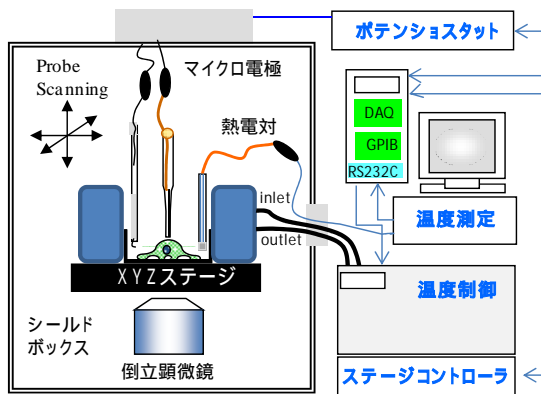


図1 低温下で測定可能なSECMシステム

### 3- SECMを利用した低温保存細胞の評価

【マイクロ電極を利用した低温保存細胞の評価】低温下で測定可能なSECMを利用して、低温保存中の細胞を評価した。具体的には、親水性電子メディエータを利用して、ネガティブフィードバック効果に伴う電流の減少を測定し、低温保存中の細胞の形状変化を評価した。

【不凍タンパク質の細胞保護効果の評価】現在、細胞や臓器の保存には様々な保存液が使われており、不凍タンパク質などのように、細胞保護効果を有する物質も知られている。そこで、開発したSECMシステムを利用して、不凍タンパク質が、低温保存した細胞へ与える影響を評価した。

## 4. 研究成果

### 4- 機能性マイクロ電極の作製

細胞から放出される乳酸脱水素酵素(LDH)の活性を測定することで、細胞が受けた障害を測定することができる。LDH活性を測定可能なマイクロ電極を開発するために、酵素系および固定化法の検討を行った。その結果、電極表面にジアホラーゼを固定化し、LDHの活性を電気化学的に測定することが可能となった。

### 4- 温度制御下で細胞を連続観察可能なSECMの開発

SECMのプロブであるマイクロ電極の走査方法を複数組み合わせることで、測定系を安定させた独自の制御技術を構築し、さらに、温度制御機構を導入した新しいSECMを開発した。本システムでは、一細胞を対象に3分間隔で24時間以上の連続した観察が可能となり、この時、イメージングだけではなく細胞高さの経時変化を50nm以下の解像度で測定できた。このSECMを用いることで、細胞分裂の様子や、薬物により刺激を受けた細胞の形状変化などが観察できた。

4- 不凍タンパク質の細胞保護効果の評価  
開発したSECMシステムを利用して不凍タンパク質(AFP)の細胞保護効果に関して詳細な検討を行った。24時間以上連続して、保存液中(4℃)に置いた細胞を観察した。AFPを含まない保存液中では、細胞は8時間ほど一定の状態を保った後、急激に膨潤して破裂する様子が観察された(図2)。一方、AFPを添加

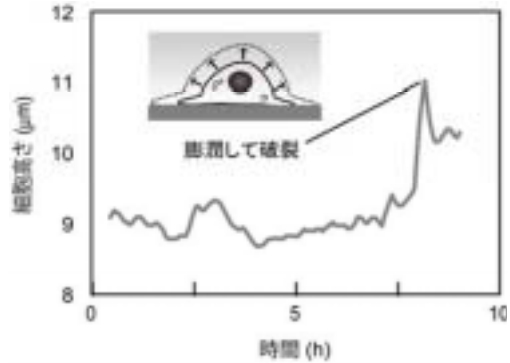


図2 SECMを利用した低温下の細胞の連続観察

した保存液中では膨潤が始まる時間が大幅に延長され、その膨潤速度も緩やかになり、さらに最大膨潤状態の細胞体積量も増加した。これらの結果より、AFPを添加した保存液は、低温下の細胞膜の柔軟性を保ち、安定化することを明らかとした。この研究成果は、電気顕微鏡を用いた初めての細胞の長時間連続観察であるばかりではなく、AFPの有無による低温状態の細胞の様子を示した全く新しい内容である。またこの技術は、AFPの解析のみではなく、細胞の形状変化に関連する他の様々な解析にも応用可能であると考えている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計3件)

Y. Hirano, T. Yasukawa, Y.

Sawayashiki, H. Shiku F. Mizutani and

T. Matsue: Preparation of

Immunosensors using a Microfluidic

Device with an Interdigitated Array

Electrode Modified with Antibodies.

Electrochemistry, 78: 175-177,

(2010) 査読有

Y. Hirano, Y. Nishimiya, S. Matsumoto,

M. Matsushita, S. Todo, A. Miura, Y.

Komatsu and S. Tsuda: Hypothermic

preservation effect on mammalian cells of type III antifreeze proteins from notched-fin eelpout Cryobiology, **57**: 46-51 (2008) 査読有

Y. Hirano, Y. Nishimiya, K. Kowata, F. Mizutani, S. Tsuda and Y. Komatsu : Construction of Time-Lapse Scanning Electrochemical Microscopy with Temperature Control and Its Application to Evaluate the Preservation Effects of Antifreeze Proteins on Living Cells. Anal. Chem., **80**: 9349-9354 (2008) 査読有

〔学会発表〕(計2件)

平野 悠、キャピラリー添加と走査型電気化学顕微鏡を併用した一細胞連続観察システムの開発、日本分析化学会、2009年9月24日、札幌

平野 悠、低温環境下の細胞を評価するための走査型電気化学顕微鏡の開発、日本分析化学会、2008年9月10日、福岡

〔その他〕

ホームページ等

<http://unit.aist.go.jp/bpri/bpri-bimo/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平野 悠 (HIRANO YU)

独立行政法人産業技術総合研究所・ゲノム  
ファクトリー研究部門・研究員

研究者番号：70415735

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：