

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2011～2015

課題番号：23107006

研究課題名(和文) 直接細胞内分子観察できる極微小探針の創製

研究課題名(英文) Development of a nanoprobe for measuring the molecular dynamics in living cells

研究代表者

三宅 淳(Miyake, Jun)

大阪大学・基礎工学研究科・教授

研究者番号：70344174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 68,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内は通常の化学実験と異なり、多くの繊維性構造体や膜構造体、様々なタンパク質複合体・巨大核酸が高密度に存在する分子クラウディング環境となっている。本研究は、こうした細胞内の高分子動態を実験的に解析する事を目的としている。mRNAを細胞内で直接計測するための極微小探針(直径400nm、長さ10um)を作製し、極微小探針をAFMにて直接細胞に挿入することで、概ね1000コピー以上存在するmRNAの安定的な検出に成功した。

研究成果の概要(英文)：In living cells, there are many huge filamentous structures, organelles, protein complexes, and nucleic acids. The complex intracellular environment rises from awful molecular crowding conditions in the cytosol. To learn the dynamic molecular reactions in living cells, it is essential to clarify their physicochemical structure and features like disproportional macromolecular crowding structures, molecular diffusion, and excluded volume effect. In this project, we have aimed to analyze the macromolecular dynamics, simulate physical structures.

To analyze the dynamics of mRNA in living cells, we have to develop an mRNA detection system with nM sensitivity in molecular crowding conditions. We modified the nanoneedle with molecular beacon, which is a highly sensitive nuclear acid probe. The developed nanoprobe could detect as small as 1 nM RNA in solution. By using the nanoprobe for GAPDH or beta-actin, we succeeded in selective detection of the mRNA inside the cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：分子クラウディング AFM mRNA 細胞骨格 高空有間分解能イメージング 深層学習

### 1. 研究開始当初の背景

疾病を分子反応の統合として理解し、それを解決する技術系の構築には、細胞を反応場とした分子反応の統合的理解あるいは高次の体系化が欠かせない。特に細胞内は通常の化学実験と異なり、多くの繊維性構造体や膜構造体、様々なタンパク質複合体・巨大核酸が高密度に存在する分子クラウディング環境となっている。そのため、細胞内における分子反応を理解・考察するためには、通常の *in vitro* で行われるような希薄溶液中での分子反応研究ではなく、実際の細胞内環境下での分子反応研究、特に細胞内での分子拡散等に影響を与える高分子環境を明らかにし、その環境下での分子反応を研究することが必要となる。しかしながら、細胞内空間は極度に複雑な高分子流体であり、これを簡易な形で定式化し、さらにその中の分子反応の定量的解析・分子反応パラメーターの同定を行うことは困難である。そのため、実際の細胞内環境下における分子動態・分子反応を解析可能な実験系の構築と、それを簡略的にも再現可能なモデルを構築することが出来れば、細胞内分子反応研究の重要なプラットフォームになると考えられる。

### 2. 研究の目的

細胞内環境下における分子反応の詳細な解析を可能とする「極微小探針」の創製を行い、それを用いた細胞内における分子反応の定量解析、細胞骨格のナノ力学計測、新規の高分解能イメージング手法の開発、深層学習による細胞ダイナミズムの構築を行うことで、広く細胞内における分子動態・反応解析のプラットフォームの構築を目指す。

### 3. 研究の方法

- (1) 細胞に挿入することで、細胞内 mRNA の検出を可能にする極微小探針を創製する。創製した極微小探針を用いて細胞内 mRNA の定量解析を行う。
- (2) AFM を用いた生細胞内における細胞骨格の直接的検出技術の開発
- (3) 細胞内の分子を高空間分解能で観察可能なプローブの創生とイメージング応用。
- (4) 細胞ダイナミズムの解析を行う深層学習的手法の構築。

### 4. 研究成果

(1) 原子間力顕微鏡技術を利用し、直接細胞内に挿入可能な探針 (直径 200-400nm, 長さ 10 $\mu$ m) を製作し、そこに mRNA を検出可能なモレキュラービーコンを修飾することで mRNA 検出のための極微小探針を創製した (図 1(a))。ナノプローブの検出限界は 1nM であり、細胞内 mRNA の特異的な検出に成功した。細胞内の GAPDH の濃度として nM オー

