

## V. 委託テーマの成果詳細

## ① バイオ・有機材料融合プロセス技術の開発

### V-1 ①-A バイオ材料融合プロセス技術の開発

#### (1A) バイオ・ナノ界面融合プロセス技術

##### (1A)-1 脂質二重膜の安定形成プロセスの開発

##### (1A)-1-1 脂質二重膜の安定形成の条件検討と評価実験装置の導入

##### (1A)-1-1-1 概要

研究の背景として、今後迎える本格的な高齢社会における大きな問題の一つとして、医療費の増加があり、その抑制が求められている。この解決策として重要視されているのは、日常の健康管理による病気予防と、病気を早期発見して進行を防ぐことである。特に、近未来の健康医療の課題は、高齢化に伴う慢性的な健康障害に対して、患者の QOL を損ねることなく診断治療することと言える。そのために、超高感度で生体情報や生体物質をセンシングできるセンサーを有し、体表に貼り付けられる、または体内に埋め込むことができる健康状態の常時モニタリングシステムなどの開発が期待されている。現在、体内埋め込み型で組成成分情報を連続計測できるセンサーの研究開発が各方面で進んでいる。しかしながら、実用化されているデバイスは、電位を計測する電極や、MEMS 技術を使った温度モニターといった物理センサーに限られており、医療や健康の分野で期待される生体内成分をモニターする化学量センサーについては十分な性能を発揮するものがない。この原因として、体内組織の炎症反応によるセンサーの劣化や、センサー周囲への被包形成があげられる。これらは生体内成分を特に長期間連続計測する上での代表的な障害であり、組織反応を防ぐ、或いは、センサーにとって都合のよい組織反応を提示できるデバイス界面の形成プロセスの開発が急務である。

上記のように、次世代の健康・医療・環境分野で必要とされているデバイス開発には、高感度、高効率、生体・環境適合などの機能や機構を実現する製造プロセスが必要である。このため、従来のシリコンを中心とする無機ドライ材料に加え、合成有機分子や生体分子、細胞、組織、微生物などのバイオ・有機材料の持つ特異的な機能を活かす融合プロセスの研究開発が不可欠である。

そこで、本研究開発項目では、これまで MEMS プロセスで扱うことが困難であった、バイオや合成有機材料をデバイス内で機能する素子として扱えるように加工し、利用する基盤プロセスを確立する。具体的には、バイオ界面長期安定形成プロセスであり、将来の埋め込みデバイスや超高感度分子計測デバイスの研究基盤を創出するために、脂質膜がデバイス内で長期安定して機能し、生体計測を続けられる界面の形成プロセス技術を開発する。

昨年度は、「4チャンネル同時に電氣的に独立して計測できる脂質二重膜を形成する方法を開発する」を実施項目とし、結果として以下を得た。

- ・ 脂質二重膜を形成できるマイクロ流路とマイクロチャンバーの形成プロセスを開発した。
- ・ 金による電極形成プロセスの開発に成功した。
- ・ 独立したマイクロチャンバーに電極を形成することにより、独立した電流計測が確認できた。

本報告書では、昨年度開発した脂質二重膜の形成法を更に安定して機能させるために、脂質二重膜関連実験装置を導入して、脂質の種類、濃度、溶液の流速、デバイスの材料などの検討の結果を報告する。

また、昨年度開発した電氣的に独立して計測できる脂質二重膜を形成する方法を利用し、実際の膜たんぱく質の電流計測を実施したため、その結果も合わせて報告する。

#### 【実施項目】

平成20年度に開発したマイクロ流路を用いた脂質二重膜の形成法を安定して機能させるために、脂質二重膜関連実験装置を導入して、脂質の種類、濃度、溶液の流速、デバイスの材料などを検討する。

#### (1A)-1-1-2 脂質二重膜の安定形成法の検討

始めに、昨年度に開発した脂質二重膜の形成法について要約する。脂質二重膜の形成法は「接触法」を応用したものである。この「接触法」は、まず、有機溶媒中に脂質を溶かし、水滴を導入する。脂質は、親水基と疎水基からなるため、水と有機溶剤との界面には脂質の一重膜が形成される。こうした水滴を2つ用意し、双方をマイクロ流体デバイス内で接触させることで、脂質二重膜を再構成することに成功している。<sup>1)</sup> 昨年度は、この「接触法」を更に発展させ、マイクロ流路内にアレイ状で脂質二重膜の形成を実現した。

具体的な方法は、マイクロ流路と多数のマイクロチャンバーを持つデバイスに、マイクロシリンジおよびマイクロシリンジポンプを用いて、流体（1<sup>st</sup> バッファ、脂質、2<sup>nd</sup> バッファ）を連続的に流すことにより、マイクロチャンバーに脂質二重膜を形成する。<sup>2)</sup>

本年度は、昨年度開発した脂質二重膜形成方法を更に安定させるために、デバイスの材料検討や膜の形成条件である脂質の種類や濃度、溶液の流速について検討を行った。

## ■デバイス材料の検討

### a. デバイス材料

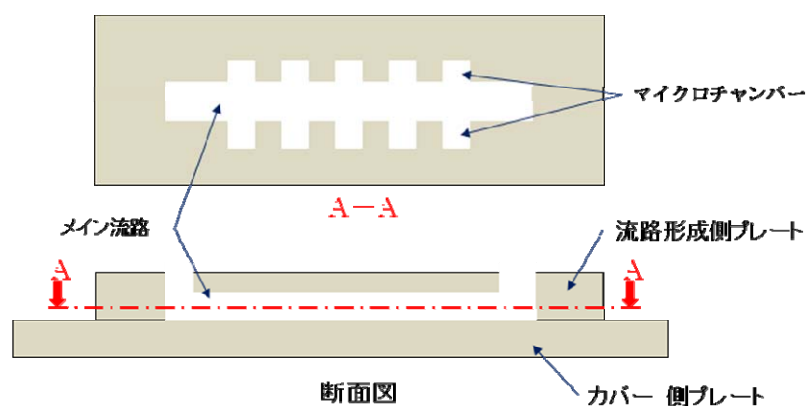
昨年度は、デバイスの材料として PDMS（ポリジメチルシロキサン:Polydimethylsiloxane）を使用した。この PDMS はシリコーンゴムの一種であり、モールドイング（型取）により、サブミクロン程度の微細構造が製作できる。無色透明で、自己接着性があり、細胞に対して悪影響を与えないなどの特長を持つことから、バイオ分野において広く用いられる材料である。

この PDMS に加え、今回、新たに硬質ガラス（パイレックスガラス:PYREX）を検討した。このパイレックスガラスは、ケイ酸（シリカ:SiO<sub>2</sub>）を主成分に、少量のホウ酸（B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>）を添加したガラスで、耐熱性、耐久性が高く、熱膨張率が低いことに特長があり、耐熱食器などに一般的に使用されている材料である。

### b. デバイスの構造

デバイスは2枚のプレートで構成されており、1枚は流路形成側プレート、もう1枚はカバープレートであり、この2枚のプレート同士を張り合わせてデバイスを製作する。（図①-(1A)-1-1.1 デバイスの構造）

ここで、流路形成側プレートに PDMS 材料を使用したものを PDMS デバイスとし、ガラス材料を使用したものをガラスデバイスと呼ぶ。（表①-(1A)-1-1.1 各デバイスと材料の関係）



図①-(1A)-1-1.1 デバイスの構造

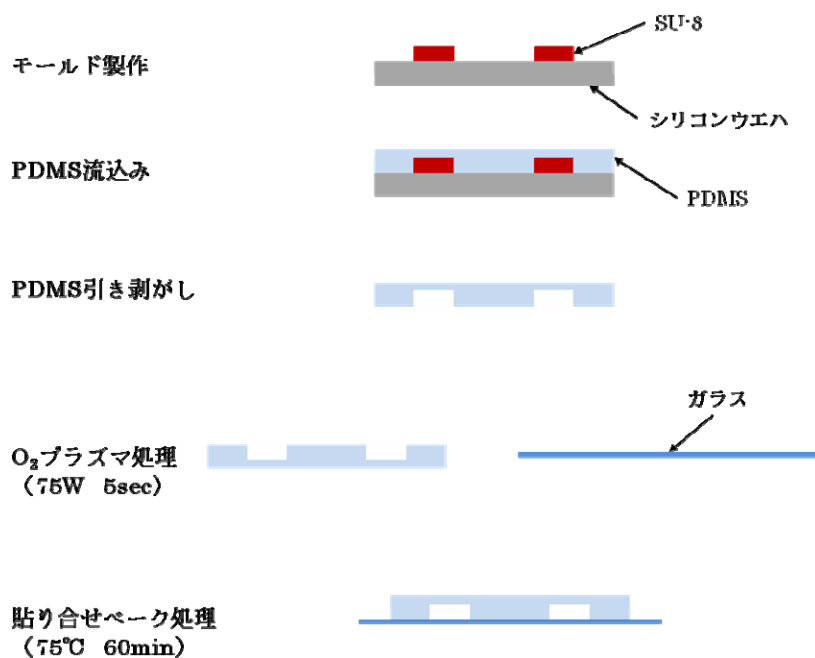
表①-(1A)-1-1.1 各デバイスと材料の関係

	流路形成側プレート	カバープレート
PDMSデバイス	PDMS	ガラス
ガラスデバイス	ガラス	ガラス

### c. PDMSデバイスの製作

モールドイング（型取）により、流路形成側プレートを PDMS で製作した。モールド（型）は、SU-8（化薬マイクロケム株式会社）と呼ばれるエポキシ樹脂ベースのフォトレジストを用いて一般のフォトリソプロセスにより製作した。

この流路形成側プレートとカバープレートに  $O_2$  プラズマ処理を行った後に張り合わせ、ベーク処理を行いデバイスを製作した。以下に PDMS デバイス製作工程と実際の PDMS デバイスの写真を示す。（図①-(1A)-1-1.2 PDMS デバイス製作工程、図①-(1A)-1-1.3 PDMS デバイス写真）



図①-(1A)-1-1.2 PDMS デバイス製作工程



図①-(1A)-1-1.3 PDMS デバイス写真

#### d. ガラスデバイスの開発

ガラスデバイスの製作は、今回、初めての試みである。構造としては PDMS デバイスと同じであるが、ガラスに流路を掘りこむため、ガラスエッチングプロセス（ガラスにエッチングすることで流路を形成するプロセス）の検討が新たに必要となった。

まずは、ガラスのエッチングプロセス検討について示す。

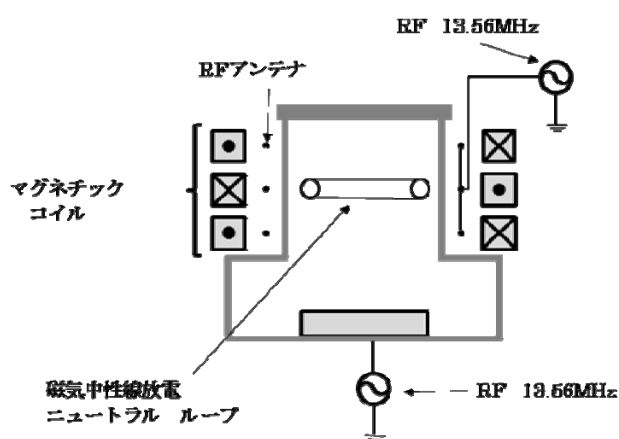
##### ア. ガラスエッチングプロセスの検討

昨年度導入した磁気中性線放電（NLD:Neutral Loop Discharge）プラズマ装置（図①-(1A)-1-1.4 エッチング装置外観写真）を使用して、ガラスエッチングを行った。

磁気中性線放電プラズマ装置は、真空中に磁場ゼロの点が連なって形成される線のところに電場を印加することによって生成されるプラズマを利用してエッチングする。（図①-(1A)-1-1.5 エッチング装置概略）このプラズマの特長として、電子が磁気中性線近傍で特殊な運動により印加された電磁エネルギーを効率良く吸収し、低圧で高密度プラズマの生成ができることである。この磁気中性線プラズマ装置を用いて、以下に示す流路形成仕様を満たすエッチングパラメータの検討を行った。



図①-(1A)-1-1.4 エッチング装置外観写真



図①-(1A)-1-1.5 エッチング装置概略

【エッチング試料】

- ・パイレックスガラス (50mm×70mm 厚み 0.7mm)

マスクは SU-8 レジスト (厚み 25 $\mu$ m) をフォトリソプロセスによりパターンニングして使用した。

【流路形成エッチング仕様】

- ・エッチング深さ 10 $\mu$ m 程度
- ・エッチングレート 0.4 $\mu$ m/min 以上
- ・テーパ角 80° 以上
- ・エッチング面が荒れないこと

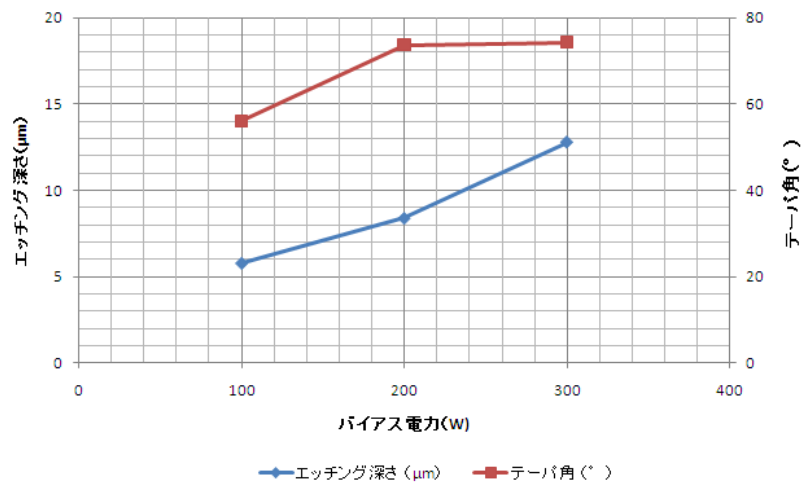
【エッチングパラメータの検討】

エッチング深さやエッチング表面粗さ等に寄与する主なパラメータとして、バイアス電圧とプロセスガス流量がある。今回は、この2つのパラメータを可変させ、エッチング特性の確認を行った。

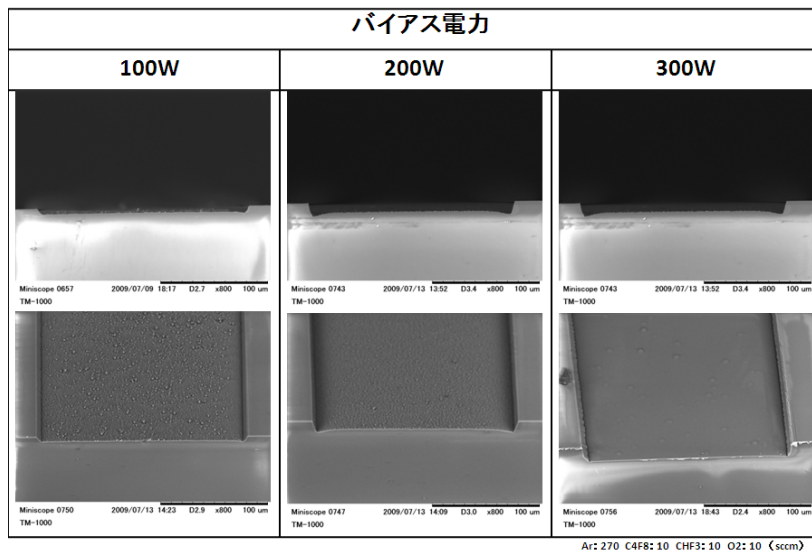
○バイアス電圧

バイアス電圧を増加させることにより、エッチング深さおよび、テーパ角の増加傾向が確認できた。(図①-(1A)-1-1.6 バイアス電圧可変 エッチング結果)

また、エッチング面の平滑性についてもバイアス電圧を増加させることにより、平滑な面となることを確認できた。(図①-(1A)-1-1.7 バイアス電圧可変 エッチング結果 (SEM 写真)) 本結果からバイアス電圧を一旦 300W に設定し、次にプロセスガス (C<sub>4</sub>F<sub>8</sub>) 流量を可変させ特性を確認した。



図①-(1A)-1-1.6 バイアス電圧可変 エッチング結果

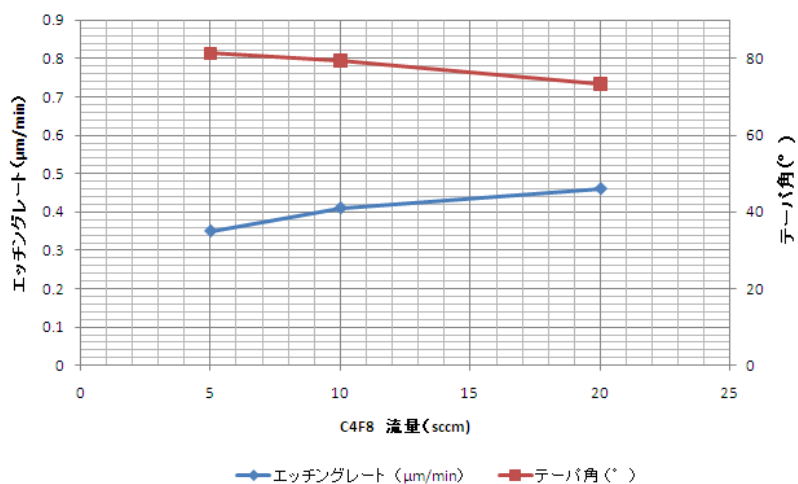


図①-(1A)-1-1.7 バイアス電圧可変 エッチング結果 (SEM 写真)

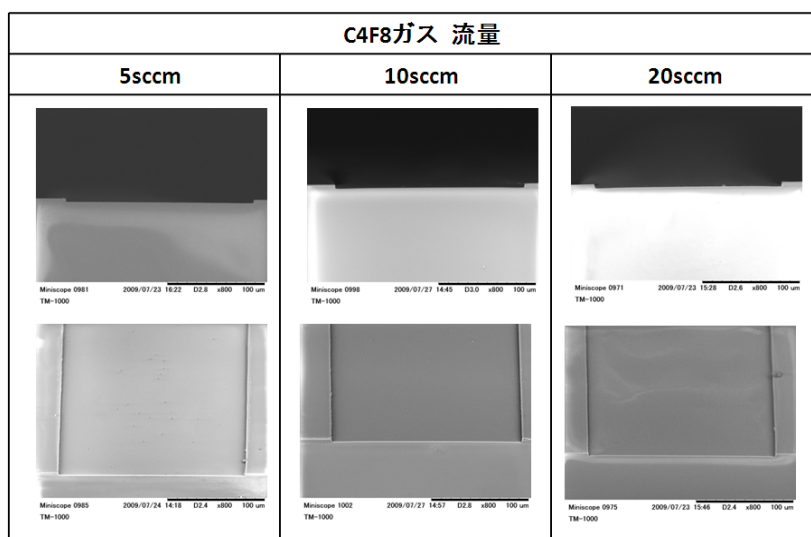
○プロセスガス流量

プロセスガス ( $C_4F_8$ ) 流量を増加させるとエッチングレートは増加するが、テーパ角は減少することが確認された。(図①-(1A)-1-1.8 プロセスガス流量可変 エッチング結果) 一方、エッチング面の平滑性については、特に変化は見られなかった。(図①-(1A)-1-1.9 プロセスガス流量可変 エッチング結果 (SEM 写真))





図①-(1A)-1-1.8 プロセスガス流量可変 エッチング結果



図①-(1A)-1-1.9 プロセスガス流量可変 エッチング結果 (SEM 写真)

○パラメータ検討のまとめ

【各パラメータの特性】

- ・バイアス電圧増→エッチング深さ増およびテーパ角増
- ・プロセスガス (C<sub>4</sub>F<sub>8</sub>) 流量増→エッチングレート増およびテーパ角減

【エッチングパラメータの最適値】

- ・バイアス電圧：300W
- ・プロセスガス (C<sub>4</sub>F<sub>8</sub>) 流量：10sccm

#### イ. エッチングによる流路形成側プレートの製作

上述したエッチングパラメータ検討を基に、パラメータを決定し、流路形成側プレートを製作した。

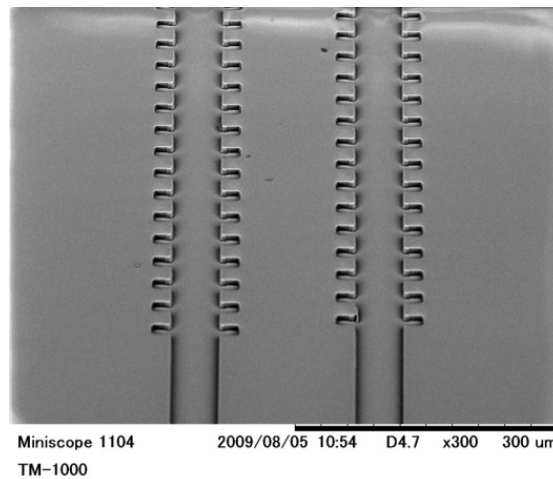
【エッチングパラメータ】

- ・ バイアス電圧  
300W
- ・ プロセスガス流量  
C<sub>4</sub>F<sub>8</sub> ガス 10sccm  
CHF<sub>3</sub> ガス 10sccm  
Ar ガス 270sccm  
O<sub>2</sub> ガス 10sccm

【エッチング結果】

表面の平滑性も良好な、微細なエッチング加工を実現できた。

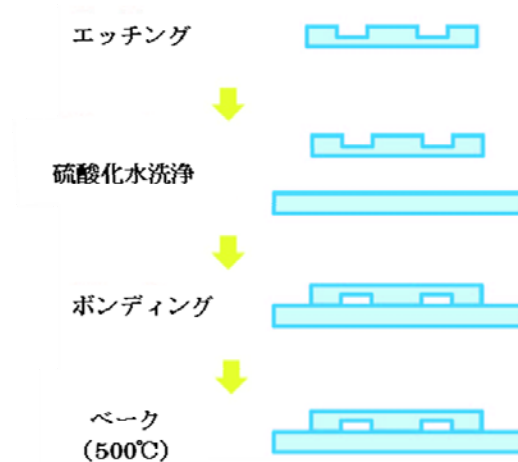
(図①-(1A)-1-1.10 流路エッチング結果 (SEM 写真))



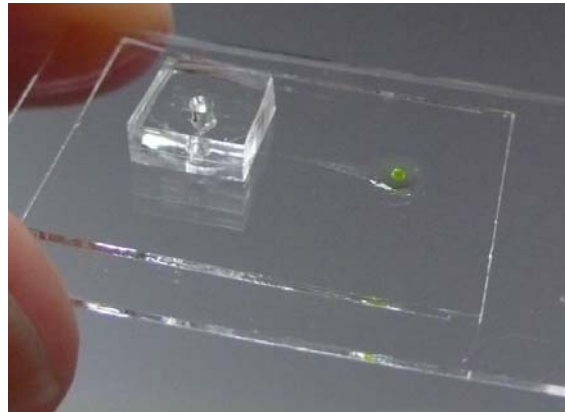
図①-(1A)-1-1.10 流路エッチング結果 (SEM 写真)

ウ. ガラスデバイスの製作

ガラスデバイスの製作工程と製作したガラスデバイス写真を示す。(図①-(1A)-1-1.11 ガラスデバイス製作工程、図①-(1A)-1-1.12 ガラスデバイス写真)



図①-(1A)-1-1.11 ガラスデバイス製作工程



図①-(1A)-1-1.12 ガラスデバイス写真

#### e. デバイス材料の検討結果

PDMS デバイスと今回新たに開発したガラスデバイスにおいて、脂質二重膜の安定形成を脂質二重膜の形成時間で比較した。

##### ア. 実験条件

(ア) PDMS デバイス

###### 【使用流体】

- 1<sup>st</sup> バッファ : PBS + Calcein (1.5mM), KCl (15mM), MOPS (0.3mM)
- 脂質 : 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPhPC)  
+ Hexadecane (脂質濃度 : 10mg/ml)

• 2<sup>nd</sup> バッファ : PBS

###### 【流体流速】

- 1<sup>st</sup> バッファ : 1 $\mu$ l/min
- 脂質 : 0.8~1 $\mu$ l/min
- 2<sup>nd</sup> バッファ : 0.05~0.1 $\mu$ l/min

(イ) ガラスデバイス

###### 【使用流体】

- 1<sup>st</sup> バッファ : PBS + Calcein (1.5mM), KCl (15mM), MOPS (0.3mM)
- 脂質 : 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPhPC)  
+ Hexadecane (脂質濃度 : 10mg/ml)

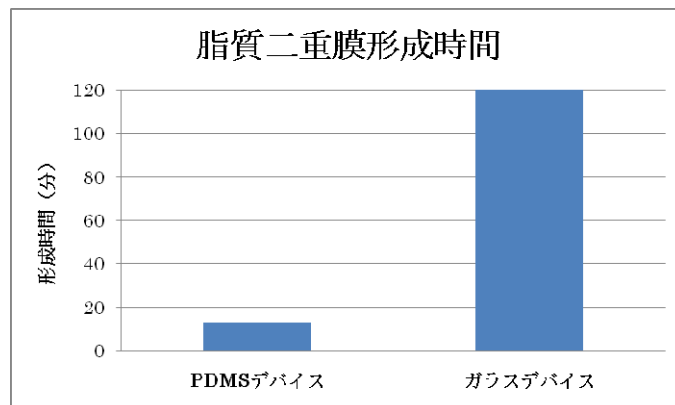
• 2<sup>nd</sup> バッファ : PBS

###### 【流体流速】

- 1<sup>st</sup> バッファ : 0.7 $\mu$ l/min
- 脂質 : 0.3 $\mu$ l/min
- 2<sup>nd</sup> バッファ : 0.15 $\mu$ l/min

## イ. 実験結果と考察

PDMS デバイスとガラスデバイスにおいて、脂質二重膜形成時間で比較をおこなった。結果を以下に示す。(図①-(1A)-1-1.14 脂質二重膜形成時間グラフ)



図①-(1A)-1-1.14 脂質二重膜形成時間グラフ

### 【結果】

PDMS デバイスにおける膜形成時間 10 分程度に対し、ガラスデバイスの膜形成時間は 120 分となった。デバイス材料を PDMS からガラスに変更することで、膜の形成時間に大幅な改善が見られた。

### 【考察】

PDMS は脂質の溶媒である Hexadecane を吸収する。この現象をデバイスで形成した脂質二重膜に当てはめて考えると、脂質二重膜の両端 (PDMS 壁面) から溶媒の Hexadecane が吸収され、それにより脂質二重膜が両端から引っ張られるように張力が働き、その結果、脂質二重膜が破れると考えられる。反対にガラスデバイスは溶媒の吸収が無い為、脂質二重膜が安定して維持できると考えられる。

### ■脂質種類の検討

次に、脂質について、現状の 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (以下 DPhPC) に加え、新たに、L- $\alpha$ -phosphatidylcholine (以下 EggPC) を検討した。

#### a. 脂質種類の物性情報

DPhPC と EggPC の物性情報を以下に示す。

##### ・ DPhPC

分子量 : 846.252

組成式 :  $C_{48}H_{96}NO_8P$

##### ・ EggPC

分子量 : 770.123

組成式：C<sub>42</sub>H<sub>82</sub>NO<sub>8</sub>P

## b. 実験条件

### ア. 脂質としてDPhPCを使用した場合

#### 【使用デバイス】

ガラスデバイス

#### 【使用流体】

- ・ 1<sup>st</sup>バッファ：PBS+Calcein (1.5mM), KCl (15mM), MOPS (0.3mM)
- ・ 脂質：DPhPC+Hexadecane (脂質濃度：20mg/ml)
- ・ 2<sup>nd</sup>バッファ：PBS

#### 【流体流速】

- ・ 1<sup>st</sup>バッファ：0.7μl/min
- ・ 脂質：0.3μl/min
- ・ 2<sup>nd</sup>バッファ：0.15μl/min

### イ. 脂質としてEggPCを使用した場合

#### 【使用デバイス】

ガラスデバイス

#### 【使用流体】

- ・ 1<sup>st</sup>バッファ：PBS+Calcein (1.5mM), KCl (15mM), MOPS (0.3mM)
- ・ 脂質：EggPC+Hexadecane (脂質濃度：20mg/ml)
- ・ 2<sup>nd</sup>バッファ：PBS

