

「ヒト直交性酵素」と微小液滴による高感度かつダメージレスな1細胞分析・分取技術の開発



SATテクノロジー・ショーケース2026

■はじめに

近年、疾患診断や治療法開発において、細胞間の多様性や不均一性に着目した研究が急速に拡大している。このような研究の基盤を支える技術として、「1細胞分析・分取」が非常に重要である。従来法であるフローサイトメトリー(FCM)は、高いスループット性を誇るもの、数コピーレベルの低発現タンパク質の検出が困難であることや、細胞分取時の外部刺激によるダメージが問題であった。高感度化を実現する手段として、酵素抗体法による蛍光シグナル増感が用いられているが、増感酵素にも課題が残る。従来用いられてきた増感酵素(アルカリフェオスマターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ペルオキシダーゼ)は、細胞自身に同一の酵素活性が内在するため、内在酵素の事前失活操作が必要であり、これにより細胞死が生じる。また、これらの酵素はそれぞれ酵素反応の至適条件が異なるため、複数タンパク質の同時検出には使用できない¹⁾。

本研究は、高感度かつダメージレスな1細胞分析・分取技術の開発を目指し、「ヒト直交性酵素: Human Orthogonal Enzyme (HOE)」と「微小液滴による1細胞の内包」を組み合わせた戦略を提案する。HOEとは、我々の研究グループで見出したヒト細胞に同一の酵素活性が内在しない酵素であり、内在酵素の失活が必要ない。また、生理条件下で高い酵素活性をもち、複数種のHOEが同時に使用可能であるという特徴を有する²⁾。HOEを抗体標識した1細胞を微小なW/O型液滴に封入し、液滴内で標的タンパク質特異的な蛍光シグナル増感を行う(図1)。これにより、蛍光シグナル濃縮による高感度化、複数タンパク質の同時検出、及び微小液滴による外部刺激からの細胞保護を実現する。

■活動内容

1. 「ヒト直交性酵素」とそれに応答する蛍光基質の探索

HOEの中から、 β -xylosidase (Xyl)、 α -rhamnosidase (Rham)という2つの糖加水分解酵素を選択した。これらの酵素は交差反応性を持たず、同一溶液中で同時に作用が

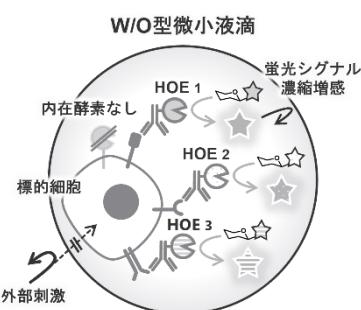


図1 「ヒト直交性酵素」を用いた
微小液滴内の1細胞分析

可能である。それぞれの酵素に応答するTurn-on型蛍光基質(sTG-Xyl, sTM-Rham)を合成した。これらの基質は、W/O型液滴に内包した際、液滴から漏出しないことを確認した。

2. 微小液滴中の1細胞検出

PC-9細胞をHoechst 33342で核染色し、標的タンパク質としてEpCAMおよびCD44を選択した。EpCAMにRham、CD44にXylを抗体介在的に標識した。得られた酵素標識細胞をsTG-RhamおよびsTM-XylとともにOn-chip Dropgeneratorを用いてW/O液滴内に内包し、室温で1時間酵素反応を行った。その後、蛍光顕微鏡により各蛍光シグナルを観察した。

3. 結果及び考察

Hoechst 33342の蛍光が確認された液滴が細胞を含む液滴であり、これらの液滴においてのみsTGおよびsTM由来の蛍光シグナルの増加が観察された(図2)。一方、細胞を含まない液滴では蛍光の増加は認められなかった。これらの結果から、標的タンパク質特異的な酵素反応により蛍光シグナルが生じていることが示唆された。

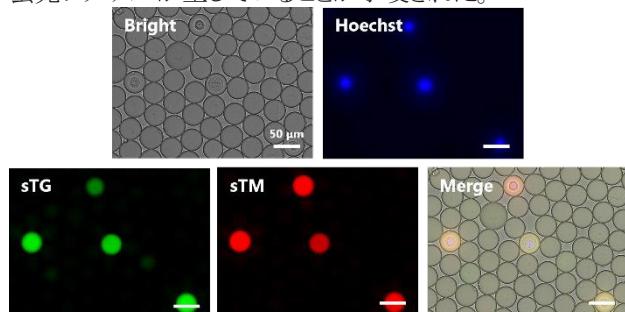


図2 細胞を含む液滴における
標的特異的な蛍光シグナルの観察

4. 展望

今後は、本技術を微量ながん細胞の分取や有用タンパク質を発現する細胞のスクリーニングに応用し、疾患のメカニズム解明や新規治療薬の開発につなげていく予定である。

■関連情報等(特許関係、施設)

特許

哺乳類直交性酵素及びその利用(PCT/JP2022/19229)

参考文献

1) Z. Liu, et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 2014, 106, 1.

2) R. Kaneko, et al., *BUNSEKI KAGAKU*, 2022, 71, 101.

- キーワード: (1)「ヒト直交性酵素」
- (2)マイクロ流体デバイス
- (3)シングルセル解析

- 共同研究者: 藤村祐(On-chip biotechnologies, Co, Ltd.)
- 浦野泰照(東京大学)
- 小松徹(東京大学)