ダーと推定され、この濃度はリアルタイム PCR によって得られた 1 細胞当たりの mRNA 濃度と同オーダーであった (図 1(b))。細胞に探針を挿入することで細胞内に蛍光分子を導入する手法と細胞内の溶液環境を変化可能なセミインタクト細胞技術を用い、細胞質・核質・核小体での分子ダイナミズムを蛍光分子の拡散から評価した (図 2)。細胞質中における分子拡散に可溶性分子が働いていること、核質中の分子拡散は DNA の影響が大きいこと、核小体では DNA によって拡散しやすい環境が作られていることを明らかにした。

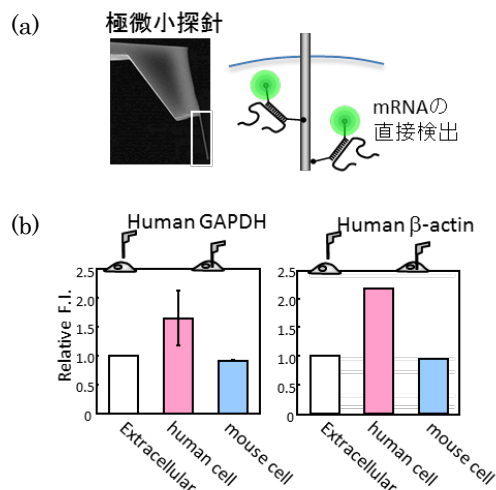


図 1 極微小探針による細胞内 mRNA の直接検出。配列特異的に検出可能。

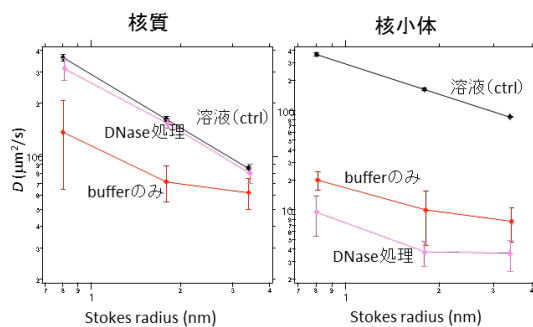


図 2 核質と核小体における分子の拡散係数の比較。核質と核小体では DNA が分子拡散におよぼす影響が異なる。

(2) 細胞は細胞内に存在するアクチン細胞骨格・細胞質によって、リポソームとは異なる力学構造 (粘弾性体であり、運動・不均一性・多様な形態のため時空間内での変動が大きい) を有している。そのため、その特性を一義的に表現することは難しい。そこで、細胞の形態から生じる非対称性をなくし、均等な球状で AFM 測定するシステムを構築した。球状状態で細胞のアクチン細胞骨格は再構築され膜周辺の cortical actin が発達する。こうした cortical actin に由来する球状細胞の力

学特性も、接着時と同様に時空間内での変動は大きく、対称空間内での不均一性・動的変化を表していると思われる。こうした球状細胞の弾性率は分裂期の細胞の弾性率よりも3-4倍高く、アクチン細胞骨格の再構築・cortical actinの発達プロセスが両機構で異なることが力学的に示唆された(図3)。