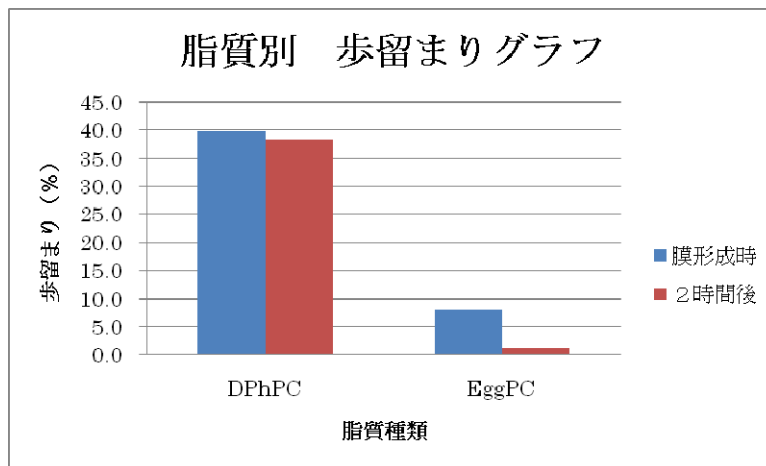
#### 【流体流速】

- ・ 1<sup>st</sup>バッファ：0.7μl/min
- ・ 脂質：0.3ul/min
- ・ 2<sup>nd</sup>バッファ：0.15μl/min

## c. 結果と考察

それぞれの脂質を使用した場合において、脂質二重膜形成率を示す歩留まり（デバイス内において、全体に対する脂質二重膜の成功比率）にて比較した。

尚、歩留まりの確認は、脂質二重膜形成直後と2時間経過後の2つのタイミングで実施した。（図①-(1A)-1-1.15 脂質別 歩留まりグラフ）



図①-(1A)-1-1.15 脂質別 歩留まりグラフ

### 【結果】

歩留まりについて、脂質 DPhPC の方が脂質 EggPC に比べて、膜形成時で約 6 倍、2 時間後で約 38 倍と大幅に上回っている。

次に、歩留まり維持率（膜形成時の歩留まりに対する、2 時間後の歩留まり）について、脂質 DPhPC は約 96% で、2 時間後においても膜の維持率が高い、それに対し、脂質 EggPC は約 14% となり膜の維持率が低い。従って、膜の維持率においても脂質 DPhPC の方が優位性がある結果となった。

### 【考察】

歩留まりおよび膜の維持率の両方において、DPhPC の方が良好な結果となった。この結果の差は、脂質の分子構造の違いによるものが影響しているのではないかと考えられる。脂質分子の構造は、親水性の頭部と疎水性の尾部で構成されている。ここで、DPhPC と EggPC で違いがあるのが、疎水性の尾部の部分である。DPhPC の疎水性尾部の炭化水素鎖には、メチル基が分岐して付いており、尾部が複雑な形状を取っている。これにより、隣の脂質の尾部同士が絡み易く、そのため膜が形成され易く、且つ、維持され易いと考えられる。

### ■脂質濃度の検討

次に脂質濃度変更が脂質二重膜形成に与える影響について調べた。ここで、使用した脂質は、脂質種類の検討結果で良好な結果が得られた DPhPC を使用した。

#### a. 実験条件

実験の条件を以下に示す。脂質の濃度は 5 水準に変化した。

#### 【使用デバイス】

ガラスデバイス

### 【使用流体】

1<sup>st</sup> バッファ : PBS + Calcein (1.5mM), KCl (15mM), MOPS (0.3mM)

脂質 : DPhPC + Hexadecane

2<sup>nd</sup> バッファ : PBS

### 【流体流速】

1<sup>st</sup> バッファ : 0.7 $\mu$ l/min

脂質 : 0.3 $\mu$ l/min

2<sup>nd</sup> バッファ : 0.15 $\mu$ l/min

### 【脂質 (DPhPC) 濃度】

2mg/ml

5mg/ml

10mg/ml

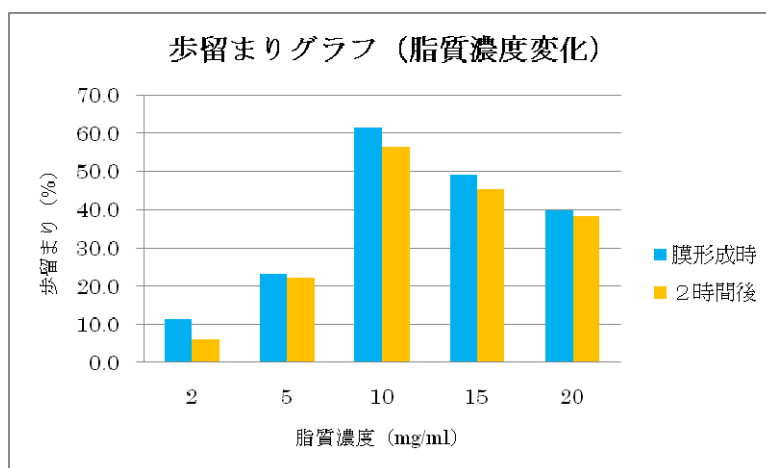
15mg/ml

20mg/ml

## b. 結果と考察

それぞれの脂質を使用した場合において、脂質二重膜形成率を示す歩留まり（デバイス内において、全体に対する脂質二重膜の成功比率）にて比較した。

尚、歩留まりの確認は、脂質二重膜形成直後と2時間経過後の2つのタイミングで実施した。（図①-(1A)-1-1.16 脂質濃度別 歩留まりグラフ）



図①-(1A)-1-1.16 脂質濃度変化別 歩留まりグラフ

### 【結果】

歩留まりについては、脂質濃度 10mg/ml までは、脂質濃度の増加とともに歩留まりが増加している。特に、脂質濃度 10mg/ml で歩留まりが急増した。

歩留まりのピークについては、脂質濃度 10mg/ml に歩留まりのピークがあり、

以降、濃度を上げてても歩留まりは増加しないで、少しずつ減少した。

最適な脂質濃度は 10mg/ml であった。

#### 【考察】

結果から、脂質濃度と歩留まりの関係は、一次関数的でなく、ピークを持つ二次関数的に変化している事から、脂質濃度の最適値が存在することが確認できた。今回の条件下（脂質の種類やデバイスなどの諸条件）では、10mg/ml が最適であったが、脂質が変わると（たとえば EggPC）最適値が変化する事が予測される。

#### ■脂質の流速検討

次に脂質の最適流速について調べた。経験上、PDMS デバイスにおいては、脂質の流速が速いと脂質がチャンバー内に入り込み、1<sup>st</sup> バッファを押し出してしまい、その結果、脂質二重膜の形成まで至らない場合が多く見られた。今回は、ガラスデバイスに変更しているため、脂質がチャンバー内に入り込まない流速の範囲を改めて確認することにした。

#### a. 実験条件

実験の条件を以下に示す。

##### 【使用デバイス】

ガラスデバイス

##### 【使用流体】

1<sup>st</sup> バッファ：PBS+Calcein (1.5mM), KCl (15mM), MOPS (0.3mM)

脂質：DPhPC+Hexadecane 濃度 10mg/ml

2<sup>nd</sup> バッファ：PBS

##### 【流体流速】

1<sup>st</sup> バッファ：0.7 $\mu$ l/min

2<sup>nd</sup> バッファ：0.15 $\mu$ l/min

ここで、脂質の流速を以下の 4 水準に変化させた。

##### 【脂質流速】

0.15 $\mu$ l/min

0.3 $\mu$ l/min

0.5 $\mu$ l/min

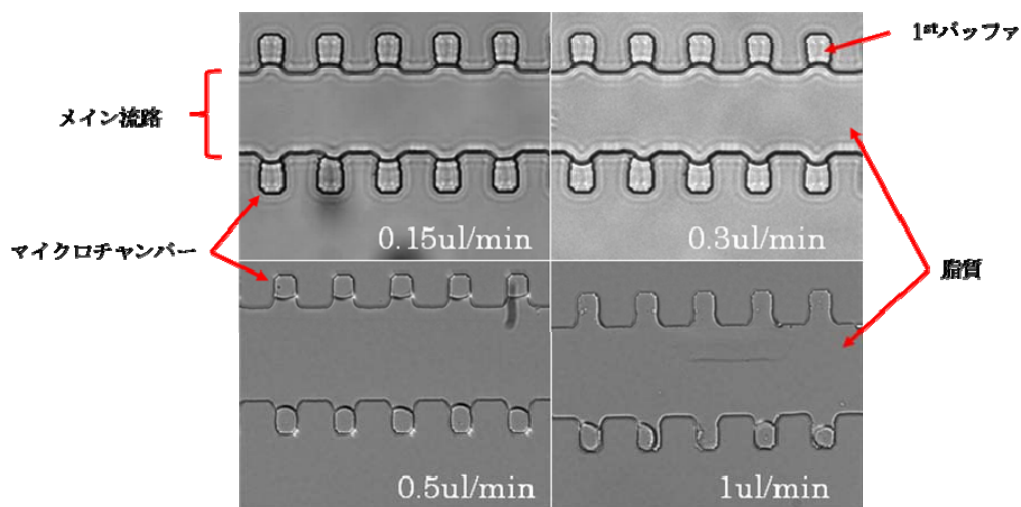
1.0 $\mu$ l/min

#### b. 結果と考察

各脂質流速の時の脂質流入状況写真を以下に示す。



(図①-(1A)-1-1.17 脂質流速変更結果)



図①-(1A)-1-1.17 脂質流速変更結果

**【結果】**

脂質流速が 1  $\mu\text{l}/\text{min}$  の時に、高い確立でチャンバー内に脂質が押し込まれ、1<sup>st</sup>バッファが流れてしまう事が確認された。また、0.5  $\mu\text{l}/\text{min}$  以下では、脂質の押し込みは見られなかった。

結果より、脂質の流速は、0.5  $\mu\text{l}/\text{min}$  以下が適切である。

**【考察】**

脂質の流速を増加していくと、チャンバー内に脂質が押し込まれる現象が確認できた。しかし、この現象は、流速だけでなく、チャンバー壁面の表面状態（親水性、疎水性）にも影響されると考えられるため、今後は表面状態の検討も必要になると考える。

(1A)-1-1-3 まとめ

実施計画項目と結果について、以下にまとめる。

**【実施項目】**

平成 20 年度に開発したマイクロ流路を用いた脂質二重膜の形成法を安定して機能させるために、脂質二重膜関連実験装置を導入して、脂質の種類、濃度、溶液の流速、デバイスの材料などを検討する。

**【結果】**

- ・デバイス材料について、ガラス材料が PDMS 材料の約 10 倍以上の脂質二重膜の形成時間を実現した。よってデバイスの材料はガラスが適している。
- ・脂質について、DPhPC が EggPC の約 6 倍以上（膜形成時）の歩留まりを実現

した。よって脂質は DPhPC の方が今回の用途には適している。

・脂質の濃度について、濃度 10mg/ml において歩留まりのピークを確認した。(使用脂質 DPhPC) よって濃度は 10mg/ml が適している。

・脂質の流速について、0.5 $\mu$ l/min 以下では、脂質の押し込みによる 1<sup>st</sup>バッファの流れ出しが見られなかった。よって流速は 0.5 $\mu$ l/min 以下が適切である。

#### (1A)-1-1-4 脂質二重膜を利用した膜たんぱく質の電流計測

昨年度に脂質二重膜を形成できるマイクロ流路とマイクロチャンバーの形成プロセスおよび電極形成のプロセスを開発し、実際にデバイスを製作して電流計測ができることを確認した。

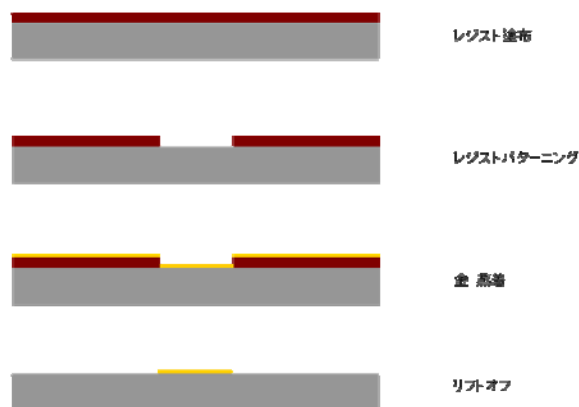
本年度は、それをを用い実際の膜たんぱく質の電流計測を実施した。

##### ■電極機能を持つ脂質二重膜デバイスの開発

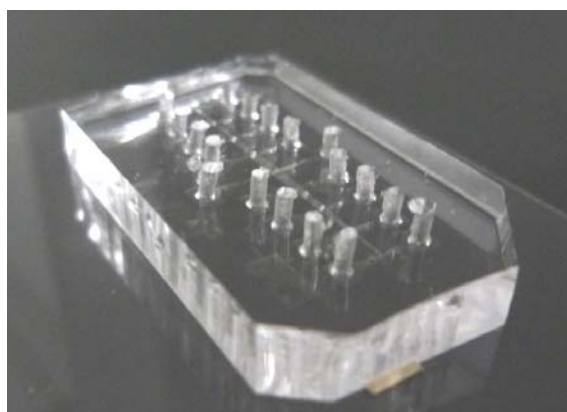
実際に製作したデバイスは、上述の PDMS デバイスの製作で紹介したデバイスを基本に、独立したチャンバーに電極（金属／金）を追加した。ここでは、具体的な電極の形成プロセスを紹介する。

##### a. 金による電極の形成プロセスと製作したデバイス

ガラス基板にリフトオフ手法により金電極を作製した。(図①-(1A)-1-1.18 金電極形成プロセス) その後、流路を形成した PDMS プレートとアライメント接合を行いデバイスを製作した。(図①-(1A)-1-1.19 金電極付き PDMS デバイス)



図①-(1A)-1-1.18 金電極形成プロセス



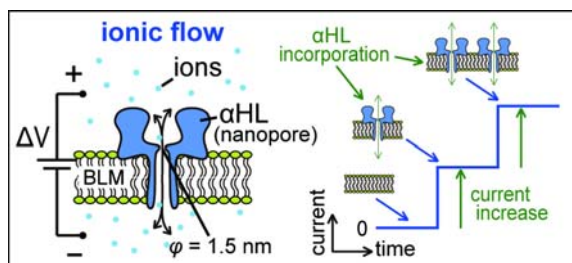
図①-(1A)-1-1.19 金電極付き PDMS デバイス

#### b. 膜たんぱく質の電流計測結果

金電極付きデバイスを用い、膜たんぱく質の電流計測を実施した。

ここで、使用した膜たんぱく質は $\alpha$ ヘモリシン ( $\alpha$ -Hemolysin) である。この $\alpha$ ヘモリシンは、病原性黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) のほとんどの株が分泌する細胞外たんぱく質で、細胞膜表面で膜孔を形成する。

ここで、 $\alpha$ ヘモリシンが脂質二重膜に融合し、膜に孔を開けた場合の電流値は、開いた個数の増加に伴い、電流値がステップ的に増加する。(図①-(1A)-1-1.20  $\alpha$ ヘモリシン電流特性)



図①-(1A)-1-1.20  $\alpha$ ヘモリシン電流特性

#### ア. 実験条件

実験の条件を以下に示す。

##### 【使用デバイス】

PDMS 電極付きデバイス

##### 【使用流体】

1<sup>st</sup> バッファ :

PBS +  $\alpha$ ヘモリシン (5 $\mu$ g/ml), Calcein (50 $\mu$ M), KCl (5mM), MOPS (0.1mM),  
脂質 : DPhPC + Hexadecane 濃度 10mg/ml

2<sup>nd</sup> バッファ : PBS

##### 【流体流速】

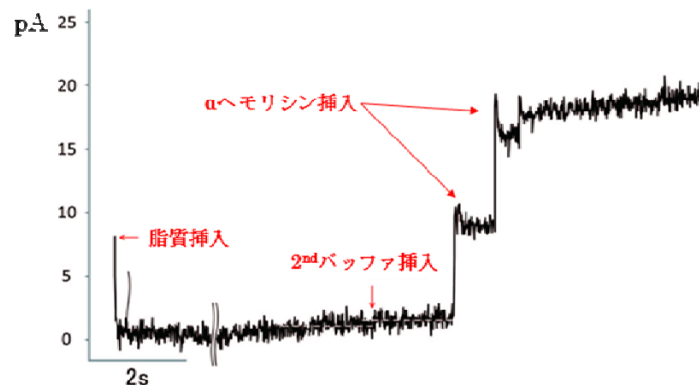
1<sup>st</sup> バッファ : 1 $\mu$ l/min

脂質 : 1 $\mu$ l/min

2<sup>nd</sup> バッファ : 0.03 $\mu$ l/min

## イ. 結果と考察

以下に電流計測結果のグラフを示す。(図①-(1A)-1-1.21  $\alpha$ ヘモリシン挿入 電流計測結果)



図①-(1A)-1-1.21  $\alpha$ ヘモリシン挿入 電流計測結果

グラフから以下の事が確認できる。

- ・ 2<sup>nd</sup> バッファ流入により、数 pA の電流値上昇を確認できた。これはギガオームシールを示しており、これにより脂質二重膜が形成された事が確認できる。

- ・ 2<sup>nd</sup> バッファ挿入して数秒後に電流値がステップ状に 2 回程上昇していることが確認できた。これにより脂質二重膜の形成後に  $\alpha$ ヘモリシンが融合した事が確認できる。

以上より、デバイス内で脂質二重膜を形成し、その膜に膜たんぱく質 ( $\alpha$ ヘモリシン) を融合させた事を電氣的に計測することに成功した。

### (1A)-1-1-5 脂質二重膜関連実験装置の導入

脂質二重膜の形成法の評価を目的に、脂質二重膜関連実験装置の導入を行った。必要となる装置および仕様を以下に示す。

#### ■ 観察システム

脂質二重膜形成の観察および蛍光観察等を行う顕微鏡を導入した。

#### a. 主な仕様

##### ア. 光学性能

接眼レンズ :  $\times 10$       対物レンズ :  $\times 10$ 、 $\times 20$ 、 $\times 40$

#### イ. 蛍光用光源および蛍光フィルター

青色励起バンドパスフィルターを有すること

#### ウ. 顕微鏡操作性

サンプルセット、電極セット、液体挿入チューブセットが容易に行える機構となっていること

#### b. メーカーおよび型式

メーカー：オリンパス株式会社

型式：IX71N-22FL/PH

#### c. システム外観



図①-(1A)-1-1.22 観察システム

#### ■ 蛍光観察解析システム

脂質二重膜の形成および蛍光観察を長時間且つ任意の時間において画像取得できるカメラとカメラ制御用システム（ソフトウェア含む）を導入した。

#### a. 主な仕様

##### ア. 量子効率

70%以上（520nm 近辺）

##### イ. 冷却方式、冷却温度

空冷、水冷を有すること。

-30℃以下

##### ウ. ADコンバーター

16bit 以上

#### b. メーカーおよび型式

メーカー：浜松ホトニクス株式会社

型式：デジタル CCD カメラ C10600-10B

制御システム アクアコスモス U7501

c. システム外観



- ①カメラ
- ②カメラ制御用システム

図①-(1A)-1-1.23 蛍光観察観察システム

## (1A)-1-2 膜タンパク質の人工膜組み込みプロセスの開発

### (1A)-1-2-1 概要

ナノテクノロジーに代表される昨今の技術進歩は著しいものがある。今後、大きく需要が増加すると思われる健康・医療・環境分野等で次世代に使われるデバイスは従来の無機材料だけでなく、タンパク質や DNA などナノレベルで様々な機能を持つ有機材料を導入することで、より高機能に、また多機能になると考えられる。

既に一部のデバイスは生体関連物質を簡便、高感度、高い選択性で測定できるバイオセンサーとして開発され、これまでに多くの研究開発が行われている。実用化された一例として自己測定型血糖値センサーがあるが、酵素であるグルコースオキシダーゼと電気化学デバイスを組み合わせることで高感度化を実現しており、今後の高齢化により予想される糖尿病患者の増加に伴い、全世界で大規模な市場を形成すると考えられる。

一方で、現在タンパク質で最も注目を浴びているのが膜タンパク質である。膜タンパク質は脂質二重膜である細胞膜に埋め込まれる形で存在し、主に外部からの様々な情報を細胞内部に伝えるセンサーとして働くタンパク質群である。特筆すべきはその高機能性であり、膜タンパク質の中にはピコ( $10^{-12}$ )mol/l 程度のごく微量の物質を認識できるものさえある。また各物質を認識する多種の膜タンパク質が存在するため、膜タンパク質が埋め込まれている細胞膜は多機能性を獲得している。

これらのタンパク質をバイオセンサーとしてデバイスに組み込むことができれば、その高機能性および多機能性によりその用途は格段に広がると考えられる。しかし、現在の技術では、膜タンパク質の脂溶性の高さに付随する安定性の問題や生体膜をデバイスに組み込む困難さ等の問題から膜タンパク質が持つ機能を保持したままセンサーデバイス上で利用することが非常に困難である。また膜タンパク質等の生体機能分子の人工膜導入において、配向制御、選択的配置、高密度化は極めて難しい。

そこで本研究開発では、膜タンパク質の脂質二重膜への新規導入法の開発を行う。また、膜タンパク質等をデバイスに導入するプロセスの開発を行う。具体的には、受容体タンパク質等の捕捉タンパク質をタンパク質工学により改変して作製し、リポソーム膜(脂質二重膜)に組み込む。血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 受容体、腫瘍壊死因子 $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) 受容体、抗体などを膜に固定化し、VEGF、TNF $\alpha$ 、対応する抗原 (例えば、前立腺腫瘍マーカー) を検出する MEMS デバイスを作製

する。

### 【実施項目】

本年度の目標は、バイオケミカルシグナルを電気シグナルとして計測が可能なデバイスを作製するため、まず膜タンパク質等の調製技術を検討する。さらに、膜タンパク質等をデバイスに導入するプロセスの開発を行うことである。

具体的には、疾患関連マーカーVEGF と結合する膜タンパク質 VEGFR をクローニングし、大腸菌によるタンパク質の大量発現系を構築し、発現、精製を行う。VEGFR は主に血管新生に関わるサイトカインである VEGF の受容体であり、細胞内にシグナルを流すことにより血管新生を制御する。VEGFR をデバイスに導入する膜タンパク質に選んだ理由として、①VEGFR のリガンドである VEGF が腫瘍マーカーであり、VEGF を検知するデバイス素子を作成することが有用である。②1 回膜貫通タンパク質であり、膜タンパク質の中で比較的脂溶性が低い。③VEGFR の VEGF 結合領域のみのタンパク質において精製方法が確立されている点があげられる。さらにタンパク質をリポソーム膜に組み込み、プロテオリポソームを作製し、表面プラズモン共鳴法により当該疾患関連マーカーとの結合を確認する。

## (1A)-1-2-2 実験方法

### a. VEGFRのクローニング

デバイスに導入する VEGFR1 および VEGFR2 のクローニングを行った。Human placenta cDNA(Clontech) を鋳型として VEGFR1 をプライマー (Forward:ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTC, Reverse:CTAGATGGGTGGGGTGGAGTACAGGACCAC)、VEGFR2 をプライマー (Forward:ATGCAGAGCAAGGTGCTGCTGGCCGTC, Reverse:TAAACAGGAGGAGAGCTCAGTGTGGTCCCCGAG)を用いてPCRを行った。PCR産物を Wizard<sup>®</sup>SV Gel and PCR Clean-up System(Promega)を用いて精製し、Zero Blunt<sup>®</sup> TOPO<sup>®</sup> PCR クローニングキット (invitrogen) を用いて pCR-Blunt II -TOPO ベクターに導入した。

### b. VEGFR1 組み換えタンパク質の作製・設計

#### ア. 概要

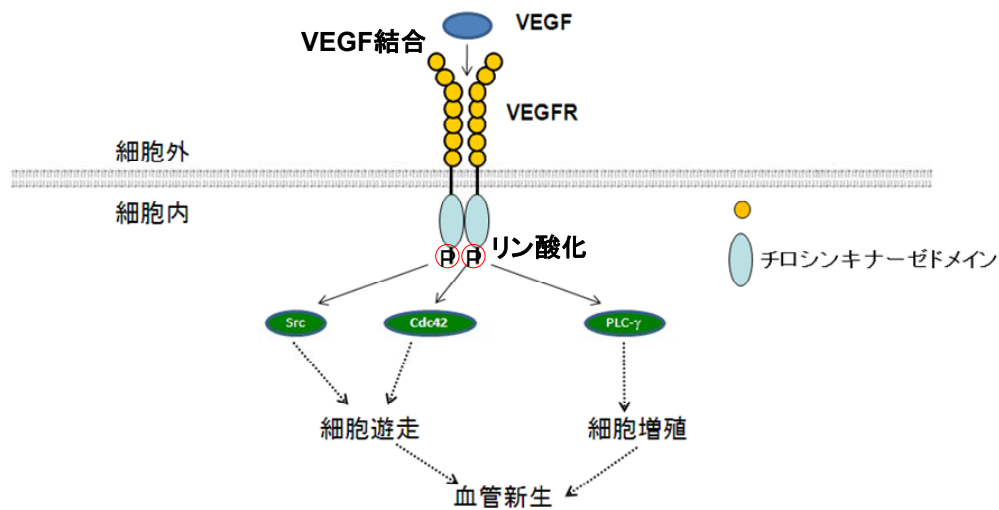
VEGFR は大きく分けて二つの分子機能を有している。一つは VEGF などサイトカインとの結合、もう一つは結合の結果として起こるリン酸化(キナーゼ)の機能である。VEGF 結合領域は細胞膜の外側、キナーゼは内側に存在する(図①-(1A)-1-2.1)。



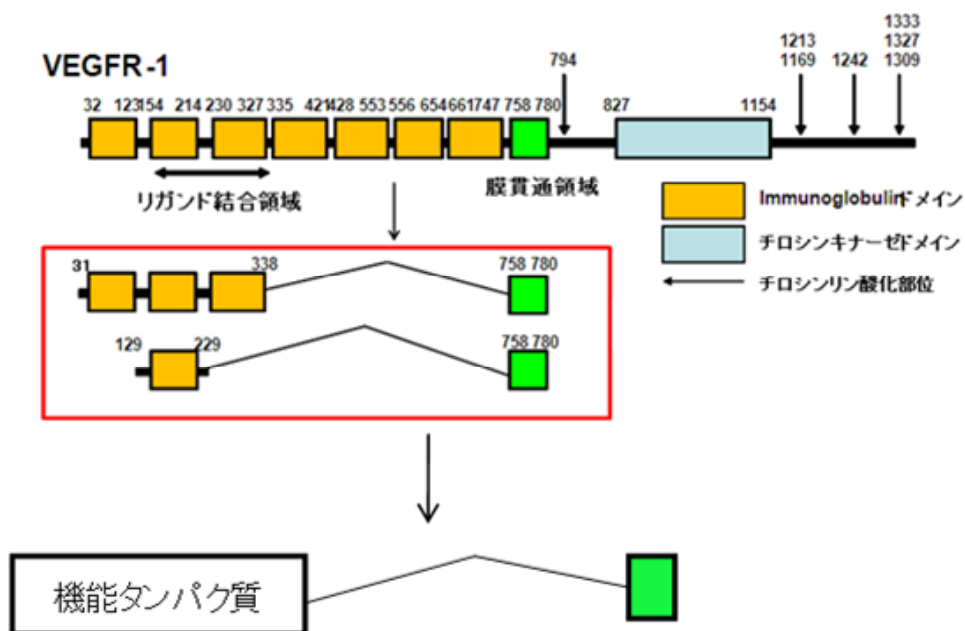
一般的に膜タンパク質は正常に機能を保持したまま発現、精製することが困難であることが知られている。また発現する領域が長くなればその発現精製はより困難になる。そこで今回は、まず VEGF 結合の機能に限定し、VEGF 結合領域と膜貫通領域を有したタンパク質を発現精製し、脂質二重膜に導入することとした。この方法のように膜に導入することが可能であれば、同じように膜貫通領域とタンパク質機能ドメインをつなげることで、本来細胞質で発現するような機能タンパク質も膜デバイスに組み込むことが可能になる(図①-(1A)-1-2.2)。

デバイスとして組み込む膜タンパク質として VEGF に対して VEGFR2 より親和性が高い VEGFR1 に 7 つあるイムノグロブリンドメインの N 端から 1 番目-3 番目のイムノグロブリンドメイン(31-338)および 2 番目のイムノグロブリンドメイン(129-229)と膜貫通領域予測プログラム SOSUI で膜貫通領域に予測された領域を融合させたタンパク質を設計した(図②-(1A)-1-2.2)。

