

「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

H24 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(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

研究のねらい: インフルエンザウイルスは感染細胞の核の中で自己のゲノムをウイルス独自の RNA 依存 RNA ポリメラーゼで複製また転写することにより増殖する。これまでインフルエンザウイルス感染による細胞の物理的・化学的变化に関し解析されたことはなかった。私たちはインフルエンザウイルス感染による細胞の変化を明らかにすることと、核内に局在するウイルスゲノム (vRNP) を光ピンセットにより除去することを目的とし研究を実施した。

これまでの研究の概要: インフルエンザウイルスを蛍光標識し、光ピンセットで細胞に搬送後、ウイルスの付着に関し解析を行った。その結果インフルエンザウイルスが静止期細胞特異的に付着することを明らかにした。この結果をもとに静止期と分裂期の細胞でのシアル酸の量の違いを明らかにした。また細胞膜の強度にも違いがあることを明らかにした。さらにインフルエンザウイルス感染により細胞膜強度、脂質組成、細胞温度の変化があることを明らかにした。また核内に存在するウイルスゲノムを光ピンセットで動かしてみると動く範囲が限られることが明らかになった。

研究の進捗状況:

「ウイルス感染による細胞変化」: インフルエンザウイルス感染細胞での温度上昇とともに細胞内 ATP 量の計測を行った結果、ウイルス感染により一旦消費された ATP が再び合成され消費されるという現象を明らかにした。この結果をもとに ATP 合成に関与するピルビン酸キナーゼの発現量を解析した(図1A)。ピルビン酸キナーゼはウイルスを細胞に付着させているインキュベーションの 1 時間に消費されるが、再合成され、再び消費されることが明らかになった。さらにピルビン酸キナーゼがウイルス増殖に必要であることがピルビン酸キナーゼの siRNA を導入した細胞でウイルス増殖が要請されることから ATP 合成がウイルス感染に必須であることを明らかにした(論文投稿中)。

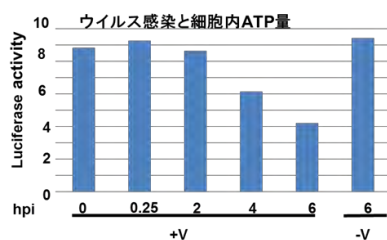


図 1A ウイルス感染細胞の ATP 発現

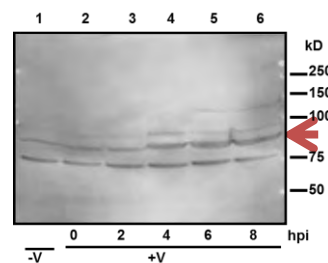


図 1B ウイルス感染細胞のピルビン酸キナーゼ発現

「核内環境計測」細胞内導入による環境センサーツールは脂質膜間融合により細胞内・核内へ導入することにした。このため蛍光ビーズの外周を 4 層の脂質膜で覆うため、図 2 で示すような方法でビーズのコートを試みた。図 3 で示すようにセンサービーズに任意の層数の脂質膜コートが可能になった。1,3,3-Trimethylindolino -6'- nitrobenzopyrylospiran (SP) を導入した脂質でコートしたビーズを紫外線照射し、このビーズを MDCK へ付着させることに成功した。細胞への付着効率は脂質濃度が高いほど高率がよかった(図 3)。

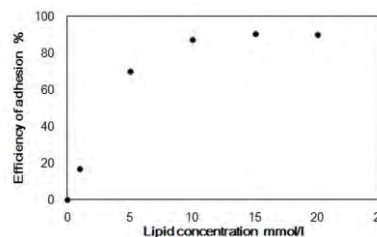
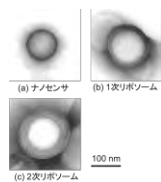
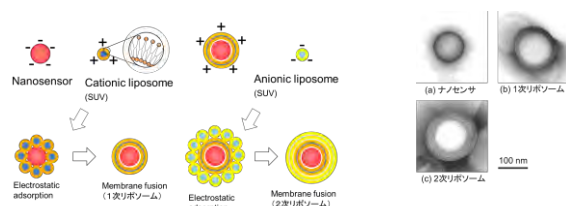


図2センサー表面への脂質膜コート法とTEM画像

図3脂質濃度と脂質コートビーズ付着

「核内のウイルスゲノム搬送の試み」: 核内に局在するウイルスゲノム (vRNP) の光ピンセットによる捕捉と搬送を試みた。vRNP は感染後時間経過とともに可動範囲の減少が観察された。そこですでに発見されている核内機能タンパク質に対する抗体を用いて免疫染色した結果 Cajal body と共局在した (図 4)。同時に免疫共沈により vRNP と結合するタンパク質の解析を行っている。

「核内での染色体操作」: 核内でのゲノム操作、特異的遺伝子除去のための手法として蛍光標識した短鎖 DNA を目的遺伝子に結合後レーザ照射を行っていく。

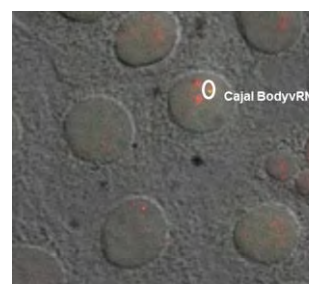


図4 vRNP の核内局在

研究成果:

1. 光ピンセットによる単一ウイルス感染システムの開発とそこから得られた細胞の違い 論文投稿中 (受理 PlosOne)
2. ドイツでの国際会議で初めて光ピンセットを用いたウイルス感染に関して大変好評であった。
3. ウイルス感染細胞の温度上昇 論文投稿中
4. vRNP と核内局在 論文投稿準備中
5. ウイルス感染による細胞変化 論文投稿準備中

今後の見通し:

これまでに得られた結果をまとめて論文にするとともにまだ明確な結果が得られていないウイルス感染細胞核内環境計測ツール、膜強度測定方法をより正確なものに確立していく。できれば他のウイルスでの計測を試み、将来的に抗ウイルス剤、新しいウイルス感染診断法の開発に発展させていく。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

- 1 .K.Ohara, D.Kawakami, T.Takubo, Y.Mae, T.Tanikawa, A.Honda, T.Arai, Dextrous cell diagnosis using two-fingered microhand with micro force sensor, *Journal of Micro-Nano Mechatronics* 1-8 2012
2. T. Sugiura, S. Maeda, and A. Honda, Pulse Laser Assisted Optical Tweezers for Biomedical Applications, Proceedings of 34th Annual International Conference of the IEEE EMBS, 4476-4471 2012.
3. T. Sugiura, H. Miyoshi, T. Nishio, A. Honda, Cell palpation with an optically trapped particle, *Journal of Micro-Nano Mechatronics* 7 131-136 2012. (DOI: 10.1007/s12213-012-0051-3)