

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 8 月 31 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26630421

研究課題名(和文)細胞内での異常な核酸分子挙動の解析

研究課題名(英文)Analysis of dynamics of nucleic acid in cytosol

研究代表者

中村 史(Nakamura, Chikashi)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・客員教授

研究者番号：40357661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、モレキュラービーコン(MB)を用いて、細胞内を模した分子クラウディング環境でMBに対する核酸のハイブリダイゼーション速度(結合速度定数)を評価した。またMBを修飾したナノニードルを用いることによって、細胞内で直接mRNAの結合速度定数を評価することを試みた。20wt%PEGにより分子クラウディング環境を模した緩衝液中で結合速度定数は大きく、またDNAと比較してs-oligoの結合速度定数が大きいことが明らかとなった。細胞内での試験結果は、前述のいずれの結合速度定数を上回るものであり、過去の報告例と比較して細胞質におけるmRNAの拡散係数が大きいことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluated hybridization rate (association rate constant) of a molecular beacon (MB) with nucleic acids in molecular crowding condition mimicking intracellular environment. Furthermore, association rate constant of intracellular mRNA was directly analyzed by use of MB immobilized nanoneedle. In buffer solution simulated molecular crowding environment by addition of 20wt% PEG, association rate constant of s-oligo was higher than that of DNA. The constant of mRNA obtained by in vivo experiment exceeded all of the above-mentioned results. This result suggested that the diffusion coefficient of mRNA in cytosol is high compared to the previous reports.

研究分野：ナノ細胞工学

キーワード：分子クラウディング ナノニードル モレキュラービーコン 核酸分子 結合速度定数

1. 研究開始当初の背景

細胞内環境は緩衝液中と異なり、高濃度で存在する巨大分子やオルガネラによって分子クラウディングと呼ばれる環境が形成されている。この環境において分子は拡散阻害による拡散速度の低下や排除体積効果による実効的な濃度の上昇、結合の促進、構造の安定化などの影響を受ける。また、水分子は高濃度に存在する様々な分子を水和し、その活量は著しく低下していると考えられている。そのため、細胞内における分子の働きを解明するためには、緩衝液中ではなく細胞内、またはそれを模した環境での実験が不可欠である。

これまでに、細胞内の核酸の拡散係数は1/100程度と考えられてきた。また、三好、杉本のクラウディング剤を用いた系でB型DNA二重鎖が不安定化するという報告がある一方で(J Am Chem Soc, 128, 7957, 2006)、岡部らが報告するRNAプローブを用いた標的mRNAの検出速度は*in vitro*と細胞内でほぼ等価と考えられる(Nucleic Acids Res, 39, e20, 2011)。このような背景から、本研究では分子クラウディング環境下における核酸の挙動について明らかにすることを目的とした。我々は細胞内の分子を観察するために、AFMの探針を直径200nmの針状に加工したナノニードルを使用し研究を行ってきた。その過程で、表面にhGAPDH mRNAを標的とするモレキュラービーコンを修飾したナノニードルを細胞へ挿入することで、細胞内のhGAPDH mRNAの検出に成功した(Biosens Bioelectron, 26, 1449, 2010)。

細胞内 mRNA の検出実験に用いたヒト子宮頸部癌細胞 HeLa 内にはhGAPDH mRNA が約 2500 分子存在することが次世代シーケンサーによる解析から明らかとなっている。モレキュラービーコンはステムループ構造を形成する一本鎖 DNA の両端に蛍光基と消光基がそれぞれ結合しており、ループ部分に相補配列がハイブリダイズすることでステム構造が解離し、FRET が解消することで蛍光を発する。細胞に挿入したナノニードル表面で応答したモレキュラービーコンの分子数を蛍光強度から算出したところ、数千分子と見積もられ、細胞内のほぼ全ての hGAPDH mRNA がニードル表面に到達すると推察している。細胞内でのモレキュラービーコンの応答は、挿入後 10 秒という非常に短い時間で確認されている。分子クラウディング環境中では排除体積効果によって分子結合が促進されるが、近傍の分子間に起こる効果である。hGAPDH mRNA は細胞中にほぼ均一に拡散しているので、ナノニードルから遠位にある mRNA も迅速に表面に到達しなければならない。