VEGF 結合領域 VEGFR1(31-338) + 膜貫通領域 VEGFR1(758-780)(以下 VEGFR1I-TM)および VEGFR1(129-229) + 膜貫通領域 VEGFR1(758-780)(以下 VEGFR1s-TM)を HIS タグ融合タンパク質として発現させる pET16b ベクターに挿入した。



図①-(1A)-1-2.1 VEGFR の分子機能



図①-(1A)-1-2.2 実際に発現させた領域

#### イ. VEGFR1(31-338)および(129-229)のサブクローニング

VEGF と結合するイムノグロブリンドメインのサブクローニングを行った。  
VEGFR1(31-338)についてプライマー

(forward:GCGAATTCCATATGGATCCTGAACTGAGTTTAAAAGGCAC,  
reverse:GCAGGATCCTCAATGTTTCACAGTGATGAATGCTTTATCATATATATG) 、  
VEGFR1(129-229)についてプライマー

(forward:GCGAATTCCATATGAGTGATACAGGTAGACCTTTCGTAG,  
reverse:GCTGGATCCTCAGATTGTATTGGTTTGTTCGATGTGTGAG)を用いてPCR を  
行った。PCR 産物を Wizard<sup>®</sup>SV Gel and PCR Clean-up System(Promega)を用いて精  
製し、NdeI (New England Biolabs)および BamHI (New England Biolabs) を用いて制  
限酵素処理を行った後、アガロースゲル電気泳動を行い、Wizard<sup>®</sup>SV Gel and PCR  
Clean-up System(Promega)を用いて精製を行った。

pET16b ベクター を NdeI(New England Biolabs)および BamHI(New England  
Biolabs)を用いて制限酵素処理を行った後、アルカリフォスファターゼ処理を行い、  
65°C、30 min 加熱をすることにより、酵素を失活させた。アガロースゲル電気泳  
動を行い、DNA フラグメントを Wizard<sup>®</sup>SV Gel and PCR Clean-up System(Promega)  
を用いて精製した。

それぞれの精製産物(PCR 産物、ベクター)を混合し、T4 リガーゼを反応させライゲーションを行った。

#### ウ. 膜貫通領域の導入

VEGFR1 配列が挿入されている pET16b ベクターに対して膜貫通領域予測プログラム SOSUI により膜貫通領域と同定された VEGFR1 配列 758-780 残基の配列を PCR により導入した。膜貫通領域に相当する配列は複数のプライマーを用いて PCR を行うことにより VEGFR1(31-338)および VEGFR1(129-229)の C 端を徐々に伸長させ、付加した。

VEGFR1(31-338)についてプライマー

(forward: GCGAATTCCATATGGATCCTGAACTGAGTTTAAAAGGCAC,  
reverse1:GTAGCTGTTTGGTTATGTTAGCTCGACTAGTGAGATTGTACGTG,  
reverse2:GACTAGTGAGATTGTACGTGGACACACCGACGCTGAGAGAAGACC,  
reverse3:GACGCTGAGAGAAGACCGAGGATAATTGGGAGAAATAGACTCCTAGG  
AGG)を用いて、VEGFR1(129-229)について

(forward:GCGAATTCCATATGAGTGATACAGGTAGACCTTTCGTAG,  
reverse1':CGTAAGTAGTGACACTTGTACTCGACTAGTGAGATTGTACGTG,  
reverse 2, reverse 3)を用いて PCR を行い、目的断片を増幅した。

PCR 産物を Wizard<sup>®</sup>SV Gel and PCR Clean-up System(Promega)を用いて精製し、NdeI(New England Biolabs)および BamHI(New England Biolabs) を用いて制限酵素処理を行った後、アガロースゲル電気泳動を行い、Wizard<sup>®</sup>SV Gel and PCR Clean-up System(Promega)を用いて精製を行った。

pET16b ベクター を NdeI(New England Biolabs)および BamHI(New England Biolabs)を用いて制限酵素処理を行った後、アルカリフォスファターゼ処理を行い、65°C、30 min 加熱をすることにより、酵素を失活させた。アガロースゲル電気泳動を行い、DNA フラグメントを Wizard<sup>®</sup>SV Gel and PCR Clean-up System(Promega)を用いて精製した。

それぞれの精製産物(PCR 産物、ベクター)を混合し、T4 リガーゼを反応させライゲーションを行った。

#### c. HIS-VEGFR1s-TMの発現精製

##### ア. 概要

デバイスにタンパク質を導入するためには精製したタンパク質が必要である。そこで作製したタンパク質発現系を大腸菌によりタンパク質を発現させ、精製を行った。なお今回は、発現させる配列が短く精製がより容易と考えられる HIS タ

グ融合 VEGFR1s-TM (HIS-VEGFR1s-TM)に絞り検討を行った。

#### イ. HIS-VEGFR1s-TMの発現

形質転換を行った大腸菌 BL21(DE3)株を LB 培地で培養を行った。OD<sub>600</sub>=0.5 の時に終濃度が 1 mM になるように Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside(IPTG)を添加し、25°C、3 h 培養を行った。その後、菌体を回収し破砕バッファー(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5)を加え、Bioraptor(コスモバイオ)で超音波破砕(Power H, 30 sec on 30 sec off, 15 min)を行った。破砕後、遠心(14000 rpm, 4°C, 10 min)を行い上清画分と沈殿画分のそれぞれを分取し SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)を行った。

#### ウ. HIS-VEGFR1s-TMの可溶化の検討

HIS-VEGFR1s-TM は膜貫通領域を持っているため脂溶性が高く可溶化させるのが困難であると考えられる。そこで、可溶化バッファーの検討を行った。具体的にはタンパク質を発現させた菌体を超音波破砕後、その沈殿画分を破砕バッファー(50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7.5)で洗浄を 2 回行った。その後、沈殿画分にタンパク質を穏やかに可溶化させる界面活性剤 {n-ドデシル-β-D-マルトシド (DDM), n-オクチル-β-D-グリコシド(OG), CHAPS, Tween20, n-デシル-β-D-マルトシド(DM), Nonidet P-40, コール酸ナトリウム各 1%}を含む破砕バッファー(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5)を加え、Bioraptor(コスモバイオ)で超音波破砕(Power H, 30 sec on 30 sec off, 15 min)を 2 回行うことで可溶化を行った。

#### エ. HIS-VEGFR1s-TMの可溶性画分の精製

HIS-VEGFR1s-TM はほとんど可溶化しなかったが、実際には微量に可溶化していると考えられる。そこで発現タンパク質のジスルフィド結合形成を容易にさせる大腸菌 RosettaGamiB(DE3)株を用いて HIS-VEGFR1s-TM を発現させ、その膜画分を可溶化、ニッケルカラムにより精製を行った。

OD<sub>600</sub>=0.5 の時に終濃度が 1 mM になるように IPTG を添加し、25°C、3 h 培養を行った。菌体回収後、破砕バッファー(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5)を加え、Bioraptor(コスモバイオ)で超音波破砕(Power H, 30 sec on 30 sec off, 15 min)を行った。遠心(14000 rpm, 10 min, 4°C)後、その上清に対して超遠心(100000 g, 4°C, 1 h)を行い、沈殿画分を膜画分として回収した。沈殿画分は可溶化バッファー(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% DM, pH 7.5)で可溶化後、遠心(14000 rpm, 4°C, 10 min)をして沈殿を除去した。上清画分についてニッケルカラムによる精製を行った。

#### オ. HIS-VEGFR1s-TMのリフォールディングの検討

HIS-VEGFR1s-TM はほとんど可溶化しないが沈殿画分(inclusion body)に取り込

まれている HIS-VEGFR1s-TM は多量に存在する。よって inclusion body を可溶化させ、リフォールディングすることを考えた。実際、VEGFR1(129-229)についてはリフォールディングにより精製されたという知見がある。

HIS-VEGFR1s-TM を発現させた菌体を破砕バッファー(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5)を加え、Bioraptor(コスモバイオ)で超音波破砕(Power H, 30 sec on 30 sec off, 30 min)を行った。破砕後、遠心(14000 rpm, 4°C, 10 min)を行い上清画分と沈殿画分に分離し、その沈殿画分について破砕バッファー(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5)で3回洗浄後、変性バッファー{50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 6 M 尿素, 10 mM ジチオトレイトール(DTT), pH 8.0}を入れ、2時間ボルテックスを行い、可溶化を行った。その後、透析を行いリフォールディングを行った後、ゲル濾過を行った。

#### d. マルトース結合タンパク質(MBP)-VEGFR1s-TMの発現精製

##### ア. 概要

タンパク質はグルタチオン-S-セファロース(GST)や MBP 等の可溶性のタグを融合させて発現させると可溶化する場合がある。今回、発現させるタンパク質は膜タンパク質のため、大腸菌内で発現された後に大腸菌の内膜に組み込まれる必要がある。そのため、内膜を通過し、ペリプラズムに移動する MBP タグを目的タンパク質の N 端に融合させるベクターである pMAL ベクターに VEGFR1s-TM の配列を挿入し、発現精製を行った。その際、MBP と VEGFR1s-TM の間にリンカーとして HIS タグ+ランダム配列(MGHHHHHHHHHHSSGHIEGRHM)を挿入した。

##### イ. MBP-VEGFR1s-TMの発現系構築

VEGFR1s-TM の配列が挿入されている pET16b ベクター を NcoI(New England Biolabs)および BamHI(New England Biolabs)を用いて制限酵素処理を行った後、アガロースゲル電気泳動を行い、Wizard<sup>®</sup>SV Gel and PCR Clean-up System(Promega)を用いて DNA フラグメントの精製を行った。

pMAL-c5x, pMAL-p5g ベクター を NcoI(New England Biolabs)および BamHI(New England Biolabs)を用いて制限酵素処理を行った後、アルカリフォスファターゼ処理を行い、65°C、30 min 加熱を行うことで、酵素を失活させた。アガロースゲル電気泳動を行い、Wizard<sup>®</sup>SV Gel and PCR Clean-up System(Promega)を用いて DNA フラグメントの精製を行った。

それぞれの精製産物を混合し、T4 リガーゼを反応させライゲーションを行った。

##### ウ. MBP-VEGFR1s-TMの可溶化の検討

MBP-VEGFR1s-TM を発現させる pMAL-c5x ベクターおよび pMAL-p5g ベクター

により形質転換させた大腸菌 BL21(DE3)株を LB 培地で培養を行い、 $OD_{600}=0.5$  の時に終濃度 0.2 mM になるように IPTG を加え 20°C、4 h 培養を行った。破碎バッファー(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5)を加え、Bioraptor(コスモバイオ)で超音波破碎(Power H, 30 sec on 30 sec off, 15 min)を行った。破碎後、遠心(14000 rpm, 4°C, 10 min)を行い上清画分と沈殿画分のそれぞれを分取し SDS-PAGE を行った。

#### エ. MBP-VEGFR1s-TMの発現精製

MBP-VEGFR1s-TM を発現させる pMAL-c5x ベクターにより形質転換させた大腸菌 RosettaGamiB(DE3)株を LB 培地で培養を行い、 $OD_{600}=0.5$  の時に終濃度が 0.2 mM になるように IPTG を添加し、20°Cで一晩培養を行った。菌体回収後、破碎バッファー(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5)を加え、Bioraptor(コスモバイオ)で超音波破碎(Power H, 30 sec on 30 sec off, 15 min)を行った。遠心後(14000 rpm, 4°C, 10 min)、その上清に対して超遠心(100000 g, 4°C, 1h)を行い、沈殿画分を膜画分として回収した。沈殿画分を可溶化バッファー(50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 1% DM, pH 7.5)で可溶化後、遠心(14000 rpm, 4°C, 10 min)をして沈殿を除去した。上清画分をアミロースレジンに通し、洗浄バッファー(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% DM, pH 7.5)で洗浄を行い、溶出バッファー(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% DM, 20 mM マルトース, pH 7.5)で溶出した。

#### オ. MBPタグ切断検討

pMAL-c5x ベクターで発現させたタンパク質は MBP を Factor Xa により切断することができる。Factor Xa 切断条件の検討を行った。MBP-VEGFR1s-TM をアミロースレジンにつけたまま Factor Xa で切断時の温度を 4°Cおよび 25°C、3 h 切断を行った。

### e. VEGFRプロテオリポソームの作製

#### ア. 概要

精製した MBP-VEGFR1s-TM について脂質二重膜に挿入する必要がある。今回、脂質二重膜としてリポソームを作製し、リポソームに MBP-VEGFR1s-TM を透析法により組み込むこととした。

#### イ. リポソームの作製

リポソームは E.coli polar extract (Avanti polar lipid)を用いて作製した。脂質を 3% OG に溶解させ 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4 で一晩透析を行った。透析後、液体窒素を用いて 5 回凍結融解を行った。

#### ウ. プロテオリポソームの作製

リポソームおよび MBP-VEGFR1s-TM, 10% OG をそれぞれ混合し、室温で 15 min

放置した。その後、10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4, 4°Cで 24 h 透析を行った。溶液回収後、遠心を行い(14000 rpm, 4°C, 10 min)沈殿を除去し、その上清をプロテオリポソームとした。

## f. VEGFRリガンドの作製

### ア. 概要

リポソーム膜に挿入した MBP-VEGFR1-TM が機能するかはそのリガンドである VEGF および胎盤成長因子(PIGF) との相互作用により確認することができる。また精製の容易さやタンパク質安定性の問題から全長ではなく VEGFR1(129-229)と結合する VEGF(8-109)および PIGF(19-119)の領域について大腸菌発現系を構築し、発現精製を行った。

### イ. VEGFのサブクローニング

VEGF(8-109)についてプライマー

(forward: GGG AATTCCATATGGGGCAGAATCATCACGAA, reverse:GGGAGGATCCTCAATCTTTCTTTGGTCTGCATTAC)を用いてPCRを行った。PCR産物を Wizard<sup>®</sup>SV Gel and PCR Clean-up System(Promega)を用いて精製し、NdeI(New England Biolabs)および BamHI(New England Biolabs)を用いて制限酵素処理を行った後、アガロースゲル電気泳動を行い、Wizard<sup>®</sup>SV Gel and PCR Clean-up System(Promega)を用いて精製を行った。

pET16b ベクター を NdeI(New England Biolabs)および BamHI(New England Biolabs)を用いて制限酵素処理を行った後、アルカリフォスファターゼ処理を行い、65°C、30 min 加熱をすることにより、酵素を失活させた。アガロースゲル電気泳動を行い、目的産物を Wizard<sup>®</sup>SV Gel and PCR Clean-up System(promega)を用いて精製した。

それぞれの精製産物(PCR産物、ベクター)を混合し、T4 リガーゼを反応させライゲーションを行った。

### ウ. VEGFの発現精製

VEGF(8-109)は大腸菌株 BL21(DE3)株で発現させた。LB 培地で培養を行い、OD<sub>600</sub>=0.5 の時に終濃度が 0.5 mM になるように IPTG を添加し 30°C一晩培養を行った。菌体回収後、菌体破碎を bioraptor(コスモバイオ)で超音波破碎(Power H, 30 sec on 30 sec off, 30 min)を行い、遠心後(14000 rpm, 4°C, 10 min)、その沈殿画分を洗浄バッファー(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8.0)で洗浄を 5 回行った。次に沈殿画分を変性バッファー(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 6 M 尿素, 10 mM DTT pH 8.0)で 4 時間ボルテックスを行い、可溶化を行った。その後、Ni sepharose high

performance resin(invitrogen)を用いて精製を行った。洗浄(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 6 M 尿素, 50 mM イミダゾール, pH 8.0)を行った後、溶出(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 6M 尿素, 500 mM イミダゾール, pH 8.0)を行った。

溶出溶液に対して終濃度が 10 mM になるように DTT を加え、1 時間放置後 20 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, 1 mM システイン, pH 8.4, 4°C, 24 h 透析を行うことでリフォールディングを行った。

その後、50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5 でゲル濾過を行い、目的分子量の画分をサンプルとした。

#### エ. PIGFのサブクローニング

PIGF のサブクローニングを行った。PIGF(19-119)についてプライマー(forward: GGG AATTC CATATGGAGGTGGAAGTGGTACCCTTC,reverse:GGGAGGATCCTCAC ATCTTCTCCCGCAGAGG)を用いて PCR を行った。PCR 産物を Wizard<sup>®</sup>SV Gel and PCR Clean-up System(Promega)を用いて精製し、NdeI(New England Biolabs)および BamHI(New England Biolabs) を用いて制限酵素処理を行った後、アガロースゲル電気泳動を行い、Wizard<sup>®</sup>SV Gel and PCR Clean-up System(Promega)を用いて精製を行った。

pET16b ベクター を NdeI(New England Biolabs)および BamHI(New England Biolabs)を用いて制限酵素処理を行った後、アルカリフォスファターゼ処理を行い、65°C、30 min 加熱をすることにより、酵素を失活させた。アガロースゲル電気泳動を行い、目的産物を Wizard<sup>®</sup>SV Gel and PCR Clean-up System(promega)を用いて精製した。

それぞれの精製産物(PCR 産物、ベクター)を混合し、T4 リガーゼを反応させライゲーションを行った。

#### オ. PIGFの発現精製

PIGF(19-119)は大腸菌 BL21(DE3)株で発現させた。LB 培地で培養を行い、OD<sub>600</sub>=0.5 の時に終濃度が 0.5 mM になるように IPTG を添加し 30°C 一晩培養を行った。菌体回収後、菌体破碎を bioraptor(コスモバイオ)で超音波破碎(Power H, 30sec on 30sec off, 30min)を行い、遠心後(14000 rpm, 20°C, 10 min)、その沈殿画分を洗浄バッファー(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8.0)で洗浄を 5 回行った。次に沈殿画分を変性バッファー(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 6 M 尿素, 10 mM DTT pH 8.0)で 4 時間ボルテックスを行い、可溶化を行った。可溶化後の上清を Ni sepharose high performance resin(invitrogen)を用いて精製を行った。洗浄(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 6 M 尿素, 50 mM イミダゾール, pH 8.0)を行った後、溶出(50 mM Tris-HCl,



150 mM NaCl, 6 M 尿素, 500 mM イミダゾール, pH 8.0)を行った。

溶出溶液に対して終濃度が 10 mM になるように DTT を加え、1 時間放置後 20 mM Tris-HCl, 1 mM cystein pH 8.4 で透析を行うことでリフォールディングを行った。

その後、50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5 でゲル濾過を行い、目的分子量の画分をサンプルとした。

#### g. 表面プラズモン共鳴法を利用したBIACOREによるMBP-VEGFR-TMの活性評価

##### ア. 概要

作製したプロテオリポソームについて VEGF 結合活性の評価は BIACORE により行った。なお BIACORE 測定に用いたチップは L1 チップである。L1 チップはデキストランにアルキル鎖を付与してあり、リポソームを脂質二重膜として固定化することができる。

##### イ. リポソームのBIACORE L1 チップへの固定

プロテオリポソームおよびリポソームは流速 1 $\mu$ l/min で 1h 流すことで BIACORE L1 チップに固定化した。リポソーム固定化後 100  $\mu$ g/ml BSA を流速 1 $\mu$ l/min で 5 min 流した。

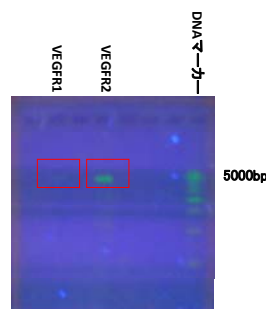
##### ウ. プロテオリポソームへの結合活性

BIACORE L1 チップに固定されたプロテオリポソームについて MBP 抗体、VEGF165 の結合活性をそれぞれ 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4, 25 $^{\circ}$ C の溶媒条件で測定した。

#### (1A)-1-2-3 結果および考察

##### a. VEGFRのクローニング

PCR の結果、目的長断片(VEGFR1:4017bp, VEGFR2:4071bp)を得ることに成功した(図①-(1A)-1-2.3)。その後、目的長断片が pCR-Blunt II -TOPO ベクターに導入されていることを PCR で確認した。



図①-(1A)-1-2.3 VEGFR のクローニング

VEGFRは血管内皮細胞など血管新生が盛んな部位に多く発現していると言われている。今回、胎盤の cDNA を用いたが、この部位は血管新生などが盛んにおこなわれている部位であり、VEGFR の発現が多いと予想される。その部位の cDNA を鋳型として用いた結果、VEGFR1 および VEGFR2 をクローニングすることに成功することができたと考えられる。

#### b. VEGFR1 組み換えタンパク質の作製・設計

VEGFR1 のサブクローニングにおける PCR の結果、VEGFR1(31-338)および VEGFR1(129-229)の目的断片を得ることに成功した。pET16b ベクターにライゲーション後、シーケンスを行い目的配列であることを確認した。

VEGFR1(31-338)および VEGFR1(129-229)の配列が挿入された pET16b ベクターに対してそれぞれの C 端に膜貫通領域 VEGFR1(758-780)を PCR により挿入した。その結果、膜貫通領域を付与した配列 VEGFR1s-TM および VEGFR1I-TM を pET16b ベクターに挿入することに成功した。その後シーケンスを行い、目的配列が pET16b に挿入されていることを確認した。

#### c. HIS-VEGFR1s-TM の発現精製

タンパク質発現条件の重要な factor である IPTG 濃度、発現温度について検討を行ったが、そのほとんどにおいて発現タンパク質は沈殿画分に存在することが分かった(図①-(1A)-1-2.4)。また 20°C で発現させると 30°C で発現させるよりも発現量が多いことが判明した。

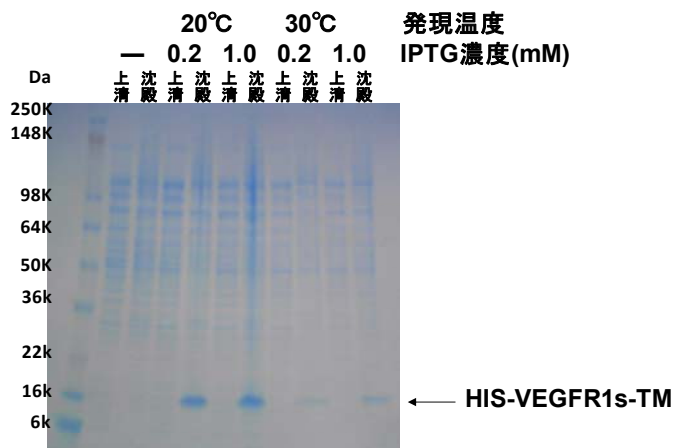
界面活性剤による可溶化を検討したが、可溶化しないことがわかった(図①-(1A)-1-2.5)。よって今回の不溶性画分にある目的タンパク質はそのほとんどが inclusion body であることが分かった。

上清にわずかに溶けていると思われる HIS-VEGFR1s-TM はニッケルカラム精製後、SDS-PAGE の結果、非常に微量に存在するが、最終精製サンプルには不純物も多く含まれていることが分かった(図①-(1A)-1-2.6)。よってこの方法では精製された HIS-VEGFR1-TM を得るのは困難である。

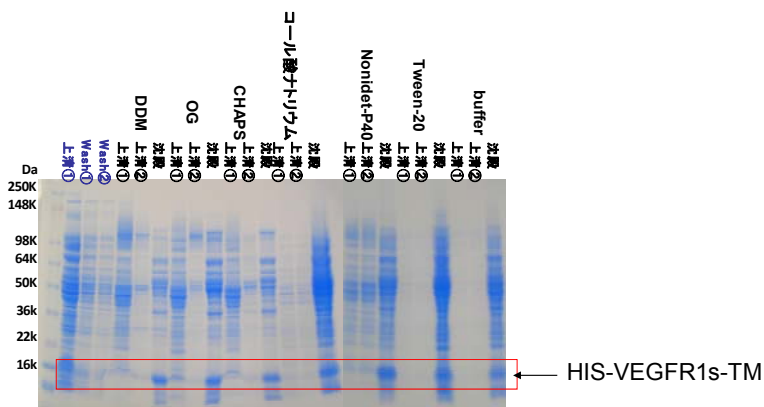
膜タンパク質の発現精製において困難なのは膜タンパク質の可溶化である。HIS-VEGFR1s-TM はその多くが inclusion body に取り込まれていることが分かった。Inclusion body からリフォールディングを行うため検討を重ねたが、ゲル濾過チャートにおいて高分子量の多量体を形成しており、リフォールディングには成功しなかった。

膜タンパク質のリフォールディングは一般に非常に困難とされている。膜貫通領域がベータバレル型の膜タンパク質においては成功例があるが、今回のような  $\alpha$

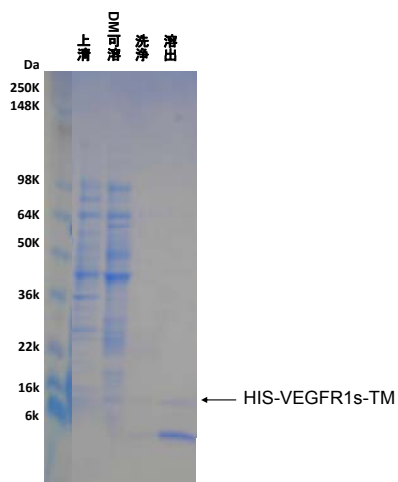
ヘリックス型の膜タンパク質においては未だに成功例がない。なぜリフォールディングが困難なのかについては、膜貫通ヘリックスである脂溶性の高い  $\alpha$  ヘリックスがそれを阻害していると考えられる。界面活性剤の配合や塩濃度等を詳細に検討することでリフォールディングできる可能性がある。



図①-(1A)-1-2.4 HIS-VEGFR1s-TM の発現可溶化検討



図①-(1A)-1-2.5 HIS-VEGFR1s-TM の可溶化の検討

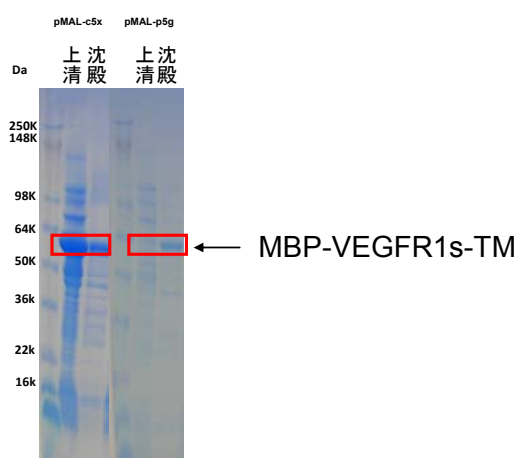


図①-(1A)-1-2.6 HIS-VEGFR1s-TM の精製

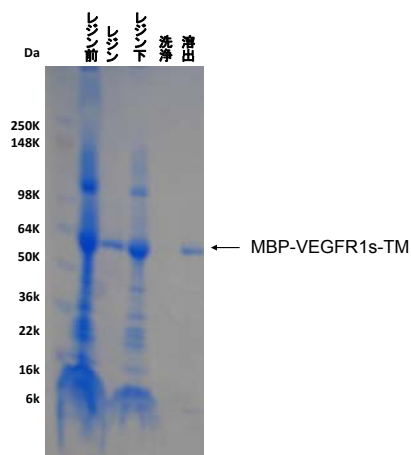
#### d. MBP-VEGFR-TMの発現精製

PCRを行うことで目的断片がpMALベクターに挿入されていることを確認した後、大腸菌BL21(DE3)株でタンパク質を発現させ、SDS-PAGEを行った結果、pMAL-c5xベクターで発現させた大腸菌では上清画分に目的タンパク質があるのに対して、pMAL-p5gベクターで発現させた大腸菌では沈殿画分に目的タンパク質があることが分かった(図①-(1A)-1-2.7)。

大腸菌RosettaTagamiB(DE3)株にMBP-VEGFR1s-TMを発現させるpMAL-c5xベクターを導入し、発現精製を行った結果、ほぼ不純物のないMBP-VEGFR1s-TMが精製できた(図①-(1A)-1-2.8)。



