

単一細胞解析のための生体分子ハンドリング技術の研究

研究代表者 庄子 習一
(基幹理工学部 電子物理システム学科 教授)

1. 研究課題

本研究では、「マイクロスケール～サブミクロンスケールの柔らかい（壊れやすい）生体分子の選択的ハンドリングと処理をマイクロ流体デバイス技術により行う事」を目的とする。具体的には、多数の同種の微小サンプルのうち特異的な機能を発現する希少サンプルのみをピックアップし、次工程での利用・応用が可能となるような「特異的サンプルピックアップ用マイクロ流体デバイス」の開発、およびピックアップされた特定サンプルに対して「選択的に薬物処理等が可能なマイクロ流体デバイスシステムの開発」を行う。本研究の遂行により、従来技術では困難であった、特異的機能を持つ単一細胞内オルガネラの機能解析や、特殊な微量たんぱく質等の分析・解析が可能となり、いままで不明であった各種微小器官や細菌等の働きの解明が飛躍的に進むことが期待される。

2. 主な研究成果（MS ゴシック、太字、11 ポイント）

2.1 液滴生成デバイスの3次元構造最適化

液滴を生体分子のハンドリングに用いるためには液滴の微細化が不可欠である。マイクロ流体デバイスの構造材料として用いられるPDMSは疎水性であるためオイル液滴生成が難しいという問題がある。そこで、液滴生成部の構造を3次元化して表面張力によるオイルの広がりを抑え、せん断応力を有効に使うことで液滴生成を容易にする方法を提案した。流体シミュレーションによる設計に基づき3種類の液滴生成デバイスを作製して実験した結果、生成部の構造を台形型にしたデバイスで表面処理を行わなくてもオイル液滴を安定に生成することが可能であることが確認された。また、デバイスの構造を最適化することでW/O/W液滴を容易に作成できることも確認できた。

2.2 微小液滴を用いた化学合成

抗がん剤や燃料電池など、多岐にわたる分野での応用が期待されているアゾ化合物の安定生成にマイクロ液滴を用いる方法を検討した。従来のビーカーを用いた方法では、高濃度の塩酸や水酸化ナトリウム水溶液によるpH調整や、溶液温度の厳密な調整が要求され、副生成物の生成が避けられない。また、Y字流路などマイクロ流路を用いた方法では、流路に生成物が吸着するなどの問題があり、安定な生成が難しかった。そこでT字型流路を2段組み合わせた液滴生成合成デバイスを作製して、アニリン・亜硝酸ナトリウム・o-バニリンを用いた合成を行った。反応場としてW/O液滴を用いることで生成物の流路への吸着を防ぐことが可能となり、また、液滴内の

pH を正確に制御できることも確認できた。生成物を核磁気共鳴法 (Nuclear Magnetic Resonance : NMR)・フーリエ赤外分光法 (Fourier Transition Infrared spectroscopy : FT-IR)・紫外・可視分光法 (UV-vis)・高速原子衝突質量分析 (Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry : FAB-MS)を用いて同定した結果、従来法で生成したアゾ化合物と同様な結果が得られた。この方法により、精密な合成環境のパラメータの制御を要求せず、副生成物がほとんど生じない短時間のアゾ化合物生成が可能となった。

2.3 微小液滴を用いたタンパク質の結晶化

非測定タンパク質の構造を同定する方法として、X線結晶構造解析が一般に用いられている。X線結晶構造解析で結晶の正確な構造を明らかにするためには回折斑点が明瞭でなければならぬため、100 μm 以上の単結晶の生成が必要となる。タンパク質の単結晶を生成する反応場として微小液滴を用いる方法が提案されてきたが、結晶化は容易であるが生成結晶が柔らかくもろいため取り出すことが難しいという問題があった。そこで、我々はMEMS技術で作成した超撥水性構造表面の液滴を用いたタンパク質結晶化を実現した。また、マイクロ流路内での連続流を用いた微小液滴中でのタンパク質結晶化デバイスの下流に、PDMSとガラスからなる液滴を保管する流路を形成することを考えた。この構造は簡単に分離することが可能で、生成タンパク質結晶を容易に取り出すことができる。このデバイスでリゾチーム結晶を生成しFE-SEMによる観察およびエネルギー分散型X線分析装置(EDX)での同定を行い、その有効性を確認した。

