

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2010

課題番号：19360379

研究課題名(和文) 細胞内 mRNA の定量的分布解析と細胞への mRNA 導入技術の開発

研究課題名(英文) Development of a method to detect intrinsic mRNA in a living cell by using a molecular beacon-immobilized nanoneedle

研究代表者

中村 史 (NAKAMURA CHIKASHI)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究グループ長

研究者番号：40357661

研究成果の概要(和文)：

我々は、ナノニードルを用いた低侵襲な細胞操作技術の開発を行っている。本研究では、モレキュラービーコンを修飾したナノニードルを用いた生細胞の mRNA 検出技術を開発した。細胞内で mRNA とナノニードル表面のモレキュラービーコンのハイブリダイゼーションによって起こる FRET 解消を共焦点レーザー顕微鏡によって検出した。これにより迅速かつ精度の高い GAPDH の mRNA 検出が可能であることが示された。

研究成果の概要(英文)：

We have been developing a low invasive cell manipulation technology using a nanoneedle. In this study, a detection technique of the intracellular mRNA in a living cell using a nanoneedle functionalized with molecular beacons has been developed. It was clarified that intracellular GAPDH mRNAs could hybridize with molecular beacons on the nanoneedle very rapidly and the capability of sequence recognition was very high.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2008年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2009年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2010年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：細胞工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：ナノニードル、細胞操作、mRNA、AFM、モレキュラービーコン

1. 研究開始当初の背景

細胞膜を通過し、細胞内に物質を輸送するためには、細胞自身の取込作用に頼るか、細胞表層構造を物理的に破壊する手法をとるか選択が必要である。前者では、リポフェクションが一般的な手法として広く用いられる。リポフェクションに伴うエンドサイトーシスでは、エンドソーム脱出が低効率であるという問題がある。後者の手法の一つとしてマイクロインジェクションがあるが、用いら

れるガラスキャピラリは細胞膜貫通に最適なサイズと形状であるとは決して言えない。特に基板に対する付着性が高く高さが低い細胞に対して挿入操作を行うとき、キャピラリが細胞膜を貫通できずに先端が基板に衝突するケースが多く起こる。機械的に細胞膜あるいは核膜までも貫通し物質輸送を行う手法として、我々は原子間力顕微鏡 (AFM) の探針を集束イオンビームによって直径 200 nm の円筒型の針状にエッチングしたナノニ

ードルを作製し、これを細胞に挿入する手法を開発している。ナノニードルを操作する装置として AFM を用いることによって、細胞への針挿入を力学的に検出することが可能である。

細胞にナノニードルを挿入する際には機械的な圧入過程が必ず存在する。細胞は物理的な刺激を受けると、細胞外から細胞内にカルシウムイオンが流入する。カルシウムイオンの流入をきっかけとして細胞骨格の再構築が起こることで、機械的な変形に対して細胞は対応する。このような劇的な変化が起こった細胞は平常の状態を保持しているとは言えない。しかしナノニードルを繰り返し挿入し続けてもカルシウムイオンの流入は全く起こらないことが確認されており、ナノニードル挿入による細胞操作は、細胞のネイティブな状態を維持したまま行うことが可能であり、正確な細胞の状態解析を行うことが可能であることが示唆されている。

2. 研究の目的

細胞内は、様々な生体分子、小器官が密集し、混在した分子クラウンディングと呼ばれる状態の空間であり、通常用いられる培地や緩衝液とは全く違った分子の挙動が観察される場である。このような細胞内という特殊な環境において、その細胞の状態を最も端的に表現する分子種である mRNA の検出を目的とした。

in situ ハイブリダイゼーションは細胞内の mRNA の局在性を調査する手法として古くから用いられ、FISH 法によって出芽酵母の *ASH1* の mRNA の局在性が調査されるなど¹⁾、細胞内の mRNA の局在性を証明する手段として用いられてきた。しかし固定化操作を行うために、生きた細胞の mRNA の経時変化を調べることは不可能であった。Osada らは、生きた細胞の mRNA 検出法として AFM 探針を細胞に押し込み、物理吸着により探針表面に付着した mRNA を逆転写定量 PCR によって検出する方法 (single cell nanoprobe method, SCN 法) を報告している^{2,3)}。この方法では、生きた細胞の mRNA の局在性を解析することが可能であるが、PCR のための時間を要するため迅速な検出は難しい。そこで我々は、ナノニードルを用いることで可能な限りリアルタイムの細胞内 mRNA 観察を可能にする手法の開発を行った。

