

【目的】 短鎖のノンコーディング 1 本鎖 RNA であるマイクロ RNA (miRNA) は、細胞の発生・分化・増殖など様々な生命現象を調節する機能を担っている。さらに、細胞外に放出される分泌型 miRNA は、細胞間の情報伝達機能を有し、miRNA の分泌量がガンや心疾患など様々な病気に応じて変化することが知られている。そのため、細胞から放出される miRNA をリアルタイムで計測することは、細胞が関係する様々な生命現象の解明に繋がり、細胞生物学・創薬科学・診断医学など多くの学術分野への貢献が期待できる。分泌型 miRNA の検出・解析方法としては、定量 PCR、miRNA アレイ、RNA シークエンサが従来からよく用いられており、近年では検出感度の向上および検出時間の短縮を目指し電気化学 DNA (e-DNA) センサやナノポアセンサなどの手法が応用されている。しかしながら、どの解析手法においても、前処理プロセスが必要であり、細胞から放出された miRNA のオンサイト・リアルタイム検出は達成されていない。一方我々のグループでは、マイクロ・ナノ電極先端に脂質二分子膜形成しポア形成膜タンパク質を再構築した生体ナノポアプローブを開発することで、ナノポアセンシングによる局所的なケミカルセンシング技術を確認している。本生体ナノポアプローブでは、脂質溶液と水溶液が層となった浴溶液に電極を挿入することで脂質二分子膜を形成可能であり、ナノポアの分子通過を電氣的に計測するナノポアセンシングプラットフォームとして非常に有用である。そこで本研究では、本生体ナノポアプローブ技術を応用し、細胞近傍に脂質二分子膜を形成することで細胞から放出される miRNA の検出が可能なプローブ型人工細胞膜システムの開発を目的とする。

【方法】 人工細胞膜プローブシステムの基礎的技術を確認させるために、マイクロ電極先端に形成される微小空間の最適化および生体ナノポアプローブの位置制御による局所核酸分子検出実験を行った。プローブ型人工細胞膜システムでは、浴溶液に対しプローブ側の溶液量が非常に少ないため、ナノポアセンシングによる移動によって溶液内のイオン濃度が変化し電流値が減衰するという問題点があった。そこで、電極をエッチングすることでマイクロ電極先端に形成される微小空間サイズを制御し、微小空間サイズに対するイオン電流の減衰の関係性を明らかにした (図左)。局所核酸分子検出実験では、プローブをナノメートルレベルで位置制御可能な走査型プローブ顕微鏡システムを構築し、細胞を模擬したマイクロメートルスケールの細孔から放出される核酸分子の検出実験を行った (図右)。

【結果】 微小空間サイズの最適化においては、微小空間サイズを 200 pL 以上とすることでチャンネル電流測定における電流減衰を低減可能であることが分かり、生体ナノポアプローブ開発における設計指針を確認することができた。今後は、ナノポアセンシングによる微小空間内への核酸分子の取り込み量の影響についても検討し、プローブサイズの最適化を試みる。一方、局所核酸分子検出実験においては、プローブ - 試料間の距離によって変化するイオン電流値からプローブ - 試料間の距離を補正した後に、プローブを試料と水平に移動させることで細孔から放出される核酸分子濃度勾配をマッピングすることに成功した。以上のように本研究では、生体ナノポアプローブの設計指針の確認、生体ナノポアプローブを用いた局所核酸分子の検出に成功した。今後は、新たな細胞観察機能として本システムを応用し、細胞伝達機能の調査および細胞情報伝達に関連する様々な疾患の病理メカニズムの解明を目指す。

生体ナノポアプローブの最適化および局所核酸分子検出実験

