

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：12401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26620113

研究課題名(和文)化学イメージングセンサによる高スループットスクリーニングの研究

研究課題名(英文)Study of high throughput screening based on chemical imaging sensor

研究代表者

内田 秀和 (UCHIDA, Hidekazu)

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号：60223559

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)：創薬のための分子探索を効率化する手法として二次元電気化学センサ(LAAS)を用いるスクリーニングシステムを提案した。光学顕微鏡下で酵素反応量を画像化することが可能であり、マイクロビーズにアルコール脱水素酵素を固定化し、試薬類を含むアガロースゲル電解質とLAASデバイス間に分散させて測定した。その結果、数個のビーズが集まった集合体であればホメピゾールで処理したビーズと未処理のビーズを区別することが可能で、酵素阻害効果を測定できることが確認できた。また、マイクロビーズが細胞の大きさに近いことから、実際の生体細胞を用いた創薬スクリーニングにも使える可能性が見出された。

研究成果の概要(英文)：We proposed the screening system based on the Light Addressable Amperometric Sensor (LAAS) which enables high throughput screening for drug discovery. The system can image a distribution of enzyme reaction under an optical microscope. We measured enzyme activity of microbeads spread between a LAAS sensor and a gel electrolyte. The enzyme modified microbeads that treated with fomepizole (inhibitor) can be discriminated from untreated one. We confirmed that the system can evaluate the efficacy of the inhibitor. There is the possibility of the drug screening on biological cells because the size of the microbead close to a cell.

研究分野：センサシステム

キーワード：二次元電気化学センサ LAAS マイクロビーズ アルコール脱水素酵素 ホメピゾール スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

DNA チップやプロテインアレイといった網羅的な分析手法の技術開発が盛んであり、それらの手法は分子結合の親和性を評価する手法として遺伝子診断などで利用が進んでいる。しかし、創薬など分子機能が重要な場合には酵素阻害活性などを個別の分子について別途評価する必要があり、分子機能も同時に評価できる手法の開発が望まれている。分子機能の評価には蛍光標識を用いた技術があり、高い識別能力を持つため、広く利用されているが、標的に合わせた分子設計が必要となっている。一方で電気化学的分析手法は識別能力が低い反面、分子設計が不要であり、研究対象に適合できれば迅速に評価が可能という特徴がある。研究代表者は二次元電気化学センサ (Light Addressable Amperometric Sensor : LAAS) を考案し、電気化学分析手法において多用される電流検出型の分析技術 (アンペロメトリ) に基づいた酸化還元物質の二次元分布を画像観測できる技術を開発した。LAAS は有機半導体の pn 接合による光起電力を用いたシンプルなデバイスであり、光スポットを照射した数 μm の領域に限定して酸化還元電流の分析をすることができる。このセンサ技術を応用することにより創薬スクリーニングを効率的に実行できるシステムの構築が期待できる。

2. 研究の目的

本研究は LAAS を用いたマイクロ計測技術を開発し、高効率な並列分析法を確立することを目的として行った。光導電性有機薄膜を用いた化学イメージセンサを分析デバイスとして確立するとともに、マイクロビーズを用いた分子固定化技術を組み合わせることで、多種類の分子群を網羅的に計測して標的分子を迅速に発見する技術 (高スループットスクリーニング技術) を確立することを目標とした。

3. 研究の方法

スクリーニングのモデルケースとして酵素阻害剤の探索を採用し、酵素反応に伴う電子の授受を電子伝達体となるメディエータ分子を介して電極で測定する手法を用いた。図 1 に示すように酵素反応に伴い生成する電子を酸化状態の電子伝達体 (酸化体) が受け取ることで還元状態の電子伝達体 (還元体) となり、熱平衡状態に比べて還元体が過剰な状態となる。この時、LAAS デバイスの有機半導体 pn 接合に集光した励起光を照射すると局所的に光起電力が発生し、励起されたホールがセンサ表面で還元体から受け取った電子と再結合して酸化還元電流が流れる。観測される酸化還元電流は還元体の濃度

に依存するため、励起光スポットを移動しながら電流を観測すると酵素反応の度合いを画像化することができる。酵素阻害剤により酵素反応が減少すると観測信号も減少するため、阻害剤の効果を評価することができる。

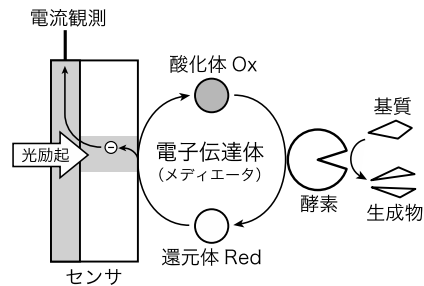


図 1 酵素測定の実験原理図

本研究では対象となる酵素をマイクロビーズに固定化し、種々の阻害剤候補分子と反応させ、どのビーズの酵素の活性が低下しているかを判別して候補分子のスクリーニングを行う。図 2 に示すようにガラス基板 / 東名電極 / 有機半導体 pn 接合の積層構造を有する LAAS デバイス上に酵素固定化ビーズを分散させ、電解質ゲルを被せてビーズを固定、底面から励起光スポットを掃引照射して観測される酸化還元電流のマッピングを行った。

