

**京都大学教育研究振興財団助成事業
成 果 報 告 書**

2021年 6月11日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 藤 洋 作 様

所 属 部 局: 工学研究科高分子化学専攻

職 名: 特定研究員

氏 名: 安藤 満

助 成 の 種 類	令和 02 年度 ・ 研究活動推進助成			
申請時の科研費 研究 課 題 名	膜タンパク質を基軸とした細胞外小胞の理解と機能化技術の創出			
上記以外で助成金 を 充 当 した 研 究 内 容				
助成金充当に関 わる共同研究者	(所属・職名・氏名)			
発表学会文献等	(この研究成果を発表した学会・文献等)			
成 果 の 概 要	研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、添付して下さい。(タイトルは「成果の概要／報告者名」)			
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	1,000,000	円	
	使用した助成金額	1,000,000	円	
	返納すべき助成金額	0	円	
	助成金の使途内訳	費 目	金 額	
		什器購入費	421,982	
		消耗品	466,058	
		研究資料購入	7,480	
旅費(国内のみ)		104,480		
当財団の助成に つ い て	<p>(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。)</p> <p>本助成により研究を継続することができました。ここに記して感謝申し上げます。 今後も本助成事業の様に萌芽段階の挑戦的な研究に支援いただきますと継続して研究の質を高めることが可能ですので、研究者にとっても非常に幸いに存じます。</p>			

試料中に存在するごく微量な生体分子を定量可能な技術を開発することは、疾患の早期発見や治療予後の診断、また、オルガノイドや病理組織など不均一な検体の性質を評価する上でも極めて重要である。生体分子の中でも、DNA や RNA などの核酸分子は 1 分子レベルで検出が可能である一方で、タンパク質に関しては 1 分子レベルでの検出は実現に至っていない。一般的に測定サンプル中のタンパク質濃度の定量評価は、Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)法が広く用いられている。ELISA 法では、抗体を用いて目的タンパク質を捕捉することから特異性が高く、目的タンパク質濃度の検出限界は pg/mL (10^8 分子/mL)オーダーと微量なタンパク質を検出可能である。しかしながら、1 細胞に存在する、あるいは、体液中に存在するごく微量なタンパク質を検出するには検出感度は十分ではないことから、より高感度にタンパク質を検出可能な方法の確立、検出技術の開発が期待されている。

そこで申請者は、微小閉鎖空間である water-in-oil (W/O)エマルジョンを用いたデジタルアッセイに着目し、タンパク質を検出するための反応場として利用することを考えた。しかしながら、エンドポイントアッセイであるデジタルアッセイでは、エマルジョン 1 粒子中に標的分子を 1 分子だけ存在するようにサンプルを調製する必要がある。したがって、この測定原理上の制約により、多検体のハイスループット解析が困難である。そこで本研究では、微量なタンパク質の定量解析へ向け、まず、デジタルアッセイの実験条件上の制約を解消することで、1 つの微小空間内に標的核酸が数百分子以上含まれていた場合でも測定可能な技術の開発を目指した。

タンパク質を用いて検討を進める前進研究として、バキュロウイルスの膜タンパク質である gp64 遺伝子を標的遺伝子として選択して検討を行った。具体的には、定量を行う微小反応場として W/O エマルジョンを採用し、数分子の gp64 遺伝子を非破壊的にソーティングすることでフェムトリアクタを作製した。続いて、PCR による gp64 遺伝子の増幅を行い、エンドポイントアッセイではなくセミリアルタイムアッセイの概念を解析に導入し、標的核酸の増幅を定量、増幅曲線の推移を評価することで W/O エマルジョン 1 粒子に数分子の gp64 遺伝子が存在する場合でも定量可能かを評価した。

まず、デジタル PCR を行う前に qPCR を行い gp64 遺伝子の増幅効率を評価したところ、増幅効率は 96.5%と良好なものであったことから、このプライマーセットを用いて後の検討に進んだ。エマルジョン 1 粒子に 500, 5, 1 分子となる様に gp64 遺伝子を内包し、増幅反応回数が異なる様に PCR を行い、引き続いてデジタルアッセイを行った。その結果、PCR サイクルが 10, 20, 30, 40 サイクルと増加するにつれて、内包した gp64 遺伝子の量に従った増幅曲線が得られた。これは、エマルジョン 1 粒子に複数分子の標的遺伝子が存在する場合でも、セミリアルタイムに解析することでデジタルアッセイの実験場の制約を克服し、定量可能であることを示唆している。さらに解析を

進め、1 エマルジョン内に標的遺伝子が 500 分子以上存在している場合でも定量可能であることが明らかとなった。

今後は、本助成事業により推進したモデル実験の論文化を目指すと共に、タンパク質の定量可能な測定技術へ発展していきたい。