

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06590

研究課題名（和文）時空間相関イメージングによる細胞内遺伝子デリバリー機構の全容解明

研究課題名（英文）Comprehensive elucidation of intracellular gene delivery mechanisms using spatiotemporal correlation imaging

研究代表者

佐々木 章（Sasaki, Akira）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長

研究者番号：30580162

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：時空間相関イメージングの基礎となる画像相関法の基盤技術の検討を行った。2色で蛍光標識されたDNAオリガミ分子の標識間の相関（共局在性）を定量化する技術を構築し、その標準試料に関する総説論文を発表した。また、本技術を細胞内のRNA測定に展開していくための技術として、蛍光アプタマーを活用した蛍光相関解析の検討を行い、論文成果を得た。また、画像相関の基礎技術が顕微鏡のハードウェア性能を定量評価できることを見出した。RNAseqを用いて複数細胞種のDNA分解酵素遺伝子発現プロファイルを比較した結果、差が見られたタンパク質の中に核酸分解酵素も含まれていることが明らかになり、一定の絞り込みに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では画像相互相関アルゴリズムを開発し、異なる情報同士で相互相関（この場合は2色蛍光の共局在性）を定量評価することに成功した。顕微鏡を用いた測定値を校正するストラテジーや標準試料に関する基盤も構築した。また、本技術を細胞内のRNAに展開していくための技術として、蛍光アプタマーを活用した蛍光相関解析にも成功した。さらにRNAseqにより細胞内のDNA分解に関与する分子の絞り込みに成功した。これらの成果は、蛍光顕微鏡による分子動態の定量技術としての有用性に加え、遺伝子デリバリーの基盤となる知見を与えるものであり、近年新たなモダリティとして注目を集めている核酸医薬への貢献も期待される。

研究成果の概要（英文）：We investigated the basic technology of image correlation methods, which is the basis of spatiotemporal correlation imaging. We developed a technique to quantify the correlation (colocalization) between labels in DNA origami molecules labeled with two colors of fluorescent dyes, and published a review paper on standard samples for this method. Additionally, we explored fluorescent correlation analysis using fluorescent aptamers as a technique to extend this technology to intracellular RNA measurements, resulting in published research findings. We also discovered that the fundamental technology of image correlation can quantitatively evaluate microscope hardware performance. By comparing the gene expression profiles of DNA-degrading enzymes in multiple cell types using RNA sequencing (RNAseq), we identified that some of the proteins with observed differences included nucleases, successfully narrowing down the candidates.

研究分野：生物物理学、分析化学

キーワード：画像相関分光法 ジーンデリバリー

1. 研究開始当初の背景

遺伝子ベクター複合体は、外来遺伝子を人工的に細胞に導入する際に用いられ、ターゲットとなる遺伝子をコードした核酸と、運び屋となる化合物、ポリマーや脂質が自己集合的に結合することで生じる。この複合体は細胞に取り込まれ外来遺伝子発現を引き起こす。しかし、遺伝子ベクター複合体が細胞に侵入し運んだ遺伝子を発現させるまでの過程のほとんどはブラックボックスである(図1)。申請者は過去に蛍光相関分光法(FCS)に代表される種々の相関解析法を用いて外来遺伝子が細胞内で分解される機序を明らかにしてきた(Sasaki *et al.*, *J. Cont. Release* 2010, *Sci. Rep.* 2015 他)。しかし、遺伝子デリバリーの全体像を細胞内で解明した例はなく、核酸を用いた創薬はアウトプットのみをモニターした試行錯誤による開発にとどまっていた。外来物質である外来遺伝子、遺伝子ベクター複合体と細胞のかかわりの本質は、「細胞による非自己の排除」であると考えられるものの、実際にその作用を引き起こす主体は不明であり、細胞内における外来遺伝子の排除に関与する酵素や分解の場を明らかにするための研究開発が必要であった。

