

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20551

研究課題名（和文）生体膜機能を可視化する電気化学発光顕微鏡の創製

研究課題名（英文）Development of an electrochemiluminescence microscopy to visualise biomembrane functions

研究代表者

平本 薫 (Hiramoto, Kaoru)

東北大学・学際科学フロンティア研究所・助教

研究者番号：40963038

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、電気化学発光顕微鏡を用いて脂質二分子膜の形成をイメージングする系を構築した。平板電極上にリン脂質膜を展開し、ルテニウムビピリジン錯体とトリプロピルアミンの電気化学発光によって表面観察を行うと、1.1 V以上の電圧でわずかな発光が見られた。電圧依存的な発光は複数回の電圧掃引でも繰り返し観察できたことから、ルテニウム錯体のレドックス反応によるものと考えられる。さらに構成脂質をアニオン性・中性・カチオン性と変えると、発光が生じる電位も酸化側にシフトし、ルテニウム錯体と脂質膜の静電的相互作用により脂質膜の見え方が変化することが分かり、ラベルフリーな新規の脂質膜イメージング系を構築できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

支持脂質二分子膜は細胞膜を人工的に基板上に再構成したものであり、生命・病理に関わる細胞膜の機能を解明するための有望な分子モデル系として認識されている。生体膜の重要な要素として電気容量や抵抗が挙げられるが、これらの電気的特性を計測する手法はあるものの同時に脂質膜の平面空間情報膜を得ることは困難なため、膜機能のより深い理解と幅広い応用が制限されてきた。本研究では膜表面を電気化学的に直接観察する新たな手法として電気化学発光顕微鏡を開発し、電圧依存的に変化する発光検出システムを構築した。本研究成果により脂質膜の物理化学的特性評価と表面観察が同時に行えるようになり、生体膜研究の推進が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, a system for imaging the formation of lipid bilayers using electrochemiluminescence microscopy was constructed. Phospholipids were deposited on a flat electrode, and surface observation by electrochemiluminescence of ruthenium-bipyridine complexes and tripropylamine through the lipid bilayer was observed. The voltage-dependent luminescence could be observed repeatedly even after multiple voltage sweeps, which may be due to the redox reaction of the ruthenium complex. Furthermore, when the constituent lipids were changed to anionic, neutral or cationic, the potential at which luminescence occurred also shifted to the oxidative side, suggesting that the electrostatic interaction between the ruthenium complex and the lipid membrane altered the appearance of the lipid membrane. Through the study, a novel label-free lipid membrane imaging system was constructed.

研究分野：電気化学分析

キーワード：電気化学発光 脂質二分子膜 イメージング

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、生体分子やナノ粒子の新たなイメージング手法として電気化学発光顕微鏡 (Electrochemiluminescence microscopy) が興隆している。電気化学発光 (ECL) では電極上での酸化あるいは還元反応により発光種を励起することにより発光を得る。反応が生じた電極表面でのみ発光が生じるため、蛍光測定のようにバックグラウンド蛍光や細胞の自家蛍光に悩まされることがなく、電極-溶液界面の状態を高感度に反映する発光が得られる。申請者はこれまでに細胞の酸素呼吸を ECL で可視化する技術を報告しているが[1]、電気化学発光が界面状態に極めてセンシティブであることから、細胞の分泌物や細胞膜動態も ECL で可視化できると考えた。これまで細胞膜機能解析の汎用的な手法としては、蛍光観察や電気化学計測が用いられている。蛍光観察は比較的広い視野で検出ができハイスループットな測定に向くが、標識作業が必要、生体試料のバックグラウンド蛍光が S/N を悪化させるといった課題がある。一方電気化学計測では、細胞膜機能の重要な指標である膜抵抗や膜容量を計測することができるが、一次元情報であるため、膜上の分布やイベントの発生位置情報を把握することはできない。そこで生体膜の (電気化学的) 物性と、イメージングが同一の系で両立できる電気化学発光顕微鏡を開発し、生体膜解析の新たな手法を確立することを目指した。

