

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K05917

研究課題名(和文) DNAを利用した一細胞代謝解析のための酵素固定化電極の開発と心筋細胞評価への応用

研究課題名(英文) Development of microbiosensor with DNA scaffolds for cell metabolic analysis

研究代表者

平野 悠 (Hirano, Yu)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：70415735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：生命の維持には外部から取り入れた有機物などを利用して、必要なエネルギーなどを生産する必要があり、この反応は、代謝経路と呼ばれる複雑な化学反応により構成されている。細胞の代謝は細胞状態を評価する指標であるため、薬剤開発では代謝活性への影響評価が不可欠となっている。本研究では、細胞と同程度の大きさを有する針状マイクロ電極の表面に酵素を固定化し、細胞近傍の代謝物濃度をリアルタイムで観察する技術を開発の開発を進めた。さらに、細胞にダメージを与えることなく、その状態を評価できる走査型電気化学顕微鏡(SECM)と組み合わせて、標的となる細胞を選択してグルコース消費などを評価することが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

培養した細胞を利用すると薬剤の効果などを評価することができるが、細胞単位で細胞が消費や生産したりする生体分子を定量することは難しかった。本研究では、細胞の薬剤添加に伴う変化を連続して評価できる顕微鏡システムを開発した。特に、細胞サイズの小さな電極に酵素などを固定化することで、細胞が消費するグルコースなどの定量が可能となった。開発したシステムを利用して、心筋細胞などに対する薬剤効果の評価に応用した。本研究の成果は、将来的には医薬品開発や基礎研究に役立つことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Metabolic pathways are a series of chemical reactions that occur within a cell. Since cellular metabolism is an indicator to analyze living cells, evaluation of the effect on metabolic activity is essential for drug development. In this study, we developed a system to analyze the concentration of metabolites in the vicinity of cells by immobilizing enzymes on a tip of a needle-shaped microelectrode. In combination with scanning electrochemical microscopy (SECM), it was possible to evaluate the glucose consumption of living cells.

研究分野：生物電気化学

キーワード：電気化学 細胞 酵素 マイクロ電極

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞の代謝は、必要なエネルギーなどを生産するプロセスであり、代謝経路と呼ばれる複雑な化学反応により構成されている。細胞の代謝の評価は、疾病や分化の指標となることから、医薬品や再生医療などの研究開発において不可欠となっている。例えば、心臓では糖尿病や高血圧などが原因で心筋細胞の代謝に障害が生じて収縮機能が低下する。そのため、心疾患の治療や予防には心筋細胞のエネルギー代謝を改善する必要がある、代謝活性の変化から薬理作用を評価している。しかしながら、心筋細胞は増殖能を持たないことから、主に生体から回収された細胞を利用するため、代謝活性の測定では目的以外の種類の細胞を含んでいる場合が多い。従って、不均一な細胞群から得られる平均化されたデータとなり、定量的な活性評価が困難であった。また、一定時間薬剤に暴露した後、回収して比色法、HPLC、質量分析などで測定するため、細胞に生じる変化を連続して観察することも難しかった。

走査型電気化学顕微鏡(SECM)はマイクロ電極をプローブとして、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り、細胞観察にも応用されている(PNAS, 109 (2012) 11484)。特に、酸素はマイクロ電極で直接濃度測定が可能であることから、細胞近傍の濃度勾配を観察して、細胞の酸素消費速度が評価されている。我々はプローブと細胞が数 $\mu\text{m}$ 離れていても測定可能である SECM の特徴を利用することで、低温下において、一細胞を測定対象に障害を与えることなく長時間連続測定可能なシステムを開発している(Anal. Chem. 80 (2008) 9349)。また、これを応用して、心筋細胞の収縮・弛緩に伴う細胞形状変化を測定している(Anal. Biochem. 447 (2014) 39)。一方、プローブであるマイクロ電極表面へ酵素を固定化して選択性を持たせることで、細胞近傍のグルコースなどを測定する試みも報告されている(Anal. Chem. 80 (2008) 2717)。しかしながら、マイクロ電極は面積が小さいことから、活性を保持できないと十分なシグナルが得られなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、細胞にダメージを与えることなくその動態を観察できる走査型電気化学顕微鏡(SECM)システムを基盤として、培養環境下で細胞のエネルギー代謝の評価を可能とする。また、細胞近傍の代謝物濃度を評価するために、マイクロ電極に複数種の酵素を固定化し、細胞近傍などの局所の代謝物濃度をリアルタイムで観察する技術を開発する。上記 SECM と組み合わせ、標的となる細胞を選択して一細胞レベルで薬剤などを添加した際のエネルギー代謝を評価することを目指した。

