

本田文江

法政大学・生命科学部・生命機能学科・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

ウイルス感染についていまだに解明されていない「感染したウイルスが細胞で何倍に増えるか、核内でゲノム複製を行うウイルスは核内のどの領域が必要かを明らかにすること」を目的とし、1. 核内の生理的環境の制御機構を解明する、2. ウイルスゲノムの除去、3. 新しい生殖医療への貢献を目標に研究を行い、以下の結果を得た。

インフルエンザウイルス付着細胞特性を明らかにするため開発を行った“光ピンセットによる単一ウイルス感染システム”により、インフルエンザウイルスが静止期細胞と特異的に結合することを明らかにした。[I] 静止期と分裂期細胞の違いを解析し、以下のことを明らかにした。1. シアル酸は静止期細胞に多く存在する (H21)。2. 光ピンセットを利用した細胞膜強度計測から分裂期の細胞が静止期より硬い (H22)。[II] インフルエンザウイルス感染細胞の変化解析用ツール開発と解析を行い (H22)、以下のことを明らかにした。1. ウイルス感染細胞変化解析: 細胞変化の現象の一つであるタンパク質の修飾解析からインフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼと相互作用し、その機能障害をする宿主タンパク質は感染 2 時間後から修飾されることが明らかになった。2. 細胞変化計測: インフルエンザウイルス感染細胞の温度変化計測法を開発し、解析した結果、インフルエンザウイルス感染細胞では温度変化があった。3. 細胞内環境変化計測: リボソームに封入したツールの細胞質内への挿入に成功し細胞質内ツールの光ピンセットでの捕捉・搬送に成功した。4. 核内環境計測ツールの核内搬入に成功し、光ピンセットで搬送操作はできたが確実性が低いため核内搬入システムの開発が必要である。[III] ウイルス RNP 捕捉・搬送の試み: ガラス板上で光ピンセットによる vRNP の捕捉・搬送の成功 (H21) から vRNP が8分節の集合体である可能性があった。グリセロール密度勾配遠心で解析を行った結果 vRNP は8分節の集合体であった。光ピンセットによる vRNP の細胞質での捕捉・搬送はできたが核内では成功していない。[IV] ウイルスゲノム切除用ツール作製: ビーズに DNA 切断酵素をコートし、プラスミド DNA、静止期細胞由来の染色体の切断に成功した。[V] vRNP 移動後のインフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ活性解析用プローブ開発: 光ピンセットによる vRNP の核内操作のためには

vRNP 標識が必要であると同時に核内での移動による RNA ポリメラーゼ活性の解析は重要である。RNA ポリメラーゼ活性を測定する目的で擬似ウイルス作製を行った。今後、これまでの結果をもとに vRNP の核内での光ピンセットによる異動実験と染色体DNAから一部領域の除去実験を行っていく。

§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(法政大学生命科学部、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(名古屋大学大学院工学研究科、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

(文中の引用番号等は(4-1)に対応する)

単一ウイルス感染システムの改良

新井グループで作製した、特定細胞への単一ウイルス粒子感染のためのマイクロ流体チップを本田グループで実験を行い、システムの改良を行っている(論文3)。誘電泳動力によるウイルス濃縮の効率向上ため、電極間の流路形状を3次元的に設計し、局所的に電界勾配を向上させることでより大きな力を発生させる iDEP (Insulator-based Dielectrophoresis) を用いてインフルエンザウイルスの濃縮性能の向上を図った。

有限要素法を用いた電場解析に基づき、流路形状と電極配置を設計した。3次元的な狭窄部を有する流路をマスクレス露光装置によるグレースケールリソグラフィにより作製した(図1)。細胞チャンバーは従来通り細胞播種及び回収用に上部を開閉可能にした。図2に示すように、ウイル