2. 研究の目的

これまでに連携研究者である鈴木らの研究

により、アデノシンリン酸の周辺において、拘束水に加え、水分子間の水素結合ネットワークが通常の水より疎である「ハイパーモバイル水」が共存し、AMP、ADP、ATPとリン酸が付加されるにつれ、その量が増大することが明らかとなっている(Biophys Chem, 154, 1, 2011)。我々はこのハイパーモバイル水が mRNA のリン酸骨格周辺に存在するためにバルク水との水素結合ネットワークが形成しにくい状態になり、mRNA の拡散等の分子挙動に影響するのではないかと考えた。Franckらは、DNA 表面においてタンパク質や脂質表面に存在する水和水と異なり、容易に交換や転移が起こる水和水が存在することを NMR 測定から明らかにしており(J Am Chem Soc, 137, 12013, 2015)、核酸近傍の水分子の状態が他の生体分子とは異なることを示唆している。

そこで本研究では、DNA リン酸骨格の酸素原子 1 つを硫黄原子に置換したホスホロチオエートオリゴ(s-oligo)及びssDNAの*in vitro*におけるハイブリダイゼーション速度(結合速度定数)を解析することを目的とした。顕著な差違が観察された場合には、誘電緩和スペクトル測定を行い、ハイパーモバイル水について解析を行うこととした。また、細胞内での核酸の挙動を解析するために、hGAPDH モレキュラービーコンに加え、細胞内で応答性の無い inert モレキュラービーコンを設計し、これらを修飾したナノニードルを用いて結合速度解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 細胞

本研究では細胞内 mRNA 検出のためにヒト子宮頸部癌細胞 HeLa を対象として用いた。HeLa 細胞は 10%FBS (GIBCO)、Gentamycin/Amphotericin (invitrogen)、2 mM Gltamax (invitrogen) を含む DMEM (Sigma) で培養し、蛍光観察時にはフェノールレッドを含まない DMEM/F-12、HEPES (Life technology) に交換した。転写阻害には終濃度 500 nM の Actinomycin D (和光) を培地に添加した。

(2) モレキュラービーコンの表面修飾

本研究で用いたモレキュラービーコンは、消光基をラベル化した 3' 末端側チミンがピオチン化されており、ストレプトアビジンを

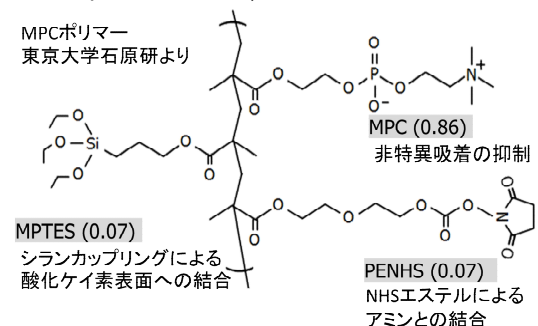


図1 使用した MPC ポリマーの構造

介してシリコンウエハまたはナノニードル表面への固定化を行った。シリコン表面の修飾には東京大学の石原一彦教授より分与頂いた MPC ポリマーを用いた(図1)。MPC ポリマーは、MPTES によるシランカップリングによりシリコン表面に共有結合により固定化し、ホスホリルコリンのドメインにより非特異的な相互作用を抑制する。NHS を介してストレプトアビジンを結合し、これに対してビオチン化モレキュラービーコンを添加することによって固定化を行った。

### (3) モレキュラービーコン応答試験

#### モレキュラービーコンの設計

モレキュラービーコンは hGAPDH mRNA の 564 番目から 582 番目までの 19 塩基を標的とし、7 塩基対でステム構造を形成するように設計した(Ann Biomed Eng, 34, 39, 2006)。3'側にビオチンとブラックホールクエンチャー1、5'側に Alexa488 を修飾した。また、ネガティブコントロールとして、同じステム配列を持ち HeLa 細胞内で応答しない配列を参照し(Bioconjug Chem, 19, 2205, 2006)、HeLa inert モレキュラービーコンを設計した。

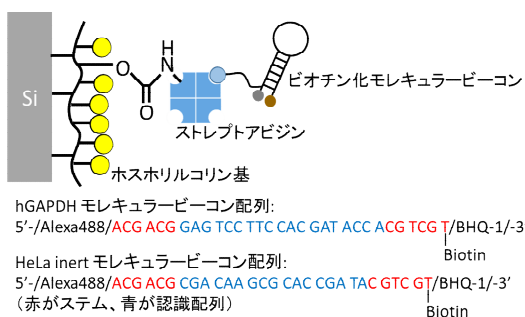


図2 モレキュラービーコンの修飾の模式図及び配列

#### in vitro 試験

細胞内を模擬した分子クラウディング環境を調製し、固定化モレキュラービーコンに対する 19 mer の標的 ssDNA のハイブリダイゼーション速度(結合速度定数)の解析を行った。細胞質模擬緩衝液(25 mM HEPES、115 mM CH<sub>3</sub>COOK、2.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.5 mM TCEP-HCl、pH 7.1)に終濃度 1 μM で標的 ssDNA もしくはホスホロチオエート(s-oligo)を添加し、シリコンウエハに固定されたモレキュラービーコンの蛍光強度の経時変化を測定した。分子クラウディング剤として PEG200(東京化成)を終濃度 20wt%で添加した緩衝液で同様の実験を行った。測定のための蛍光画像の取得には倒立型顕微鏡 IX80(Olympus)を使用し、ミラーユニットは NIBA を用いた。励起光の光源には水銀ランプを使用した。観察は 10 秒ごとに 20 分以上行い、撮影時以外にはシャッターを使用して励起光を遮断した。各画像の蛍光強度測定には ImageJ を使用した。測定は室温で行ったが二本鎖の解離は起こらないため、解離のな

い二次反応速度式による回帰を KaleidaGraph(Synergy software)を用いて行い、結合速度定数を算出した。

#### in vivo 試験

細胞内の hGAPDH mRNA のハイブリダイゼーションの速度解析を行った。ナノニードルは単結晶シリコン製の AFM カンチレバー ATEC-CONT(NanoWorld AG)を集束イオンビーム加工装置 SMI500(日立ハイテクサイエンス)で直径 200 nm、長さ 15 μm に加工したものを、AFM NanoWizaed I(JPK Instruments AG)を用いて細胞へ挿入した。共焦点レーザー蛍光観察によりナノニードル先端付近の領域を走査し取得した蛍光画像から蛍光強度の経時変化を測定した。蛍光観察時の光源には 488 nm のレーザーを使用し吸収フィルターによって 510 nm 以上の波長の蛍光を観察した。蛍光強度の経時変化の測定と結合速度定数の算出には in vitro 試験と同様の手順を用いた。結合速度定数算出の際の細胞内 hGAPDH mRNA 濃度は、2500 分子に対して排除体積を考慮し細胞質実効容積を 0.1 pL とし、42 nM として計算を行った。ネガティブコントロールとして、Actinomycin D により、転写阻害した HeLa 細胞を用いた試験と、HeLa inert 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試験を行った。

## 4. 研究成果

### (1) in vitro 試験の結果

シリコンウエハ表面に固定化した hGAPDH モレキュラービーコンと標的一本鎖核酸のハイブリダイゼーションによる蛍光強度の経時変化を蛍光顕微鏡で観察した。観察された蛍光強度から緩衝液中でのモレ

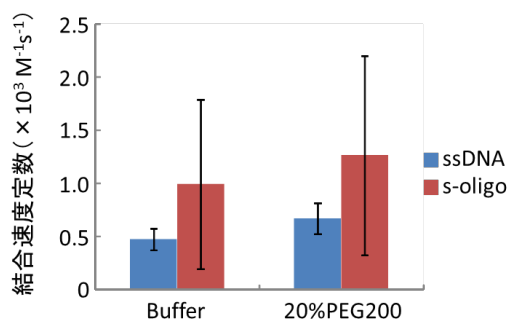


図3 ssDNA 及び s-oligo の細胞質模擬緩衝液及び 20% PEG 添加緩衝液中における結合速度定数

キュラービーコンと核酸の結合速度定数を算出したところ、ssDNA では  $4.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、s-oligo では  $9.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  であった。また、20wt%の PEG200 を用いて調製した分子クラウディング緩衝液中では、ssDNA では  $6.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、s-oligo では  $1.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  であった。

まず、PEG200 により調製した分子クラウンディング環境では、速度定数がより大きいことが示された。PEG 添加による排除体積効果によるものと考えられる。反応後、標的核酸と PEG を含まない緩衝液に置換するとモレキュラービーコンの蛍光が増大した。PEG を添加した分子クラウンディング環境でワトソンクリック型塩基対が不安定化しているためと推察される。

また、ssDNA と比較して s-oligo の結合速度定数は明らかに増大していた。連携研究者の鈴木らの調査結果から尿素の酸素原子を硫黄原子に置換したチオ尿素にはより多くのハイパーモバイル水が存在することが明らかとなっている。リン酸の酸素原子を硫黄原子に置換することによって同様の効果が得られるために s-oligo の結合速度定数が増大する可能性があるとして我々は推察した。鈴木らと誘電緩和スペクトル測定を行っているが、現在のところ s-oligo のハイパーモバイル水の検出に至っていない。引き続き測定を継続し、結果は論文発表等をもって報告する予定である。

## (2) *in vivo* 試験の結果

シリコン製ナノニードルに MPC ポリマーを用いて hGAPDH モレキュラービーコンまたは HeLa inert モレキュラービーコンを固定化し、HeLa 細胞に挿入した。挿入前および挿入直後から 15 分間、ナノニードル表面の蛍光強度の経時変化を共焦点顕微鏡で観察した(図4)。終濃度 0.5 μM で Actinomycin D を培地に添加した HeLa 細胞を用いて同様の実験を行った。

まず、hGAPDH モレキュラービーコンで、HeLa 細胞内でナノニードル表面の蛍光強度の上昇を確認した。これに対して HeLa inert モレキュラービーコンでは細胞内で蛍光強度の上昇は確認されなかった。HeLa inert モレキュラービーコンのステムの配列は全く同じであり、*in vitro* 試験では良好な応答を示したことから、ナノニードルの挿入による応力などで機械的にステムが解離するのではないことが明らかとなった。また、転写阻害した細胞では hGAPDH モレキュラービーコンの応答が確認されなかったことから、

