

## 研究課題別評価

1 研究課題名: 生体システムを集積化した素子・システムの創製と実用化

2 研究者氏名: 加藤 大

3 研究のねらい:

生体という高度に維持された組織体は複雑系における精密な認識と協調の上に達成されている。これらの調節機構に関与している生体分子による認識、捕捉、反応等は、正確であり、かつ高効率であることが知られている。また近年半導体集積化技術の発達により、各種ユニットを一体化した機能集積型マイクロチップの作製が可能になっている。機能を集積化することで、省スペース、必要な試料・試薬量の軽減、高感度化等が達成される。しかしながらマイクロチップ上での機能発現に、生体分子を利用した例は少ない。申請者は、高含水ゲルを用いることでタンパク質をその機能を保持したまま微小空間内に固定化する手法を開発し、固定化したタンパク質の機能を利用したバイオ素子・システムの開発に成功した。そこで本提案では、以下の3点の研究項目を検討することで、優れた分析素子やシステムの創製を目標とする。1) 個体レベルに近づけたバイオ素子・システムの創製、2) タンパク質固定化システムの実用化、3) 生体物質の固定化に適した高含水ゲルの開発。

4 研究成果:

(1) 個体レベルに近づけたバイオ素子・システムの創製

-a) 1つの生体内反応に関与する複数の生体物質の固定化

多くの生体内反応は、1つの酵素のみではなく複数の生体物質が関与している。そこで本研究では、マイクロソームを利用して1つの生体内反応に関与する生体物質群を固定化したアレイチップを開発した。生体内反応には薬物代謝の第1相反応を選択し、チトクロムやリダクターゼ等の固定化を行った。これらの生体物質群の固定化には、珪酸ナトリウムとコロイダルシリカより生成したゲルを利用し、反応の過程でメタノールが生じるのを防いだ。3種類のチトクロム(CYP1A1、3A4、2C19)を固定化したチップを作製し、蛍光基質を添加した結果、代謝物質に由来する蛍光が検出された。さらに蛍光基質と拮抗薬の混合液を添加することで、生成する蛍光強度が減少し、その減少量は添加した拮抗薬の濃度の増加に伴って大きくなった。作製したチップは、洗浄することで繰り返し利用でき、さらに長期間薬物代謝活性を維持したことから、優れた実用性を有する薬物代謝活性評価用チップであると考えられる(Anal. Chem. 2005, 77, 7080-7083)。

-b) 細胞を利用した解析用素子の開発

細胞は生命体の最小単位であり、これらが組織化することで組織、器官、個体が形成される。そこでまず細胞を利用した評価系の構築を行った。細胞にはヒト肝癌由来の HepG2 細胞

を用い、多孔質体やガラス板上で、細胞を培養し、測定時に細胞をマイクロチップ上に移動させることにした。まず始めに細胞の培養に適した多孔質体の調製を試みた。そこで異なった条件で多孔質体を調製し (J. Chromatogr. A 2002, 961, 45-51)、細胞の3次元的な培養に利用している。反応に用いるシリカモノマーの種類、反応温度、添加するポロジェンの量等を検討した結果、細胞の大きさより大きい空隙(約 10 $\mu$ m)を有する多孔質体の調製に成功した。

この実験と並行してマイクロチップ上で、細胞を利用した生体内反応の反応液をマイクロチップで分析した。その結果、肝細胞の代謝反応の解析に成功した。

## (2)タンパク質固定化システムの実用化

### -a)プロテオーム解析システムの開発

ヒトゲノムが解読された現在、ゲノムによって調節されているタンパク質の機能や動態に人々の興味が集まっている。その解析(プロテオーム解析)には、高速に多種類のタンパク質を同定し、定量する解析法が必要不可欠である。タンパク質の動態を解析するには、2次元ゲル電気泳動、ゲル内消化、質量分析を組み合わせた方法などが現在用いられている。しかしながらこれらの方法では、自動化が困難である、解析に時間がかかる、非常に高価な高分解能質量分析装置が必要である等の問題点があった。そこで私は、自動化が容易でありタンパク質を高速に解析可能な測定システムの開発を行った。タンパク質の解析を簡便にかつ自動化して行うために、解析に必要な操作の全てを連結したシステムの開発を試みた(図1)。生体試料中のタンパク質の解析には、分離、酵素消化、質量分析が必要であり、これらを直列に連結することにした。

