

平成23年3月31日現在

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2006～2009

課題番号：18101006

研究課題名（和文） 多機能ナノ電気化学顕微鏡システムの創成

研究課題名（英文） Multifunctional Nano-Scanning Electrochemical Microscopy

研究代表者

末永 智一（MATSUE TOMOKAZU）

東北大学・大学院環境科学研究科・教授

研究者番号：70173797

研究成果の概要（和文）：マイクロ・ナノ電極プローブに機能性分子やイオン電流計測機能を付加した多機能ナノ電気化学顕微鏡を開発し，単一細胞レベルでの多項目定量解析手法を確立した．すなわち，①フィードバックを用いたナノ電極-サンプル間のナノメートル距離制御システムを確立し，②多機能マイクロ・ナノ電極を開発することにより，③細胞表面のイオンチャネルやタンパク質受容体の機能を高速かつ高解像度にイメージングすることに成功した．さらに，④細胞機能とイオンチャンネル活性の同時計測や⑤受容体発現量-病態の系統的解析に成功し，新規細胞診断システム構築のための基礎技術を確立した．

研究成果の概要（英文）：The multifunctional micro/nano scanning electrochemical imaging system (NanoSECM) was developed and utilized for the single-cell diagnostics. We fabricated multifunctional micro/nano-structured probe electrodes and developed a novel feedback control between the electrode and sample surfaces at nanometer levels. By using NanoSECM with these new technologies, we successfully attained the fast and high resolution and simultaneous imaging of live cells to disclose the cell functions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	26,000,000	7,800,000	33,800,000
2007年度	19,700,000	5,910,000	25,610,000
2008年度	13,700,000	4,110,000	17,810,000
2009年度	12,400,000	3,720,000	16,120,000
年度			
総計	71,800,000	21,540,000	93,340,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学，マイクロ・ナノデバイス

キーワード：マイクロ化学システム，単一細胞計測

1. 研究開始当初の背景

電気化学顕微鏡（SECM）は化学的な情報の可視化，局所における反応の誘起等，他のプローブ顕微鏡と相補的で興味深い多彩な

応用が可能なシステムである．これまで，単一細胞を対象に細胞の形状計測，酸素濃度分布による呼吸活性の評価および薬物，毒物の代謝機構の解明等が行われてきた．しかし，

その解像度が1ミクロン程度と他のプローブ顕微鏡に比べてはるかに低いこと、電気化学測定の高い精度が多項目の測定には困難が伴うことが指摘されてきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マイクロ・ナノ電極をプローブとした電気化学顕微鏡システムに、機能性分子による電極表面修飾、近接場光計測およびイオン電流計測を付加した多機能 NanoSECM を開発するとともに、この新システムを用い単一細胞レベルで多項目を定量的に解析する手法を確立することである。特に、細胞の形状、機能・活性、細胞膜表面の受容体の発現量と表現型（フェノタイプ）およびイオンチャンネルを介して流入出する各種イオンを単一細胞レベルで同時に検出できるシステムの開発に主眼をおいた。また、獲得した成果を系統的に解析し、心疾患の早期発見と治療に適用できる細胞診断システムへの展開を、本研究終了後に継続する応用研究と位置付け最終目的に設定した。このシステムを用いて、細胞活性、イオン調節機能との連関を重点的に解析し、新規な細胞診断という学術領域を創生することを本研究の最終的な目標とした。

3. 研究の方法

次の6つのサブテーマを設定し、研究を遂行した。

- 1) シアフォースフィードバックを用いたナノ電極-サンプル間距離制御システムの確立（東北大：末永，珠玖，兵庫県立大：水谷，防衛大：山田）
- 2) 機能性修飾ナノ電極による細胞の機能評価システムの確立（兵庫県立大：水谷）
- 3) SECM を用いた膜受容体の可視化による発現量および表現型（フェノタイプ）の解析（東北大：末永，柳澤，兵庫県立大：安川）
- 4) 電流/近接場光計測型多機能 NanoSECM による細胞活性と受容体の同時検出システムの開発（東北大：珠玖，産総研：水谷）
- 5) 多機能 NanoSECM システムを利用した細胞機能とイオンチャンネル活性の同時計測（東北大：珠玖，兵庫県立大：安川）
- 6) 受容体発現量-病態の系統的解析（東北大：末永，柳澤，兵庫県立大：安川）

