

平成 31 年 4 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14098

研究課題名(和文) ナノポアトラップ法を利用した包括的1細胞解析法の創成

研究課題名(英文) Development of a nanopore trapping method for comprehensive analysis of single-cells

研究代表者

有馬 彰秀 (Arima, Akihide)

大阪大学・産業科学研究所・特任助教(常勤)

研究者番号：20781347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ナノスケールの細孔(ナノポア)を利用した電氣的単一粒子捕捉法(ナノポアトラップ法)を一細胞解析へと発展させることを目指した。本研究により、細胞が1個レベルで捕捉可能であることが実証されると共に、体積を指標とした粒子識別が可能であることが実証された。また、ナノスケールの粒子位置制御機構としての応用可能性も示唆された。微小な検体をナノポアという局所空間に体積や表面電荷の情報を得ながら捕捉できるとともに、ポア垂直方向において位置制御可能であることは、他の分析手法と組み合わせにおいて有効に機能すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義として、ポアというナノ空間において、電気泳動力や電気浸透流の抗力のバランスを介して、検体体積・表面電荷の違いがイオン輸送へと与える影響について知見が得られたことが挙げられる。また、社会的意義として、本研究結果を他の分析手法と組み合わせることで、液中であっても単一粒子レベルについてより詳細な解析が可能となり、近年問題となっているPM2.5等の空気中有害微粒子や、海洋中マイクロプラスチックなどの調査に大きく寄与することが挙げられる。

研究成果の概要(英文)：This research aim to develop a nanopore trapping method for a single-cell analysis. It was demonstrated that single-cells can be trapped/detrapped by simple control of applied voltage. In addition, it is shown that this technique can be used to particle discrimination by their volume. Beside, the potential as position modulator of micro-nano scale in liquid condition was also indicated. These finding may provide a useful insight for developing single-particle analysis by the combination of other techniques.

研究分野：ナノマイクロバイオシステム

キーワード：ナノポア イオン電流 電気泳動

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞ごとに遺伝子やタンパク質の状態は異なっており、1細胞解析に近年注目が集まっている(M. B. Elowitz et al., *Science*, 297, 1183 (2002))。細胞分裂や分化に代表されるイベントのプロセスに関しては分子生物学的に研究が進んでいるが、一方でリアルタイムで細胞の状態を評価する手法は、2014年のノーベル化学賞を受賞した超高解像度の蛍光顕微鏡(E. Betzig et al., *Science*, 313, 1642 (2006), R. M. Dickson et al., *Nature*, 388, 355 (1997), S. W. Hell and J. Wichmann, *Optics Lett.*, 19, 780 (1994))に代表される光学的な直接観察に大きく依存している。さらに、上記のような先駆的な手法であっても蛍光修飾や染色などの侵襲的な前処理を必要としているか、細胞の破壊により同一の細胞の長期経時変化を追えない場合がほとんどである(F. Fujii et al., *Nat. Protoc.*, 10, 1445 (2015))。加えて、光学的観察におけるカメラのフレームレートに依存した時間分解能は、一般に数百fps程度であり、リアルタイムでの長期評価が可能な、簡便・非侵襲・高時間分解能の1細胞解析法の創成が求められている。

これらの課題を解決するポテンシャルを有するのがナノ-マイクロスケールの細孔(ポア)を利用したセンサーである。ポアでのセンシングは、電解質溶液中の検体が電気泳動的にポアを通過した際に、検体の体積に応じた電解質溶液を排除することで生じるイオン電流の変化に基づいており、生体分子分析に広く応用されている(C. Dekker, *Nat. Nanotechnol.*, 2, 209 (2007))。一方ポアの直径を検体より小さく設計することで、検体をポア開口部に詰まらせることが可能となる。これはすなわち検体の電気的捕捉(ナノポアトラップ法)であり、イオン電流変化から捕捉の確認が行えると共に、検体の体積・表面電荷に代表される情報を取得できる(図1, M. Tsutsui et al., *Appl. Phys. Lett.*, 103, 01328 (2014))。

加えて近年、パルス電場を用いた細胞のアポトーシス誘導が太田らのグループによって実証されている(K. Awasthi et al., *J. Phys. Chem. B*, 116, 11159 (2012))。この研究により、マイクロスケールの電極間に存在している細胞にパルス電場を介してその状態を能動的に変化させることが可能だと実証された。細胞への検体導入に用いられる技術であるエレクトロポレーションも、細胞膜の不安定化に同様にパルス電場を用いており、アポトーシス誘導とエレクトロポレーションにおける細胞膜の不安定化の間には電気的な閾値が存在していることが示唆される。

申請者はこれまで、ナノポアトラップ法による検体の電気的捕捉により、ナノ-マイクロ領域の1粒子レベルでの捕捉を実証した(A. Arima et al., *AIP Adv.* 6, 115004 (2016))。また、低アスペクト比ナノポア構造を利用したイオン電流計測により、検体の表面電荷が評価可能であることを明らかにした(A. Arima et al., *Appl. Phys. Lett.*, 104, 163112 (2014))。さらにソフトマテリアルであるリポソームのナノポアにおける捕捉と融合に関する研究に取り組んでいる。

以上を踏まえ申請者は、リポソーム同様に脂質二重膜で構成された細胞も、ポアで捕捉することが可能であると考えた。そして、表面電荷密度の評価による細胞の状態評価や、細胞内外の物質輸送を介したイベントの検出がポアを流れるイオン電流を介して行うことができ、リアルタイムでの長期評価が可能な、簡便・非侵襲・高時間分解能の細胞評価が達成できると考えた。加えて発展として、捕捉のための縦方向にセッティングした電極とは別に、ポア外周上に電極を組み込むことで、捕捉した細胞にパルス電場を印加することが可能になり、アポトーシス誘導や細胞膜の不安定化のような特殊な細胞状態をポアという限定された空間で発生させ、細胞への電気的干渉からその評価までを一貫して行える包括的な1細胞解析法を創成できると考え、本研究計画を着想した。

2. 研究の目的

本研究では、申請者がこれまで研究を行ってきたナノポアトラップ法を細胞捕捉へと発展させ、電気泳動条件下で細孔を流れるイオン電流と、細胞状態の相関に基づいた、簡便・非侵襲・高時間分解能のリアルタイム細胞評価法を確立する。さらにこれを発展させ、パルス電場による細胞への電気的干渉を組み込んだ包括的な1細胞解析法を創成する(図1)。

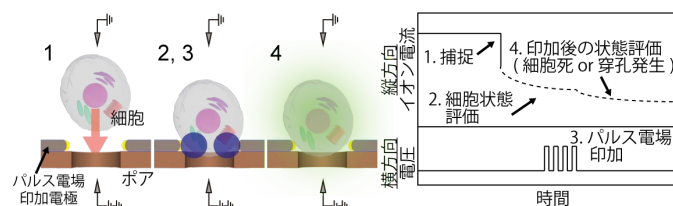


図1. 目的とする1細胞解析

3. 研究の方法

1) ナノポアトラップ法による1細胞捕捉実証

本段階では、細胞のハンドリング技術を習得すると共に、1細胞の捕捉機構や捕捉時の細胞の形態変化や捕捉状態と、イオン電流変化の相関を解明する。まずナノポアトラップ法を細胞捕捉に適用するために適切なポア設計、及び電場強度を導出する。デバイスは単純なSiN膜上に作製したポアを用いる。申請者はこれまでの研究で μm -nmのSiNポアの作製に習熟しており、細胞に合わせてポアのサイズ最適化を行う。実験では、縦方向の細胞トラップ用電極により、電圧を段階的に上げていくことで細胞をポアに捕捉させる。捕捉の確認は申請者が構築した微小電流計測と顕微鏡観察の同時計測系を用いて行い、細胞の捕捉機構を明らかにし、捕捉状態・

形態変化とイオン電流変化を相関付ける。

2)ポアを通るイオン電流を介した細胞解析法の確立

本段階では、細胞状態の評価が捕捉時のイオン電流変化で可能であることを実証する。まず、生細胞と死細胞の表面電荷の違いをナノポアトラップ法におけるイオン電流の落ち込みに基づき、明らかにする。また、細胞への干渉を行わず、種々の細胞の成長や分裂に代表されるイベントについてサイズと表面電荷の観点から分析する。

3)ポア組込電極による1細胞への電氣的干渉とその影響の評価

本段階では、縦方向電場による捕捉を行った状態で横方向パルス電場により細胞に電氣的な刺激を与え、その影響を評価する。これまでの研究における横方向電極組み込みナノポア作製プロセスを利用して、細胞への電氣的干渉に向けた横方向電極の最適化を行う。

4. 研究成果

(1)ナノポアトラップ法における単一細胞計測系の構築

本研究計画を遂行する上で必要な電圧印加及びイオン電流計測のためのプログラムを新規に作成した。カルボキシ基修飾ポリスチレン微粒子(粒子径 6 μm)での検証を行うことで、単一粒子の捕捉脱離を確認した。ラット副腎褐色細胞種由来の細胞(PC-12)の培養系構築を行い、実際に生体試料へ適用可能か確認するため、1細胞状態にした細胞分散液の計測を行った。その結果、1細胞の捕捉に由来すると考えられるイオン電流の減少が確認された。これにより本手法が当該細胞に対しても適用可能であることを実証した。

(2)ナノポアトラップ法による体積を指標とした単一粒子識別の実証

ナノポアトラップ法において捕捉された検体の挙動を調べるために、780 及び 900 nm のカルボキシ基修飾ポリスチレン標準微粒子の捕捉を行うと共に、イオン電流コンダクタンスの電圧依存性を確認した。各検体は直径が異なるものの、形状は同じ粒子であることから、依存性の傾向は同様のものであったが、実際には大きく異なっていた。ナノポアトラップ法が電気泳動力と、電気浸透流の抗力の拮抗によって成り立つことから、この平衡状態が異なることによってこの違いが発生することが示唆された。両者の比較により、体積を指標とした単一粒子分析が実証された。

また、粒子によってポアを閉塞する本手法の性質上、コンダクタンスと粒子位置には密接な関係があると考えられる。これを明らかにするため、有限要素法ベースの汎用マルチフィジックスシミュレーションソフトを用いて、粒子位置の導出を行った。具体的には、まずポアとその上下のチャンパー部分のモデルを作製した。その後、各印加電圧条件において、粒子モデルをポア近傍に設置することで、捕捉状態とした。その際の電流値をシミュレーションにより求め、粒子捕捉時の実験値に近くなった地点を粒子位置として採用した。その結果、興味深いことに、粒子挙動の傾向は、コンダクタンスのものとは一致していた。これはシンプルな電圧制御により粒子の位置制御がなされていることを示していることから、ナノポアトラップ法によって、溶液中で単一粒子をポアという局所空間に固定するのみならず、そのポア垂直方向の位置制御を行えることが示唆された。

一方、両粒子のコンダクタンスは概ね一致しているものの、粒子位置は異なる領域が存在しており、ナノポアトラップ法におけるイオン電流抑制では体積が支配的な要素として考えられた。それを確認するために、他の粒子についても計測を行い、異なる粒径・表面電荷の場合において、コンダクタンスがどう変化するかを調べた。その結果、実際には両方の要素が関与しており、一方が類似している場合において、他方の寄与が強く現れることがわかった。よって、成長した同一種細胞の大きさは類似していると考えられるため、表面電荷を指標とした状態分析への展望が拓かれた。

以上本研究によって、ポアというナノ空間において、電気泳動力や電気浸透流の抗力のバランスを介して、検体体積の違いがイオン輸送へと与える影響について知見が得られた。そして、ナノポアトラップ法による一細胞の捕捉及び、粒子体積を指標とする識別が1粒子レベルで実証されるとともに、溶液中におけるナノ-マイクロスケールでの粒子位置制御への応用可能性が示された。本研究成果は、他の分析手法と組み合わせることで、単一粒子分析分野における有用な技術になると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Akihide Arima, Makusu Tsutsui, Masateru Taniguchi, Volume discrimination of nanoparticles via electrical trapping using nanopores, Journal of Nanobiotechnology, 査読有り, 17, 40, 2019, pp.1-6. DOI: 10.1186/s12951-019-0471-5

〔学会発表〕(計2件)

有馬 彰秀、筒井 真楠、谷口 正輝、ナノポアトラップ法による単一粒子識別、第 66 回応用物理学会春季学術講演会、2019 年 3 月 17 日、甲南大学岡本キャンパス

有馬 彰秀、筒井 真楠、谷口 正輝、ナノポアトラップ法による単一粒子の捕捉と識別、日本化学会 第 99 回春季年会 (2019)、2019 年 3 月 9 日、東京工業大学大岡山キャンパス

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ情報

<http://www.bionano.sanken.osaka-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。