

## 細胞上でのダイレクトな増感分析を可能にする「ヒト直交性酵素」を用いたマルチカラー解析と上皮間葉転換の評価への応用

○金子諒右<sup>1</sup>・立石宙也<sup>2</sup>・谷戸謙太<sup>2</sup>・山中皓太<sup>2</sup>・古賀朗寛<sup>2</sup>・新居輝樹<sup>1</sup>・岸村顕広<sup>1,3</sup>・森健<sup>1</sup>・片山佳樹<sup>1,3</sup> (九大院工<sup>1</sup>・九大院システム生命<sup>2</sup>・九州大学分子システム科学センター<sup>3</sup>)

**Multi-colored sensitizing analysis directly on cell by human-orthogonal enzymes and evaluation of epithelial-mesenchymal transition as an application** (Graduate School of Engineering, Kyushu University<sup>1</sup>, Graduate School of Systems Life Sciences, Kyushu University<sup>2</sup>, Center for Molecular Systems, Kyushu University<sup>3</sup>) KANEKO, Ryosuke<sup>1</sup>; TATEISHI, Chuya<sup>2</sup>; TANITO, Kenta<sup>2</sup>; YAMANAKA, Kota<sup>2</sup>; KOGA, Akihiro<sup>2</sup>; NII, Teruki<sup>1</sup>; KISHIMURA, Akihiro<sup>1,3</sup>; MORI, Takeshi<sup>1</sup>; KATAYAMA, Yoshiki<sup>1,3</sup>

【緒言】バイオ分析において、標的を高感度に検出するために酵素反応による増感が行われる。代表的な酵素増感として、ELISA や IHC, Western blot などのタンパク質分析法がある。これらの分析において一般的に用いられる酵素としては、Horse radish peroxidase や Alkaline phosphatase,  $\beta$ -Galactosidase が挙げられる。しかし、これらの酵素を用いて細胞や組織に存在しているタンパク質を分析する場合、元来細胞に存在している酵素活性がバックグラウンドとなる。そのため、ELISA や Western blot には通常、標的の抽出や単離といった工程が含まれるが、コストや煩雑さの観点で望ましくない。また、IHC においては、細胞内酵素の変性失活処理が行われるが、標的タンパク質も同様に変性させるため、正確な分析が困難となる。この問題を解決するため、我々は細胞に内在しない直交性酵素群(HOEs)を見出し、これらの定量分析能力を調査してきた。本発表ではさらに、HOEs に応答する3色の蛍光色素による多色分析を上皮間葉転換(EMT)の評価に適用した。EMT の状態評価には、複数のタンパク質の定量が必要である。今回は細胞上でダイレクトに ELISA を



図1 HOEs を用いた多色 cell ELISA の概略図

おこなう cell ELISA に HOEs と蛍光基質を適用し、多色定量を試みた結果を報告する (図1)。

【実験】HOEs として当研究室で見出した  $\alpha$ -アラビノフラノシダーゼ、 $\beta$ -キシロシダーゼ、 $\alpha$ -ラムノシダーゼを用いた。これらに応答する turn-on 型の蛍光基質として、メチルウンベリフェロンアラビノフラノシド、フルオレセインキシロシド、およびレゾルフィンラムノシドを用意した。酵素基質ペアをそれぞれ N-カドヘリン、ビメンチン、E-カドヘリンの分析に使い、0 から 30 ng/mL の TGF- $\beta$  で 72 時間刺激した A549 細胞を分析した。EMT の誘導状態は細胞の形状と、蛍光抗体で標識した細胞の蛍光顕微鏡観察およびフローサイトメトリー解析によって確認した。

【結果と考察】HOEs を用いた多色 cell ELISA によって、サンプルに対して抽出や、変性処理、電気泳動などの単離操作を施すことなく、複数のタンパク質の発現量変化を同時に定量できた。TGF- $\beta$  濃度依存的な N-カドヘリンおよびビメンチンの増加と、E-カドヘリンの減少を捉えることができ、EMT の進行を簡便に評価可能であることが示唆された。従来用いられている Western blot と比較すると、ライセートやゲル電気泳動、転写などの煩雑な操作がない分、高速化や器械による自動化が可能となる。今後、この多色 cell ELISA を用いて、EMT の阻害効果のある薬剤のスクリーニングなどを行う。