図①-(1A)-1-2.7 MBP-VEGFR1s-TMによる可溶化検討



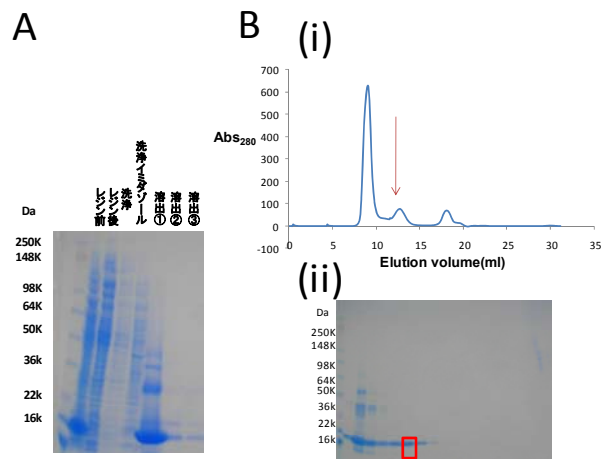
図①-(1A)-1-2.8 MBP-VEGFR1s-TMの精製

今回、MBPを融合させることにより VEGFR1s-TM を可溶化することができた。また大腸菌の膜画分から VEGFR1s-TM が回収できたことから MBP-VEGFR1s-TM は大腸菌の内膜に埋め込まれていたものと考えられる。VEGFR1sにはジスルフィド結合が存在するため、ペリプラズムと細胞質どちらに N 端が存在するかは構造を正しく取らせるために非常に重要である。ペリプラズムに元来存在する MBP が N 端にあることから MBP-VEGFR1 はペリプラズム領域にあるものと考えられる。しかしながら細胞質側にある可能性も考えられるため、大腸菌 BL21(DE3)株で発現させたほうが発現量が多いものの、細胞質でタンパク質を発現させてもジスルフィド結合が形成されやすい大腸菌 RosettaGamiB(DE3)株で発現し、精製することにした。また同じ pMAL ベクターでもペリプラズム分泌型の pMAL-p5g はほとんどが不溶性画分に発現される一方、細胞質発現型の pMAL-c5x は可溶性画分に発現することも興味深い。これは大腸菌内膜への組み込まれやすさが反映されていると考えられる。

Factor Xa における MBP-VEGFR1s-TM の切断の結果、アミロースレジンに VEGFR1s-TM が吸着することが分かった。MBP が切断されたことにより、タンパク質の性質が変化し、アミロースレジンに非特異的に吸着してしまったと考えられる。

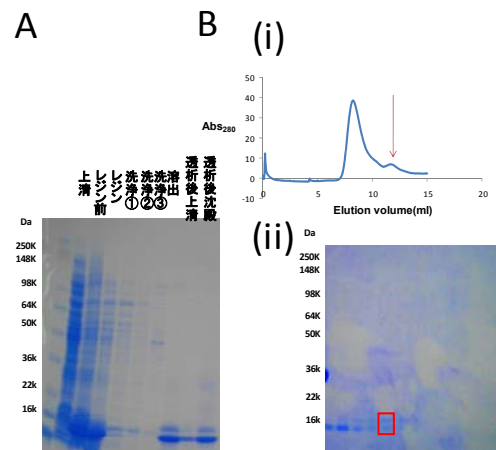
#### e. VEGFRリガンドの作製

VEGFR1のリガンドである VEGF(8-109)および PIGF(19-119)において発現精製を行った。菌体破碎後、不溶性画分に含まれている inclusion body を尿素により可溶化し、ニッケルカラムによる精製を行った後、透析を行い、尿素の除去を行った。その際、PIGF(19-119)については大半のタンパク質が透析の際、沈殿した。その沈殿を除去し、ゲル濾過を行うと VEGF(8-109)および PIGF(19-119)においてゲル濾過チャート上のダイマーの分子量の画分にピークが現れたためその画分をサンプルとして回収した(図①-(1A)-1-2.9, 図①-(1A)-1-2.10)。



図①-(1A)-1-2.9 VEGF(8-109)の精製

A: VEGF(8-109)の精製における SDS-PAGE B:(i) VEGF(8-109)のゲル濾過チャート  
 ト(ii)ゲル濾過の各画分における SDS-PAGE



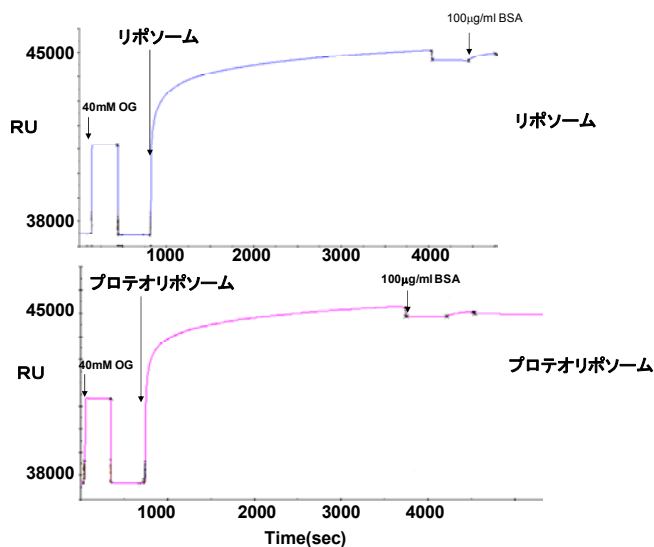
図①-(1A)-1-2.10 PIGF(19-119)の精製

A: PIGF(19-119)の精製における SDS-PAGE B:(i) PIGF(19-119)のゲル濾過チャート  
 ト(ii)ゲル濾過の各画分における SDS-PAGE

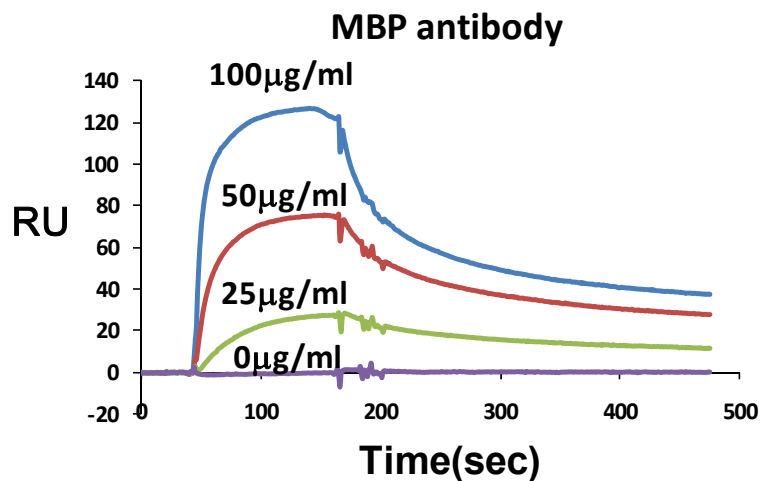
#### f. BIACOREによるMBP-VEGFR-TMの活性の検討

調製したリポソームおよびプロテオリポソームを BIACORE L1 チップに固定化を行った。その結果、それぞれ約 7000 RU 固定化することができた(図①-(1A)-1-2.11)。この固定化量は L1 チップの表面がリポソームによる脂質二重膜に覆われるのに十分な固定化量である。次に MBP 抗体とプロテオリポソームの相互作用を BIACORE により検出を行った(図①-(1A)-1-2.12)。その結果、予備的な結果

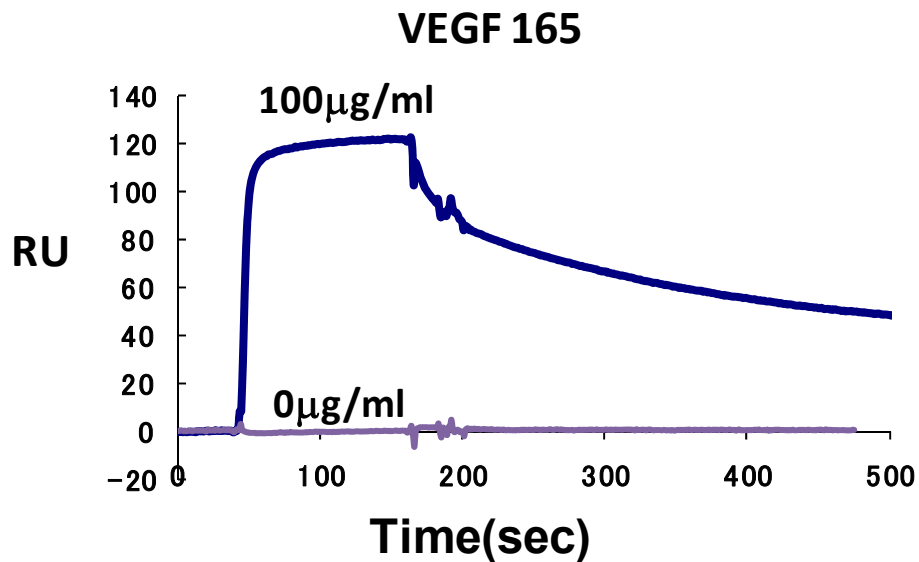
ではあるが濃度依存的な相互作用が確認できた。このことから MBP-VEGFR1s-TM は実際にリポソームに組み込まれていることが確認できた。また VEGF165 についても測定を行い、同じく予備的な結果ではあるが相互作用するという結果を得ることができた(図①-(1A)-1-2.13)。



図①-(1A)-1-2.11 リポソームおよびプロテオリポソームの BIACORE L1 チップへの固定化



図①-(1A)-1-2.12 MBP 抗体とプロテオリポソームの相互作用



図①-(1A)-1-2.13 VEGF165 とプロテオリポソームの相互作用

#### (1A)-1-2-4 まとめ

実施項目と結果について、以下にまとめる。

##### 【実施項目】

本年度の目標は、バイオケミカルシグナルを電気シグナルとして計測が可能なデバイスを作製するため、まず膜タンパク質等の調製技術を検討する。さらに、膜タンパク質等をデバイスに導入するプロセスの開発を行うことである。

具体的には、疾患関連マーカーと結合する 1 種類の受容体タンパク質（膜タンパク質）をクローニングし、大腸菌を用いたタンパク質の大量発現系を構築する。またこのタンパク質を大量作製し、精製する。さらにこれをリポソーム膜に組み込みプロテオリポソームを作製し、表面プラズモン共鳴法により当該疾患関連マーカーとの結合を確認する。

##### 【結果】

疾患関連マーカーである血管内皮細胞増殖因子 VEGF と結合する受容体タンパク質である血管内皮細胞増殖因子受容体 VEGFR をクローニングし、VEGF 結合領



域である VEGFR1(129-229)および膜貫通領域(758-780)を融合させたタンパク質の大量発現系を構築した。このタンパク質を MBP 融合タンパク質として大腸菌で大量発現させ、精製した。さらにこの膜タンパク質をリポソーム膜に挿入することによってプロテオリポソームを作製した。そのリガンドである VEGF(8-109)および PlGF(19-119)について大量発現系を構築し、発現、精製を行った。MBP 抗体および VEGF165 について表面プラズモン共鳴法によりその結合を調べ、予備的な結果ではあるがその結合を確認した。

## (1A)-1-3 バイオケミカルシグナルを電氣的に計測するデバイスの作製

### (1A)-1-3-1 概要

環境中には、植物の香りのように効果のある匂い物質や、近年の住宅内の塗装や喫煙習慣による人体に悪影響を与える匂い物質など、様々な揮発性物質が含まれる。人体に悪影響を及ぼす匂い物質については低濃度で効果を示すものや、瞬時に効果が表れるものなど様々であり、これら匂い物質の詳細な情報が必要とされる。従来の化学センサには、水晶振動体や金属酸化物半導体を利用したセンサが開発・使用されているが、感度や選択性が低いことや、検出時間がかかること、そして高価であることなどの問題点がある。現在、高感度かつ高選択的に匂い物質を瞬時に感知できる安価なセンサの開発が期待されている。最近では、感度と選択性に関して生体による匂い認識能力が注目されており、その利用に向けた研究が盛んに行われている。

昆虫は外界に存在する環境因子を高感度に識別する能力を持つ。この能力は、昆虫に特徴的な匂い受容メカニズムに因るものである。匂い識別に関わる昆虫の嗅覚受容体は、これまでにキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*)、カイコガ (*Bombyx mori*) など 6 種類の昆虫種から単離されている。それらのうち、約 100 種類の嗅覚受容体については、異生物種発現系を利用して機能解析が進められている。例えば、キイロショウジョウバエでは 24 種類、ハマダラカでは 50 種類の嗅覚受容体について食べ物や汗の匂い成分を含む 100 種類以上の化学物質に対する応答特性が決定されており、それぞれの受容体は様々な化学物質に対し異なる強度で応答し、匂い成分を識別していることが示されている。

また、昆虫の嗅覚受容系では、哺乳類とは異なる高感度匂い受容メカニズムを発達させてきた。哺乳類の嗅覚受容体は G タンパク質と共役することにより匂い受容シグナルを細胞内へと伝え、イオンチャネルを活性化する。一方で、昆虫の嗅覚受容体は、Or83b ファミリータンパク質と呼ばれる膜タンパク質とともにイオンチャネル一体型の受容体 (イオンチャネル型受容体) を形成している。そのため、匂い分子が嗅覚受容体に結合すると、細胞内シグナル伝達機構を介さずにイオン流入が誘導され、応答が増幅される。

このイオン流入を検出する方法として用いられてきたのが、アフリカツメガエル卵母細胞による電気生理学手法 (2 電極膜電位固定法) である。卵母細胞は、1980 年代からチャネルや受容体の機能解析の手法として利用されてきており、昆虫の嗅覚受容体の機能測定も可能であることが報告されている。即ち、昆虫の嗅覚受容体と Or83b ファミリータンパク質、及びアフリカツメガエル卵母細胞を利用す

ることにより、バイオケミカルシグナルとして様々な匂い成分の応答を容易に電気シグナルに変換し、検出することが可能である。

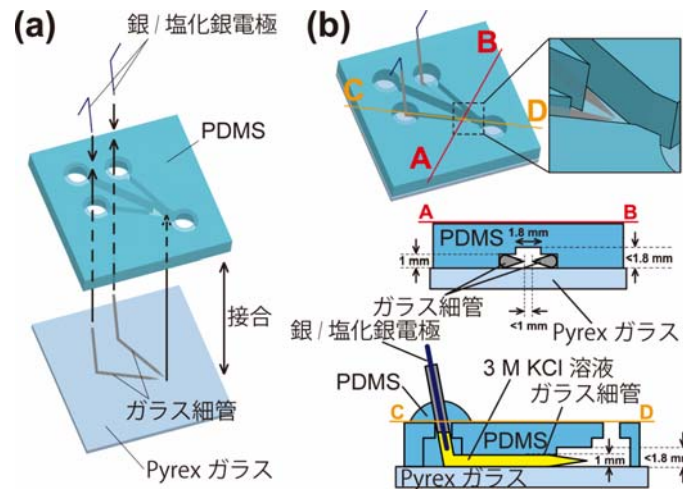
本年度は、バイオケミカルシグナルを電気シグナルとして計測が可能なデバイスを作製することを目的に、多チャンネル電流計測用増幅器を用いた嗅覚受容体発現卵母細胞から電流計測を行うためのチップデバイスの試作を行った。次に、作製したチップと増幅器を用いて、これまでに機能同定されている性フェロモン受容体を発現する卵母細胞で性フェロモンに対する電流応答を計測した。

### (1A)-1-3-2 実験方法

#### a. 卵母細胞の電流計測用チップデバイスの作製

微小流路内に電位計測用の二電極を設けた検出デバイスは次の材料を用いて作製した(図①-(1A)-1-3.1)。それらは(1) Pyrex ガラス(5 cm×5 cm×2 mm、#7740、コーニング)とPDMS(ポリジメチルシロキサン)(SILPOT 184、東レ・ダウ コーニング)で構成される流路、(2) ガスバーナーで加熱し、手動でL字型に屈曲させた硼珪酸ガラス製キャピラリー(外径1 mm、内径0.8 mm、G-100、ナリシゲ)、(3) 銀線(直径0.4 mm、AG-401355、ニラコ)を次亜塩素酸水溶液に数時間浸漬して調製した銀/塩化銀電極である。

PDMSの鋳型となる構造物はアクリル樹脂を掘削加工して作製し、Pyrex ガラスとの接合は酸素プラズマ処理(10 Pa、75 W、5 秒間、酸素流量20 ml/min、Compact Etcher FA-1、サムコ)にて行った。ガラスキャピラリーは先端の外径が数十 $\mu\text{m}$ 程度となるようにプーラー(PB-7、ナリシゲ)で引いて調製した。ガラスキャピラリー内には予め3 MのKCl溶液を満し、図①-(1A)-1-3.1に示した通り、二本の銀/塩化銀電極を各々、ガラスキャピラリーに挿入した。その二本のガラスキャピラリー先端の距離は卵母細胞(直径1-1.5 mm)をトラップするために約1 mm未満となるように配置した。



図①-(1A)-1-3.1 電流計測のためのチップデバイス

(a) デバイスの構成材料とその配置。ガラスキャピラリーは PDMS と Pyrex ガラス板に挟み込まれる。(b) 作製した電極一体型流路のスケールと断面模式図。二本のガラスキャピラリーの先端間距離が 1 mm 未満になるように配置してある。

## b. 嗅覚受容体のアフリカツメガエル卵母細胞での発現

### ア. 嗅覚受容体遺伝子の単離

触角の totalRNA は羽化一週間以内の成虫の触角から Trizole (Invitrogen) を用いて抽出し、DNase I (Nippon gene) 処理したものを使用した。cDNA 合成は RNA PCR kit ver.3.1 (TAKARA Bio Inc.) を用いて行った。逆転写の反応は 1  $\mu\text{g}$  の total RNA から oligo-dT アダプタープライマー、AMV 由来逆転写酵素 (TAKARA Bio Inc.) を用いて、42°C30 分間反応させた。合成した cDNA は使用するまで -20°C で保存した。PCR は Prime STAR DNA ポリメラーゼ (TAKARA Bio Inc.) と合成した cDNA を用いて行った。受容体遺伝子の単離のために、制限酵素部位 (EcoR1、Xba1 (New England Bio Labs Inc.)) を付加したプライマーを用いて ORF 配列を得た。PCR は 94°C2 分間 (1 サイクル)、94°C15 秒間 55°C10 秒間 68°C1.5 分間 (35 サイクル)、72°C5 分間 (1 サイクル) の条件で行った。増幅した産物は、制限酵素 EcoR1 及び Xba1 を用いて切断し、同様に切断した卵母細胞発現用ベクター (pCS2+) にクローニングした。

### イ. アフリカツメガエル卵母細胞での嗅覚受容体の発現

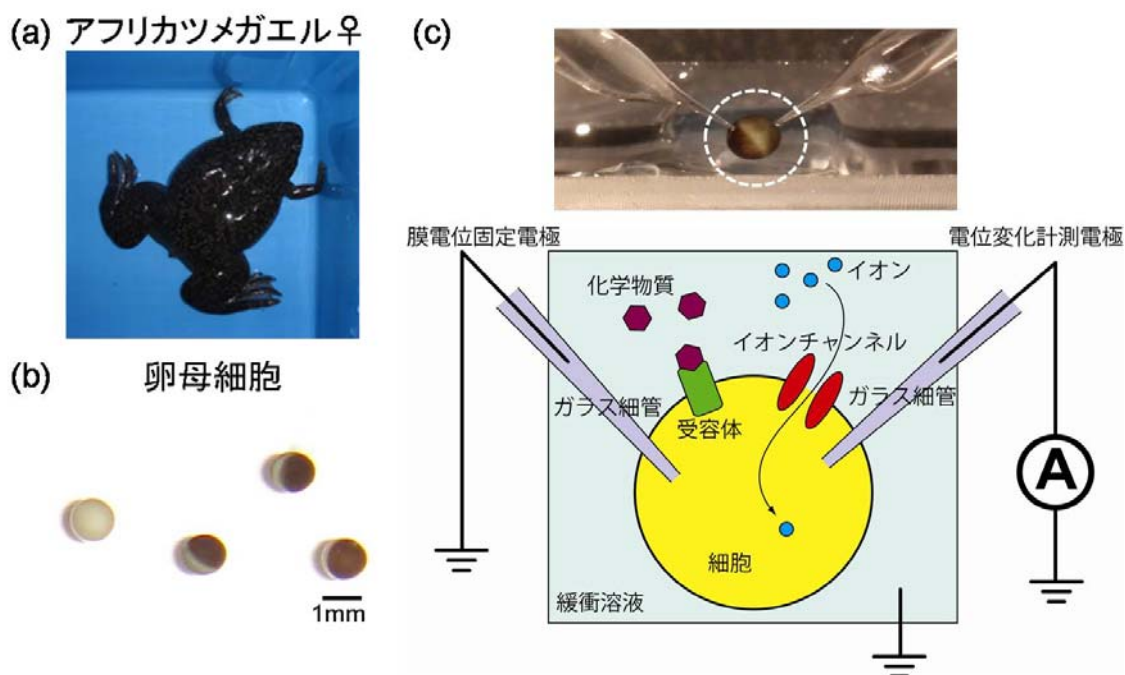
ステージ V-VI のメスアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) から卵塊を摘出し、1.5 mg/ml のコラゲナーゼ (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) を含む  $\text{Ca}^{2+}$ -free の

バッファー (82.5 mM, NaCl, 2 mM, KCl, 1 mM, MgCl<sub>2</sub>, 5 mM, HEPES, pH7.5) 中で 20°C 1.5 時間処理した。処理した卵母細胞は 10 µg/ml のペニシリンストレプトマイシン溶液を含む Barth solution (88 mM, NaCl, 1 mM, KCl, 0.3 mM, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.4 mM, CaCl<sub>2</sub>, 0.8 mM, MgSO<sub>4</sub>, 2.4 mM, NaHCO<sub>3</sub>, 15 mM, HEPES, pH7.6) 中で 2 時間以上培養した後、cRNA のインジェクションを行った。cRNA は、受容体をクローニングした発現用ベクター (pCS2+) から mMESSAGE mMACHINE (Ambion Inc.) を用いて合成した。合成した嗅覚受容体遺伝子と Or83b ファミリータンパク質遺伝子の cRNA は、25 ng ずつ卵母細胞にインジェクションを行った。インジェクションを行った卵母細胞は Barth solution 中で 20°C 3~6 日間保温し、電流計測に用いた。

#### ウ. 匂い成分の準備と嗅覚受容体発現卵母細胞の応答測定

性フェロモン成分 ((E,Z)-10,12-hexadecadien-1-ol (bombykol)、(E,Z)-10,12-hexadecadienal (bombykal)、Z-11-hexadecenal (Z11-16:Ald)) は、ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide; DMSO) に溶解した。刺激溶液は Barth solution に 1% の DMSO 濃度となるように希釈したものをを用いた。上記で作製したチップデバイスの流路中にはポンプ (Peristaltic pump、PST-250、イワキ) を用いて Barth solution を流しておき、濃度調整した刺激溶液を上流より添加することで卵母細胞に刺激を与えた。

卵母細胞の全電流は 2 電極膜電位固定法 (図①-(1A)-1-3.2) (OC-725 (Warner)、Triton (Tecella LLC)) により測定した。OC-725 でのデータ取得は Digidata1322A と pCLAMPver.8.0 (Axon Instrument) を用いて行った。内部電流は -80mV に保持した電圧で刺激に対する応答を測定した。Triton を用いた計測では、サンプリングレートは 0.1 msec で、-80mV に保持した固定膜電位で刺激に対する応答を測定した。



図①-(1A)-1-3.2 アフリカツメガエル卵母細胞を用いた2電極膜電位固定法

(a)アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) のメス。(b)摘出した卵母細胞。スケールバーは1 mmを示す。(c)性フェロモン刺激による卵母細胞の応答測定の様式図。*OR83* 遺伝子と嗅覚受容体遺伝子のcRNAをインジェクションした卵母細胞の測定法を示す。化学物質(匂い成分)が細胞の受容体に結合することにより生じるイオンの流入を細胞膜内外の電位差として二本の電極で計測する。一方の電極は電位差を保つための膜電位固定電極であり、他方は電位変化を検出するための電極である

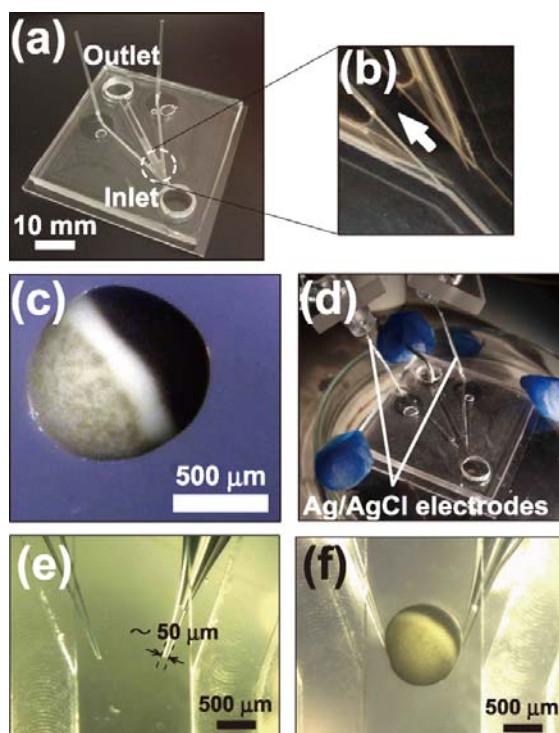
### (1A)-1-3-3 実験結果と考察

#### a. 流路内での細胞トラップ

図①-(1A)-1-3.3 にデバイスの写真と細胞トラップの様子を示す。PDMS/ガラス流路内に設置したガラスキャピラリーの先端径は数十 $\mu\text{m}$ が検出に適していた。直径が数百 $\mu\text{m}$ の場合、ガラスキャピラリー内に満たしたKCl溶液が流路側へ流出し、応答信号が検出できなかった。また、細胞がキャピラリー側に吸引される現象が見受けられ、細胞の損傷が観察された。一方、先端部分の径が数 $\mu\text{m}$ 程度の場合は応答強度が小さく観測された。そのため、本実験ではキャピラリーの先端径を50 $\mu\text{m}$ 程度になるように作製し、実験を行った。流れに沿って細胞がトラップされる際、どちらか一方の電極だけが細胞にアクセスするのを防ぐため、二本のガラスキャピラリー先端は流れの向きを軸にして互いに対称となる位置に配置する必要がある

った。

この機構により、これまで顕微鏡観察下でマイクロマニピュレータを用いて行っていた細胞への電極挿入の簡便化に成功している。



図①-(1A)-1-3.3 デバイスの写真と細胞のトラップ

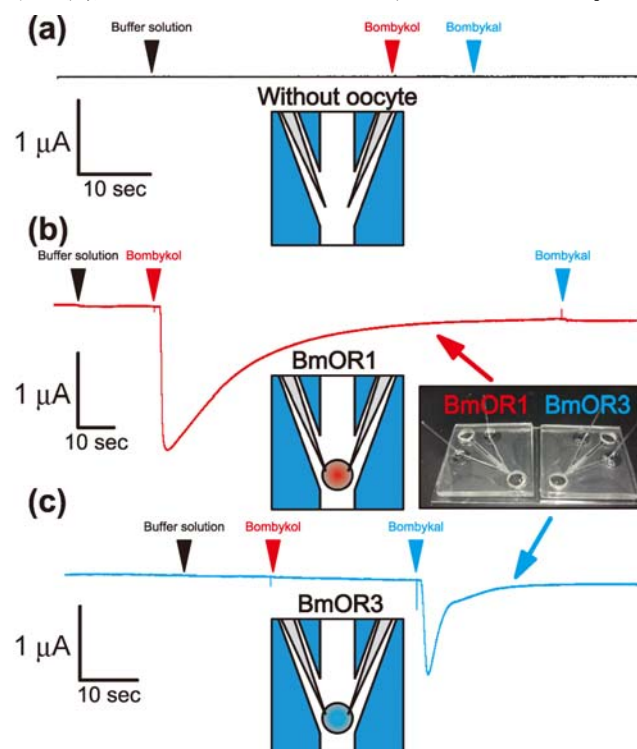
(a) デバイスの全体写真。(b) 細胞トラップ領域。溶液の流れを白色矢印で示してある。(c) アフリカツメガエルの卵母細胞。(d) 実際に電極を挿入した写真。(e) 細胞トラップ前と (f) トラップされた後の写真。

#### b. リガンドに対する選択性

作製デバイスに細胞を利用しない場合と BmOR1 もしくは BmOR3 を発現させた細胞を利用した場合の三種類の計測を行った結果、図①-(1A)-1-3.4 のような電流値の変化が得られた。

細胞がない場合は緩衝溶液、ボンピコール、ボンピカールのいずれを加えても電流値の変化は確認されなかった。一方、BmOR1 を発現させた細胞を利用した系ではボンピコールにのみ反応し、緩衝溶液もしくはボンピカールを加えても変化は確認されなかった。また、BmOR3 発現細胞に関しては反対にボンピカールのみに対応を示した。

