

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2011

課題番号：22686077

研究課題名（和文） 遺伝子型に基づく細胞分離法

研究課題名（英文） Cell selection based on genetic signal

研究代表者

阿部 洋 (ABE HIROSHI)

独立行政法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・専任研究員

研究者番号：80415067

研究成果の概要（和文）：

本研究では、「生細胞内の遺伝子シグナルを釣り針として望みの細胞を単離する」前例のない新しい技術を開発することを目指した。長波長領域にシグナルを発生する赤色プローブを作成した。つづいて、未分化細胞で高発現している miRNA を標的に RETF プローブを作成し、フローサイトメーターで検出実験をおこなったところ、優位なシグナルを観測できた。そこで、現在、標的シグナルを指標にした細胞分離を検討している。

研究成果の概要（英文）：

Our aim is to develop new RNA detection probe which is capable of cell selection based on genetic signal. First, we synthesized red fluorescent probe to offer very high signal and background ratio. Next, the probe was designed to target miRNA which is expressed in stem cells. As a result, we confirmed specific miRNA signal in model cells. Now, we are trying to isolate cells with specific miRNA signal.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
2011年度	9,500,000	2,850,000	12,350,000
年度			
年度			
年度			
総計	20,000,000	6,000,000	26,000,000

研究分野：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：RNA、細胞、分離、イメージング、蛍光、化学反応、フローサイトメーター、DNA

1. 研究開始当初の背景

複数種の細胞群の中から望みの細胞種のみを単離する技術は、生命科学研究から医療・産業応用に至るまで大変重要な技術となり得る。これまでも様々な方法論により細胞の単離・精製が行われている。その中でも細胞種特異的な表面抗原を認識する抗体を用いて、セルソーターにより望みの細胞を分離する技術は成功を収めている。しかしながら、特徴的な表面抗原に乏しい細胞においてはこの方法を適用するのが難しい。例えば、近年、再生医療分野においてその利用が期待されているヒト iPS 細胞 (induced Pluripotent Stem Cells) が挙げられる。iPS 細胞は、体細胞に数種類の遺伝子を導入することにより初期化された細胞であり、ES 細胞に似た分化万能性をもつ。ところが、一般にその樹立法が確立されたと考えられている iPS 細胞においても、その初期化効率の悪さが問題となっている。真に初期化された細胞は全体の数百分の 1 であると報告されている (*Cell*, 2007, 131, 861)。そこで、真に初期化された細胞 (真の iPS 細胞) の単離・精製法が必要になる。現在までのところ、未分化の iPS 細胞は特徴的な抗原に乏しい為抗体を用いた細胞単離も困難であり、熟練した研究者がコロニーの形態を基に、経験的な判断により単離しているのが現状である。この真の iPS 細胞の獲得の難しさは、Nature 誌のトピックとして取り上げられている (*Nature* | doi:10.1038/news.2009.989)。このように細胞単離における新しい手法の開発が期待されている。また、代表者が所属する理化学研究所では、iPS 細胞配布の任を負っており、本技術の開発は、緊急の課題となっている。一方、生細胞内で発現する iPS 細胞の

2. 研究の目的

これまで、我々は生細胞内 RNA を検出できる方法論を開発してきた (*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2006, 263; *Bioconjugate Chem.* 2009, 1026)。この方法を用いれば、生細胞内の遺伝子シグナルを観測し、望みの細胞を見つけて単離する戦略が可能となる。例えば、iPS 細胞においては、Oct3/4 メッセージャー RNA (mRNA) が高発現していることが明らかになっている。そこで、Oct3/4 mRNA を遺伝子マーカーとすれば、我々の方法により目的の iPS 細胞を単離できる可能性がある。iPS 細胞に限らず、遺伝子シグナルに基づいた細胞単離法は、様々な動物細胞、あるいは原理的には微生物細胞への適用も可能になる、画期的な技術となり得る。そこで、我々は「生細胞内の遺伝子シグナル

を釣り針として望みの細胞を単離する」前例のない新しい技術の開発を計画した。

3. 研究の方法

本研究では、化学反応 (RETF) プローブを用いて「遺伝子型に基づいた新規細胞単離法」を確立する。最初に、細胞内の微量 RNA 種 (特に重要な mRNA) を検出するために、細胞の自家蛍光を回避できる赤色蛍光発生化合物を合成し、それを導入した高感度な RETF プローブを合成する。次に、プローブの細胞内導入法を検討し、その導入率と細胞分取後における細胞生存率の観点から最適な導入法を確立する。続いて遺伝子型の異なる細胞 2 種を混合した細胞群から片方の細胞のみを、発現 RNA シグナルを指標に単離するモデル実験を行う。本実験で、遺伝子型に基づいた高精度な細胞単離を実現する。最後に、幹細胞に発現している RNA マーカーを標的とした RETF プローブを作成し、その単離を試みる。

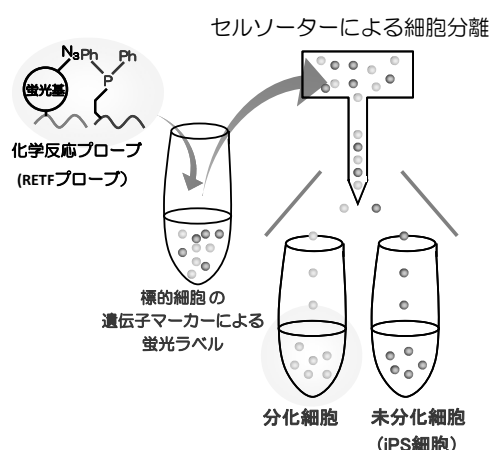


図 1 遺伝子シグナルを指標とする生細胞単離法

4. 研究成果

(1) 微量 mRNA の検出を可能にする RETF プローブの確立

これまでに合成した蛍光発生化合物 (フルオレセインのアジドメチル誘導体) は緑色蛍光 (Em=520nm) を有するため、微量 RNA シグナルを観測する場合、細胞の自家蛍光が問題となる。その低減のために、長波長領域にシグナルを発生する赤色蛍光化合物 (660nm) を合成する。赤色蛍光化合物であるナフソフルオレセインをアジドメチル化することで、蛍光発生型化合物を合成し、それを RETF プローブに導入した。しかしながら、ナフソフルオレセインは導入した形では、中性付近ではあまり発光しなかった。そこで、新たに、ナフソローダミンを基本骨格として、その両ア

ミノ基をアジド基に変換することで赤色領域(660nm)に蛍光を発生する新規化合物を合成した(図1、図2、図3)。この化合物をDNA鎖に導入することでRETf (Reduction Triggered Fluorescence)プローブを作成できた。続いて、RETf プローブの特徴である化学反応によるシグナル増幅について最適化を行った。DNA プローブの長さを種々検討したところ、DNA の融解温度に近い反応温度で検出反応を行うと効率のよいシグナル増幅効果を観察できた。例えば、10塩基のプローブを用いた場合は25℃でもっともよいシグナル増幅が可能となった。

(2) RETf プローブの導入法の確立

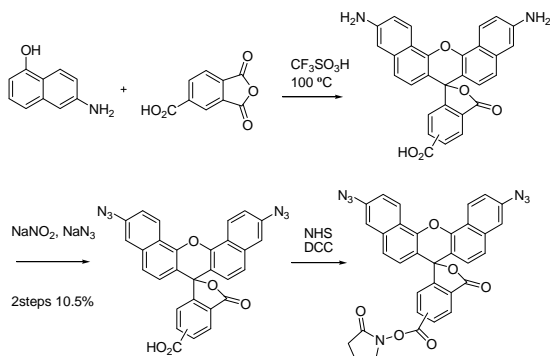


図1 ナフソローダミンを基本骨格とした蛍光発生化合物の合成

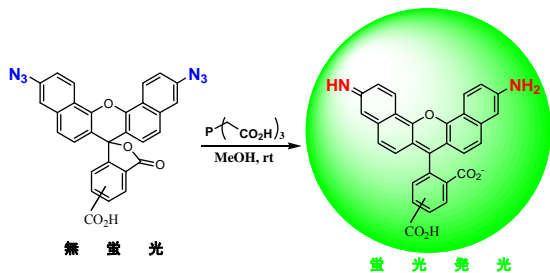


図2 蛍光発生化合物の蛍光発光メカニズム

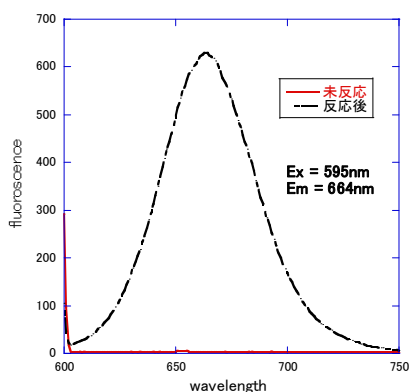


図3 蛍光発生化合物の蛍光スペクトル
細胞内 RNA 検出を検討した。細胞分離を可能にするためには、ほとんどすべての細胞にダメージ少なく RETf プローブを導入する必要

がある。そこで、まず、最適な細胞内プローブ導入法を検討した。市販のリボソームを用いた導入をおこなったが、バックグラウンド蛍光が高くなるため、不向きであった。ついで、エレクトロポレーションを用いたが、プローブがその条件で分解することがわかった。そこで、ストレプトライシン 0 (SLO) を用いて細胞膜に穴を開けてプローブを導入したところ、ほとんどの細胞にプローブを導入できることがわかった。また、細胞の生存率は 10%程度と完全ではないが、細胞分離の実験に用いることができるレベルであった。

