

氏 名 畠山 明子

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1346 号

学位授与の日付 平成 22 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Electric introduction of protein into single cells
with nano-electrodes

論文審査委員 主 査 教授 仁木 宏典
教授 小林 武彦
准教授 木村 暁
助教 伊藤 啓
研究グループ長 中村 史
(産業技術総合研究所)

論文内容の要旨

The injection of substances such as protein and DNA to living cells is indispensable to analyze molecular functions and to elucidate biological reactions. Especially, to investigate the cell-cell interaction and the cell fate determination, it is necessary to deliver object substances to a particular cell surrounded by a lot of neighboring cells. Although several techniques to deliver substances to single cells had been developed, a more simple and convenient technique, which can be applied to crowded single cells with the typical size of $\sim 20 \mu\text{m}$, is required. We have developed a new electroporation technique to deliver substances into single cells on target by applying electric pulses. This method uses the nano-electrode modified from a commercially available conductive-silicon cantilever for the atomic force microscope (AFM). The procedure to prepare nano-electrodes is in two steps; one is to coat the whole surface of the cantilevers to insulate the surface electrically, and the other is to remove the coated agent at a tip.

At first, we coated the surface of cantilevers by an aminosilane, 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES). We use two solvents, hydrated toluene and a 5% water contained ethanol to deposit APTES. To characterize the electrical insulation of the coated cantilevers, impedance was measured at AC electrical fields in a frequency range from 10^2 to 10^5 Hz as well as at DC. As a result, the impedance of the cantilever increased by one order, indicating that the APTES coating is effective to improve surface isolation. Next, the deposited layer was removed only at the tip by scratching a glass surface with AFM. Because a bubble due to electrolysis of water was observed only at a tip of the scratched cantilever, the conductive area was proved to be limited at the electrode-tip. With the electrode, we succeeded in confining the electric field to the tip to perforate cell membrane of single cells.

This technique was applied to inject to fluorescent dye, propidium iodide (PI), into single cells of *Spodoptera frugiperda* (Sf9) in typical diameter of 10-20 μm . PI was added to the PBS solution containing Sf9 cells and the nano-electrode was approached onto the cell membrane. Then a square pulse was applied. The optimal pulse duration was determined at the constant amplitude by monitoring the injection efficiency in different durations. By selecting appropriate pulse duration, we succeeded in injecting the dye into Sf9 cells with the efficiency as high as 100%. In conclusion, the nano-electrodes coated by APTES with removed the coating layer at the tip works well for the electroporation. Next, to apply our electroporation technique to protein, rhodamine-labeled avidin was added to PBS solution containing Sf9 cells. The Injection efficiency reached 67% by selecting appropriate pulse conditions. This result demonstrates that our method is highly effective to inject rhodamine-labeled avidin to Sf9 cells,

although the efficiency is lower than the case of PI. Next, to estimate the invasiveness of our method to Sf9 cells, the viability was measured. We found that, all cells were alive in 18 h (100% viability), indicating that our method is less invasive.

To investigate the effect of the pulse condition, we applied multiple square pulses for injecting PI and rhodamine-labeled avidin. Injection efficiencies of PI were measured at different frequencies, DC, 10 kHz and 50 kHz. At each frequency, the injection efficiency reaches a maximum at a particular pulse duration. We found that the optimal pulse duration increases with increasing frequency. The efficiency is 100% for DC and decreases slightly with increasing frequency in the frequency range less than 50 kHz. The similar tendency was observed when rhodamine-labeled avidin was injected. These results suggest that in the case of Sf9 cells, the single square pulse with the optimal pulse duration is sufficient to obtain the best electroporation efficiency.

Furthermore, we applied this technique to 16-cell-stage embryos of *Caenorhabditis elegans* with hard eggshells. The embryos were fixed to the glass bottom of a culture dish coated with poly-L-lysine. Like the case of Sf9 cells, the nano-electrode was approached vertically to an embryo to apply electric pulses. We succeeded the injection of PI into cells inside the shell by applying electric pulses with relatively large amplitude (13 V). By selecting the appropriate extracellular solution, the embryos repeated cell divisions after the PI injection until later stage in development.

