

科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金)研究成果報告書

平成25年 5月 15日現在

機関番号：17102  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011~2012  
 課題番号：23750194  
 研究課題名(和文)細胞間情報伝達物質の蛍光イメージングを可能にする機能性核酸センサーの開発  
 研究課題名(英文)Development of functional nucleic acids toward fluorescence imaging of chemical transmitter dynamics  
 研究代表者  
 野中 洋(NONAKA HIROSHI)  
 九州大学・稲盛フロンティア研究センター・特任助教  
 研究者番号：80579269

研究成果の概要(和文)：細胞間で行われる化学伝達物質放出現象は生体において極めて重要な役割を担っている。この細胞間における情報伝達物質の放出・拡散過程は詳細にはわかっていない。そこで、細胞膜上で行われる細胞間情報伝達物質の放出を分子レベルで可視化・解析するために、伝達物質の1つであるアデニンヌクレオチドの蛍光センシングが可能な核酸アプタマーセンサーを開発し、細胞間における情報伝達物質アデニンヌクレオチドの放出・拡散現象の観測に成功した。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated an application of fluorescent aptamer for molecular sensing of extracellular chemical transmitters dynamics on cell surface. We developed a fluorescent aptamer sensor that could be immobilized on cell surface for the analysis of extracellular events. Our approach enabled an easy and efficient immobilization of the fluorescent adenine nucleotide(Ade) aptamer on cell surface, and realized the fluorescence visualization of Ade efflux from living cell.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：核酸、アプタマー、伝達物質、イメージング

1. 研究開始当初の背景

生体内には多様な情報伝達物質が存在し、それぞれが重要な機能を果たしている。例えば、ドーパミンやセロトニンなどに代表される神経伝達物質はシナプス間隙において放出・拡散・受容されることで、感情の調整などの高次神経機能などに関わっている。近年では、ATPやUDPなどのヌクレオチド類もこれまでのエネルギー源や核酸の原料としての機能だけでなく、受容体に作用する情報伝達物質として神経系細胞の機能調整や免疫系細胞の化学走性など様々な細胞機能に関与していることも示唆されている(図1)。これら細胞間情報伝達物質の関わる生命現

象の解明のため、細胞間で行われている情報伝達物質の放出・拡散現象を特異的にセンシング可能な新しい手法の開発が強く求められている。

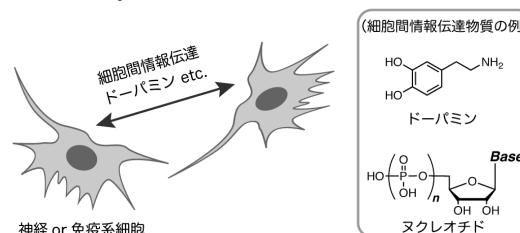


図1、細胞間情報伝達概念図と伝達物質例

これまでに細胞表層局所の情報伝達物質を検出するシステムとしては、グルタミン酸受容体の細胞外リガンド結合部位を改変したグルタミン酸センサー (K. Hirose et al., *Eur. J. Neurosci.* **2007**, *25*, 2249) や、ルシフェラーゼを用いた ATP の化学発光検出系 (E. Kobatake et al., *Anal. Biochem.* **2006**, *122*, 2469) などが開発されているが、その他の伝達物質に対しては存在していない。また ATP に関しては酵素反応による検出であるため放出部位を特定可能な状態でのリアルタイムイメージングに不向きといった問題点がある。そこで、研究代表者は、細胞間情報伝達物質の解析をおこなうために、試験管内進化法 (SELEX) によって得られる核酸アプタマーに着目した。核酸アプタマーは、理論的にはあらゆる標的分子に対して結合可能な核酸アプタマーを試験管内進化法により取得可能である。この核酸アプタマーの優れた分子認識能を生かし、未だ実現されていない様々な細胞間伝達物質の解析基盤となり得るセンシングツールの開発を目指した。

## 2. 研究の目的

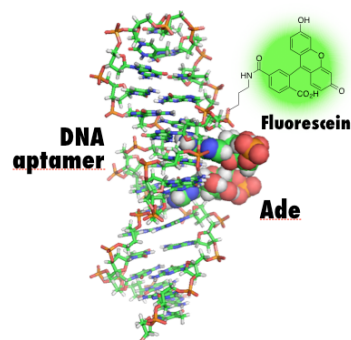
本研究の目的は、細胞膜上で行われる細胞間情報伝達物質の放出を分子レベルで可視化・解析するために、伝達物質の蛍光センシングが可能な核酸アプタマーセンサーを開発することである。細胞間で行われるドーパミンなどの伝達物質放出現象は生体において極めて重要な役割を担っている。この細胞間における情報伝達物質の放出・拡散過程は詳細にはわかっておらず、伝達物質の動態を分子レベルで可視化・解析することができれば未知の部分が多い細胞間情報伝達物質の作用の理解につながると考えられる。

標的とする細胞間情報伝達物質として、近年グリア伝達物質として注目が集まっているアデニンヌクレオチド (Ade)、主に ATP を標的とした。グリア細胞は、脳細胞の 90% を占める細胞であり、これまでグリア細胞は、神経細胞を繋ぐ糊のような受動的な役割を果たしていると考えられてきた。しかし、最近の研究により、グリア細胞は、能動的に脳機能を制御することが分かってきた。興味深いことに、主要なグリア伝達物質はアデニンヌクレオチド、主に ATP であることが知られている。ATP は細胞のエネルギー源として良く知られているが、最近の研究により、ATP はグリア伝達物質として細胞外に放出され、神経細胞やグリア細胞の活性を調整することが分かってきた。そこで、グリア伝達物質としてのアデニンヌクレオチドの動態解析を目標とした。

## 3. 研究の方法

Ade のセンシングのために Ade 蛍光アプタマーセンサーに着目した。細胞間で授受される伝達物質を効果的に可視化するために、細胞表層にセンサーを固定化することを考えた。しかし、このようなコンセプトを実現するには、2つの課題がある。1つは、ミリ秒から秒単位で起こる非常に速い神経伝達を検出するために、アプタマーセンサーが高速蛍光応答をすることが求められる。もう1つは、細胞間で授受される伝達物質をイメージングするために、アプタマーをどうやって細胞表層へ固定化するかが課題であった。

1つ目に関して、過去に Ellington らによって、報告された蛍光アプタマーセンサーを用いることにした。このアプタマーセンサーはアデニンヌクレオチド結合部位近傍に蛍光色素フルオレセインがついたシンプルな構造をしており、FRET などを利用する構造変化型のアプタマーセンサーに比べて、標的分子への蛍光応答が速いことが期待された。この蛍光アプタマーセンサーの ATP に対する蛍光応答速度を確認するため、ストップドフロー蛍光測定を行った。蛍光応答の速度定数



A. D. Ellington et al.  
*J. Am. Chem. Soc.*, 2000

図 2、用いた蛍光核酸アプタマー

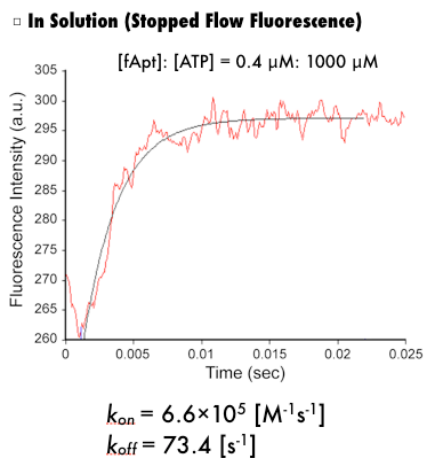


図 3、高速蛍光応答能の確認

を算出した結果、 $k_{on} = 6.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $k_{off} = 73 \text{ s}^{-1}$ となった。この値は、実際に神経伝達物質の検出に用いられているセンサーの速度定数と同等の値であり、本アプタマーセンサーは速い神経伝達の解析に応用可能であることが示唆された。

2つ目の固定化法に関して、まずセンサーの固定化として細胞表面のアミノ基を利用する手法を用いた。細胞表面のアミノ基を化学的にビオチン化し、5'末端をビオチン化したアプタマーセンサーをビオチンアビジン相互作用を介して固定化した(図4)。本手法を用いることで、センサーを細胞表面に固定化可能することに成功しものの、いくつかの問題点が明らかになった。1つは、センサーの細胞表面への固定化量が細胞種への依存性がみられた。他には、本手法では過剰量の化学物質を加え、細胞を複数回洗浄する必要があった。従って、細胞に対して障害を与える可能性や操作の煩雑さに問題があった。これは、将来的に個体や組織に本手法を用いる際の問題となると考えられた。

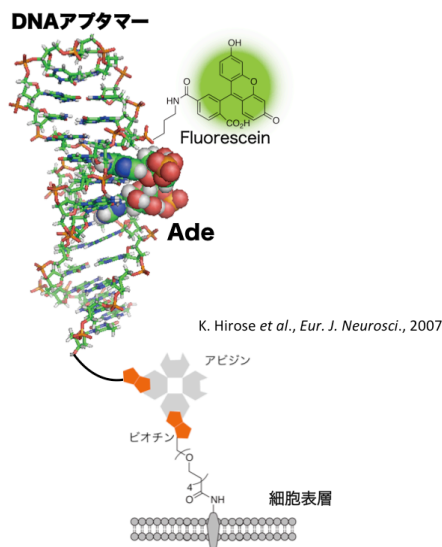


図4、細胞表面にビオチンを化学修飾するアプタマーセンサー固定化の概念図

これらの問題点を克服するために、我々は、新たな固定化法に着目した。アプタマーセンサーの末端に、細胞膜と親和性を有するトコフェロールを修飾する事で、センサーを直接細胞に固定化することを試みた(図5)。このセンサーを細胞に加えるだけで、簡便に細胞表面に固定化可能であった。

グリア細胞(アストロサイト)表面固定化後のセンサー応答能を確認したところ、トコフェロール修飾アプタマーセンサーは、グリア細胞表面でも親和性、選択性、応答速度等の性能を損なわず機能することが示された。

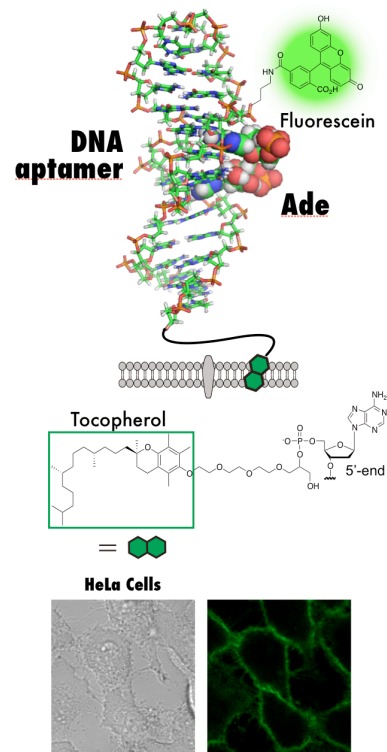


図5、細胞表面にアンカリング可能な脂質を修飾したアプタマーセンサー固定化の概念図と HeLa 細胞への修飾の様子

#### 4. 研究成果

グリア細胞(アストロサイト)の内因性 Ade 放出のリアルタイムイメージングを、開発した膜固定型蛍光アプタマーセンサーを用いて試みた。グリア細胞は機械的刺激を与えられることで、自発的にアデニンヌクレオチド放出を起こすことが知られている。そこで、センサーを固定化したグリア細胞にマイクロガラスピペットを用いて機械的刺激を与えると、Ade 放出に伴う蛍光強度の上昇が観測され、リアルタイム蛍光イメージングに成功した(図6)。

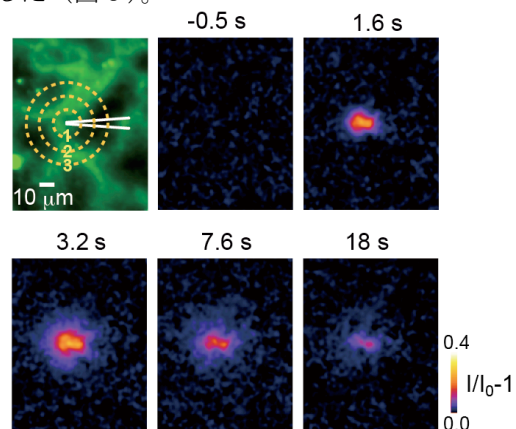


図6、グリア細胞(アストロサイト)の内因性 Ade 放出のリアルタイムイメージング

また、図6に示す1から3の各領域に分けて蛍光の時間変化を定量した結果を見ると(図7)、アデニンヌクレオチド濃度は急速に上昇し、ゆっくりと減衰した。通常の神経伝達物質濃度はミリ秒オーダーで速やかに上昇・減衰することが知られている。一方、アデニンヌクレオチドは、数十秒にも及ぶ長時間の減衰を示している。応答速度の速いセンサーを用いているため、このゆっくりとした減少は、センサーの応答速度が合わないことに起因するアーチファクトではなく、実際の変動をみているものと思われる。

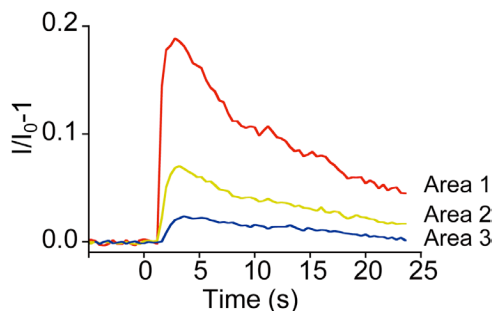


図7、図6のエリア1~3における蛍光強度変化の解析

さらに、機械的な刺激を受けたアストロサイトから観測されたAde放出が周囲の細胞に与える影響の同時観測についても検討をおこなった。アストロサイト表層にアプタマーセンサーをアンカリングした後に、カルシウムイオン蛍光プローブを細胞内に導入した。その細胞に、機械的刺激を与えるとAdeの放出に同調するように細胞内のカルシウムイオンが増大していく様子が観察された。系時的な変化を解析すると、アプタマーセンサーの蛍光増強は素早くおこり、それ以降は数十秒にわたりゆっくりと減少していくことがわかった。同様にカルシウムイオンの増大も数十秒にわたって同調して起こっていた。通常の神経伝達物質では、秒やミリ秒といったタイムスケールで放出される。今回観測されたAde放出は数十秒にも渡る長時間の放出挙動を示す。これにより、Adeが通常の伝達物質とは異なり、周辺の細胞を長期的に活性化するような役割を担っているのかもしれない。

本研究の目的であった、細胞膜上で行われる細胞間情報伝達物質の放出を分子レベルで可視化・解析へ向け、実際に細胞間で行われるATPなどの伝達物質放出現象を可視化・解析することに成功した。細胞間情報伝達物質の放出のイメージングへ向け、応答速度の評価、センサーの細胞への固定化法の検討、高精度蛍光イメージングを実施することができた。以上のことから、今後、特定の伝達物質に応答する蛍光アプタマーセンサーの

開発に成功すれば、同様の手法・システムへ適用可能であり、核酸アプタマーを用いた様々な細胞間伝達物質の解析基盤となり得るセンシング手法の可能性を示すことに成功した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

(1) Takeshi Tokunaga, Shigeyuki Namiki, Katsuhiko Yamada, Takahiro Imaishi, Hiroshi Nonaka, Kenzo Hirose, Shinsuke Sando  
Cell Surface-Anchored Fluorescent Aptamer Sensor Enables Imaging of Chemical Transmitter Dynamics  
*J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9561-9564.

〔学会発表〕(計 5件)

(1) Hiroshi Nonaka, Takeshi Tokunaga, Katsuhiko Yamada, Takahiro Imaishi, Shigeyuki Namiki, Kenzo Hirose, Shinsuke Sando  
Realtime imaging of chemical substances on cell surface using fluorescent aptamer sensor  
The 38th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry

(2) 徳永 武士、山田 雄大、今石 高寛、野中 洋、山東 信介  
細胞表層における分子イメージングを指向した核酸アプタマーの応用  
第5回バイオ関連化学シンポジウム

(3) 徳永 武士、並木 繁行、山田 雄大、今石 高寛、野中 洋、廣瀬 謙造、山東 信介  
核酸アプタマーによる細胞表層伝達物質リアルタイムモニタリング  
第92回日本化学会春期年会

(4) Hiroshi Nonaka, Takeshi Tokunaga, Shigeyuki Namiki, Katsuhiko Yamada, Takahiro Imaishi, Kenzo Hirose, Shinsuke Sando  
Realtime imaging of chemical transmitter dynamics on cell surface using fluorescent aptamer sensor  
The Second Asian Chemical Biology Conference

(5) 野中 洋、徳永 武士、並木 繁行、山田 雄大、今石 高寛、廣瀬 謙造、山東 信介  
核酸アプタマーセンサーによる細胞間情報伝達物質のリアルタイム蛍光イメージング  
第85回日本生化学会(招待講演)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

野中 洋 (NONAKA HIROSHI)

九州大学・稲盛フロンティア研究センター・特任助教

研究者番号：80579269