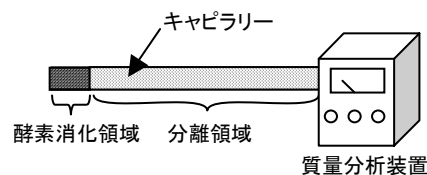


図1 開発したプロテオーム解析システムの模式図

また質量分析装置に不揮発性の塩を用いると、試料のイオン化効率が減少し、感度の低下や装置の汚染等の問題があることから、揮発性のギ酸溶液を分離、酵素消化、質量分析に用い、酸性条件でも安定であり活性を有するペプシンを消化酵素に用いることにした。キャピラリー内にペプシンを固定化し、タンパク質試料をキャピラリー内で分離・酵素消化し、精製したペプチド断片を直接、質量分析装置に導入し、タンパク質の同定を行った。その結果、タンパク質であるリゾチームのアミノ酸配列の 73%を検出、同定することに成功し、本手法がプロテオーム解析の効率化に役立つことを明らかにした(Anal. Chem. 2004, 76, 1896-1902)。

### -b)薬物代謝評価システムの開発

キャピラリーを利用して肝臓ミクロソーム画分を固定化した薬物代謝評価システムを開発した。開発したシステムでは、少量の薬物候補物質を注入すると、代謝物が生成し、さらに候補物質と代謝物質が分離検出された。代謝物が泳動された時間により化合物が同定され、またピーク強度と反応時間から、反応効率を測定することができた(Anal. Biochem. 2002, 308, 278-284)。本システムでは、候補物質と同時に、代謝拮抗薬を注入することで代謝阻害の評

価も可能であった(J. Chromatogr. A 2004, 1051, 261-266)。

#### -c)臨床分析用マイクロチップの開発

マイクロチップを臨床応用するために、生理活性物質の分析に利用した。プラスチック製マイクロチップは、安価で壊れ難いため病床などの試料採取場所でのオンサイト分析に適している。しかしプラスチックは、その表面の疎水性により試料が吸着し良好な分離や反応が行えないという問題があった。そこでプラスチック表面による非特異的な吸着を抑制する添加剤の探索を行った。その結果、カチオン化した澱粉誘導体を用いることで、アミノ酸、タンパク質等の生理活性物質をマイクロチップで1分以内に分離検出することに成功した(図2、Anal. Chem. 2004, 76, 6792-6796, Electrophoresis 2005, 26, 3682-3688)。

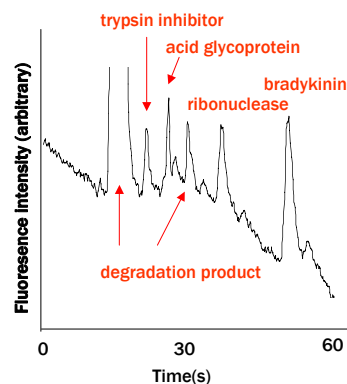


図2 マイクロチップによるタンパク質の分離

#### -d)リン脂質を有するポリマー利用したタンパク質固定化マイクロチップの開発

生体物質をより生体内と類似した環境下に固定化するために、細胞膜の成分であるリン脂質を利用した固定化を試みた。細胞膜と類似した構造をマイクロチップ上に構築するために、まず始めにリン脂質を有する高分子でマイクロチップ表面を被覆した。その後、トリプシンを化学結合によりリン脂質膜表面に固定化することで、消化反応、分離、検出を集積化したマイクロチップを作製した。本チップを用いることで、アミノ酸誘導体が2分以内に加水分解、分離、検出された(Lab Chip 2004, 4, 4-6)。

#### -e)高感度検出装置の最適化

細胞の状態、応答等を計測するには、細胞から放出される信号を様々な手法で高感度に検出する必要がある。これまでのマイクロチップの実験で用いた蛍光検出法は、汎用性がないため限られた蛍光物質しか検出されなかった。そこで細胞等の生体システムから出力される様々な情報を高感度に検出するために質量分析装置の最適化を行った。まず始めにキャピラリー電気泳動装置と質量分析装置とを組み合わせ、細胞に含まれる内容物の網羅的解析を試みた。その結果、低分子のアニオン化合物に対しては、数 f(フェムト)mol~数 100a(アト)molの検出が可能であった。またアニオン性、カチオン性、中性物質の一斉分離検出法の開発も行った。この結果、数十種類の生体物質の同時分離検出に成功した(論文投稿中)。

