平成21年度
実績報告

「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

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

インフルエンザウイルス感染は細胞の膜に存在するシアル酸へウイルス膜に存在するウイルス特異的タンパク質HAが結合することにより起こる。ところで、細胞は分裂することにより増殖するが分裂している細胞と静止期の細胞にはいくつか大きな違いがあることが明らかにされてきている。インフルエンザウイルスRNAポリメラーゼと相互作用する宿主タンパク質の検索からインフルエンザウイルス感染は細胞周期依存的ではないかという予測を立て、インフルエンザウイルス粒子の蛍光標識と光ピンセットにより捕捉・搬送する技術を開発し、蛍光標識したインフルエンザウイルスを周期の異なる細胞に搬送する実験を行った。その結果インフルエンザウイルスは分裂期の細胞ではなく静止期の細胞に付着することを明らかにした（世界初）。そこでインフルエンザウイルスが付着する静止期の細胞と付着しない分裂期の細胞で何が違うかを明らかにする実験を行った。インフルエンザウイルスリセプターであるシアル酸の量に着目し解析した。その結果静止期と分裂期の細胞でシアル酸量が大きく異なっていた。静止期の細胞には分裂期の細胞に比べ約10倍シアル酸が多く存在していることを明らかにした（図4）。これは世界で初めての発見である。

インフルエンザウイルスのゲノムはマイナス鎖RNAが８本に分節し、その転写・複製は核内で起こることはすでに証明されている。ウイルスゲノムRNAにはウイルス特異的RNA依存RNAポリメラーゼ、RNA結合タンパク質(NP)が結合しウイルスRNP（vRNP）複合体としてウイルス粒子中に存在する（図1A）。そこで私たちはvRNPの核内での局在領域を明らかにすると同時に、vRNPを局在領域から移動させることによりその転写・複製に影響があるかどうかを明らかにする目的で光ピンセットによるvRNPの核内で搬送を計画している。 そこでまずvRNPのin vitroでの補足・搬送を試みた。vRNPの一分子の大きさは電子顕微鏡写真から20~30nm x 50~100nm（図1B）と考えられている。ウイルス粒子内で８本のvRNPが集合体として存在するかどうか明らかではない。そこでウイルス粒子から取り出したvRNPを光ピンセットで捕捉できるかどうかを検討した。 この目的のためvRNPとウイルス粒子膜を蛍光試薬で二重標識し、界面活性剤でウイルス粒子膜を除去

し vRNP をウイルス粒子から取り出し光ピンセットで捕捉・搬送を試み、成功した。この結果から vRNP はウイルス粒子内で8分節の集合体(サイズが直径　約 50　nm 以上)として存在している可能性が高い(杉浦らの光ピンセットによる捕捉実験では直径 50nm の粒子まで捕捉可能であった)。この結果を基に今後生化学的解析を行い vRNP が集合体として存在すること、またどのような結合様式かを明らかにしていく。

　インフルエンザウイルス感染細胞の変化を計測する目的で光ピンセットを利用した細胞膜強度計測を開始しウイルス感染後 4 時間で細胞膜強度に変化が現れることを明らかにした。この結果はウイルス感染により発現誘導されてくる宿主蛋白質の変化と相関していた。またウイルス感染による細胞内環境変化計測の目的で温度変化、pH 変化を計測できるツールの開発に成功している。

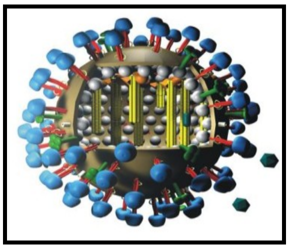


図1A

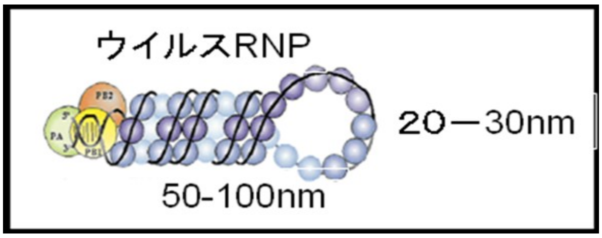


図 1B

§2. 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　細胞分裂期の染色体局在の物理的環境測定技術の開発

§3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4−1)に対応する。)

