

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月21日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21350045

研究課題名（和文） ナノバイオ計測への展開を目指した脳内物質センシング法の高度化と応用

研究課題名（英文）

Advanced methods for molecular sensing in brains and its application to nanobio sensing

研究代表者

菅原 正雄（SUGAWARA MASAO）

日本大学・文理学部・教授

研究者番号：50002176

研究成果の概要（和文）：脳内物質、特に神経伝達物質を対象とする高感度なキャピラリー酵素センサー、免疫凝集を利用するアレイ型免疫アッセイ、脂質二分子膜センサーおよび時空間分解能の高いグルタミン酸イメージング法を開発した。そのいくつかを急性海馬スライスを用いての脳機能計測へ応用、神経伝達機構に関する新しい知見を得た。

研究成果の概要（英文）：

New methods with high sensitivity, such as a capillary-based enzyme sensor, array-type immune sensing, lipid bilayer sensors, and an imaging method with high spatiotemporal resolution have been developed for brain substances, especially neurotransmitters, and some of them were applied to acute brain slices for elucidating neuronal signal transduction mechanisms.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,600,000	2,580,000	11,180,000
2010年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2011年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：生体分析，急性脳スライス，神経伝達物質，L-グルタミン酸，マイクロセンサー，可視イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

脳研究に必要な電気生理学的手法，薬理学的手法と細胞外イオン・分子計測法を一体化することや局所領域で生起する長期増強現象（LTP），長期抑圧減少（LTD）など，記憶・学習に参与する脳機能を神経伝達分子の

側から解釈すること，神経伝達分子以外の細胞外分子の動態・局所的存在量，存在場所を解明することのためには新たな計測法の視点が必須である。脳内の細胞外イオン・分子の計測法は数十 $\mu\text{m}$ レベルの時空間での測定は既実現されているが，数 $\mu\text{m}$ ～数十

nm レベルの時空間を目指した方法へ高度化することは今後の課題である。

## 2. 研究の目的

これまでに開発してきた脳を対象とするバイオ分子センシング法を発展させ、高度化することによって、これまで計測が容易でなかった脳海馬の数十ナノ～数マイクロレベルの微小時空間でおこるイオン・分子の動態と、それに伴っておこる現象を計測する方法を開発する。微小(数 $\mu\text{m}$ )ないし超微小(数十～数百 nm)時空間の高感度計測法の開発は、脳研究に重要な電気生理学的実験と細胞外イオン・分子の高感度計測法とを一体化するために重要である。また、近い将来必須となる“ナノバイオセンシング”の基礎となる基盤技術を構築することに寄与する。本申請では、シナプス内、シナプス外の神経伝達分子グルタミン酸の微小時空間計測法の開発、脳内情報伝達分子を検索できる高感度膜センサーの開発、極微量サンプルでの網羅的分析を目指したアレイの開発などに焦点をあてる。

## 3. 研究の方法

本研究では、代表者らが開発してきた脳を対象とするバイオセンシング法を基盤として、それらをより微小な時空間のバイオセンシング法として発展させ、脳の基礎研究に役立てることを目的とする。そのために以下の4項目を中心とした分子センシング法の開発を行う。(1)生きている脳海馬スライスを対象に、キャピラリーセンサーによる計測と電気刺激とを一体化することによって、神経伝達物質 L-グルタミン酸の濃度変化を real time に計測、全ての神経領野でグルタミン酸放出量を定量的に定める。(2)神経伝達物質を可視化する方法の高度化を図る、(3)脳内情

報伝達分子を検索することができる人工脂質二分子膜界面を構築する、(4)極微小サンプルで脳内情報伝達分子を計測するアレイ型センシング法を開発する。

## 4. 研究成果

### (1) キャピラリー酵素センサーの応用

哺乳類大脳での興奮性神経伝達系では、神経伝達物質としてグルタミン酸が放出される。哺乳類の記憶・学習の素過程とされる神経可塑性の分子機構は、神経間隙(シナプス)が集中して存在する神経領野(DG, CA1, CA3)ごとに異なると理解されている。電気生理学の領域においてグルタミン酸のその場計測が重要であるにも関わらず、局所領域で放出されるグルタミン酸を計測する方法が確立されていなかった。

