

平成 22 年 4 月 21 日現在

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） Detection and delivery of mRNA in a living cell using a 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・セルエンジニアリング研究部門・研究グループ長

研究者番号：40357661

研究代表者の専門分野：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：細胞操作、RNA 抽出、AFM、ナノ針、タンパク質発現

1. 研究計画の概要

生きた細胞内における mRNA 発現をネイティブな状態を維持しつつ観察する、あるいは mRNA を細胞に導入する技術を開発する。細胞内は、様々な生体分子、小器官が密集し、混在した空間であり、試験管内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 を検出する手法を開発する。mRNA は微小管に沿って運搬され、細胞内の適正な位置に局在して翻訳されるなどの報告もあるが、1 個の細胞内で mRNA がどのような挙動をしているかについては不明な点も多い。本研究では、細胞に対して非常に侵襲性が小さく、その挿入によって転写阻害をしない直径 200 nm のナノ針を用いて、細胞内の mRNA を定量的に評価する手法を確立することを目的としている。モレキュラービーコン修飾ナノ針を用いて細胞内の GAPDH、アクチンの mRNA の検出を試み、細胞内でのモレキュラービーコンへの mRNA の結合について解析を行う。また細胞外へ mRNA を抽出していないかどうか、転写阻害剤を用いた試験等によって調査を行う。mRNA の導入では、化学修飾によりカチオンを導入したナノ針を用いて静電的な相互作用による吸着で導入を検討する。

2. 研究の進捗状況

挿入されたナノ針表面のモレキュラービーコンに mRNA がハイブリダイズすれば、モレキュラービーコンの FRET が解消され、ナノ針表面で蛍光強度の上昇が観察される。ヒトの GAPDH で設計されたモレキュラービーコンの mRNA 認識配列は、ヒトとマウスの間で

3 塩基の違いがあるために、ヒト細胞である HeLa では蛍光強度の上昇が見られるが、マウス繊維芽細胞である C3H10T1/2 では見られなかった。また、細胞内で上昇した蛍光強度は、針を細胞外へ抜き去り、培地中で測定すると減少し、複数の細胞で連続的に測定することが出来た。モレキュラービーコン修飾ナノ針の引き抜き動作によって、細胞外へ mRNA を抽出していないことを示唆する結果が得られている。このことは、モレキュラービーコンという分子ツールを利用して細胞外から内へ mRNA を導入する手法は機械的に不可能であることを同時に示唆している。

3. 現在までの達成度

おおむね順調に進展している。

mRNA の導入方法の開発が遅れている点はマイナスであるものの、複数細胞の mRNA の発現を連続的に検出する技術を開発できた成果は予想以上であり高く評価できると考えている。

4. 今後の研究の推進方策

細胞内でのモレキュラービーコンへの mRNA の結合についてさらに解析を行う。mRNA を抽出していないかどうか、転写阻害剤を用いた試験によってさらに調査を行う。また、mRNA の非常に速い結合に関して、さらなる考察を行う。細胞内で起こっているであろう分子クラウンディング等の効果を検証し、見かけの GAPDH mRNA 濃度とその結合挙動について詳細な調査を行う。これにより、細胞にナノ針を挿入する解析手法そのものが細胞内で起こる現象を正確に表現できる手法であることを証明する。mRNA の導入では、化学修

飾によりカチオンを導入したナノ針を用いて静電的な相互作用による吸着で導入を検討する。

5. 代表的な研究成果

(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3件)

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、59-61、2008(査読無)

Sung-Woong Han, Seunghwan Ryu, Taro Kitagawa, Hiroshi Uetsuka, Naoji Fujimori, Yukihiro Aoki, Ryo Ota, Yosuke Amemiya, Nobuo Shimamoto, Chikashi Nakamura and Jun Miyake, Evaluation of the effectiveness of tapered silicon and novel diamond nanoneedles in manipulations of living single cells, Archives of Histology and Cytology (2010) in press (査読有)

Harumi Kagiwada, Chikashi Nakamura, Takanori Kihara, Hideki Kamiishi, Keiko Kawano, Noriyuki Nakamura, Jun Miyake, The mechanical properties of a cell as determined by its actin cytoskeleton are important for nanoneedle insertion into a living cell, Cytoskeleton (accepted) (査読有)

[学会発表](計25件)

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 年 3 月 29 日、近畿大学

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

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 年 3 月 29 日、日本大学

中村 史「ナノ針材料を用いた低侵襲な物質導入技術の幹細胞への応用」、シンポジウム「幹細胞の産業化に向けて～世界の動向と産総研の取組み～」、2008 年 7 月 25 日、東京国際交流館プラザ平成

中村 史「細胞を操作するためのナノスケールの針材料」、第 10 回次世代医療シ

ステム産業化フォーラム 2007、2008 年 1 月 29 日、神戸国際会館

[図書](計3件)

木原隆典、中村 史、三宅 淳「遺伝子導入技術」、Medical Bio、オーム社、46-49、2009

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、中外医学社、27/11、1304-1305、2009

中村 史、中村徳幸、三宅 淳「ナノ針を用いた細胞操作技術」、細胞分離・操作の最前線、シーエムシー出版、344-353、2008

[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：特許権

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：特許権

番号：4370397

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

<http://unit.aist.go.jp/rice/research/seitaiundou.html>