



電気生理バイオセンサの開発

鈴木 雅登*・下野 健

はじめに

バイオセンサは生体由来の分子認識機構をセンサ素子として利用し、被検知物質とセンサ素子との反応を物理信号へ変換することによって被検知物質を検出する化学センサの一種である。我々の身近なところでは、診療所などで使われるインフルエンザ簡易検査キット、妊娠検査薬、糖尿病の患者さん向けの自己採血型の血糖センサなどに利用されている。特に血糖センサは、血液中のグルコース濃度の定量を行うセンサであり、1967年に Updike S. Jらによって原理が確立されて以来¹⁾、もっとも研究開発が行われているバイオセンサである。グルコースセンサはセンサ素子にグルコースオキシダーゼ (GOx) を用い、GOxによるグルコースの酸化と酸素の還元反応の結果、系中の酸素濃度が減少し、その減少分をクラーク電極で検出しグルコース濃度を定量する。現在では、グルコースの酸化によって生じた電子を効率的に受け取るメディエータ分子の導入、血中の還元剤の影響を抑制させる電気化学計測系の工夫などの改良が加えられ、指先を紙で切ってしまった時にでる血液量 (0.6 μ L) 程度で正確に血中のグルコース濃度が計測できる²⁾。

一方、私たちの体を構成する細胞は細胞外からの多種多様な微弱な化学シグナル (ホルモン分子、神経伝達物質など) や物理シグナル (膜電位、せん断応力、細胞-細胞接触など) を受容し、適切な生理応答 (増殖、遊走、分化、アポトーシスなど) を示す。このような生理応答の高感度な検出が実現できれば、細胞自身を素子とした細胞ベースのバイオセンサが構築できる。たとえば水質指標の一つである生物学的酸素要求量 (BOD) を計測するバイオセンサがある。BODは対象水溶液中に含まれる有機物が好気性微生物によって分解される間に消費される酸素量を示し、この値が大きいほど水中に多くの有機物が含まれ水質が悪いと判断される。酸素電極の表面に酵母を担持させた膜を配置させ、膜中の酵母が水溶液中の有機物を代謝する際に消費される酸素量を酸素電極で測定することによりBODが迅速に求められる³⁾。

哺乳細胞を用いた例としては、*in vitro*での心臓毒性

試験hERG assayがある。hERG (human Ether-a-go-go Related Gene) は心筋活動電位の再分極を担うカリウムイオンチャネル (Kv11.1) 遺伝子であり、このチャネルの異常が心臓疾患の一つであるQT延長症候群の原因であることが知られている⁴⁾。このチャネルをHEK (human embryonic kidney) 細胞やCHO (Chinese hamster ovary) 細胞などに発現させ、薬物候補化合物を添加した際にhERGチャネルの電気生理機能を計測することにより、試験化合物の心臓への毒性の評価がなされている⁵⁾。

細胞の生理的な応答の多くは細胞膜にあるタンパク質 (イオンチャネル、トランスポーター、ATPaseなど) を用いた細胞内外でのイオン (Ca^{2+} , Na^{+} , K^{+} , Cl^{-}) の輸送を伴う。このような細胞の微弱な電気活動は古来より電気生理学的手法によって計測されてきた。そこで本稿では電気生理の基礎の基礎に触れながら、我々がこれまで開発してきた細胞ベース電気生理バイオセンサの研究例について紹介する。

細胞電気生理計測の基礎⁶⁾

膜電位の発生 古くから生体内の細胞が電氣的に興奮することが知られており、この興奮現象が中枢神経系における情報伝達、心臓や平滑筋の興奮収縮、骨格筋の運動神経による随意運動など、種々の器官の重要な機能を担っている。細胞の電氣的な興奮現象は細胞内外でのイオン組成の差に起因している。表1に神経細胞の興奮現象に寄与する重要なイオン種の細胞内外での濃度を示した。細胞外液は Na^{+} が多く、 K^{+} が少なく細胞内ではその逆である。このようなイオン種の非平衡な状態を維