なお、阻害剤の効果を確認するには本測定システムとは別に、光学画像によるビーズ位置の特定と測定値との照合が必要であり、阻害剤の効果が認められるビーズが見出された場合は、ビーズの回収と阻害剤の特定が別途必要となるが、阻害剤がペプチドなどの場合は DNA タグを用いるなど容易に回収、増幅が可能な利点を持つ。

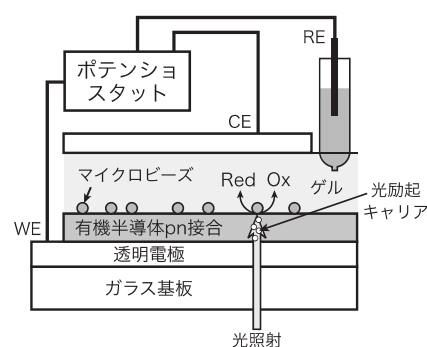


図 2 マイクロビーズを個別測定する原理

二次元電気化学測定システムの概念図を図 3 に示す。励起光はレーザーダイオード (637nm、3mW) に 120ms の方形波変調をかけ、ガルバノミラーと f- θ レンズにより直径 $57\mu\text{m}$ のスポットを掃引した。電流・電圧変換された観測信号は PC に取り込まれ、励起光の ON/OFF の周期に合わせた同期検波による振幅測定を行った。振幅測定に用いるデータはパルスボルタンメトリと同様に電気

二重層の充放電にかかる非ファラデー電流を除外して行った。

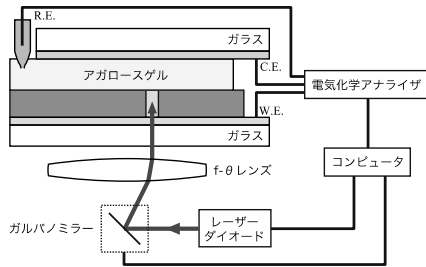


図3 二次元電気化学センサのシステム

LAAS デバイスは 20mm × 20mm のガラス / ITO 透明電極 (GEOMATEC 社製、抵抗値 5 Ω/sq、膜厚 0.7mm) の上にペリレン-3,4,9,10- テトラカルボン酸二無水物 (PTCDA) および銅フタロシアニン (CuPc) 20nm ずつ真空蒸着により堆積させた。

マイクロビーズ (Dynabeads M-270 Carboxylic Acid) の表面をカルボジイミドで処理したのち、アルコール脱水素酵素 (ADH、ORIENTAL YEAST) を反応させて固定化を行った。炭酸-重炭酸バッファ (含 1mM エタノール、2mM NAD⁺、フェリシアン化カリウム 2mM) に分散したビーズを LAAS デバイスに展開して直ちに 15wt% アガロースゲル (含 0.1M 硫酸ナトリウム、厚さ 1mm) を被せてビーズを固定した。

酵素阻害剤を作用させる場合は上記の測定の際に 1mM ホメピゾールをバッファに添加して測定を行った。

4. 研究成果

使用した LAAS の電子伝達体濃度依存特性を図 4 に示す。10⁻⁶M まで単調減少し、SN 比が 2 を超えることから、10⁻⁵M まで測定可能と考えられる。

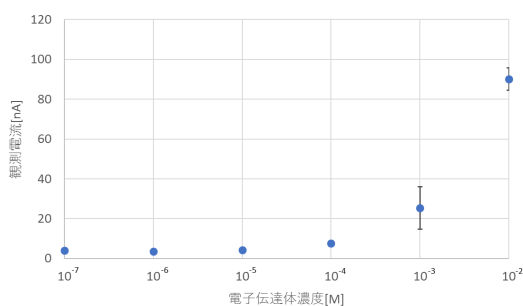
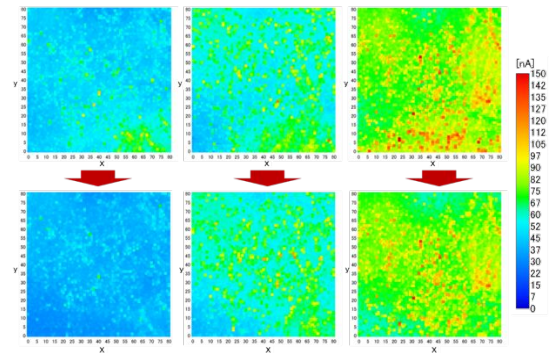


図4 使用した LAAS の電子伝達体濃度依存特性

図 5 に非阻害ビーズを展開したときの画像測定の結果を示す。酵素反応による酸化還元電流の分布が画像として観測されており、密度が高い部分では観測電流も大きくなっていることが確認できた。しかし、ビーズ個々を分別して観測するには空間分解能が不足していること、また、光学観測系を組み込むことが困難であるため、光学画像を用い