2. 研究の目的

細胞は常に互いにコミュニケーションを取りながら、高度に情報処理を行い、生命活動を維持している。この情報伝達機構を解明することは、病理解明や創薬研究において極めて有用である。中でも細胞内外の物質や電子のやりとりのインターフェースとなる細胞膜機能の解析は、生理・病理機序の基礎的な理解においても、生体膜を利用した新しいバイオ素子の応用展開においても重要である。本研究では、生体膜機能の解析や薬剤開発に利用できるよう分析技術を開発することを目的として、モデル細胞組織 (スフェロイド) や人工脂質二重膜をプラットフォームとして用い、膜小胞形成や生体膜特性を、時空間分解能をもってイメージングする電気化学発光顕微鏡の技術開発を行った。

3. 研究の方法

(1) 細胞の膜小胞分泌の可視化

細胞を 3 次元環境で培養することにより作製できるスフェロイドを電極上に配置し、ルミノール誘導体の電気化学発光を利用してスフェロイド周囲の基板表面をイメージングすることにより、スフェロイドの分泌物の可視化を行った。この研究では乳がん細胞由来のスフェロイドを作製し、薬剤投与による代謝物変化を追跡した。一方、派生研究として間葉系幹細胞を用いたスフェロイドでも同様の手法を用いた代謝評価を行い、間葉系幹細胞スフェロイドの骨分化過程の代謝変化をモニターした。

(2) 人工脂質膜表面のイメージング

電極基板上に脂質膜を再構成した支持脂質二分子膜 (Supported lipid bilayer: SLB) は、膜事象を解明するための有望なモデル系である。インジウムスズ酸化物 (ITO) 電極上に両親媒性脂質である 1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DOPC) の支持脂質膜を形成し、従来の電気化学計測 (サイクリックボルタンメトリ、電気化学インピーダンス分光法) を用いてその特性を評価するとともに、電気化学発光の発光特性を解析することで、膜の空間分布のイメージングと物性との紐づけを行った。本系では電気化学発光種として発光体 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ と共反応物であるトリ-n-プロピルアミン (TPrA) を用いたが、これまでに平面支持脂質膜に電気化学発光イメージングを適用した報告はなく、脂質膜上での発光メカニズムの解明とその特性解析から取り組んだ。

4. 研究成果

(1) 細胞の膜小胞分泌の可視化

電極基板上に乳がん細胞スフェロイドを配置しインキュベーション後、ルミノール誘導体の電気化学発光によってイメージングすると、スフェロイド周辺部で輝度の減少が観察された。これはスフェロイドの分泌物による電極反応阻害に基づくものである。付着した分泌物は XRD 解析などを用いて細胞膜由来であることを確認した。輝度分布を定量化することで、生細胞と死細胞の代謝の違いの検出することが可能であった (Fig. 1)、さらに、スフェロイドに呼吸鎖阻害剤を投与した際の呼吸量と分泌物の変化を電気化学発光顕微鏡で観察すると、阻害剤投与に伴い呼吸量は減少し、一方で分泌物は増加するという傾向がみられた[2]。電気化学発光顕微鏡では複数スフェロイドを一度に評価できることから、従来の電気化学計測と比較してハイスループット化が可能である。本測定系により膜性物質の分泌を指標としたスフェロイドの薬効評価系への展開が期待できる。

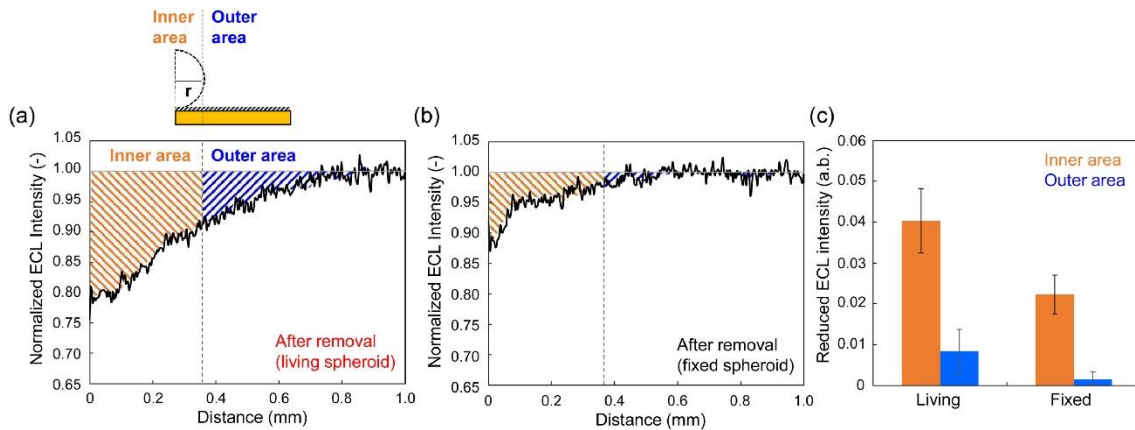


Fig. 1 スフェロイド配置後の基板の電気化学発光分布。生細胞スフェロイドでは代謝活動により分泌物が多いためスフェロイド配置部分で電気化学発光輝度の大幅な減少がみられた。この輝度分布を取得することでスフェロイドの代謝活動の大きさを評価できる。Reproduced with permission from Ref. [2] Copyright 2023 Elsevier.

さらに、派生研究として、同様のルミノール誘導体の電気化学発光を用いて、骨分化過程における間葉系幹細胞スフェロイドの酸素消費評価を行った。並行して、マイクロ流体デバイス内でスフェロイドと血管内皮細胞を共培養し、スフェロイドの血管誘導能を調査した。これらの関係から、骨再生の移植材料として期待される間葉系幹細胞スフェロイドの代謝変化について報告した[3]。

(2) 人工脂質膜表面のイメージング

DOPC 単体および、DOPC とコレステロール、カチオン性脂質、アニオン性脂質などの混合脂質を用いて ITO 電極上にモデル生体膜を作製した。正立顕微鏡下に ITO 電極を置き、 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{TPrA}$ の溶液中でサイクリックボルタンメトリを行いながら ECL 発光のイメージングを行うと、脂質膜形成領域では、脂質膜がない領域と比較して遅れて発光が生じ、電位の上昇とともに発光が増強した。 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{TPrA}$ の発光ルートは複数あり、発光種の混合比、印加電位、溶液 pH、温度などによって支配的なルートが変わる(Fig. 2)。また、TPrA は親水性表面では反応しにくいという特徴がある。このような表面の親和性と $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ と TPrA それぞれの膜透過性の違いから、電位シフトを伴って脂質膜を介した発光が得られたと考えられる。また高い電位では脂質膜の境界が曖昧になったが、これは発光種の拡散層が脂質膜 (数 nm) の厚みを超えて溶液に拡散したためと考えられる。これらの結果を元に、DOPC 単体と混合脂質との電気化学発光での見え方を検証すると、カチオン性脂質含有により発光開始電位が高電位側に、アニオン性脂質含有により低電位側に電位シフトがみられ、電気化学発光顕微鏡により、脂質膜組成や表面電荷を反映したイメージングが可能であることが示唆された。これらの成果の一部は、国内外の学会で発表するとともに論文投稿準備中である。