(3) 細胞内 RNA 検出の検討

未分化細胞で高発現している miRNA を標的に RETf プローブを作成し、フローサイトメーターで検出実験をおこなったところ、優位なシグナルを観測できた(図4)。そこで、現在、標的シグナルを指標にした細胞分離を検討している。

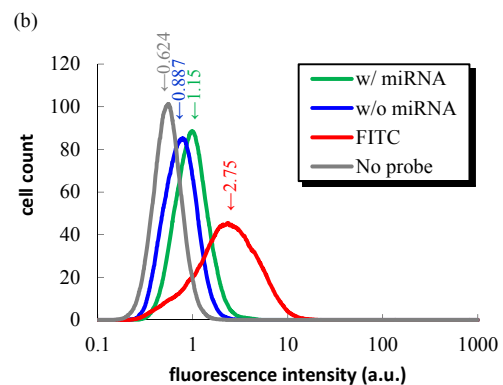


図4 フロサイトメーターを用いた miRNA の検出

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 5 件)

1. Mika Ito, Aya Shibata, Jie Zhang, Michio Hiroshima, Yasushi Sako, Yukiko Nakano, Kyoko Kojima-Aikawa, Bengt Mannervik, Satoshi Shuto, Yoshihiro Ito, Ralf Morgenstern, Hiroshi Abe, Universal Caging Group for In Cell Detection of Glutathione Transferase Applied to 19F NMR and Bioluminescent Probes, *ChemBioChem* in press, (2012).
2. Aya Shibata, Hiroshi Abe, Yoshihiro Ito, Oligonucleotide-Templated, Reactions for Sensing Nucleic Acids, *Molecules*, 17(3), 2446-2463 (2012).
3. Kazuhiro Furukawa, Hiroshi Abe,

Yasutsugu Tamura, Rei Yoshimoto, Minoru Yoshida, Satoshi Tsuneda, Yoshihiro Ito, Fluorescent Detection of Intron Lariat RNAs with Reduction-Triggered Fluorescence Probes, *Angewandte Chemie International Edition*, 50(50) 12020-12023, (2011).

4. Jie Zhang, Aya Shibata, Mika Ito, Satoshi Shuto, Yoshihiro Ito, Bengt Mannervik, Hiroshi Abe, and Ralf Morgenstern, Synthesis and characterization of a series of highly fluorogenic substrates for glutathione transferases, a general strategy, *Journal of the American Chemical Society*, 133(35), 14109-14119, (2011).
5. Katarina Johansson, Mika Ito, Carolien M. S. Schopuizen, Sherin Mathew T, Vanina D. Heuser, Jie Zhang, Miyuki Shimoji, Marie Vahter, Wee Han Ang, Paul J. Dyson, Aya Shibata, Satoshi Shuto, Yoshihiro Ito, Hiroshi Abe, Ralf Morgenstern, Characterization of New Potential Anticancer Drugs Designed To Overcome Glutathione Transferase Mediated Resistance, *Molecular Pharmaceutics*, 8(5), 1698-1708, (2011).

[学会発表] (計 4 件)

1. 阿部洋、次代を担う若手大学人育成イニシアティブセミナー、「生細胞内遺伝子の解析と制御を目的とした機能正核酸分子の創製」2012年1月13日、筑波大学 下田臨界実験センター、下田市、口頭
2. 阿部洋、トクシマ・ファルマ・トライアングル (TPT) 構築事業 特別講演会 「遺伝子シグナルの化学的増幅」2011年12月7日、徳島大学薬学部、徳島市、口頭
3. 阿部洋 高分子学会関東支部 第22回埼玉地区談話会 「医療応用を目指した人工核酸分子の創製」、2011年2月17日、東洋大学川越キャンパス、川越市、口頭
4. 阿部洋 大阪大学 免疫学フロンティア研究センター セミナー「人工核酸分子を用いた遺伝子発現の解析と制御」、2010年7月15日、大阪大学、口頭

[図書] (計 1 件)

1. 古川和寛、阿部洋、伊藤嘉浩、常田聡、「生細胞内 RNA 検出のための化学反応プローブ」「難培養微生物研究の最新技術 II～ゲノム解析を中心とした最前線と将来展望～」大熊盛也、工藤俊章監修、シーエムシー出版、

p.19-27 (2010)

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称: 蛍光発生分子

発明者: 阿部洋、伊藤嘉浩、古川和寛

権利者: 理化学研究所

番号: US 8084201

取得年月日: 2011年3月31日

国内外の別: 日本、米国、EU

[その他]

<http://www.riken.jp/nano-med.eng.lab/abe.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 洋 (ABE HIROSHI)

独立行政法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・専任研究員

研究者番号: 80415067