

「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

H23 年度 実績報告

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. 研究実施体制

(1) 「本田」グループ

① 研究代表者: 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 主たる共同研究者: 新井 史人 (東北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 主たる共同研究者: 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

§ 2. 研究実施内容

文中の引用番号等は(3-1)に対応する)

インフルエンザウイルス感染による細胞温度変化の原因を明らかにする目的で生化学的解析、また感染細胞核内の vRNP の局在領域を明らかにする目的で光ピンセットによる操作、vRNP 結合タンパク質解析、さらに核内のウイルスゲノム除去のための方法開発を行った。

細胞膜上での温度計測システムを用いて感染細胞・非感染細胞の温度変化を計測した結果、感染細胞での温度上昇が観察された。

H23 年度は細胞内温度計測 のためのツール(温度感受性を有する蛍光色素の Rhodamine B で内部を染色したポリスチレンビーズをセンサとした)の改良を試みた。リポソーム内に 1 個のセンサの導入を可能とし、細胞内及び核内への導入に成功した。(図1a, b)。作製したリポソームを光ピンセット操作により細胞に接触させ任意のセンサをリポソームにより細胞質、核内への導入に成功した(図1c)。

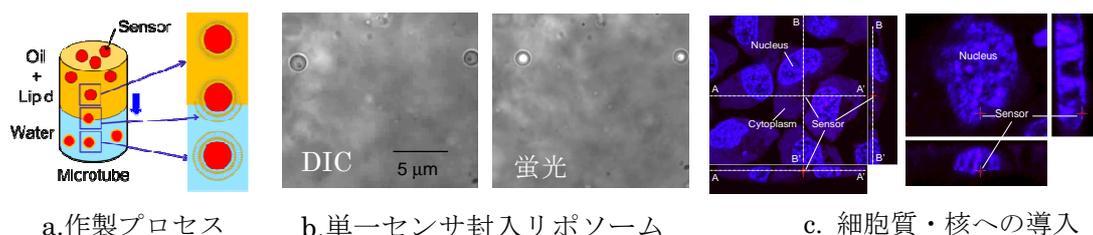


図 1 単一センサ封入リポソームの作製

さらに安定な温度計測法として蛍光スペクトル分布変化、すなわち色変化を用いる手法を考案した(Ref. 2)。この手法は、温度上昇に伴い蛍光スペクトルが一定の割合で低下することを利用している。スペクトルの一部を光学系でカットすることで温度変化により生じるスペクトル分布の変化を色変化として CCD で検出する方法である。通常の CCD カメラで得られる情報は R(赤), G(緑), B(青)であるが、これらの成分は明るさの情報を含んでいるため、蛍光退色やブリンキングの影響を大きく受ける。この問題を解決するため、RGB 色情報を式 1、式 2 を用いて YCrCb 色空間に変換し、Y(輝度)と Cr(赤の色差)と Cb(青の色差)に分離し、Cr で温度を評価する手法を開発した。この手法は、温度上昇に伴い蛍光スペクトルが一定の割合で低下することを利用し、スペクトルの一部を光学系でカットすることにより温度変化により生じるスペクトル分布の変化を色変化として CCD で検出するものである。560nm にピーク波長を有す量子ドットを用いて蛍光画像を取得し、感度、精度、及び時間安定性の評価を行った結果、感度は従来の蛍光強度法と同等だが精度及び時間安定性に優れることが明らかになった(図2, 3)