本研究では、マウス海馬神経領野 CA1 を電気刺激することによって長期増強現象(LTP)を実験的に引き起こし、その際に放出される細胞外グルタミン酸を実測することに初めて成功した。その結果、LTP では放出量の増加を伴うことを明らかにした。また、NMDA 受容体阻害剤 AP-5 や AMPA 受容体阻害剤 CNQX の共存下での放出量を測定することによって、グルタミン酸放出にかかわる分子機構について検討し、シナプス後膜の両受容体の活性を阻害した場合でも、グルタミン酸の放出が残ることを明らかにした。

また、化学的に LTP を引き起こすとされている塩化テトラエチルアンモニウム(TEA)刺激によって放出される細胞外 L-グルタミン酸濃度を計測、CA1 領野においては数 $\mu\text{M}$ であることを示した。さらに方法論的視点から

海馬スライス上の一定の高さに置かれたセンサーの応答は、細胞内グルタミン酸濃度を反映することを明らかにした。また、化学刺激の際の EPSP を同時に記録し、EPSP と放出されるグルタミン酸の“濃度”との相関を検討した。その結果、化学的 LTP の生起によってもグルタミン酸濃度が増加することが分かった(図 1)。

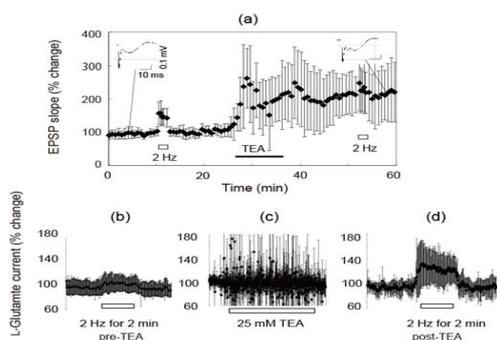


図 1 cLTP とグルタミン酸放出の関係

## (2) グルタミン酸レセプター抗体を用いるシナプス内グルタミン酸の可視イメージング法の開発

海馬スライス内のグルタミン酸濃度の変化を可視化し、real timeに検出するためのフロー系イメージング法を開発するため、グルタミン酸酸化酵素 (GluOx) と基質をアガロースゲルに封入して用いる新規イメージング法を開発した。細胞死のモデルである虚血刺激下やCa<sup>2+</sup> パラドックス刺激によって放出されるグルタミン酸を可視化することに応用し、グルタミン酸の神経領野間分布の違いを示唆する結果が得られている。

## (3) 脂質二分子膜センサーの構築

膜界面を分子レベルでデザインすることで様々なイオン・分子に適応可能な一般性の

ある高感度センシング膜界面を構築することを目指し、ペプチドチャネル (グラミジシジン)、無機チャネル (MCM-41) を用いて、様々な生膜体レセプターを化学修飾できる *in situ* レセプター修飾法を開発した。まず、反応性の高いアミノ基をもつ脂質(PE)とアルキル鎖長の異なる DOPC (C<sub>18:1</sub>)、DPPC (C<sub>16:1</sub>) 及びコレステロールからなる人工脂質二分子膜を分子認識界面として構築した(図 2)。アミノ基を持つため、チャネル能を持たない様々なレセプターを化学修飾できるので、汎用的な、高感度分子認識界面となる。この膜に、レセプター蛋白として牛血清抗体(anti-BSA 抗体)を化学修飾した膜は、10<sup>-9</sup> ng/mL の BSA を選択的に認識、積分電流値の変化に情報変換できる。

