

Capillary Electrophoresis System using Biological Reaction of Single Cell as a Sensor Probe

○学 佐藤 達也 (大阪大)

正 橋本 守 (大阪大)

安井 武史 (大阪大)

正 荒木 勉 (大阪大)

Tatsuya SATO, Mamoru HASHIMOTO, Takeshi YASUI, and Tsutomu ARAKI

Graduate School of Engineering Science, Osaka University, Machikaneyama, Toyonaka, Osaka, 560-8531

We have constructed a capillary electrophoresis (CES) system using living cells as the sensor tip of CES to monitor the change of cellular environment. In the present system, yeast cell stained with fluorescence dye was applied as the sensor cell. Fluorescence intensity of the probe cell changes according to the change of cellular environment. To confirm the performance of the proposed CES system, the pollutant (Hg^{2+}) and the biological substance (acetylcholine) were applied. Fluorescence intensity of Rhodamine123 (membrane potential sensitive dye for mitochondria), decreased gradually due to effect of the pollutant, while that of Fluo-3 (calcium sensitive dye) increased.

Key Words: capillary electrophoresis, fluorescence microscope, single cell biosensor, environmental monitor

1. はじめに

生物は非常に優れたセンサを有しており、外部からの情報に対して特異的に感受し、すばやい反応を起こす。例えば、細胞表面には物質を認識する受容体と呼ばれるセンサがあり、これはアミノ酸がたった一個違うだけの2つのタンパク質や同じ分子の2つの光学異性体すらも区別できるほど優れたものである。我々は、このような生物の持つセンサに注目し、生物のおかれた周囲の環境を評価しようと試みた。

本研究においては、細胞周囲の局所環境を変化させ、細胞の起こす応答を蛍光強度の変化を通じてモニタすることを目的としている。そこで、キャピラリーチューブの中に蛍光標識された細胞を入れ、電気泳動によって環境を変化させて、細胞の応答を観測した。一般にキャピラリー電気泳動を用いて化学物質を移動し、検出器により化学物質を検出する実験はよく行われているが、本研究では細胞をセンサープローブとして、局所領域で化学物質を検出できないか検討する。

2. 実験装置

本研究で用いたキャピラリー電気泳動装置の概略図を Fig.1 に示す。キャピラリーは、内径 $25\mu\text{m}$ 外径 $150\mu\text{m}$ の熔融石英キャピラリーチューブ (ジーエルサイエンス) を使用した。キャピラリー全長を 310mm とし、キャピラリー内に細胞を含んだバッファ (0.01M PBS, $\text{pH}7.3$) を導入する。キャピラリー内に入り込んだ細胞は、いくつか管壁に付着して固定される。その後キャピラリーの一端をバッファに、他端を試料溶液に入れて、白金電極を差し込み、直流電圧 7kV を印加する。電圧印加によって、試料溶液がキャピラリー内をバッファ槽側へ移動し、細胞を刺激する。

実験に用いる細胞として、直径約 $5\mu\text{m}$ の酵母菌を使用した。細胞は 37°C で 12 時間インキュベートした後、適切な蛍光色素で染色を行った。

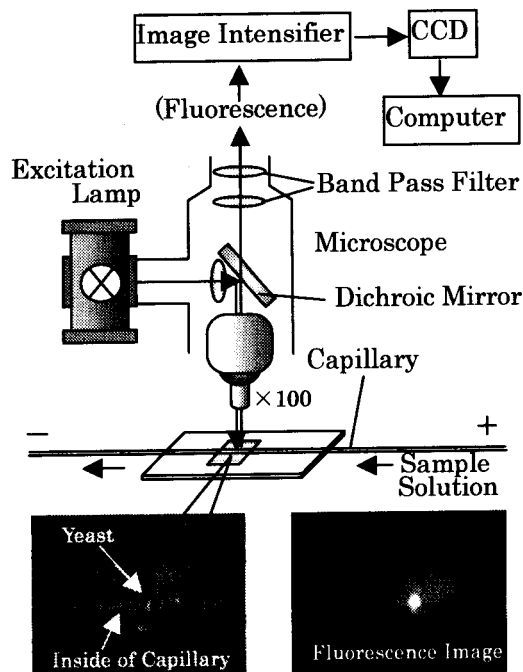


Fig.1 Capillary Electrophoresis System

3. 実験・結果

(1) 環境汚染物質の検出

はじめに、細胞を蛍光色素 Rhodamine123 で染色した。

Rhodamine123 は、ミトコンドリアの膜壁に吸着するが、その量は膜電位が高くなると増加し、低くなると減少する。従って、その蛍光は膜電位の指標となる。細胞周囲の環境に環境汚染物質が現れれば、細胞の活性が弱まり、膜電位が減少すると考えられる。Fig.2 は環境汚染物質 Hg^{2+} で細胞を刺激した際の Rhodamine123 の蛍光強度変化を表している。 Hg^{2+} を加えた場合は、 Hg^{2+} を加えない場合に比べ蛍光強度が急激に減衰することが確認された。

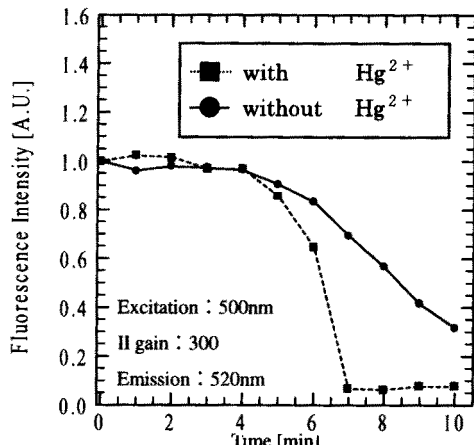


Fig. 2 Change of fluorescence intensity of single-cell-combined Rhodamine123

(2) 細胞の生死確認実験

(1)の実験から、環境汚染物質によって細胞の蛍光強度が急激に減衰するのが確認された。しかしこの蛍光減衰は、生きた細胞の応答ではなく、細胞が死亡した結果起こったものである可能性がある。そこで、死細胞を選択的に染色する蛍光色素 DAPI によって細胞の染色を試み、細胞の生死を確認する実験を行った。