当初の研究計画では、イオンチャンネルを多く発現する培養細胞（神経細胞など）を対象とし、生細胞機能の画像化に着手する予定で準備を進めていた。しかし、研究の過程で、医薬品開発等に繋げるためには上皮成長因子受容体（Epidermal Growth Factor Receptor; EGFR）など、疾患に関わるタンパク質受容体の機能評価が重要であることが新たに明らかとなった。また、当初の研究計画では、電極-サンプル間の距離制御システ

ムとして、シアフォースによるフィードバック系を構築する予定だった。しかし、シアフォースだけでなくイオンコンダクタンスによるフィードバック制御を行うことにより、より精密な制御が可能になることが判明した。そこで、当初の予定になかった受容体の評価手法の開発およびイオンコンダクタンスによるフィードバック制御に関する研究も行うこととした。

4. 研究成果

(1) フィードバックを用いたナノ電極-サンプル間のナノメートル距離制御システムの確立

①電極走査法の改良

●スタンディングアプローチモードを採用し、細胞など起伏の激しいサンプルに対しても正確なフィードバック制御が可能となり、安定してピンポイント計測およびバイオイメージングができるようになった。

②探針-試料間距離制御フィードバックシステムの開発

探針-試料間距離をシアフォース、及びイオンコンダクタンスによりZ方向を10 nm程度の精度で制御し、単一生細胞へのアプローチと電気化学・光・形状シグナルの取得を検討した。

【シアフォース】

●形状イメージの解像度は、神経細胞軸索（幅数 μm ）の明瞭な形状イメージが得られるレベルに達した。

●アルゴリズム変更により距離制御を高速化し、 $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ の範囲のイメージングに要する時間を、従来の1時間以上から30分に短縮した。

【イオンコンダクタンス】

●形状イメージの解像度は、キャピラリ径の最適化により、10 nm以程度の分解能で、細胞膜表面の形状起伏やタンパク質固定化表面の形状をイメージングが可能なレベルに達した。

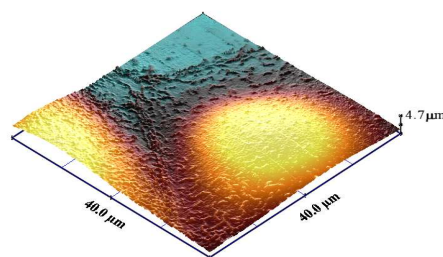


図1. 走査型イオンコンダクタンス顕微鏡で計測した腎臓上皮細胞膜表面の微絨毛構造の形状イメージ。

●シアフォースフィードバック距離制御の高速化アルゴリズムを元に、距離制御を高速化した。 $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ の範囲のイメージン

グに要する時間わずか7分半に短縮した。これにより、腎臓上皮細胞膜表面における微絨毛構造（幅数百 nm の繊維状構造）の経時変化の追跡に成功した（図1）。

（2）多機能マイクロ・ナノ電極の開発

①酵素修飾ナノ電極

●煩雑な操作を要する従来のナノディスク電極作製法を簡便化し、白金線を挿入した石英管を最尖化するというわずか1段階操作により電極径数十～数百 nm の Pt ナノディスク電極を作製可能とした（図2(A)）。下記リング電極の作製法と組み合わせによりリング／ディスクナノ電極の作製が可能になると期待できる。

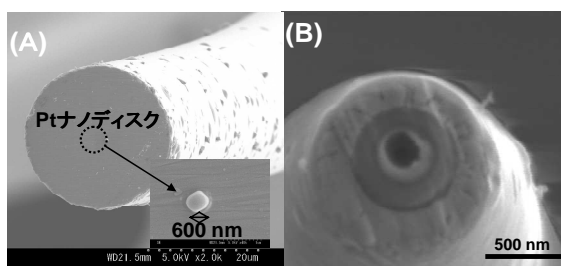


図2. (A) Pt ナノディスク電極,(B) 光ファイバ／ナノリング電極先端の走査型電子顕微鏡写真.