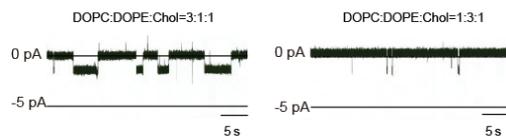


図 2 脂質二分子膜の応答

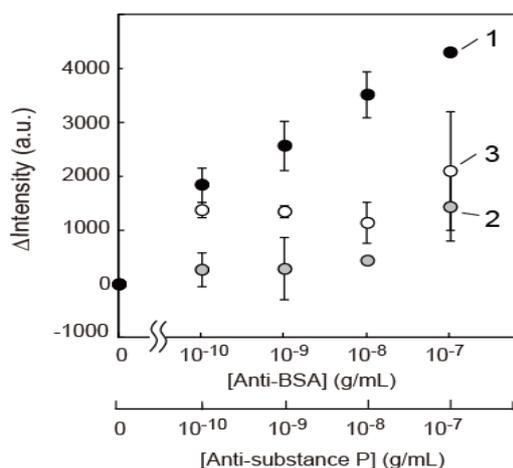
次に、メソポーラスシリカ MCM-41 の細孔内に PE 脂質を固定化し、そこにレセプター (BSA) を化学修飾した。その結果、MCM-41 マルチチャネルに基づいて、anti-BSA 抗体に対して 10<sup>-12</sup> g/mL レベルの検出下限をもつ高感度センシングが可能であることを実証した。

## (4) アレイ型センシング法の構築

DNA チップ、ペプチドチップなどの網羅的一斉分析法のように、できるだけ多くのアナライトを対象にする計測法が必要とされる一方、特定の、限定された数のアナライトを同時にターゲットとするアレイ型センシング法の重要性が指摘されている。

① 脂質封入MCM-41 を用いる高感度イムノセンシング法の開発

脂質を封入したMCM-41細孔中には水溶液中の蛍光色素が輸送され、その蛍光が著しく増感されること、封入脂質 (PE) にレセプター (BSA) を化学修飾することで、BSA抗体を特



異的に認識し、色素の細孔内への流入を制御  
図3 脂質封入MCM-41 を用いる新規蛍光法  
できることを見出した。MCM-41 マテリアルの沈殿物の蛍光イメージを測定し、その平均蛍光強度を用いるとBSA抗体を定量できる (図3)。この方法は、チャンネル類似の物質輸送現象に基づいており、増幅能をもつ新しい物質検出法となる。

② リポソームアレイの開発と応用

水溶液中でのイムノリポソームの凝集反応とグラミシジンによる蛍光増強効果を併用することで、神経伝達物質サブスタンス P を蛍光検出する高感度、かつ迅速な検出法を開発した。pH 依存性蛍光色素を内封したイムノリポソームはグラミシジンの存在下、水素イオンを放出し、内水相の pH が上昇する。それによって蛍光強度が強くなる。このリポソーム凝集体を、サブスタンス P 抗体を化学

修飾したガラス基板に補修し、その蛍光イメージを測定する。検出下限は 20 fg/mL で、500 倍に希釈するだけで血清中のサブスタンス P を定量できる。

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 8 件)

- ① A. Shoji, M. Kabeya, M. Sugawara, Real time monitoring of matrix metalloproteinase-9 collagenolytic activity with a surface plasmon resonance biosensor, *Anal. Biochem.*, 419, 53-60 (2011).  
[doi:10.1016/j.ab.2011.07.031](https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.07.031), 査読有.
- ② K. Nozawa, A. Oshima, T. Nasu, A. Shoji, A. Hirano-Iwata, M. Niwano, M. Sugawara, BSA-modified MCM-41 channels in planar lipid bilayers as a sensing system for anti-BSA. *Sensors and Actuator B Chemical*, 160, 139-144 (2011).  
[doi:10.1016/j.snb.2011.07.024](https://doi.org/10.1016/j.snb.2011.07.024), 査読有.
- ③ S. Hozumi, K. Ikezawa, A. Shoji, A. Hirano-Iwata, T. Bliss, M. Sugawara, Simultaneous monitoring of extracellular L-glutamate level and excitatory postsynaptic potential in region CA1 of mouse hippocampal slices. *Biosensors & Bioelectronics*, 26, 2975-2980 (2011).  
[doi:10.1016/j.bios.2010.11.052](https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.11.052), 査読有.
- ④ H. Chiba, Y. Deguchi, E. Kanazawa, J. Kawai, K. Nozawa, Atsushi Shoji, M. Sugawara, *In Vitro* measurements and comparison of extracellular

L-glutamate level in region CA3 of mouse hippocampal slices under chemical stimulation. *Anal. Sci.*, 26, 1103-1106 (2010).

doi: 10.2116/analsci.26.1103, 査読有.

