

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25888008

研究課題名(和文) 単一分子レベルでの神経変性iPS細胞における少数核酸イメージング

研究課題名(英文) Single molecule imaging of nucleic acids in neurons

研究代表者

小阪田 泰子 (Osakada, Yasuko)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：00579245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、1. 単一分子レベルでのRNAのイメージングを可能にする、新規なイメージングの手法の開発と、2. 生体分子の局在化計測に向けた磁場によって発光が変化する一粒子観察系の構築を行った。1. では、A. 最適なプローブの設計と合成、評価、B. 単一分子FRETの測定系の構築と観察を行った。2. では、磁場依存発光LNPの合成と最適化と、B. 顕微鏡下磁場発生装置の製作を行い、計測系のセットアップを構築することを目標とした。両研究とも概ね当初の目標を達成し、研究活動スタート支援研究として有意義な研究となった。

研究成果の概要(英文)：In neurons, mRNA is one of key bio-molecules to regulate their functions and survivals. Previously, the localization of individual mRNAs is demonstrated and their location depends on mRNAs such as dendrite and axonal terminus in neurons. More recently, it is demonstrated that mRNAs travels singly to dendrite compartmentalized in one RNA granule. Actin-filament is one of cytoskeletal proteins and functions important roles in cells as well as neurons. Previously, we reported the importance of actin filament for axon guidance and axonal transport. Then, we wondered whether the mRNA of actin filaments travel into axon and are translated in axon. Here, we hypothesize that the mRNA localize into growth cones to maintain the growth of neurons. In this study, we investigate the dynamics of actin-related mRNA. We conducted in situ single molecule imaging of mRNA with pseudo-total reflection fluorescence microscopy.

研究分野：光化学

キーワード：イメージング 核酸 神経

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病などの神経変性疾患の発症機構解明や神経損傷に対する治療法の確立は、社会的に急務な研究課題の一つである。本研究では、神経の成長や維持に關与する RNA の定量的な単一分子空間イメージングにより、神経変性疾患 iPS 細胞での「少数」RNA の機能に關する学術的知見を得ることを目的とした。

iPS 細胞は、ノーベル賞に代表されるように、病態解明や創薬に大きなブレークスルーをもたらすと期待されている。特に、これまで生体より入手困難であったヒト神経変性疾患にかかる神経細胞が、ここ数年で、iPS 細胞株として樹立され、今後、アルツハイマー病などのヒト神経疾患研究を対象とした研究における重要なツールとして利用されることが見込まれる。一方、ノンコーディング RNA は、タンパク質へ翻訳されず、生体内であらゆる機能を果たす RNA の総称であり、その疾病への寄与が近年注目されている。中でもタンパク質翻訳を制御していると見積もられており、その疾病への関与に關して、研究が近年開始された。神経関連の研究分野では、これまでのマウス等を用いた研究により、アルツハイマー病への関与や損傷神経の再生への寄与が示唆されているが、その詳細な作用機序は全てが明らかではなく、更なる研究が望まれる。また、ノンコーディング RNA を含めた RNA のイメージングに關する研究は、最近、固定した HeLa 細胞においてマイクロ RNA の単一分子レベルでイメージング可能であることは示唆されたものの、その一般性および神経細胞への適用はなされていない。加え、神経細胞での一分子レベルでの mRNA の局在化およびシグナル伝達過程での役割は研究開始段階では不明であった。

2. 研究の目的

一分子レベルでの RNA のイメージングを可能にするには、新規なイメージングの手法を開発することが重要であると考えた。

帰国後の新規の研究開始に伴い、細胞イメージングに必要な実験系の構築、神経での活動を調べるための電気生理学的な計測系の構築を含め、実験に必要な実験設備の構築を行うことを目的とした。また、研究期間中の再度の異動に伴い、上記の実験系の再セットアップを行う必要があった。

その上で、単一分子レベルでのイメージング法の確立として、まず 1. mRNA の FRET プロープによるイメージングを試みた。実施機関の異動に伴い、当初目的とした iPS 細胞での実施は現所属機関では困難と考え、ほぼ同等の機能を有する培養細胞での実施に切り替えることにした。