以上から今回試作したデバイスが化学物質のセンシング機能を有していることが確認でき、且つボンビコールとボンビカールの判別が可能であることが実証できた。ボンビコールとボンビカールは末端の官能基が水酸基とアルデヒド基の違いのみで非常に似た構造である。しかしながら、本デバイスは生体分子の基質特異性により、極めて高い選択性が得られていることがわかる。図①-(1A)-1-3.4(b)と図①-(1A)-1-3.4(c)の結果は各々のデバイスを並列配置して測定可能なことを示している。そのため、同様の検出素子を更に並列化することで複数の検出が可能となり、多チャンネル測定のプロトタイプを示すことができた。



図①-(1A)-1-3.4 作製デバイスを用いた計測結果

(a) 細胞を装備せずに測定した結果。緩衝溶液を 20  $\mu\text{l}$ 、10  $\mu\text{M}$  のボンビカール溶液を 20  $\mu\text{l}$ 、10  $\mu\text{M}$  のボンビコール溶液を 20  $\mu\text{l}$  の順で加えている。(b) BmOR1 を発現させた細胞を用いて測定した結果。緩衝溶液を 20  $\mu\text{l}$ 、10  $\mu\text{M}$  のボンビカール溶液を 20  $\mu\text{l}$ 、10  $\mu\text{M}$  のボンビコール溶液を 20  $\mu\text{l}$  の順で加えている。(c) BmOR3 を発現させた細胞を用いて測定した結果。緩衝溶液を 20  $\mu\text{l}$ 、0.5  $\mu\text{M}$  のボンビカール溶液を 20  $\mu\text{l}$ 、0.5  $\mu\text{M}$  のボンビコール溶液を 20  $\mu\text{l}$  の順で加えている。

### c. リガンド濃度に対する応答強度の変化

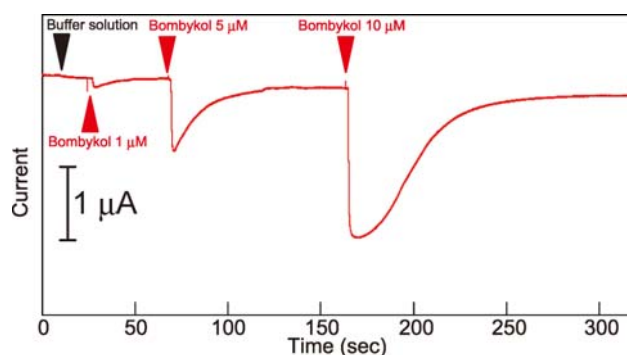
図①-(1A)-1-3.5 と図①-(1A)-1-3.6 はそれぞれ濃度を変化させたボンビコールとボンビカールに対する BmOR1 発現細胞と BmOR3 発現細胞の連続的な応答測定結



果である。リガンド濃度の増加に伴い、応答強度が増加していることが確認できた。

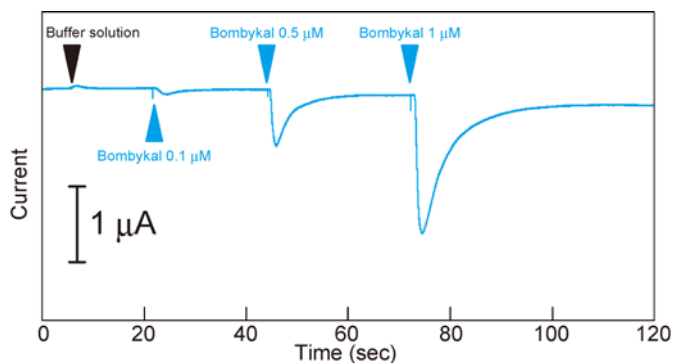
本実験での濃度範囲では電流値変化はリガンド濃度に依存してほぼ線形に増加している。しかしながら、酵素反応などの多くの生体反応の特性と同様、更に高濃度側では飽和状態に達し、応答電流値は一定以上増加しなかった。これらの結果から、検出濃度範囲に制約があるものの、本検出デバイスは検出物質の濃度に依存した定量測定が可能であることがわかった。

受容体の発現量や細胞の個体差に依存して応答強度の強弱が観測されたが、低濃度側では BmOR1 発現細胞で数百 nM、BmOR3 発現細胞で数十 nM のリガンド濃度が検出限界であった。



図①-(1A)-1-3.5 BmOR1 発現細胞利用センサの濃度依存応答

緩衝溶液 20  $\mu\text{l}$  と 1  $\mu\text{M}$ 、5  $\mu\text{M}$ 、10  $\mu\text{M}$  のボンビコール溶液を 20  $\mu\text{l}$  ずつ順番に加えた。



図①-(1A)-1-3.6 BmOR3 発現細胞利用センサの濃度依存応答

緩衝溶液 20  $\mu\text{l}$  と 0.1  $\mu\text{M}$ 、0.5  $\mu\text{M}$ 、1  $\mu\text{M}$  のボンビコール溶液を 20  $\mu\text{l}$  ずつ順番に加えた。

今回試作したデバイスは独立した流路でそれぞれ細胞一つずつをトラップし、計測できるシステムであるが、この仕組みを応用し、複数の細胞を同一流路内で扱うことも可能である。本実験では図①-(1A)-1-3.5 及び図①-(1A)-1-3.6 の結果からわかる通り、細胞の応答が他方のリガンドにほとんど応答しない基質特異性の高い系である。今後、化学物質の混合試料の検出同定には多種類の受容体を各々独立した細胞で発現させ、その応答を複合的に得ることで対応可能と考えている。また現在、ガラス管内が二領域に仕切られた  $\theta$  管などを利用することにより、電極挿入の更なる簡便化を図っている。

#### d. まとめ

化学受容体を発現させたアフリカツメガエルの母卵細胞を利用して化学量センサの構築に成功した。生体反応の特異性の高さを利用することにより、化学物質のわずかな官能基の違いでも判別できる検出系となっている。今回作製したデバイスは微小流路と電位計測系が一体となっていることにより、小型の系での細胞の応答検出が実現できた。

我々の提案するデバイスの機構は原理的に一基板上で複数の細胞にも応用可能であるため、より小型の系での多チャンネル化に適していると考えられる。

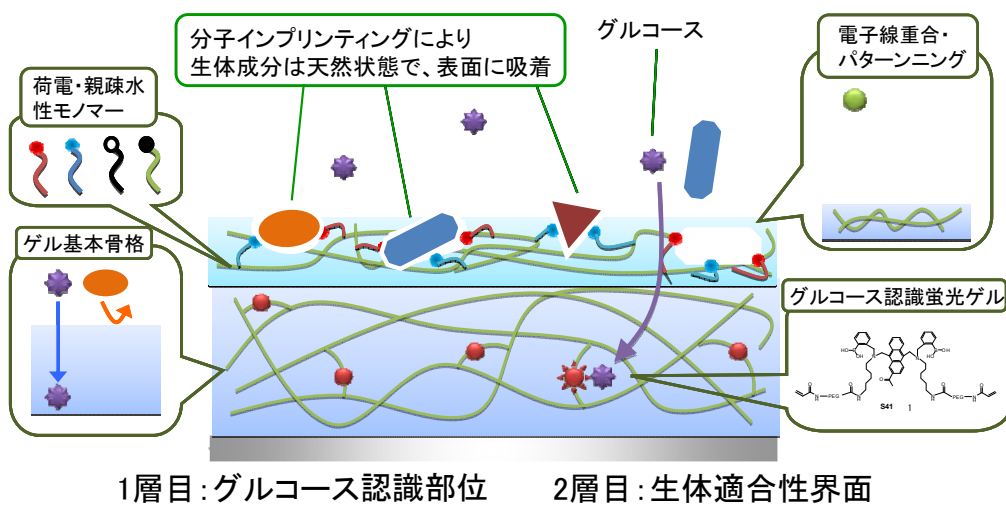
## (1A)-2 ハイドロゲル界面形成プロセスの開発

### (1A)-2-1 概要

近年問題となっている医療費増加の抑制のため、より優れた治療法の開発に向けた研究が盛んに行われている。昨今ではこれに加え、血糖値や血圧など日常生活における健康管理による病気予防も重要視されるようになってきている。この日常的な健康管理のためには、患者のQOLを損ねることなく、生体情報や生体物質をセンシング可能な技術・デバイスの開発が必要不可欠であり、特に生体内成分の常時モニタリングのための生体内埋め込み型デバイスの開発が広く期待されている。

しかし、デバイスのような異物を工夫なく生体内に埋め込むと、体内組織の炎症反応や、それに伴うセンサー周囲への被包形成等により、センサーがその性能を発揮することができなくなってしまう。これを防ぐため、センサーにとって都合のよい組織反応を提示できるデバイス界面の形成、すなわち、生体適合性界面形成プロセスの開発が急務である。

現在でも、デバイス界面への生体適合性付与のため、ポリマーブラシで修飾した表面の開発、生体組織を模倣した表面の構築などの研究が盛んに行われているが、ここではこれらとは異なる、分子インプリンティング技術を用いた、生体適合性界面形成プロセスの開発を試みる。天然状態の生体成分に対する分子インプリンティングをセンサーゲル界面に形成することができれば、センサーゲル界面における異物反応の抑制が可能になると期待される。図①-(1A)-2.1 に、本研究が目指す、生体適合性界面を有する生体成分センサーゲルの概要図を示す。



図①-(1A)-2.1 本研究が目指す長期間埋め込みが可能な  
グルコースセンサーデバイスの概要図

このような表面製造プロセスは、センサーだけでなく、血管カテーテルや人工血管の抗血栓性や、各種インプラントデバイス表面に特定の細胞との親和性を付与し、組織適合性を上げるための表面設計にも幅広く展開可能である。

これに対し、前年度は、高速・低エネルギーで重合が可能と考えられる電子線照射による重合条件について検討し、膜厚を制御したゲルを石英基板上に電子線重合により作製することに成功した。

これらを踏まえ、本項目では以下の実施項目について研究を行ったので、ここに報告する。

#### 【実施項目 1】

生体適合性を目指した分子インプリンティング界面形成法として、高速重合が可能で、重合開始剤を必要としない電子線重合法の有効性について確認する。

#### 【実施項目 2】

ゲル膜評価システムを導入して、ハイドロゲル界面形成プロセス、および膜構造を評価する。

### (1A)-2-2 実験方法

#### (1A)-2-2-1 分子インプリンティング能評価のためのゲル固定化方法検討

今回、作製したゲルの分子インプリンティング能を評価するため、微小な質量変化をモニタリング可能な QCM(分子間相互作用測定システム)を導入した。本装置は、時計にも利用されているような規則正しく振動を発振する水晶振動子の振動数変化を検出する装置である。水晶振動子からなるセンサー表面に生体成分などの物質が付着すると、その重さに応じた振動数が生じる。この変化を検出することで、センサー表面への分子の吸着などをモニタリングすることが可能である。今回、導入した装置に用いる水晶振動子センサー(QCM センサー)は、センサー表面が金、酸化シリカ、チタン、ハイドロキシアパタイトなどでコーティングされているものが用意されている。図①-(1A)-2.2に今回導入したQCMの外観図を示す。



図①-(1A)-2.2 QCM（分子間相互作用測定システム）外観図

#### a. ゲル固定化のための前処理

ここでは、QCM センサー表面へのゲル固定化のため、金でコーティングされている Au センサーを用いることとした。以下に金表面へのゲル固定化方法を述べる。

1. Au センサーを UV オゾンクリーナーにて、30min 洗浄
2. Au センサーを 8mM *N,N'*-シスタミンビスアクリルアミドのエタノール溶液中に浸漬し、1 晩置く。
3. 大量のエタノールにて、センサーの洗浄を行い、窒素吹き付けにより乾燥させる。

これにより、アクリルアミド残基が QCM 表面に、自己組織化膜(SAM)として固定化された Au センサーを得ることができる。

#### b. 化学重合によるゲル固定化

次に、確認のため、前処理を行った Au センサー上へのゲル固定化を行った。以下に実験方法を述べる。

1. 60 mM リン酸緩衝液(PB buffer, pH7.4), 1.0 mM EDTA 溶液に、アクリルアミド(AAm)が 15wt%、*N,N'*-メチレンビスアクリルアミド(Bis-AAm)が 0.3wt%となるように溶解させた溶液を適量調整し、窒素バブリングにより、脱酸素を行った。
2. 1 の溶液に対し、過硫酸ナトリウム(SPS)と *N,N,N',N'*-テトラメチルエチレンジ

アミン(TEMED)を適量加え攪拌し、これを 2 $\mu$ L、ゲル固定化前処理を行った Au センサー上に滴下した。

3. これに UV オゾンで洗浄したガラス板を被せ、窒素雰囲気下で約 1 時間置いて、重合を進行させた。

4. 重合終了後、ガラス板を剥がし、milli Q 中にて、一晩洗浄した。

### c. 電子線重合によるゲル固定化

次に電子線照射による Au センサー上へのゲル固定化を行った。以下に実験方法を述べる。

1. (1A)-2-2-1a 記載の方法にて、Au センサーに対し、ゲル固定化のための前処理を行った。

2. 所定濃度の AAm、Bis-AAm などを含む溶液を調整し、0.5 $\mu$ L を Au センサー表面に滴下した。

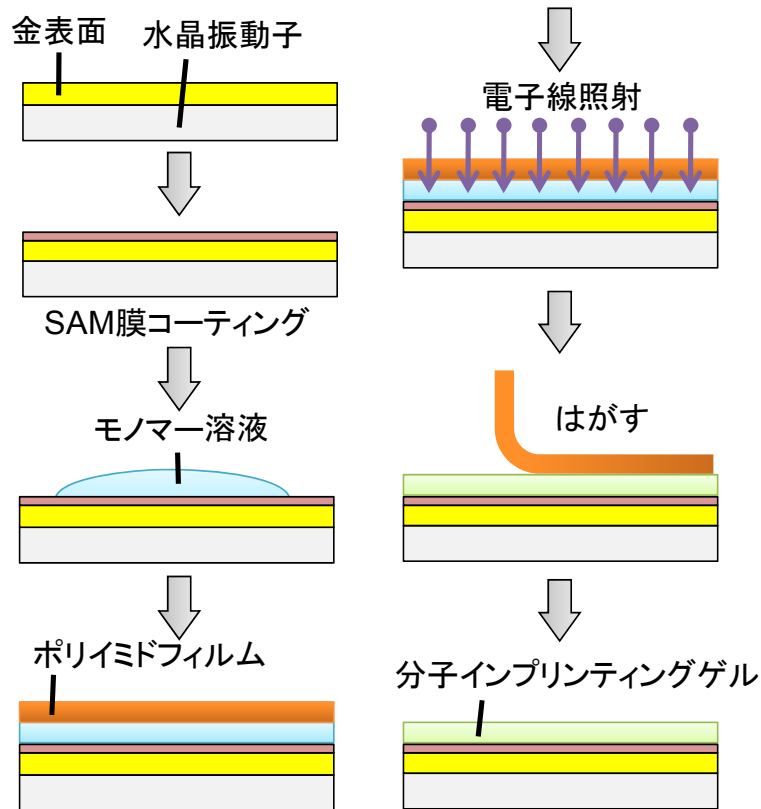
3. 空気を抱き込まないように注意しながら、適当な大きさにカットしたカプトンフィルムを上からかぶせた。

4. カプトンフィルム越しに電子線を照射し電子線重合を行った。

5. カプトンフィルムを剥がし、ゲルの存在を顕微鏡下で観察した。

6. milli Q を吹きかけて洗浄したのち、milli Q 中に一晩以上つけることで、洗浄を行った。最後に、測定用のバッファー中につけ、洗浄とともに平衡化させた。

上のゲルを作製する工程部分をまとめたものを図①-(1A)-2.3 に示す。



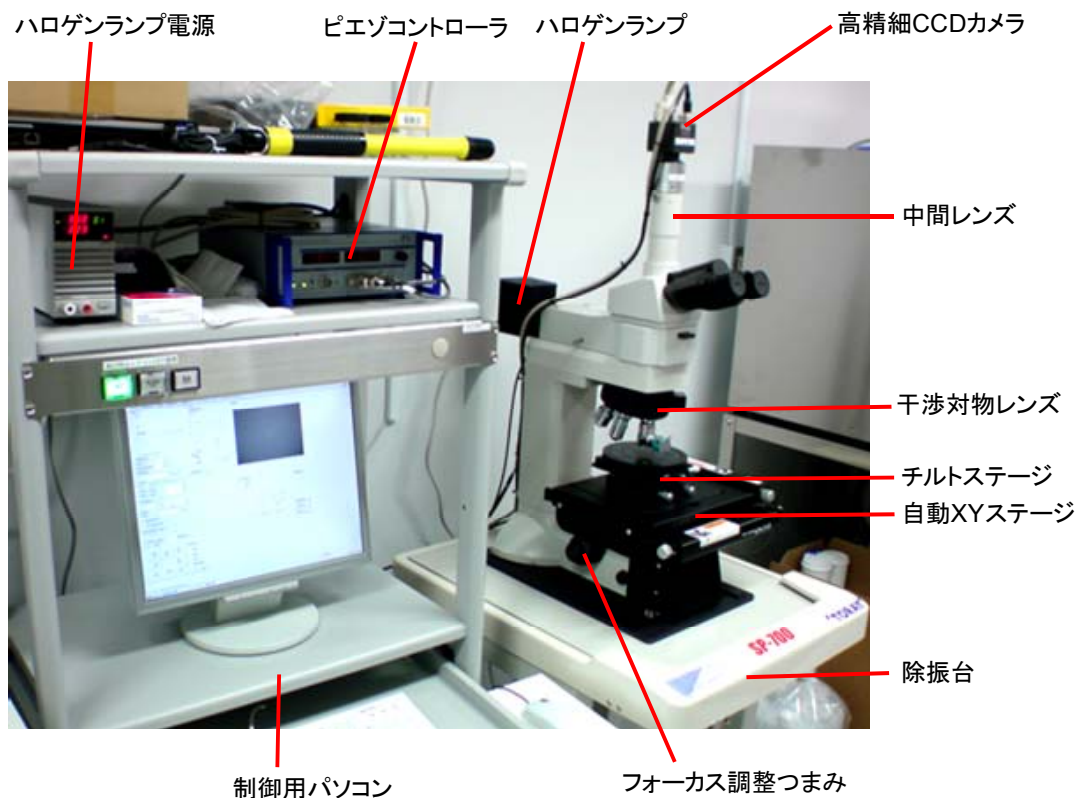
図①-(1A)-2.3 分子インプリンティングゲルの作製方法

#### d. 電子線重合によるゲル作製方法の評価

タンパク質などの生体成分は、金などのセンサー表面には非特異的に吸着してしまう。そのため、Auセンサー面に作製したゲルが、Au面の全体を覆っていないと、ゲルへのタンパク質の吸着を正しく評価することができない。

また、ゲルへのタンパク質吸着量は、ゲルの体積、すなわち厚みに比例すると予想されるため、作製したゲルの厚みを測定する必要がある。

これらの評価のため、試料表面の形状、および、表面膜の厚みなどが観察可能なゲル膜評価システム(表面形状測定装置)を導入した。本装置は試料高さに従い発生する干渉縞を観察し、この干渉波形のピーク位置を解析することで、試料の高さを求めることが可能である。また、透明膜であれば、表面と膜下の干渉縞をとらえることで透明膜(ゲルなど)の膜厚も求められる。図①-(1A)-2.4に今回導入した、ゲル膜評価システムの外観図を示す。



図①-(1A)-2.4 ゲル膜評価システム外観図

ここでは、(1A)-2-2-1 c の実験方法において、15wt% AAm, 0.75wt% Bis-AAm の溶液を調整し、使用量を 1.0, 2.5, 5.0 $\mu$ L としたときに作製したゲルの膜厚、及び、金表面がゲルで覆われているかどうか評価した。

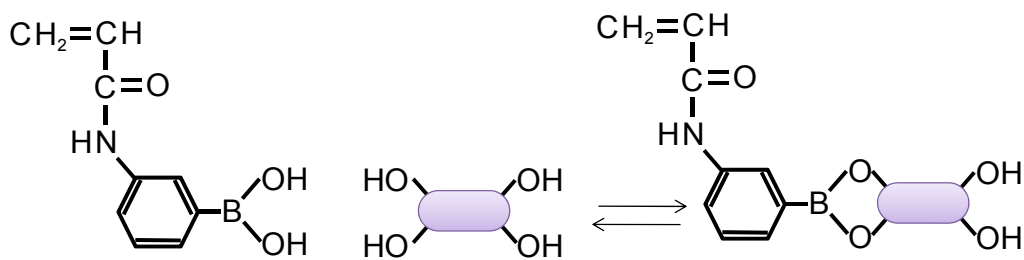
#### (1A)-2-2-2 グルコース分子インプリンティングゲル作製条件検討

電子線照射による分子インプリンティングゲル作製条件検討のため、ここでは、グルコースを分子インプリンティングの対象(テンプレート)として、作製条件の検討を行った。

分子インプリンティングゲルは一般的に、分子インプリンティングの対象となるテンプレートと、テンプレートと結合する性質を持つ機能性モノマーとを結合させた状態で、ゲル化させることで作製されている。

ここでは、グルコースの分子インプリンティングを行うための機能性モノマーとして、3-acrylamidophenylboronic acid(3AAmpb)について検討を行った。図①-(1A)-2.5 に示すように、3AAmpb が構造中に持つボロン酸基は、糖類と特異的にかつ、可逆的に結合するという性質を有している<sup>3)</sup>。





図①-(1A)-2.5 3AAmpb と糖類との結合反応

(1A)-2-2-1c 記載の方法にて、分子インプリンティング(MIP : molecular imprinting polymer)ゲル、分子インプリンティングしない(NIP : non-imprinting polymer)ゲル、機能性モノマーなしの AAm ゲルを電子線重合により作製した。それぞれの組成は以下のようにした。

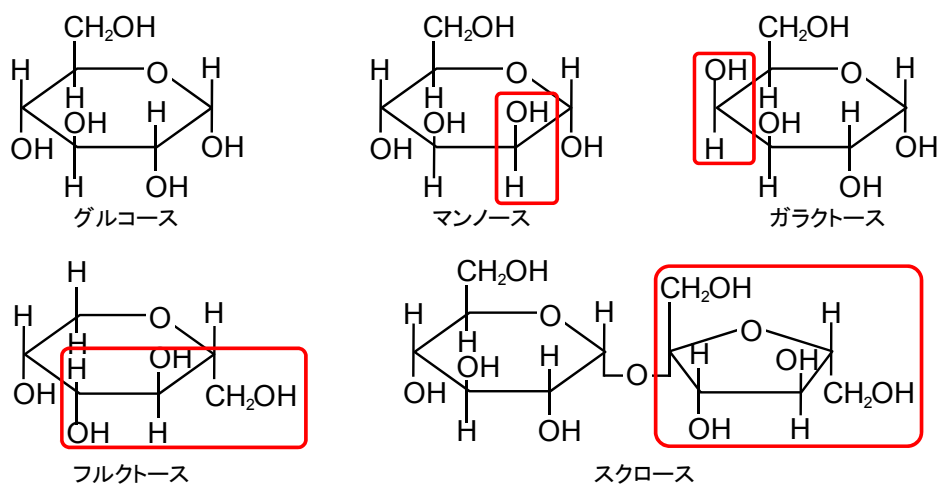
MIP ゲル : 15wt% AAm, 0.3wt% Bis-AAm, 1.27wt% 3AAmpb, 1200mg/dL Glucose

NIP ゲル : 15wt% AAm, 0.3wt% Bis-AAm, 1.27wt% 3AAmpb

AAm ゲル : 15wt% AAm, 0.3wt% Bis-AAm

各々、60mM PB, 1mM EDTA 溶液にて調整

グルコース分子インプリンティング能の評価は、QCM を用いて行った。グルコースに対する特異的な吸着能の評価のため、グルコースと近い構造を持つ 4 種類の糖をサンプルとして用いた。各糖濃度は、500mg/dL とした。図①-(1A)-2.6 に、サンプルとして用いた糖とその構造式を示す。



図①-(1A)-2.6 グルコース分子インプリンティング評価に用いた糖とその構造式

各種ゲルを固定化させた QCM センサーを QCM にセットし実験を行った。60mM PB にて、30 分程度洗浄し平衡化させたのち、各糖溶液を順次流し、振動数変化をリアルタイムで検出した。各糖溶液の間には洗浄のため PB を流した。糖溶液、洗浄用の PB を流すときなど、実験中の流速は全て 150 $\mu$ L/min とした。

### (1A)-2-2-3 アルブミン分子インプリンティングゲル作製条件検討

#### a. アルブミンMIPのための機能性モノマー検討

タンパク質の分子インプリンティングを行うにあたり、まずは、生体で一番多いタンパク質である、アルブミンを対象に分子インプリンティングを試みた。アルブミンの分子インプリンティングを行うための機能性モノマーとして、N-[3-(Dimethylamino)propyl]-methacrylamide (DMAPMA)を用いた<sup>4)</sup>。DMAPMA は疎水性で正電荷を有する分子であり、1 分子中に 18 の負電荷を有するアルブミンと結合する。

(1A)-2-2-1c 記載の方法にて、アルブミンの MIP ゲル、NIP ゲル、を電子線重合により作製した。それぞれの組成は以下のようにした。

MIP ゲル : 15wt% AAm, 0.75wt% Bis-AAm, 6.4 $\mu$ L/mL DMAPMA, BSA 0.5mg/mL

NIP ゲル : 15wt% AAm, 0.75wt% Bis-AAm, 6.4 $\mu$ L/mL DMAPMA

AAm ゲル : 15wt% AAm, 0.75wt% Bis-AAm

各々、10mM Tris-HCl buffer (pH 7.36)にて調整

#### b. アルブミン分子インプリンティング能の評価

アルブミン分子インプリンティング能の評価は、QCM を用いて行った。

アルブミンに対する特異的な吸着能の評価にあたり、BSA の他に 4 種のタンパク質をサンプルとして用いた。各タンパク質濃度は、0.5mg/mL とした。以下に、サンプルとして用いたタンパクの詳細を示す。

BSA(Bovine Serum Albumin) : Mw=66kDa, pI 4.8

OVA(Ovalbumin) : Mw=44kDa, pI 4.7

Hb(Hemoglobin) : Mw=64.5kDa, pI 6.8~7.0

Lys(Lysozyme) : Mw=14.4kDa, pI 10.7

Mb(Myoglobin) : Mw=17.5kDa, pI 6.8-7.2

各種ゲルを固定化させた QCM センサーを QCM にセットし実験を行った。10mM Tris-HCl にて、30 分程度洗浄し平衡化させたのち、各タンパク質溶液を順次流し、振動数変化をリアルタイムで検出した。各糖溶液の間には洗浄のため 500mM NaCl in 10mM Tris-HCl を流した。タンパク質サンプル、洗浄用の NaCl を流すときなど、実験中の流速は全て 150 $\mu$ L/min とした。

### (1A)-2-3 実験結果と考察

#### (1A)-2-3-1 分子インプリンティング能評価のためのゲル固定化方法検討

##### a. ゲル固定化のための前処理

実験方法に従い、ゲル固定化のための前処理を、金表面の QCM センサーに対して行った。

##### b. 化学重合によるゲル固定化

実験方法に従い作製した、AAm ゲル固定化 QCM センサーを図(1A)-2-7 に示す。

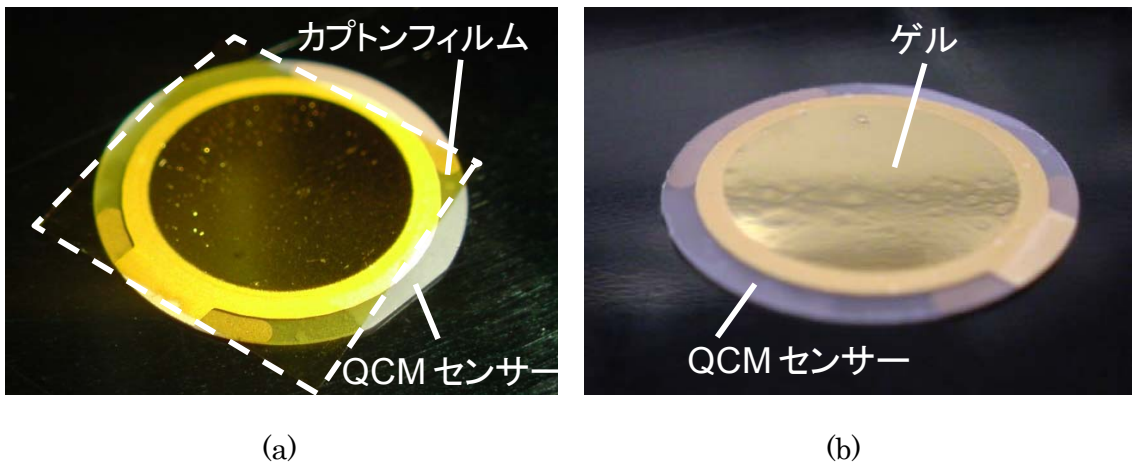


図①-(1A)-2.7 化学重合により AAm ゲルを固定化した Au センサー

親水性である AAm ゲルが固定化されたことにより、センサー上の親水性が向上していることが確認できる。また、1 晩洗浄してもゲルが剥がれる様子は確認されなかった。これより、本方法により Au センサーにゲルを固定化することが可能であることがわかった。