表1. 神経細胞内外のイオン濃度

イオン種	細胞外濃度 [mM]	細胞内濃度 [mM]	平衡電位 [mV]
K^{+}	5	100	-80
Na^{+}	150	15	62
Ca^{2+}	2	0.0002	123
Cl^{-}	150	13	-65

* 著者紹介 パナソニック株式会社本社R&D本部デバイスソリューションセンター (主任研究員)
 E-mail: suzuki.masa-to@jp.panasonic.com

持させるために、細胞はエネルギー源であるアデノシン三リン酸 (ATP) を消費して膜タンパク質の一つである Na^+ , K^+ -ATPase を用いて Na^+ を細胞外に排出させ、 K^+ を細胞内に取り込んでいる。そのため細胞は細胞膜を介して多くのエネルギーが蓄えられた状態であり、刺激によってこのイオン組成のバランスが崩れると膜電位が大きく変化する。この膜電位の変化が隣接する細胞への刺激となり、シグナルが遠くの細胞まで伝播する。

ここで細胞内外の K^+ に着目して考える。細胞外に 5 mM, 細胞内に 100 mM の K^+ が存在するため、この濃度勾配にしたがって K^+ は細胞内から細胞外へ拡散しようとする。それと同時に K^+ が細胞外へ移動した分、細胞外が細胞内に対して陽性を帯びてくる。その結果、静電的な斥力によって K^+ を細胞内に留めようとする力が作用する。このように二つの勾配 (濃度、電位) に起因した力をイオンは受け、その結果イオンはポテンシャルを有する。これは電気化学ポテンシャル (electrochemical potential: μ) と呼ばれ、細胞内外の電気化学ポテンシャルの差が、細胞膜が有するエネルギーとなる。

その差は式 (1) のように記述される。

$$\Delta\mu(\text{K}^+) = \mu_i(\text{K}^+) - \mu_o(\text{K}^+) = zF(E_i - E_o) + RT \ln \frac{[\text{K}^+]_i}{[\text{K}^+]_o} \quad \text{式 (1)}$$

$\Delta\mu(\text{K}^+)$: K^+ の細胞内外の電気化学ポテンシャル差, R : 気体定数, T : 絶対温度, z : イオン価, F : ファラデー定数, E : 電位, 添え字 i : 細胞内, 添え字 o : 細胞外。

この式の第1項は細胞膜内外の電位差にしたがって細胞内から細胞外へ移動しようとするポテンシャルであり第2項は K^+ が細胞内から細胞外へ濃度差にしたがって移動しようとするポテンシャルである。この電気化学ポテンシャル差が正の場合、 K^+ は細胞内から細胞外へ移動し、負の場合細胞外から細胞内へ移動する。電気化学ポテンシャル差が0の場合、濃度勾配による力と電位勾配による力が釣り合い、細胞内外のイオンの出入りはなくなる。この状態を電気化学平衡 (electrochemical equilibrium) といい $\Delta\mu = 0$ である。この状態を式 (1) に導入すると式 (3) が誘導される。この式はネルンストの式と呼ばれ1種類のイオン透過性の膜を隔てた1種類のイオンが形成する平衡電位を与える。表1に平衡電位も記載した。式 (3) に細胞内外のイオン濃度を代入すれば平衡電位 (細胞膜に関して言えば、膜電位) が算出される。

$$\mu_i(\text{K}^+) - \mu_o(\text{K}^+) = zF(E_i - E_o) + RT \ln \frac{[\text{K}^+]_i}{[\text{K}^+]_o} = 0 \quad \text{式 (2)}$$

$$E_i - E_o = -\frac{RT}{zF} \ln \frac{[\text{K}^+]_i}{[\text{K}^+]_o} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[\text{K}^+]_o}{[\text{K}^+]_i} \quad \text{式 (3)}$$

この膜電位の意味について考えるために K^+ のみを透過するイオンチャネルを有する細胞を仮定する。この場合、先ほどの計算より膜電位が細胞外に対して細胞内が 80 mV 低い状態 (-80 mV) に保持される。この状態で人為的に膜電位を -40 mV に保持した場合、40 mV 分の力が細胞内から外側に作用し外向きの電流が生じる。その後人為的な電位の保持を開放させると膜電位は -80 mV に戻り安定する。