また、研究を行う中で、新たな一粒子イメージング系の構築として、ランタノイド粒子を用いた磁場スイッチングによる生体分子

の観察系の構築についての検討を開始した。生体のイメージングなど、幅広く用いられているランタノイドナノ粒子系 (LNP) は、磁場や電場などの外部環境のセンシング材料として国内外で注目されている。LNP の発光機構は、近赤外光の多光子吸収が起こり最終的に主に可視光領域の発光が見られるが、最近、一部の LNP では外部磁場により発光が減少することが報告されている。これらの材料では、常磁性元素近傍に存在する金属イオンのスピン状態と電子軌道占有率が、外部磁場に依りて僅かに変わること、発光が変化すると考えられているが、その機構は明らかではない。LNP のこれまでの研究の多くは、材料合成の研究に集中しており、磁場効果の解明を目指した研究は非常に少ない。したがって、実験理論両面から、局所磁場と LNP の発光の關係性に關する理解が進めば、新規光応答の開拓や神経での磁場イメージングにつながると考えた。以上の理由から、2. 生体分子の局在化計測に向けた磁場によって発光が変化する一粒子観察系の構築を行ったので報告する。

3. 研究の方法

具体的な研究の方法は、4. 研究成果の項に示した。

4. 研究成果

研究の実施に当たり、実施機関の異動に伴って、研究期間中に、2 回の実験に必要な細胞培養環境の整備、ラットを用いた実験に必要な動物実験の申請を行う必要があった。現在、大阪大学での動物実験承認と細胞培養に關する研究施設整備等が概ね整い、実験を開始できる準備が整った。また、神経のイメージングと共に、電気生理学的なシグナルを計測するシステムの再セットアップも概ね終了し、実験を遂行する準備が整った。以上から、研究のスタートに当たり、必要な基盤的要素の構築は、整った。

1. mRNA の FRET プロープによるイメージング

上記の研究を行うに当たり、A. 最適なプロープの設計と合成、評価、B. 一分子 FRET の測定系の構築と観察を行った。

A. 最適なプロープの設計と合成、評価。

ターゲットとする mRNA として、アクチンに由来する mRNA を、*in vitro* で合成した。この mRNA に特異的に結合する複数の Cy3、Cy5 色素間の FRET を可能にするオリゴヌクレオチドプロープを設計し、実際に合成した。合成法は、末端アミノ修飾されたオリゴヌクレオチドに、蛍光色素の NHS 体を共有結合により修飾し、HPLC を用いて分取・分離することで、プロープ群を合成した。

このプロープ群を用いて、上記に記載したアクチン由来 mRNA のバルクでの FRET による

る検出を、蛍光計を用いて行った。その結果、ターゲットとなる mRNA 存在下で、シグナルの増強を観察し、一分子計測への利用の可能性を見出した。次に、固定した細胞での RNA の検出を試みた。まず、Hela 細胞を固定化し、その後、プローブオリゴをインキュベーションすることで、目的のサンプルを得た。

B. 一分子 FRET の測定系の構築と一分子観察の試み。

一分子 FRET の測定系の構築に向け、2 波長の励起光源を用いた全反射照明蛍光顕微鏡のセットアップを行った。また、構築したセットアップで、A で準備したサンプルの蛍光観察を行った。その結果、いくつかの輝点を観察した。今後、より高感度な一分子イメージングを可能にするには、プローブの配列の最適化、核酸の修飾が必要であると考えた。また、物理化学的なパラメータも考慮したプローブの設計を基に、今後、検討を進める必要があると結論した。以上より、研究活動スタート研究として、目的とした高感度な一分子イメージングを達成する手がかりとなる結果を得ることができ、施設の整備等を行うことが出来た。

2. 生体分子の局在化計測に向けた磁場に感度のある一粒子発光計測系の構築。

本研究の達成を目指し、該当年度は、A . 磁場依存発光 LNP の合成と最適化と、B . 顕微下磁場発生装置の製作を行い、計測系のセットアップを構築することを目標とした。