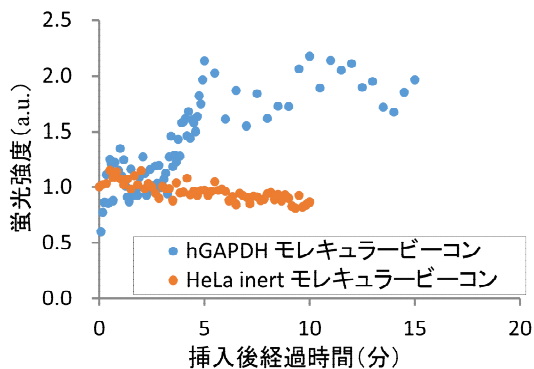


図4 細胞内でのモレキュラービーコンの応答

蛍光強度の上昇は mRNA とのハイブリダイゼーションによるものであることが示された。蛍光強度の経時変化から細胞内での hGAPDH mRNA の結合速度定数を算出したところ、 $4.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であった。この速度定数は 20wt% PEG 緩衝液を用いた *in vitro* 試験の ssDNA の結果と比較して、二桁大きい値である。細胞質実効容積を細胞体積の 10%程度とし、mRNA 濃度を大きく見積もってなおこのような大きな差が得られた。希薄溶液と比べて細胞内では核酸分子の拡散係数が著しく低下することが報告されているが (*J Biol Chem*, 275, 1625 2000)、得られた結果は細胞質における mRNA の拡散係数が緩衝液中と同等もしくはそれ以上であることを示唆する。一方で、分割蛍光蛋白質とナノニードルを用いた蛋白質の結合速度定数の評価では、*in vitro* と *in vivo* で同程度の結果が得られている。核酸においては、ハイパーモバイル水のようなまだ未解明の特殊な水分子が配置されることで、細胞内における分子挙動に大きく影響すると我々は推察している。

## 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)

D. Matsumoto, R. R. Sathuluri, Y. Kato, Y. R. Kawamura, F. Iwata, T. Kobayashi and C. Nakamura, Oscillating high-aspect-ratio monolithic silicon nanoneedle array enables efficient delivery of functional bio-macromolecules into living cells, *Scientific Reports*, 5, Article number: 15325 2015, 査読有

doi:10.1038/srep15325

T. Saito, W. Yoshida, T. Yokoyama, K. Abe and K. Ikebukuro, Identification of RNA Oligonucleotides Binding to Several Proteins from Potential G-Quadruplex Forming Regions in Transcribed Pre-mRNA, *Molecules*, 20(11), 20832-40, 2015, 査読有 doi: 10.3390/molecules201119733.

### [学会発表](計7件)

C. Nakamura, Nanoneedle technology for single cell biosensing and cell sorting, *Pacificchem2015*, December 18, 2015, Honolulu, Hawaii, USA,

C. Nakamura, D. Matsumoto, Y. Kato, F. Iwata, K. Kobayashi, Nanoneedle technology for living cell analysis and manipulation, 3rd International Conference on Nanotechnology in Medicine, Manchester, United Kingdom, November 23, 2015

内藤 瑞紀, 柳 昇桓, 松本 大亮, K. R. Rostgaard, K. L. Martinez, 深澤 今日子, 石原 一彦, 中村 史, 分割蛍光タンパ

ク質の細胞内結合解析、2015年9月11日、第9回バイオ関連化学シンポジウム、熊本大学工学部、熊本県熊本市

C. Nakamura, Nanoneedle technology for biosensing, UK-Japan Workshop on Biosensing Technology for the Innovative Healthcare, British Embassy in Tokyo, Japan, December 1st-3<sup>rd</sup>, 2014

中村 史、ナノニードルを用いた細胞内分子の *in situ* 検出技術、2014年電気化学秋季大会、2014年9月27日 - 28日、北海道大学高等教育推進機構、北海道札幌市

中村 史、AFMカンチレバー型ナノニードルを用いた *in situ* 細胞解析、界面科学コロキウム「原子間力顕微鏡」(招待)神戸大学、2014年7月18日 - 18日

中村 史、ナノニードル技術を用いた生細胞の骨格タンパク質の解析、第53回生体医工学会大会シンポジウム、2014年6月24日 - 26日、仙台国際センター、宮城県仙台市

〔図書〕(計1件)

R. Kawamura, Y. R. Silberberg and C. Nakamura, Nanobiosensors and Nanobioanalysis, 379, 291-303, 2015

〔その他〕

ホームページ等

<https://unit.aist.go.jp/bmd/biomed-cme/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 史 (NAKAMURA, Chikashi)  
東京農工大学・大学院工学府・客員教授  
研究者番号：40357661

(2) 研究分担者

池袋 一典 (IKEBUKURO, Kazunori)  
東京農工大学・大学院工学研究院・教授  
研究者番号：70251494

(3) 連携研究者

鈴木 誠 (SUZUKI, Makoto)  
東北大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号：60282109