

「統合1 細胞解析のための革新的基盤技術」  
平成28年度採択研究代表者

H28年度 実績報告書
----------------

民谷 栄一

大阪大学大学院工学研究科  
教授

細胞膜レセプタータンパクの1細胞統合解析技術の開発

## § 1. 研究実施体制

### (1) 民谷グループ

- ① 研究代表者: 民谷 栄一 (大阪大学大学院工学研究科、教授)
- ② 研究項目
  - ・細胞膜レセプタータンパクの1細胞機能解析マイクロ流体デバイスの構築

### (2) 植田グループ

- ① 主たる共同研究者: 植田 充美 (京都大学大学院農学研究科、教授)
- ② 研究項目
  - ・レセプター探索のための抗体タンパク創成に関する研究およびリガンド探索に関する研究

### (3) 高松グループ

- ① 主たる共同研究者: 高松 漂太 (大阪大学医学部呼吸器・免疫内科、助教)
- ② 研究項目
  - ・1細胞計測システムを用いた癌や免疫細胞特性の非侵襲的計測方法の確立

## § 2. 研究実施の概要

本研究では、細胞が1細胞ずつ配置されたその場でレセプタータンパクのダイナミクスを捉えるナノバイオセンシングを活用した1細胞レセプター解析技術の創成を目指している。そのため、網羅的に1細胞を操作できる遠心マイクロ流体細胞デバイスの開発、その場でのバイオセンシングのためのプラズモン共鳴・電気化学・ラマン分光イメージングなどによりリアルタイム計測を可能にする1細胞バイオセンサーチップ、ペプチドバーコードを用いたレセプタータンパク認識抗体ライブラリーやシグナル分子としてのペプチドの探索のためのプラットフォームの開発、各種チップと連動したイメージングシステムの開発、およびこれらを用いた診断応用検討に取り組んでいる。上記のデバイス実現に向け、本年度は、ベースとなる個々の要素技術開発に取り組んだ。

遠心回転マイクロ流体デバイスは、流体の時空間的制御に加え、シリンジポンプ等の別機構が不要でコスト減になるなどのメリットが期待できる。下図に示すように、一つのチップで最大11718細胞を捕捉できる遠心型チップを設計試作した。ヒト単球細胞種(THP-1)、ヒト急性T細胞性白血病細胞株(Jurkat細胞)を用いて、95%のトラップサイトに1細胞捕捉することに成功した。さらに、CD3抗体とCD13抗体を指標にレセプター解析してみると、レセプタータンパク発現から細胞種判別がオンチップで可能なことを確かめられた。今後、諸条件の最適化を進めることで精度向上を図り、また、解析する抗体を適切に選択することで、任意細胞の判別ができるように検討を進めていく。

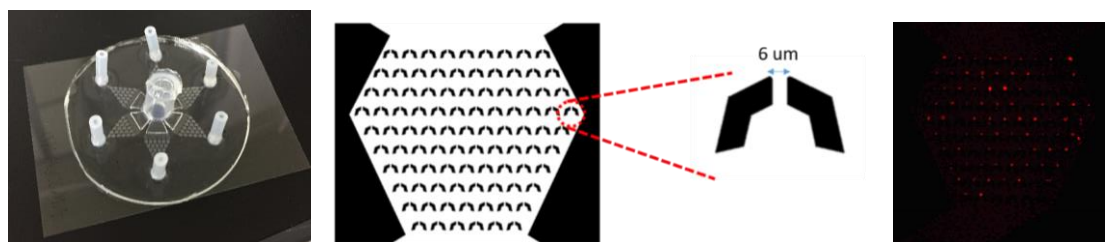


図. 試作した1細胞分離配置チップ(左)と捕捉1細胞蛍光像(右)

一方、マイクロチップデバイスによる1細胞レベルの計測にあたって、酵素反応等によって大きな分子信号へと増幅ができれば、微量の対象分子をより捉えやすくなると考えられる。ルミノールを用いた電気化学発光(ECL)に着目し、2種のモデル検討を行った。活性酸素の一つである過酸化水素を分解する酵素カタラーゼを磁性粒子に固定化することで90fMの高感度検出を実現した[1]。血清中の糖化アルブミンをモデルに、ECL計測検討も行いった。糖化アルブミンをタンパク分解酵素により分解し、生成する糖化アミノ酸について酸化酵素を用いて過酸化水素を生成させ、ECLにより計測した結果、血清中の糖化アルブミンを検出下限0.1 μMで検出できた[2]。次年度以降、構築したECL技術について1細胞解析への展開を図っていく。

### 代表的な原著論文

- [1] Sensitive Detection of Glycated Albumin in Human Serum Albumin using Electrochemiluminescence, Inoue, Yuki; Inoue, Mikako; Saito, Masato; Yoshikawa, Hiroyuki; Tamiya, Eiichi, Analytical Chemistry (in press) (2017)
- [2] Quenched Electrochemiluminescence Imaging using Electro-Generated Substrate for Sensitive Detection of Catalase as Potential Enzyme Reporter System, Yuki Inoue, Masato Saito, Hiroyuki Yoshikawa, Eiichi Tamiya, Electrochimica Acta, 240, 447-455 (2017)