

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710140

研究課題名(和文) ナノ電気化学顕微鏡を用いた膜輸送のリアルタイム計測

研究課題名(英文) Real-time monitoring of chemical transport on cell membrane using nano-SECM

研究代表者

高橋 康史 (TAKAHASHI, YASUFUMI)

東北大学・原子分子材料科学高等研究機構・助教

研究者番号：90624841

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：生細胞の界面で生じる膜輸送のメカニズムの解明は、生物学的な知見にとどまらず、ドラッグデリバリーや遺伝子導入の高効率化への付与が期待できる。本研究では、ダイナミックに起こる膜輸送を、ナノ電極(半径10-100 nm)をセンサーとして、電流値の変化として捉えた。電気化学測定は、化学物質の拡散現象を定量的に捉えるため、固液界面の物質輸送の評価に大変有効であり、ナノ電極と電極の細胞表面でのポジショニングシステムの開発より、細胞膜界面の輸送過程の定量評価およびタイムラプスイメージングを行った。

研究成果の概要(英文)：Chemical transport on the cell membrane is important issue for development of drug delivery system and improvement of gene transfection. In this study, the dynamic cell surface fluctuation was detected or visualised by using nano electrode. The electrochemical measurement is effective for evaluation of mass transfer on liquid/solid interface. I developed fabrication method of nanoelectrode and nanopositioning system for quantitative analysis and time-lapse imaging of mass transfer on cell membrane.

研究分野：ナノ・マイクロ科学

科研費の分科・細目：マイクロ・ナノデバイス

キーワード：走査プローブ顕微鏡 マイクロ・ナノデバイス バイオ関連機器 細胞・組織 分析科学

## 1. 研究開始当初の背景

マイクロ電極を用いて検出物質(神経伝達物質、一酸化窒素、酸素など)の濃度を電流値として捉える走査型電気化学顕微鏡(SECM)は、固液界面での物質移動の評価に有効であり、解像度の向上により、細胞膜表面で生じる細胞膜のダイナミクスをリアルタイムで捉える可能性を有する。しかし、細胞上の微小器官をイメージング、あるいは評価した報告はなく、その応用範囲も頭打ちとなってきている。これは、ナノ電極を作成可能な研究者に限られており、また、センサーであるナノ電極を細胞表面にナノメートルスケールで近接させることが困難なためである。申請者らは、走査型イオンコンダクタンス顕微鏡(SICM)のフィードバック制御を、世界に先駆けてSECMに応用し、生細胞の化学物質の透過性に関して、サブマイクロスケールのイメージングに成功した。さらに、焼成カーボンを利用した新規複合型ナノプローブの作成法を確立した。このプローブは、集光イオンビームを用いた加工が不要であり、わずか3分ほどで半径100 nm以下の電極を作成可能である。このナノ電気化学顕微鏡(NanoSECM)は、電気化学測定、形状測定さらにプローブを利用した局所的な薬剤投与が可能であり、細胞膜表面で起こる現象の評価を行った。

## 2. 研究の目的

生細胞の界面で生じる膜輸送のメカニズムの解明は、生物学的な知見にとどまらず、ドラッグデリバリーや遺伝子導入の高効率化への付与が期待できる。本研究では、ダイナミックに起こる膜輸送を、ナノ電極(半径10-100 nm)をセンサーとして、電流値の変化として捉える。電気化学測定は、化学物質の拡散現象を定量的に捉えるため、固液界面の物質輸送の評価に大変有効である。ナノ電極と電極の細胞表面でのポジショニングシステムの開発より、細胞膜界面の輸送過程の定量評価およびタイムラプスイメージングを行った。

## 3. 研究の方法

ダイナミックな膜輸送に関して、溶液中を拡散する物質を電流値として捉えるSECMとナノメートルスケールの形状変化を測定可能な走査型イオンコンダクタンス顕微鏡(SICM)を用いて、詳細な輸送のメカニズムの解明を行う。具体的には、これまでSECMによる膜タンパク質の発現量のモニタリングでは、pHが非常に高いため、長期的な計測が困難であった。そこで、pH7.4でも計測可能な酵素とその標識を検討した。膜タンパク質の発現状態の評価法の検討を行った。さらに、SICMの弱点である測定時間の短縮のため、測定を行う前に荒くプリスキャンを行い、サンプル表面の高さ情報をあらか