パッチクランプ法 細胞の膜内外の電位差や電流を計測するためには、細胞内へ計測用の電極を1本ないし2本挿入する必要がある。電極挿入による細胞への致命的なダメージを回避するために電気生理学の黎明期 (1940年代) ではイカ巨大神経繊維 (直径 400~800 μm) など巨大細胞が用いられてきた。その後、微小電極作製技術の普及、電流増幅装置の改良などによって単一微小細胞さらには単一 (あるいは複数個) のイオンチャネル分子の活動をイオン電流として記録する方法が確立された。この方法はパッチクランプ法と呼ばれ、1976年に Neher と Sakmann によって開発された⁷⁾。パッチクランプ法によって細胞や分子レベルでの生理学研究に大きなインパクトを与えその業績から Neher と Sakmann は 1991年にノーベル賞を受賞した。

パッチクランプ法は、細胞に先鋭化 (直径 1 μm 程度) させたガラスキャピラリー電極を高抵抗 (ギガオーム以上) で細胞膜に密着させ (cell-attached mode), その先端開口部の微小膜領域 (パッチ膜) に含まれるイオンチャネルを通るイオン電流を計測する方法である。この電流計測から得られるデータとして、パッチ膜中に含まれていたイオンチャネルのコンダクタンス (イオンの通りやすさ), チャネルの開確率などを求めることができる。パッチクランプ法は cell-attached の状態から、パッチ膜の破断 (whole-cell mode), パッチ膜の剥離 (inside-out mode), パッチ膜の破断の後の剥離 (outside-out mode) などさまざまな測定モードが提唱されてきた。次節と関連が深い whole-cell mode についてのみ紹介する (図1)⁸⁾。

Whole-cell mode はパッチクランプ法の cell-attached の状態から、ガラスキャピラリー内を陰圧にし、パッチ膜を破断させ、細胞内とガラスキャピラリー内の電解液を同質にさせる。図1Aに whole cell mode でのパッチクランプ計測システムの概念図を示す。パッチクランプアンブ

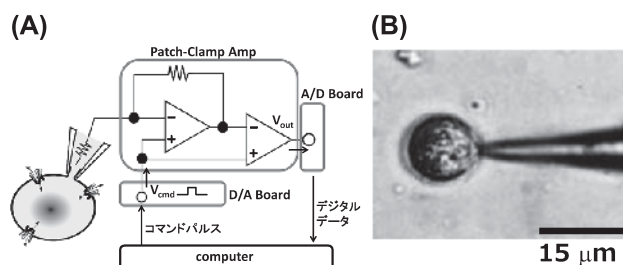


図1. (A) Whole-cell modeパッチクランプ計測システムの概念図, (B) whole-cell mode状態の細胞の光学顕微鏡写真.

は高感度な電流-電圧変換装置 (I-Vコンバータ) であり, 細胞から生じる極微量な電流 (ピコアンペア~ナノアンペア) を電圧に変換する. この電圧信号がアナログ-デジタル (A/D) 変換されコンピュータに記録される. パッチクランプアンプの特徴は, I-Vコンバータにオペアンプを用いることにより, 電圧固定と電流計測を1本の電極で行える点にある. その結果, 単一細胞という極微小なターゲットの電気計測が実現されるようになった. Whole-cell modeの場合, ガラスキャピラリ内液の組成を調製することにより, 実験の目的に応じた, 細胞内液組成の変更が可能である. また, whole-cell状態の細胞をバイオセンサの素子として使用することにより, この細胞に対して膜電位変化を惹起させる化合物の検出がなされてきた. たとえば網膜双極細胞を whole-cell modeでガラスキャピラリ上に保持させ, この状態のまま網膜水平細胞へ近接させ, 水平細胞から放出される Gamma-Amino Butyric Acid (GABA) が検出されている⁹⁾.