●電極表面への機能性分子の固定化膜としてアダマンタン自己組織化単分子膜形成試薬を合成し、金電極上への単分子膜形成を確認した。この自己組織化膜によりナノメートルレベルの微小電極表面への種々機能性分子の簡便な固定化が実現される。

●グルコース酸化酵素活性を数十 $\mu\text{U/L}$ のレベルまで測定可能な Os(II) 錯体修飾過酸化水素電極の作製に成功した。

●細胞の呼吸活性計測を目的とした酸素検出型酵素センサを開発した。酵素固定化条件の制御によりセンサ感度、定量範囲を簡便に調節可能とした。

②光ファイバ／ナノリング電極、及びナノピペット／ナノリング電極

●細尖化光ファイバ外壁への貴金属（金、白金）のスパッタ蒸着、及び絶縁用電着塗料の被覆により、先端径 500 nm 以下の複合プローブ電極の作製に成功した。

光ファイバ／ナノリング電極：ファイバ開口径 75 nm, リング電極外径 110 nm (図2(B))。ナノピペット／ナノリング電極：ピペット開口径 200 nm, リング電極外径 600 nm。

③イオン選択性ナノ電極

●先端径サブミクロンの K イオン選択性電極を作製した。シアフォース距離制御システムに搭載し、厚さ 1 μm , 直径 10 μm 程度のナフ

ィオンスポットの形状, K イオン濃度の同時計測に成功した。

④mRNA 回収プローブ電極

●リング電極を用いた単一細胞の電場破碎と mRNA 回収を実現した(図3). real-time PCR による mRNA の定量と組み合わせ、癌化の指標となる細胞極性と EGFR mRNA コピー数の相関性を明らかにした。

●2つのピペット開口を有するシート型先端の微小流体プローブを作製し、1本のプローブで単一細胞への薬剤投与による細胞破碎と mRNA の回収を実現した。

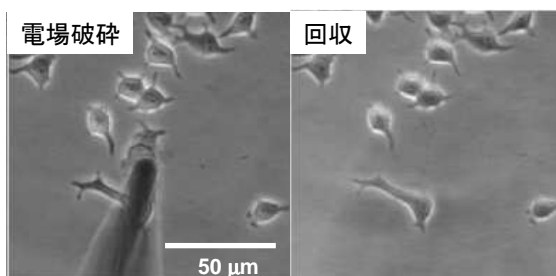


図3. リング電極による単一細胞の電場破碎、及びmRNA回収.

⑤細胞培養液中での計測が可能な電極の開発

細胞培養液中での計測で問題となる電極の汚染, 劣化解決のため、以下の電極を開発した。

●ダイヤモンド, あるいはダイヤモンド・ライク・カーボン電極を作製した。生態関連物質の吸着, 汚染による電流低下が低減され, さらに高電位印加による電気化学的洗浄も容易であることを明らかにした。

●ポリエチレングリコール被覆された酵素修飾電極を作製し, 細胞培養液中での長期間連続測定を可能にした。

（3）多機能ナノ電極による単一細胞機能の高解像度イメージング

①細胞機能の可視化に向けた膜受容体, 及びイオンチャネルに関する基礎的検討

●膜受容体の発現制御に関わる未知のタンパク質の同定, 及び機能解明を実現した。

●平滑筋においてカルシウムチャネル活性を介した細胞収縮動作の制御を解明した。

●平滑筋においてアドレナリン $\beta 2$ 受容体刺激を介したカリウムチャネル機能制御を解明した。

●細胞性免疫を担うマクロファージにおいて, 自己免疫疾患に関連のある Kv1.3 チャネル発現量とマクロファージ活性化指標である過酸化水素生成量の相関性をパッチクランプ法, 及び微小電極法で明らかにした。

②酵素活性の可視化

●ナノピペット/ナノリング電極を用い、基板上に物理吸着させた酵素パターン表面の形状起伏と、形状に対応した酵素活性分布を、100 nm以下の分解能で、形状（イオンコンダクタンス）/電気化学の同時高解像度イメージングすることに世界で初めて成功した（図4）。この形状・電流計測の解像度は、酵素抗体法により標識した膜タンパク質の細胞表面分布の可視化を可能にすると期待できる。

