

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月25日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22350036

研究課題名（和文）

単一細胞内成分の高性能分離分析法の開発と応用

研究課題名（英文） Development and application of high-performance separation analytical methods for the components of single cells

研究代表者

金田 隆 (KANETA Takashi)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：20243909

研究成果の概要（和文）：生体細胞はタンパク質、DNA や多くの小分子を含んでいる混合物であり、高性能な分離分析法は細胞内現象を分子レベルで解明するための重要な技術である。そこで本研究では、高感度に薬物、生理活性分子、タンパク質、DNA など分離、計測するための方法を開発し、細胞内に含まれるこれらの成分の分析に応用した。得られた結果から、開発した方法は、分子生物学研究における新規かつ有用な技術になるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：Biological cells consist of proteins, DNA, and a lot of small molecules, so high-performance separation analytical methods are important technologies for clarifying phenomena in biological cells at molecular levels. Therefore, this study aimed to the development of sensitive methods to separate and determine drugs, bioactive molecules, proteins, and DNA, and application of the methods to the analysis of these components in biological cells. From the results obtained by the study, the developed methods are expected to be novel and useful techniques in the study of molecular biology.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2011年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2012年度	3,000,000	900,000	3,900,000
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

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：キャピラリー電気泳動、レーザー励起蛍光、がん細胞、タンパク質、DNA、抗がん剤、多剤耐性タンパク質

1. 研究開始当初の背景

近年、ライフサイエンス分野において、細胞内現象を分子レベルで解明することが重要な課題となっている。特に、細胞内での分子の相互関係を解明することは、生命の理解にとって不可欠である。例えば、細胞への小分子の取り込みや細胞内でのタンパク質の動的挙動を理解するためには、複数の分子種を同時に計測できる方法が必要であり、今後の分子生物学の発展における重要な技術の

ひとつである。

細胞内での分子の挙動は細胞周期と深く関連している。したがって、細胞内分子の存在率と細胞周期の関係を明らかにすることは、細胞内現象の解明、薬物の作用機構の解明において、重要である。一般に、細胞周期の計測はフローサイトメトリーにより行われているが、この方法では各細胞周期において発現する多数のタンパク質を同時に計測することは困難である。

一方、ケミカルサイトメトリーは、細胞周期の各段階において、単一細胞内の化学成分を計測できる唯一の方法である。この方法は、分離能に優れたキャピラリー電気泳動と、高感度検出法であるレーザー励起蛍光検出法を組み合わせ、単一細胞を直接分離カラム内に導入し、細胞溶解、分離、検出を行うものである。この研究に関して、現在までに手法に関する原理的な研究が行われているが、具体的な応用に関する研究は報告されておらず、これからの応用研究の発展が期待されている。そこで本研究では、この方法を細胞周期決定と薬物や発現タンパク質の定量を同時に行えるシステムに拡張し、分子生物学研究における新規かつ有用なツールとなることを実証することを目指した。

2. 研究の目的

本研究においては、研究代表者が開発した高感度キャピラリー電気泳動法を活用し、以下の三項目について検討を行うことを目的とした。

(1) タンパク質の高感度検出法の開発：先に開発したポストカラム誘導体化／キャピラリー分子ふるい電気泳動法を単一細胞内タンパク質の計測に応用するために、光学系と反応試薬の最適化による高感度化を実現する。

(2) 単一細胞内の DNA 測定による細胞周期計測：単一細胞内の DNA を計測することで、個々の細胞の細胞周期を決定できることを明らかにする。膜透過性色素で細胞内の DNA を染色し、細胞を直接キャピラリー内に導入して、細胞内の DNA 量を計測する方法を開発する。

(3) 細胞周期と抗がん剤取り込み挙動の研究：がん細胞に抗がん剤を投与し、個々の細胞について、細胞周期と抗がん剤の取り込み挙動を同時に計測する。この目的を達成するために、二つのレーザーを光源とする二チャンネル同時検出装置を開発する。開発した検出装置で、単一細胞内の DNA 量と抗がん剤取り込み量、または発現タンパク質を同時に計測できることを実証する。