じめ把握することで、測定時間を劇的に減少させた。

## 4. 研究成果

これまでSECMによる膜タンパク質の定量評価として、細胞内へ取り込まれにくい528抗体を利用して癌の増殖と密接なかわりのある上皮成長因子受容体(EGFR)に酵素を標識してきたが、エンドサイトーシスによる膜表面のEGFRの変化を捉えるため、細胞内へ取り込まれやすい225抗体を利用する。また、これまでアルカリフォスファターゼ(ALP)を標識に用いたが、ALPの検出に利用する電気化学メディエータは細胞膜を透過するため、エンドサイトーシスをモニタリングする際の標識酵素として適切でない。そこでグルコースオキシダーゼ(GOx)を標識抗体に用いる。GOxが生成する $H_2O_2$ を検出し、エンドサイトーシスに伴うEGFRの減少をモニタリングした。その結果、pH7.4かつメディエータを使用せずに膜タンパク質を電気化学的に計測可能となった。

また、SICMに関して、解像度の向上と高速化を試みた。高解像度化に関しては、 $CO_2$ レーザープレーによるナノピペットの作製条件の検討により、ピペット径の微細化を行い、光学顕微鏡では可視化が困難な直径120 nmのクラスリンピペットの可視化に成功した。さらに、高速イメージングに関しては、ピエゾステージやプログラムの改良を行うことで $128 \times 128$ の測定点のイメージングに関して、約10分で測定が可能となった。

本システムは、細胞上での局所的な化学物質の検出に大変有効であることがわかり、PC12から放出される神経伝達物質の局所検出にも成功した。

## 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17件)

1. Nashimoto, Y.; Takahashi, Y.; Takano, R.; Miyashita, K.; Yamada, S.; Ino, K.; Shiku, H.; Matsue, T., Isolation and quantification of messenger RNA from tissue models by using a double-barrel carbon probe. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406* (1), 275-282. (査読有)
2. Kanno, Y.; Goto, T.; Ino, K.; Inoue, K. Y.; Takahashi, Y.; Shiku, H.; Matsue, T., SU-8-based Flexible Amperometric Device with IDA Electrodes to Regenerate Redox Species in Small Spaces. *Anal. Sci.* **2014**, *30* (2), 305-309. (査読有)
3. Ino, K.; Kanno, Y.; Nishijo, T.; Komaki, H.; Yamada, Y.; Yoshida, S.; Takahashi, Y.; Shiku, H.; Matsue, T.,