In conclusion, our method is powerful enough to deliver substances into single cells surrounded by neighboring cells and promising to analyze biological reactions such as developmental mechanisms and cell-cell interaction.

博士論文の審査結果の要旨

細胞の中に、タンパク質や核酸、または化合物を注入し、細胞の活動を調べる方法は医学・生物学の研究において重要な手法である。ガラスの微細な針を細胞に刺して物質を導入するというマイクロインジェクション法や電気パルスによって導入するエレクトロポレーション法は、すでに広く研究に利用されている。ナノテクノロジーの発展により、生物研究においても細胞や分子レベルでの操作が可能になりつつある。その中でも、1細胞だけに目的の物質を効率よく導入する技術は、重要な技術の一つと位置づけられ、現在様々な研究開発が行なわれている。畠山明子さんは、原子間力顕微鏡用のカンチレバーを微小電極として使い、標的1細胞の表面でのみ局所的な電気パルスを生じさせ、蛍光化合物やタンパク質を1細胞のレベルで効率よく導入する技術の開発を行い、この技術により培養細胞や初期発生途中の線虫 *C.elegans* の細胞に蛍光化合物の導入が可能であることを実証し、本博士学位論文として報告した。

微小電極には、実用性を考慮し比較的安価な市販の原子間力顕微鏡用のシリコン製カンチレバーを採用した。カンチレバーが微小とはいえ、針全体に導電性があるため、市販のままでは局所的な電気パルスを生じさせ、標的の1細胞だけを操作するには不都合であった。そこでまず、針先端にのみ導電性を高めるように改良を加えた。カンチレバーの電気抵抗値を高めるため、針全体をAminosilane, 3-aminopropyltriethoxysilaneの皮膜で覆うを試みた。そして条件検討の結果、電気抵抗値を約10倍上げることに成功した。次に、針先端部のみ電気パルスを発生させるため、針先端部の皮膜をはがす必要があった。通電、イオンビームによるエッチングなどの方法により皮膜の除去を試みたが、針先端部のみから皮膜を除去するには至らなかった。最終的に、このカンチレバーを使ってガラスの表面を引っ掻くことでこの問題を解決した。針先端部で皮膜が除去されていることは通電時の電気分解により発生するガスの状態で確認した。皮膜の除去処理をしたカンチレバーでは、針先端部でのみ気泡の発生がみられ、針先端部に通電が起っていた。

作成した微小電極で、1細胞への物質の導入ができることを検証するため、培養細胞としては比較的小さくマイクロインジェクション法が困難な昆虫由来のSf9細胞株に、蛍光色素であるPropidium iodide(PI)の導入を試み、これに成功した。また、より分子量の高いローダミン標識のアビジンの導入にも成功した。それぞれの導入効率は100%と67%と高い。またこれらの操作にかかる時間も短く、100細胞への導入が15分で可能であった。アビジンを導入した細胞は、その後も分裂を行ない増殖することを観察し、細胞毒性が低いことを示した。さらに、本技術が発生途中の初期胚の標識実験などに応用可能か実証するために、16細胞期の *C.elegans* 細胞にPIの導入を行なった。 *C.elegans* の初期胚は固い殻に覆われており、マイクロインジェクション法が困難である。比較的高い電圧が必要であったが、この殻を通過してPIを16細胞期の特定の1細胞に導入することに成功した。導入したPIの初期胚での分布は、発生の進行と共に変化した。さらに技術的な改良を加えることで、これまで困難であった *C.elegans* の初期胚での標識実験が可能となることを期待させる成果である。

以上、本申請論文の内容は、1細胞レベルでの物質導入方法をあらたに開発し、線虫 *C.elegans* の発生中の特定の細胞を蛍光標識ができることを可能し、今後の発生学研究の進

展に大きな可能性を与えた点で高く評価できる。以上の理由から、畠山明子さんの学位提出論文は博士号授与の要件を満たすと審査員全員一致で判断した。