3. 共同研究者 (MSゴシック、太字、11ポイント)

東京大学・大学院・教授	船津 高志
早稲田大学・研究員・教授	関口 哲史
早稲田大学・研究院・助教	尹 棟鉉

4. 研究業績

4.1 学術論文

1. D.H. Yoon, D. Tanaka, T. Sekiguchi, S. Shoji, "Structural Formation of Oil-in-Water (O/W) and Water-in-Oil-in-Water (W/O/W) Droplets in PDMS Device Using Protrusion Channel without Hydrophilic Surface Treatment", Micromachines 2018, Vol.9, No.9, 468 (2018), 12 pages, DOI: 10.3390/mi9090468 (電子版掲載日 : 9/14)
2. D.H. Yoon, D. Tanaka, T. Sekiguchi, S. Shoji, "Size-Dependent and Property-Independent Passive Microdroplet Sorting by Droplet Transfer on Dot Rails", Micromachines 2018, Vol.9, No.10, 513 (2018), 10 pages, DOI: 10.3390/mi9100513 (電子版掲載日 : 10/11)
3. D. Tanaka, W. Kawakubo, K. Takahashi, D.H. Yoon, T. Sekiguchi, T. Akitsu, S. Shoji, "High Efficiency Synthesis of Br Addition Ligand by Microfluidic Device", 43rd International Conference on Coordination Chemistry (ICCC 2018), 2018.07.30-08.04, Sendai (2018) A01139-DT
4. T. Tanaka, K. Imato, K. Yoneda, D.H. Yoon, T. Sekiguchi, S. Shoji, N. Takeda, "Fabrication of Long Luminant Tissues in Three-Dimensional Gel Scaffolds with Oriented Cellulose Nanofibers", 5th Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society World Congress 2018, (5th TERMIS World Congress 2018), 2018.09.04-07, Kyoto (2018) 01-P230
5. K. Imato, K. Yoneda, T. Tanaka, D.H. Yoon, T. Sekiguchi, S. Shoji, N. Takeda, "Fabrication of Long

Myotube Bundles in Three-Dimensional Gel Scaffolds with Oriented Cellulose Nanofibers”, 5th Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society World Congress 2018, (5th TERMIS World Congress 2018), 2018.09.04-07, Kyoto (2018) 01-P237

6. C. Tang, D.H. Yoon, T-Sekiguchi, S. Shoji, “Oil-In-Water Droplet Formation in Hydrophobic PDMS Device Using Three-Dimensional Protruded Taper Channel”, The 22nd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2018), 2018.11.11-15, Kaohsiung, Taiwan (2018) pp.395-397
7. Y. Tanaka, N. Suzuki, K. Moro, J. Mizuno, S. Shoji, S. Uemura, Y. Shirasaki, “Measurement of the Cell Migration and Cytokine Secretion Activity with Real-Time Imaging System”, 29th 2018 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS 2018), 2018.12.09-12, Nagoya (2018)

4.2 総説・著書

なし

4.3 招待講演

なし

4.4 受賞・表彰 (MS 明朝体、11 ポイント)

「CIAiS International Symposium 2019 Best Poster Award」、前田世蓮、“Water-Electrokinetic Energy Harvester Using Flexible Woody Carbon Film“

4.5 学会および社会的活動

化学とマイクロ・ナノシステム研究会 評議委員

マイクロマシンセンター 国内外技術動向調査委員会委員

電子情報技術産業協会 センシング技術専門委員会委員

5. 研究活動の課題と展望

本研究では、引き続き MEMS やナノ／マイクロ流体工学の研究を通して、化学・生化学分野で実際に応用できるシステムの開発を行っている。単一細胞解析の要求に即したの技術開発を進め、さらに新たな機能を持つデバイス開発を引き続き行う必要がある。実用化を目指す上では集積システム化の研究が重要となり、マイクロ流体デバイス間の整合性に関する研究をさらに進める必要がある。