まず、試料溶液槽に Hg^{2+} を加え電圧を 5 分間印加する。これで、細胞が 5 分間 Hg^{2+} にさらされる。次に試料溶液槽に DAPI をふくむバッファを入れ、電圧を 10 分間印加する。これにより、キャピラリー内に DAPI が満たされる。この状態で 30 分間放置することで細胞の染色を試みたが、細胞は染色されなかった。よって細胞は生きているということが確かめられた。つまり、(1)の蛍光減衰は生きた細胞の起こしたものであることがわかった。

(3) 生理活性物質の検出

最後に行った実験として、生理活性物質を検出する実験を行った。生理活性物質によって刺激された細胞では、細胞内カルシウム濃度が増加することがわかっている。そこでカルシウム指示薬である Fluo-3 で細胞を染色し、細胞を刺激した際のカルシウム濃度の変化を調べることで生理活性物質を検出しようと試みた。本実験で用いた生理活性物質はアセチルコリンである。これを選択した理由としては、アセチルコリンが水溶液中ではイオンで存在する為、キャピラリー電気泳動実験で扱いやすい点や、動物から植物にいたるまでさまざまな生物の中に含まれるものであり、酵母菌を刺激できる可能性が高いことなどが挙げられる。Fig.3 はスライドガラス上に置いた数個の酵母菌の上にアセチルコリン溶液を一滴垂らし、その後その蛍光強度の変化を調べたものである。この結果からわかるように、アセチルコリンを加えることにより細胞内カルシウム濃度が上昇することがわかる。よってアセチルコリンが酵母菌を刺激することがわかる。そこで実際にキャピラリー電気泳動装置で実験を行い、一個体の細胞が刺激を受けて蛍光強度を変化させる経過を調べた。Fig.4 に示すように、アセチルコリンを加えた場合、蛍光強度が一時的に上昇することが確認された。しかし、カルシウム濃度は細胞内のさまざまな情報伝達に利用されているという事

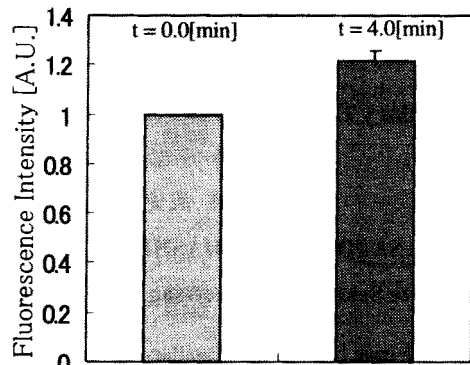


Fig.3 Change of fluorescence intensity of the cells after stimulation by Acetylcholine (N=5)

がわかっている。本当に生理活性物質が特異的に細胞を刺激し、その結果細胞内カルシウム濃度が上昇したのかどうか断定できない。そこで Hg^{2+} を加えた際の蛍光強度の変化を調べた。Fig.5 に示すように、 Hg^{2+} を加えた場合も同様にカルシウム濃度が上昇することが確認された。よって、細胞によって生理活性物質を検出できるかどうかは、現時点では断定できなかった。

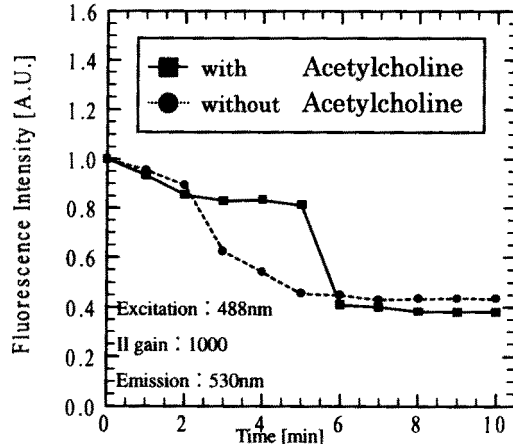


Fig.4 Change of fluorescence intensity of Fluo-3 in a single cell stimulated by Acetylcholine

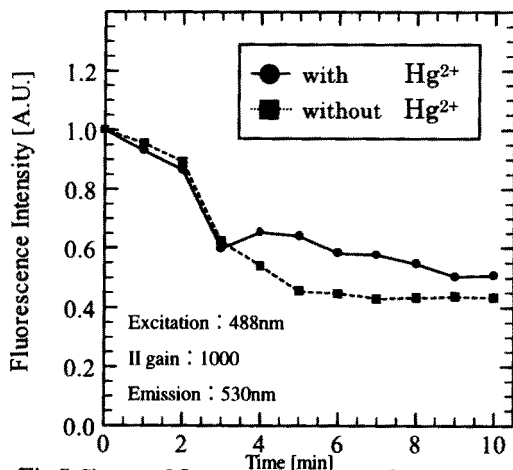


Fig.5 Change of fluorescence intensity of Fluo-3 in a single cell stimulated by Hg^{2+}

※本研究に対して 1999 年度昭和シェル石油環境助成財団よりの研究助成と平成 11,12 年度文部省科学研究費(萌芽的研究 11875063)の助成を受けた。