GPCRへのリガンド結合を検出する細胞ベース電気生理センサ¹⁰⁾

Gタンパク質結合型受容体 (GPCR) は, 神経伝達物質やホルモンなどの化学物質, タンパク質, 光などさまざまなシグナルの受容を担う. また, GPCRは薬剤ターゲットとしても注目され, 現在上市されている薬剤の約25%がGPCRを標的にした薬剤である. そのためGPCRの機能を調整する分子 (リガンド) を迅速・簡便に検出する技術の開発が望まれている. GPCRリガンドの検出は, GPCRの活性化によって生じたシグナル分子 (cAMP, Ca^{2+}) の, 生化学的手法 (ELISA, レポーターアッセイ) による検出で実現されているが, 煩雑な溶液操作や結果の取得まで時間を要するという課題がある. そこで我々はGPCRに対するリガンドを電気生理的に迅速に検出可能なセンサ細胞の開発に着手した (図2A).

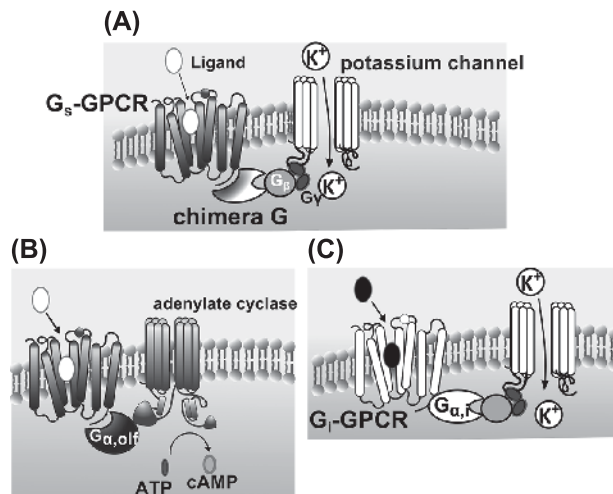


図2. (A) 細胞ベース電気生理センサの原理の模式図, (B) $G_{\alpha,s}$ と共役する GPCR が活性化する代表的なシグナル伝達経路の模式図. (C) $G_{\alpha,i}$ と共役する GPCR が活性化する代表的なシグナル伝達経路の模式図.

今回は, GPCRの中でもGタンパク質のサブファミリーの一つである $G_{\alpha,s}$ タンパク質と共役するアドレナリンやドーパミン受容体の一部や嗅覚受容体に適応可能なセンサ細胞の開発を目的とし, $\beta 1$ アドレナリン受容体 ($\beta 1AR$) を用いた. $\beta 1AR$ は心筋細胞に強く発現し, 心不全治療薬の重要なターゲットである.

キメラGタンパク質の開発 Gタンパク質シグナルを電気生理的に検出するためにはGPCRの活性化を適当なイオンチャネルにつなげる必要があった. $G_{\alpha,s}$ と共役する GPCR では, $G_{\alpha,s}$ を経由してアデニル酸シクラーゼが活性化され細胞内のcAMP濃度が増加する (図2B). 一方, Gタンパク質連動型内向き整流性 K^+ チャネル (Kir3) は $G_{\alpha,i}$ と呼ばれるGタンパク質と共役する GPCR によって活性化される (図2C). そこで $G_{\alpha,i}$ の一部を $G_{\alpha,olf}$ ($G_{\alpha,s}$ のサブファミリーの一つ) に置換させたキメラGタンパク質の開発に着手した. 図3に G_{α} タンパク質の2次元モデル図を示した¹¹⁾. G_{α} タンパク質はGTPase domainとhelical domainの二つの機能ドメインから構成され, 特に $\alpha 3$ - $\beta 5$ ループ, $\alpha 4$ - $\beta 6$ ループ, およびC末端領域が受容体の選択性を決定する領域であると考えられている. $G_{\alpha,s}$ と共役する GPCR によって K^+ チャネルを開口させるために, $G_{\alpha,i}$ のこれらの領域を $G_{\alpha,olf}$ に置換させた13種類のキメラGタンパク質を作製した.