単一ウイルスの単一細胞への搬送と感染

単一ウイルスの単一細胞への感染を行うためのチャンバーの改良を行った。有限要素法を用いた流体解析に基づき、ウイルス搬送経路の流体の安定性が向上するよう流路形状を再設計した(マイルストーン)。またウイルス捕捉作業の効率化のため、ウイルス導入流路底面に電極を加工し負の誘電泳動力(Dielectrophoresis: DEP)によりウイルス濃度を上昇する機構を追加した。チップはネガレジストの SU-8 をフォトリソグラフィーにより加工して作製したモールドに、シリコーンゴムのポリジメチルシロキサン(PDMS)を転写して作製した。電極はガラス基板上にコートされた透明電極の酸化インジウムスズ(ITO)を、フォトリソグラフィーで櫛刃上にパターニングすることで作製した。チップは細胞チャンバーとウイルス導入流路から構成される(図 1)。またチップ中央の流路は細胞チャンバーとウイルス導入流路を物理的に分離するための光硬化性樹脂の導入流路であり、局所硬化により不要なウイルスが細胞チャンバーに混入しないよう分離可能であることを確認済である。細胞チャンバーは細胞播種及び回収のため上部を開閉可能とした。流路のサイズはウイルス導入流路以外を幅は 100 μm、深さは 115 μm に統一しチップ内の流体の変動を抑制した。ウイルス導入流路の深さを 15 μm と低くすることで流路内でのウイルスの発見を容易とした。図 2 に示すように、ウイルス溶液の導電率を 10 mS/m に調整し 20 $V_{p\text{-}p}$、3 MHz の方形波の電圧を印加することで、負の誘電泳動力によりウイルスを電極間に捕集することに成功した。また負の誘電泳動力による捕集がウイルスのガラス基板への付着を抑制する効果があることを確認した。図 3 に示すようにウイルス導入流路内の蛍光試薬 DiI で染色したウイルスを光ピンセットにより搬送し、細胞培養チャンバー内に播種した H292 細胞へ接触・固定することに成功した。 以上の結果より、本チップを用いた単一ウイルスの単一細胞への搬送と感染の有効性を確認した。

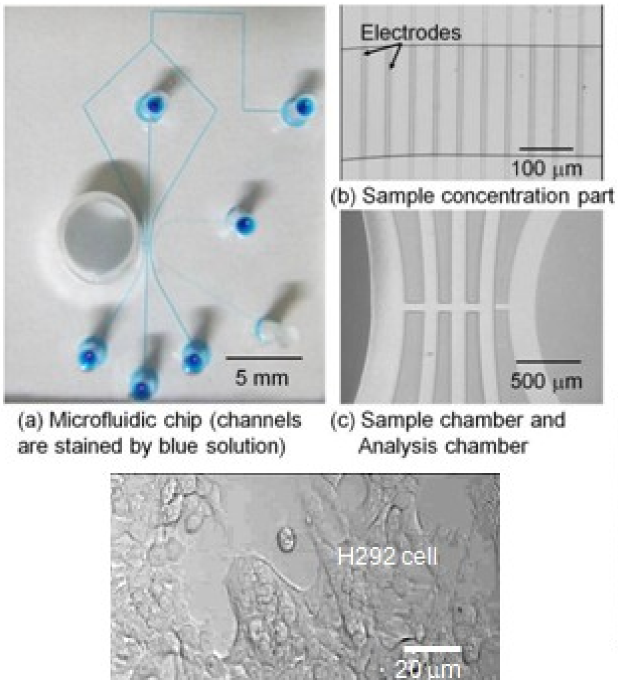


図 1 単一ウイルス感染用マイクロ流体チップ

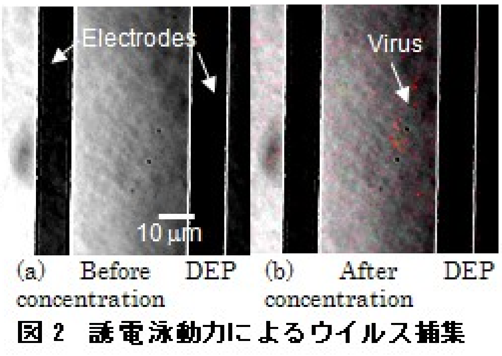


図 2 誘電泳動力によるウイルス捕集

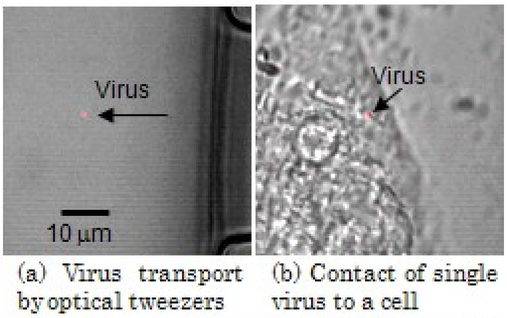


図 3 単一ウイルスの特定細胞への搬送

インフルエンザウイルス粒子結合細胞の解析：

インフルエンザウイルス粒子を蛍光標識し光ピンセットで異なる細胞周期の細胞へ搬送し解放後細胞への結合を観察した結果ウイルスは静止期の細胞にのみ結合することを明らかにした。そこで本年度ウイルスと結合する細胞としない細胞の違いを生化学的に解析した。インフルエンザウイルスのリセプターはシアル酸であることが既に明らかであったのでシアル酸に焦点を絞り各細胞周期での存在量を測定した。まず細胞膜抽出物を SDS-ポリアクリルアミドゲルで分離し PVDF に転写しシアル酸に結合するレクチンで検出した（図 4）その結果静止期（R）でのシアル酸量は分裂期(D)に比べ高いことがわかった。これは世界で初めて得られた結果である。

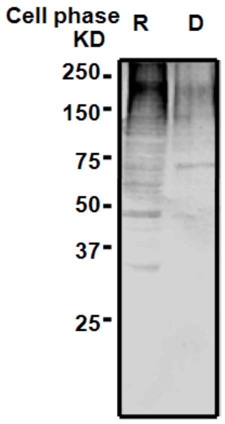


図 4　シアル酸量比較

インフルエンザウイルス感染細胞・非感染細胞の膜強度変化解析：インフルエンザウイルス感染により宿主遺伝子の発現誘導が制御されることから細胞膜にも何らかの変化が現れると考え光ピンセットによる膜強度計測を試みた。強度計測に用いるビーズはコラーゲンコートを行っているためコラーゲン粒子が結合するインテグリンを介した強度測定を行った（図 5）。ウイルス感染による細胞膜の力学的性質の変化の計測に必要な細胞触診システムの改良を行った。細胞膜への結合サイト数に依存せずに弾性を計測できるよう計測プロトコルを確立し、細胞骨格構造との関連について調べ、細胞骨格の形成が阻害されると細胞の弾性が低く計測されること、その後細胞骨格が形成されると弾性が回復することを確認した。さらにインフルエンザウイルスを感染させた際の細胞硬さの変化を、時系列を追って計測し、感染後4時間で細胞弾性が低下し、その後回復する傾向がみられることを確認した。その結果ウイルス感染により膜強度に変化が起こることを明らかにした。この結果はウイルス感染による宿主タンパク質（Ebp1）の遺伝子発現が誘導される時期と相関していた。

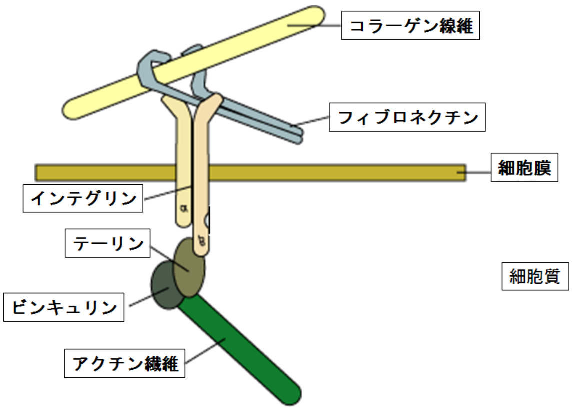


図 5 インテグリンとコラーゲンの相互作用

感染細胞内環境変化計測システム開発： ウイルス感染により細胞内では新たなタンパク質合成あるいは分解など様々な環境変化が起こることが予測される。このような変化は細胞内温度・pH 変化として計測されることが考えられる。そこで細胞内温度・pH 変化計測用ツールの開発を行った。感染細胞内の環境変化を計測するために、細胞融合リポソームに内包したナノ温度計測ビーズを作製し、環境計測ツールの細胞導入を実現した（マイルストーン）。今後はウイルスを用いた細胞感染実験効率化のためのシステム改良及び感染後の細胞採取システムの構築を行う。

インフルエンザウイルス感染細胞膜の組成変化解析： インフルエンザウイルス感染により膜強度変化が観察されたため膜強度に影響を与える可能性のある脂質の変化を TLC(thin layer chromatography)で解析した。

また細胞、ウイルス、計測用プローブなどの微小物体を捕捉搬送するための光ピンセットのシステムの光学設計及び構築を行った。これまでに開発してきた高速操作に適した時分割方式と多点操作に適したレーザの空間分割方式のマルチビーム統合型光ピンセットの光学系に細胞加工が可能なフェムト秒レーザを導入する系を構築した。

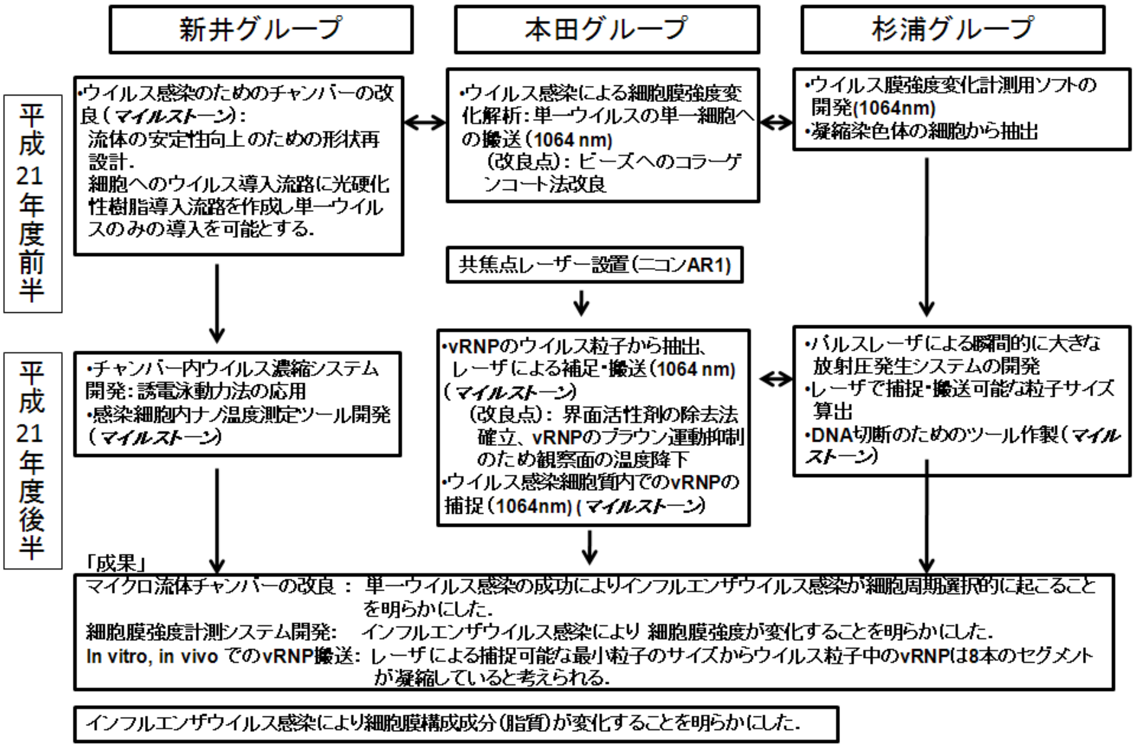
in vitro での凝縮染色体の捕捉・搬送

細胞から部分精製した凝縮染色体の捕捉搬送を行うための実験系として、緩衝液中で染色体を遠心分離することで回収し、実験に用いる系を構築した。

パルスレーザを用いて瞬間的に強力な放射圧を発生させる技術を開発した。パルス幅6ns のレーザ光で瞬間的に大きな放射圧を発生させてガラス基板表面に固着した粒子を取り外す実験に成功したのに引き続き、取り外し操作の確実性を評価する実験を行った。その際、強力なパルス光によってレーザ誘起ブレークダウン（誘電破壊）現象が高確率で発生し、操作対象物が爆発するように破壊されてしまう問題が生じた。そこで、誘電破壊現象の発生確率がパルス光のエネルギーで決まるかパワーの尖頭値で決まるのかについて調べるため、パルス光を遅延させて重ね合わせる光学系を組み込み、パルス幅を伸長させ、誘電破壊現象の発生確率を測定する実験を行った。その結果、誘電破壊現象の発生確率はパルス尖頭値に依存することが明らかになり、誘電破壊現象を避けながら強力な放射圧を発生させて操作を行うには適正なパルス幅のレーザ光源を利用することが不可欠との結論を得た。そこで適正なパルス幅を求める理論解析を行い、光ピンセット中の粒子運動の減衰時定数から水中の直径1μmの粒子の場合では 100～200ns のパルス幅であると効果的であることを導いた。次年度では、パルス幅 100～200ns のパルスレーザ光源を導入して増強放射圧を発生させ、それを利用して粒子の操作実験を行う予定である。

ウイルスゲノム切除のためのツール作製

DNA切断酵素によるウイルスゲノム除去のためのツールとして、DNA切断酵素を表面にコートしたビーズを用いることを検討している。本年度では、カルボキシル基末端の表面を持つ粒子上へリンカー分子を用いてDNA切断酵素を固定し、DNA切断活性が低いながらも保持されていることを確認した。酵素活性の低下を抑制するために、酵素が粒子上に結合する向きを制御するなどの改良を必要としている。



§4. 成果発表等

(4−1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Hideaki Miyoshi, Tadao Sugiura and Kotaro Minato: Cell Palpation System Based on a Force Measurement by Optical Tweezers for Investigation of Local Mechanical Properties of a Cell Membrane. 2009 Japanese Journal of Applied Physics 48 120223-1-3 DOI:10. 1143/JJAP. 48. 120223

2. Gopinath, M., Raju, S., Honda, A. and Shaila, M. S. Host factor Ebp1 inhibits rinderpest virus transcription
in vivo.2010 Arch. Virol. 155 455-462 DOI:10.1007/ s 00705-010-0599-y