- Densified Electrochemical Sensors Based on Local Redox Cycling between Vertically Separated Electrodes in Substrate Generation/Chip Collection and Extended Feedback Modes. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (8), 4016-23. (査読有)
4. Ino, K.; Goto, T.; Kanno, Y.; Inoue, K. Y.; Takahashi, Y.; Shiku, H.; Matsue, T., Droplet array on local redox cycling-based electrochemical (LRC-EC) chip device. *Lab Chip* **2014**, *14* (4), 787-794. (査読有)
  5. Actis, P.; Tokar, S.; Clausmeyer, J.; Babakinejad, B.; Mikhaleva, S.; Cornut, R.; Takahashi, Y.; Cordoba, A. L.; Novak, P.; Shevchuk, A. I.; Dougan, J. A.; Kazarian, S. G.; Gorelkin, P. V.; Erofeev, A. S.; Yaminsky, I. V.; Unwin, P. R.; Schuhmann, W.; Klenerman, D.; Rusakov, D. A.; Sviderskaya, E. V.; Korchev, Y. E., Electrochemical Nanoprobes for Single-Cell Analysis. *Acs Nano* **2014**, *8* (1), 875-884. (査読有)
  6. Ozawa, F.; Ino, K.; Takahashi, Y.; Shiku, H.; Matsue, T., Electrodeposition of alginate gels for construction of vascular-like structures. *J. Biosci. Bioeng.* **2013**, *115* (4), 459-461. (査読有)
  7. Ozawa, F.; Ino, K.; Arai, T.; Ramon-Azcon, J.; Takahashi, Y.; Shiku, H.; Matsue, T., Alginate gel microwell arrays using electrodeposition for three-dimensional cell culture. *Lab Chip* **2013**, *13* (15), 3128-3135. (査読有)
  8. McKelvey, K.; Nadappuram, B. P.; Actis, P.; Takahashi, Y.; Korchev, Y. E.; Matsue, T.; Robinson, C.; Unwin, P. R., Fabrication, Characterization, and Functionalization of Dual Carbon Electrodes as Probes for Scanning Electrochemical Microscopy (SECM). *Anal. Chem.* **2013**, *85* (15), 7519-7526. (査読有)
  9. Matsumae, Y.; Arai, T.; Takahashi, Y.; Ino, K.; Shiku, H.; Matsue, T., Evaluation of the differentiation status of single embryonic stem cells using scanning electrochemical microscopy. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (58), 6498-6500. (査読有)
  10. Ino, K.; Ono, K.; Arai, T.; Takahashi, Y.; Shiku, H.; Matsue, T., Carbon-Ag/AgCl Probes for Detection of Cell Activity in Droplets. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (8), 3832-3835. (査読有)
  11. Ino, K.; Nishijo, T.; Kanno, Y.; Ozawa, F.; Arai, T.; Takahashi, Y.; Shiku, H.; Matsue, T., Electrochemical Device with Interdigitated Ring Array Electrodes for Investigating the Relationship between Cardiomyocyte Differentiation from Embryonic Stem Cells and Alkaline Phosphatase Activity. *Electrochemistry* **2013**, *81* (9), 682-687. (査読有)
  12. Babakinejad, B.; Yasufumi, T.; Korchev, Y.; Actis, P., Development of Carbon Nano-Heater: Stimulation of Sensory Neurons for Functional Study of Heat Sensitive Channels (vol 104, pg 519a, 2013). *Biophys. J.* **2013**, *104* (8), 1834-1834. (査読有)
  13. Babakinejad, B.; Jonsson, P.; Cordoba, A. L.; Actis, P.; Novak, P.; Takahashi, Y.; Shevchuk, A.; Anand, U.; Anand, P.; Drews, A.; Ferrer-Montiel, A.; Klenerman, D.; Korchev, Y. E., Local Delivery of Molecules from a Nanopipette for Quantitative Receptor Mapping on Live Cells. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (19), 9333-9342. (査読有)
  14. Takahashi, Y.; Shevchuk, A. I.; Novak, P.; Babakinejad, B.; Macpherson, J.; Unwin, P. R.; Shiku, H.; Gorelik, J.; Klenerman, D.; Korchev, Y. E.; Matsue, T., Topographical and electrochemical nanoscale imaging of living cells using voltage-switching mode scanning electrochemical microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109* (29), 11540-11545. (査読有)
  15. Ino, K.; Nishijo, T.; Arai, T.; Kanno, Y.; Takahashi, Y.; Shiku, H.; Matsue, T., Local Redox-Cycling-Based Electrochemical Chip Device with Deep Microwells for Evaluation of Embryoid Bodies. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (27), 6648-6652. (査読有)
  16. Ino, K.; Kanno, Y.; Nishijo, T.; Goto, T.; Arai, T.; Takahashi, Y.; Shiku, H.; Matsue, T., Electrochemical detection for dynamic analyses of a redox component in droplets using a local redox cycling-based electrochemical (LRC-EC) chip device. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (68), 8505-8507. (査読有)
  17. Ino, K.; Kanno, Y.; Arai, T.; Inoue, K. Y.; Takahashi, Y.; Shiku, H.; Matsue, T., Novel Electrochemical Methodology for Activity Estimation of Alkaline Phosphatase Based on Solubility Difference. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (18), 7593-7598. (査読有)

〔学会発表〕(計 19 件)

