

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 24 日現在

機関番号：32619

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560223

研究課題名(和文)分子インプリント高分子を利用した神経伝達物質用高速センサの開発

研究課題名(英文)Development of a neurotransmitter-sensor using molecularly imprinted polymer

研究代表者

吉見 靖男 (Yoshimi, Yasuo)

芝浦工業大学・工学部・教授

研究者番号：30267421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：脳・機械インターフェイス(BMI)の開発のため、中枢神経系内の神経伝達物質を捉えるセンサの開発を試みた。電極の表面に、伝達物質セロトニンを鑄型として、メタクリル酸、エチレングリコールジメタクリレート、ビルフェロセンを共重合し、分子インプリント高分子(MIP)固定電極を得た。また鑄型を加えずに、同じモノマーで非インプリント高分子(NIP)固定電極も得た。両電極電流値の差は、セロトニンを選択的に検出できた。一方、アメフラシ神経のS-クラスターは、学習を反映した味覚刺激に応答することを見出した。MIPおよびNIP電極をS-クラスター内に留置することにより、BMIのモデルの構築が可能である。

研究成果の概要(英文)：We attempted a neurotransmitter-sensor using molecularly imprinted polymer (MIP). Poly(Methacrylic acid-co-ethyleneglycoldimethacrylate-co-vinylferrocene) was grafted onto indium-tin oxide electrodes imprinted with serotonin. The differential current between the grafted electrodes imprinted or non-imprinted with serotonin was sensitive to serotonin with selectivity. The result indicated that pair of the imprinted and the non-imprinted electrodes are useful as a serotonin sensor. We also discovered S-cluster in Aplysia buccal ganglion response to taste stimulation with indicating learning. Then those results indicates that pair of the grafted electrodes implanted in the S-cluster of Aplysia would be helpful for development of a new model of brain-machine interface by detection of serotonin release regulated by learning of the animal for control of machine.

研究分野：バイオエレクトロニクス、医用化学工学

キーワード：分子インプリント高分子 分子認識 セロトニン バイオセンサ グラフト重合 電子移動 神経 学
習

1. 研究開始当初の背景

記憶や判断などの脳の高度な情報処理機構は、神経細胞間の伝達物質の授受によって成されていることは古くから知られている。神経伝達物質の挙動を解析するには、核磁気共鳴法 (NMR) や陽電子トモグラフィ (PET) で行われている。これらの方法は、非侵襲的であり、脳の機能を阻害せずに分析できる利点があり、脳の情報処理機構の開明に大きく貢献してきた。また、これらの技術は伝達物質の過不足と脳疾患の解明に貢献し、さらには脳疾患の診断法としても威力を発揮してきた。しかしながら、神経細胞のクラスターレベルで伝達物質の挙動を解析できるほどの時間的または空間的解像度を実現していないことが、脳の研究や診断用ツールとしての限界を与えていた。

また脳内神経細胞のシグナルを接触した電極の電流として捉え、それに基づいて義肢などを操作する BMI の開発が進んでいるが、電流は数ピコアンペアと微弱なため、ノイズの影響を受けやすいという欠点がある。

2. 研究の目的

分子インプリント高分子 (molecularly imprinted polymer: MIP) は、重合の際に添加された任意の鑄型に対する特異結合能を付与された合成高分子である。申請者は、グラフト重合法によって MIP を固定した電極が、鑄型の濃度に依存して透過速度を変化させる現象 (ゲート効果) を示すことを発見した。この現象を利用することで、高感度 (μM オーダー)、高選択性 (キラル識別も可能) かつ高速応答 (数百 msec ~ 数 sec) の鑄型のセンシング法の開発に成功しており、これらの特性は、BMI 用センサに適していると考えられる。そこで本研究期間においては、神経伝達物質を鑄型とした MIP を電極上にグラフトし、神経細胞にほぼ匹敵する高感度、高選択性、高速応答能を有するセンサを開発する。さらには、開発したセンサで、アメフラ

シ神経節中の神経伝達物質を検出し、行動と伝達物質の挙動との関係を解析できることを証明する。

抗体のような特異結合能を有しながら簡便に合成できる MIP は、長らくその実用性を見いだすことはできなかった。しかし申請者は、MIP が鑄型に対して著しい透過速度変化を呈するゲート効果を発見した。この性質を利用することで、ナノメートルオーダーの厚みの MIP 膜を電極表面に固定して、ファラデー電流の変化を検出すれば、鑄型とした検出対象物質の濃度変化を迅速に検出できるセンサを何種類か開発している。神経伝達物質は放出や回収が迅速であり、放出量も微量で、種類も多い。BMI に利用するには、この神経伝達物質を神経細胞に匹敵する高速、高感度、高選択的にセンシングする方法が望まれるが、そのような技術は世界的にも開発例は他に皆無である。申請者が開発したゲート効果によるセンシングは、様々な物質に対してテーラーメイド的に対応でき、感度、応答速度、選択性に優れているため、神経中の伝達物質の脳内挙動解析用センサに発展する可能性が高い。

3. 研究の方法

3-1. セロトニンに対する MIP 固定電極の作製および *in vitro* 評価

- (1) インジウムスズ酸化物 (ITO) の表面に 3-アミノプロピルトリメトキシシランでアミノ基を導入した。このアミノ基を 4-クロロメチル安息香酸とペプチド結合反応させて、ITO 表面にクロロメチル基を導入した。さらにジメチルジチオカルバミドナトリウムと反応させ、ITO 表面に光重合開始剤機能を有した官能基 (ジエチルジチオカルバミルベンジル基) を固定した。
- (2) 鑄型とするセロトニン、機能性モノマーメタクリル酸、架橋性モノマーとしてメチレンビスアクリルアミドまたはエチ

レングリコールジメタクリレートを溶解した。

- (3) 溶液を石英板と開始剤固定 ITO の間に挟み、キセノンランプ光を照射し、グラフト重合を生じさせた。その後、1 M の塩化ナトリウム水溶液で洗浄して、MIP 固定電極を得た。
- (4) セロトニンを加えずに(2)、(3)の手順で、非インプリント高分子 (NIP) 固定電極を作製した。
- (5) (2)の過程にレドックス性モノマービニルフェロセンを加えてフェロセン導入 MIP 固定電極、NIP 固定電極を作製した。
- (6) セロトニンまたはその構造類似物質 L-トリプトファンを含む緩衝液中で得られた電極の微分パルスボルタメトリーを行い、感度と選択性を評価した。

3-2. 食物を介した学習機能獲得の観察法の開発

アメフラシは海藻の味覚に対して明確な嗜好性が有る。この性質を利用して学習機能を評価した。

- (7) 口球を摘出し、神経の接続を保持したまま口球神経節（味覚の認識および口球運動を司る微小脳）を剥離した。
- (8) 口球神経節を覆う保護膜を剥離して、神経細胞を露出した。
- (9) 膜電位感受性色素 Di-4-ANEPPS で神経細胞を染色した。
- (10) 口球神経節を蛍光顕微鏡で観察しながら、口球にアメフラシが好む味覚刺激剤（ワカメ抽出液、ノリ抽出液、アスパラギン水溶液）や嫌う味覚刺激剤（アスパラギン酸水溶液、マグサ抽出液）の注入した。味覚刺激から、神経興奮までのタイムラグと味覚の好悪の関係を調べた。
- (11) アメフラシが好むアスパラギン水溶液を、口球に投与しながら電気ショックを与え、同味覚を拒絶するように学習させ

た。その後、口球と口球神経節を取り出し、味覚に対する神経の応答速度を評価した。

4. 研究成果

(A) セロトニンセンサの開発

ビニルフェロセンを用いずに作製された MIP および NIP 電極は、いずれもセロトニン濃度およびトリプトファン濃度に依存する電流を発生した。しかし EDMA を架橋剤に用いた両電極の検出電流の差は、トリプトファンに対して感受性が無いものの、セロトニンに対しては感度を示した（図 1）。一方、MBAA を架橋剤に用いた場合の両電極の電流差は、セロトニンにもトリプトファンにも依存した。この結果は、疎水性である EDMA を架橋剤に用いた MIP が、剛性によって厳密に鑄型を識別できることを示している。

次に架橋剤に EDMA を用い、重合の過程でビニルフェロセン (VFc) を加えて作った MIP 電極、NIP 電極の微分パルスボルタメトリーを行い、両電極の電流差を取った。その結果、VFc を用いた電極は、用いないものの 4 倍程度の高い感度を示した。これは、ビニルフェロセンが、MIP のサイトに捉えられたセロトニンと ITO 電極間の電子移動を著しく促したことを示している。本結果より、ビニルフェロセン、EDMA、メタクリル酸で NIP および、セロトニンを鑄型とした MIP の固定電極の差分電流を取ることで、セロトニンを検出できることが確認された。