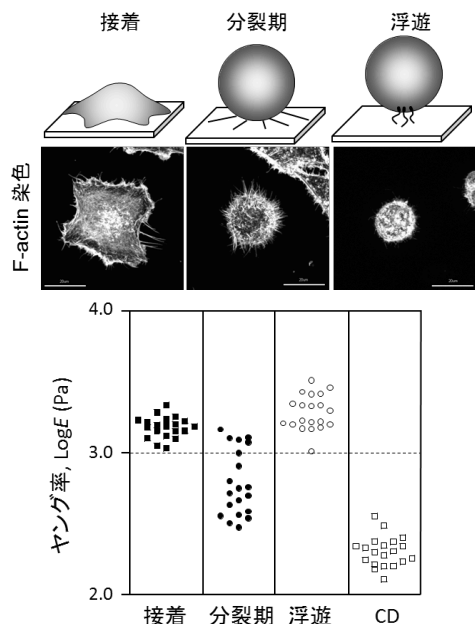


図3 細胞の状態によって異なる表層の力学特性。

(3) 電子線照射によって励起される発光(CL: Cathodoluminescence)を呈するナノ粒子を作製した。観察に電子顕微鏡を用いることができるため、高空間分解能での観察が可能であり、発光波長を分光することでモノクロの電験像を蛍光顕微鏡のようにカラー観察可能となる。 $Y_2O_3$ を母材とし、希土類元素を添加したナノ粒子を、均一沈殿法により作製した。この時、反応に用いる尿素の量を調整することで粒子径をおよそ300 nmから30 nmの間で制御することに成功した。希土類元素としてTmとYbを導入した粒子( $Y_2O_3:Tm,Yb$ )はそれぞれ、電子線照射によって波長455 nm付近のCL発光を呈した。 $Y_2O_3:Er,Yb$ は550 nm及び660 nm付近のCL発光を呈した。は蛍光体のCL像であり、STEMを用いて観察を行った。図4より、STEMと同程度の空間分解能でのイメージングが可能であるといえる。また、両方の蛍光体をHeLa細胞へ導入し、STEM-CLイメージングを行ったところ、STEM像よりミトコンドリアなどの細胞内器官の観察ができ、さらに、CL像において発光波長の違いからそれぞれの蛍光体を見分けることに成功した(図5)。

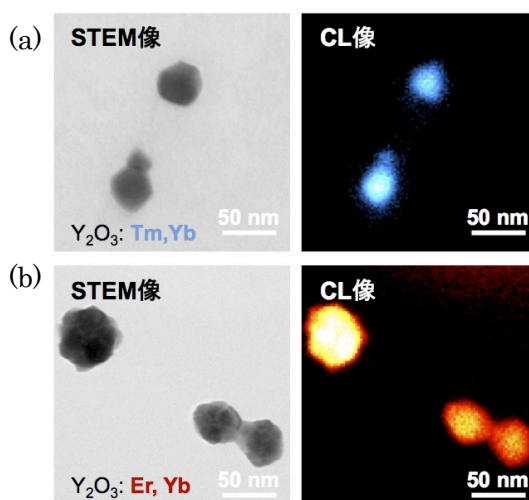


図4 (a) $Y_2O_3:Tm,Yb$ のCL及びSTEM像(b) $Y_2O_3:Er,Yb$ のCL及びSTEM像

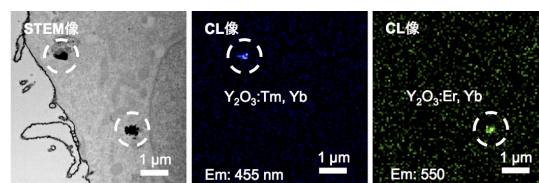


図5 ナノ粒子を取り込んだ細胞のSTEM像及びCL像

(4) 深層学習(Deep Learning)の一種であるCNN(Convolutional Neural Network)(図6)を構築し、位相差顕微鏡像から細胞の分化判別を行なった。実験では、試料としてマウス骨格筋芽細胞(C2C12)を用い、高速演算処理のために自作のPC(GPU: NVIDIA GTX980Ti, CPU: Intel Corei7-4790K, メモリ: 8GB)と、独自に開発したDeep LearningライブラリSigmaを用いた。C2C12は分化誘導を行なうと、徐々に細長い形状に変化し、最終的に細胞核が融合し多核の筋管細胞へと分化する。分化誘導を開始した日をDay 0とし、Day 0および分化後であるDay 6それぞれの細胞位相差像(各1000枚、1枚の画像サイズは200x200 pixels)を取得した。各画像をCNNによって学習し、テストデータ(各100枚)の分類を行なった。100万回の学習を繰り返すことにより、96%の精度で識別が可能となった(図7)。Day 6の細胞においては、免疫染色により分化マーカーであるミオシン重鎖の発現を確認した。従って、CNNを用いた本手法は、細胞の形態から細胞内の分子動態を解析するプラットフォームとして有用であると考える。