3. 研究の方法

生きた細胞内部の特定の mRNA を迅速、高感度に検出するためには、配列特異性の極めて高いプローブを用いなければならない。核酸検出においてはモлекуラービーコンが有用である。図 1 に示すようにモлекуラービー

コンは両末端に蛍光基と消光基を修飾した一本鎖の DNA であり、ターゲット非存在下ではステムループ構造を形成して両末端の蛍光基と消光基が接近していることで蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) が起こり消光状態にあるが、標的の核酸とループ部分が結合し、2 本鎖形成が行われると開環して蛍光が回復する分子プローブである。シンプルかつ高い配列特異性、高い S/N 比を有する優れた分子プローブであり、理論的には最大 200 倍もの応答が観察されると報告されている⁴⁾。図 1 に示すようにナノニードルの表面にモлекуラービーコンを固定化し、ナノニードルの挿入によってモлекуラービーコンを細胞内に導入する。mRNA の結合はナノニードル表面で生じるので、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM) で、針表面の蛍光強度を測定し、その変化を解析する。この手法には、ナノニードルを細胞から引き抜くことによってモлекуラービーコンを細胞外へ取り出し、細胞内に可能な限り外来物質を残さないという狙いがある。

本研究では、ヒト GAPDH mRNA を認識するモлекуラービーコンを修飾したナノニードルを用いて HeLa 細胞の mRNA の検出を行った。Nitin らによって、既に報告されている配列を参考にして以下の配列を設計した Alexa488/ACGACG GAGTCCTCCACGATACCA CGTCGT/BHQ-1⁵⁾。このモлекуラービーコンは Alexa488 を蛍光基として、消光基には無蛍光の消光基である BHQ-1 (吸収波長 534 nm) を使い、また 3' 末端のチミンはビオチン化されており、アビジン-ビオチン結合によって固相への

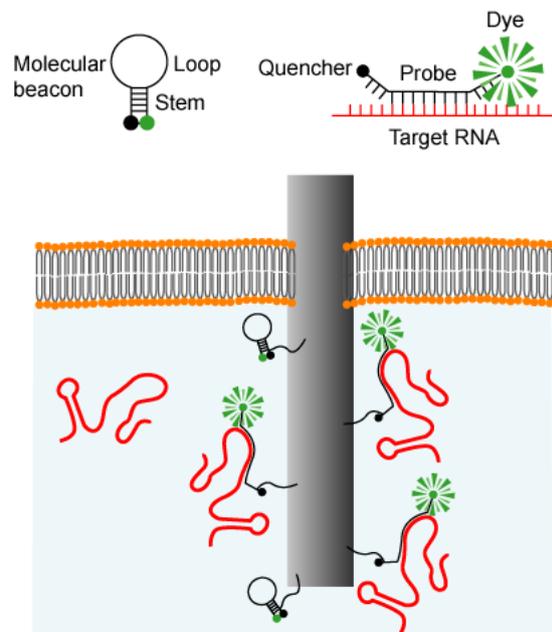


図 1. モлекуラービーコン修飾ナノニードルを用いた細胞内 mRNA の検出

修飾が可能である。まず、ナノニードルを硫酸過酸化水素液で洗浄した後に、エタノールを溶媒として 3-aminopropyltriethoxysilane にてシラン化反応を行った。次に、10 mM sulfo-NHS-LC-LC-biotin / 10 mM ホウ酸緩衝液 (pH8.0) にシラン化ナノニードルを浸漬し、ビオチン化を行った。続いてストレプトアビジンを結合させ、最後に 10 μ M モレキュラービーコン溶液で 1 時間反応させ固定化を行った。

まず、同様の方法で、ヒト GAPDH モレキュラービーコンを固定化したシリコンウエハを用いて、5 M 尿素溶液に浸漬したときの蛍光強度変化を観察した。その結果、尿素溶液中での蛍光強度は約 8 倍に増大し、緩衝液に浸漬させると蛍光強度は減少し、ほぼ元の値に戻った。繰り返し蛍光強度の増加と減少がほぼ同じ割合で繰り返し観察され、固相上に固定化された状態でもモレキュラービーコンの応答は観察できることが確認された。

続いて培養 2 日目の HeLa 細胞に対して mRNA 検出の試験を行った。無血清培地 OPTI-MEM1 に交換し、モレキュラービーコン修飾ナノニードルの挿入操作は AFM (Asylum Research, MFP-3D) を用いて行った。まず挿入前に、培地中でナノニードルの CLSM 撮影を行った。リアルタイムに力応答を観察しながら手でフォースホイールを回転しカンチレバーを下降させ、挿入操作を行った。フォースカーブ上の斥力ドロップを観察することで確実に挿入されていることを確認し、2 分間保持した後にその場で再び CLSM 撮影を行った。カンチレバーを上昇させ、モレキュラービーコン修飾ナノニードルの抜去を行った。抜去 1 分後にさらに CLSM 撮影を行い、再度挿入の後に蛍光観察をという手順を繰り返した。

4. 研究成果

挿入前後で、ナノニードル表面の蛍光強度に明らかな蛍光強度変化があることが分かった。ディッシュ上の異なる 3 個の HeLa 細胞に挿入を連続して行った結果を図 2 に示す。細胞に挿入した後に、ナノニードル表面の蛍光強度は上昇するが、挿入を維持したまま転写阻害剤である actinomycin D を培地に添加すると著しい蛍光強度の減少が観察されたため、蛍光は GAPDH mRNA がナノニードル表面のモレキュラービーコンと結合することによって FRET が解消し、生じているものであることが確認された。細胞にナノニードルを挿入し、CLSM 撮影におよそ 2 分を要するが、この間にナノニードル表面の蛍光強度は最大値に達しており、細胞内での mRNA の結合は非常に短時間に行われていることが分かった。

また、細胞からナノニードルを抜去し、培地中に取り出すと蛍光強度が減少し、このナ

ノニードルを別の細胞に挿入すると再び蛍光強度の上昇が確認された。これにより、連続的に細胞の解析を行うことが可能であり、連続で 10 個の細胞の測定を行うことが可能であった。ナノニードル抜去時に蛍光が減少する理由として、mRNA はモレキュラービーコンと比べて分子量が大きく、かさ高いためにナノニードルの引き抜きの際に細胞膜との衝突によって脱離しているものと推察された。同一の細胞に挿入を繰り返した場合、mRNA が抽出されるならば、モレキュラービーコンの応答は挿入回数の増加に伴い減少することが期待されるが、著しい減少は観察されない。また、ナノニードル抜去時に観察される数 nN 以上の大きな力は、mRNA の機械的脱離に要するものと考えられる。我々は、観察によって細胞の状態を変化させないことを技術的な目標としているので、mRNA が脱離し、細胞内に残存することは好ましい現象である。

測定後に尿素処理によって上昇した蛍光強度は、最初の細胞に挿入した時点での蛍光と比較して 70% 程度に低下している。細胞の挿入と抜去を繰り返すことによってモレキュラービーコンが脱離していることが考えられる。アビジン-ビオチン結合が細胞膜通過時の機械的に脱離している、あるいは培地中でモレキュラービーコン自身が分解を受けているなどの理由が考えられ、これらを克服する安定な固定化方法、安定なプローブ分子の利用が課題として考えられる。

本手法により、非常に短い時間に低濃度の mRNA の検出が可能であった。モレキュラービーコンをマイクロインジェクションなどによって注入する方法でも同様に迅速な測定

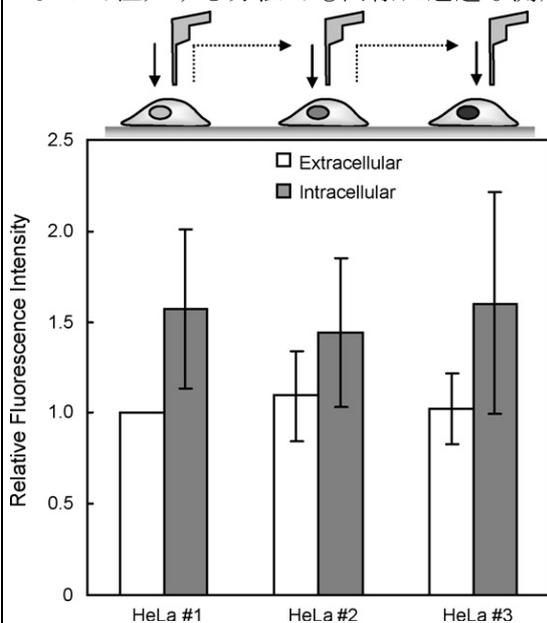


図 2. HeLa 細胞への連続した挿入操作後の蛍光強度変化

が可能であるが、合成物質であるモレキュラービーコンを導入した細胞は天然の状態であるとは言えない。現在は CLSM による蛍光測定が律速であるが、固相表面で秒単位の経時変化を測定することによって生きた細胞内での結合速度解析も本手法では可能になる。

ヒト乳癌細胞 MCF-7 では 2600 コピーの GAPDH mRNA が 1 個の細胞に存在するとの報告がある⁶⁾。HeLa でも 1000~2000 コピーの mRNA が存在していると考えられるが、細胞容積を 1 pL 程度と見積ると細胞内 mRNA 濃度は数 nM となる。この濃度は、本モレキュラービーコンの試験管内の測定の検出下限の濃度に近いが、細胞内のナノニードル上では、明らかに高い蛍光が観察されている。生細胞の mRNA の蛍光相関分光法による定量解析の結果、Cos7 細胞の c-fos mRNA が 270 nM にも達するという報告がある⁷⁾。c-fos mRNA のコピー数は GAPDH と比較して小さいと考えられ、細胞容積から求められる mRNA 濃度は数 nM 以下と計算される。細胞内には核をはじめとする多数のオルガネラが含まれており、mRNA が存在する細胞質の容積は細胞容積に比して小さく、上記のような数百倍の濃度に達するのかもしれない。また、PEG を用いて分子クラウディング環境を模擬した緩衝液中では、本モレキュラービーコンに対する ssDNA の結合速度が増大する結果が得られており、細胞内の分子クラウディング環境が迅速な応答に起因するものと推察される。本研究で開発された手法は、そのような細胞内の mRNA の状態を正確に知ることが出来る可能性があり、直接プローブを生きた細胞に挿入し、その場で観察するという本手法の特長が生かされた成果が今後得られるものと期待される。

本研究では、試験管内で合成された蛍光タンパク質 EGFP の mRNA をナノニードルによって導入する方法を検討したが、そのタンパク質発現には至らなかった。上述のようにモレキュラービーコンに結合した mRNA は細胞外に抽出されないことが示唆されている。mRNA 分子の導入を達成するためには、細胞膜通過に耐える安定かつ強固な mRNA 分子の固定を行い、かつその固定化 mRNA は細胞内では効率よく脱離するような高機能な分子固定方法が必要であると考えられる。

参考文献

- 1) S. Aronov and J. E. Gerst: J Biol Chem 279, 36962 (2004).
- 2) T. Osada, H. Uehara, H. Kim and A. Ikai: J. Nanobiotechnol. 1, 2 (2003).
- 3) H. Uehara, T. Osada and A. Ikai: Ultramicroscopy 100, 197 (2004).
- 4) S. Tyagi and F. R. Kramer: Nat

Biotechnol 14, 303 (1996).

- 5) N. Nitin, P. J. Santangelo, G. Kim, S. Nie and G. Bao: Nucleic Acids Res 32, e58 (2004).
- 6) Y. Nashimoto, Y. Takahashi, T. Yamakawa, Y. S. Torisawa, T. Yasukawa, T. Ito-Sasaki, M. Yokoo, H. Abe, H. Shiku, H. Kambara and T. Matsue: Anal Chem 79, 6823 (2007).
- 7) 船津高志:薬学雑誌、129(3)、265 (2009).

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 4 件)

- ① Takanori Kihara, Narutoshi Yoshida, Taro Kitagawa, Chikashi Nakamura, Noriyuki Nakamura, Jun Miyake, Development of a novel method to detect intrinsic mRNA in a living cell by using a molecular beacon-immobilized nanoneedle, Biosensors & Bioelectronics, 査読有, 26(4), 2010, 1449-1454
- ② Harumi Kagiwada, Chikashi Nakamura, Takanori Kihara, Hideki Kamiishi, Keiko Kawano, Noriyuki Nakamura, Jun Miyake, he mechanical properties of a cell as determined by its actin cytoskeleton are important for nanoneedle insertion into a living cell, Cytoskeleton, 査読有, 67(8), 2010, 496-503
- ③ Sung-Woong Han, Seunghwan Ryu, Taro Kitagawa, Hiroshi Uetsuka, Naoji Fujimori, Yukihiro Aoki, Ryo Ota, Yosuke Amemiya, Nobuo Shimamoto, Chikashi Nakamura, Jun Miyake, Evaluation of the effectiveness of tapered silicon and novel diamond nanoneedles in manipulations of living single cells, Archives of Histology and Cytology, 査読有, 72(4/5), 2009, 261-270
- ④ 中村 史、上石 英希、柳 昇桓、三枝 真吾、韓 成雄、三宅 淳、ナノスケールの針の細胞への挿入操作と力計測、M&E、2008、59-61、査読無

[学会発表] (計 30 件)

- ①金城 百合恵、雨宮 陽介、木原 隆典、三宅 淳、中村 徳幸、中村 史、「金コートナノニードル上に固定化したモレキュラービーコンと細胞内 mRNA の結合解析」、日本化学会第 91 春季年会(2011)、2011 年 3 月 11 日、紙上および Web 上で開催
- ② Chikashi Nakamura, Takanori Kihara, Yosuke Amemiya, Narutoshi Yoshida, Taro Kitagawa, Shingo Mieda, Noriyuki Nakamura

and Jun Miyake, "Analysis of intracellular molecules in a living cell using a nanoneedle functionalized with molecular probes", Pacificchem 2010, Dec. 19th, 2010, Honolulu, Hawaii, USA

③ Takanori Kihara, Narutoshi Yoshida, Taro Kitagawa, Chikashi Nakamura and Jun Miyake, "Development of in situ nanoprobe for mRNA in a living cell using MOMENT", Biosensors 2010, May 27th, 2010, Glasgow, UK

④ 中村 史、北川 太郎、金 百合恵、雨宮 陽介、吉田 成寿、木原 隆典、中村 徳幸、三宅 淳、「ナノ針上に固定化したモレキュラービーコンと細胞内 mRNA の結合解析」、日本化学会第90春季年会(2010)、2010年3月29日、近畿大学本部キャンパス

⑤ 中村 史、北川 太郎、吉田 成寿、木原 隆典、中村 徳幸、三宅 淳、「Molecular Beacon 修飾ナノ針を用いた生細胞の mRNA 解析」、第61回日本生物工学会大会、2009年9月24日、名古屋大学東山キャンパス

⑥ 金 百合恵、北川 太郎、中村 史、鍵和田 晴美、木原 隆典、中村 徳幸、三宅 淳、「モレキュラービーコン修飾ナノ針による Oct4 mRNA の検出」、第24回生体機能関連化学シンポジウム、第12回バイオテクノロジー部会シンポジウム、2009年9月15日、九州大学医系キャンパス・百年記念講堂

⑦ 中村 史、北川 太郎、吉田 成寿、木原 隆典、中村 徳幸、三宅 淳、「Molecular Beacon 修飾ナノ針を用いた生細胞 mRNA の解析」、第24回生体機能関連化学シンポジウム、第12回バイオテクノロジー部会シンポジウム、2009年9月14日、九州大学医系キャンパス・百年記念講堂

⑧ 中村 史、北川 太郎、吉田 成寿、木原 隆典、中村 徳幸、三宅 淳、「Molecular Beacon 修飾ナノ針を用いた細胞内 mRNA の検出」、2009年電気化学秋季大会、2009年9月10日、東京農工大学小金井キャンパス

⑨ 北川 太郎、中村 史、木原 隆典、中村 徳幸、吉田 成寿、三宅 淳、「固定化分子ビーコンに対する mRNA 結合解析」、日本化学会第89春季年会(2009)、2009年3月29日、日本大学理工学部船橋キャンパス

⑩ 北川 太郎、中村 史、柳 昇桓、韓 成雄、中村 徳幸、三宅 淳、「ナノ針を用いた mRNA 導入・抽出技術の検討」、第3回バイオ関連化学合同シンポジウム、2008年9月20日、東京工業大学すずかけ台キャンパス

⑪ 北川 太郎、中村 史、韓 成雄、中村 徳幸、三宅 淳、「ナノ針を用いた単一細胞からの mRNA 抽出技術の開発」、日本化学会第88春季年会、2008年3月29日、立教大学池袋キャンパス

〔図書〕(計4件)

① 中村 史、雨宮 陽介、木原 隆典、三宅 淳、「FRET 分子プローブ修飾ナノニードルを用いた細胞内解析技術の開発」、表面科学、日本表面科学会、459-465、2010年

② 中村 史、「セルサージェリー」、クリニカルニューロサイエンス、1304-1305、2009年

③ 木原 隆典、中村 史、三宅 淳、細胞操作技術の最前線 第4回「遺伝子導入技術(ミクロの決死圏は実現するかー細胞の中を操作する時代)」、Medical Bio、オーム社、46-49、2009年

④ 中村 史、「ナノ針を用いた細胞操作技術」、細胞分離・操作技術の最前線、シーエムシー出版、344-353、2008年

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：細胞操作用部材

発明者：中村 史、三宅 淳

権利者：独立行政法人産業技術総合研究所

種類：特許

番号：特願 2009-133603

出願年月日：2009年6月3日

国内外の別：国内

○取得状況(計1件)

名称：物質細胞挿入の力学解析方法

発明者：中村 史、小幡谷 育夫、三宅 淳、

中村 徳幸、韓 成雄

権利者：独立行政法人産業技術総合研究所

種類：特許

番号：第 4370397 号

取得年月日：2009年9月11日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://unit.aist.go.jp/biomed-ri/biomed-cme/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 史 (NAKAMURA CHIKASHI)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究グループ長

研究者番号：40357661

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：