

プレーナーパッチクランプによる単一細胞解析

—細胞内容物の抽出と mRNA の定量解析—

Single cell analysis using planar patch clamp:

Extraction of the cytoplasm and quantitative analysis of mRNA

名大グリモ¹, 名大医², JST-CREST³, 山梨大⁴, 北陸先端大⁵○宇野 秀隆^{1,3}, 王 志宏^{1,3}, 石垣 診祐^{2,3}, 浮田 芳昭^{3,4}, 高村 禪^{3,5}, 宇理須 恒雄^{1,3}Nagoya Univ. GREMO¹, Nagoya Univ. Sch. Med.², JST-CREST³, The Univ. Yamanashi⁴, JAIST⁵○H. Uno^{1,3}, Z-H. Wang^{1,3}, S. Ishigaki^{2,3}, Y. Ukita^{3,4}, Y. Takamura^{3,5}, T. Urisu^{1,3}

E-mail: hideuno@gym.nagoya-u.ac.jp

生物は非常に多くの細胞で構成されており、その細胞は遺伝子やタンパク質の発現、分化増殖、免疫系、代謝等の様々な生命活動を制御している。従って、細胞の機能解析は、生体反応機構の解明にとどまらず医療分野にも大きく貢献する。近年、細胞を単に集団機能としてではなく、それぞれ高い情報能や応答性を有する生命体分子として単一細胞レベルでの解析が注目されている。例えば 1 つの細胞を無作為に解析するのではなく、細胞集団を同時に 1 細胞レベルで解析し、その中から疾患等に関与する単一細胞の詳細な機能解析を行うことが重要である。プレーナーパッチクランプを用いる単一細胞解析は、個々の細胞の位置情報を保持し、一度に膨大な数の生きた細胞の分子情報を網羅的に処理できることが大きな利点であるため、打って付けの手法といえる。

本研究では、プレーナーパッチクランプ用に開発した基板及び抽出装置を用いて単一の細胞体より細胞内容物の抽出を試みた。抽出実験テスト細胞としてヒト胎児腎細胞由来の細胞(HEK293 細胞)を用いた。細胞内容物に蛍光タンパク質 GFP を遺伝子発現させ抽出実験のマーカーとして利用した。細胞はまず一次吸引 (5 kPa) により、プレーナーパッチクランプチップの微細貫通孔 (2 μm) [Fig.(a)] 上へ配置した[Fig.(b)]。その後、細胞膜破壊を目的に二次吸引として 15 kPa まで吸引圧力を増大させることにより、細胞の位置を保持した状態で、細胞内の GFP 蛍光強度の急速な減衰を確認した[Fig.(c)]。この蛍光強度の減衰は細胞膜が微細貫通孔地点での吸引圧力により細胞膜が破壊され細胞内用物が抽出された結果である。我々はさらにこの抽出溶液を回収し、GFP の mRNA を逆転写し、リアルタイム PCR を用いた定量解析を行った。詳細については当日報告する。

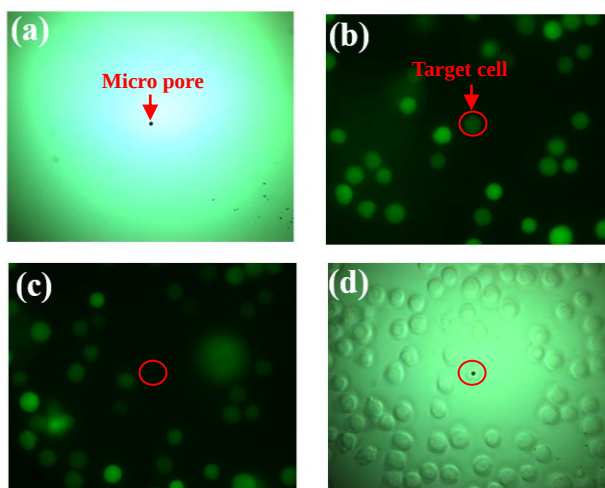


Fig. Observation of the fluorescence reduction with a single cell on the micro-pore of the patch clamp chip by suction. (a)before, (b)seeding and trapping, (c)extraction of the cytoplasm cell, (d) after