

平成 21 年 4 月 17 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19750055

研究課題名（和文） 電気化学マイクロ培養デバイスによる細胞微小環境の制御と定量解析

研究課題名（英文） Micro-culture device for environmental condition control and quantitative electrochemical analysis

研究代表者

珠玖 仁 (SHIKU HITOSHI)

東北大学・大学院環境科学研究科・准教授

研究者番号：10361164

研究成果の概要：

我々はこれまでに、ベータ・ガラクトシダーゼ (β GAL) およびアルカリホスファターゼ (AP) をレポーター酵素とし、遺伝子発現の on/off により制御されるシグナル伝達の電気化学的追跡が可能であることを示した。本課題では、単一細胞レベルでの酵素活性検出を目標とする。これを実現するために、分泌型酵素を利用しレポーター酵素を膜外に分泌させ、大幅な感度の向上を目指す(分泌型 AP の適用)。電極・ウェルデザインの最適化により酵素反応生成物が効率的に電極に到達するよう検討を加える。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：チップ分析、電気化学、レポーター遺伝子、細胞培養

1. 研究開始当初の背景

我々は、微細加工技術と遺伝子組み換え技術を融合し、極微量の細胞(理想的には一細胞レベル)を対象としたハイ・スループットのバイオアッセイシステムを提案してきた。本研究では、遺伝子導入から機能評価までの一連の操作を連続的に行うことができる電気化学マイクロデバイスの構築をめざす。これまでに、電極集積型細胞培養デバイス、プラスミド DNA の細胞内導入デバイスの開発に成功した。デバイスは、単結晶シリコンに形

成したピラミッド形状貫通孔型ウェルアレイ、PDMS (poly(dimethylsiloxane)) 流路、および両者の積層により構成される。ウェル体積が極めて微小 (~ 20 nL) でありながら貫通孔を通じて良好な物質交換が実現されており、その効果は細胞長期間培養・遺伝子導入・電気化学応答性の向上に留まらず、細胞凝集体(スフェロイド)形成過程の自動化や複数薬剤の並列暴露を可能としている。

しかしながら現状では、我々の電気化学デバイスで追跡可能な検体数は 8~25 ch 程

度であった。蛍光・発光検出系細胞チップにおいて $10^3 \sim 10^6$ wells のスループットが報告されている世界動向を鑑みると、電気化学計測システムのスループット向上は研究分野の生存を賭けた緊急開発課題と位置づけることができる。さらに、ウェル内部の細胞・微生物の均一性を保証するためには、ウェル内部に存在する細胞が1個 (1 cell/well) あるいは1細胞由来のコロニー (1 colony/well) であることが望まれる。本研究では電気化学計測の利点を活かし、細胞培養環境の制御・リアルタイムモニタリングと定量的解析を試みる。

2006年度までに、PDMSの表面処理(酸素プラズマ処理・蛋白質吸着)に伴う酸素透過係数の減少、PDMS流路デバイス近傍の3次元酸素濃度プロファイルの可視化、種々デザインのマイクロウェルと細胞呼吸活性の関係を走査型電気化学顕微鏡(SECM)により定量した。SECMでは微小電極プローブを2次元・3次元的に走査し、局所の電気化学活性種の濃度プロファイルを可視化する。拡散方程式から酸素を始めとして様々な電気化学活性種の物質移動速度を定量的に解析できる。これに対し、本研究においては、煩雑なプローブ走査工程を省き、電極一体型デバイスの適用を前提として定量的解析を推進する。そのために、細胞サンプルの形状および電極-サンプル間の空間的配置(距離)を顕微鏡観察下で厳格に規定することが不可欠となる。その際、個々のデバイスにおける僅かな空間的配置のずれも考慮し、これまでにSECMで得られた拡散形態(球面・半球面・半円筒拡散など)や界面における物質透過係数に関する知見を定量的解析に反映させる。さらに同一細胞サンプルについてSECM測定と電極デバイス上での測定結果を精査・比較検討する。

2. 研究の目的

電気化学測定法の利点であるリアルタイムモニタリングと定量性に着目し、遺伝子-蛋白質発現過程を詳細に追跡する。レポーターとしてベータ・ガラクトシダーゼ(β GAL)とアルカリホスファターゼ(AP)を用いる。プラスミドDNAアレイを作製し、微生物系および動物細胞系において遺伝子導入をチップ上でを行い、実用を踏まえた電気化学レポーターセンシングシステムを構築する。本課題では、単一細胞レベルでの酵素活性検出を目標とする。これを実現するために、分泌型酵素を利用しレポーター酵素を膜外に分泌させ、基質および反応生成物の細胞内への取込み過程を省き、大幅な感度の向上を目指す(分泌型APの適用)。バイ・エンザイムシステムを適用し、2つの酵素反応を共役させて電流応答の増幅を試みる。電極・ウェルデザインの最適化により酵