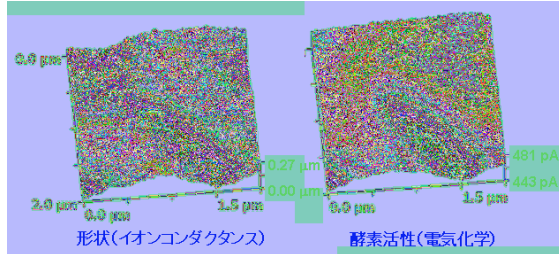


図 4. ナノピペット/ナノリング電極を用いた酵素パターン表面の形状、及び酵素活性イメージング。

③膜受容体の可視化

●癌関連性の高い上皮成長因子受容体 (Epidermal growth factor receptor, EGFR) の発現量に関し、蛍光標識抗体により得られた蛍光シグナルと酵素標識抗体で得られた電流応答の相関を確認した。また、光ファイバ/リングナノ電極を用い、単一細胞の形状、活性（蛍光シグナル）、及びEGFR認識抗体の標識酵素活性（電流シグナル）の同時計測に成功した（図5）。また、FPGAボード（100万ゲート、1 MHz）を用いて3系同時イメージングの高速化に成功した。

④細胞機能の可視化

●光ファイバ/ナノリング電極を用い、単一細胞の形状(A)、細胞内タンパク質発現（蛍光シグナル, (B)), 及び膜受容体刺激に伴う分泌型酵素発現（電流シグナル, (C)）の同時イメージングに成功した。

●ナノディスク電極を用い単一酵母における呼吸電子伝達鎖の酵素活性のイメージングに成功した。

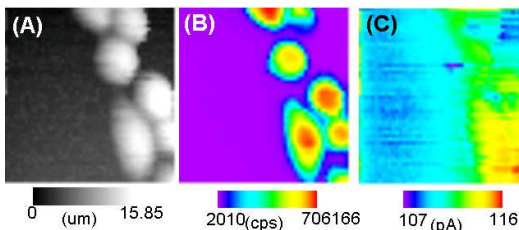


図 5. 光ファイバ/リングナノ電極を用いた単一細胞の形状(A)、活性(B)、及びEGFR認識抗体の標識酵素活性(C)の同時イメージング。

(4) 多機能 NanoSECM システムを利用した細胞機能およびイオンチャンネル活性の同時計測

①SICMの高速化とノイズ低減

●パッチクランプ用のアンプをイオンコンダクタンス顕微鏡システムに統合し、SICMの高速化とノイズ低減を実現した。

②マクロファージ活性化に伴う形状変化と膜容量変化の同時計測

●マクロファージ活性化過程に伴う形状変化を SICM で、膜容量変化をパッチクランプ法で評価した。

(5) 受容体発現量-病態の系統的解析

①受容体発現量-病態の系統的解析

●EGFをトリガーとするEGFRのダウンレギュレーション過程を電気化学イメージングで追跡した。酵素標識抗体を用いて、電流応答はEGF添加前後で有意に異なることが確認できた。

②カリウムチャンネル-病態の系統的解析

●シアフォースフィードバック機構に基づきカリウムイオン透過性プローブを走査し、生体試料表面のカリウムイオン分布のイメージングに成功した。

③損傷モデル系における1細胞レベルでの遺伝子発現の定量評価

●リング電極-キャピラリー複合プローブにより mRNA を1細胞レベルで検出することに成功した。ITO電極上に作製した損傷モデル系で、共存するサイトカインと上皮成長因子受容体ファミリーおよびキナーゼ遺伝子の発現量に違いがあることを定量的に評価した。

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43件)

1) Simultaneous Noncontact Topography and Electrochemical Imaging by SEM/SICM Featuring Ion Current Feedback Regulation., Y. Takahashi, A. I. Shevchuk, P. Novak, Y. Murakami, H. Shiku, Y. E. Korchev, T. Matsue, *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 10118–10126. 査読有り。

2) Topographic Imaging of Convolved Live Cells by Scanning Ion Conductance Microscopy in a Standing Approach Mode Y. Takahashi, Y. Murakami, K. Nagamine, H. Shiku, S. Aoyagi, T. Yasukawa, M. Kanazaki, T. Matsue, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2010, 12, 10012–17. 査読有り。

3) Transfected Single-Cell Imaging by Scanning Electrochemical Optical Microscopy with Shear Force Feedback Regulation. Y. Takahashi, H. Shiku, T. Murata, T. Ya