変異型 K^+ チャネル Kir 3 は Kir 3.1 ~ Kir 3.4 までの4つのサブタイプがあり, それぞれ異なるサブタイプとヘテロ多量体を形成し, イオンチャネルを形成する. Vivaudou M. らは Kir 3.1 の137番目のフェニルアラニン

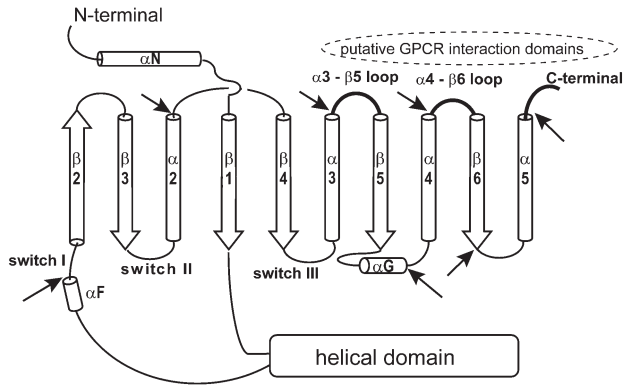


図3. $G_{\alpha,i}$ タンパク質の2次元モデル図(参考文献11, Figure 3の一部を改変した). 円柱が α -ヘリックス, ブロック矢印が β -シートを示す. 矢印の領域からC末端側を $G_{\alpha,olf}$ タンパク質へ置換させた.

表2. Whole-cell mode計測時に用いた溶液の組成

溶液名	
細胞外液	140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM glucose, 10 mM HEPES, pH 7.4, Osmo: 290–300 mOsm/kg
highK 溶液	140 mM KCl, 2.6 mM $CaCl_2$, 1.2 mM $MgCl_2$, 5 mM HEPES, 10 mM glucose, pH 7.4, Osmo: 290–300 mOsm/kg
内液	107 mM KCl, 1.2 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 10 mM EGTA, 5 mM HEPES, 2 mM ATP, 0.3 mM GTP, pH 7.2, Osmo: 290–300 mOsm/kg

をセリンへ変更したKir3.1 (F137S) 変異体が, ホモ四量体を構成しイオンチャンネルを形成することを示した¹²⁾. 本開発では, センサ細胞を構成させるタンパク質の種類を減らす目的で, Kir3.1 (F137S) 変異体を用いた.

Whole-cell mode計測の実際 Whole-cell modeの場合, 電極内液で細胞内液が置換されるため細胞内液に近い電極内液を用いた. 各溶液の組成を表2にまとめた. ガラス電極はガラス管をレーザーブラーにより先端径が約1 μ mになるよう先鋭化させ, パッチ内液で充填した後にAg/AgCl電極を挿入した. 一方, 顕微鏡下の灌流チャンバは別のAg/AgCl電極を介して接地させ, 灌流チャンバとガラス電極間の電位差をパッチクランプアンプ (EPC 10, HEKA Instruments Inc.) により制御した. 単一細胞にガラス電極を接触させcell-attached状態した後, whole-cell modeにした. この時の細胞の静止膜電位は-10 mV程度の値を示し, K^+ チャンネルのみを発現させた細胞の静止膜電位は-60 mV~-30 mVであった.

K^+ チャンネルの評価 K^+ チャンネルの電位依存性を確認するために, 細胞外液をhigh-K溶液に置換し細胞内外

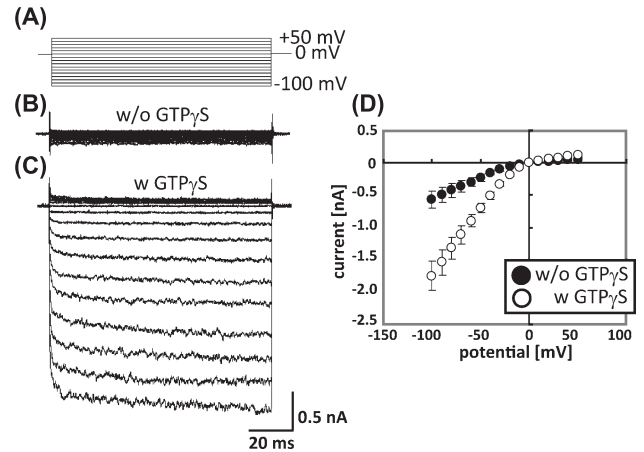


図4. K^+ チャンネルを発現させたHEK293T細胞のwhole-cell modeでの計測結果. (A) 細胞に印加した電圧ステップの模式図, (B) 内液に $GTP\gamma S$ を含まないときの電圧を変化させたときの電流値の変化. (C) $GTP\gamma S$ で K^+ チャンネルを活性化させたときの電流値変化. (D) 内液に $GTP\gamma S$ がある場合(○)とない場合(●)の K^+ チャンネルのI-V応答.