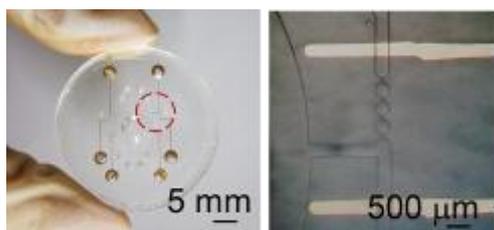


図1 iDEP 機構を組み込んだウイルス感染用マイクロ流体チップ

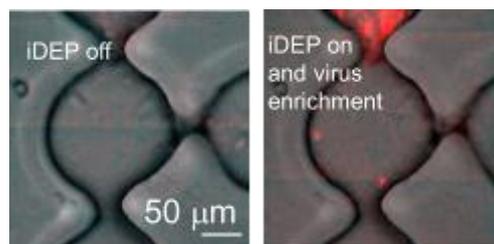


図2 iDEP によるウイルス濃縮

ス溶液の導電率を 20 mS/m に調整し 20 V_{pp} 、 10 MHz の正弦波の電圧の印加により、誘電泳動力でウイルスを流路流で濃縮することに成功した。濃縮した DiI 標識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へ搬送できた。本手法は従来のチップに比べウイルス濃縮部を細胞チャンバー近傍に設置できるため、単一ウイルス搬送・細胞感染の作業性が向上できた。また、ウイルス濃縮部はその3次元に絞った形状から、これまで懸念されてきたガラス基板へのウイルス付着を抑制し得る可能性が示された。今年度は同マイクロ流体チップを用いた単一ウイルス感染細胞の回収にはまだ至っておらず、次年度も継続して改良を行う。

静止期・分裂期細胞の膜強度解析; 杉浦グループにより開発されたコラーゲンコートしたビーズを周期の異なる細胞膜に付着させ光ピンセットで印加し、バネ乗数として解析した結果、静止期の細胞膜強度は弱かった(図3)。

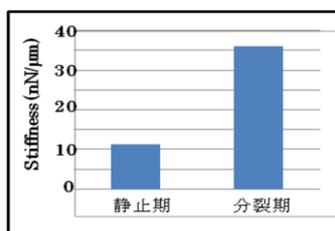


図3 静止期・分裂期細胞膜強度比較

インフルエンザウイルス感染細胞の変化解析: インフルエンザウイルス感染・非感染細胞ですでに膜強度変化、膜脂質成分変化が起きることを明らかにした(H21)。H22年度は細胞内タンパク質変化の解析を行った。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 Ebp1 はウイルス RNA ポリメラーゼ機能阻害活性を持ち、インフルエンザウイルス感染により発現誘導される(原著論文3)。しかしウイルス増殖への影響がないことから修飾を受けている可能性を予測し、その修飾様式を解析するとウイルス感染 2 時間から大きく修飾されることが明らかになった(投稿準備中)。また新井グループの丸山はローダミン B を PVA に封入した細胞の温度計測システムを開発し、インフルエンザウイルス感染・非感染細胞膜上に付着させ、蛍光強度変化を時間ごとに計測した。

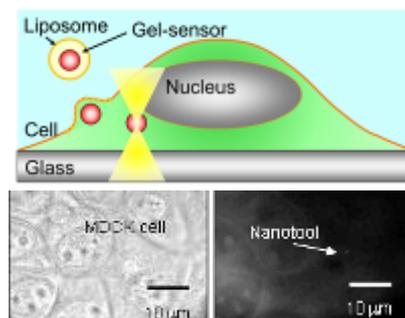


図4 光 pH 制御リポフェクションによる計測ツールの細胞内導入と細胞内操作

核内環境計測と vRNP の核内での捕捉・搬送:異なる細胞周期の核内生理環境(pH・温度等)計測用ツール作製と細胞内・核内導入の基盤技術を開発した(新井グループ)。核内への計測ツール導入法として、1)光 pH 制御リポフェクションによる計測ツールの選択的導入(図4)、2)細胞分裂を利用した計測ツールの核内導入、の手法を実施し、以下のような結果を得た。計測ツールの細胞内への導入及び操作に成功した。このツールは温度感受性の蛍光色素であるローダミン B を内包しており、細胞内の局所的な温度を計測できる。これは計測ツールの材質が非特異吸着の無い PEG であることが影響していると考えており今後検討していく。この技術を杉浦・本田グループで研究を行っている制限酵素コートビーズの核内導入への適用可能性を検討していく。

