

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24681027

研究課題名(和文) 単一ヒト細胞核を含むピコリットル空間の1分子mRNAカウンティング

研究課題名(英文) A single mRNA counting by a microchamber array device containing a single human nucleus

研究代表者

加地 範匡 (Kaji, Noritada)

名古屋大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90402479

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒトの細胞(体積：数pL)と同程度の大きさを有するピコリットル空間内に、ヒトの細胞から単離した核を単一核レベルで封入し、転写されて核外へ輸送されてくるメッセンジャーRNA(mRNA)を100分子レベルで高精度にカウンティングできる新しいマイクロデバイスと解析法を確立した。これにより、これまで発現量が極めて低く見落とされていたmRNAも高精度な定量が可能となるため、超早期に細胞の分化やがん化などの検出が可能となることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this research, a microchamber array device was designed to capture a single cell, lyse a cell membrane, and isolate a single cell nucleus, and then mRNA in a single cell nucleus were directly quantitated by using highly sensitive In-Stem Molecular Beacons (ISMB). As a result, the expression of three frequently used house-keeping genes were successfully quantitated to an accuracy of 100 molecules within a single cell nucleus.

研究分野：ナノバイオテクノロジー

キーワード：ナノバイオ mRNA 細胞

1. 研究開始当初の背景

全く同じゲノム情報を有する細胞でも、その遺伝子発現過程(DNA→mRNA→タンパク質)は確率論的に起こるため、細胞内で発現する mRNA やタンパク質の量は細胞ごとに異なる。この遺伝子発現量、特に mRNA 転写量は、cDNA マイクロアレイや定量 PCR などにより定量されてきたが、検出感度の問題から、mRNA を増幅する作業が必要不可欠であった。この増幅過程は、塩基配列依存的な増幅バイアス(増幅率の偏り)を伴うことが知られており、正確な mRNA 転写量を反映していないという問題があった。昨年、検出感度の問題をマイクロデバイスを用いて克服した、単一細胞(大腸菌)からの網羅的定量トランスクリプトーム・プロテオーム解析が報告されたが、mRNA の定量に関しては古典的な FISH 法を用いており、低発現の mRNA も正確に定量が出来たとは言い難い。このように低発現の mRNA 定量法にはまだまだ問題があるため、早急な解決策が求められている。低発現の mRNA を高精度に検出できれば、生命機能の解明のみならず、幹細胞の分化や細胞のがん化、さらには疾病の発症を超早期に検出できる可能性があるため、世界中から大きな関心を集めており、医学・薬学分野、さらには解析に必要な試薬やデバイス開発の観点から生化学や分子生物学、工学分野でも熾烈な研究開発が進められている。

研究代表者はこれまでに、化学・生化学分析において半導体分野で培われてきた超微細加工技術をいち早く導入することで、従来の μ TAS(micro Total Analysis Systems)による DNA 解析法にナノパーティクルやナノ構造体を応用した新しい DNA 分離法を確立してきた。このナノ構造体を DNA 分離媒体として用いた研究においては、従来の高分子を用いる方法では困難であった長鎖 DNA の高速分離を可能とただけでなく、分離原理をナノ構造体の形状で制御できることを DNA の 1 分子ダイナミクスに基づいて明らかとした。また、ナノ空間では水の物性がバルク中とは異なり、直径 1 μ m 以下の精密に制御したナノ空間を利用することでタンパク質の活性を制御できるなど、従来法とは原理が異なる革新的な分析がナノバイオ技術により可能であることを実証してきた。さらに最近では、ナノ材料を用いた *in vivo* イメージング法など、超微細加工技術と 1 分子可視化技術を巧みに組み合わせた分析技術の開発を行ってきた。このような研究を通して、超微細加工技術で作製できるナノ空間場が、細胞の大きさ($\sim 10^{12}$ L)はもちろんのこと、ミトコンドリアのような細胞内オルガネラ($\sim 10^{18}$ L)と同程度のサイズであることに着想を得て、このナノ空間を擬似的な核や細胞として使うことはできないかと考えるようになった。研究代表者の 1 分子可視化技術を用いれば、蛍光分子 1 分子のリアルタイム検出も可能であることから、ひとつの核から転写され