の K^+ の濃度勾配を解消させた(静止膜電位0~+2 mV). この状態で細胞内の電位を細胞外に対して-100 mV~+50 mVの範囲で変化させ, その際に細胞膜を通過する K^+ を電流の変化量として計測した(図4). K^+ チャンネルを活性化させない状態では-100 mVを印加した際に, -500 pA程度の電流(細胞外から細胞内に電流が流れ込む方向を通常“-”で表記する)が観測され, +50 mVではほとんど電流は観測されなかった(図4B). 細胞内液にGタンパク質の活性化剤である0.5 mM guanosine 5'-O-[gamma-thio]triphosphate ($GTP\gamma S$)を加えた際, -100 mVで-2 nA以上の大きな電流値が観測された(図4C). $GTP\gamma S$ によって細胞が有する内在の $G_{\alpha,i}$ タンパク質が活性化され K^+ チャンネルが開いたためである. K^+ チャンネルのON/OFF比が4以上あり, K^+ チャンネルを用いたバイオセンサでは大きなS/Nが取得できると期待された(図4D).

キメラGタンパク質のスクリーニング 次に $\beta 1AR$, Gタンパク質, K^+ チャンネルを発現させた細胞の計測を行った. 膜電位を0 mVから-50 mVにステップさせた際に流れた電流値を計測した. 図5にパッチクランプの測定結果を示す. Gタンパク質に $G_{\alpha,i}$ を用いた場合, パルス波を印加した直後に-200 pA程度の電流値が計測され, 代表的な β アドレナリン受容体のアゴニストであるイソプロテレノール (ISO) を30 nM添加した場合, 電流値は約-500 pAへ変化した(図5A). $G_{\alpha,olf}$ でも $G_{\alpha,i}$ タンパク質と同様の変化しかみられなかった(図5B). $G_{\alpha,i}$ の場合, K^+ チャンネルを活性化することができ

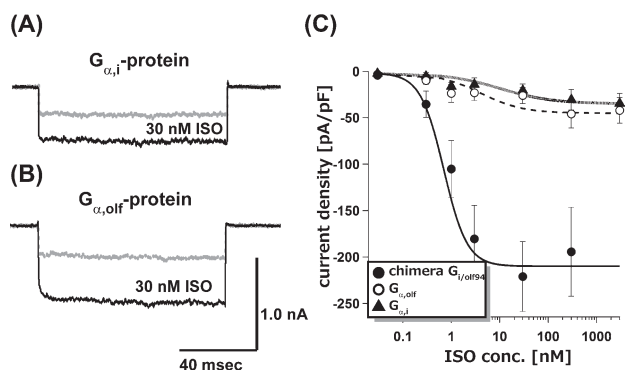


図5. $\beta 1AR$ 、キメラGタンパク質、 K^+ チャネルを発現させた細胞のisoproterenolで刺激したときの電流変化。0 mVから-50 mVへ電位をステップさせたときの電流値を計測した。Gタンパク質に(A) $G_{\alpha,i}$ もしくは(B) $G_{\alpha,olf}$ タンパク質を用いた。(C) $G_{i/olf94}$ 、 $G_{\alpha,olf}$ 、 $G_{\alpha,i}$ それぞれを導入したHEK293T細胞のisoproterenolの濃度応答曲線。