A . 磁場依存発光 LNP の合成と最適化

実際に、まず手がかりとなる測定に用いる粒子は、Li らの既報の合成方法に従い、合成する。オレイン酸と 1-オクタデセン中に、Gd、Nd、イッテルビウム (Yb) および Er 酢酸塩を溶解し、フッ化アンモニウムを添加後、300 程度、アルゴン雰囲気下での熱分解法により、磁場依存発光 UCNP である $\text{NaGdF}_4:\text{Nd}^{3+}, \text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ を合成する。これまでに、コアシェル型の $\text{NaGdF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}/\text{NaGdF}_4$ の合成に成功し、980 nm のダイオードレーザー (Thorlabs, L980P300J) 照射により可視域に明瞭な発光を有することを確認した。このように、すでに、合成法は確立し、ドーピングするイオンの種類 (Er、ツリウム (Tm) 等) や比率、結晶構造、コアシェル型などの構造や発光収率を最適化し、単一粒子レベルで発光を観測するのに十分な発光収率を持つものに最適化する段階まで合成に関しては研究が進んだ。

B . 顕微下磁場発生装置の製作と発光観測系の構築

発光観測系の構築を行うために、980 nm の LED レーザーを全反射照明で顕微鏡に導入することにした。

0.2 テスラの最大磁場を発生できる電磁石

または永久磁石を用いた磁場発生装置の設計と製作を行った。

電磁石による磁場発生は、2 つの希土類磁石を使って磁場発生を行う。要求される磁場強度が大きいので、磁極間のギャップを 5 mm 以下にした。更に、鉄ヨーク内の磁束密度を磁極の先端部分に集め、ギャップ内の磁場強度を増加するために、先端形状を細く設計した。この場合、ギャップ間距離と磁場強度は比例しないので、予めガウスメーターを使って磁場強度の校正を行い、その関係式を使って距離を調整し、所望の磁場強度が発生できるようにした。これまでに試作した磁場発生装置の第一号機の概要を以下に示す。鉄を材料とする凹型のヨークからなる磁気回路を形成し、ソレノイドコイルを使って励磁する電磁石を製作した。電源 (PAN35-5A, Kikusui) を用いて、電圧を印加し、ギャップ間の磁場をガウスメーター (GM-301, EMIC) を用いて測定した。現在のところ、0.3 テスラ程度の磁場が局所的に発生できることが分かった。

今後、これまでに構築した合成手法と、測定系を組み合わせ、生体分子の局在化計測を行う。本研究活動スタート支援研究として、目標とした磁場に感度のある一粒子発光計測系の構築を概ね終了し、現在測定を行っている。成果に関しては、まとめ次第、論文として報告する予定である。

また、上記のイメージングに関連した論文・研究発表として、X 線照射によって発光するイメージング系に関する報告を行ったので、主な発表論文等の欄に示した。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Y. Osakada*, G. Pratz, C. Sun, M. Sakamoto, M. Ahmad, O. Volotskova, Q. Ong, T. Teranishi, Y. Harada, L. Xing* and B. Cui*.

Hard X-ray-induced optical luminescence via biomolecule-directed metal clusters.

Chemical Communications 50, 3549-3551, (2014). (査読有り、インサイドフロントカバーに掲載された、Global Medical Discovery に掲載された。)

2. Z. C. Lin, C. Xie, Y. Osakada, Y. Cui* and B. Cui*.

Iridium oxide nanotube electrodes for sensitive and prolonged intracellular measurement of action potentials.

Nature communications 5, 4206/4201-4206/4210 (2014). (査読有り)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. (招待講演) 日本薬学会第 135 会 (神戸)、一般シンポジウム S27 薬学における生命指向型化学 (医薬と異なる小分子を駆使して探る・

操る細胞機能研究の新境地) S27-3、硬 X 線励起で可視光発光を示すプローブの開発、阪大産研、小阪田泰子、2015 年 3 月 26 日、神戸学院大

2. (招待講演) 2013 光化学討論会、シンポジウム 4、輝く若手研究者たち～分子光化学の進化を目指して～「X 線照射によって発光するナノプローブ」小阪田泰子、2013 年 9 月 13 日、愛媛大

〔図書〕(計 0 件)
該当なし

〔産業財産権〕
○出願状況(計 0 件)
該当なし

○取得状況(計 0 件)
該当なし

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/mec/osakada.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小阪田 泰子 (OSAKADA YASUKO)

大阪大学産業科学研究所・助教

研究者番号：00579245