##### c. 電子線重合によるゲル固定化

実験方法に従い QCM センサー上に AAm ゲルを作製した。作製時のカプトンフィルムを被せたところ、および、電子線により作製したゲルの写真を図①-(1A)-2.8 に示す。

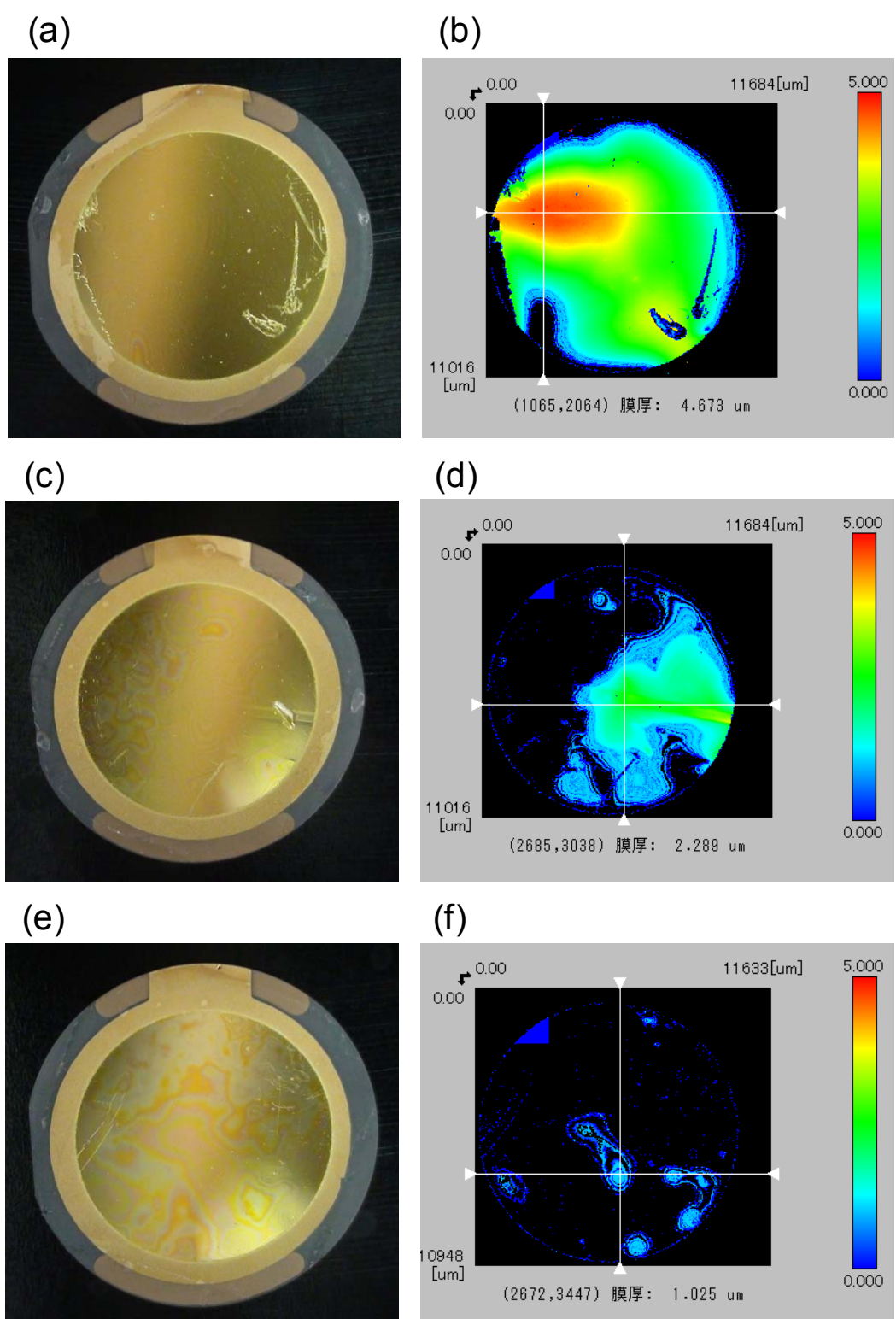


図①-(1A)-2.8 (a) カプトンフィルムを被せた QCM センサー (b) 電子線重合により作製したゲル

図①-(1A)-2.8 (b)に示すように、QCM センサー上に電子線重合によりゲルが作製できていることが確認できた。顕微鏡で観察してみると、ゲル表面は凸凹形状や、クレーターのような形状となっていることがわかった。これは、カバーとしてかぶせたカプトンフィルム表面がきれいな面となっていないため、また、カバーをかぶせる際に空気を抱き込んでしまったために形成されてしまった形状であると考えられる。

#### d. 電子線重合によるゲル固定化方法の評価

電子線重合時に使用した AAm 溶液量を 1.0, 2.5, 5.0 $\mu$ L として作製したゲルについて、実体顕微鏡、及び、ゲル膜評価システムにて観察した結果を図①-(1A)-2.9 に示す。

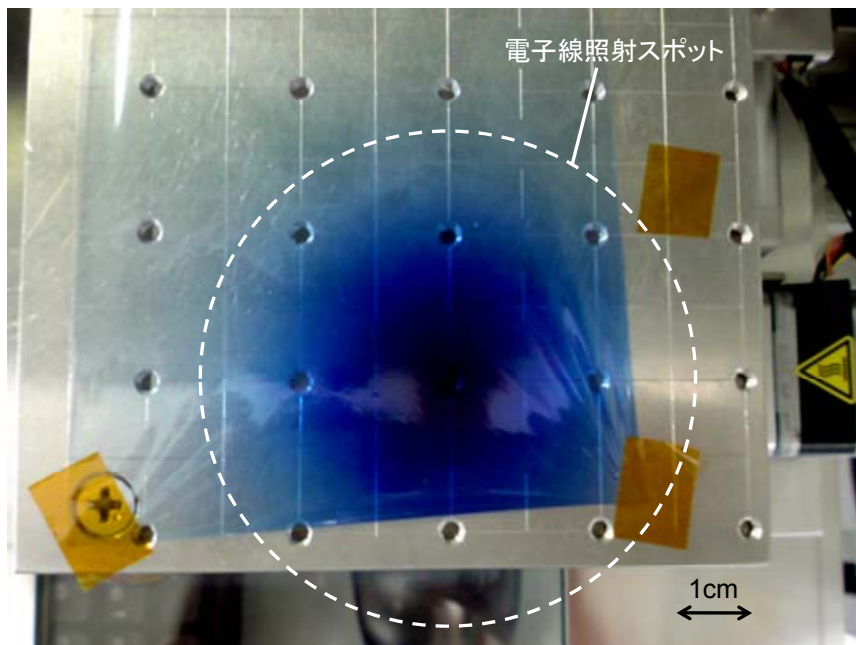


図①-(1A)-2.9 電子線重合ゲル観察結果 (a) AAm 5.0 $\mu$ L で作製した電子線重合ゲルの顕微鏡像、(b) (a)のゲル膜厚測定結果、(c) AAm 2.5 $\mu$ L で作製した電子線重合ゲルの顕微鏡像、(d) (c)のゲル膜厚測定結果、(e) AAm 1.0 $\mu$ L で作製した電子線重合ゲルの顕微鏡像、(f) (e)のゲル膜厚測定結果

まず、各々のゲル膜厚測定結果(図①-(1A)-2.9 (b)、(d)、(f))の比較から、AAm 溶液使用量によって、明らかにゲルの厚みに差が出ていることがわかる。しかし、その膜厚には分布があり、AAm の使用量が 5.0 $\mu$ L の時のゲル厚みは 2.5~5.0 $\mu$ m 程度、2.5 $\mu$ L の時のゲル厚みは 1.0 $\mu$ m 以下~2.5 $\mu$ m 程度、1.0 $\mu$ L の時のゲル厚みは 1.0 $\mu$ m 以下であった。また、カバーとして使用したカプトンフィルムのシワが、そのまま転写されたようなゲル形状も観察された。平坦なゲル界面を作製するために、カバーの扱いについても、今後、改良が必要である。一方で、ゲル厚みについてそれぞれ分布があるものの、その差は 3 $\mu$ m 以下であった。これが実際の QCM による生体分子の吸着評価にどの程度影響するのか、無視できる程度のものかどうか、今後の QCM 評価とゲル膜厚・形状を比較しながら確認していく予定である。

また、各々のゲルの顕微鏡像とゲル膜厚測定結果の比較から、金面が露出しているような部位が観察された。作製時に気泡が入ったり、作製後にゲルを引っかいてしまうなどしたものと考えられる。しかし、そういった部位について、詳細にゲル膜厚測定を行うと、0.05 $\mu$ m など、極薄いゲルが観察されることもある。そのため、今回の結果からは金面が露出しているのか、それとも、ゲルが薄すぎてゲルがないように表示されているのかを区別するのは難しい。ただし、厚いゲルのほうが、生体成分吸着量は大きくなり、分子インプリンティング能を評価するには好都合であると考えられる。よって、今後は、QCM にて評価可能なゲル厚みの範囲で、厚いゲルを作製できるよう、引き続き、ゲル作製条件の検討を行う予定である。

また、電子線照射による重合が高速であることを確認するため、電子線の照射スポット径を実測し、移動速度と照射回数から、実際の重合に要している時間を求めた。図①-(1A)-2.10 に、照射スポット径の測定結果を示す。

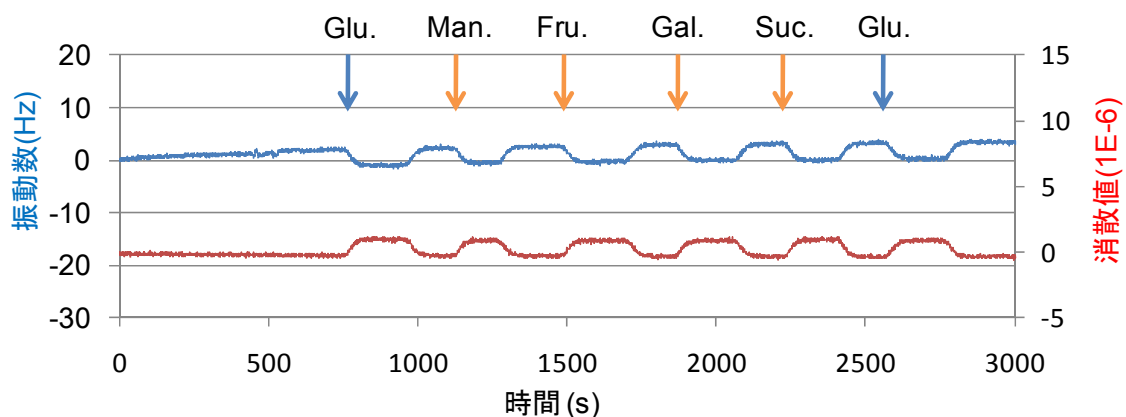


図(1A)-2-10 電子線照射スポット径の確認

これは電子線が照射されると、透明色から青色に発色するフィルムであり、実際には吸収線量を求めるために使用するものである。これを利用し、青く発色した部分の径を求めれば、照射スポット径を求めることができる。図①-(1A)-2.10より、照射スポット直径は大きく見積もっても 70mm である。今回の実験における電子線照射時の移動速度が、200mm/sec, 照射回数が 6 回であることから、電子線重合に要している時間は、およそ、2.1 秒であると求めることができる。化学重合による AAm ゲル作製には、確実なゲル化のため通常 1 時間程度、早くとも数分は静置しておく必要があることから、電子線照射によるゲル作製は高速で重合可能な方法であると言える。また、実験条件にあるように、重合開始剤、促進剤などの添加も必要ない。

#### (1A)-2-3-2 グルコース分子インプリンティングゲル作製条件検討

AAm ゲル、グルコース NIP ゲル、グルコース MIP ゲルを固定化した QCM センサーについて、各種糖溶液をサンプルとして流したときの吸着量の変化を測定した結果を図①-(1A)-2.11 に示す。

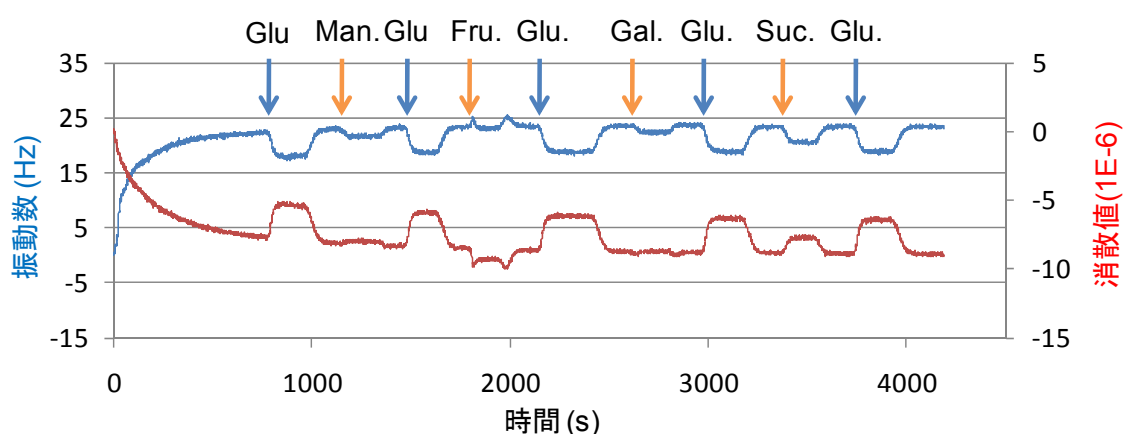


図①-(1A)-2.11 AAm ゲルに対する各種糖の吸着測定結果

図①-(1A)-2.11 から確認できるように、AAm ゲルについてはグルコースに限らず、どの糖についても同程度の振動数変化が観察された。これは、各糖と AAm ゲルとが特異的に吸着したものでなく、流している溶液の密度が、糖濃度の分だけ大きいために生じた変化である。各糖濃度は全て 500mg/dL であるため、全ての糖において同程度の振動数変化となる。このように、特異的吸着でない場合は、溶液の密度変化による振動数変化のみが観察される。また、洗浄により、振動数変化が元に戻ることから、糖のゲルに対する非可逆的な吸着もないということが確認できた。

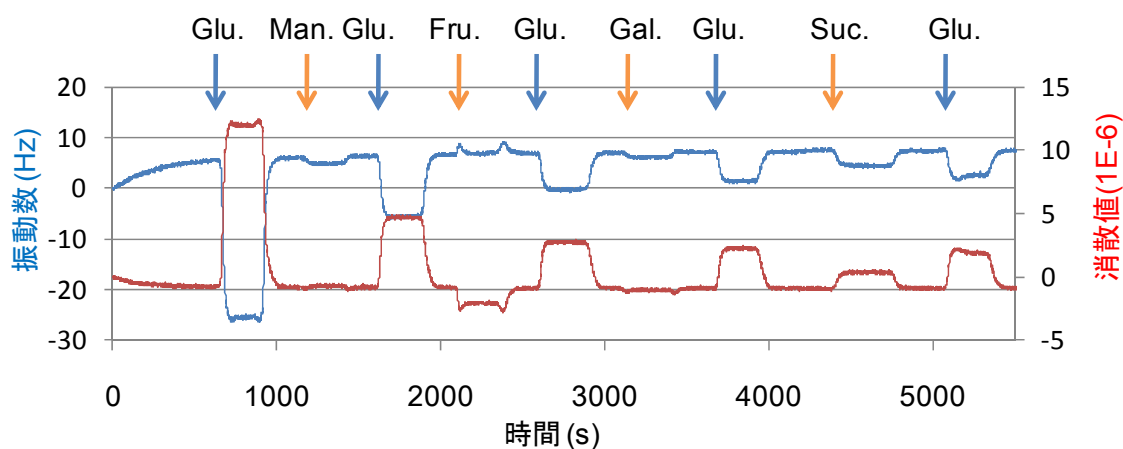
次に図①-(1A)-2.12 の NIP ゲルについて確認してみると、各糖に対する振動数変化が異なっていることが確認できる。これは、AAm ゲルとは違った結果であり、機能性モノマーを組成にもつことに由来する。糖によって振動数変化、すなわち、吸着量が異なっている原因として、機能性モノマーとして用いた 3AAmpb の各糖に対する応答能・親和性にもともと差があり、その差が出たものと考えられる。その結果、今回用いた糖の中では、グルコースに対する応答能が最も大きいものであった。今回、MIP ゲルに期待される効果は、NIP ゲルと比較したときに、グルコースを流したときの振動数変化のみが大きくなることである。





図①-(1A)-2.12 NIP ゲルに対する各種糖の吸着測定結果

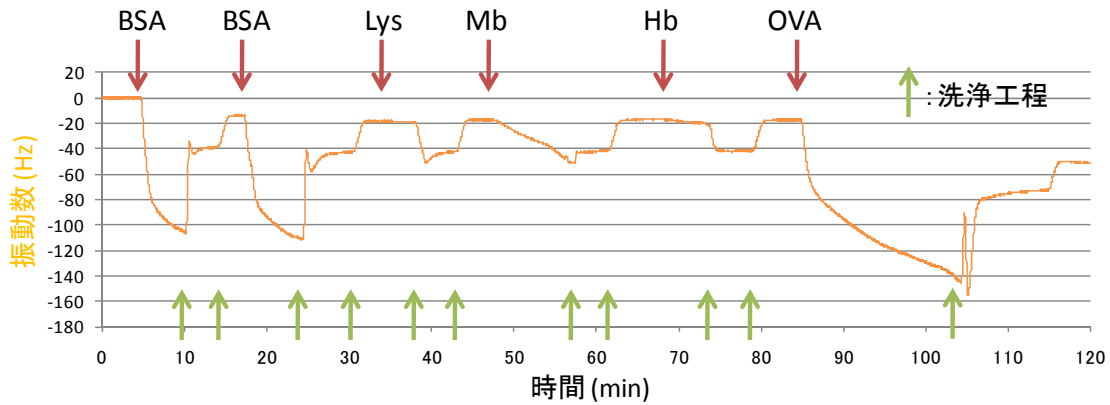
最後に図①-(1A)-2.13 の MIP ゲルについて確認してみると、他糖との応答能には変化がみられないにも関わらず、グルコースに対する応答性のみが大きく向上していることがわかった。一方で、その応答は、グルコースを導入するたびに小さくなっている。洗浄のたびに、ベースラインはおおよそ元の値に戻っているため、グルコースがゲルに強く吸着し洗浄しきれしていない、ということは考えにくい。同様に、ベースラインは一定で減少などしていないことから、糖と結合する 3Aampb が時間とともに解離しているということも考えにくい。これらから、おそらく、分子インプリンティングにより形成されたグルコースを特異的に認識可能な立体構造が、各糖を流すたびに少しずつ壊れているものと考えられる。これは、ゲルの強度、すなわち、ゲルの骨格を強固にすることで、グルコース認識立体構造を強固することで解決可能であると考えられる。



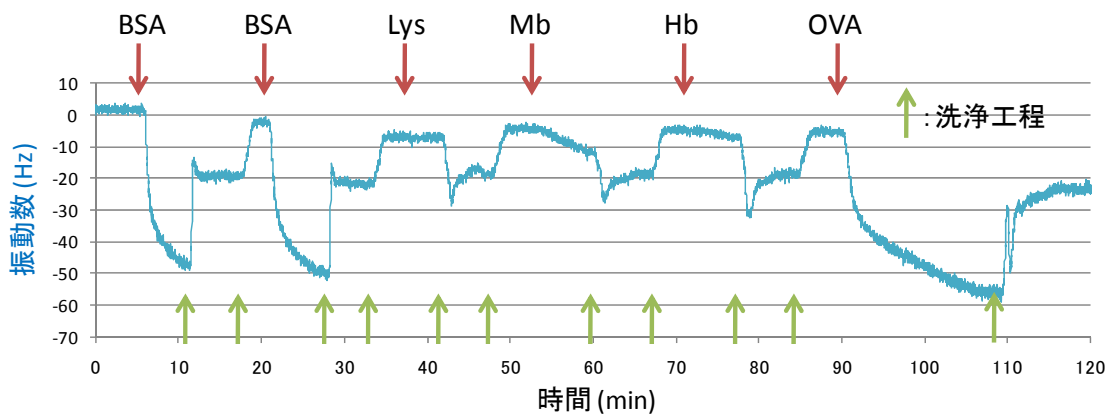
図①-(1A)-2.13 MIP ゲルに対する各種糖の吸着測定結果

### (1A)-2-3-3 アルブミン分子インプリングゲル作製条件検討

アルブミン NIP ゲル、アルブミン MIP ゲルに対し、各種タンパク質溶液をサンプルとして流したときの、吸着量の変化を、QCM を用いて観察した結果を図①-(1A)-2.14, 図①-(1A)-2.15 に示す。



図①-(1A)-2.14 アルブミン NIP ゲルに対する各タンパク質の吸着測定結果



図①-(1A)-2.15 アルブミン MIP ゲルに対する各タンパク質の吸着測定結果

まず NIP ゲルについて確認すると、各タンパク質で振動数変化が異なっていた。これは、DMPMA とタンパク質との結合しやすさ、の差によるものであり、実際に DMAPMA と結合しやすい、すなわち正電荷が高いタンパクほど、吸着量が大きいがわかる。これはすなわち、分子インプリングによる効果ではなく、DMPMA がもともと有している性質である。MIP ゲルに期待されるのは、同組成のゲルであるにも関わらず、立体構造をインプリントしたことで、BSA に対する吸着能のみが、特異的に向上することである。

次に、MIP ゲルについて確認したところ、NIP ゲルと同様の変化となった。これは、すなわち、今回の作製方法では、分子インプリントゲルが作製できていな

いことを意味している。原因として電子線重合時にそもそも BSA と DMAPMA が結合していない、もしくは、重合後の洗浄工程の際にゲルが膨張収縮を繰り返すため、これによりゲルの立体構造が失われている可能性が考えられる。

これらの解決のため、今後は、MIP 時の溶液調整条件とその組成、洗浄工程について、詳細に検討していく予定である。

#### (1A)-2-4 まとめ

##### 【実施項目 1】

生体適合性を目指した分子インプリンティング界面形成法として、高速重合が可能で、重合開始剤を必要としない電子線重合法の有効性について確認する。

##### 【結果】

グルコースと BSA に対する MIP ゲル作製を電子線重合法により行い、MIP 対象の吸着量変化から、電子線重合の有効性について確認した。結果、再現性は得られていないが、グルコースに関しては、MIP によると思われる特異的吸着を観察することに成功した。再現性については、作製時の溶液組成や電子線重合条件を最適化することで、分子インプリンティング界面形成可能であると考えられる。

またこの時のゲル作製においては、重合開始剤・促進剤は不要であり、重合のための照射時間も約 2 秒と、高速重合であることが確認できた。

##### 【実施項目 2】

ゲル膜評価システムを導入して、ハイドロゲル界面形成プロセス、および膜構造を評価する。

##### 【結果】

ゲル膜評価システムとして、光干渉法による表面形状測定装置を導入した。これを用いて、作製したゲルの観察を行ったところ、ゲルの膜厚は作製時の溶液使用量に依存して、変化することがわかった。

一方で、今のカプトンフィルムを被せる方法では、気泡などにより、膜厚が一樣でないことも確認できた。しかし、その差も 3 $\mu\text{m}$  以下であったため、その差が今後の評価にあたり、どのような影響を及ぼすのか、ゲル形状と QCM による評価結果を比較することで、今後、検討していく予定である。

### (1A)-3 タンパク質、微生物界面形成プロセスの開発

#### (1A)-3-1 材料表面特異的接着ペプチド・タンパク質を用いたタンパク質の配向固定プロセスの開発

##### (1A)-3-1-1 概要

バイオセンサーには、無機材料や有機材料を基板としたセンサーチップ上にタンパク質等のプローブ分子を固定化・構造化させたシステムが多い。このシステムを効率よく稼働させるためには、有機・無機材料表面へプローブ分子を最適な配向を持つ形で固定化させる必要がある。既存の方法では、SAM 膜作成等複雑な工程を数段階経てプローブ分子を固定化させるが、センサーチップの構造もナノ化・複雑化したセンサーチップには対応できない事象が増えつつある。本研究開発では、結合無機対象物として、センサー基板として利用可能な酸化亜鉛の表面構造自身を標的として選択的接着・接着が可能なペプチドを作製し、単純な混合操作のみで簡便にプローブ分子を目的基板へ配向固定化でき得るペプチド・抗体分子を作製してきた。本年度は、そのペプチド・抗体を起点としてモデルタンパク質を検出できるプローブの開発と、材料結合性ペプチド・抗体分子を用いたマイクロメートル領域での選択的タンパク質固定化を混合操作のみで達成するプロセスを開発することを行った。

##### 【実施項目】

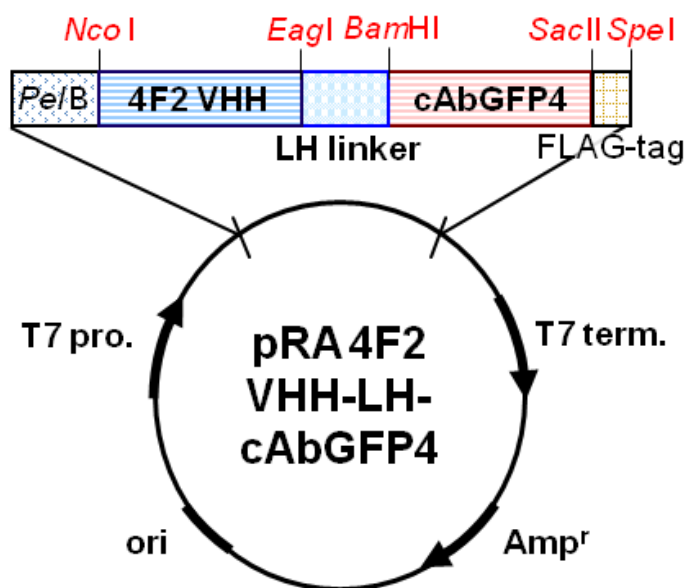
タンパク質界面形成プロセスのモデル化検討として、材料結合性ペプチド・抗体分子を用いたマイクロメートル領域での選択的タンパク質固定化を生体分子・微生物関連実験装置を導入して実施する。

#### (1A)-3-1-2 二重特異性抗体の作製

##### a. 発現ベクターの構築

ZnO 結合性 VHH と緑色蛍光タンパク質(Green Fluorescent Protein : GFP)結合性 VHH の二重特異性抗体を作製するため、GFP 結合性 VHH cAbGFP4 を作製した。cAbGFP4 の配列情報を元にプライマーを作製し、オーバーラップエクステンション PCR 法により cAbGFP4 をコードする遺伝子を全合成した。PCR で増幅した遺伝子を NcoI-SacII で消化し、pRA-wtVHH-FLAG ベクターに繋ぐことで、pRA-cAbGFP4-FLAG ベクターを作製した。使用したプライマーを表①-(1A)-3-1.1 に示す。さらに、二重特異性 VHH を作製するため、ラマ由来 IgG2 upper hinge linker (LH; EPKIPQPQPKPQPQPQPQPQPKPQPKPEP) を ZnO 結合性抗体 4F2 VHH の C

末端に融合した. pRA-4F2 VHH-FALG, 及び, pRA-cAbGFP4-FLAG ベクターを鋳型として, 作製したプライマーをもとに遺伝子を PCR 増幅し, 増幅した遺伝子を制限酵素 *Nco*I-*Sac*II で消化し, pRA-wtVHH-FLAG ベクターに繋ぐことで, pRA-4F2 VHH-LH-cAbGFP4-FLAG ベクターを構築した. 作製したプライマーを表①-(1A)-3-1.1 に, 構築したベクターマップを図①-(1)-3-1-1 に示す.



図①-(1A)-3-1.1 pRA ZnO 4F2 - cAbGFP4 VHH dimer のベクターマップ  
T7 pro: T7 プロモーター, T7 term: T7 ターミネーター, ori: 複製開始起点,  
Amp<sup>r</sup>: アンピシリン耐性遺伝子を示す.