vRNP の細胞内での捕捉搬送の試み: 蛍光標識 vRNP を持つインフルエンザウイルスを感染させ核内に侵入した vRNP の捕捉搬送を試みたがまだうまくいっていない。細胞質での捕捉はできたが長距離の搬送ができていない。細胞質の小器官による搬送障害と考えられるためその障害を克服するためにパルスアシスト光ピンセットの開発を行った。細胞膜に付着したビーズの除去を光ピンセットのみで試みても除去できなかったが開発したパルスアシスト光ピンセットで除去することができた。また核内インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ活性測定用擬似ウイルス作製は終了した(図5)。この擬似ウイルスの RNA を蛍光標識し細胞に感染後、光ピンセットによる除去操作を引き続き継続していく。

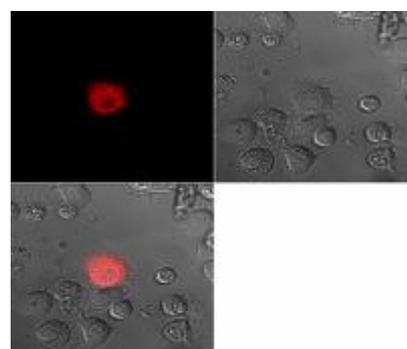


図5 ゲノムに蛍光タンパク質遺伝子を導入したインフルエンザウイルスの感染(赤い細胞)

染色体切断用ツール作製: DAN を特異的場所で切断する酵素 (Pst1) をコートしたビーズでのプラスミド DNA 切断に成功(図6、左)し、さらに静止期細胞から染色体を抽出し染色体 DNA 上の多数の場所で切断する酵素(Alu) をコートしたビーズで静止期から抽出した染色体の切断を試み切断に成功した(図6、右)。

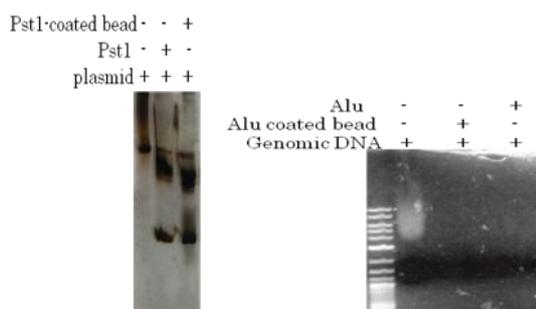


図6 制限酵素コートビーズでのプラスミド DNA, 染色体 DNA 切断

力の3次元計測による細胞膜力学特性評価:細胞触診システムで細胞の力学特性を3次元的に評価できるよう3次元力計測システムの開発を進めている。異なる焦点面の画像3枚を同時取得することで粒子の3次元位置を推定し、さらに粒子位置を実時間で追跡できる手法を開発した。また本手法を用いて粒子のブラウン運動を計測して局所的な粘性係数を計測する系を構築した。

パルスアシスト光ピンセットの高効率化:パルス光をアシストに用いる光ピンセット法において、パルス幅を 100ns ~200ns 程度に長くすることで効率良く光ピンセットのアシストを行えることを力学的解析から見出し、160ns のパルス幅を持つパルス光源を特注で作成し、パルスアシストの効率を評価した。その結果、アミノシラン処理した基板上に吸着したガラス粒子をほぼ100%の確率で引きはがせることを確認した。また引きはがした粒子を通常的光ピンセットでトラップして操作し、所望の位置で再度基板上に吸着させることで粒子を整列させることに成功した。図7は、アミノシラン処理基板上のシリカ粒子(直径 1.57 μ m)をパルス光で引きはがして移動操作して、再吸着させることを繰り返して作成したパターンの一例である。