### (3)新しい高含水ゲルの開発

#### -a)高含水ゲルの構造解析

高含水ゲルの構造解析には、高分解能を有する走査型電子顕微鏡や透過型電子顕微鏡

を用いた。高分解能の電子顕微鏡を用いて、薄膜状に作製した生体物質(トリプシン)包含ゲルを観察した結果、固定化された生体物質と思われる形が観察された(Anal. Chem. 2005, 77, 1813-1818)。また透過型電子顕微鏡を用いることで、高含水ゲルに含まれるマイクロソームやシリカのネットワークを観察することに成功した(図3)。観察された構造は、推測していた模式図(J. Pharm. Biomed. Anal. 2003, 31, 299-309)と類似していた。従来は、酵素活性や元素分析によって固定化された生体物質の量を推定していたが、電子顕微鏡によって実際に固定化された生体物質を直視することができるようになった。

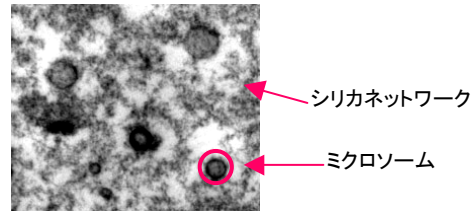


図3 ミクロソームを包含した高含水ゲルのTEM像

#### -b)生体物質の固定化に優れた高含水ゲルの開発

生体物質の固定化に利用している高含水ゲルをシリカのみならず、ゼラチンやキトサン等の天然由来の有機高分子で調製した。しかし有機高分子のみでは、包含させた生体物質が流出してしまい、固定化素子として利用することができなかった。そこで従来のシリカと有機高分子とのハイブリットなゲルを調製し、より生体物質がその機能を発現するのに適したゲルの開発を試みた。アルブミン固定化素子の場合、高含水ゲル調製時に少量のキトサンを添加することで、固定化されたアルブミンとの相互作用がより強固となり、また安定性も増加し、固定化素子の機能が改善した(J. Chromatogr. A 2004, 1044, 267-270)。

#### -c)多孔質支持体を利用した固定化法の開発

高含水ゲルに固定化された生体分子を利用した分析法では、固定化に利用している網目構造より大きい物質が良好に分析できなかった。そこで多孔質支持体の表面に生体分子を含んだ高含水ゲルを被覆する新しい固定化法を開発した。まず固定化タンパク質としてトリプシンを選択し、支持体に用いる多孔質体の構造の最適化を行った。その結果、貫通孔が大きい多孔質体に固定化されたトリプシンが最も強い活性を示した。作製したトリプシン固定化多孔質体を用いることで、網目構造より大きいタンパク質試料が効率的に加水分解された。また固定化多孔質体は、繰り返し利用でき、さらに冷蔵庫での長期間保管が可能であった(Anal. Chem. 2005, 77, 1813-1818)。

#### -d)アルコールの生成しない固定化法の開発

透過型電子顕微鏡の実験より、固定化されているマイクロソームの密度が期待していた固定化密度より低いことが明らかとなった。これは固定化の過程で一部のマイクロソームの破壊や流出が起こっていると考えられた。また固定化されたチトクロムの活性も予想以上に弱かった。これら原因の一つにアルコキシシランの加水分解、もしくは重合過程で生成するアルコールが、マイクロソームの破壊やチトクロムを失活させていると考えた。そこでアルコキシシランの加水分解や重合反応の過程で生成するアルコール量を減少させた高含水ゲルの調製を試み

た。その結果、珪酸ナトリウムとコロイダルシリカの反応で生じるゲルは、反応の過程でアルコールを生じず、また生成したゲルは長期間包含した生体物質(チトクロム)の機能を保持することが明らかとなった(Anal. Chem. 2005, 77, 7080-7083)。

#### 5 自己評価:

研究代表者は、採択時に上記の研究成果の欄に記載した3つの研究項目を掲げていた。1番目の研究項目である生体システムを利用した優れた評価系の構築は、複数の生体物質による生体内反応を利用した評価系を構築し、さらにマイクロチップ上で細胞を利用した評価系もほぼ構築したものの、組織・器官などより複雑な細胞システムを利用した系の構築までは至らなかったことから、目標を達成したとは言えない。しかし2番目と3番目の研究項目はほぼ予定通り研究が進行し、実用的な評価系の構築や新しい固定化ゲルの開発に成功したことから、目標を達成したと考えられる。