- ⑤ A. Shoji, E. Sugimoto, S. Orita, K. Nozawa, A. Yanagida, Y. Shibusawa, M. Sugawara, A reusable liposome array and its application to assay of growth hormone related peptides. *Anal. Bioanal. Chem.*, 397, 1377-1381 (2010). doi:0.1007/s00216-3615-x, 査読有.
- ⑥ K. Nozawa, A. Shoji and M. Sugawara, Trypsin-immobilized mesoporous silica MCM-41 as a sensing system for ions and molecules. *Supramolecular chemistry*, 22, 389-395 (2010). doi:10.1080/10610278.2010.483733, 査読有.
- ⑦ T. Oka, Y. Tominaga, Y. Wakabayashi, A. Shoji, M. Sugawara, Comparison of L-glutamate levels in mouse hippocampal slices as measured with a glass capillary sensor and a patch sensor. *Anal. Sci.*, 25, 353-358 (2009). doi: 10.2116/analsci.25.353, 査読有.
- ⑧ W. Okumura, N. Moridera, E. Kanazawa, A. Shoji, A. Hirano-Iwata, M. Sugawara, Visualizing L-glutamate fluxes in acute brain slices with glutamate oxidase-immobilized slips (2009). *Anal. Biochem.*, 385, 326-333. doi: 10.1016/j.ab.2008.10.047, 査読有.
- [学会発表] (計20件)
- ① 東海林 敦, 高辻龍太郎, 柿崎郁美, 小川祥二郎, 飯田 隆, 菅原正雄, コステ

ロール誘導体リポソームを用いるストレプトリジン0 のナノポア形成能の制御とその応用, 日本分析化学会第 72 回討論会, 2012 年 5 月 20 日, 鹿児島.

- ② 西尾将人, 野澤桂一郎, 東海林 敦, 菅原正雄, グラミシジンチャンネルの平面脂質二分子膜中での挙動とイムノセンサーへの応用, 日本分析化学会第 72 回討論会, 2012 年 5 月 20 日, 鹿児島.
- ③ 竹内 亮, 野澤桂一郎, 東海林 敦, 菅原正雄, 脂質封入メソポーラスシリカのナノ細孔を用いる蛍光バイオセンシング法の基礎検討, 日本分析化学会第 72 回討論会 2012 年 5 月 20 日, 鹿児島.
- ④ 手塚竜太, 平野愛弓, 菅原正雄, 庭野道夫, 神経可塑性における放出グルタミン酸量の脳スライス内その場計測, 2012 年春季第59回応用物理学関係連合講演会, 2012年3月15日, 東京.
- ⑤ 菅原正雄, 脂質膜を用いるバイオセンシング法の高度化と応用, 日本分析化学会関東支部茨城地区技術交流会, 2011 年 10 月 28 日, 東海村.
- ⑥ 阪本美里, 東海林敦, 菅原正雄, グラミシジンを包埋したイムノリポソーム凝集体によるサブスタンス P の超高感度イムノアッセイ, 日本分析化学会第 60 年会, 2011 年 9 月 15 日, 名古屋.
- ⑦ 穂積志津子, 東海林敦, 菅原正雄, グルタミン酸濃度と興奮性シナプス後電位の同時計測: 長期増強現象とグルタミン酸濃度の関係, 日本分析化学会第 60 年会, 2011 年 9 月 15 日, 名古屋.
- ⑧ 相馬奈都美, 穂積志津子, 東海林敦, 菅原正雄, 界面スライスを対象とする埋め込みパッチセンサーの開発, 日本分析化学会第 60 年会, 2011 年 9 月 15 日, 名古屋.