1. 熊谷明哉、高橋康史、猪又宏貴、白木将、山本邦子、春田正和、伊野浩介、珠玖仁、一杉太郎、末永智一、界面イオン伝導顕微鏡による多結晶電極表面の結晶構造と Li 挿入脱離の相関性の検討、電気化学会第 81 回大会、関西大学、2014 年 3 月 31 日
2. Takahashi, Y.; Matsumae, Y.; Ino, K.; Shiku, H.; Korchev, Y.; Matsue, T., Development of Voltage Switching Mode Scanning Electrochemical Microscopy for Nanoscale Electrochemical Imaging, 14th Topical Meeting of the International Society of Electrochemistry in Nanjing, China, 招待講演, 2014 年 3 月 30 日
3. 熊谷明哉、高橋康史、猪又宏貴、棟方裕一、伊野浩介、珠玖仁、金村聖志、末永智一、界面イオン伝導顕微鏡の創製と Li イオン電池電極材料への応用、第 61 回応用物理学会春季学術講演会、青山学院大学、2014 年 3 月 19 日
4. 高橋康史、松前義治、伊野浩介、珠玖仁、末永智一、走査型イオンコンダクタンス顕微鏡を用いた海馬の形状イメージ、バイオ系 SPM 研究会、新潟、2013 年 12 月 9 日
5. Takahashi, Y.; Matsumae, Y.; Ino, K.; Shiku, H.; Korchev, Y.; Matsue, T., Nanoscale Imaging of Living Cells using Nano-Scanning Electrochemical Microscopy, ICFD2013 (Special Session of Tenth International Conference on Fluid Dynamics), Sendai, 2013 年 11 月 25 日
6. 高橋康史、松前義治、伊野浩介、珠玖仁、末永智一、走査型電気化学・走査型イオンコンダクタンス顕微鏡を用いた生体イメージング、公益社団法人日本顕微鏡学会第 57 回シンポジウム、名古屋、招待講演、2013 年 11 月 16 日
7. 熊谷明哉、高橋康史、棟方裕一、猪又宏貴、伊野浩介、珠玖仁、金村聖志、末永智一、界面イオン伝導顕微鏡による電極材料表面における Li 挿入脱離の可視化、第 54 回電池討論会、大阪、2013 年 10 月 8 日
8. 高橋康史、熊谷明哉、棟方裕一、伊野浩介、珠玖仁、金村聖志、末永智一、界面イオン伝導顕微鏡による LiFePO<sub>4</sub> 電極材料表面のその場観察、2013 年電気化学秋季大会、東京、2013 年 9 月 27 日
9. Takahashi, Y.; Matsumae, Y.; Ino, K.; Shiku, H.; Korchev, Y.; Matsue, T., Topography Imaging of Hippocampus Spine using Scanning Ion Conductance Microscopy, XXIII International Symposium on Morphological Sciences, Niigata, 2013 年 9 月 20 日
10. Kumatani, A; Takahashi, Y.; H. Munakata, H.; Inomata, H.; Ino, K.; Shiku, H.; Kanamura, K.; Matsue, T., 'In-situ characterization and mapping of lithium-ion transport at the electrolyte/cathode interface by high resolution ion-conductance microscopy', EMRS fall meeting 2013, Warsaw, Poland, 2013 年 9 月 17 日
11. Takahashi, Y.; Matsumae, Y.; Ino, K.; Shiku, H.; Korchev, Y.; Matsue, T., Topographical and Electrochemical Nanoscale Imaging of Living Cells using Nano-Scanning Electrochemical Microscopy, The Fourteenth International Symposium on Electroanalytical Chemistry, Changchun, China, 招待講演, 2013 年 8 月 20 日
12. Takahashi, Y.; Matsumae, Y.; Ino, K.; Shiku, H.; Matsue, T., Evaluation of Differentiation State of an Embryonic Stem Cell using Scanning Electrochemical Microscopy, 223st ECS Meeting, Toronto, Canada, 2013 年 5 月 12 日
13. 高橋康史、伊藤小町、松前義治、棟方裕一、珠玖仁、伊野浩介、金村聖志、末永智一、ナノピペットを利用した LiFePO<sub>4</sub> の局所的充放電特性評価、電気化学会第 80 回大会、仙台、2013 年 3 月 28 日
14. 高橋康史、松前義治、伊野浩介、珠玖仁、末永智一、走査型電気化学・イオンコンダクタンス顕微鏡を用いたバイオイメージング、生体 SPM 研究部会、新潟、2012 年 12 月 9 日
15. Takahashi, Y.; Matsumae, Y.; Ino, K.; Shiku, H.; Korchev, Y.; Matsue, T., Electrochemical and Topographical Imaging of Living Cell using SECM-SICM, 3rd Kanazawa Bio-AFM Workshop, Kanazawa, 2012 年 11 月 5 日
16. Takahashi, Y.; Matsumae, Y.; Ino, K.; Shiku, H.; Korchev, Y.; Matsue, T., Development of Voltage Switching Mode Scanning Electrochemical Microscopy for Topographical and Electrochemical Nanoscale Imaging of Living Cells, 222st ECS Meeting, Hawaii, USA, 2012 年 10 月 9 日
17. 高橋康史、松前義治、伊野浩介、珠玖仁、末永智一、ナノ電気化学顕微鏡による膜タンパク質のイメージング、日本分析化学会第 61 年会、金沢、2012 年 9 月 20 日
18. Takahashi, Y.; Matsumae, Y.; Ino, K.; Shiku, H.; Korchev, Y.; Matsue, T.,

High-resolution bioelectrochemical imaging with SECM-SICM hybrid system, International Association of Colloid and Interface Scientists Conference 2012, Sendai, 2012年5月16日

19. Takahashi, Y.; Matsumae, Y.; Ino, K.; Shiku, H.; Korchev, Y.; Matsue, T., Characterize Cell Function using SECMSICM, 221st ECS Meeting, Seattle, USA, 2012年5月7日

〔図書〕(計2件)

1. 高橋康史、珠玖 仁、末永智一、マイクロナノ電極システムを用いたバイオセンシングとバイオイメージング、*表面科学*, 34, 488-493, (2013).
2. 高橋康史、珠玖 仁、末永智一、「使える解析テクニック！」シリーズ、マイクロ電極(3) 応用計測事例：電気化学顕微鏡(SECM)-走査型イオンコンダクタンス顕微鏡(SICM)複合システムの開発 *Electrochemistry*, 80, 271-275, (2012).

〔産業財産権〕

- 出願状況(計0件)
- 取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 康史 (TAKAHASHI YASUFUMI)  
東北大学・原子分子材料科学高等研究機構・助教

研究者番号：90624841

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし