

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15601

研究課題名（和文）細胞内局在RNAのハイスループットの回収システムの開発

研究課題名（英文）Development of high-throughput system for extraction of intracellularly localized RNAs

研究代表者

周 縁殊（ZHOU, YUANSHU）

金沢大学・ナノ生命科学研究所・特任助教

研究者番号：60758556

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：神経細胞の細胞核から枝のように分かれている樹状突起に輸送された伝令RNAは記憶形成に關与すると期待されている。しかし、標的部位への局所的アクセス方法が難しいことや、解析のスループットの問題などがあり、局在するRNAの機能解析が困難である。本研究は、申請者が開発した細胞表面の非侵襲的形狀測定と液中物質の極微量回収を両立可能な多機能ナノピペットを利用して神経細胞のダイナミックイメージングと局所RNAの回収を実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の手法はナノスケールで生細胞の形状変化を非標識・非接触で取得可能であり、他の技術では計測困難な細胞の局所的变化を可視化できる。また、ナノピペットを探針に用いるため、局所的な薬剤投与や細胞質の回収が可能である。その成果の発展として、RNAとともに回収したタンパク質の質量分析により、RNA輸送のメカニズムと機能の解析が可能になる。さらに、RNAと記憶形成の関連性が解明できれば、RNAの神経細胞間移植による記憶の再現という研究分野の開拓が期待できる。

研究成果の概要（英文）：RNA transported from the nucleus of a neuron to its dendrites, which divide like branches, are expected to be involved in memory formation. However, functional analysis of localized RNA is difficult due to difficulties in local access methods to target sites and throughput of analysis. In this study, dynamic imaging of neurons and recovery of local RNA were realized by using a multifunctional nanopipette developed by the applicant, which can both measure the non-invasive shape of the cell surface and recover a very small amount of liquid material.

研究分野：分析化学

キーワード：細胞内回収

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経細胞間の情報伝達は記憶の形成に大きく寄与すると従来から考えられてきたが、記憶を形作る物理的な仕組みはまだ解明されていない。高分子の RNA は、タンパク質生成や、遺伝子情報を形質に反映させるという、生物上の仕組みにかかわっている。米国の研究者たちは、電気ショック訓練を与えられた軟体動物ジャンボアメフラシの神経から調製した RNA を別の個体に移植すると、訓練されていない個体が訓練された個体と同様の反応を示したことを報告している。さらに、マウスを使った実験では、脳の記憶領域である海馬を刺激して投与された伝令 RNA は神経細胞の細胞核を経由し、樹状突起に流れ着くことも報告されている。この実験により、記憶形成には度重なる刺激による樹状突起への伝令 RNA の輸送が必要不可欠である事が示唆されている。しかしながら、それらの RNA はどこで、どのタイミングで、どのように記憶形成に関わるのかは解明されていない。これらを理解するには、位置情報を含む RNA の網羅的解析が重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究は、申請者が開発した【A】細胞表面の非侵襲的形狀測定と【B】液中物質の極微量回収を両立可能な多機能ナノピペットを基盤として、探針設計・回収プロセスの改善とともに RNA シーケンシングとの融合により RNA 粒子やエクソソームなどの微粒子を介して行う伝令 RNA 輸送の網羅的計測を実現し、神経細胞 RNA 輸送の分子機構及び機能を突き止めることを目的とする。

3. 研究の方法

神経細胞表面の非侵襲的形狀測定は走査型イオンコンダクタンス顕微鏡(SICM)を用いる。具体的、ガラスキャピラリーを先端微細化したナノピペットに電解質溶液を充填し、二本の Ag/AgCl 電極をピペット内・外部の溶液それぞれに挿入する。この二本の電極間に電圧を印加すると、ピペット先端にイオン電流が生じる。測定する時、ナノピペットを対象に一定のスピードで近づかせるとイオン電流が減少する現象を利用して非接触的計測を行う。ナノピペットは細胞質の回収にも応用できます。この方法は電気化学シリンジと呼ばれています。細胞内物質の回収は電気化学シリンジを利用する。具体的、ナノピペットの内部に電解質を含む有機溶媒を充填し水溶液に浸すと先端に有機相と水相の液液界面が形成させる。電圧の印加により界面が移動する電気浸透流現象を利用し回収を行う。

4. 研究成果

(1) 神経細胞のダイナミックイメージング

新しく開発したアルゴリズムにより、細胞の位置を予測して次のイメージング領域を選択し、タイムラプスイメージングのスキャン時間を半分に短縮できた。タイムラプス画像は、神経細胞ナノスケールの構造変化だけでなく、樹状突起スパイン、synaptic bouton の体積変化や記憶に密接に関連する神経ネットワークの形成プロセスに関する定量的情報も取得した(図1)。さらに、蛍光標識が確立されていない神経突起の伸長に関わる直径 150 nm 前後の小胞(ppvs)の輸送や、成長円錐での細胞骨格の再配置なども可視化できた。

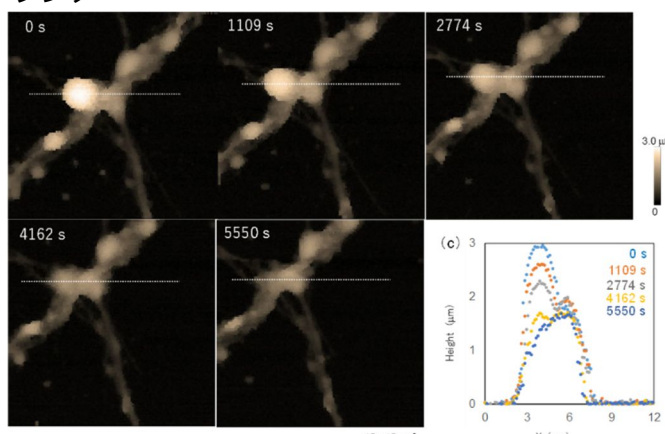


図1 単一神経突起の高さ変化

(2) 神経細胞内のミトコンドリア RNA の回収

神経細胞局所の RNA を回収するために電気化学シリンジの検出感度を向上する必要がある。その際に、ピペット外部に非特異的吸着する RNA を含む核酸の影響を抑制するために、回収した後にナノピペット先端を核酸分解酵素(DNase)で処理した。その効果を評価するために濃度既知の DNA プラスミド溶液から様々な体積で回収を行い、顕微鏡画像から計算した回収量と PCR で検出された量を比較した。その結果、何も処理しないナノピペットに対し、DNase 処理によって外部に吸着する核酸の量が 90%減少した(図2)。次に実際に PC12 細胞から分化した神経細胞の細胞体と突起の中に局在するミトコンドリア RNA の回収を行った。その結果、細胞体より突起の

ほうがミトコンドリア RNA の発現量が多いことが分かった。

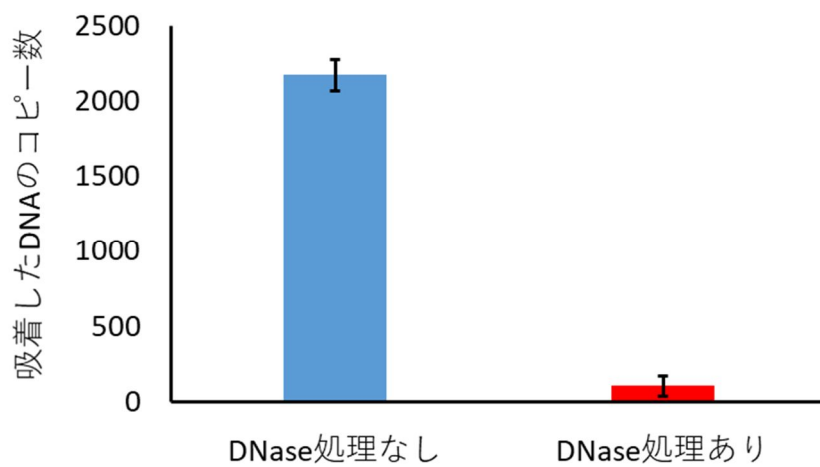


図 2 DNase 処理による吸着抑制

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takahashi Yasufumi, Zhou Yuanshu, Miyamoto Takafumi, Higashi Hiroki, Nakamichi Noritaka, Takeda Yuka, Kato Yukio, Korchev Yuri, Fukuma Takeshi	4. 巻 92
2. 論文標題 High-Speed SICM for the Visualization of Nanoscale Dynamic Structural Changes in Hippocampal Neurons	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 2159 ~ 2167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.9b04775	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sato Katsuhiko, Sato Fumiya, Kumano Masayuki, Kamijo Toshio, Sato Takaya, Zhou Yuanshu, Korchev Yuri, Fukuma Takeshi, Fujimura Tsutomu, Takahashi Yasufumi	4. 巻 33
2. 論文標題 Electrochemical Quantitative Evaluation of the Surface Charge of a Poly(1 vinylimidazole) Multilayer Film and Application to Nanopore pH Sensor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Electroanalysis	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/elan.202100041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuanshu Zhou, Masaki Saito, Takeshi Fukuma, Yasufumi Takahashi
2. 発表標題 Nanoscale measurement of primary cilia using scanning ion-conductance microscopy
3. 学会等名 International Symposium on Analytical Electrochemistry 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------