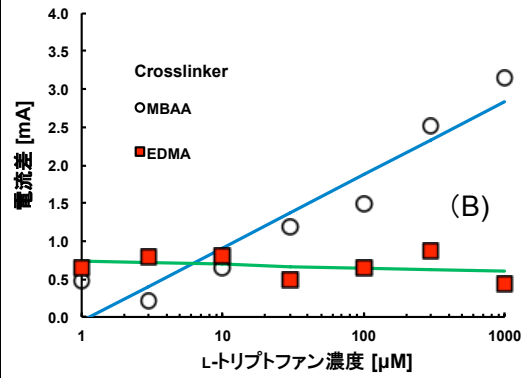
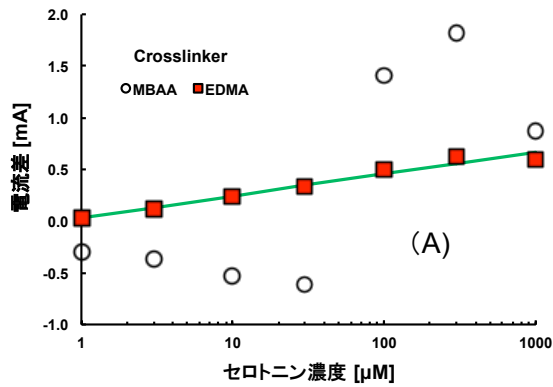


図 1 : MIP 電極および NIP 電極の電流値差の (A) セロトニン濃度、(B) L-トリプトファン濃度依存性

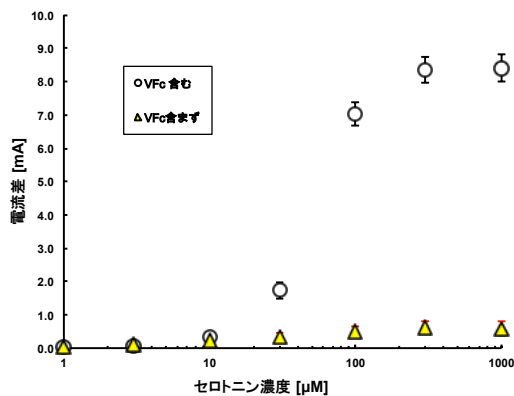


図 2 : MIP 電極および NIP 電極の電流値差のセロトニン感度に与える、VFc の有無の影響

(B) 味覚に対する学習の解析

口球神経節神経節を膜電位感受性色素で染色し、この神経節と接続した口球に、味覚刺激を与え蛍光強度変化から味覚応答を感知した。その結果、口球に味覚が与えられると、特定部位 (S-クラスター) の神経細胞が一斉に興奮する様子が観察できた。アメフラシが好む味覚 (L-アスパラギン水溶液、ワカメ抽出液、海苔抽出液) を口球に与えると、4 秒のタイムラグを置いて興奮するのに対し、嫌う味覚 (L-アスパラギン酸水溶液、マクサ抽出液、純水) を与えると、タイムラグは 2 秒であった。さらに好む味覚を与えながら電気ショックを与え、その味覚を嫌うように学

習させると、やはりその味覚に対しては約 2 秒のタイムラグで応答した。実際、動物が誤った食物を素早く吐き出さなければならないことから、この結果には合理性があり、S-クラスター神経細胞には、味覚認識の好悪を示したシグナルが入力されていることがわかった。

S-クラスター細胞の応答速度はセロトニンで制御されていることは既往研究 (*Comp Biochem Physiol C* 155: 151–159, 2012) で分かっている。また BMI の原理は、患者がセンサを介してアクチュエーターを動かすのに最適な神経シグナルを学習することによるものである。その部位で放出される神経伝達物質をセンシングすることにより、アメフラシの意志に応じた BMI のモデルが構築できる可能性が示された。

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 0 件)

[学会発表] (計 6 件)

山口和哉, 吉見靖男「分子インプリントポリマーを用いたセロトニンセンサの開発」日本膜学会年会 2016 年 5 月, 東京

柳貴人, 吉見靖男「蛍光膜電位イメージングによる学習がアメフラシ味覚神経系に与える影響の解析」日本膜学会年会 2016 年 5 月, 東京

吉見靖男, 柳貴人「膜電位イメージングを用いたアメフラシ神経の学習機能の解析」電気化学学会年会 2016年3月, 大阪

吉見靖男, 柳貴人, 長濱辰文「膜電位感受性色素を用いたアメフラシ中枢神経系における味覚認識と学習の解析」日本膜学会膜シンポジウム 2015年11月, 神戸

吉見靖男「レドックス種を内在した分子インプリント固定電極によるリエージェントレスセンシング」日本膜学会年会 2015年5月, 東京

吉見靖男「ゾルゲル法でインジウム・スズ酸化薄膜を形成した分子インプリント高分子固定微小電極」化学センサ研究発表会, 2014年9月, 札幌

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1件)

名称: 「分子インプリント高分子薄膜を用いたセンサ」

発明者: 吉見靖男

権利者: 芝浦工業大学

種類: 特許

番号: 2015-042755

出願年月日: 2015年3月4日

国内外の別: 国内、国外両方

○取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉見靖男 (YOSHIMI, Yasuo)

芝浦工業大学・工学部・教授

研究者番号: 30267421

(2) 研究分担者

無し ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

無し

研究者番号: