

「先端光源を駆使した光科学・光技術の融合展開」
平成 20 年度採択研究代表者

本田 文江

所属・役職 法政大学・生命科学部・教授

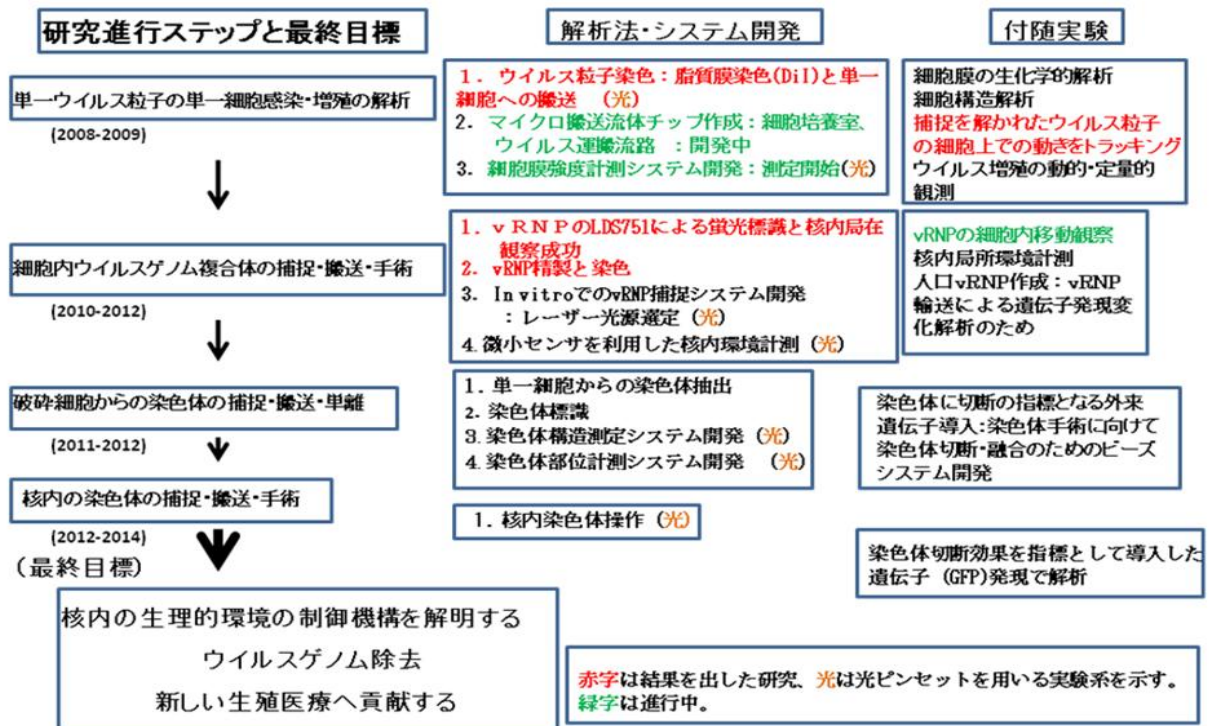
光ピンセットによる核内ウイルス RNP 輸送と染色体操作
～ウイルスゲノム除去への挑戦～

1. 研究実施の概要

今日までインフルエンザウイルス感染は、約 100 万個の培養細胞への感染実験から得られた結果を基に解析されてきた。しかし細胞集団は細胞周期という側面から捉えても均一ではない。これまでのウイルス感染の解析は多数の細胞の平均化した情報として捉えられてきた。ウイルスの細胞への付着や細胞内での増殖は個々の細胞により異なることが予想される。個々の細胞核内でのウイルス RNP 輸送と染色体操作を行う目的で 2008 年度後半から研究を開始した。その中の一つとして私たちは個々の細胞でのウイルス感染を解析する目的で光ピンセットによる単一ウイルスの単一細胞への輸送及び核内ウイルス RNP の輸送のためのシステム開発を行っている。半年間で実施した研究にて、ウイルス粒子及びウイルス RNP の蛍光染色による光学顕微鏡での可視化を実現し、蛍光染色したウイルスの単一細胞への搬送に成功した。この結果、インフルエンザウイルスは感染のために静止期の細胞に付着することを明らかにした。またウイルス RNP の染色を試み、ウイルス粒子から遊離し核への移行を明らかにした。またウイルス搬送の目的でウイルス粒子流路と細胞培養チャンバーを備えたマイクロチップの開発及びウイルス感染細胞の総合的変化計測の一環として光ピンセットによる細胞膜強度変化測定システムの開発を行った。細胞膜強度測定システムを用い静止期細胞での測定を開始した。2008 年度の目標に掲げたシステム開発・研究の結果は得られたが完全な解釈をするために生化学的解析を行っている。今後開発したシステムを用いウイルス感染細胞の総合的計測(非感染細胞との区別化)、核内でのウイルス RNP の移動によるウイルスゲノムの転写・複製への影響の解析、ウイルス RNP 局在領域の核内環境の計測を行い染色体操作へと研究を推進していく予定である。

2. 研究実施内容

次に示すフローチャートで示した研究実施計画を基に 2008 年度の計画を実施した。



単一ウイルスの単一細胞への搬送と感染

インフルエンザウイルス感染・増殖は細胞により異なるが、今日までウイルスを感染させた約100万個の細胞集団により解析されている。しかし、この方法では細胞集団の平均値を覗いていることになりウイルス感染による真の細胞変化を捉えるには不十分であった。この問題を解決するため私たちは光ピンセットを利用し単一ウイルスを単一細胞に感染させることを考えた。単一ウイルスの単一細胞への感染をより確実に行うためにマイクロ流体チップを作製した。マイクロ流体チップは細胞培養チャンバー、ウイルス導入用流路、ウイルス輸送用流路、光硬化性樹脂導入用流路から構成される(図1(a))。チップはSU-8のフォトリソグラフィによるモールド作製とシリコン樹脂のポリジメチルシロキサン(PDMS)への転写により作製した。各流路の厚さは50 μmとした。細胞培養チャンバーは長径3.5 mm、短径875 μm、厚さ約1mmの楕円筒形で、CO₂の濃度変化の抑制及び細胞の播種・採取のため上部は開放可能でPDMSのシートにより閉じることができる。ウイルス輸送用流路は光硬化性樹脂により閉じることができ、余分なウイルスの混入防止及びチャンバー内の環境の安定化が可能である。ウイルスの感染は図1(b)に示すプロセスにしたがって行う。まずチップ外部からポンプによりウイルス導入用流路にウイルスを導入する。導入されたウイルスを光ピンセットで操作しウイルス輸送用流路を通して細胞培養チャンバーに搬送する。搬送したウイルスを細胞に接触させ感染させる。ウイルスの感染後、光硬化性樹脂のポリエチレングリコールジアクリレート(PEG-DA)を光硬化性樹脂導入用流路から導入しウイルス輸送用流路の入口部を紫外光照射により重合した樹脂により閉じて余分なウイルスの混入を防ぐ。

ウイルスの模擬粒子として直径200 nmのポリスチレンビーズを用い、光ピンセットによるウイルス導入用流路から細胞培養チャンバーへの単一粒子の搬送(3 μm/s)及び光硬化性樹脂による

チャンバーの閉鎖に成功し、本マイクロ流体チップの有効性を確認した。図 2(a)に示すようにウイルス感染用細胞 H292 を細胞培養チャンバーに播種して培養を実施し、図 2(b)に示すように 1 日後にチャンバー内で H292 細胞の培養に成功したことを確認した。以上の結果よりマイクロ流体チップ内での単一ウイルスの単一細胞感染に必要な要素技術を実現した。しかし現状ではウイルス搬送流路の流速が速くウイルスの搬送に影響を与えているため、流速を精密に制御する流体制御システムの工夫を行っている。

インフルエンザウイルスのサイズは約 100 nm ほどであるため光学顕微鏡下での観察は困難である。そこでウイルス粒子の蛍光標識を試みた。蛍光色素のカルボシアニン (DiI) を用い標識したウイルス粒子は蛍光顕微鏡下で観察できた。ウイルス貯留チャンバーから細胞培養チャンバーへの輸送は成功していないが細胞培養ディッシュ内で蛍光標識したウイルス粒子を波長 1064nm の YAG レーザーで捕捉し単一細胞への搬送に成功した。この結果ウイルスは静止期の細胞に付着したが分裂期の細胞には付着できなかった。静止期の細胞に付着する理由を明らかにするためにいくつかの実験と解析を試みた。ウイルスの光ピンセット捕捉を細胞の上で解放したときのウイルスの動きをトラッキングした。その結果、静止期の細胞上にウイルスを落とすとブラウン運動を行うが、その動きは分裂期の細胞上に落としたものより小さかった (図 3)。インフルエンザウイルスは細胞膜上のシアル酸に結合することは実証されているためシアル酸の量の比較を試みた。静止期、分裂期細胞上のシアル酸の量の同定を試みた。蛍光標識レクチンの結合を蛍光強度で計測した。しかし異なる周期でのシアル酸量の比較実験では明確な差が出ていないが実験条件を詳細に検討することにしている。

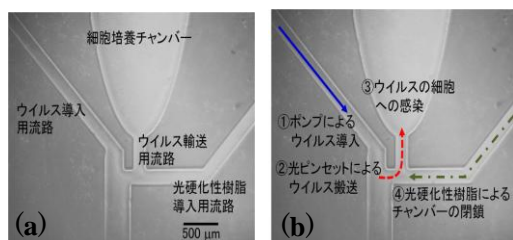


図 1. 単一ウイルス感染用マイクロ流体チップ。

(a)マイクロ流路概要, (b) ウイルス感染プロセス

(実線:ポンプによるウイルス導入経路, 点線:ウイルスの光ピンセットによる搬送経路, 一点破線:光硬化性樹脂の導入経路)

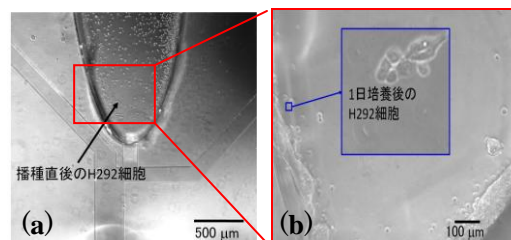


図 2. チャンバー内での H292 細胞の培養実験結果。

(a) 細胞播種直後の様子, (b) 1日培養後のチャンバー内の H292 細胞の様子 (チャンバー部 (図 2(a)の四角枠) を拡大して撮影)

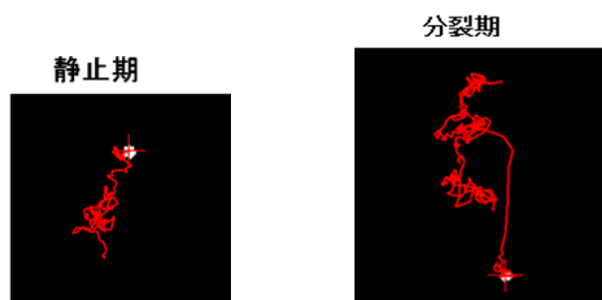


図 3. 蛍光標識ウイルスを光ピンセットで搬送後のウイルスの軌跡

ウイルス感染・非感染細胞における細胞膜強度の比較

細胞膜強度測定システムは、光ピンセットを利用して保持した粒子を細胞表面の狙った場所に固着させ、左右に往復運動をさせて振幅の減衰を計測することで細胞膜の固さを評価するシステムである。本システムは、ウイルス感染時の細胞膜の力学的な特性変化の計測を目的に開発を進めている。細胞膜の計測では、コラーゲンコートした粒子を細胞膜へ押し当てた状態で一定時間保持して固着させ、往復運動を開始する。すると、まず初期の細胞膜強度が計測でき、その後も往復運動を繰り返すことで、力学的刺激により細胞の接着斑が成熟してくる様子を観察できる。現在 pN オーダーの力が計測できることを確認している。今後は、接着斑下部で細胞骨格が一分子ずつ形成されて行く様子を計測可能にすることで、接着斑形成のメカニズムの解明に使用できることを示す。現在このシステムを利用し感染細胞と非感染細胞での膜強度の違いを実測し測定システムが機能していることを確かめている。

今後の展開

今後は、マイクロ流体チップを用いたインフルエンザウイルスの細胞感染実験結果に基づき、FEM による流体解析等を行い、ウイルスを効率よく感染できるよう流路設計の改良を行う。

細胞、ウイルス、計測用プローブ等の操作のための光ピンセットシステムの光学設計は完了し、光学系及び制御システムの構築を行っている。従来のマルチビーム統合型光ピンセットの光学系に加えフェムト秒レーザーを導入が可能な設計とし、操作者への力覚提示が可能なオムニデバイスを導入することで、細胞内及び核内での精密な操作・計測・加工が可能なシステムの構築を行う。ウイルス粒子が付着する細胞、付着しない細胞の生化学的、形態学的、生物物理学的解析を行い、付着しない理由を明らかにする。ウイルス RNP の蛍光標識に成功したため試験管内及び核内での捕捉を試みる。またウイルス RNP がウイルス粒子から放出された後の、核内への移行を観察する。

3. 研究実施体制

(1)「本田」グループ

- ①研究分担グループ長: 本田 文江 (法政大学、教授)
- ②研究項目 光ピンセットによるインフルエンザウイルス粒子・ウイルス RNP の捕捉搬送

(2)「新井」グループ

- ①研究分担グループ長: 新井 史人 (東北大学大学院、教授)
- ②研究項目 マルチビームによるマイクロツールの高速操作を用いた染色体操作

(3)「杉浦」グループ

- ①研究分担グループ長: 杉浦 忠男 (奈良先端科学技術大学院大学、准教授)
- ②研究項目 光ピンセットによる細胞内外の物理的環境測定

4. 研究成果の発表等

特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数：0 件（CREST 研究期間累積件数：0 件）