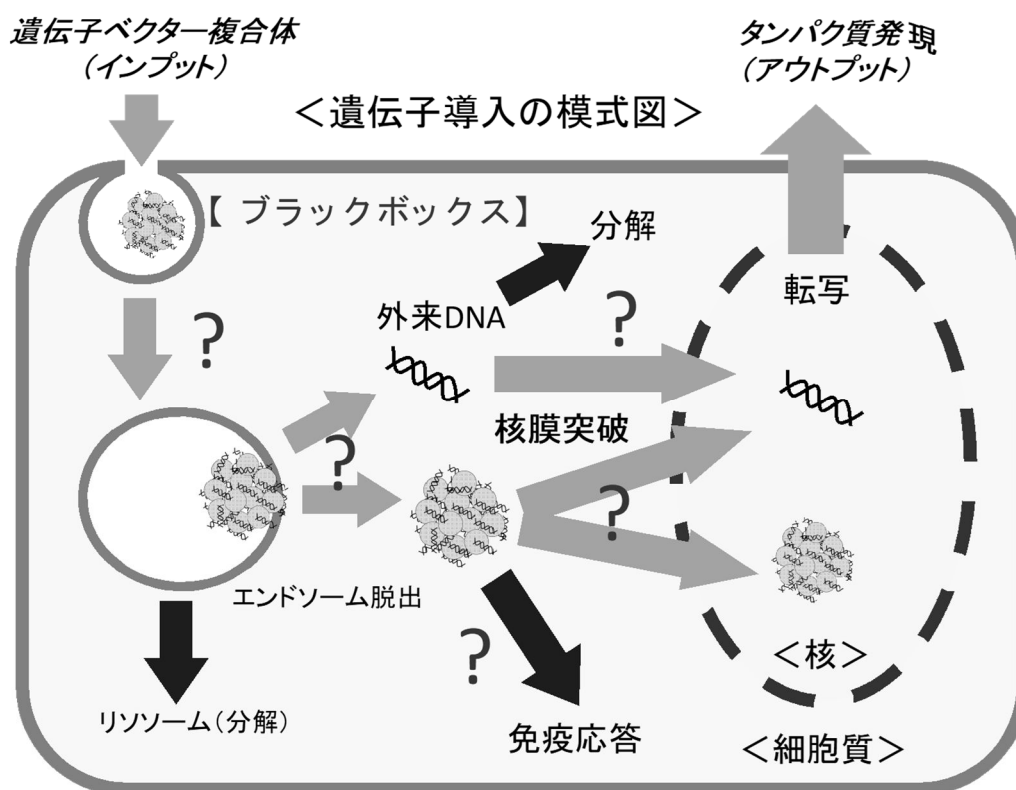


図1 外来遺伝子の細胞内デリバリー経路の模式図

2. 研究の目的

遺伝子治療に代表される細胞内への外来遺伝子導入は大きく異なる時間スケール(マイクロ秒～分まで)を持つため、解析には時空間的かつさまざまなタイムスケールに対応した技術が必要となる。本研究の目的は、生きた細胞の中で局在・イメージング情報に加えて分子動態情報を同時に取得し、それらを統合することで細胞内の分子反応状態を直接かつ時空間的に「見る」ための技術開発を行うことである。さらに、解析対象となる細胞でどのような遺伝子が発現しており、外来遺伝子導入に関与しているかどうかを明らかにすることを目的とした。また、DNAやRNAのような核酸分子を蛍光標識して動態をトレースする技術開発と開発した解析で取得された数値の妥当性を検証するストラテジーも併せて構築することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 核酸を細胞内で観察するための標識技術開発と画像に含まれる相関情報を解析する方法の開発

DNA は両 5' 末端を 2 色の蛍光標識した 2 本鎖 DNA を合成し、相互相関解析に供した。画像相関においては、DNA オリガミ分子である GATTA ビーズやナノルーラー (GATTAQuant 社) を利用し、2 色の蛍光シグナルの画像を取得した。それらの画像を新規に開発した (Image cross-correlation spectroscopy) (ICCS) アルゴリズム RNA を細胞内で蛍光により可視化可能な RNA アプタマーを利用した相互相関解析を実施した。

(2) RNAseq によるターゲット細胞の遺伝子発現の解析

過去に細胞内における DNA の分解活性が異なる細胞株を見出している。本研究では分解活性が異なることが想定される 3 種類のヒト細胞株 (HeLa, MEF, HEK293) を用意し、RNAseq を用いてそれらの細胞の遺伝子発現プロファイルと比較した。

4. 研究成果

画像相互相関法の原理により、画像の共局在性を定量的に解析する方法を開発した。任意の距離を隔てて 2 色で蛍光標識された DNA オリガミ分子の測定から、標識間の相関を定量化して 2 色間の共局在性を判別する技術を構築した (図 2)。本研究で開発した画像相互相関アルゴリズムで相関解析を実施した結果、異なるチャンネルからの情報同士で相互相関 (この場合は共局在性) を定量的に評価することに成功した。また、開発技術が顕微鏡のハードウェア性能などを定量評価することに適していることを見出し、顕微鏡を用いた測定値の妥当性を検証するストラテジーや顕微鏡の正しい調整やキャリブレーションに使用する標準試料に関する情報をまとめた招待講演並びに総説論文を発表した。また、本技術を DNA のみならず細胞内の RNA に展開していくための技術として、蛍光アプタマーを活用した蛍光相関解析の検討を行った。蛍光 RNA アプタマーである Broccoli と蛍光基質 (DFHBI-1T) の結合解離やそれによる蛍光強度の増大、蛍光相関測定への適用における基本的性質の検証を実施した。その結果、RNA アプタマー (Broccoli) と蛍光基質 (DFHBI-1T) の結合定数、またフォールディングの状況など、分子論的なメカニズムを明らかにした。RNAseq によるターゲット細胞の遺伝子発現の解析に関し、過去に実施してきた相関測定から、HeLa 細胞や MEF 細胞においては外来 DNA の細胞内分解が速く、一方で HEK293 細胞は細胞内に入った DNA が分解されにくいことを示してきた。それらの細胞株の RNAseq の結果、発現量に差が見られたタンパク質の中に核酸分解酵素も数種類含まれていることが明らかになり、細胞内の DNA 分解に関与する分子の一定の絞り込みは成功していることが示唆された。本研究成果は、蛍光顕微鏡による分子動態の定量分析技術としての有用性もさることながら、遺伝子デリバリーの基盤となる知見を与えるものであり、近年新たなモダリティとして注目を集めている核酸医薬への貢献も期待される。

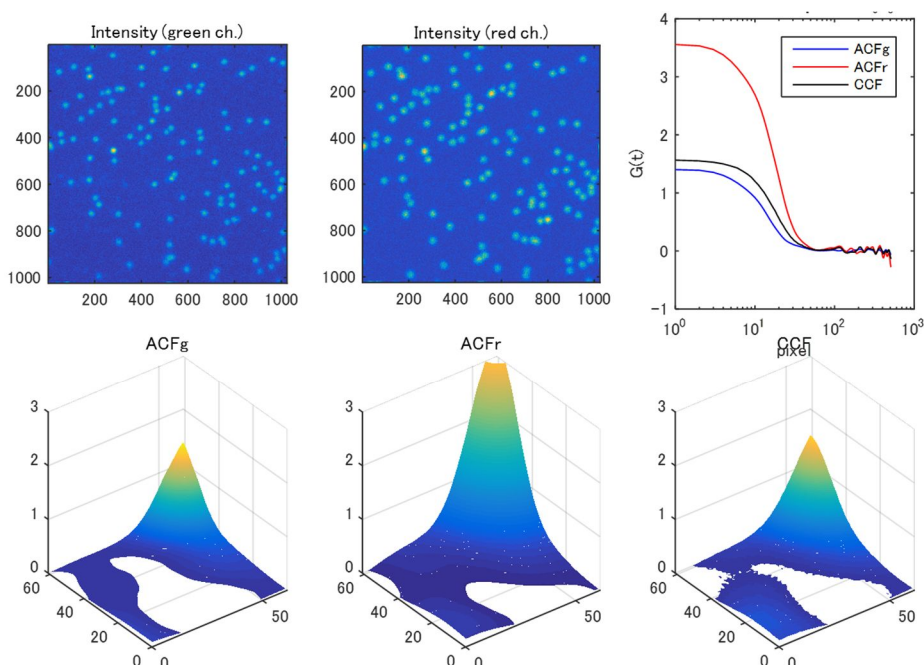


図 2 画像相関解析による 2 色蛍光の共局在性の定量化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sasaki Akira, Ohmiya Yoshihiro	4. 巻 19
2. 論文標題 Standardization of luminescence, fluorescence measurements, and light microscopy: Current situation and perspectives	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 n/a ~ n/a
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.bppb-v19.0037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Furuhata Yuichi, Sasaki Akira	4. 巻 12
2. 論文標題 Monitoring Molecular Properties of a Fluorescence Light-Up Aptamer Using Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 2002 ~ 2002
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/app12042002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sasaki Akira	4. 巻 14
2. 論文標題 Recent advances in the standardization of fluorescence microscopy for quantitative image analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biophysical Reviews	6. 最初と最後の頁 33 ~ 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12551-021-00871-0	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sasaki Akira
2. 発表標題 Toward traceable quantitative fluorescence microscopy - Benchmarking microscope using FCS technique -
3. 学会等名 第 60 回日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木章、古旗祐一
2. 発表標題 蛍光相互相関分光法による蛍光アプタマーの分子特性計測
3. 学会等名 第31回日本バイオイメーキング学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sasaki Akira
2. 発表標題 Fluorescence correlation methods for standardization of confocal fluorescence microscopy images
3. 学会等名 2022 AIST-KU Joint Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022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