

### 3 電気化学計測技術を応用したシングルセル呼吸計測技術の開発

山形大学工学部技術部  
計測技術室 高倉 啓

#### 1. 研究の背景

ミトコンドリアは呼吸によりエネルギーを生産する真核生物の細胞小器官であり、呼吸は細胞活動の重要な指標である。この点に着目して、筆者が所属する研究室では、電気化学計測技術を応用した「受精卵呼吸測定装置」の開発に成功しており、家畜繁殖分野や不妊治療で実用化されている。しかしながら、現行装置では受精卵と比較してサイズが小さい培養細胞の呼吸計測は困難である。培養細胞の呼吸計測システムを確立することができれば、単一細胞レベルでの細胞呼吸機能診断が可能となる。そこで本研究では単一培養細胞呼吸測定技術の確立を目的とした。

#### 2. 実験方法

実験にはラット前立腺癌細胞 (Mat-Lu)、ウサギ扁平上皮癌細胞 (VX2)、ヒト子宮癌細胞 (HeLa)、マウス肺線維芽細胞 (MLg) を使用した。呼吸測定には受精卵呼吸測定装置 (株式会社北斗電工)、呼吸測定液 (ERAM-2、株式会社機能性ペプチド研究所)、自作の白金微小電極を使用した。呼吸測定後、グリッドシールにより同一の細胞を追跡し、ミトコンドリア染色を行ない、キャピラリーガラスで吸引して単一細胞を個別に回収した。ミトコンドリア染色は MitoTracker Orange CM-H<sub>2</sub> TMRos (Life Technologies) または JC-1 (Life Technologies) を用いて行なった。回収した単一細胞から Total RNA Isolation (Takara) にて RNA を抽出し、Takara

PrimeScript RT reagent kit (Takara) を用いて逆転写反応を行ない、AmplitaqGold (Applied Biosystems) を用いて PCR (polymerase chain reaction) を行なった。

#### 3. 実験結果

##### 3-1. マイクロ電極走査条件の検討

呼吸測定値は対象と電極の位置によって変化するため、比較的サイズの大きい細胞 (VX2) を使用してマイクロ電極走査条件の検討を行なった。走査開始位置を培養皿底面から 30  $\mu\text{m}$  ~ 100  $\mu\text{m}$  の範囲で変化させた時の呼吸量の値を 10 個の細胞で調べた (図 1)。電極走査開始位置が 30  $\mu\text{m}$  の時に呼吸量は最大となり、50  $\mu\text{m}$  以上離れた位置では計測できないことが分かった。

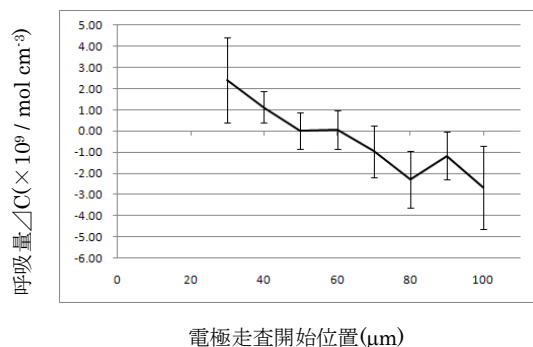


図 1 電極走査開始位置と呼吸量

##### 3-2. マイクロ電極先端径の検討

電気化学計測の感度は電極の先端径に反比例するため、先端径 5  $\mu\text{m}$  と 2  $\mu\text{m}$  のマイクロ電極を用いて同じ細胞 (VX2) の呼吸量を比較

した (表 1)。先端径 2  $\mu\text{m}$  の電極の方が呼吸量は大きな値となることが分かった。

表 1 マイクロ電極先端径と呼吸量

Sample no.	酸素濃度変化 $\Delta C \times 10^{10} / \text{mol cm}^{-3}$	
	先端径 5 $\mu\text{m}$	先端径 2 $\mu\text{m}$
1	$-2.60 \pm 3.41$	$5.52 \pm 5.39$
2	$5.16 \pm 2.83$	$20.8 \pm 11.3$
3	$8.40 \pm 5.51$	-
4	$4.44 \pm 4.15$	$10.2 \pm 4.18$
5	$4.20 \pm 3.64$	$11.0 \pm 9.80$

### 3-3. 単一細胞の呼吸量測定と活性型ミトコンドリアの検出

ここまでの検討で、最適な測定条件は培養皿底面から 30  $\mu\text{m}$  離れた位置での先端径 2  $\mu\text{m}$  のマイクロ電極の Z 軸方向への挿引であることが分かった。単一細胞呼吸測定システムの有効性を検証するため、サイズの小さい細胞 (HeLa) の呼吸量を測定し、活性型ミトコンドリアの染色を行なった (表 2)。計測された呼吸量とミトコンドリア染色の強度に相関がみられたことから、単一細胞呼吸測定システムの有効性が示された。

表 2 活性型ミトコンドリア染色と呼吸量

酸素濃度変化 $\Delta C \times 10^{10} / \text{mol cm}^{-3}$	
活性型ミトコンドリアが染色された細胞	活性型ミトコンドリアが染色されなかった細胞
$6.18 \pm 1.17$	$-1.53 \pm 3.11$
$3.35 \pm 2.18$	$-3.26 \pm 2.41$
$2.98 \pm 0.61$	$2.10 \pm 3.41$

### 3-4. 単一細胞の Cox 遺伝子発現解析

ミトコンドリア呼吸機能のさらなる理解のためには細胞レベルや小器官レベルでの解析だけではなく、遺伝子レベルでの解析も必要である。ミトコンドリアで唯一酸素を消費してい

る呼吸鎖複合体 IV を構成するシトクロム c オキシダーゼ (COX) サブユニットに着目して、MLg の Cox 遺伝子発現解析を行なった (図 2)。単一細胞において呼吸測定と Cox 遺伝子発現解析を続けて行なうことが可能であることが分かった。

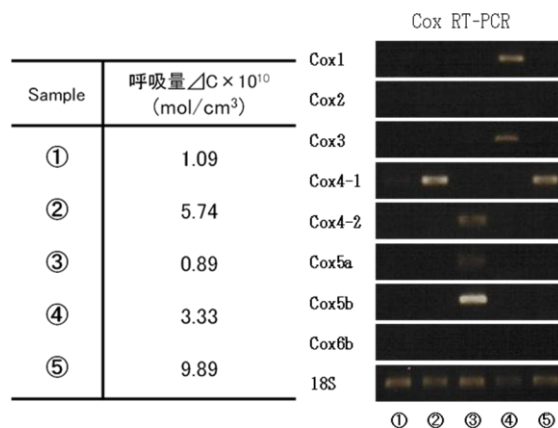


図 2 MLg の呼吸量と Cox 遺伝子発現

## 4. まとめ

- (1) 「受精卵呼吸測定装置」で単一培養細胞の呼吸量測定が可能であった。
- (2) 最適な測定条件は、培養皿底面から 30  $\mu\text{m}$  離れた位置での先端径 2  $\mu\text{m}$  のマイクロ電極の Z 軸方向への挿引であった。
- (3) 単一培養細胞の呼吸量と活性型ミトコンドリア染色の強度に相関が認められた。
- (4) 単一培養細胞の Cox 遺伝子発現解析が可能であった。

## 5. 謝辞

本研究に関してご指導ご助言を頂きました山形大学大学院理工学研究科バイオ化学工学専攻の阿部宏之教授、黒谷玲子助教に深く感謝致します。本研究は平成 24 年度科学研究費補助金 (奨励研究、課題番号: 24921009) の助成を受け実施しました。