

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25630372

研究課題名(和文) 単一細胞破碎に基づく高精度オルガネラ回収技術の開発

研究課題名(英文) High quality organelle recovery from microalgae with single cell disruption techniques

研究代表者

田中 剛 (Tanaka, Tsuyoshi)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20345333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では細胞からインタクトな状態でオルガネラを取り出す技術として、単一細胞破碎技術を確立することを目指した。そのために、微細孔アレイ上に多数の細胞を単一細胞レベルでアレイ化させ、個々の細胞に吸引圧、もしくは化学的処理を施すことにより細胞を温和な条件で破碎する手法の開発を行った。さらに、細胞の破碎状況や分画するオルガネラのキャラクタリゼーションに向けて、微細孔アレイにおける細胞のライブイメージング、及び顕微ラマン分光法を用いた含有分子の組成解析法の確立を行った。本研究により確立された技術は、様々なオルガネラの定量的かつ高精度な分画のための基礎検討として有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The cell disruption method to extract intact organelle from the cells, including hard plant cells, was developed in this study. The diatom species were used as model samples, and captured on the micro-cavity array, followed by addition of aspiration pressure. Another strategy for cell disruption is chemical method, such as acidic treatments. As comparing these two, an acidic treatment was demonstrated to be better way to achieve efficient and benign cell disruption. Furthermore, live imaging system for the micro-cavity array was developed, and further analysis and characterization were carried out using Raman microscope on the imaging system. These techniques can contribute to development of a quantitative and efficient cell disruption method.

研究分野：生物工学

キーワード：オルガネラ回収 微細藻類 細胞破碎 バイオディーゼル 顕微ラマン分光法

1. 研究開始当初の背景

オルガネラ（細胞小器官）は、細胞の内部に存在する、特定の機能に特化した構造体である。核、ミトコンドリア、小胞体や、植物細胞における葉緑体などがあり、これらのオルガネラの機能の解明は、細胞生物学上、極めて重要な意義を持つ。

オルガネラ機能の詳細な解析のためには、細胞から特定のオルガネラを損傷なく単離することが理想的である。しかし、オルガネラの多くは脂質二重膜で囲まれただけの脆弱な構造をしており、超音波処理やビーズ破碎、フレンチプレスといった過剰な圧力やせん断力を加える方法ではオルガネラの損傷も大きく、他のオルガネラ成分のクロスコンタミネーションも不可避である。

一方、近年、Lab-on-a-chip 技術の進展により、単一細胞レベルでの細胞破碎技術が提案されている。レーザー照射、電位印加、界面活性剤により、マイクロ流体デバイス内において個々の細胞から細胞内成分を取り出す方法が開発されている。これらの単一細胞破碎技術は、破碎が容易な動物細胞を対象としたものであり、強固な細胞壁を有する細胞への適応は困難であった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、細胞からインタクテナ状態でオルガネラを取り出す技術として、“単一細胞破碎”技術を確立することを目的とした。微細孔アレイ上に多数の細胞を単一細胞レベルでアレイ化させ、個々の細胞に吸引圧、もしくは化学的処理を施すことにより“単一細胞破碎”を実現する。本研究では特に、既存の単一細胞破碎技術の適応が困難であった植物細胞（微細藻類）を標的として用い、単一細胞レベルでの連続的な細胞破碎を通して、高精度なオルガネラの分画を行う。さらに、分画するオルガネラのキャラクタリゼーションに向けて、微細孔アレイにおける細胞のライブイメージング、及び含有分子の組成解析を試みた。本技術は、様々なオルガネラの定量的かつ高精度な分画へ利用でき、細胞生物学研究における有力なツールになると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 同時並列可能な単一細胞捕捉・破碎デバイスの開発

研究対象となる微細藻類として、*Fistulifera* 属、および *Phaeodactylum* 属の珪藻を用いることとした。*Fistulifera* 属の珪藻の細胞には一つの葉緑体と二つの油滴（小胞体に囲まれ、脂質を含有するオルガネラ）が含まれている点で特徴的である。一方、*Phaeodactylum* 属は複数の小型の油滴を有する。これらの細胞を、研究代表者らがこれまで開発してきた微細孔アレイ（孔数：約 10 万、孔径：3 μm ）を PDMS 支持体で固定し、流路を組み込んだカートリッジに

導入した。構築したカートリッジ上に効率的に細胞を捕捉できるかを確認するため、10 万個の微細藻類細胞を導入し、吸引圧を加えた後に、微細孔上への捕捉効率を評価した。また捕捉時の細胞の形状を顕微鏡観察することで、上記の陰圧処理のみで細胞が破碎できるか観察した。さらに、化学処理による細胞破碎を行うために 1 mM、10 mM のフッ化水素を珪藻細胞に添加し、1 分後に観察を行った。

(2) 捕捉した単一細胞の *in vivo* ダイナミクス解析法の開発

捕捉した単一細胞の破碎状況のライブイメージングを実現するために、珪藻の細胞内オルガネラ（葉緑体、および脂質蓄積のための油滴）を対象にした *in vivo* ダイナミクス解析法の開発を行った。先に記述した単一細胞集積化技術と顕微ラマン分光法を組み合わせ、微細孔アレイ上に捕捉した微細藻類細胞に対し、532 nm 励起光を照射することで *in vivo* 脂質解析を行った。更に、脂質蓄積条件下で培養した藻体をヘキサン抽出によって脂質含有量を秤量し、ラマンスペクトルとの相関を評価した。また、ラマンスペクトルから細胞内脂質の不飽和度を算出した。脂肪酸の不飽和度と脂質蓄積量の相関についても評価を行った。

3. 研究成果

(1) 微細孔アレイ上への微細藻類の捕捉
Fistulifera 属、および *Phaeodactylum* 属の珪藻を微細孔アレイ上へ捕捉した。その結果、*Fistulifera* 属珪藻は微細孔上に細胞一つずつが捕捉され、等間隔に配列させることができた。一方、*Phaeodactylum* 属珪藻は微細孔上に細胞が捕捉されず、孔の近傍にランダムに沈着している様子が観察された。これは、*Phaeodactylum* 属珪藻の細胞の形状が、*Fistulifera* 属珪藻の細胞と比較して細長く、微細孔からの吸引圧を受けにくいためではないかと考えられた。そのため、本方法を用いた細胞破碎実験においては、細胞の形状を考慮する必要があることを明らかとした。後の研究では *Fistulifera* 属珪藻を用いることとした。

(2) 吸引圧処理、化学処理による単一細胞破碎方法の開発

構築した微細孔アレイ（孔数：約 10 万、孔径：3 μm ）のカートリッジ上に細胞懸濁液を導入することで細胞を捕捉した。その際、懸濁液導入の流速、細胞濃度などの諸条件を研究代表者らの過去の研究と照らし合わせて検討した。その結果、流速 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、 5×10^6 cells/mL で細胞導入・吸引した時に、導入した細胞の内、90%以上を微細孔アレイに捕捉可能であることを確認した。本条件において一部の細胞の破碎が確認されたものの、その効率は低かった。

細胞破碎効率を向上させるため、流速をさらに増加させたが、破碎効率の劇的な向上には至らなかった。そこで、フッ化水素処理による珪藻細胞壁（珪殻）の溶解条件の検討を行った。その結果、10 mM フッ化水素処理では細胞が完全に崩壊してしまうのに対し（Fig. 1-A）、1 mM フッ化水素処理では、細胞内の葉緑体の形状は残しつつも、密度の小さい油滴を細胞外に遊離させることができることを見出した（Fig. 1-B）。本処理は温和な条件下（常温・常圧）で短時間（1 分間）に完了する。遊離した油滴は球状の形状を保っており、インタクトな状態で細胞を破碎できることが確認された。

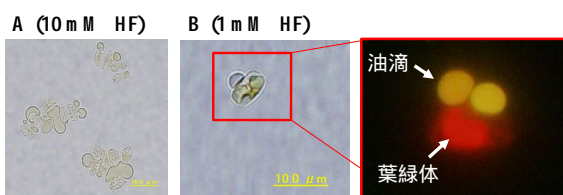


Fig. 1 フッ化水素処理した *Fistulifera* 属珪藻の顕微鏡像 (A) 10 mM フッ化水素処理後の細胞、(B) 1 mM フッ化水素処理後の細胞 蛍光色素で染色した油滴 (黄色部分) と、葉緑体 (赤色部分) を蛍光顕微鏡にて観察した。

(3) 捕捉細胞のライブイメージング、及びラマン顕微分光法を用いた細胞由来分子の組成解析法の開発

微細孔アレイ上に捕捉した細胞の破碎工程を時系列に沿って観察できるよう、ライブイメージングシステムを開発した。本システムは、微細孔アレイを連続的に観察できるように配置した共焦点顕微鏡により構成される。これにより、高い時間分解能、空間分解能で細胞のイメージング（明視野観察、蛍光観察）を行うことが可能である。さらに、分画対象とするオルガネラの *in vivo* キャラクターゼーションのために、捕捉した細胞内部の分子組成を特定できるラマン顕微分光法の適用を試みた（Fig. 2）。

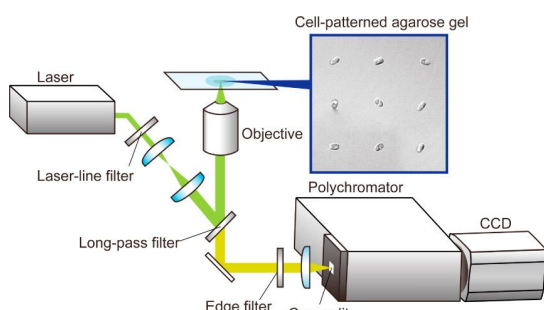


Fig. 2 微細孔アレイを用いて整列させた *Fistulifera solaris* の顕微ラマン分光法解析を行う装置の概要

微細孔上に捕捉した細胞を寒天培地に包

埋したサンプルに対してラマン分析を行った結果、脂質蓄積条件下で培養した細胞の脂質・タンパク質・カロテノイドの各々について単一細胞内における局在を観察することが可能であった（Fig. 3）。また、脂質のマーカーバンドである 1445 cm^{-1} のバンド強度面積と、ヘキサン抽出によって秤量した脂質含量に相関があったことから、ラマンスペクトル解析により *in vivo* の情報から脂質の定量が可能であると示唆された。脂肪酸不飽和度と細胞内油滴体積値の相関評価を行った結果、油滴の蓄積に伴って油滴を構成する脂肪酸の不飽和度が減少していく傾向が見られた。よって、単一細胞ライブイメージング技術と顕微ラマン分光法を統合することで、生体分子の局在及び脂質含量、脂肪酸の不飽和度を同時に解析できることが示された。

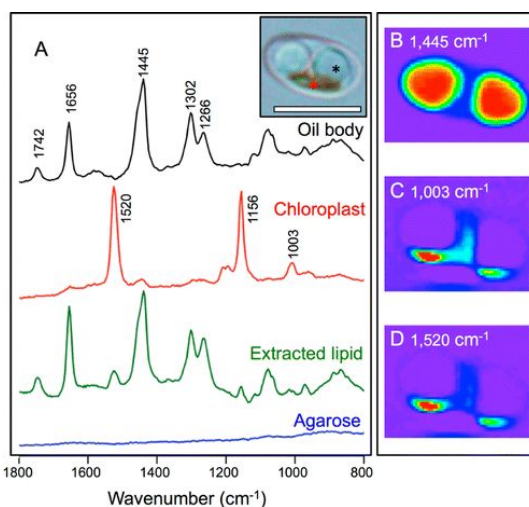


Fig. 3 顕微ラマン分光法による *Fistulifera solaris* の脂質解析 (A)油滴、葉緑体、抽出した脂質及びアガロースゲルのラマンスペクトル (B-D)(B)1445 cm^{-1} (油滴)、(C)1003 cm^{-1} (タンパク質とカロテノイド)、(D) 1520 cm^{-1} (カロテノイド)におけるラマンイメージ像

以上のように、フッ化水素による化学的細胞破碎方法、および単一細胞ライブイメージングシステムの開発を完了することができた。これらを統合することにより、単一細胞破碎に基づく高精度オルガネラ回収技術の基盤技術を開発することができたと考える。

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 2 件)

1) Masahito Hosokawa, Masahiro Ando, Shoichiro Mukai, Kyoko Osada, Tomoko Yoshino, Hiro-o Hamaguchi, Tsuyoshi Tanaka

“In vivo live cell imaging for the quantitative monitoring of lipids by using raman microspectroscopy” Analytical Chemistry, 86. 8224-8230 (2014) DOI: 10.1021/ac501591d (査読有り)

2) Kyoko Osada, Masahito Hosokawa, Tomoko Yoshino, Tsuyoshi Tanaka “Monitoring of Cellular Behaviors by Microcavity Array-Based Single-Cell Patterning” Analyst, 139. 425-430 (2014) DOI: 10.1039/c3an01698f(査読有り)

〔学会発表〕(計 6 件)

1) 向井将一郎、田中剛「Lipid compositional analysis of marine diatom *Fistulifera solaris* strain JPCC DA0580 using Raman microspectroscopy」The Second Taiwan International Symposium On Raman Spectroscopy, 2014 年 6 月 23 日-24 日, National Dong Hwa University, Hualien, Taiwan

2) 長田響子、田中剛「単一細胞パターンニングによる海洋珪藻 *Fistulifera* sp. JPCC DA0580 株のオイル蓄積過程のタイムラプス解析」第 15 回マリンバイオテクノロジー学会大会, 2013 年 6 月 1 日-2 日, 沖縄県市町村自治会館 (沖縄県)

3) 向井将一郎、田中剛「In vivo lipid analysis of marine diatom *Fistulifera* sp. strain JPCC DA0580 using Raman Microspectroscopy」The First Taiwan International Symposium on Raman Spectroscopy, 2013 年 7 月 4 日-5 日, National Chiao Tung University, Taiwan

4) 吉野知子、田中剛「顕微ラマン分光法による海洋珪藻 *Fistulifera* sp. JPCC DA0580 株の脂質イメージング解析」第 15 回マリンバイオテクノロジー学会大会, 2013 年 6 月 1 日-2 日, 沖縄県市町村自治会館 (沖縄県)

5) 向井将一郎、田中剛「顕微ラマン分光法による海洋珪藻 *Fistulifera* sp. JPCC DA0580 株の脂質解析」第 65 回日本生物工学会大会, 2013 年 9 月 18 日-20 日, 広島国際会議場 (広島県)

6) 長田響子、田中剛「Time-lapse analysis of oleaginous diatom *Fistulifera* sp. strain JPCC DA0580 during the triglyceride accumulation using single-cell patterning」10th International Marine Biotechnology Conference, 2013 年 11 月 11 日-15 日, Brisbane Convention and Exhibition Centre, Brisbane, Australia

〔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://www.tuat.ac.jp/~biomol/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

田中 剛 (TSUYOSHI TANAKA)

東京農工大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：20345333