たビーズ位置の照合が難しいという問題も確認された。



(a) (b) (c)

図5 二次元画像測定の結果

(a) $6.7 \times 10^1 \sim 1.2 \times 10^2$ beads/ μ l

(b) $6.7 \times 10^2 \sim 1.2 \times 10^3$ beads/ μ l

(c) $6.7 \times 10^3 \sim 1.2 \times 10^4$ beads/ μ l

上段：溶液展開直後に測定開始

下段：さらに 20 分後に測定開始

空間分解能の向上とビーズ位置の照合が容易になるように、ガルバノミラスキャナーと f- θ レンズを倒立落射顕微鏡と XY 移動ステージに置き換えて測定を行った。20 倍の対物レンズを用いて、励起光スポット径は 5.6 μ m となった。その結果、ビーズ単体、ビーズの集合体を識別して測定が可能となった。図 6 に阻害剤で処理していない酵素固定化ビーズの測定結果を、図 7 にホメピゾールで酵素活性を阻害したビーズの測定結果を示す。

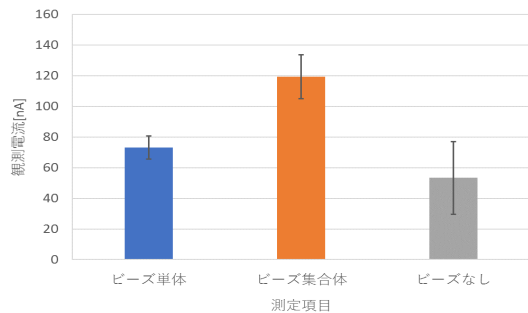


図6 非阻害酵素固定化ビーズの測定結果

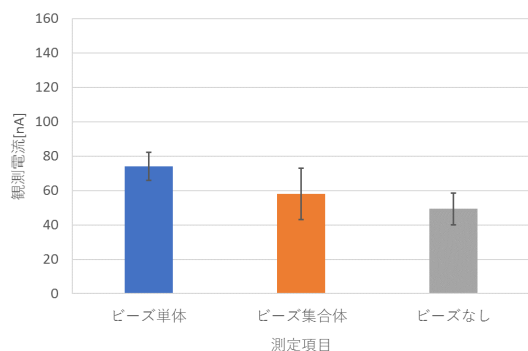


図7 阻害処理済み酵素固定化ビーズの測定結果

図6と図7を比較した時、ビーズ単体での酵素阻害効果を確認することはできなかったが、ビーズが数個集合した集合体では有意に阻害剤の効果を確認することができた。

理想的には酵素1個の反応を捉えて阻害効果を確認するのが好ましいが、本システムではまだ感度が不十分と判断される。感度を高めるにはLAASデバイスの膜材料を変更してより大きな光起電力が得られるようにすることで、電流検出感度の向上が期待できる。また、センサ表面構造を変更してウェルを形成し、酵素反応による生成物の拡散を防ぐことで単一パルスにより観測できる電流値を高めることでも感度の向上が期待できる。酵素の反応速度が仮に10回/秒程度の速い反応と仮定して、単一酵素から生成される物質を10分間蓄積して電荷を効率的に蓄積できれば、1msの単一パルスでピコアンペアの電流値観測が見込める。本研究ではセンサ電極から酵素分子までの距離が極めて離れているため、不可能だったが、金ナノ粒子など極めて小さな金属粒子を酵素の担体かつ電極として使用することで、LAASによる単一酵素分子の測定が可能になると考えられることがわかった。

また、現状のシステムでは酸化還元酵素が測定対象となるが、実用的にはプロテアーゼの評価が可能になると有用性が増すことが考えられるため、反応プロトコルの拡張や高分子物性変化を反映する測定技術の開発が今後の課題としてあげられる。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計5件)

尾崎 拓真、長谷川 有貴、内田 秀和、
「二次元電気化学センサ"LAAS"を用いた水溶液中におけるイオン拡散のリアルタイム観測」、電気学会全国大会 3-157、2017年

野平 充彦、高木 雄大、長谷川 有貴、内田 秀和、
「二次元電気化学センサの測定技術の研究」、電気学会ケミカルセンサ研究会 CHS-15-005、2015年

下山 千紘、長谷川 有貴、内田 秀和、
「二次元電気化学測定システムによる酵素固定化マイクロビーズ測定の研究」、電気学会ケミカルセンサ研究会 CHS-16-030、2016年

尾崎 拓真、長谷川 有貴、内田 秀和、
「有機ヘテロ接合型二次元電気化学センサによる酸化電流測定の研究」、電気学会ケミカルセンサ研究会 CHS-16-031、2016年

小澤 諒平、早瀬 貴文、長谷川 有貴、内田 秀和、
「有機半導体を用いた二次元電気化学センサデバイスの研究」、電気学会ケミカルセンサ研究会 CHS-15-004、2015年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 秀和 (UCHIDA, Hidekazu)

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号：60223559