図7 パルスアシスト光ピンセットによる吸着性基板上での粒子の配列操作

進捗状況: 当チームが掲げた目的を達成するために 4 つの研究計画を掲げた。「光ピンセットによる単一ウイルス捕捉・搬送」手法の開発は達成し、ウイルスの細胞への搬送実験から細胞周期によるウイルス付着性の違いが明らかになり、開発した膜強度計測システムを用いた計測から異なる細胞周期では膜強度が異なることを明らかにし、膜構成成分が異なることを明らかにした(投稿準備中)。またウイルス感染細胞を膜強度計測システムや開発した温度計測システムを用い測定を行った結果ウイルス感染が細胞に大きな変化を引き起こすことが明らかになった。測定結果を基に感染細胞内生理環境変化を生化学的・分子生物学的手法を用いた解析を行いウイルス感染細胞の変化を実証した(投稿準備)。単一ウイルス感染システム用マイクロ流体チップは改良中であるため感染したウイルスの細胞内での増殖量に関する解析は終了していない。「核内でのウイルス複製領域の解明」のために蛍光標識 vRNP をウイルス粒子から抽出し光ピンセットによる捕捉・搬送は可能になったが核内に存在する vRNP の捕捉搬送は現在進行中である。目標の「感染細胞からのウイルスゲノムの除去と核内の生理的環境の解明」では vRNP 除去を簡単に解析するためのプローブ作製は終了し、vRNP の核内操作が残されている。

染色体操作は染色体切断するためのツールの開発は終え、光ピンセットでツールを染色体上の特定部位に搬送し切断する *in vitro* 実験が進行中である。核内での実験はツールをいかに核内に安定して搬送できるかの検討を行っている。核内の生理的環境の制御機構解明はプローブを核内に挿入するための方法の開発段階である。

今後の方針: 当研究グループは「光ピンセットによる核内ウイルス除去」を目的に研究を遂行してきている。その中でウイルス感染細胞の生理的、物理的な変化をウイルス増殖初期に解析できるシステムを開発し細胞変化とウイルス感染の相関を説明できる研究が成功しつつある。ウイルス感染細胞変化の計測はこれまでになかった研究であり、この結果から細胞の構造や組成に対する新しい知見とともに、ウイルス感染細胞の早期発見(診断)法の開発が可能になると考えられる。このウイルス感染細胞変化の計測を基に開発する診断法はこれまでのウイルス感染細胞の診断法

に比べより早期に診断ができるという点で今後のウイルス感染防御に大きな役割を果たすことになると考える。また単一ウイルス感染細胞変化の計測により新しい細胞の物理的属性、生化学的変化、情報伝達系が明らかになってきている。以上のことから副産物として出てきた研究も残された3年間の研究の中で推進していきたいと考えている。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

- [1] Masayoshi Matsumoto, Tadao Sugiura, Kotaro Minato: Illumination by near-critical-angle incidence for imaging fluorescence correlation spectroscopy with electron-multiplying charge-coupled device camera. *Jpn. J. Appl. Phys.* 49 (2010) 060208 (DOI: 10.1143/JJAP.49.060208)
- [2] H.Maruyama, K.Kotani, T. Masuda, A.Honda, T.Takahata, F. Arai: Nanomanipulation of single Influenza Virus Using Dielectrophoretic Concentration and Optical Tweezers for single virus infection to a specific cell on a Microfluid Chip *Microfluids and Nanofluidics.* in press (DOI: 10.1007/s10404-010-0739-4)
- [3] M. Ejima, K.Kadoi and A. Honda Influenza virus infection induces cellular Ebp1 gene expression. *Genes to Cells.* Accepted

(4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 1件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1件)