Au 結合性 VHH と上皮増殖因子受容体(Epidermal Growth Factor Receptor : EGFR) VHH との二重特異性抗体を作製するため, EGFR 結合性 VHH である la1VHH を作製した. la1 VHH の配列情報を元にプライマーを作製し, オーバーラップエクステンション PCR 法により la1 VHH をコードする遺伝子を全合成した. PCR で増幅した遺伝子を *Nco*I-*Sac*II で消化し, pRA-wtVHH-FLAG ベクターに繋ぐことで, pRA-la1VHH-FLAG ベクターを作製した. 使用したプライマーを表①-(1A)-3-1.2 に示す. さらに, 二重特異性 VHH を作製するため, ラマ由来 IgG2 upper hinge linker(LHEPKIPQPQPKPQPQPQPQPKPQPKPEP)を la1VHH の C 末端に融合した. pRA-la1 VHH-FLAG, 及び, pRA-Au E32 VHH-FLAG ベクターを鋳型として, 表①-(1A)-3-1.2 に示すプライマーを用いて遺伝子を PCR 増幅し, 増幅した遺伝子を制

限酵素 *NcoI-SacII* で消化し, pRA-wtVHH-FLAG ベクターに繋ぐことで, pRA-lal VHH-LH-Au E32 VHH-FLAG ベクターを構築した.

表①-(1A)-3-1.1 遺伝子作製に用いたプライマーの配列

NcoI-cAbGFP4:	5'-NNNCCATGGCCCAGGTGCAGCTGGTGGAAAG-3'
cAbGFP4-SacII:	5'-NNNCCGCGGATGACACGGTCACCTGGGT -3'
cAbGFP4-1-back:	5'-CAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGCTGGTGCA GCCGGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGGGCGAGCGG CTTCCGGTGAACCGCTATAG -3'
cAbGFP4-2-forward:	5'-GATCACCAGCGCTGCTCATGCCCGCCACCCATTCGCGTTC TTTGCCCGGCGCCTGGCGATACCAGCGCATGCTATAGCGG TTCACCGGAAAG -3'
cAbGFP4-3-back :	5'-CATGAGCAGCGCTGGTGATCGCAGCAGCTATGAAGATAG CGTGAAAGGCCGCTTACCATTAGCCGCGATGATGCGCGC AACACCGTGT -3'
cAbGFP4-4-forward:	5'-CCCACGTTACGTTGCAATAATACACAGCGGTATCTTCCG GTTTCAGGCTGTTTCATCTGCAGATACACGGTGTTCGCGCGC ATCA -3'
cAbGFP4-5-Back:	5'-GTATTATTGCAACGTGAACGTGGGCTTTGAATATTGGGGC CAGGGCACCCAGGTGACCGTGTTCATCC -3'
T7 promoter-back:	5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGGG -3'
T7 terminator-forward:	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG -3'
VHH-hinge-forward:	5'-TTGCGGTTGTGGTTGCGGTTGCGGTTTCGGCTGCGGCT GCGGAATTTTCGGTTCGGCCGATGAAACGGTAACCTG GGTG-3'
VHH-hinge-back:	5'-CAACCGCAACCACAACCGCAACCGCAGCCGAAACCGCAG CCGAAACCGGAACCGGGATCCCAGGTTTCAGCTGGTTGAA AGC -3'

各変異体作製に用いたプライマーの組み合わせは, 以下の通りである

<b>cAbGFP4</b>	NcoI-cAbGFP4, cAbGFP4-2-forward, cAbGFP4-5-back	cAbGFP4-SacII, cAbGFP4-3-back,	cAbGFP4-1-back, cAbGFP4-4-forward,
<b>ZnO 4F2-cAbGFP4</b>	T7 promoter-back, T7 terminator-forward, VHH-hinge-forward, VHH-hinge-back		

表①-(1A)-3-1.2 遺伝子作製に用いたプライマーの配列

NcoI-Ia1:	5'- NNNNCCATGGCCCAGGTGCAGCTG-3'
Ia1-SacII:	5'- NNNNCCGCGGCCGAGCTCACG-3'
Ia1-1-back:	5'- NNNNCCATGGCCCAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCGG CGGCCTGGTGCAGGCGGGCGGCAGCCTGCTGC-3'
Ia1-2-forward:	5'- GTTCTTTGCCCGGCGCCTGACGAAACCAGCCCATCGC  ATAGCTGCTAAAGGTACGGCCAGACGCCGCGCAGCTCAG CAGCAGGCTGCCGCC-3'
Ia1-3-back:	5'- GTCAGGCGCCGGGCAAAGAACGTGAATTTGTGGCGG  CGATTAAGTGGAGCGGCGGCAGCACCAGCTATGCGGATA GCGTGAAAGGCCGTTTTACC-3'
Ia1-4-forward:	5'- CGCGGCGGTATCTTCCGGTTTCAGGCTGTTTCATCTGCAGA  TACACGGTGTTTTTGGTGTATCACGGCTAATGGTAAAC GGCCTTTCACGCTATCCG-3'
Ia1-5-back:	5'- GAAACCGGAAGATACCGCCGCGTTTTATTGCGCGGCGA  CCTATAACCCGTATAGCCGTGATCATTATTTCCGCGTATGA CCACCGAATATGATTATTGGG-3'
Ia1-6-forward:	5'- NNNNCCGCGGCCGAGCTCACGGTCACCTGGGTGCCCT GGCCCCAATAATCATATTCGGTGGTCATACGCG-3'

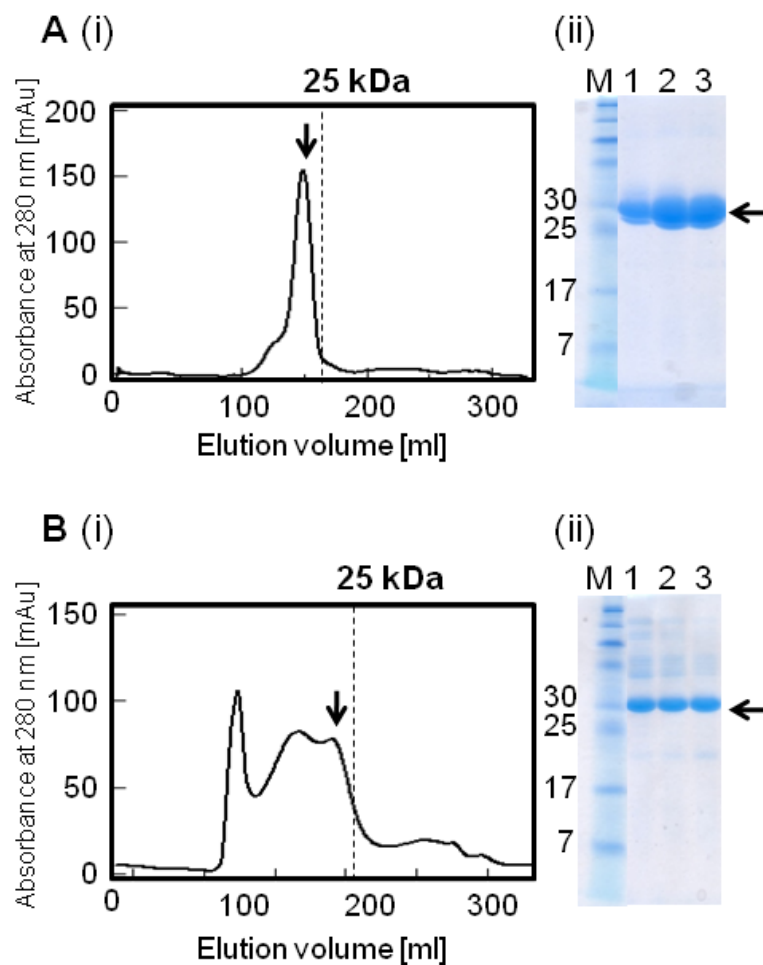
各変異体作製に用いたプライマーの組み合わせは、以下の通りである

<b>Ia1 VHH</b>	NcoI-cAbGFP4, cAbGFP4-2-forward, cAbGFP4-5-back	cAbGFP4-SacII, cAbGFP4-3-back,	cAbGFP4-1-back, cAbGFP4-4-forward,
<b>Ia1-Au E32</b>	T7 promoter-back, T7 terminator-forward, VHH-hinge-forward, VHH-hinge-back		

#### b. 大腸菌での二重特異性抗体の発現と精製

構築した二重特異性 VHH 発現ベクターを用いて、大腸菌 BL21 (DE3)株を形質転換し、2 × YT 培地を用いて 28 °C、坂口フラスコにて振盪培養した。O.D. 600nm が約 0.8 の時に終濃度 1 mM となるように IPTG を加え、さらに 12hr 振盪

した。菌体を集菌後，浸透圧を利用して菌体外膜を破碎し，ペリプラズム画分を回収した。ペリプラズム画分をオープンカラムである anti-FLAG M2 affinity gel column (SIGMA, Tokyo, Japan)を用いたアフィニティークロマトグラフィーにて精製した。anti-FLAG M2 affinity gel column は，樹脂に FLAG タグ結合 IgG が固定化されており，FLAG タグを持つタンパク質に選択的に結合し，酸により溶出する。さらに，アフィニティ精製後のサンプルを，ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。精製した結果を図①-(1A)-3-1.2 に示す。



図①-(1A)-3-1.2 作製した二重特異性抗体の精製結果

(A) ZnO 4F2-cAbGFP4 VHH dimer, (B) Ia1-Au E32 VHH dimer のゲルろ過クロマトグラフィーの結果 (カラム:(A) HiLoad 26/60 Superdex 75 pg column, (B) Superose 12 column, 展開溶液: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0, 200 mM NaCl), 流速: 2 ml/min). 矢印の画分を回収した. (ii) SDS-PAGE (15% アクリルアミドゲル)の結果を示す. M はマーカー, レーン 1,2,3 は, (A)の矢印の画分を示す.

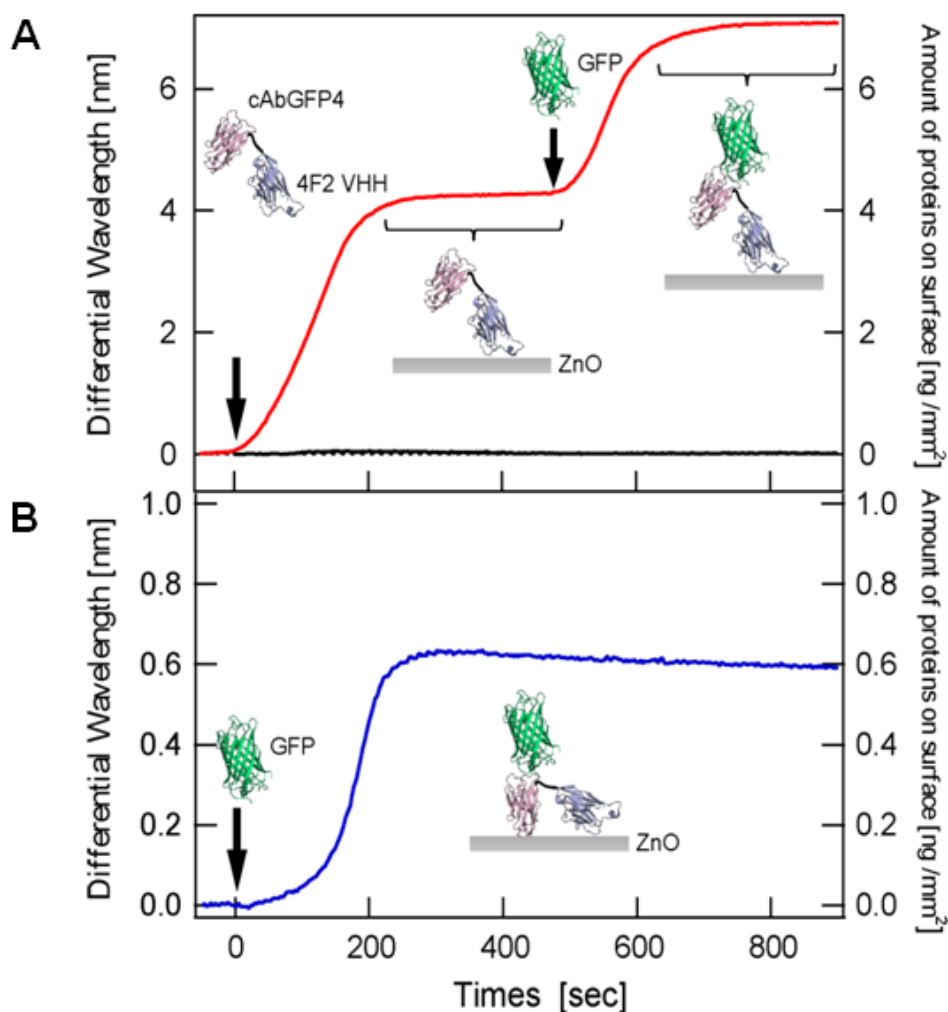


### (1A)-3-1-3 二重特異性抗体を用いたセンシング

作製した ZnO 4F2-cAbGFP4 VHH 二重特異性抗体を用いて、ZnO 基板上への VHH dimer と GFP の段階的固定化を行った。今回は、このタンパク質の段階的固定化を評価するために、反射率測定干渉分光法を原理とした biosensor array system (Fluidware Technology Inc., Kawaguchi, Japan)を用いて ZnO 4F2-cAbGFP4 VHH dimer の二重特異性試験を行った。具体的には、シリコン基板表面に ZnO 膜を作製し、10 mM リン酸緩衝水溶液(pH;7.5, 200 mM NaCl)中の VHH dimer (1  $\mu$ M)を流速 10  $\mu$ l/min で 240 s 間添加した。さらに 240 s 間 10 mM リン酸緩衝水溶液にて洗浄後、1  $\mu$ M GFP を 240s 間添加し、干渉色の変化を測定した。図①-(1A)-3-1.3 に、反射率測定干渉分光法により、タンパク質の固定化を測定した結果を示す。ZnO 基板上に VHH dimer を添加し、VHH を固定化後、さらに GFP を添加したところ、段階的なセンサーグラムを得た。これらの結果は、ZnO 4F2-cAbGFP4 VHH dimer が ZnO 基板表面に結合し、さらに ZnO 基板に固定化された状態で GFP に結合している結果を示しており、ZnO 4F2-cAbGFP4 VHH の二重特異的な結合活性を示した。さらに、ZnO 4F2-cAbGFP4 VHH dimer の ZnO 表面への固定化量、及び、GFP の固定化量を評価した結果、VHH dimer は 134 nmol / m<sup>2</sup>、GFP は 110 nmol / m<sup>2</sup>であった。ZnO 結合性抗体 4F2 VHH を用いて同様の実験を行ったところ、ZnO 基板上への 4F2 VHH 単独の固定化量は 130 nmol / m<sup>2</sup>であったことから、VHH dimer は 4F2 VHH の活性をほぼ 100 %保持していることを示す。さらに VHH dimer 固定化量と GFP の固定化量から、ZnO 基板に固定化された VHH dimer の 81 %が GFP への結合活性を保持していることが示唆された。また、アミンカップリング法にて VHH dimer をシリコンウェハー基板に直接固定化し、GFP を添加した実験も行ったところ、VHH dimer の固定化量が 38 nmol / m<sup>2</sup>であり、GFP の固定化量が 22 nmol / m<sup>2</sup>であった。これらの結果から、アミンカップリング法にて基板に固定化した VHH dimer の結合活性残存率は約 58%であることがわかった。このことから、高親和性無機材料結合性抗体を用いた VHH dimer の場合、一般的なアミンカップリング法と比較し、より簡便な方法で直接基板上に結合することにより、多くの抗体を固定化することが可能であり、且つ効率的に抗原タンパク質を捕捉できることが示唆された。

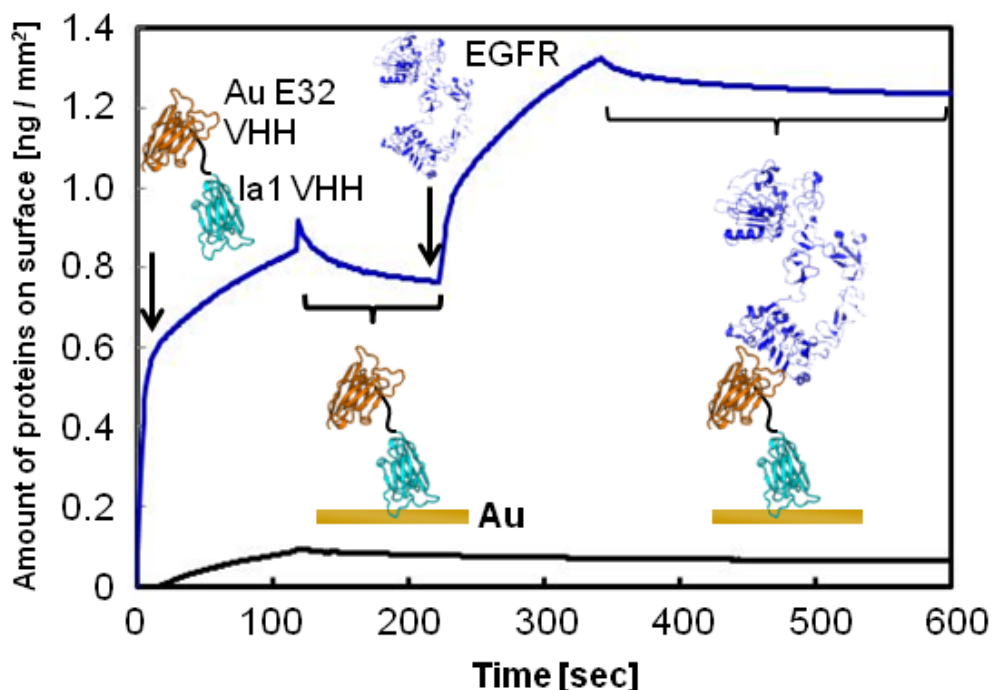
上皮増殖因子受容体(EGFR)結合性 VHH と金結合性 VHH との二重特異性抗体 la1-Au E32 VHH dimer についても、同様に基板上への固定化と、抗原タンパク質の検出を試みた。実験は、表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance : SPR)を原理とした Biacore 2000 (Biacore AB, Uppsala, Sweden) を用いて la1-Au E32 VHH

dimer の二重特異性試験を行った。Au 表面を露出している SIA sensor chip (Biacore AB, Uppsala, Sweden) に対して、流速 10 ml/min で 1  $\mu$ M Ia1-Au E32 VHH dimer を 120 s 間添加した。さらに、120s 間洗浄し、1  $\mu$ M EGFR を 120s 間添加した。図①-(1A)-3-1.4 は、SPR によりタンパク質の固定化を測定した結果を示す。これを見ると金基板センサーチップ上に、VHH dimer を添加し、さらに EGFR を添加したところ、段階的なセンサーグラムを得ていることが分かる。これは、VHH dimer が金基板上に固定化し、さらに固定化された状態で EGFR に結合している結果を示しており、二重特異的な結合を示している。一方、EGFR のみを金基板に添加した場合、一部の EGFR が非異的に金基板へ結合したが、ほとんど結合しなかった。これらの結果から、VHH dimer を結合活性を維持したまま金基板表面上に固定化することが可能であり、SPR を利用したセンシング応用にも利用可能であることを示した。



図①-(1A)-3-1.3 ZnO4F2-cAbGFP4 VHH dimer を用いたセンシング応用

反射率測定干渉分光法を原理としたリフレクトメトリーによる測定 (A) 10 mM リン酸緩衝水溶液(pH 7.5, 200 mM NaCl)中の VHH dimer (1  $\mu$ M)を流速 10  $\mu$ l/min で 240 sec 間添加し, その後 GFP(1  $\mu$ M)を添加した(—). 矢印は, VHH dimer と GFP を添加したタイミングを示す. 黒色ライン(—)のセンサーグラムは, GFP のみを添加した場合を示す. (B) アミンカップリングにてシリコンウェハー上に VHH dimer を固定化し, GFP (1 $\mu$ M)を 240 sec 間添加した. 流速は 10  $\mu$ l/min, 展開溶液は 10 mM リン酸緩衝水溶液(pH 7.5, 200 mM NaCl)である.



図①-(1A)-3-1.4 Ia1-Au E32 VHH dimer を用いたセンシング応用

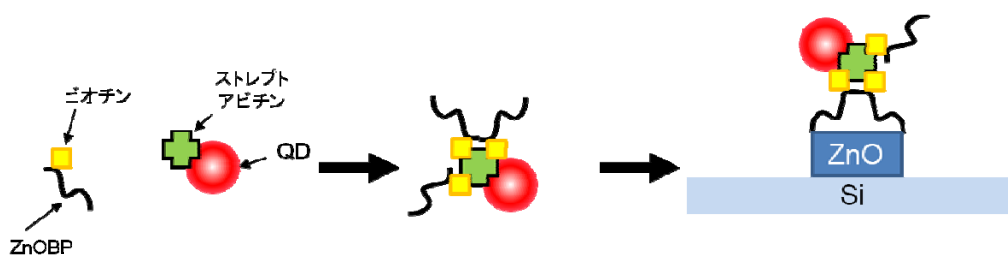
表面プラズモン共鳴法(SPR)により測定した. 10 mM リン酸緩衝水溶液(pH 7.5, 200 mM NaCl)中の VHH dimer (1  $\mu$ M)を流速 10  $\mu$ l/min で 120 sec 間添加し, その後 EGFR (1  $\mu$ M)を添加した(—). 黒色ライン(—)のセンサーグラムは, EGFR のみを添加した場合を示す.

#### (1A)-3-1-4 材料結合性ペプチドを用いたマイクロメータ領域でのタンパク質パターンニング

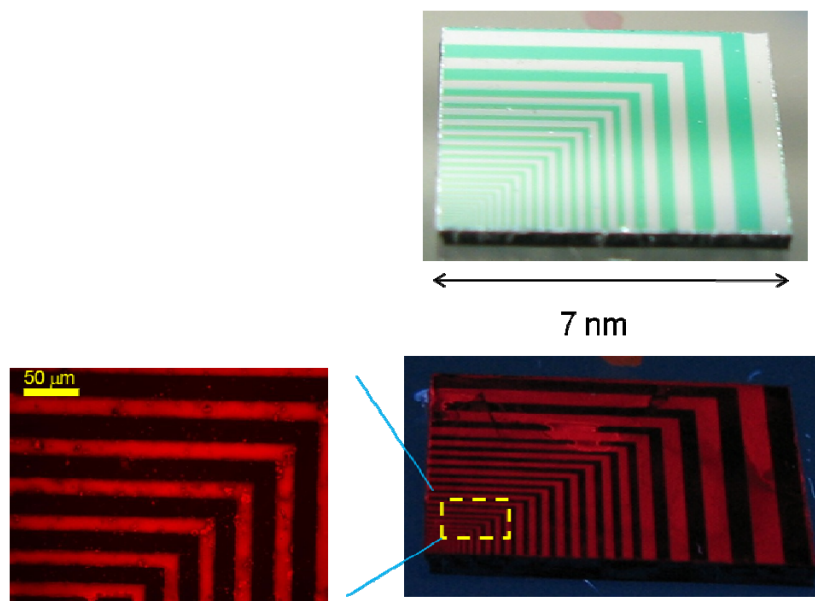
以上より, 材料結合性ペプチド・抗体分子を用いれば, 無機基板表面へ直接目的タンパク質を検出できるプローブ分子を簡便に固定化できることがわかった. ここでは, 材料結合性ペプチド・抗体分子を用いてマイクロメートル領域でのパターンニングされ

た特定無機材料表面にタンパク質をパターニングする実験を行った。材料結合性ペプチドとしては、酸化亜鉛結合性ペプチド ZnOBP(EAHVMHKVAPRP)を選びこのペプチドの N 末端にビオチン分子を修飾したペプチドであるビオチン化 ZnOBP(Biotin-GGGS-ZnOBP)を有機合成により調製した。そして、このビオチン化 ZnOBP を利用して、酸化亜鉛がパターニングされたシリコンウェハー上にビオチンに結合するストレプトアビチンを混合操作のみで選択的に固定化させる実験を行った。実験は、0.05 %の界面活性剤(Tween20)が入ったリン酸緩衝水溶液中に量子ドット(QD)が修飾したストレプトアビチンとビオチン化 ZnOBP を添加し 30 分ほど静置することによって、アビチンと ZnOBP を連結させた。そして、パターニングされた酸化亜鉛膜がパターニングされたシリコンウェハーを ZnOBP 連結アビチンが入ったリン酸緩衝水溶液に 30 分浸し同じ緩衝水溶液で洗浄した後、蛍光顕微鏡によって QD を検出することでアビチンの ZnO パターニング膜に対する固定化状況を評価した(図①-(1A)-3-1.5)。

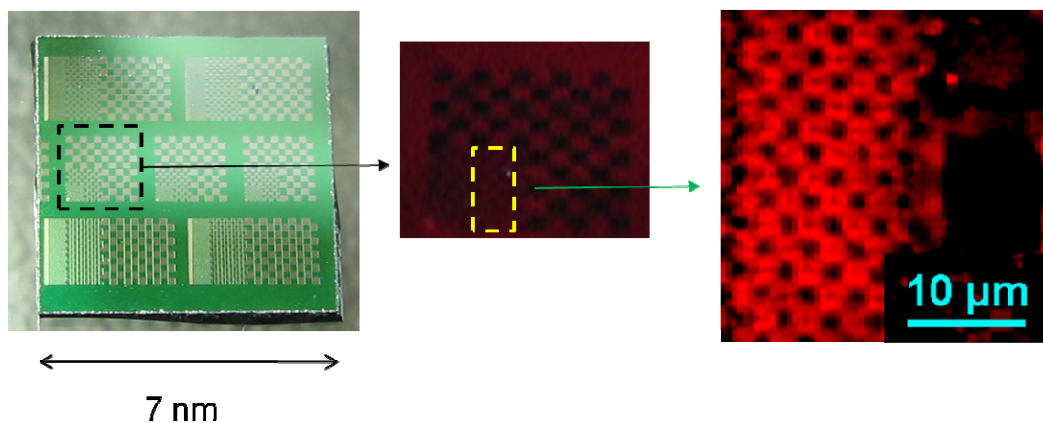
ライン状に 500 μm 以下で ZnO 膜がパターニングされているシリコンウェハーを用いたところ、Si 表面には QD の蛍光が見られないが、すべての幅の酸化亜鉛膜に均一な QD 由来の蛍光が観測された(図①-(1A)-3-1.6)。さらにより微細な酸化亜鉛膜パターニング上にタンパク質を固定化するために、2 マイクロメートルレベルで市松パターニングされたシリコンウェハーでも試みた(図①-(1A)-3-1.7)。その結果、2 マイクロメートルレベルでも酸化亜鉛のパターニングにそって QD の蛍光が観測された。これより、材料結合性ペプチドを用いれば特定無機材料のパターニングにそってマイクロメートル領域でタンパク質を簡便に固定化できることが分かった。



図①-(1)-3-1-5 ZnOBP を用いたストレプトアビチン固定化



図①-(1A)-3-1.6 ライン状 ZnO 膜パターニング Si ウェハーへの  
ZnOBP を用いたストレプトアビチン固定化



図①-(1A)-3-1.7 市松 ZnO 膜パターニング Si ウェハーへの  
ZnOBP を用いたストレプトアビチン固定化

#### (1A)-3-1-5 まとめ

##### 【実施項目】

タンパク質界面形成プロセスのモデル化検討として、材料結合性ペプチド・抗体分子を用いたマイクロメートル領域での選択的タンパク質固定化を生体分子・

微生物関連実験装置を導入して実施する。

**【結果】**

酸化亜鉛結合性ペプチドを用いて、ストレプトアビチンを 2 マイクロメートル領域で酸化亜鉛膜パターニングに沿って混合操作のみでパターニングさせることに成功した。

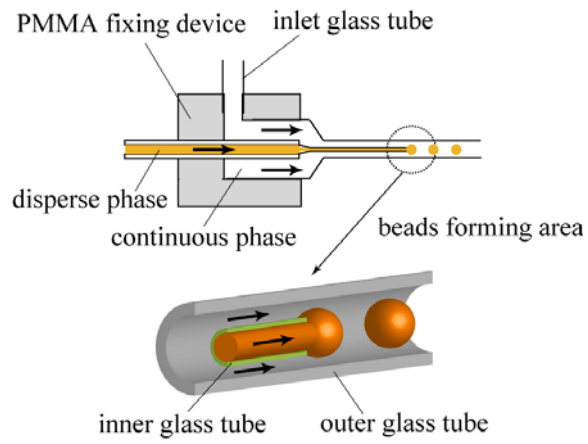
## (1A)-3-2 細胞や微生物など高次のバイオ材料を固定するための界面融合プロセス