- sukawa, T. Matsue, *Anal. Chem.*, 2009, 81, 9674-9681. 査読有り.
- 4) Electrochemical Single-Cell Gene Expression Assay Combining Dielectrophoretic Manipulation with Secreted Alkaline Phosphatase Reporter System.
T. Murata, T. Yasukawa, H. Shiku, T. Matsue, *Biosens. Bioelectron.*, 2009, 25, 913-919. 査読有り.
 - 5) Electrochemical Detection of Epidermal Growth Factor Receptors on a Single Living Cell Surface by Scanning Electrochemical Microscopy., Y. Takahashi, T. Miyamoto, H. Shiku, R. Asano, T. Yasukawa, I. Kumagai, T. Matsue, *Anal. Chem.*, 2009, 81, 2785-2790. 査読有り.
 - 6) Potentiation of potassium currents by beta-adrenoceptor agonists in human urinary bladder smooth muscle cells: a possible electrical mechanism of relaxation., Takemoto J, Masumiya H, Nunoki K, Sato T, Nakagawa H, Ikeda Y, Arai, Yanagisawa Y, *Pharmacology*, 2008, 81, 251-258. 査読有り.
 - 7) Fabrication of a shear force-based ion-selective capillary probe for scanning electrochemical microscopy., H. Yamada, Y. Ikuta Y, T. Koike T, T. Matsue, *Chem. Lett.*, 2008, 37, 392-393. 査読有り.
 - 8) Measurement of Gene Expression from Single Adherent Cells and Spheroids Collected Using Fast Electrical Lysis., Y. Nashimoto, Y. Takahashi, T. Yamakawa, Y. Torisawa, T. Yasukawa, T. Ito-Sasaki, M. Iyokoo, H. Abe, H. Shiku, H. Kambara, T. Matsue, *Anal. Chem.*, 2007, 79, 6823-6830. 査読有り.
 - 9) Microcontact printed diaphorase monolayer on glass characterized by atomic force microscopy and scanning electrochemical microscopy, H. Q. Luo, H. Shiku, A. Kumagai, Y. Takahashi, T. Yasukawa, T. Matsue, *Electrochemistry Communications*, 2007, 9, 2703-2708. 査読有り.
 - 10) Electrochemical screening of recombinant protein solubility in *Escherichia coli* using scanning electrochemical microscopy (SECM), K. Nagamine, S. Onodera, A. Kurihara, T. Yasukawa, H. Shiku, R. Asano, I. Kumagai, T. Matsue, *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 96, 1008-1013. 査読有り.
 - 11) Topographic, Electrochemical, and Optical Images Captured Using Standing Approach Mode Scanning Electrochemical/Optical Microscopy., Y. Takahashi, Y. Hirano, T. Yasukawa, H. Shiku, H. Y
- amada, T. Matsue, *Langmuir*, 2006, 22, 10299-10306. 査読有り.
- [学会発表] (計 53 件)
- 1) T. Matsue, Integrated micro/nano electrochemical systems for bioanalysis, NIMS WEEK 2009, 2009.7.22, エポカルつくば
 - 2) T. Yanagisawa, Cav channels and their modifiers: molecular identification of the binding sites., 10th International Symposium on Mechanisms of Vasodilatation, 2009.6.1, 松島
 - 3) T. Matsue, Electrochemical Detection of Gene Expression in a Single Living Cell, CRC Symposium, 平成20年10月29日, 札幌
 - 4) T. Matsue, Characterization of Cellular Functions with Scanning Electrochemical Microscopy, Electrochemistry and Biomedical technology Symposium, 2008.10.6, ソウル (韓国)
 - 5) H. Shiku, D. Okazaki, T. Yamakawa, H. Akita, H. Harashima, T. Matsue, Single-cell analysis of nucleic acids and proteins in gene introduction system, The 3rd International Workshop on approaches to Single-Cell Analysis, 2008.9.11, ETH Zurich, Switzerland
 - 6) H. Shiku, S. Goto, K. Nagamine, T. Yasukawa, T. Itayama, T. Matsue, Electrochemical Analysis of Yeast Cells Expressing Beta-Galactosidase within a Poly(dimethylsiloxane) Microwell Array, The 5th Workshop on Scanning Electrochemical Microscopy, 2008.8.24, Blue Mountain Lake (米国)
 - 7) H. Shiku, Integrated Electrochemical Devices for Detection of Gene Expression, 3rd German-Italian-Japanese Meeting of Electrochemists, 2008.5.25, Taormina, Italia
 - 8) T. Matsue Integrated Electrochemical Cellular Systems for Gene Engineering., 6th Asian Conference on Electrochemistry in Taipei, 2008.5.12, Taipei
 - 9) 山田 弘, 宮澤春菜, 小池 亨, 微小イオン選択性電極を探針としたシアフォース制御走査型電気化学顕微鏡による形状・局所カリウムイオン濃度の同時測定, 電気化学会第75回大会, 平成20年3月31日, 山梨大学
 - 10) 安川智之, 水谷文雄, マイクログルコースセンサをプローブとした電気化学顕微鏡の開発, 表面技術協会第117回講演大会, 平成20年3月12日, 千葉
 - 11) T. Matsue, Electrochemical Monitoring of Gene Expression with Cellular Devices (基調講演), The 9th Asian Conferences on Analytical Sciences, 2007.11.6, Jeju, Korea
 - 12) H. Shiku, T. Yamakawa, Y. Nashimoto, Y. Takagasu, Y. Torisawa, T. Yasukawa, T.

Ito-Sasaki, M. Yokoo, H. Abe, H. Kambara, T. Matsue, Dual-Capillary Micro-fluidic Probe to collect mRNA from a single adherent cells, The International Forum on Post-Genome Technologies, 2007.9.9 中国

- 13) 末永智一, 集積型細胞デバイスを用いた遺伝子発現の検出 (基調講演), 第 15 回化学とマイクロシステム研究会, 2007.5.25 仙台

[図書] (計 6 件)

- 1) 微生物機能を利用したマイクロバイオチップの開発, 長峯邦明, 末永智一, 化学フロンティア「切り拓き, サイエンスを牽引する分析最前線」, 化学同人, 2008,127-133
2) 細胞機能を利用するマイクロバイオセンサ, 井上 (安田) 久美, 珠玖 仁, 末永智一, 先進化学センサ, (株)ティール・アイ・シー, 2008, 243-252
3) Whole-Cell Biosensors, H. Shiku, K. Nagamine, T. Kaya, T. Yasukawa, T. Matsue, in "Handbook of Bioelectrochemistry", Chapter 7 (249-266), John Wiley, 2008.3
4) マイクロフルーイディックシステムを用いた細胞デバイス, 鳥澤勇介, 安川智之, 珠玖 仁, 末永智一, バイオセンサ・ケミカルセンサ事典, テクノシステム, 2007.8

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 走査型電気化学イオンコンダクタンス顕微鏡測定法, 走査型電気化学イオンコンダクタンス顕微鏡, その探針および探針の製造方法

発明者: 高橋康史, 末永智一, 珠玖仁, 村上有美, 長峯邦明, アンドリュウ・シェヴチャク, ユーリ・コルチュエフ

権利者: 国立大学法人東北大学, インペリアル・イノベーションズ・リミティッド

種類:

番号: 特願 2009-140602

出願年月日: 2009 年 6 月 11 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.che.tohoku.ac.jp/~bioinfo/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

末永 智一 (MATSUE TOMOKAZU)

東北大学・大学院環境科学研究科・教授
研究者番号: 70173797

(2) 研究分担者

水谷 文雄 (MIZUTANI FUMIO)

兵庫県立大学・大学院物質理学研究科・教授

研究者番号: 80118603

柳澤 輝行 (YANAGISAWA TERUYUKI)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 90133941

珠玖 仁 (SHIKU HITOSHI)

東北大学・大学院環境科学研究科・准教授

研究者番号: 10361164

安川 智之 (YASUKAWA TOMOYUKI)

兵庫県立大学・大学院物質理学研究科・准教授

研究者番号: 40361167

山田 弘 (YAMADA HIROSHI)

防衛大学校・応用化学科・准教授

研究者番号: 10545974

(H18-H20 連携研究者)

(3) 連携研究者

秋葉 宇一 (AKIBA UICHI)

秋田大学・工学資源学部・准教授

研究者番号: 60184107