

先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム) 実施状況報告書(平成22年度)

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	1 細胞分析法が拓く受精卵および幹細胞の新規品質評価システムの開発
研究機関・ 部局・職名	東北大学・大学院環境科学研究科・准教授
氏名	珠玖 仁

1. 当該年度の研究目的

本研究では、これまで mRNA の定量解析を中心に展開してきた 1 細胞分析システムを拡張し、[エピゲノム-遺伝子-タンパク質-代謝]の階層横断的情報統合により複合的指標を提供することを目標とし、受精卵および幹細胞の品質評価に応用する。具体的には、新規細胞回収プローブ（テーマ①）、多項目並列分析システム（テーマ②）を統合し、ハイスループットな 1 細胞分析システムを構築する（テーマ③）。また、エピジェネティックな情報取得を可能とする 分析システムの開発として、ChIP(クロマチン沈降法)と MSP(Methylation specific PCR)を検討する（テーマ④）。さらにセルソーターやデジタル PCR に接続するインターフェースを開発する。これらのシステム開発は、当初研究蓄積のあるレポーター遺伝子導入細胞系、単層培養系、3次元培養系をサンプルとして用いる。引き続きマウス受精卵、マウス胚様体 (Embryoid body, EB)、ES/iPS 細胞コロニー、ラット臍島の品質評価に応用する。平成 22 年度の研究目標は以下のとおりである。

- I. レポーター遺伝子導入細胞系で、異なる半減期のタンパク質を発現させ、mRNA およびタンパク質発現の 1 細胞レベルでの相関係数の変化を詳細に追跡する。細胞塊(スフェロイド)を作製し、1 細胞レベルおよび細胞集団のレベルでの発現ゆらぎの関係について調査する。(テーマ①)。
- II. 単層培養系で損傷回復モデルを検討する。細密充填の細胞シートの一部を剥がし、その修復過程における成長因子の種類と遺伝子発現の関係を 1 細胞レベルで追跡する。同様にして細胞塊(スフェロイドおよび胚様体)の一部を破壊して、その回復過程を追跡する(テーマ①)。
- III. セルソーターおよび同調培養により細胞周期を均一にし、1 細胞分析の結果 mRNA やタンパク質の発現分布の変化を詳細に解析する(テーマ①)。
- IV. 液滴型流路デバイスの基礎特性を取得する(テーマ②)。

2. 研究の実施状況

I. リアルタイム定量 PCR の手法により、1 細胞レベルで遺伝子発現分布を解析した。その結果、内在性遺伝子・一過性発現系レポーター遺伝子、恒常発現系レポーター遺伝子のいずれの場合においても、極めてブロードな発現分布を示し対数正規分布に基づきフィッティングした。F 検定に基づく分散分析では、細胞・遺伝子の種類に関わらず等分散に収束していることが示唆された。細胞回収プローブで採取する細胞数が 2, 3, 4 細胞の場合、内在性遺伝子・恒常発現系レポーター遺伝子のいずれの場合においても分散が小さくなる傾向にあったが、F 検定では有意差が得られなかった。1 細胞に導入するレポーター遺伝子の量を調整し 1 細胞あたりで発現する mRNA が $10^3 \sim 10^7$ コピーの全ての場合において、分散に関して F 検定では有意差が得られなかった。さらに、 $10^3 \sim 10^4$ 細胞からなるスフェロイドのサイズと内在性遺伝子発現量の関係を調査したが、いまのところ相関は得られていない。これに対し、非細胞由来の標準核酸サンプルを同様に PCR で定量した場合細胞由来の遺伝子発現分布と明確に判別可能であった。

II. ヒト乳がん細胞株 MCF-7 をコラーゲン被覆透明電極 (ITO 電極) 状に播種し、細胞シートの一部を剥がし、その修復過程における成長因子の種類と遺伝子発現の関係を血清飢餓培

様式19 別紙1

地中で追跡した。ハウスキーピング遺伝子に加え、上皮成長因子受容体ファミリー遺伝子、リン酸化シグナル伝達経路の遺伝子発現を1細胞レベルで定量した結果、基本的には、大量細胞系（約 10^4 細胞）で得られる1細胞あたりの遺伝子発現量とよく一致した。しかし、上皮成長因子（EGF）を添加した場合のHer-2(human epidermal growth factor receptor type2)遺伝子発現量が、損傷回復部位で顕著に増加していることが示唆された。

III. ヒト子宮頸がん細胞株HeLaの同調培養系にて、サイクリンDを含む細胞周期関連遺伝子の発現量を1細胞レベルで定量した。細胞周期特異的に発現する蛍光タンパク質レポーター遺伝子を導入し、細胞周期と遺伝子発現の関連について1細胞レベルで追跡可能であることが確認できた。

IV. 我々が確立した、分泌型アルカリホスファターゼ（SEAP）をレポーターとする1細胞応答の電気化学検出系を、マイクロ流路デバイスに連結するための基礎的検討を実施した。流路デバイス上に配置した電極でアルカリホスファターゼ反応を検出することに成功した。

3. 研究発表等

雑誌論文 計0件	(掲載済み-査読有り) 計0件 (掲載済み-査読無し) 計0件 (未掲載) 計0件
会議発表 計1件	専門家向け 計1件 1. <u>H. Shiku</u> , G. Saito, T. Yamakawa, Y. Takahashi, K. Ino, T. Matsue, SINGLE-CELL MESSENGER RNA ANALYSIS FOR WOUND HEALING, University of Tokyo, The 5th International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, Tokyo, March 03-04, 2011. 一般向け 計0件
図書 計0件	
産業財産権 出願・取得状況 計0件	(取得済み) 計0件 (出願中) 計0件
Webページ (URL)	http://www.che.tohoku.ac.jp/~bioinfo/
国民との科学・技術対話の実施状況	該当なし

様式19 別紙1

新聞・一般雑誌等掲載 計0件	
その他	該当なし

4. その他特記事項

該当なし

実施状況報告書(平22年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されます

1. 助成金の受領状況(累計) (単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額
直接経費	120,000,000	0	76,100,000	43,900,000
間接経費	36,000,000	0	22,830,000	13,170,000
合計	156,000,000	0	98,930,000	57,070,000

2. 当該年度の収支状況 (単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を 除く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度 執行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額
直接経費	0	76,100,000	0	76,100,000	256,790	75,843,210
間接経費	0	22,830,000	0	22,830,000	90,000	22,740,000
合計	0	98,930,000	0	98,930,000	346,790	98,583,210

3. 当該年度の執行額内訳 (単位:円)

	金額	備考
物品費	250,490	実験用消耗品、PC等
旅費	0	
謝金・人件費等	0	
その他	6,300	圧力調整器修理
直接経費計	256,790	
間接経費計	90,000	
合計	346,790	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
該当なし				0		
				0		
				0		