### 3. 研究の方法

細胞のエネルギー代謝は温度や pH などの培養環境の変化に大きな影響を受ける。そこで、SECM を利用して細胞のエネルギー代謝を正確に評価するために、通常の培養環境下で長時間、安定して測定可能な SECM システムを開発する。また、薬剤刺激に伴う細胞の変化についても側面的するために標的細胞的に薬剤などを添加可能なシステムを構築する。細胞近傍の代謝物を評価するために、マイクロ電極表面に効率的に酵素の固定化する方法を開発する。

#### (1) 細胞のエネルギー代謝を評価するための SECM システムの開発

SECM を利用した細胞測定では、倒立顕微鏡を利用してステージ上で標的となる細胞近傍にプローブであるマイクロ電極先端を観察しながら正確に配置する。培養細胞等を標的として薬剤添加に伴う変化などを測定する場合、温度だけではなく、湿度や二酸化炭素濃度を一定に保持する必要がある。そこで、顕微鏡ステージ上に半密閉のインキュベータを配置して培養環境の維持を試みた。また、半密閉環境で標的細胞に薬剤を添加するために、先鋭化したガラスキャピラリーを利用した薬剤添加システムを SECM に導入する。

#### (2) 細胞近傍の代謝物濃度を測定可能なマイクロ電極の開発

SECM のプローブであるマイクロ電極を利用して細胞近傍の代謝物濃度を測定するために、電極表面へ酵素を固定化する。ここでは、グルコースを標的として細胞のグルコース消費の測定を試みる。微小なマイクロ電極表面に効率的に酵素を固定化するために、電極表面形状、固定化する足場分子や酵素の組み合わせなどを検討する。

### 4. 研究成果

#### (1) 細胞のエネルギー代謝を評価するための SECM システムの開発

細胞のエネルギー代謝は温度や pH などの培養環境の変化に大きな影響を受けることから、SECM を利用してこれらの細胞を正確に評価するために、通常の培養環境下で長時間、安定して測定し、薬剤応答を評価するための SECM システムを開発した。開発したシステムを利用して、多くのエネルギーを必要とすることから代謝の異常は重大な疾患に繋がる心筋細胞を対象にして評価した。ラット由来心筋細胞の拍動を測定したところ、120 分以上、安定した拍動を維持す

ることを確認した。続いて、測定中の心筋細胞の薬剤応答を評価するために、SECM システムに細胞近傍に微量の薬剤を添加可能なキャピラリーマイクロピペットを導入した。ここでは、標的となる心筋細胞の拍動から周辺細胞の影響を除外するために、島状のパターン培養した心筋細胞群を利用した。拍動を観察しながら、adenosine triphosphate (ATP) を添加したところ、拍動数が亢進し、さらに、収縮時間は変化しないで弛緩時間の短縮が確認された。また、心毒性を有する薬剤であるアステミゾールを用いたところ、弛緩時間が大きく延長することが明らかとなった。この拍動変化はアステミゾールが引き起こす心筋細胞の活動電位変化と一致していると考えられる。従って、従来法では評価することが困難であった、心筋細胞の薬剤添加前後の拍動の変化の解析が可能となった。

## (2) 細胞近傍の代謝物濃度を測定可能なマイクロ電極の開発

細胞の代謝物を評価するためのセンサプローブの開発では、マイクロ電極先端に固定化する酵素量を増加させるために、電極表面形状を検討した。代謝物を選択的に測定するために有効と考えられる規則的な凹凸形状の形成が可能となり、ナノメートルサイズの規則的な凹凸を形成することで酵素の固定化量が大幅に増加する可能性を見出した。また、凹凸を形成したグルコースオキシダーゼなどの酵素を、凹凸を形成したマイクロ電極表面に固定化することで、グルコース濃度測定が可能となり、細胞の消費するグルコース濃度の評価が可能となった(図)。