これらの研究成果とともに、私にとって意義深かった点として、このさきがけに採択されなければ知り合うことがなかったような異分野の研究者やアドバイザーの先生方との人的な交流ができたことが挙げられる。この交流によって今後の研究の進め方について多く学ぶことができた点は、これからの研究人生において大変有意義であり、今後の展開につながると考えている。

#### 6 研究総括の見解:

当初の主要な目標は、高含水ゲルを利用して生体分子、細胞等を3次元的に固定化し生体内を模倣したバイオ素子・システムを創製することであったが、細胞の固定化に適した高含水ゲルの開発に成功しなかったこともあり、達成できなかったのが残念である。しかし最近、細胞を利用したマイクロチップ上での評価系の構築やアルコールの発生しないゲルの調製法の開発に成功したことから、近い将来に目標が達成される可能性は認められる。バイオ素子を利用した優れた分析法の開発や新しいハイブリッド高含水ゲルの開発などに成功した点は評価できる。

#### 7 主な論文等:

##### 論文

1. M. Kato, K. Inuzuka, K. Sakai-Kato, T. Toyooka, "Monolithic bioreactor immobilizing trypsin for high-throughput analysis" Anal. Chem. 2005, 77, 1813-1818.

2. K. Sakai-Kato, M. Kato, H. Homma, T. Toyooka, N. Utsunomiya-Tate, "Creation of P-450 chip for high-throughput analysis" Anal. Chem. 2005, 77, 7080-7083.

3. K. Sakai-Kato, M. Kato, K. Ishihara, T. Toyo'oka, "An Enzyme-immobilization Method for Integration of Biofunctions on a Microchip using a Water-soluble Amphiphilic Phospholipid Polymer Having a Reacting Group" Lab Chip 2004, 4, 4-6.

4. M. Kato, K. Sakai-Kato, H.-M. Jin, K. Kubota, H. Miyano, T. Toyo'oka, M. T. Dulay, R. N. Zare, "Integration of On-line Protein Digestion, Peptide Separation, and Protein Identification using Pepsin-Coated Photopolymerized Sol-Gel Columns and Capillary Electrophoresis/Mass Spectrometry" Anal. Chem. 2004, 76, 1896-1902.

5. M. Kato, Y. Gyoten, K. Sakai-Kato, T. Nakajima, T. Toyo'oka, "Cationic starch derivatives as dynamic coating additives for analysis of amino acids and peptides using poly(methyl methacrylate) microfluidic devices" Anal. Chem. 2004, 76, 6792-6796.

(他 計13報)

#### 総説・解説記事

1. M. Kato, K. Sakai-Kato, T. Toyo'oka, "Minutalization using immobilized biomolecules toward high throughput screening" Anal. Bioanal. Chem. 2006, 384, 50-52.

2. M. Kato, K. Sakai-Kato, T. Toyo'oka, "Silica sol-gel monolithic materials and their use in a variety of applications" J. Sep. Sci. 2005, 28, 1893-1908.

3. 加藤 大, "ゾルーゲル反応を利用した high-throughput screening に適したアッセイ系の構築" ファルマシア 2005, 41, 1159-1163.

4. 加藤 大, "ゾルーゲル反応の分析化学への応用" ぶんせき 2004, , 101-102.

5. 加藤 大, "生体システムを集積化した素子・システムの開発" 化学工業 2003, 54, 339-345.  
(他 計6報)

#### 特許

1. 「機能性物質含有薄膜で被覆された固定化素子、及びその製造法」平成 15 年 9 月 27 日  
出願番号:PCT/JP2004/014055

2. 「分析方法、及び該分析方法に用いる装置」平成 17 年 8 月 3 日  
出願番号:特願 2005-224935

#### 受賞

1. 分析化学会中部支部奨励賞(日本分析化学会中部支部) 2003年  
「生体物質を利用した高性能ハイスループット解析法の開発」

招待及び依頼講演

1. 日本薬学会第126年会シンポジウム(仙台) 2006年3月28日(予定)
2. 第36回中部化学関係学協会支部連合秋季大会(静岡) 2005年9月23日
3. The Fifth Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separations and Analysis(ソウル) 2004年12月6日
4. 第35回中部化学関係学協会支部連合秋季大会(名古屋) 2004年9月18日
5. 東海バイオファクトリー研究会&SMS研究会合同シーズ発表会(名古屋) 2003年10月2日  
(他 計7回)