るが、 $\beta 1AR$ と結合することができず、また $G_{\alpha,olf}$ は $\beta 1AR$ と結合することはできるが、 K^+ チャネルを活性化させることができない。そのためISOで刺激した後も電流変化量は小さかった。ついで13種類のキメラGタンパク質を導入してISO添加前後での電流変化量を比較した。キメラ $G_{i/olf94}$ ($G_{\alpha,i}$ のC末端から94番目のアミノ酸までを $G_{\alpha,olf}$ に置換したもの)がもっとも大きなS/Nを示した。ISOに対する濃度応答曲線を計測した結果、 EC_{50} が0.7 nMと非常に高感度にISOを検出することができることが明らかとなった(図5C)。また、ISOと同じく $\beta 1AR$ のアゴニストであるドブタミンやドーパミン、アンタゴニストであるpropranolol, carvedilolの検出も可能であった。

以上の結果より、独自のキメラGタンパク質を採用することによりGPCRの一種である $\beta 1AR$ のリガンドを高感度、高S/Nで測定可能なセンサ細胞の作製に成功した。本細胞はキメラGタンパク質とイオンチャネルを利用した検出方式であるため、 $\beta 1AR$ 以外の $G_{\alpha,s}$ 結合型のGPCRに原理的には適用可能である。一方で、検出方法にパッチクランプ法を用いているため、データが実験者の手技に依存しスループットが非常に悪いという課題がある。著者も多数のキメラGタンパク質のパッチクランプ法での評価に難儀した記憶がある。

しかしながら、現在創薬向けにMolecular Device社、Sophion BioScience社、Nanji[on Technologies社、Fluxion Biosciences社などからオートパッチクランプ

システムが販売されている。オートパッチクランプはマニュアルパッチクランプのガラスキャピラリの代わりに、平板基板やマイクロ流路内に配置させた貫通孔を用いて単一細胞を捕捉させ数百メガ〜ギガシールを形成させる。細胞を各社専用の容器に分散させることによってほぼ全自動でパッチクランプ計測が達成され、マニュアルパッチと比較して飛躍的なスループットの向上が期待される。

おわりに

電気生理学の基本的な事項について概説し、その応用として細胞ベース電気生理バイオセンサの開発について紹介した。GPCRは創薬ターゲットとしてだけではなく、味覚や嗅覚といったヒトの化学受容も司る重要な受容体である。実際に人工的に作製した細胞膜にこれらの受容体を組み込み低分子化合物の検出を行う研究がなされつつある¹³⁻¹⁵⁾。このように電気生理的なセンシング技術を拡張することにより味や匂いといったこれまで定性的であったヒトの感覚の定量的な評価が期待できる。

謝 辞

本稿で紹介した細胞ベース電気生理バイオセンサの開発にあたり、京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻の森泰生教授、清中茂樹准教授、沼田朋大助教に感謝いたします。

文 献

- 1) Updike, S. J. and Hicks, G. P.: *Nature*, **214**, 986 (1967).
- 2) 中南貴裕：血糖自己測定システム (バイオ電気化学の実際, 第10章), CMC出版 (2007).
- 3) JIS K 3602: 微生物電極による生物化学的酸素消費量 (BODs) 計測器 (1990).
- 4) Sanguinetti, M. C. *et al.*: *Cell*, **81**, 299 (1995).
- 5) 熊谷雄治ら監修: 薬物性QT延長症候群, 情報機構 (2010).
- 6) 倉智嘉久: 心筋細胞イオンチャネル, 文光堂 (2000).
- 7) Neher, E. and Sakmann, B.: *Nature*, **260**, 799 (1976).
- 8) 岡田泰伸編: 最新パッチクランプ実験技術法, 吉岡書店 (2011).
- 9) Schwartz, E. A.: *Science*, **238**, 350 (1987).
- 10) Suzuki, M. *et al.*: *Chem. Sensors Suppl. A*, **28**, 12 (2012).
- 11) Oldham, W. M. and Hamm, H. E.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 60 (2008).
- 12) Vivaudou, M. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **272**, 31553 (1997).
- 13) Goldsmith, B. R. *et al.*: *ACS NANO*, **5**, 5408 (2011).
- 14) Lim, J. *et al.*: *Adv. Health. Mater.*, **3**, 360 (2014).
- 15) Hamada, S. *et al.*: *Chem. Commun.*, **50**, 2958 (2014).