3. 研究の方法

(1) タンパク質の高感度検出法の開発

先に開発したポストカラム誘導体化／キャピラリー分子ふるい電気泳動法を生体成分分析に適用した。検出感度を向上させるために、ポストカラム誘導体化における還元剤の種類について検討した。さらに、開発した方法を細胞内タンパク質や牛乳中のタンパク質計測に応用した。

(2) 単一細胞内の DNA 測定による細胞周期決定

単一細胞の細胞周期を決定するために、高

分離能を有するキャピラリー電気泳動法と、高感度検出が可能なレーザー励起蛍光検出法を組み合わせた細胞周期の決定法について検討した。

試料として、SYTO80 により DNA を蛍光標識したヒト肺上皮癌細胞(A549)の懸濁液を用い、試料溶液を落差注入法と電気的注入法の併用によりキャピラリー内に導入し、電気泳動を行った。キャピラリー内を流れる細胞は、発振波長 532 nm の Nd:YAG レーザーを光源とするレーザー励起蛍光法により検出した。

(3) 細胞周期と抗がん剤取り込み挙動の研究

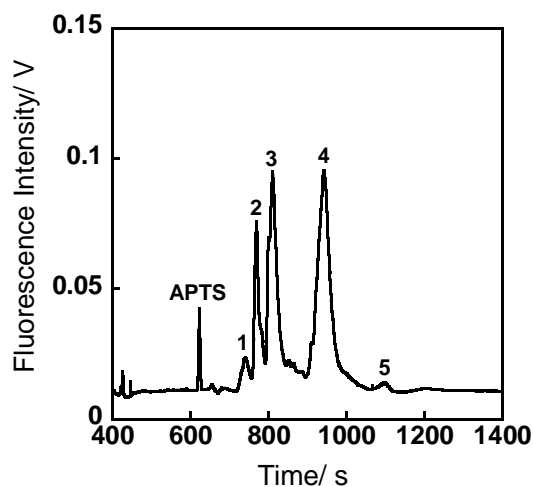
細胞内への抗がん剤取り込み挙動に対する多剤耐性タンパク質の効果について検討した。まず、アントラサイクリン系抗がん剤の分離条件に関する検討を行った。ついで、この分離法を利用して、アントラサイクリン系抗がん剤のがん細胞への取り込み挙動を評価した。

さらに、抗原抗体反応を利用する多剤耐性タンパク質の定量法の開発を行った。多剤耐性タンパク質である MRP1 の抗体を蛍光標識し、これと細胞溶解液を反応させ、細胞内の多剤耐性タンパク質を定量する方法について検討した。

4. 研究成果

(1) タンパク質のポストカラム誘導体化レーザー励起蛍光検出法に関しては、世界で初めて分子量に基づく分離後に、タンパク質を誘導体化する方法を開発し、この方法が生体試料中のタンパク質分析に適用できることを実証した。ポストカラム誘導体化反応において、2-メルカプトエタノールよりもエタンチオールを用いたほうが高感度であることを明らかにした。そこで、エタンチオールを用いて、牛乳、並びにがん細胞中のタンパク質

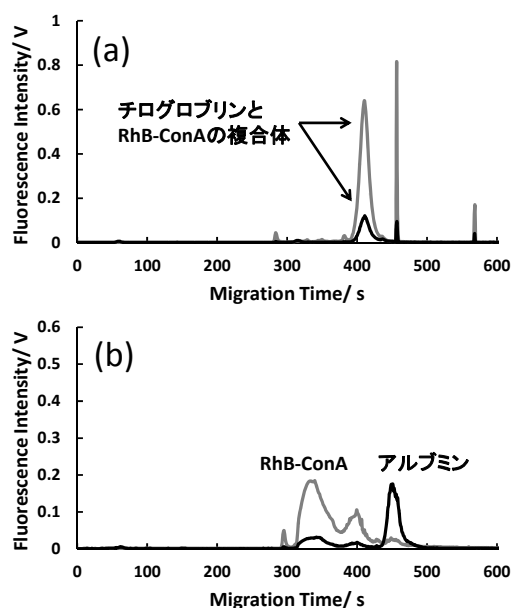
図1 牛乳中のタンパク質の分離。
の分離検出を行ったところ、良好な分離結果



を得ることができ、この方法が生体試料中の

タンパク質分析に適用できることを明らかにした。図1に牛乳中のタンパク質分析の結果を示す。この方法により、牛乳中の α -ラクトアルブミン(1)、 β -ラクトグロブリン(2)、 κ -カゼイン(3)、 α -及び β -カゼイン(4)、血清アルブミン(5)を分離検出することに成功した。