- ⑨ 菅原正雄, 脂質二分子膜とチャンネルを用いる物質検知法, 電気通信研究所共同プロジェクト研究会 「ナノ・バイオの融合による新規バイオデバイスに関する研究」, 第 15 回情報バイオエレクトロニクス研究会, 2011 年 1 月 25 日, 仙台.
- ⑩ 菅原正雄, 電気で遊ぶ, 第 4 回千葉県分析化学交流会, 2010 年 12 月 27 日, 東京.
- ⑪ 壁谷充堯, 東海林敦, 野澤桂一郎, 菅原正雄, 表面プラズモン共鳴法を用いた Matrix Metalloproteinase-9 阻害活性測定法の構築, 日本分析化学会第 59 年会, 2010 年 9 月 17 日, 仙台.
- ⑫ 穂積 志津子, 池澤 香奈, 堀江 未恵子, 東海林 敦, 平野 愛弓, T. Bliss, 菅原正雄, 急性海馬スライスに電気刺激した際に放出されるグルタミン酸のリアルタイム計測, 日本分析化学会第 59 年会, 2010 年 9 月 16 日, 仙台.
- ⑬ 東海林敦, 金澤恵奈, 江口由夏, 野澤桂一郎, 菅原正雄, 海馬スライスの化学刺激に伴い放出される L-グルタミン酸の領野間分布, 日本分析化学会第 59 年会, 2010 年 9 月 16 日, 仙台.
- ⑭ 野澤桂一郎, 那須朋大, 大島 梓, 東海林敦, 平野愛弓, 庭野道夫, 菅原正雄, 平面脂質二分子膜中のメソポーラスシリカへのレセプター修飾法, 日本分析化学会第 59 年会, 2010 年 9 月 15 日, 仙台.
- ⑮ 菅原正雄, マウス海馬内のグルタミン酸計測法の開発と応用, 日本分析化学会関東支部新潟地区研究発表会, 2010 年 9 月 10 日, 新潟.
- ⑯ 菅原正雄, 東海林 敦, 野澤桂一郎, 千葉広美, 出口由佳莉, 金澤恵奈, 河合 淳, 化学刺激下の急性海馬スライスで放出されるグルタミン酸濃度の領野間分布の評価, 日本化学会第 90 春季年会, 2010 年 3 月 27 日, 大阪.
- ⑰ 野澤桂一郎, 大島梓, 東海林敦, 平野愛弓, 庭野道夫, 菅原正雄, 平面脂質二分子膜中の MCM-41 チャンネルへのレセプターその場修飾法の検討, 日本化学会第 90 春季年会, 2010 年 3 月 27 日, 大阪.
- ⑱ 東海林敦, 折田さやか, 杉本恵莉香, 野澤桂一郎, 柳田顕郎, 渋谷庸一, 菅原正雄, 再利用可能な蛍光リポソームアレイによるペプチドホルモンの同時計測, 日本化学会第 90 春季年会, 2010 年 3 月 27 日, 大阪.
- ⑲ 東海林敦, 折田さやか, 杉本恵莉香, 野澤桂一郎, 柳田顕郎, 渋谷庸一, 菅原正雄, 再利用可能な蛍光リポソームアレイを用いたペプチドホルモンの同時計測法, 日本分析化学会第 58 年会, 2009 年 9 月 25 日, 札幌.
- ⑳ 野澤 桂一郎, 菅原 正雄, ナノ細孔内酵素反応の制御に基づく分子センシング法の基礎検討, 日本化学会第 90 春季年会, 2009 年 3 月 29 日, 東京.

〔図書〕(計 1 件)

- ① Masao Sugawara and Atushi Shoji, A Glass Capillary-based Microsensor for L-Glutamate in *in vitro* Uses, Microsensors, Chapter 9, ed. By I. V. Minin and O. V. Minin, pp203-216, InTech, Rijeka, Croatia (2011).  
URL:[www.intechopen.com](http://www.intechopen.com).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

菅原 正雄 (SUGAWARA MASAO)

日本大学・文理学部・教授

研究者番号: 50002176

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし