

※課題番号 : F-12-UT-0084
※支援課題名 (日本語) : 生体分子 1 分子デジタル計数デバイスの開発
※Program Title (in English) : Development of device for a single molecule counting.
※利用者名 (日本語) : 野地博行
※Username (in English) : Hiroyuki Noji
※所属名 (日本語) : 東京大学大学院工学系研究科
※Affiliation (in English) : Department of Applied Chemistry, The University of Tokyo

※概要 (Summary) :

本研究は、「細胞内生体分子 1 分子計数・ダイナミクス計測法」を確立する。具体的には 1 分子デジタル ELISA 法を利用した 1 細胞タンパク質計数法の技術課題を中心に取り組む。

1 細胞デジタル ELISA 法は 1 細胞からの細胞抽出液を用い、ミクロンサイズの W/O Droplet が 10^6 個並んだアレイを利用して 1 分子感度を有する ELISA 法を行う。そこで陽性反応のチャンバー数を計数することで 1 細胞内のタンパク質数とする。さらに、自動 ELISA システムと組み合わせることで、ハイスループットな 1 細胞デジタル ELISA 法を開発する。

※実験 (Experimental) :

チャンバーアレイを作製するためのガラスマスク作製のため、高速大面積電子線描画装置を用いて、クロム蒸着されたガラス上にパターン描画。

その後、マスク・ウェーハ自動現像装置群を用いて現像し、ガラス上のクロム層をエッチングし、ガラスマスクを作製した。このマスクを使用してチャンバーアレイ作製を行っている。

※結果と考察 (Results and Discussion) :

デジタル計数法を行うためには、フェムトリットルオーダーの均一な微小溶液を数万個以上同時に作製し、取り扱わなければならない。このような微小溶液を作製する方法として、我々は以前にドロップレットチャンバーというものを開発した。これはマイクロメートルサイズの親水/疎水パターンが施されたガラス基板上に微小 Water-in-Oil ドロップレットアレイを作製する方法である。ガラス基板に水相を滴下した後油を滴下すると親水部のみに水が保持され、均一な微小溶液が形成される。また、このドロップレット中において β -gal の 1 分子酵素アッセイにも成功している。

まず、検出下限値(Limit of detection : LOD)を求めるために、標準 β -gal 溶液を用いて実験を行った。蛍光を発するドロップレットの数を計測し、全てのドロップレットに対する割合 (Fraction of bright droplets) の β -gal 濃度依存性を確認した。 β -gal の LOD は、90 aM (9.0×10^{-17} M) と求められ、これは大腸菌 1 匹 (約 $0.6 \mu\text{m}^3$) あたりに換算すると 8.0×10^{-9} 個に相当する。大腸菌 1 個体を計測する予備実験として、大腸菌 100 個体での計測を行ったところ、 β -gal の個数は 2.5×10^5 個となった。これは、1 個体あたり 2500 個に相当し、濃度は 1040 aM となるため LOD に対して 10 倍大きな値となるため、1 個体でも十分計測可能であることが予測される。実際に 1 個体で計測したところ、平均 β -gal 1200 個とおおよそ妥当な結果となり、直接の計数に成功したといえるだろう。

※その他・特記事項 (Others) :

今後は、他のタンパク質の計数も行っていきたい。今回の方法では、ドロップレットの中に捕捉することのできる分子の割合が低く (おおよそ 2%)、抗体でトラップしてからデバイスに注入することにより補足効率を高め、細胞内での存在量がより少ないタンパク質も計数できるようにする予定である。

共同研究者等 (Coauthor) :

飯野亮太、田端和仁、渡邊力也、Soo Hyeon Kim (東京大学)
千葉陵太郎 (アボットジャパン)

論文・学会発表 (Publication/Presentation) :

なし

関連特許 (Patent) :

なし