

酸化グラフェン-DNA アプタマセンサを用いた細胞分泌物の時空間計測

Detection of cell-secreted proteins using graphene-oxide - DNA aptamer sensor

NTT 物性基礎研・BMC ○宮廻 裕樹, 手島 哲彦, 上野 祐子

NTT-BRL/BMC, ○Hiroki Miyazako, Tetsuhiko Teshima, Yuko Ueno

E-mail: hiroki.miyazako.vd@hco.ntt.co.jp

【緒言】

グラフェンや酸化グラフェン(GO)は、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) のアクセプタとして振る舞うことが知られており、当研究グループではこれまでにグラフェンと DNA アプタマを組み合わせた FRET バイオセンサを研究してきた。これまでの研究では純粋なタンパク質溶液を測定対象としていたが、細胞外へ分泌されたタンパク質の空間分布を測定するには、分泌タンパク質の拡散によるタンパク質濃度の低下などの問題により困難であった。本研究は、GO-DNA アプタマセンサが内壁に修飾された 3 次元構造体内に細胞を封入させて分泌タンパク質の拡散を抑制することにより、細胞から分泌されたタンパク質を検出した実験結果について報告する。

【実験】

本研究では、先行研究[1,2]で提案されたグラフェン-パリレン二重膜の自己組立て技術を応用した。犠牲層となるアルギン酸ゲル薄膜上にグラフェンを転写し、その上にパリレン-C を厚さ 150 nm で蒸着した。その後、GO をパリレン上にスピンコートし、アミノ基と蛍光分子 (5-Carboxytetramethylrhodamine) が修飾された DNA アプタマを GO 上に修飾した。細胞懸濁液を基板の上に滴下し、EDTA を加えてアルギン酸ゲルを溶かすことにより、グラフェン-パリレン-GO の 3 重膜が自律的に筒状に曲がり、細胞を内包させることができた (Fig. 1(a))。本研究ではシトクロム C を検出対象とし、アポトーシス中におけるヒト肝がん由来細胞(HepG2)から放出されるシトクロム C を提案した 3 次元 GO-DNA アプタマセンサによって検出した。

【結果・考察】

アポトーシス誘導後 4 時間の間は蛍光強度に大きな違いが見られなかったが、4 時間後より 3 次元構造体の外部および内部の細胞周辺において蛍光強度の上昇が見られた (Fig. 1(b))。また、構造体内の細胞周辺で蛍光強度のピークが見られた (Fig. 1(c))。一般的にアポトーシス誘導された細胞では、ミトコンドリア中のシトクロム C が細胞質に移動し、さらにアポトーシス後期では細胞膜が破壊されることが知られている。したがって、この蛍光強度の上昇は細胞質中のシトクロム C が細胞外へ放出される過程が観測されたものと考えられる。

【謝辞】 本研究の一部は JSPS 科研費 17H02759 の助成を受けて遂行された。

【参考文献】 [1] T. F. Teshima *et al.*, Nano Lett. **19**(1), 461-470 (2019). [2] K. Sakai *et al.*, Nanoscale, **11**(28), 13249-13259 (2019).

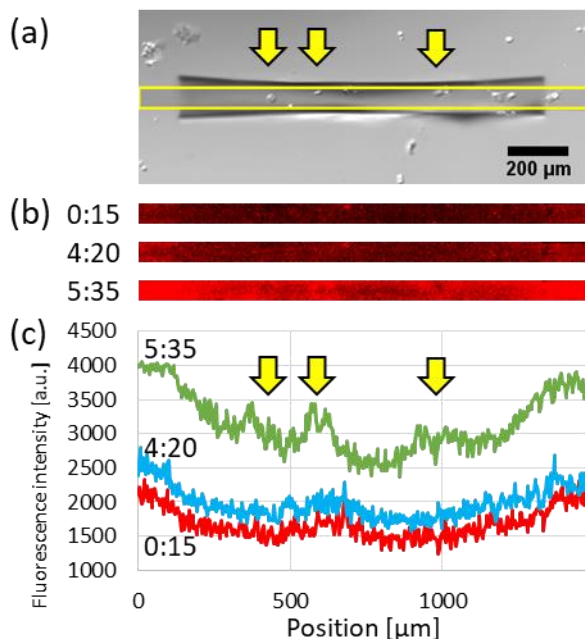


Fig. 1: Fluorescence increase after apoptosis induction. (a) Phase-contrast image. (b) Fluorescence images. (c) Spatial distribution of average fluorescence intensity.