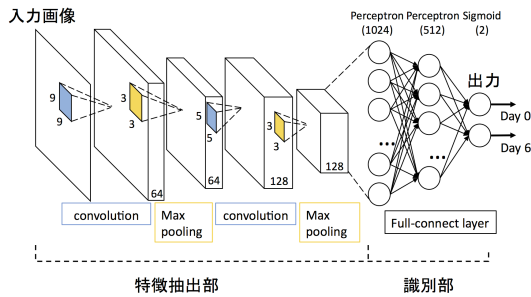


図 6 用いた CNN の構造 convolution 層と max pooling 層による特徴抽出部と fullu-connect による識別部よりなる。図では出力に day0, day6 の識別を行う。

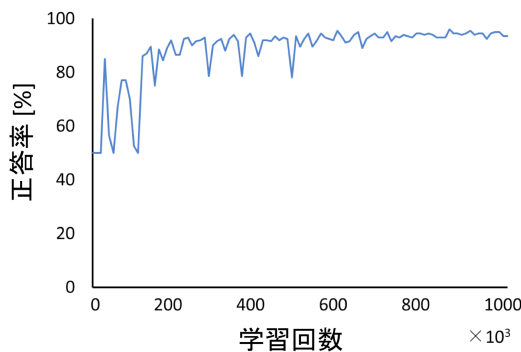


図 7 学習回数と正答率の関係

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

1. **Kihara, T.**, Yoshida, T., Haghparast, S.M.A., **Miyake, J.**, Elasticity Mapping Analysis of Apical Cell Periphery Actin Structures of Normal Fibroblasts and Cervical Cancer Cells, *Journal of Analytical Sciences, Methods and Instrumentation*, 3, 124-129, (2013) 査読あり  
DOI:10.4236/jasmi.2013.32015
2. **Kihara, T.**, Ito J., **Miyake J.**, Measurement of Biomolecular Diffusion in Extracellular Matrix Condensed by Fibroblasts Using Fluorescence Correlation Spectroscopy, *PLoS ONE* 8(11): e82382 (2013) 査読あり  
DOI:10.1371/journal.pone.0082382
3. Haghparast, S.M.A., **Kihara, T.**, Shimizu, Y., Yuba, S., **Miyake, J.**, Actin-based biomechanical features of suspended normal and cancer cells, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 116(3), 380-385 (2013) 査読あり  
DOI:10.1016/j.jbiosc.2013.03.003
4. Fukushima, S., Furukawa, T., **Niioaka, H.**, Ichimiya, M., **Miyake, J.**, Ashida, M., Araki, T., Hashimoto, M.,  $Y_2O_3:Tm, Yb$  Nanophosphors for Correlative Upconversion Luminescence and Cathodoluminescence

Imaging, *Micron*, 67, 90-95 (2014) 査読あり

DOI:10.1016/j.micron.2014.07.002

5. Furukawa, T., Fukushima, S., **Niioaka, H.**, Yamamoto, N., **Miyake, J.**, Araki, T., Hashimoto, M., Rare-earth-doped nanophosphors for multi-color cathodoluminescence nano-bioimaging using scanning transmission electron microscopy, *Journal of Biomedical Optics*, 20, 5, 056007 (2015) 査読あり  
DOI:10.1117/1.JBO.20.5.056007

6. Haghparast, S.M.A., **Kihara, T.**, **Miyake, J.**, Distinct mechanical behavior of HEK293 cells in adherent and suspended states, *PeerJ*, 3, e1131 (2015) 査読あり  
DOI:10.7717/peerj.1131

7. Tachibana, K., Haghparast, S.M.A., **Miyake, J.**, Inhibition of cell adhesion by phosphorylated Ezrin/Radixin/Moesin, *Cell Adhesion & Migration* 9(6), 502-512 (2015) 査読あり  
DOI:10.1080/19336918.2015.1113366

8. Fukushima, S., Furukawa, T., **Niioaka, H.**, Ichimiya, M., Sannomiya, T., Miyake, J., Ashida, M., Araki, T., Hashimoto, M., Synthesis of  $Y_2O_3$  nanophosphors by homogeneous precipitation method using excessive urea for cathodoluminescence and upconversion luminescence bioimaging, *Optical Materials Express*, 6, 813 (2016) 査読あり  
DOI:10.1364/OME.6.000831