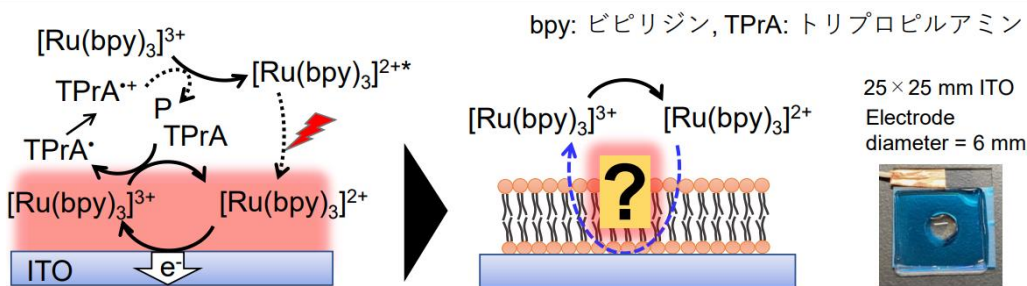


Fig. 2 ITO 電極上での $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{TPrA}$ の発光メカニズムの一例 (他にも複数のルートが報告されている)。透過性の違いにより脂質膜領域では発光電位・輝度が変化する。

参考文献

- [1] K. Hiramoto et al., Biosensors and Bioelectronics, 181, (2021), 113123.
- [2] K. Hiramoto et al., Electrochimica Acta, 458, (2023), 142507.
- [3] K. Hiramoto et al., Electrochimica Acta, 491, (2024), 144291.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 K. Hiramoto K. Komatsu R. Shikuwa A. Konno Y. Sato A. Hirano-Iwata K. Ino H. Shiku	4. 巻 458
2. 論文標題 Evaluation of respiratory and secretory activities of multicellular spheroids via electrochemiluminescence imaging	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Electrochimica Acta	6. 最初と最後の頁 142507
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.electacta.2023.142507	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 T. Ma K. Watabe M. Komiya K. Hiramoto X. Feng D. Tadaki A. Hirano-Iwata	4. 巻 -
2. 論文標題 Optical properties of ultrathin biohybrid membranes: implications for optoelectronic applications	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 ACS Applied Nano Materials	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsnm.3c04080	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 該当する

1. 著者名 K. Hiramoto A. Konno Y. Nashimoto A. Hirano-Iwata K. Ino H. Shiku	4. 巻 491
2. 論文標題 Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cell spheroids: A microfluidic device and electrochemiluminescence imaging study	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Electrochimica Acta	6. 最初と最後の頁 144291
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.electacta.2024.144291	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8件（うち招待講演 3件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 平本薫, 伊野浩介, 宿輪諒太, 平野愛弓, 珠玖仁
2. 発表標題 電気化学発光イメージングによる細胞分泌活動の観察
3. 学会等名 電気化学会第90回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平本 薫
2. 発表標題 電気化学発光による細胞機能の可視化
3. 学会等名 令和4年度共同プロジェクト研究発表会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kosuke Ino, Kaoru Hiramoto, Keika, Komatsu, Yuji Nashimoto, Hitoshi Shiku
2. 発表標題 Electrochemiluminescence Imaging of Respiratory Activity and Cellular Secretion of Three-Dimensional Cultured Cells
3. 学会等名 73rd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 K. Hiramoto K. Ino A. Hirano-Iwata and H. Shiku
2. 発表標題 Developing electrochemiluminescence imaging method for the study of supported lipid bilayers
3. 学会等名 International Society of Electrochemistry 74th Annual Meeting (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 K. Hiramoto
2. 発表標題 On the use of Electrochemiluminescence Microscopy: keys to visualizing biological phenomena
3. 学会等名 International Virtual Nanopore Weekly Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平本 薫
2. 発表標題 細胞活性測定のための電気化学インターフェース
3. 学会等名 Chem-Bio Joint Seminar 2023 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 K. Hiramoto
2. 発表標題 Electrochemical measurement techniques for the evaluation of 3D cell models
3. 学会等名 日本表面真空学会学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平本 薫 伊野 浩介 平野 愛弓 珠玖 仁
2. 発表標題 脂質二分子膜の新規電気化学発光イメージング
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第48回研究会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------