### (1A)-3-2-1 概要

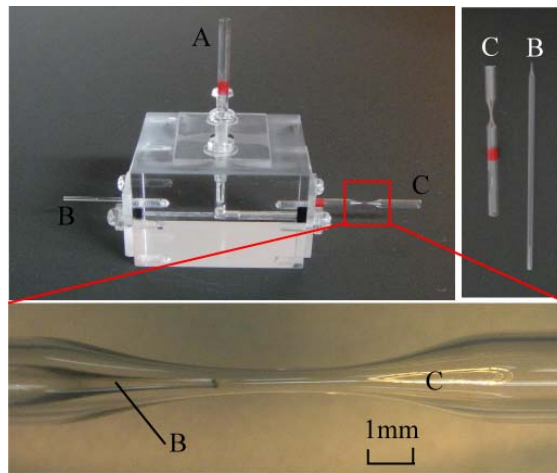
本プロジェクトにおいては、機能性タンパク質の脂質二重膜やハイドロゲルへの固定に関する研究を行うが、これらを拡張し、細胞や微生物など高次のバイオ材料を固定するための界面融合プロセス技術の開発も不可欠である。高次のバイオ材料を使用することにより、複数種類の生体酵素を利用した多段階反応が可能となる。例えば微生物の固定における研究項目は、配向・配置制御による活性の保持、高密度固定、かつ反応物質と効率よく接触させるための担体形状制御が挙げられる。特に、栄養源となる培地および代謝反応に必要なバイオ・有機材料をナノ構造化し、そこに微生物を配向制御し固定することで、センシングターゲットや他の代謝反応材料、汚染物質と効率的かつ大きな微生物菌体数で反応させることが可能となり、それに伴い高い反応効率を得られることが期待される。本年度の実施計画は、マイクロゲルを微生物担体として用いたイースト菌によるアルコール産生、および、炭素電極を微生物担体として用いた微生物発電をモデル反応とし、微生物界面と微生物産生効率に関するモデル化を行うことであった。これに対し、まずは微生物担体となるマイクロビーズの生成に関する理論構築ならびに実験による検証を行った後、ゲルビーズ内での微生物産生、炭素電極を用いた微生物発電について、微生物産生効率に関するモデル化を行った。

### (1A)-3-2-2 マイクロビーズの生成に関する理論構築

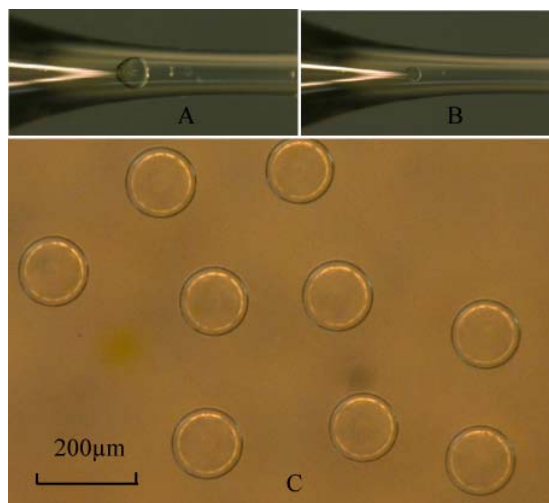
マイクロビーズの生成には、図①-(1A)-3-2.1 に示す同軸の二重ガラス管を用いた。従来の AFFD デバイスと比較し、構造が簡易で、製作が容易であるのに加え、理論化が比較的容易という利点を有する。ガラス管は熱を加えながら引き伸ばすことにより先端を鋭利化したものを用いる。製作したマイクロビーズ生成装置ならびにビーズ生成の様子を、それぞれ図①-(1A)-3-2.2、図①-(1A)-3-2.3 に示す。内側のガラス管から、球形のビーズが作製され、またサイズはほぼ同一で単分散になっていることがわかる。



図①-(1A)-3-2.1 同軸二重ガラス管



図①-(1A)-3-2.2 マイクロビーズ生成装置



図①-(1A)-3-2.3 マイクロビーズ生成の様子



次に図①-(1A)-3-2.4のように変数を定義し、モデル化を試みた。表面自由エネルギーを $\gamma$ としたとき、ガラス管との接着力 $F_{surface}$ は式(①-1)のように表される。

$$F_{surface} = 2\pi R_3 \gamma, \quad (①-1)$$

一方で外管を通ってくる流体により、マイクロビーズは $F_{drag}$ を受けることになる。このとき、 $F_{drag}$ は以下の式で表される。

$$F_{drag} = \int_0^{\varphi} 2\pi(a \sin \theta)(a d\theta)(-p \cos \theta + \sigma_{rr} \cos \theta - \sigma_{\theta r} \sin \theta) \quad (①-2)$$

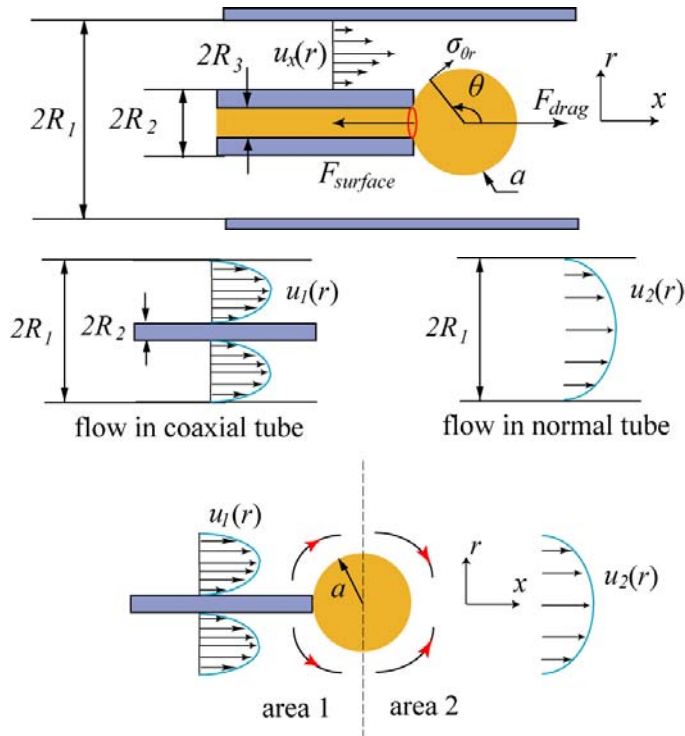
このとき、 $\varphi$ は、 $\theta$ がとりうるもっとも大きな角度で、

$$\varphi = \begin{cases} \arcsin \frac{R_2}{a}, (a > R_2) \\ \frac{\pi}{2}, (a \leq R_2) \end{cases} \quad (①-3)$$

となる。 $F_{drag}$ が $F_{surface}$ よりも大きくなったときに、ビーズはガラス管から分離する。

式(①-2)内の応力は次式のように表される。

$$\begin{aligned} \sigma_{rr} &= 2\mu \partial_r v_r \\ \sigma_{\theta r} &= \mu \left( \frac{1}{r} \partial_\theta v_r + \partial_r v_\theta - \frac{1}{r} v_\theta \right) \end{aligned} \quad (①-4)$$



図①-(1A)-3-2.4 マイクロビーズ生成のモデル化

ここでビーズまわりの流れの変化が、外管の影響を受けないと仮定する。球体にかかるストークス抵抗は、球体の前方および後方の流れ場により決定される。前方 (area1) はすなわち同軸ガラス管での流れ場であり、後方 (area2) は外管のみの流れ場となる。円筒座標系においてそれぞれ、

$$u1 = \frac{2Q}{\pi C} [r_*^2 \sin^2 \theta - A \ln(r_* \sin \theta) - B] \quad (1-5)$$

$$u2 = \frac{2Q}{\pi R_1^4} (r_*^2 - R_1^2) \quad (1-6)$$

となる。ここで  $Q$  は流速、 $r_*$  は円筒座標系における半径方向の座標、そして  $A$ 、 $B$ 、 $C$  は  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  で決定される定数である。

$$A = \frac{R_1^2 - R_2^2}{\ln R_1 - \ln R_2}$$

$$B = \frac{R_2^2 \ln R_1 - R_1^2 \ln R_2}{\ln R_1 - \ln R_2} \quad (1-7)$$

$$C = (R_1^4 - R_2^4) - 2B(R_1^2 - R_2^2) - A\{(2 \ln R_1 - 1)R_1^2 - (2 \ln R_2 - 1)R_2^2\}$$

このときの半径方向、円周方向速度、ならびに圧力は以下のように近似できる。

$$v_r = V \cos \theta \left[ 1 - \frac{3a}{2r} + \frac{a^3}{2r^3} \right]$$

$$v_\theta = -V \sin \theta \left[ 1 - \frac{3a}{4r} - \frac{a^3}{4r^3} \right] \quad (1-8)$$

$$p = p_0 - \frac{3}{2} \frac{\mu V}{a} \frac{a^2}{r^2} \cos \theta$$

ここで、 $V$  は area1 では  $u1$  に、area2 では  $u2$  に対応する。よってビーズにはたらく抗力はそれぞれ、

$$F_{drag1} = \frac{6\mu a Q}{C} \left[ (a^2 + A - B - A \ln a) \cos \varphi - \frac{a^2}{3} \cos^3 \varphi - A \cos \varphi \ln(\sin \varphi) - \frac{A}{2} \ln \left( \frac{1 - \cos \varphi}{1 + \cos \varphi} \right) \right]$$

$$F_{drag2} = \frac{6\mu a Q}{R_1^4} \left( R_1^2 - \frac{2}{3} a^2 \right) \quad (1-9)$$

となる。

上に述べたようにここでは、ビーズによる流体の変化が外管の影響を受けない、と仮定しているが、実際はビーズが大きくなり、外管内壁に近づくにつれその影響が大きくなる。この影響を、形状関数  $\eta = F\left(\frac{R_1}{a}\right)$  として表す。ビーズが離脱する

ときには、

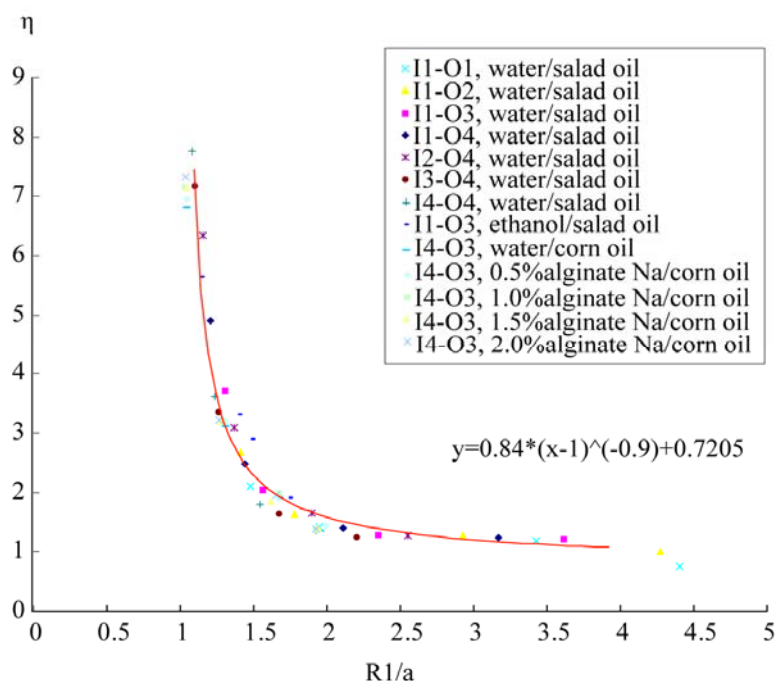
$$F_{surface} = \eta(F_{drag1} + F_{drag2}) \quad (1-10)$$

の式が成り立つ。ここで式(1-2)から式(1-9)を式(1-10)に代入することで、ビーズ径  $a$  が導出される。この計算において、 $\eta = F\left(\frac{R_1}{a}\right)$  が実験的に導出できれば、

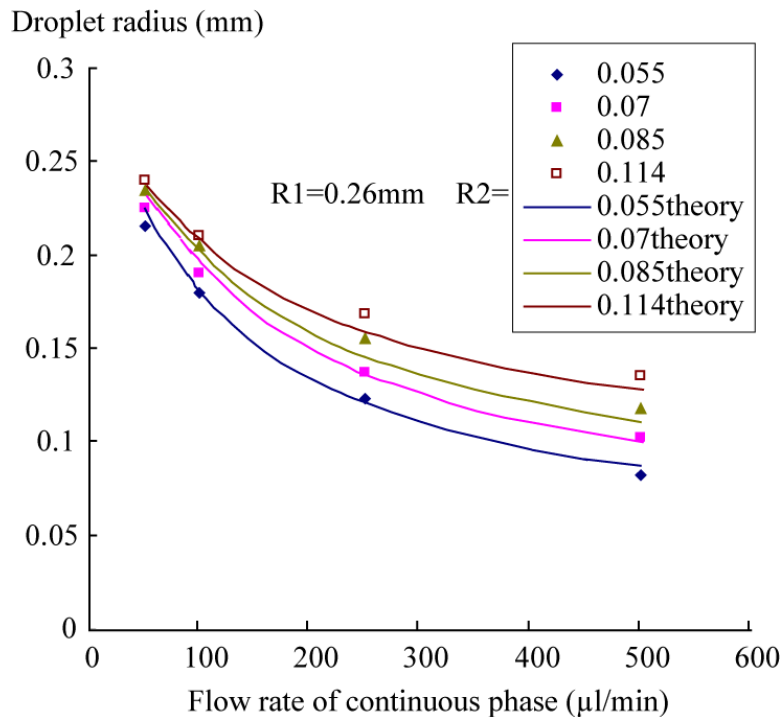
ビーズ径は、ガラス管の形状  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  ならびに、連続相の流速  $Q$ 、分散相の液体の表面エネルギー  $\gamma$  ならびに連続相の粘性  $\mu$  のみで表されることになる。これらは既知もしくは制御可能であるので、 $\eta$  が既知であれば、ビーズ径は計算することができることになる。形状関数  $\eta$  を導出するために、種々の条件で実験を行った。このときの結果を図①-(1A)-3-2.5 に示す。図より明らかになることは、形状関数が全ての条件において成り立つ、ということである。これはすなわち形状関数は  $a$  と  $R_1$  のみによるものであり、流速や粘性、液体種など他の条件によらない、ということを示している。この関数は、

$$\eta = 0.84 * \left(\frac{R_1}{a} - 1\right)^{-0.9} + 0.7205 \quad (1-11)$$

と近似される。いくつかの条件で、これを用いて計算したビーズ径と実際に実験で得られたビーズを比較するとその誤差は 5%以内であった(図①-(1A)-3-2.6)。すなわち本モデルは初めて、予備実験なしに、ビーズの径を直接導出できるものであるといえる。



図①-(1A)-3-2.5 形状関数



図①-(1A)-3-2.6 モデルにより導出したビーズ径と実験値との比較

### (1A)-3-2-3 ビーズ中の微生物産生効率モデル化

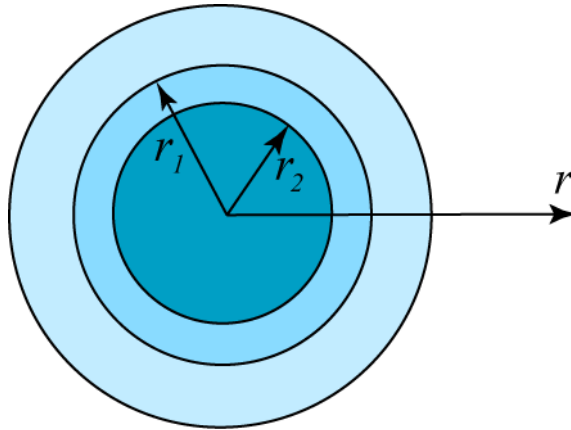
微生物の反応効率は、酵素の反応と類似しているとみなせる。ミカエリス・メンテンの式を用いてこれを表すこととする。酵素反応の場合、酵素（以下 E）が基質（以下 S）と結合して酵素基質複合体（以下 ES）を形成、ES が E と S に戻るか反応生成物（以下 P）を生成する一連の反応機構となるが、微生物の場合、酵素が微生物、基質が栄養となる。



このとき反応性生物を生成する反応を律速段階と仮定し、反応速度定数を  $k_{+2}$  とする。また、 $E + S \leftrightarrow ES$  の反応は平衡に達しており、その解離定数を  $K_s$  とする。ミカエリス・メンテンの式から、固定化微生物において、

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_s + [S]} e_0 \quad (①-13)$$

となる。 $e_0$  は固定化微生物単位体積基準の微生物濃度、 $v$  は反応速度、 $V_{\max}$  は最大反応速度であり、 $V_{\max} = k_{+2} e_0$  である。速度は  $[S]$  とともに大きくなり、 $V_{\max}$  へと漸近していく。すなわち、 $[S]$  が大きいように系をとることが重要である。これを用い、ゲルビーズ内に微生物が存在するときの反応をモデル化する。



図①-(1A)-3-2.7 ゲルビーズ球殻

ゲルビーズの中に微生物は均一に分布していると仮定すると、基質濃度は外側からビーズ内部まで下がっていく。それで、図①-(1A)-3-2.7に示す球殻層の間における濃度勾配により、基質は外側球心まで拡散していくことが分かる。その拡散を式で表示すると

$$N = -D_e \frac{dS}{dr} \quad (①-14)$$

となる。 $N$ は基質フラックスで、単位時間内単位面積を通過した基質の量です。

$D_e$ は effective diffusivity で、有効拡散係数、 $S$ は基質の濃度である。

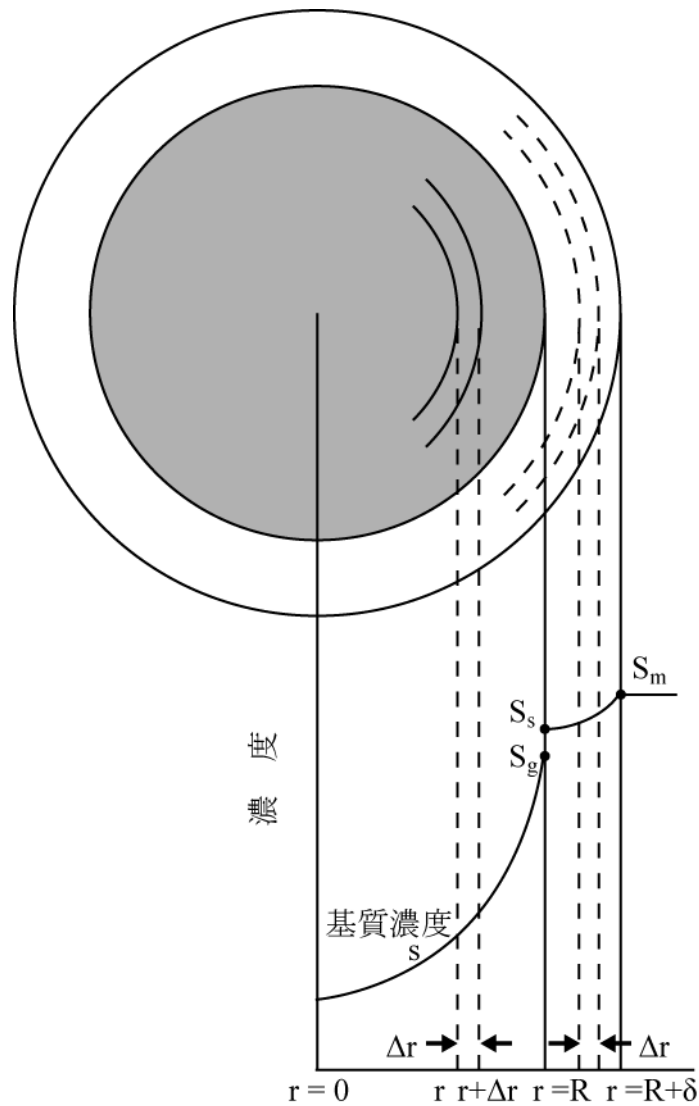
単位時間内  $r = r_1$  と  $r = r_2$  の球殻を通過した基質の量はそれぞれ

$$\begin{aligned} Q_1 &= -D_e \frac{dS_1}{dr} 4\pi r_1^2 \\ Q_2 &= -D_e \frac{dS_2}{dr} 4\pi r_2^2 \end{aligned} \quad (①-15)$$

となる。ここで、 $Q_2$ が $Q_1$ より減少した分がその間の微生物に吸収されたと考えられる。すなわち、

$$Q_1 - Q_2 = \alpha \frac{k_{+2} e_0 S_1}{K_s + S_1} 4\pi r_1^2 (r_1 - r_2) \quad (①-16)$$

この方程式を用いると、微生物を固定したゲルビーズの内部基質濃度分布が図①-(1A)-3-2.8のようになる。

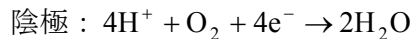
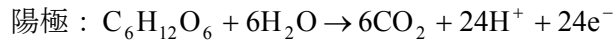


図①-(1A)-3-2.8 微生物を固定したゲルビーズの内部基質濃度分布

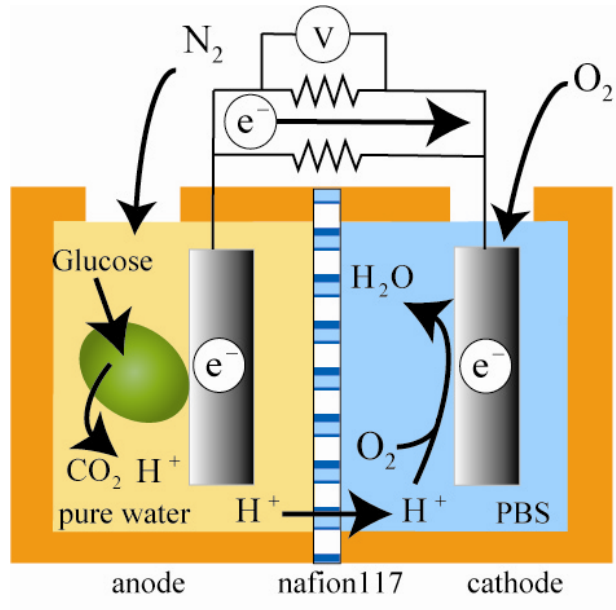
ビーズの外における基質濃度  $S_m$  が一定であるとする、ゲルビーズのサイズは小さければ小さいほど良いことが分かる。しかしこのモデル化は、微生物を含むゲルビーズがひとつのみ存在した場合である。ビーズを大量に含むデバイス全体の産生効率を考えると、重なり合ったビーズにおいては、ビーズサイズが小さすぎると、ビーズとビーズの隙間が狭くなり、基質液がゲルビーズ積層の奥まで拡散できない。すなわちみかけの拡散係数が小さくなるため、効率は低下する。すなわちゲルビーズのサイズには最適な径が存在することになる。昨年アルコール産生においては、 $600 \mu\text{m}$  のゲルビーズにおいて高い産生効率を示しており、モデルの正しさを示唆している。

#### (1A)-3-2-4 パターンされた炭素電極を用いた微生物発電のモデル化

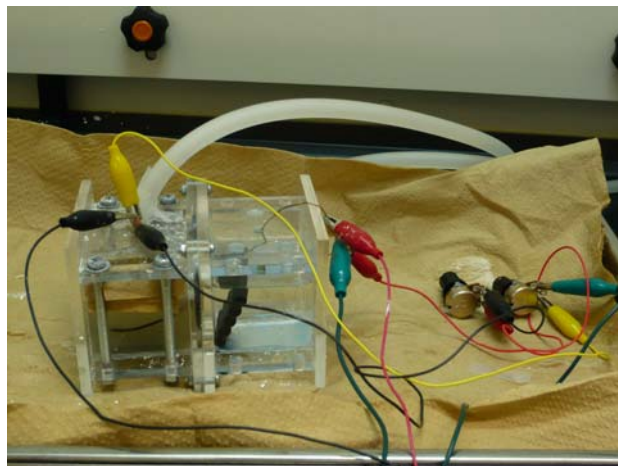
図①-(1A)-3-2.9 に微生物発電のシステム図を示す。2 槽型の微生物燃料電池であり、陽極側にグルコース、微生物が嫌気条件下で封入されており、陰極側で酸素が供給される。2 槽はプロトン透過膜で隔たれている。このときの陽極および陰極の反応は、



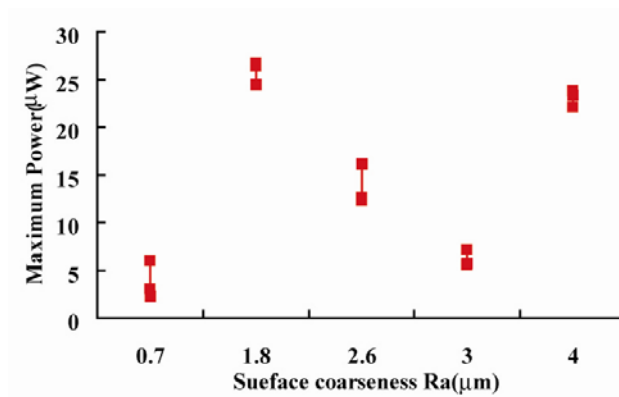
となる。ここで微生物として、*shewanella putrefaciens* を用い、図①-(1A)-3-2.10 に示す実験装置を用い実験を行った。陽極電極として炭素電極を用い、その表面粗さによる出力の変化を計測した。結果を、図①-(1A)-3-2.11 に示す。マイクロメートルオーダーの表面粗さにより、出力に大きな違いが出ているのがわかる。従来の研究では、単純に電極の表面積を増やすことを目指し、カーボンナノチューブなどナノ構造を持たせていた。しかし、本実験で明らかになった数マイクロメートルという微生物の大きさと同程度の表面粗さが支配的になるとすれば、図①-(1A)-3-2.12 のように微生物と電極の接触面積が支配パラメータになると考えられる。図①-(1A)-3-2.12 の右図では穴の中に入った微生物しか描いていないが、実際はこれに加え左図のように表面に接着している微生物とあわせて反応に貢献していると考えられる。このときもっとも効率がよいのは、ちょうど微生物のサイズのピッチで穴があいているものであり、次は 2 倍のピッチということになる。整数倍でない場合は、電極表面に微生物が接触しない領域が生じてしまい、効率が下がってしまう。すなわち図①-(1A)-3-2.11 で示す  $Ra \sim 1.8 \mu\text{m}$  のときに、微生物のサイズでのピッチで穴が開いている状態であり、 $Ra \sim 4.0 \mu\text{m}$  のときがその整数倍のとき、と考えられる。来年度以降、このモデルを用いて高効率な微生物発電を目指す。



図①-(1A)-3-2.9 微生物発電のシステム図

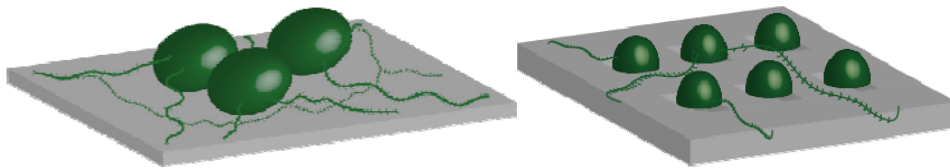


図①-(1A)-3-2.10 実験に用いた微生物燃料電池



図①-(1A)-3-2.11 電極表面粗さと出力の関係





図①-(1A)-3-2.12 電極表面における微生物固定

#### (1A)-3-2-5 おわりに

本年度は二重ガラス管を用いた微生物担体ハイドロゲルビーズの作製に関する理論構築、ゲルビーズ中での微生物の産生効率、また電極表面形状の微生物発電への影響のモデル化を達成した。来年度はこれを用い、効率の高い微生物利用反応の実現を目指す。

参考文献

- 1) Takeuchi et al, *Anal. Chem.* 2006
- 2) S.Ota, W.Tan, H.Suzuki, S.Takeuchi “MICROFLUIDIC FORMATION OF LIPID BILAYER ARRAY FOR MEMBRANE TRANSPORT ANALYSIS
- 3) Rachel Gabai, Nesim Sallacan, Vladimir Chegel, Tatyana Bourenko, Eugeni Katz and Itamar Willner, *J. Phys. Chem. B* 2001, 105, 8196-8202
- 4) ZhenDong Hua, ZhiYong Chen, YuanZong Li and MeiPing Zhao, *Langmuir* 2008, 24, 5773-5780