さらにこのポストカラム誘導体化法を二色レーザー励起蛍光検出法に拡張した。異なる波長で発振する二台のレーザーを用いて、それぞれの波長で励起したときに得られる二つの電気泳動図を同時に記録するための検出器を開発し、この検出器によるタンパク質の糖鎖修飾の有無判別を試みた。タンパク質はナフタレン-2,3-ジカルボキシアルデヒド(NDA)を用いたポストカラム誘導体化法により検出した。一方、蛍光性のローダミンBで修飾したマンノース型糖鎖と結合するコンカナバリンA (RhB-ConA) をプローブとして、タンパク質と結合した糖鎖を検出した。この検出法によりタンパク質の糖鎖の有無を判別する方法について検討した。糖タンパク質であるチログロブリンの検出を試みたところ、チログロブリンは450 nm励起で強い信号を得ることができた。これはチログロブリンのアミノ基とNDAとの反応により生成した誘導体の蛍光が観測されたものであると考えられた。一方、RhB-ConAのみを泳動した場合、532 nm励起においてブロードな強いピークが観測された。ピークがブロードな原因は、ConAに異なる数のRhBが結合したものが存在するためだと予想された。図2 タンパク質とRhB-ConAの混合物の電気泳動図。(a)チログロブリン、(b)アルブミン。



黒：450 nm励起、灰色：532 nm励起。
これらを混合して電気泳動を行ったところ、
図2(a)に示すように、両波長で新たなピーク

が観測された。糖鎖をもたないアルブミン (図2(b))では、532 nm励起でピークが観測されないことから、(a)で観測されたピークはチログロブリンとRh-ConAの複合体と考えられる。したがって、この方法により、糖タンパク質の識別が可能であることがわかった。

(2)単一細胞内のDNA計測においては、細胞をキャピラリー内に導入し、レーザー励起蛍光検出したところ、個々の細胞を単一のピークとして検出できることがわかった。次いで、50個の細胞をキャピラリー内に注入後、電気泳動を行い、蛍光強度を測定した。その結果、個々の細胞を連続的に計測することはできたが、各ピークにおけるサンプリング数が不十分であり、またS/N比も低かった。サンプリング数の不足は、細胞の流れる速度を低下させるか、あるいは測定プログラム上でサンプリング周波数を増大させることで解決できると予想された。また、S/N比が低い原因は、蛍光の集光が不十分であることに起因すると予想され、検出系の改良が必要であることが明らかとなった。

(3)抗がん剤取り込み挙動の研究において、アントラサイクリン系抗がん剤の分離条件を検討したところ、デオキシコール酸ナトリウムとシクロデキストリン誘導体を添加した泳動溶液を用いるとき、ドキシソルピシン、エピルピシン、イダルピシン、ドウノルピシンの相互分離が可能であることを見出した。この方法により、がん細胞に取り込まれたアントラサイクリン系抗がん剤量を計測した結果、4~6時間程度までは、細胞内の抗がん剤濃度が上昇するが、その後、がん細胞は抗がん剤を排出し、細胞内濃度が減少することがわかった。この抗がん剤の排出機構は細胞膜に存在する多剤耐性タンパク質によるものであると推察された。そこで多剤耐性タンパク質の阻害剤を細胞培養液に添加し、抗がん剤の細胞への取り込み挙動を評価したところ、6時間以降でも細胞内の抗がん剤濃度の増加が観測された。この結果は、阻害剤を活用することで、がん細胞への抗がん剤の取り込みを促進できることを示唆していた。

そこで、さらに詳細に抗がん剤排出機構について検討するために、細胞内で発現している多剤耐性タンパク質であるMRP1の定量法を開発した。開発した方法を用いて、抗がん剤で処理した細胞内のMRP1を定量したところ、細胞内でのMRP1発現量が増加していることがわかった。すなわち、抗がん剤の排出と多剤耐性タンパク質の発現量に相関があることを示すことができ、開発した方法が多剤耐性タンパク質の簡便な測定法として利用できることを明らかにした。

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 12 件)

① Genki Inoue, Takashi Kaneta, Toshio Takayanagi, Junichi Kakehi, Hiroyasu Motose, Taku Takahashi, Determination of polyamines in *Arabidopsis thaliana* by capillary electrophoresis using salicylaldehyde-5-sulfonate as a derivatizing reagent, *Analytical Methods*, 査読有, in press.

DOI: 10.1039/c3ay26360f

② Kaori Yamaguchi, Nobuyuki Takeyasu, Takashi Kaneta, Determination of association constants between 5'-guanosine monophosphate gel and aromatic compounds by capillary electrophoresis *Journal of Chromatography A*, 査読有, Vol.1288, 2013, pp.149–154.

DOI: 10.1016/j.chroma.2013.02.090

③ Junji Inoue, Takashi Kaneta, Totaro Imasaka, Sheath-flow electrochemical detection of amino acids with a copper wire electrode in capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 査読有, Vol.33, 2012, pp.2743–2747.

DOI: 10.1002/elps.201200059.

④ Eakkasit Punrat, Suchada Chuanwatanakul, Orawan Chailapakul, Toshio Takayanagi, Takashi Kaneta, Shoji Motomizu, Determination of Arsenic(III) by Sequential Injection/ Anodic Stripping Voltammetry (SI/ASV) Using In-situ Thin Film-Modified Screen-Printed Carbon Electrode (SPCE), *Journal of Flow Injection Analysis*, 査読有, Vol.29, 2012, pp.11-16.

URL:

http://jafia.kyushu-u.ac.jp/japanese/jfia/contents/29_1/HP/JFIA29%281%29%282012%29PP.11.pdf

⑤ Takashi Kaneta, Takehito Ogura, Shuhei Yamato, Totaro Imasaka, Band broadening of DNA fragments isolated by polyacrylamide gel electrophoresis in capillary electrophoresis, *Journal of Separation Science*, 査読有, Vol.35, 2012, pp.431–435.

DOI: 10.1002/jssc.201100909

⑥ Julius Mbuna, Takashi Kaneta, Totaro Imasaka, Micellar electrokinetic chromatographic analysis for in vitro accumulation of anthracyclines enhanced by inhibitors of cell membrane transporter-proteins in cancer cells, *Biomedical Chromatography*, 査読有, Vol.25, 2011, pp.1168–1174.

DOI: 10.1002/bmc.1589

⑦ Julius Mbuna, Takashi Kaneta, Totaro Imasaka, Rapid determination of multidrug resistance-associated protein in cancer cells by capillary electrophoresis immunoassay, *Journal of Chromatography A*, 査読有, Vol.1218, 2011, pp.3923–3927.

DOI: 10.1016/j.chroma.2011.04.046

⑧ Takashi Kaneta, Takehito Ogura, Totaro Imasaka, Analysis of proteins in biological samples by capillary sieving electrophoresis with postcolumn derivatization/laser-Induced fluorescence detection, *Electrophoresis*, 査読有, Vol.32, 2011, pp.1061–1067.

DOI: 10.1002/elps.201000488

⑨ Cheng-Huang Lin, Yuan-Kai Cheng, Takashi Kaneta, Totaro Imasaka, Applications of Hadamard transform-gas chromatography/mass spectrometry (HT-GC/MS) to online detection of exhaled breath after drinking or smoking *Journal of Chromatography A*, 査読有, Vol.1217, 2010, pp.5274–5278.

DOI: 10.1016/j.chroma.2010.06.034

⑩ Julius Mbuna, Takashi Kaneta, Totaro Imasaka, Measurement of intracellular accumulation of anthracyclines in cancerous cells by direct injection of cell lysate in MEKC/LIF detection, *Electrophoresis*, 査読有, Vol.31, 2010, pp.1396–1404.

DOI: 10.1002/elps.200900659

⑪ Chao-Chiang Cheng, Hung-Wei Chang, Tomohiro Uchimura, Totaro Imasaka, Takashi Kaneta, Cheng-Huang Lin, Application of Hadamard transform to gas chromatography/nonresonant multiphoton ionization/time-of-flight mass spectrometry *Journal of Separation Science*, 査読有, Vol.33, 2010, pp.626–630.

DOI: 10.1002/jssc.200900662

⑫ Zenzen Fan, Chien-Hung Lin, Hung-Wei Chang, Takashi Kaneta, Cheng-Huang Lin, Design and application of Hadamard-injectors coupled with gas and supercritical fluid sample collection systems in Hadamard transform-gas chromatography/mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 査読有, Vol.1217, 2010, pp.755–760.

DOI: 10.1016/j.chroma.2009.12.007

〔学会発表〕(計 29 件)

① Keisuke Kanaji, Takashi Kaneta, “Measurement of Multiply-labeled Proteins by Capillary Electrophoresis” 2013 BK21

Symposium on Chemical Materials Science, Seoul, Korea, February 14-15, 2013.

② Takashi Kaneta, Ayumi Tabara, “Selective Detection of Glycoproteins by Two-Color Laser-Induced Fluorescence in Capillary Electrophoresis”, Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON2013), Bangsaen, Chon Buri, Thailand, January 23-25, 2013.

③ 山口 佳織, 金田隆 「グアノシγγελの分子認識能評価の研究」第 29 回イオンクロマトグラフィー討論会, 岡山, 2012 年 12 月 6-7 日.

④ 赤瀬大祐, 金田隆 「フロー分析用電気化学発光検出の開発」第 29 回イオンクロマトグラフィー討論会, 岡山, 2012 年 12 月 6-7 日.

⑤ 金田隆, 田原彩裕美 「二色レーザー励起蛍光検出による糖タンパク質の選択的検出」第 32 回キャピラリー電気泳動シンポジウム, 池田, 2012 年 11 月 7-9 日.

⑥ Takashi Kaneta, Genki, Inoue, Toshio Takayanagi, Junichi Kakehi, Hiroyasu Motose, Taku Takahashi, “Determination of Polyamines in *Arabidopsis* by Capillary Electrophoresis Using Salicylaldehyde-5-sulfonate as a Derivatizing Reagent”, ITP2012, Baltimore, USA, September 29-October 3, 2012.

⑦ Eakkasit Punrat, Takashi Kaneta, Suchada Chuanuwatanakul, Shoji Motomizu, Orawon Chailapakul, “Effect of flow patterns on the determinations of metal ions using sequential injection system coupled with anodic stripping voltammetry”, Flow analysis XII, Greece, September 23-28, 2012.

⑧ Eakkasit Punrat, Takashi Kaneta, Suchada Chuanuwatanakul, Shoji Motomizu, Orawon Chailapakul, “Method development for the determination of arsenic by sequential

injection/anodic stripping voltammetry using long-lasting gold film-modified screen-printed carbon electrode”, Flow analysis XII, Greece, September 23-28, 2012.

⑨ Eakkasit Punrat, Suchada Chuanuwatanakul, Orawon Chailapakul, 樋口慶郎, 本水昌二, 金田隆 「スクリーンプリントカーボン電極 (SPCE) を用いる SIA/ボルタンメトリーによるヒ素の高感度定量」日本分析化学会第 61 年会, 金沢, 2012 年 9 月 19-21 日.

⑩ Eakkasit Punrat, Suchada Chuanuwatanakul, Orawon Chailapakul, 樋口慶郎, 本水昌二, 金田隆 「シーケンシャルインジェクション/SPCE ボルタンメトリー用フローセルの試作」日本分析化学会第 61 年会, 金沢, 2012 年 9 月 19-21 日.

⑪ 山口佳織, 金田隆 「キャピラリー電気泳動によるグアノシγγελの分子認識能評価」日本分析化学会第 61 年会, 金沢, 2012 年 9 月 19-21 日.

⑫ 田原彩裕美, 金田隆 「二色レーザー励起蛍光検出・キャピラリー電気泳動による生体高分子複合体計測法の開発」日本分析化学会第 61 年会, 金沢, 2012 年 9 月 19-21 日.

⑬ 赤瀬大祐, 金田隆 「フロー分析用電気化学発光検出の開発とアスコルビン酸分析への応用」日本分析化学会第 61 年会, 金沢, 2012 年 9 月 19-21 日.

⑭ 東谷直樹, 金田隆 「キャピラリー電気泳動法による水溶液内イオン会合の解析」第 18 回中国四国支部分析化学若手セミナー, 山口, 2012 年 9 月 8 月 31 日-9 月 1 日.

⑮ 金地啓介, 金田隆 「キャピラリー電気泳動法による多重標識タンパク質の分離計測」第 18 回中国四国支部分析化学若手セミナー, 山口, 2012 年 8 月 31 日-9 月 1 日.

⑯ 金地啓介, 高柳俊夫, 金田隆 「二波長検出キャピラリー電気泳動法によるタンパク質

の標識効率の評価」第72回分析化学討論会，鹿児島，2012年5月19-20日。

⑰東谷直樹，高柳俊夫，金田隆「キャピラリー電気泳動法によるテトラフェニルポレート誘導体と一価陽イオンの水溶液内イオン会合解析」第72回分析化学討論会，鹿児島，2012年5月19-20日。

⑱金田隆「レーザー励起蛍光検出/キャピラリー電気泳動法による生体関連物質の高感度分析」岡山地区講演会，岡山，2012年3月6日。

⑲Eakkasit PUNRAT，高柳俊夫，Suchada CHUANUWATANAKUL，金田隆，本水昌二，Orawon CHAILAPAKUL「薄膜修飾したカーボン電極を用いるシーケンシャルインジェクションアノードックストリップングボルタンメトリーによるヒ素(III)の定量」第49回フローインジェクション分析講演会，名古屋，2011年12月2-3日。

⑳井上源貴，金田隆，高柳俊夫「サリチルアルデヒド-5-スルホン酸を誘導体化試薬として用いたキャピラリーゾーン電気泳動法によるポリアミンの分離定量」日本分析化学会第60年会，名古屋，2011年9月14-16日。
□金田隆，小倉丈人，大和修平，今坂藤太郎「ポリアクリルアミドゲルから抽出したDNAの構造変化」日本分析化学会第60年会，名古屋，2011年9月14-16日。

□Shinya Kato，Takashi Kaneta，Totaro Imasaka，“Determination of DNA in Single Cells by Capillary Electrophoresis”，ICAS2011，Kyoto，May 22-26，2011。

□Takashi Kaneta，Julius Mbuna，Totaro Imasaka，“Determination of Multidrug Resistance Protein 1 by Capillary Electrophoresis Immunoassay in Cancer Cells”，ICAS2011，Kyoto，May 22-26，2011。

□加藤慎也，金田隆，今坂藤太郎「キャピラ

リー電気泳動による単一細胞中のDNA計測」2010年日本化学会西日本大会，熊本，2010年11月6-7日。

□金田隆「レーザーを用いた高性能分離・分析法の開発」日本分析化学会北海道支部公開セミナー，北見，2010年11月19日。

□金田隆，大和修平，今坂藤太郎「制限酵素法/キャピラリーシービング電気泳動法によるメチル化DNA分析」日本分析化学会第59年会，仙台，2010年9月15-17日。

□小倉丈人，金田隆，今坂藤太郎「ポストカラム誘導体化レーザー励起蛍光検出/キャピラリーシービング電気泳動による生体試料中のタンパク質分析」日本分析化学会第59年会，仙台，2010年9月15-17日。

□Takashi Kaneta，Takehito Ogura，Totaro Imasaka，“Analysis of Proteins by Capillary Sieving Electrophoresis with Postcolumn Derivatization/Laser-Induced Fluorescence Detection”，ITP2010，Baltimore，USA，August 29-September 1，2010。

□Mbuna Julius，金田隆，今坂藤太郎「MEKC Investigation on in vitro Accumulation of Anthracyclines Enhanced by Inhibition of Protein Pumps in Cancer Cells」第71回分析化学討論会，松江，2010年5月15-16日。

〔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〕

ホームページ等

http://chem.okayama-u.ac.jp/~analytical/home_j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金田 隆 (KANETA TAKASHI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：20243909