る mRNA を 1 分子レベルでカウンティングする方法論を確立することができる。また、作製するマイクロデバイスは完全に孤立した閉鎖空間を有するため、これまでの単一細胞解析で生じていた細胞間相互作用を完全に無視して考えることができる。また、化学的・物理的外部刺激が自在に加えられたり、デバイスのまま MALDI-TOF-MS 解析に供せるなど、高精度な定性・定量分析法が構築できると考えた。

2. 研究の目的

1 分子 mRNA カウンティングを実現するためには、(1) 細胞内環境を再現したマイクロデバイスの構築、(2) 1 分子 mRNA の可視化技術、(3) 取得データの評価法、が鍵となる。これまでの生細胞を対象とした mRNA の定量においては、外部から蛍光プローブ(蛍光タグ付きオリゴヌクレオチド)を加える必要があったため、細胞を殺す(FISH 法)もしくは大きなダメージを与える(マイクロインジェクション)という問題点があった。そこで本研究では、核のみを単離した後、マイクロチャンバー内に閉じ込めて、細胞としては機能を失っている(死)が、細胞内の生化学反応は継続している(生)実験系を作り出せることを実証することを目的とした。また、マイクロチャンバーを用いることで生成される蛍光シグナルの検出感度(S/N)が向上することから、mRNA の蛍光ラベル化法の最適化により、1 分子レベルでのカウンティングを高精度かつ長時間にわたって可能とする技術を確立し、さらに得られたデータの評価法を確立することで、これまでの解析では不可能であった、細胞内で数コピーしか発現していないような mRNA の発現を、経時的に定量評価できる解析法を実現することを最終目的とした。

3. 研究の方法

本研究目的を達成するために、初年度は(1) 壁面への吸着を抑制するマイクロチャンバーのコーティング法、(2) 核のマイクロチャンバーへの封入法と細胞内環境の再現のために必要とされるデバイスの構築を進めることとした。次年度は、低発現 mRNA を経時的に定量するために、(3) 1 分子 mRNA の定量的可視化法、(4) 1 分子 mRNA の経時的可視化法、といった可視化技術を検討を進めることとした。最終年度は、これまで構築してきた実験系を用いたデータ取得とその解析・評価を行い、必要なデータマイニング法を構築することで、1 分子 mRNA カウンティング法を確立することとした。

4. 研究成果

(1) マイクロチャンバーへの単一細胞の導入

細胞懸濁液をデバイスに滴下することで単一細胞、単一細胞核を封入する手法を確立した。マイクロチャンバーデバイスは、シクロオレフィンポリマー(Cycloolefinpolymer, COP)基板に反応性イオンエッチングによっ

て直径 20 μm 、深さ 30 μm の円筒形のチャンバーを作製した。このマイクロチャンバーデバイスに O_2 プラズマを照射して表面を親水化し、PBS に浸漬して超音波洗浄を行った。その後、PBS に懸濁した HeLa 細胞の PBS 懸濁液 (1.0×10^6 個/mL) を滴下し、15 分間静置することによって細胞をデバイス表面に沈降させた。その後チャンバー外の細胞を PBS によって洗い流した。マイクロチャンバーデバイスの表面を親水処理することで細胞懸濁液をデバイス全体に均一に滴下することが出来るようになった。チャンバーの直径が細胞の大きさ (直径約 15 μm) 同程度の大きさのため、チャンバー内には単一細胞が導入された。また、チャンバーの深さが 30 μm であるために洗浄の際に細胞が洗い流されずチャンバー内部にとどまった。このようにしてマイクロチャンバー内部に単一細胞が導入された。本手法を用いて、全マイクロチャンバーの 70% に単一細胞を導入することに成功した。単一細胞が導入されたマイクロチャンバーデバイスを共焦点顕微鏡によって観察した。一視野中には 1458 個のチャンバーが存在しており、導入した細胞の細胞核を SYTO16 によって染色した。チャンバー領域内部の蛍光強度からヒストグラムを作製し、全チャンバーの約 70% に細胞が導入されていることがわかった。また、明視野像から複数の細胞が導入されているチャンバーは全体の約 5% であることもわかった。