9. Fukushima, S., Furukawa, T., **Niioaka, H.**, Ichimiya, M., Sannomiya, T., Tanaka, N., Onoshima, D., Yukawa, H., Baba, Y., Ashida, M., **Miyake, J.**, Araki, T., Hashimoto, M., Correlative near-infrared light and cathodoluminescence microscopy using  $Y_2O_3:Ln, Yb$  ( $Ln = Tm, Er$ ) nanophosphors for multi-scale, multi-colour bioimaging, *Scientific Reports*, 6, 25950 (2016) 査読あり  
DOI:10.1038/srep25950

[学会発表] (計 76 件)

1. **Kihara T.**, and **Miyake, J.**, Biomechanical properties measurement for cell physiological evaluation, BPES2011, cooperated with 8th International Conference on Ubiquitous Healthcare, Kusatu, Japan (2011),
2. **Miyake, J.**, Regenerative Medicine and the Industrialization, 35th Ann. Conf. of the IEEE

Engineering in Medicine and Biology Society  
(Osaka, Japan, 2013)

3. **Miyake, J., Kihara, T., Niioka, H., Nakamura, C.**, Development of nanoprobe for measuring dynamics in a cell, International Symposium on Nanomedicine Molecular Science 2013 (University of Tokyo, 2013/07/06)
4. **Niioka, H.**, Furukawa, T., Fukushima, S., Ichimiya, M., **Miyake, J.**, Ashida, M., Araki, T., Hashimoto, M., Rare-earth doped Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanophosphors for biological cathodoluminescence imaging, International Conference on Small Science (Las Vegas, USA, 2013/12/15-18)
5. **Niioka, H.**, and **Miyake, J.**, Towards molecular imaging in multiscale with using fluorescent nano-probes excited by both NIR light and electron beam, International Symposium on Nanomedicine Molecular Science (Tsurumai Campus, Nagoya University, 2014/01/14)
6. **Miyake, J., Kihara, T., Niioka, H., Haghparast, S.M.A., Nakamura, C.**, Nanoprobes for Measuring the Molecular Dynamics in Living Cells, The 6th Taiwan-Japan Symposium on Nanomedicine (Taipei, Taiwan, 2015/01/08)
7. **Miyake, J.**, Asatani S., **Niioka, H.**, Spectroscopy, Mechanics and Informatics for Cell Analysis, Nanomedicine International Symposium (University of Tokyo, Japan, 2015/11/26)
8. **Miyake, J.**, Asatani, J., Yoshimura, A., Tagawa, S., **Niioka, H.**, Deep Learning and Spectroscopy, for Cell Analysis, The 7th Taiwan-Japan Symposium on Nanomedicine, (Tokyo, Japan, 2016/01/21)

[図書] (計 2 件)

1. Shinohara, S., Shinohara, S., **Kihara, T., Miyake, J.**, Regulation of differentiated phenotypes of vascular smooth muscle cells, Current Basic and Pathological Approaches to the Molecules to Humans, Sugi, H. (ed), InTech, pp331-344 (2012)
2. **Kihara, T.** (分担執筆), Hyper Bio Assembler for 3D cellular Systems, Springer, 317-326 (2015)

[その他]

金下裕平, 浅谷学嗣, 田川聖一, **三宅淳**, ディープラーニングの技術内容, 歴史, 今後の応用, 機能材料 2016 年 6 月号 Vol.36 No.6 p.69-75

浅谷学嗣, 田川聖一, **三宅淳**, 画像認識に活用されるディープラーニング, 機能材料 2016 年 7 月号 Vol.36 No.7 p.3-11

三宅研究室 HP

[http://miyake.bpe.es.osaka-u.ac.jp/ban\\_da\\_ji\\_chu\\_gong\\_san\\_zhai\\_yan\\_jiu\\_shi/Home.html](http://miyake.bpe.es.osaka-u.ac.jp/ban_da_ji_chu_gong_san_zhai_yan_jiu_shi/Home.html)

木原研究室 HP

<http://takanori-kihara.jimdo.com>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三宅 淳 (MIYAKE, Jun)

大阪大学大学院・基礎工学研究科・教授  
研究者番号：70344174

### (2) 研究分担者

木原 隆典 (KIHARA, Takanori)

北九州市立大学・国際環境工学部・准教授  
研究者番号：90436535

新岡 宏彦 (NIIOKA, Hirohiko)

大阪大学大学院・基礎工学研究科・助教  
研究者番号：70552074