

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23115002

研究課題名（和文）細胞内分子数を定数解析するデバイスの開発 - 少数生体分子の計数化技術 -

研究課題名（英文）Development of novel methods for single cell quantification with microdevices

研究代表者

野地 博行 (Noji, Hiroyuki)

東京大学・工学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：00343111

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 144,200,000円

研究成果の概要（和文）：東大・野地Gは、フェムトリットルチャンバ - を用いたデジタル計測法を開発し、高感度にターゲット分子を定量する手法を確立した。これにより超高感度なデジタルELISA法を開発した。またウイルスの絶対定量法も確立し、全ウイルス中のうち感染能を有するものが数%しか無いことを明らかとした。理研・渡邊Gは、生細胞中のタンパク質分子を1分子計測するための独自の超解像イメージング技術と、細胞状態を計測するためのプローブ開発を行った。その結果、多波長1分子イメージングや二次的非線形散乱光を用いた非標識型タンパク質構造状態イメージング技術、そして細胞内タンパク質濃度を決定する蛍光プローブタンパク質の開発に成功した。

研究成果の概要（英文）：Noji group in the University of Tokyo aimed to develop novel digital counting quantification methods with single-molecule or single-particle sensitivity by use of femtoliter chamber array device. Digital ELISA with unprecedentedly high sensitivity was established and applied for counting of absolute numbers of protein molecules expressed in single cells. Digital Virus counting method was also developed that revealed the only a few % of total virus population possess the capability of infection. Watanabe group in Riken developed novel imaging methods for protein quantification such as multicolor single-molecule imaging method and fundamental intracellular parameters that represent whole cellular activities such as total protein abundance and gross protein diffusion coefficient.

研究分野：1分子生物物理、マイクロデバイス、バイオイメージング

キーワード：1分子生物物理 マイクロデバイス 超解像顕微鏡 蛍光プローブ

1. 研究開始当初の背景

1 分子生物物理的計測、定量的細胞計測の発展により、分子集団もしくは細胞集団において、ごく少数の成分(small number)、もしくは極めて低い割合でしか存在しない成分(minority)がシステム全体(分子システム・細胞・組織等)の運命や性質に決定的な役割を担う事例が発見されつつある。我々はこれを「少数性問題」と呼ぶ。しかし、少数性問題の多くは技術的な問題のため未開拓の状態にあり、その性質やそのような特徴が生まれてくるメカニズムの解明は進んでいない。

2. 研究の目的

そこで、本プロジェクトでは、上記の技術的問題を克服することを目的とし、1細胞を解析する技術開発に取り組んだ。特に、1つの細胞中に存在するタンパク質分子の絶対定量に資する技術や、分子もしくは細胞状態を定量計測する技術を開発することで、**small number issue, minority issue**を解明しうる技術的基盤の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) 上記技術開発を達成するために、東大・野地グループは主として独自の超微小溶液チャンバー技術を用いたデジタル計測技術の開発、理研・渡辺グループは非線形光学技術を用いた生細胞イメージング技術の開発に取り組んだ。これら、独立したプロジェクトと並行して、共同で1細胞が分泌するペプチド成分の計測技術など、2つのグループが連携しないと達成しない課題にも取り組んだ。野地グループの技術は、ターゲット分子に遺伝的にタグをつける必要がないが細胞を一旦破碎する必要がある侵襲的手法で、渡辺グループが主として開発するのは遺伝的タグを必要とするが生細胞を用いることができる非侵襲的手法である。そのため、本新学術領域の様々なニーズに対応できる相補的な関係と言える。具体的な項目は以下のとおり。

- ①. 1 分子デジタル計測技術を用いた少数分子計測技術の開発; ここではターゲット分子・粒子そのもの、もしくはターゲット分子に抗体等を介して結合させたプローブ酵素分子の「数」を定量する技術を開発した。酵素の分子の存在は、**fluorogenic** 基質とともに微小チャンバー中に確率的に1分子単位で封入し、チャンバー中に蓄積される蛍光性反応生成物の有無から判断した。
- ②. 非線形光学技術を用いた生細胞イメージング技術; 細胞の特徴を記述するには、1種類ではなく、少なくとも複数種類のタンパク質分子の絶対数を決定する必要がある。そこで、多色かつハイスループットに1分子計測する技術開発を行った。また、二次散乱光を利用した蛍光標識を必要としない蛋白質構造状

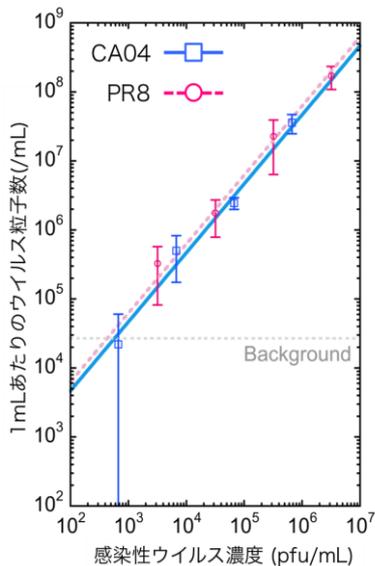
態計測技術にも取り組んだ。

- ③. 蛍光プローブを用いた細胞状態計測; 野地グループ、渡辺グループともに蛍光プローブ開発とその利用でも実績がある。ここでは、細胞の「状態」を評価するATP濃度や、蛋白質総濃度を定量する技術の開発にも取り組んだ。
- ④. 野地グループと渡辺グループの共同研究; 野地グループが有する微小溶液チャンバー技術と、渡辺グループが有する微量サンプル質量分析技術を融合させた技術開発にも取り組んだ。ここでは、免疫細胞が分泌するペプチド成分の1細胞計測に取り組んだ。

4. 研究成果

- (1) ①. 1 分子デジタル計測技術を用いた少数分子計測技術の開発; まず、抗体を用いた蛋白質の絶対定量を可能とするために1分子単位のデジタルELISA法を確立した(Lab on a chip 2012)。また、1分子単位ではないが、ヒト細胞中に発言している蛋白質を1細胞単位で計測するデバイス技術も開発した(Lab on chip 2013)。さらに、これを1細胞計測に拡張し、するため、モデル酵素(β ガラクトシダーゼ)の絶対数を大腸菌とヒトリンパ腫由来細胞(U937)に関して1細胞毎に計測した。その結果、大腸菌に関しては平均713個(非発現誘導時)、U937細胞に関しては平均60万分子という値を得ている。

公募班の大場らと共同で、インフルエンザ1粒子計測技術を確立した。その結果、1mLあたり10感染性ウイルス粒子程度しかない試料でもウイルスの有無を判別できる技術を確立した。このとき、感染性ウイルス数は並行して行った培養細胞を用いた系で決定したが、デジタル計数で検出されたウイルス数は常にその数十倍あった。当初、これは我々の試料の取り扱いに問題があり、ウイルスが失活したためと考えたが、調整直後のウイルス試料を一切凍結等の処理をしないで数時間以内で計測しても同様の結果を得た。これは、本来ウイルス粒子はすべてが感染性を持つわけではなく、ごく数%しか感染能を持たないことを意味する。大場らのグループは、細胞イメージングによってウイルス粒子は複数で1つの宿主細胞に結合し、共同で感染を確立するという観察結果を得ている。これらを合わせて考えると、インフルエンザウイルスは、細胞内では1粒子で感染を成立させる戦略ではなく、複数で強調して感染を成立させる戦略をとっているとうこれまでの常識を覆す仮説が導きだされた(投稿準備中)。

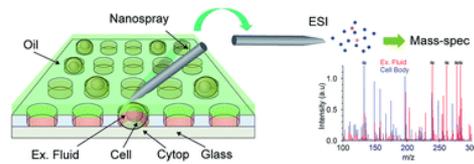


上図：感染性ウイルス数（横軸）とデジタル分析によるインフルエンザ粒子数（縦軸）。CA04, PR8 はそれぞれインフルエンザの株名。

- ②. 非線形光学技術を用いた生細胞イメージング技術; Qdot を用いて複数種類の分子を同時にナノ計測する技術を開発した (*Biomedical Optics Express accepted*)。また、第二次高調波顕微鏡を開発し、線維状蛋白質の構造状態を1本単位で検出する系を開発し、予想外の協同的構造変化の計測に成功した (投稿準備中)。その他、A01-2 班の永井グループと共同で蛍光タンパク質を用いた超解像イメージング技術の開発にも成功した。
- ③. 蛍光プローブを用いた細胞状態計測; 野地グループは、バクテリア細胞に適した FRET に依存しない蛍光性 ATP プロブ蛋白質 (BQueen) の開発に成功し、バクテリア細胞毎の ATP 分布計測に成功した (*Sci. Rep.* 2014)。その結果、合成培地中で連続培養時には ATP 濃度は 1mM から 10mM 近くまで分布していることに加え、その分布の形は正規分布ではなく非対称性を持つものであることを明らかとした。また、培養条件によってその分布の形状が変化することも明らかとなった。渡辺グループは、溶液の蛋白質濃度という非常に普遍的な細胞特徴を定量する蛍光プローブ蛋白質の開発に成功した (*Sci. Rep* 2016)。これによって、細胞周期や細胞活動と連動した細胞内タンパク質濃度ダイナミクスの1細胞計測が可能となった。
- ④. 野地グループと渡辺グループの共同研究; 野地グループが有する微小溶液チャンパー技術と、渡辺グループが有する微量サンプル質量分析技術を融合させた技術を開発した。その結果、免疫細胞が分泌するペプチド成分の1細胞計測に成功し、分泌性ペプチドの成分の時間変化や細胞毎の特性評価に成功した (*RSC*

Adv. 2015)

上図：野地 G と渡辺 G が共同で行った分泌ペプチド1細胞計測技術の模式図。一定時間毎に細胞を封入したチャンパー溶液を一部回収し質量分析を行う。



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 65 件)

- ① Kakizuka, T., Ikezaki, K., Kaneshiro, J., Fujita, H., Watanabe, T. M., and Ichimura, T. (2016). Simultaneous nano-tracking of multiple motor proteins via spectral discrimination of quantum dots. *Biomedical Optics Express*. accepted.
- ② Morikawa, T. J., Fujita, H., Kitamura, A., Horio, T., Yamamoto, J., Kinjo, M., Sasaki, A., Machiyama, H., Yosizawa, K., Ichimura, T., Imada, K., Nagai, T., Watanabe, T. M. (2016). Dependence of fluorescent protein brightness on protein concentration in solution and enhancement of it. *Scientific Reports* 6, 22342.
- ③ Kaneshiro, J., Watanabe, T. M., Fujita, H., and Ichimura, T. (2016). Full control of polarization state with a pair of electro-optic modulators for polarization-resolved optical microscopy. *Applied Optics*. 55, 1082-1089.
- ④ Watanabe, R., Soga, N. and Noji, H. (2016). Novel nano-device to measure voltage-driven membrane transporter activity. *IEEE Transactions on Nanotechnology*. 15, 70-73.
- ⑤ Li, C. B., Ueno, H., Watanabe, R., Noji, H. and Komatsuzaki, T. (2015). ATP hydrolysis assists phosphate release and promotes reaction ordering in F1-ATPase. *Nature Communications*. 6, 10223.
- ⑥ Obayashi Y., Iino R., Noji H. (2015). A single-molecule digital enzyme assay using alkaline phosphatase with a coumarin-based fluorogenic substrate, *Analyst*, 140, 5065-5073.
- ⑦ Soga N., Watanabe R. and Noji H. (2015).

Attolitre-sized lipid bilayer chamber array for rapid detection of single transporters, *Scientific Reports*, 5, 11025.

⑧Watanabe R, Soga N, Yamanaka T and Noji H (2014). High-throughput formation of lipid bilayer membrane arrays with an asymmetric lipid composition. *Scientific Reports*, 4:7076, 1-6.

⑨Yaginuma H, Kawai S, Tabata KV, Tomiyama K, Kakizuka A, Komatsuzaki T, Noji H and Imamura H, (2014). Diversity in ATP concentrations in a single bacterial cell population revealed by quantitative single-cell imaging. *Scientific Reports*, 4:6522, 1-7.

⑩Watanabe R, Soga N, Fujita D, Tabata KV, Yamauchi L, Kim SH, Asanuma D, Kamiya M, Urano Y, Suga H and Noji H, (2014). Arrayed Lipid Bilayer Chambers Allow Single-Molecule Analysis of Membrane Transporter Activity, *Nature Communications*, 5:4519, 1-8.

⑪ Ichimura, T., Jin, T., Fujita, H., Higuchi, H., and Watanabe, T. M. (2014). Nano-scale measurement of biomolecules by optical microscopy and semiconductor nanoparticles. *Frontiers in Physiology*. fphys.2014.00273, 10. 3389.

⑫Fujita, H., Esaki, T., Masujima, T., Hotta, A., Kim, S.-H., Noji, H., and Watanabe, T. M. (2015). Comprehensive chemical secretory measurement of single cells trapped in a micro-droplet array with mass spectrometry. *RSC Advances*. 5, 16968-16971.

⑬Watanabe, T. M., Imada, K., Yoshizawa, K., Nishijima, M., Kato, C., Abe, F., Morikawa, T. J., Kinoshita, M., Fujita, H., and Yanagida, T. (2013). Glycine Insertion Makes Yellow Fluorescent Protein Sensitive to Hydrostatic Pressure. *PLoS ONE*. 8(8), e73212.

⑭Watanabe, T. M., Fujii, F., Jin, T., Umemoto, E., Miyasaka, M., Fujita, H., and Yanagida, T. (2013). Four-Dimensional Spatial Nanometry of Single Particles in Living Cells Using Polarized Quantum Rods. *Biophysical Journal*. 105(3), 555-564.

⑮Kim SH, He X, Kaneda S, Kawada J, Fourmy D, Noji H and *Fujii T (2013). Quantifying genetically inserted fluorescent protein

in single iPS cells to monitor Nanog expression using electroactive microchamber arrays. *Lab on a Chip*, 14, 730-736.

[学会発表] (計 27 件)

①渡邊朋信、散乱光を用いた生体計測、レーザー学会第 36 回年次大会、名古屋、2016 年 1 月 10 日

②Noji H, Single molecule analysis of transporter protein with arrayed lipid bilayer chamber, Pacific Chem, (Hawaii, US) 2015/12/18

③ Noji H, Redesigning of F1-ATPase, Pacific Chem, (Hawaii, US) 2015/12/15

④ Tomonobu M Watanabe, Single cell Non-invasive spectroscopy, 2nd International Symposium on Nanomedicine Molecular Science, Tokyo, 11/24/2015

⑤ Tomonobu M Watanabe, Development of imaging technology to detect intracellular physical parameters, THE HONG KONG UNIVERSITY OF SCIENCE & TECHNOLOGY Joint Seminar, Hong Kong, 9/25/2015

⑥Noji H, Single molecule biophysics of ATP synthase and digitalization revolution of bioassay, POSTECH seminar, POSTECH(Pohang University of Science and Technology, Korea) 2015/9/24

⑦市村垂生、垣塚太志、池崎圭吾、金城純一、藤田英明、渡邊朋信、波長分離による複数分子ナノ追跡、第 56 回応用物理学会年会、2015 年 9 月 13 日～2015 年 9 月 16 日、名古屋国際会議場

⑧渡邊朋信、『単一』にこだわる計測技術開発、新学術領域 超高速バイオアセンブラ第 4 回若手シンポジウム、2015 年 7 月 3 日

⑨渡邊朋信、細胞と細胞集団との多層にまたがる状態遷移の定量解析、第 67 回日本細胞生物学会大会、東京、2015 年 7 月 1 日

⑩渡邊朋信、蛍光ゆらぎ相関計算に基づく超解像法、日本顕微鏡学会第 71 回学術講演会、京都、2015 年 5 月 15 日

⑪市村垂生、Liang-da Chiu、藤田克昌、渡邊朋信、藤田英明、ラマン散乱顕微鏡による細胞状態遷移の一細胞計測、日本顕微鏡学会第 71 回学術講演会、2015 年 5 月 13 日～2015 年 5 月 15 日、国立京都国際会館

⑫Noji H, Single-molecule biophysics on ATP synthase, 2014 International Biophysics Congress (IUPAB2014), Brisbane Convention & Exhibition Centre (Brisbane, Australia), 2014/8/7. (Keynote lecture),

⑬ Noji H, Arrayed Lipid Bilayer Chamber for single-molecule analysis of transporters, European Bioenergetics Conference (EBEC2014), Faculdade de Ciências(Lisbon, Portugal), 2014/7/13.

⑭ Noji H, Single-Molecule Digital ELISA and Prospects of its Applications, World Lecture Series on Micro/Nanofluidics, Keio University (Kanagawa, Japana), 2014/7/2.

⑮ Noji H, Torque generation mechanism of F1-ATPase, Tokyo ATPase Workshop (TAW), The University of Tokyo (Tokyo, Japan), 2014/6/2

⑯ Noji H, Recent advances of Single molecule biophysics of ATP synthase, The 8th International Conference on Advanced Mateials and Device (ICAMD2013), Ramada Plaza Jeju Hotel (Korea), 2013/12/12

⑰ Noji H, Novel single-molecule systems to monitor the rotary dynamics and proton-pumping of FoF1-ATP synthase, ITALY IN JAPAN 2013 WORKSHOP (Methods for the investigation of ion transport machinery in biological Membranes), Istituto Italiano di Cultura (Tokyo JAPAN), 2013/10/16

⑱ Noji H, Single-molecule digital counting with femtoliter chamber array, International Symposium on Nanomedicine Molecular Science 201 3(NMMS2013), The University of Tokyo (JAPAN), 2013/10/9

⑲ Noji H, Torque-generation mechanism of F1-ATPase, The 13th KIAS Conference on Protein Structure and Function, Seoul (Korea), 2013/9/27

⑳ Noji H, Single-Molecule counting of biomolecules with femtoliter droplet chamber array, The 17th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems, Barcelona International Convention Centre (Barcelona Spain), 2013/6/17.

㉑ Noji H, Single molecule biophysics of ATP synthase', Single Molecule Workshop. National Taicung University. 2013/4/12

㉒ Noji H, Single-Molecule Technology, Single-Molecule Biophysical Chemistry Workshop, Taipei (Taiwan), 2013/4/11.

㉓ Noji H, Single-Molecule Biophysics of ATP synthase, Single-Molecule Biophysical Chemistry Workshop, Taipei (Taiwan), 2013/4/11.

㉔ Noji H, Femtoliter chamber array for digital ELISA and single cell analysis.

Workshop on Technologies for Single Cell Analysis . Hitachi Research Institute (Tokyo, Japan). 2013/4/4

㉕ Noji H, Design Principle of F1-ATPase Rotary Molecular Motor, France-Japan Seminar BioInspired Methods & Applications, Embassy of France in Japan, (Tokyo JAPAN), 2013/2/6

㉖ Noji H, Single-molecule digital counting of proteins, Paradigm Innovation in Biology: Novel Strategy and Thinking, Academia Sinica, (Taipei , Taiwan), 2012/10/17

㉗ Noji H, Single-Molecule Digital Bioassay with a Million Droplets Array, International Conference Session 5 (JASIS), (Chiba, Japan), 2012/9/7.

㉘ Noji H, Single Molecule ELISA. 分子細胞生物学会年会. パシフィコ横浜. 2011 年 12 月 14 日.

[図書] (計 4 件)

① 野地博行, 柳田敏雄, 永井健治, 林重彦 「<座談会>1 分子ナノバイオ 熱いユメを語る分子計測と計算化学のマッチングがもたらすパラダイムシフト」(2014) 化学フロンティア 1 分子ナノバイオ計野地博行 (編) , 3 ~17, 化学同人

② 野地博行 「1 分子ナノバイオ計測の歴史」(2014) 化学フロンティア 1 分子ナノバイオ計野地博行 (編) , 18~30, 化学同人

③ 渡邊朋信, 市村垂生 (2012). 1 分子を見る光学顕微鏡 「1 分子生物学」14 章, pp. 179-192, 化学同人. (分担執筆)

④ Mamoru Hashimoto, Ichimura, T., Fujita, K. (2012). CARS Microscopy: Implementation of Nonlinear Vibrational Spectroscopy for Far-Field and Near-Field Imaging. In Raman Imaging, Springer Series in Optical Sciences 168, (Springer-Verlag Berlin Heidelberg), pp. 317-346.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 2 件)

名称：検出装置及び検出方法
発明者：野地博行、金秀炫、飯野亮太、太田
淳、徳田崇、笹川清隆、野田俊彦
権利者：国立大学法人 東京大学
種類：海外特許
番号：PCT/JP2013/073147
取得年月日：2013-8-29
国内外の別：外国

名称：高密度微小チャンバーアレイおよびそ
の製造方法
発明者：野地博行、渡邊力也、菅裕明、藤田
大士
権利者：国立大学法人 東京大学
種類：特許
番号：特願 2013-171493
取得年月日：2013-8-21
国内外の別：国内

〔その他〕

<http://www.nojilab.t.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野地 博行 (NOJI, Hiroyuki)
東京大学・大学院工学系研究科・教授
研究者番号：00343111

(2) 研究分担者

渡邊 朋信 (WATANABE, Tomonobu)
国立研究開発法人理化学研究所・生命シス
テム研究センター・チームリーダー
研究者番号：00375205

(2) 研究分担者

市村 垂生 (ICHIMURA, Taro)
国立研究開発法人理化学研究所・生命シス
テム研究センター・研究員
研究者番号：50600748

(3) 連携研究者

藤田 克昌 (FUJITA, Katsumasa)
大阪大学・工学研究科・准教授
研究者番号：80362664