(2) マイクロチャンバー内部への単一細胞核の封入

マイクロチャンバー内部において細胞から細胞核の抽出を行うことによって約 35% のチャンバー内部に単一細胞核を封入することに成功した。前述の手法で単一細胞をマイクロチャンバー内部に導入し、細胞核抽出液を滴下し 10 分間静置した。その後、PBS によってデバイスを 2 回洗浄することによってチャンバー内部に細胞核を封入した。細胞膜を FM1-34、細胞核を SYTO16 でそれぞれ染色し、共焦点顕微鏡によって観察した。また、細胞核抽出液導入後の蛍光像がそれぞれ図 3c と 3d である。細胞核抽出液導入前では細胞膜由来の蛍光と細胞核由来の蛍光が確認でき細胞の形状が保たれていることがわかった。細胞核抽出液導入後は細胞核由来の蛍光は残存しているが細胞膜由来の蛍光が消失している。このことから、細胞核抽出液によって細胞膜が消失したが、細胞核は残存しており、チャンバー内部での細胞核の抽出に成功したと言える。またチャンバー内部の細胞核由来の蛍光強度からヒストグラムを作成した。この結果から、35% のマイクロチャンバーに単一の細胞核が封入されていることがわかった。細胞導入率が 70% であるのに対し、細胞核として残存した細胞核が 35% である理由としては、細胞核抽出液を含め溶液の交換を 3 回行っていること、細胞核は 10 μm ほどの大きさであり、溶液交換の際

に流出したことが考えられる。また、細胞核の封入率が 35% であることについて、低倍率観察におけるの一視野には 1458 個のチャンバーが存在しており、約 500 個の細胞核を同時に観察できるという点から十分な残存率であると言える。

(3) 単一細胞核由来 mRNA の検出

本研究では、マイクロチャンバー内部に封入した細胞核に含まれる mRNA 検出、定量するために、蛍光を利用したモレキュラービーコン法を用いた。モレキュラービーコンは mRNA などの核酸を標識する際に用いられる 20~30 塩基ほどの小さな一本鎖 DNA に蛍光分子と消光分子を修飾し、分子が二次構造をとるとき消光分子により蛍光分子が消光されるよう設計されたものである。このモレキュラービーコンが目的の配列にハイブリダイズしたときに分子の二次構造が解かれ、蛍光が復活する。これを検出することで目的の配列の検出、定量を行うことが出来る。本研究で用いたモレキュラービーコンは一般的なモレキュラービーコンと比べて消光効率が高く、シグナルノイズ比 (S/N 比) が高くなっている。

10 nM のモレキュラービーコン溶液を用いることで、マイクロチャンバー内部における細胞核由来 mRNA を検出することに成功した。細胞核抽出溶液を導入し洗浄した後に、それぞれ 100 nM、10 nM、1 nM に調製したモレキュラービーコン溶液 100 μL をデバイスに滴下し、カバーガラスをかぶせ共焦点顕微鏡にて観察した。細胞核が導入されているかどうかを明視野像から判別し、それぞれの濃度においてチャンバー領域の蛍光強度からヒストグラムを作成した。この結果から、100 nM においては、細胞核が導入されたチャンバーと導入されていないチャンバーの蛍光強度のピークが分離できておらず、細胞核由来の mRNA を検出できたと言いはない。10 nM においては蛍光強度のピークが分離されており、細胞核内の mRNA を検出できたと言える。1 nM においては細胞核が導入されているチャンバーと導入されていないチャンバーの蛍光強度に差が見られず、mRNA 検出を行うことが出来なかった。10 nM において mRNA 検出が可能であることがわかった。

(4) 単一細胞核内 mRNA の定量

チャンバー内部の蛍光強度とモレキュラービーコンの分子数の関係から検量線を作成し細胞核内の数百から数千分子の mRNA を定量することに成功した。マイクロチャンバー内部にモレキュラービーコンと対応した配列を持つカスタムオリゴを導入した。導入したモレキュラービーコン溶液の濃度からチャンバー内部のモレキュラービーコンの分子数を算出し、チャンバー内部の蛍光強度と比較することでチャンバー内部の mRNA 分子数を定量した。モレキュラービーコンと対応したカスタムオリゴを混合した溶液 (以下蛍光溶液とする) をそれぞれ 10 nM、

5 nM、1 nM の濃度において蛍光強度を測定し、検量線を作成した。また、マイクロチャンネルデバイス内部の細胞核に対してモレキュラービーコンを導入し、細胞核から得られる蛍光強度より細胞核内部の mRNA を定量した。細胞核内部に存在する GAPDH の mRNA の分子数は数千分子程度であることから細胞核内部の mRNA を定量することに成功したといえる。

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 11 件)

1. Yasaki, D. Onoshima, T. Yasui, H. Yukawa, N. Kaji, Y. Baba, Microfluidic transfer of liquid interface for parallel stretching and stamping of terminal-unmodified single DNA molecules in zigzag-shaped microgrooves, *Lab Chip*, 15, 135-140 (2015) DOI: 10.1039/c4lc00990h
2. S. Rahong, T. Yasui, T. Yanagida, K. Nagashima, M. Kanai, G. Meng, Y. He, F. Zhuge, N. Kaji, T. Kawai, Y. Baba, Self-assembled Nanowire Arrays as Three-dimensional Nanopores for Filtration of DNA Molecules, *Analytical Sciences*, 31, 153-157 (2015) DOI: 10.2116/analsci.31.153
3. H. Yukawa, S. Nakagawa, Y. Yoshizumi, M. Watanabe, H. Saito, Y. Miyamoto, H. Noguchi, K. Oishi, K. Ono, M. Sawada, I. Kato, D. Onoshima, M. Obayashi, Y. Hayashi, N. Kaji, T. Ishikawa, S. Hayashi, Y. Baba, Novel positively charged nanoparticle labeling for in vivo imaging of adipose tissue-derived stem cells, *PLoS ONE*, 9, e110142 (2014) DOI: 10.1371/journal.pone.0110142
4. S. Rahong, T. Yasui, T. Yanagida, K. Nagashima, M. Kanai, A. Klamchuen, G. Meng, Y. He, F. Zhuge, N. Kaji, T. Kawai, Y. Baba, Ultrafast and wide range analysis of DNA molecules using rigid network structure of solid nanowires, *Sci Rep*, 4, 5252 (2014) DOI: 10.1038/srep05252
5. H. Yukawa, K. Suzuki, Y. Kano, T. Yamada, N. Kaji, T. Ishikawa, Y. Baba, Induced Pluripotent Stem Cell Labeling Using Quantum Dots, *Cell Medicine*, 6, 83-90 (2013) DOI: 10.3727/215517913x674270
6. T. Yasui, S. Rahong, K. Motoyama, T. Yanagida, Q. Wu, N. Kaji, M. Kanai, K. Doi, K. Nagashima, M. Tokeshi, M. Taniguchi, S. Kawano, T. Kawai, Y. Baba, DNA manipulation and separation in sublitographic-scale nanowire array, *ACS Nano*, 7, 3029-3035 (2013) DOI: 10.1021/nn4002424
7. T. Yasui, K. Motoyama, N. Kaji, M. Tokeshi, Y. Baba, Enzyme-catalysed reaction for long-term fluorescent observation of single

DNA molecules, *RSC Advances*, 3, 3237-3240 (2013) DOI: Doi 10.1039/C3ra22999h

8. T. Yasui, N. Kaji, Y. Okamoto, M. Tokeshi, Y. Horiike, Y. Baba, Nanopillar array chip integrated with on-line stacking for fast DNA separation with high sensitivity and high resolution, *Microfluidics and Nanofluidics*, 14, 961-967 (2013) DOI: DOI 10.1007/s10404-012-1103-7
9. M. Horade, M. M. Kanaoka, M. Kuzuya, T. Higashiyama, N. Kaji, A microfluidic device for quantitative analysis of chemoattraction in plants, *RSC Advances*, 3, 22301-22307 (2013) DOI: Doi 10.1039/C3ra42804d
10. T. Yasui, N. Kaji, Y. Baba, Nanobiodevices for biomolecule analysis and imaging, *Annual review of analytical chemistry*, 6, 83-96 (2013) DOI: 10.1146/annurev-anchem-062012-092619
11. K. Kitazoe, Y. S. Park, N. Kaji, Y. Okamoto, M. Tokeshi, K. Kogure, H. Harashima, Y. Baba, Fabrication of functionalized double-lamellar multifunctional envelope-type nanodevices using a microfluidic chip with a chaotic mixer array, *PLoS ONE*, 7, e39057 (2012) DOI: 10.1371/journal.pone.0039057

[学会発表] (計 23 件) (全て査読有)

1. 小山諒, 加地範匡, 安井隆雄, 馬場嘉信, マイクロウェルを用いた単一細胞解析法の開発, 日本化学会 第 95 春季年会 (2015/3/26) 千葉
2. 加地範匡, 安井隆雄, 馬場嘉信, ナノ流路を用いた単一分子解析技術, 先端ナノデバイス・材料テクノロジー第 151 委員会 ナノバイオフィュージョン分科会 第 7 回合同研究会 (2015/3/16) 東京
3. N. Kaji, T. Yasui, Y. Baba, DNA separation by nanopillars and nanowires, International workshop on extended-nano fluidics (2015/3/27) Tokyo
4. 孫曉寅, 加地範匡, 安井隆雄, 馬場嘉信, ナノ流路における DNA 速度制御法の開発, 日本分析化学会第 63 年会 (2014/9/19) 広島
5. 加地範匡, 安井隆雄, 馬場嘉信, ナノピラー、ナノワイヤ、ナノスリットによる統合型核酸解析デバイスの開発, 第 21 回クロマトグラフィーシンポジウム (2014/6/6) 名古屋
6. 加地範匡, ナノ構造体を用いたナノバイオデバイスの研究開発, 第 18 回 VBL シンポジウム (2014/11/17) 名古屋
7. 加地範匡, ナノワイヤデバイスによるバイオ分析～ナノポア DNA シーケンシングのための核酸前処理行程の開発～, ナノバイオ国際共同研究教育拠点 第 3 回若手国内シンポジウム NanoBio 第 7 回若手

- ネットワークングシンポジウム (2014/6/13) 福岡
8. Q. Wu, T. Yasui, S. Rahong, T. Yanagida, M. Kanai, N. Kaji, M. Tokeshi, K. Nagashima, T. Kawai, Y. Baba, A Millisecond Micro-RNA Extraction Technique for Nanopore-based Nucleic Acids Sequencing, The 18th International Conference on Miniaturized System for Chemistry and Life Sciences (uTAS2014) (2014/10/29) San Antonio, Texas
 9. N. Kaji, Y. Baba, Nanobioceives for single DNA and cell analysis, The 18th International Conference on Miniaturized System for Chemistry and Life Sciences (uTAS2014) (2014/10/29) San Antonio, Texas
 10. N. Kaji, Y. Baba, Nanowires, Nanopillars, and Nanoslits as a Pretreatment Tool for Nanopore-based DNA Sequencing, 4th Annual Next Generation Sequencing and 2nd Annual Single Cell Genomics Asia Congress (2014/10/7) Singapore
 11. N. Kaji, Y. Baba, Nano- and Quantum-biodesives for Cancer Diagnosis, Cancer Therapy, and iPS Cell Based Regenerative Medicine, Advances in Microfluidics and Nanofluidics (AMN2014) (2014/5/21) Taipei
 12. N. Kaji, T. Yasui, Y. Baba, Rapid fabrication and purification of multifunctional envelope-type gene delivery nanodevices by microfluidic devices, 8th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2014) (2014/12/5) Matsuyama, Ehime
 13. N. Kaji, T. Yasui, Y. Baba, A Single DNA Manipulation and Analysis in Nanofluidic Devices, Advances in Microfluidics and Nanofluidics (AMN2014) (2014/5/21) Taipei
 14. N. Kaji, Q. Wu, T. Yasui, Y. Baba, Nanopillar chips for a Millisecond DNA and RNA separations, 14th Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separations and Analysis (APCE2014) (2014/12/8) Kyoto
 15. 加地範匡, 小山諒, 安井隆雄, 馬場嘉信, マイクロチャンバーを用いた単一核解析法の解析, 日本分析化学会第 62 年会 (2013/9/12) 大阪
 16. 加地範匡, 安井隆雄, 馬場嘉信, ナノバイオデバイスによる単一生体分子解析, 第 7 回バイオ関連化学シンポジウム (2013/9/27) 名古屋
 17. 加地範匡, ナノワイヤデバイスによるバイオ分析, ナノバイオ国際共同研究教育拠点 第 2 回若手国内シンポジウム NanoBio 第 6 回若手ネットワークングシンポジウム (2013/6/14) 富山
 18. T. Naito, N. Kaji, Y. Baba, A new design of microfluidic components for bioanalysis, 5th International symposium on microchemistry and microsystems (ISMM2013) (2013/5/18) Xiamen, CHINA
 19. N. Kaji, High speed and highly sensitive biomolecule measurements by nanopillar- and nanopore-based nanobiodevices, 17th KAST International Symposium on "The Multi-Omics and Nano Biotechnology for Human Disease Research" (2013/11/26) Seoul
 20. N. Kaji, T. Yasui, Y. Baba, Micro and Nanochamber Array Chip for a Single Cell, Nucleus, and Protein Analysis, International Conference on Small Science (ICSS 2013) (2013/12/16) Las Vegas, NV
 21. N. Kaji, Y. Baba, Nanobiodevices-based single biomolecule and single cell analysis for cancer diagnosis/therapy and stem cell therapy LAB-ON-A-CHIP ASIA 2013 (2013/11/13) Singapore
 22. 加地範匡, “大きな技術”で小さな生体分子を視る・操る, さかえサイエンストーク (2012/10/1) 名古屋
 23. N. Kaji, Y. Baba, Micro- and Nanofabricated Structures on a Chip for Biomolecule Analysis in Artificial Intracellular Environments, ISMM2012 (2012/6/11) Hsinchu, Taiwan
- [図書] (計 4 件)
1. M. F. Serag, N. Kaji, M. Tokeshi, Y. Baba, Carbon Nanotubes and Modern Nanoagriculture, *Nanotechnology and Plant Sciences* (Siddiqui, M. H., Al-Whaibi, M. H., and Mohammad, F., Eds.), Springer. 183-201, (2015)
 2. 加地範匡, 安. 隆雄, 馬場嘉信, ナノ流路を用いた単一分子解析技術, *ぶんせき*, 日本分析化学会. 348-354, (2014)
 3. 加地範匡, 渡慶次学, 馬場嘉信, 超解像蛍光顕微鏡の開発, *現代化学*, 東京化学同人. 31-34, (2014)
 4. 加地範匡, 精密にサイズ制御したナノ空間内での分析化学, *化学と教育*, 日本化学会. 290-291, (2013)
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 1 件)
- 名称: 電気測定用チップ、及び電気測定装置
発明者: 矢崎啓寿、安井隆雄、加地範匡、川合知二、柳田剛、馬場嘉信
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2014-214090
出願年月日: 2014 年 10 月 20 日
国内外の別: 国内
- 取得状況 (計 0 件)
- [その他]
ホームページ
<http://www.apchem.nagoya-u.ac.jp/III-2/baba-ken/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

加地 範匡 (Noritada Kaji)

名古屋大学大学院工学研究科 化学・生物

工学専攻 応用化学分野、准教授

研究者番号：90402479