SECM を基盤として、培養環境下で薬剤の添加前後の細胞のエネルギー代謝などを評価する開発した。これを利用して心筋細胞を対象に薬剤添加時の変化を評価した。また、マイクロ電極表面への酵素固定化法について検討し、細胞のグルコース消費を評価できたことから、細胞レベルでのエネルギー代謝の評価の可能性を示した。

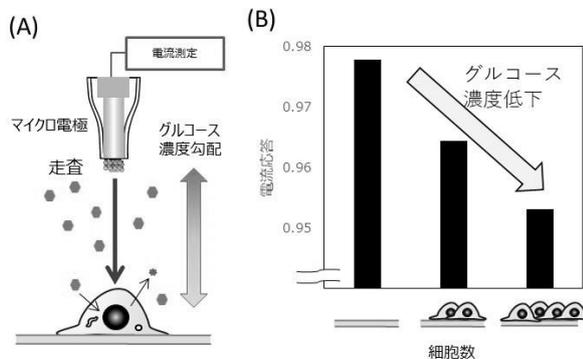


図 SECMを利用したグルコース消費の評価

(A) マイクロ電極の走査によるグルコース濃度勾配の測定

(B) 細胞数による電流応答の違い

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okumura Sho, Hirano Yu, Komatsu Yasuo	4. 巻 39
2. 論文標題 Inhibition of breast cancer cell proliferation with anti-microRNA oligonucleotides flanked by interstrand cross-linked duplexes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 225-235
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15257770.2019.1671595	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 Masiki Ikegami, Yu Hirano, Yasuhiro Mie, Yasuo Komatsu	4. 巻 166
2. 論文標題 Adsorptive Stripping Voltammetry for the Determination of Dissolved Oxygen Using a Mesoporous Pt Microelectrode	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of The Electrochemical Society	6. 最初と最後の頁 B542-B546
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1149/2.0021908jes	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 Okumura Sho, Hirano Yu, Maki Yoshiyuki, Komatsu Yasuo	4. 巻 143
2. 論文標題 Analysis of time-course drug response in rat cardiomyocytes cultured on a pattern of islands	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Analyst	6. 最初と最後の頁 4083 ~ 4089
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/c8an01033a	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 Hirano Yu, Kojima Naoshi, Komatsu Yasuo	4. 巻 75
2. 論文標題 Synthesis and Application of Interstrand Cross-Linked Duplexes by Covalently Linking a Pair of Abasic Sites	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry	6. 最初と最後の頁 e63 ~ e63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cpnc.63	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 Yasuhiro Mie, Yu Hirano, Keiko Kowata, Akiyoshi Nakamura, Mayu Yasunaga, Yoshihiro Nakajima, Yasuo Komatsu	4. 巻 10
2. 論文標題 Function Control of Anti-microRNA Oligonucleotides Using Interstrand Cross-Linked Duplexes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Therapy-Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 64-74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtn.2017.11.003	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 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 平野 悠、扇谷 仁希、千高 佐知子、三重 安弘、小松 康雄
2. 発表標題 クロスリンク2本鎖構造によるanti-miRNAオリゴの細胞内局在への影響
3. 学会等名 核酸医薬学会 第4回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平野 悠、千高 佐知子、小松 康雄
2. 発表標題 Effect of terminal double-stranded structures on intracellular localization of anti-miRNA oligonucleotide
3. 学会等名 International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平野 悠、扇谷仁希、三重安弘、小綿 恵子、小松 康雄
2. 発表標題 クロスリンク2本鎖構造を有するanti-miRNAオリゴ核酸の細胞内動態
3. 学会等名 核酸医薬学会 第4回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池上 真志樹, 平野 悠, 三重 安弘
2. 発表標題 微細構造白金マイクロ電極を用いた溶存酸素の検出
3. 学会等名 応用物理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平野 悠, 池上 真志樹, 小綿 恵子, 小松 康雄
2. 発表標題 Construction of a bienzyme immobilizing microelectrode by cross-linked DNA scaffolds and its application to analysis of cellular metabolism
3. 学会等名 The 44th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 池上 真志樹, 平野 悠, 三重 安弘, 小松 康雄
2. 発表標題 走査型電気化学顕微鏡用の白金/金コンポジット微細構造電極の開発
3. 学会等名 第65回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 平野悠 ほか (監修 津田栄)	4. 発行年 2018年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 290
3. 書名 不凍タンパク質の機能と応用	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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