①

$$Y = -0.201 \times Mg - 0.294 \times Cy + 0.5 \times Ye$$

$$Cr = 0.5 \times Mg - 0.41 \times Cy$$

$$Cb = -0.319 \times Mg - 0.181 \times Cy + 0.15 \times Ye$$

②

$$Mg = R + B, Cy = G + B$$

$$Ye = R + G, G = G$$

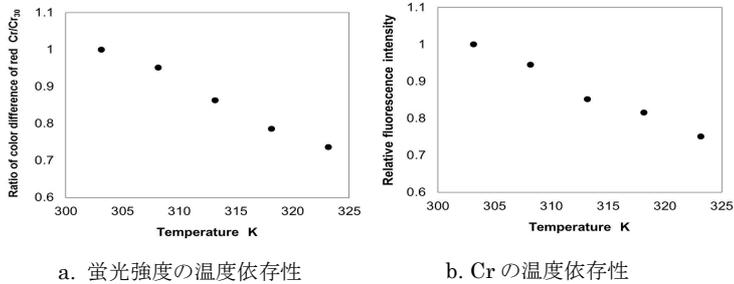


図2. 色変化による温度計測法と蛍光強度法の感度の比較

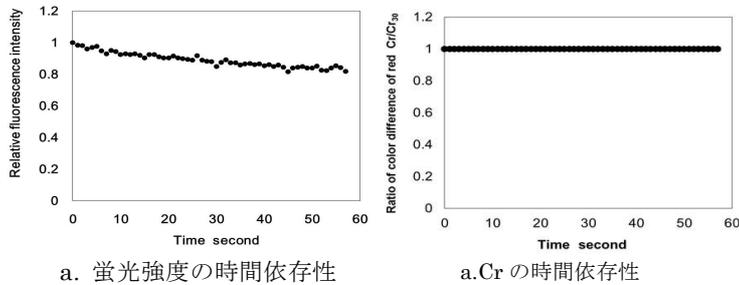


図3. 色変化による温度計測法と蛍光強度法の時間安定性の比較

ウイルス粒子中から抽出した vRNP の光ピンセットでの捕捉搬送の成功からウイルス粒子中の vRNP は 8 本の集合体であることを予測していた。23 年度は核内に侵入した vRNP を光ピンセットで捕捉搬送を試みた結果、核内に侵入した vRNP を光ピンセットで捕捉でき、約 500nm 程度移動させることができた。その可動範囲が核内では制限されていることを確認した(図4)。この結果から細胞に感染し核内に侵入した vRNP も 8 本の分節の集合体と考えられる。また vRNP の細胞質から核内への移行が観察され、8 本の分節が集合体として移行することが予想される。興味深いことに核内に移行した vRNP は感染時間が長くなることにより光ピンセットで動かしにくくなることから、vRNP の局在箇所同定のために、ウイルス RNA ポリメラーゼの抗体を用いてウイルス

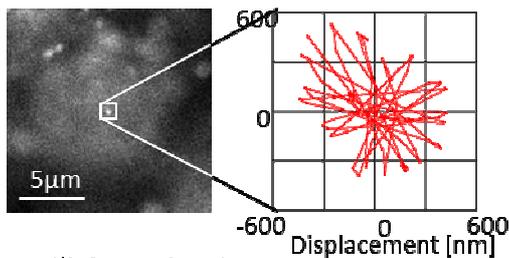


図4. 光ピンセットによる核内vRNP移動範囲

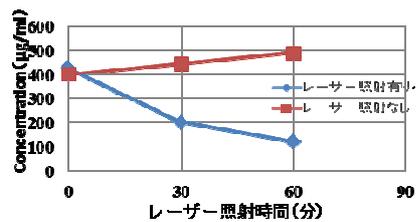


図5. レーザー照射時間とDNA崩壊効率

感染細胞から vRNP を取出し、vRNP に結合してくるタンパク質の同定を試みている。また、動かせなくなった vRNP を最適な局在箇所から動かすための手段として、パルスアシスト光ピンセットによる捕捉・搬送技術の開発を進め、基板に吸着した粒子の引きはがし操作など、従来の光ピンセットでは不可能であった操作を実現した(Ref.4)。

細胞ゲノムに挿入されたウイルスゲノム除去の目的でプラスミド DNA に蛍光色素を挿入し、レーザー照射時間と DNA の開裂を解析すると、明らかに同じ蛍光波長のものであっても開裂の割合が異なることが明らかになった(図5)。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

1. 恩田一寿、新井史人, 計算機ホログラムによる高速マルチビーム遠隔操作、日本ロボット学会誌、Vol. 29、No. 7、pp. 643-649、2011.
2. M. Ejima, K.Kadoi and A. Honda Influenza virus infection induces cellular *Ebp1* gene expression. *Genes to Cells* 16 927-937 2011
(DOI:10.1111/j.1365-2443.2011.01541.x.)
3. H. Maruyama, T. Otake, F. Arai, “Photoprocessible Hydrogel Microsensor for Local Environment Measurement on a Microfluidic Chip”, *IEEE/ASME TRANSACTIONS ON MECHATRONICS*, 16, No. 5, pp. 845-852 2011
(DOI:10.1109/TMECH.2011.2161878)
4. Kazuhisa Onda, Fumihito Arai, “Multi-beam bilateral teleoperation of holographic optical tweezers”, *Optics Express*, Vol.20, No.4, pp.3633-3641, 2012 (DOI: 10.1364/OE.20.003633)
5. Saki Maeda, Tadao Sugiura, Kotaro Minato, “Optical tweezers with assistance of sub-microsecond duration pulse laser beam,” *Applied Physics Express*, vol. 5. No. 4, pp. 04701, 2012 (DOI: 10.1143/APEX.5.042701).

(3-2) 知財出願

① 平成 23 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)