

多機能ナノ電気化学顕微鏡システムの創成

Multifunctional Nano-Scanning Electrochemical Microscopy

末永 智一 (MATSUE TOMOKAZU)
東北大学・大学院環境科学研究科・教授



研究の概要

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修飾，近接場光計測及びイオン電流計測を付加した多機能ナノ電気化学顕微鏡を開発すると共に単一細胞レベルでの多項目定量解析手法を確立し，新規細胞診断システムへ展開させる。

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ところにある。

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とする。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ている。

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したい。

3. 研究の方法

次の6つのサブ研究テーマを遂行する。

- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 6) 受容体発現量-病態の系統的解析

4. これまでの成果

- (1) フィードバック距離制御システム確立
細胞表面の 10 nm 程度の形状起伏，及び形状の時間変化をイメージング可能なフィードバック距離制御システムを確立した。
①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制御が可能となった。
②アルゴリズム変更によりシアフォースフィードバック距離制御およびイオン電流に基づく距離制御を高速化した。これにより膜受容体の活性化に起因した細胞形状の時間変化の追跡を達成した。

- (2) 多機能ナノ電極による単一細胞機能の高

〔4. これまでの成果 (続き)〕 解像度イメージング

①酵素修飾ナノ電極

白金線を挿入した石英管を最尖化する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し、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。さらに、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や Os 錯体で修飾した過酸化水素電極の作製に成功した。また、酵素検出型酵素センサを開発し、細胞の呼吸活性計測を行った。

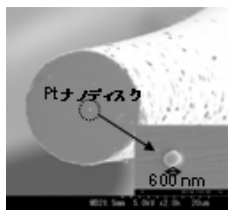


図1. Pt ナノディスク電極

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金属のスパッタ蒸着, 及び絶縁用電着塗料の被覆により, 先端径 500 nm 以下の多機能プローブの作製に成功した。このプローブで, 酵素パターン表面の形状起伏と, 酵素活性分布の高解像度同時イメージングに成功した。さらに, 単一細胞の形状, 活性, 受容体発現の3系同時計測に成功した。

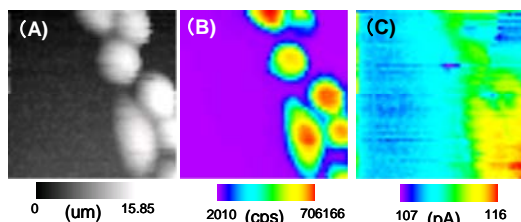


図5. 光ファイバ/ナノリング電極を用いた単一細胞の形状(A), 活性(B), 及びEGFR認識抗体の標識酵素活性(C)の同時イメージング。

③イオン選択性ナノ電極

K イオン選択性電極を作製してシアフォース距離制御システムに搭載し, 直径 10 μ m 程度のナフィオンスポットの形状と 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

リング電極を用いて単一細胞の電場破碎と mRNA 回収を実現した。また, 2つの開口を有する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。

5. 今後の計画

(1)シアフォース, 及びイオンコンダクタンスによる距離制御の精度をサブマイクロメートルレベルに上げ, 細胞や細胞に発現す

るタンパク質(各種機能分子, 受容体, イオンチャンネルなど)の分布および機能解析を行えるシステムとする。

(2)ナノピペット/ナノリング電極をさらに高解像度化し, イオンチャンネルなど細胞に発現するタンパクの機能と形状を高解像度に同時イメージングを行う。さらに, mRNA などの生体成分の回収や放出を行うプローブと電気化学計測用電極を組み合わせ, 同時多角的な細胞機能評価を行う。

(3)イオンチャンネルや受容体を含む, 細胞が発現するタンパク質の発現量および機能と疾病の関連性についてさらに調査解析を進め, 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目指す。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)
(研究代表者は太字, 研究分担者は二重下線, 連携研究者は一重下線)

1) 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.

2) 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.

3) 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

4) 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

5) Topographic, Electrochemical, and Optical Images Captured Using Standing Approach Mode Scanning Electrochemical/Optical Microscopy., Y. Takahashi, Y. Hirano, T. Yasukawa, H. Shiku, H. Yamada, **T. Matsue**, *Langmuir*, 2006, 22, 10299-10306.

ホームページ等

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