素反応生成物が効率的に電極に到達するよう検討を加える。

3. 研究の方法

(1) デバイスデザインの最適化と定量解析を互いにフィードバックさせることにより、最終的にはウェル内部に存在する細胞が1個 (1 cell/well) および1細胞由来のコロニー (1 colony/well) でハイ・スループットなウェルアレイの構築をめざす。32x32=1024 wells のアレイデバイスとGFPなど蛍光性蛋白質発現系を用い、動物細胞・酵母における1 cell / wellおよび酵母・大腸菌における1 colony / wellの細胞播種条件と細胞占有率向上の最適条件を探索する。目的遺伝子を有する細胞のクローンを実現するためには、選択培養(含抗生物質培地中で~24時間培養)過程において死滅する細胞の割合も考慮しての条件出しが必要となる。

(2) レポーター遺伝子(β GAL)を導入した酵母を用い、電気化学的応答をリアルタイムで追跡する。これまで確立した電気化学顕微鏡(SECM)によるイメージング法、1細胞応答測定デバイス、PDMS細胞アレイに基づく密閉系電気化学測定法の電流応答を定量的に解析し、各手法ごとのAP活性の違いについて比較検討する。

(3) 微生物をモデルとして確立した、電気力学現象(誘電泳動、電気泳動)に基づく1細胞アレイ化技術を動物細胞系に応用し、8x8=64 wellsの1細胞アレイを構築する。電気化学顕微鏡または電極固定型チップデバイスにより、AP活性をリアルタイムで追跡する。レポーター遺伝子であるAPの上流に各種刺激応答性のプロモーター配列(転写因子結合配列)を有するプラスミドベクターを形質導入し、異種細胞をアレイ化した環境応答性1細胞アレイチップを構築する。AP活性は高pH下における電気化学計測において応答電流が大きく、培養条件(pH7.0)と異なるためリアルタイムモニタリングは6時間が限界となっている。そこで、マイクロ流体デバイスを設計し、培養スペースとAP活性定量スペースの分離を検討する。

4. 研究成果

PDMSマイクロウェルアレイにて β GAL遺伝子を導入した酵母を閉じ込め、蛍光発色基室に基づく酵素活性イメージングに成功した。走査型電気化学顕微鏡(SECM)の探針である微小電極をPDMSアレイ上部に押し当て密閉空間を形成すると、酵素反応生成物であるp-アミノフェノールがウェル内に蓄積され、電気化学応答の増幅が観測された。即ちSECMイメージング法と異なる高感度・密閉系電気化学測定法を確立した(図1)。

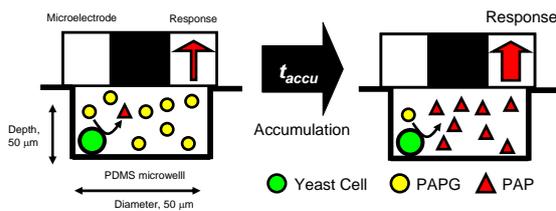


図 1 密閉系電気化学測定法

動物細胞系において、AP 遺伝子を有するプラスミドを導入したところ、HeLa 細胞株で最も発現効率が高く、電気化学応答を細胞レベルで検出可能であることを見出した。AP 遺伝子上流に転写因子結合配列を有するプラスミド8種類について、発光測定/電気化学測定に基づき、レポーター活性が最大となるよう刺激因子の種類と濃度を最適化した。ステンシル法により異種細胞をパターンニングした細胞チップを用いて、細胞シグナル伝達に基づく環境応答センシングシステムを構築した。

動物細胞系において、ウェルのサイズ、深さ、素材を検討し1細胞アレイを構築した。自然沈降に基づくランダムな配列化技術に加え、誘電泳動カ、電気泳動カに基づく1細胞配列を検討し、全てのケースで成功した。アルカリホスファターゼ (AP) 遺伝子を導入した HeLa 細胞株を用い、電気化学顕微鏡 (SECM) により、1細胞電気化学イメージングに成功した。一細胞ごとの応答を統計的に解析し、遺伝子導入細胞-非導入細胞間で有意差を確認した。NFκB 経路応答性のプラスミドを用いてサイトカイン刺激有無の比較で有意差を確認した。即ち本研究の目的は達成された。電気化学アレイデバイスでは10x10のウェルアレイに1細胞ずつランダムに播種し、100 検体の電気化学応答を僅か22秒で取得することができた。

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 6 件)

- ① H. Shiku, M. Takeda, T. Murata, U. Akiba, F. Hamada, T. Matsue, Development of Electrochemical Reporter Assay Using HeLa Cells Transfected with Vector Plasmids Encoding Various Responsive Elements, *Anal. Chim. Acta*, 640, 87-92 (2009). 査読有
- ② H. Shiku, S. Goto, S. Jung, K. Nagamine, M. Koide, T. Itayama, T. Yasukawa, T. Matsue,

Electrochemical Characterization of Enzymatic Activity of Yeast Cells Entrapped in a Poly(dimethylsiloxane) Microwell on the Basis of Limited Diffusion System, *Analyst*, 134, 182-187 (2009). 査読有

- ③ H. Shiku, T. Yamakawa, Y. Nashimoto, Y. Takahashi, Y. Torisawa, T. Yasukawa, T. Ito-Sasaki, M. Yokoo, H. Abe, H. Kambara, T. Matsue, A microfluidic dual capillary probe to collect messenger RNA from adherent cells and spheroids, *Analytical Biochemistry*, 385, 138-142 (2009). 査読有
- ④ C.-Y. Chang, T. Murata, Y. Takahashi, H. Shiku, H. -C. Chang, T. Matsue, Entrapment and Measurement of a Biologically Functionalized Microbead with a Microwell Electrode, *Lab Chip*, 2009, 9, 1185-1192 (2009). 査読有
- ⑤ Takahashi, T. Miyamoto, H. Shiku, R. Asano, T. Yasukawa, I. Kumagai, T. Matsue, Electrochemical Detection of Epidermal Growth Factor Receptors on a Single Living Cell Surface by Scanning Electrochemical Microscopy *Anal. Chem.*, 81 (7), 2785-2790 (2009). 査読有
- ⑥ C.-C. Wu, T. Saito, T. Yasukawa, H. Shiku, H. Abe, H. Hoshi, T. Matsue, Microfluidic chip integrated with amperometric detector array for in situ estimating oxygen consumption characteristics of single bovine embryos, *Sens. Actuat. B*, 125, 680-687 (2007). 査読有

[学会発表] (計 9 件)

- ① H. Shiku, Single-cell analysis based on scanning probe technique and electrochemical microdevice, 日本化学会第 89 回年会アジア国際シンポジウム, 日本大学理工学部舟橋キャンパス March 29, 2009. (招待講演)
- ② 珠玖 仁, 「一細胞採取および PCR 解析に基づくデジタル解析」第 8 回日本再生医療学会総会, 東京国際フォーラム, 東京都千代田区 March 5, 2009. (招待講演)
- ③ H. Shiku, Y. Takahashi, T. Murata, T. Matsue, Single-cell gene expression analysis based on scanning probe microscopy, IUMRS international conference in Asia 2008, Nagoya Congress Center, Nagoya, Dec. 12. 2008.
- ④ H. Shiku, "Scanning probe technique and electrochemical microdevice for single cell analysis" JAIST Nano Technology Symposium 2008, Ishikawa High-Tech Conference Center, Ishikawa, Oct. 23-25, 2008 (招待講演)
- ⑤ H. Shiku, SECM (scanning electrochemical microscopy) for single cell bioimaging, PRiME

2008, 214th Meeting of The Electrochemical Society, Honolulu, Hawaii(USA), Oct 16, 2008.

⑥H. Shiku, S. Goto, K. Nagamine, T. Yasukawa, T. Itayama, T. Matsue, Electrochemical Analysis of Yeast Cells Expressing Beta-Galactosidase within a Poly(dimethylsiloxane) Microwell Array, 5th Workshop on Scanning electrochemical Microscopy, Blue Mountain Lake, NY(USA), Aug. 24-28, 2008.

⑦珠玖 仁, 熊谷 絢子, 羅 紅群, 高橋 康史, 安川 智之, 山田 弘, 末永 智一, マイクロ・コンタクトプリンティング法におけるタンパク質パターンニング効率の電気化学的定量評価, 電気化学会第 75 回大会, 2008 年 3 月 28-30 日, 山梨大学

⑧珠玖 仁, 後藤 俊, チョン ソンボン, 長峯 邦明, 安川 智之, 末永 智一, 密閉系マイクロウェルアレイによる酵母の電気化学評価. 電気化学会第 75 回大会, 2008 年 3 月 28-30 日, 山梨大学

⑨H. Shiku, T. Yasukawa, T. Matsue, T. Ito-Sasaki, M. Yokoo, H. Abe, Oxygen Consumption of Mammalian Embryos and Oocytes Monitored by Scanning Electrochemical Microscopy, IEEE Sensors 2007, Atlanta Georgia USA Oct.28-31, 2007.

[図書] (計 1 件)

①H. Shiku, K. Nagamine, T. Kaya, T. Yasukawa, T. Matsue, *Bioelectrochemistry: fundamentals, experimental techniques, and applications*, Chapter 7, John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, UK. (Eds. P.N. Bartlett) p. 249-266, (2008).

[その他]

ホームページ等

<http://db.tohoku.ac.jp/whois/detail/acd9a15637a319e79930f9ff86a2b16c.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

珠玖 仁 (SHIKU HITOSHI)

東北大学・大学院環境科学研究科・准教授
研究者番号:10361164

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

