

## 単一生細胞成分の経時的ナノ分析：機能分子の 採取・同定・注入法の開発

Time lapse nano-analysis of single cell components:  
Development of Harvesting, Identification and Injection  
Methods of Functional Molecules

猪飼 篤 (Atsushi Ikai)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授



### 研究の概要

生化学的反応性を付与した原子間力顕微鏡探針を用いて生細胞表面に接触ないしは穿孔し、膜タンパク質の採取同定、mRNAの採取同定、細胞内へのプラスミド遺伝子の挿入、等の技術開発を通じて、単一生細胞手術法を開発する。

研究分野／科研費の分科・細目／キーワード

複合新領域／ナノ・マイクロ科学／ナノ材料・ナノバイオサイエンス／ナノバイオ

### 1. 研究開始当初の背景・動機

ナノテクノロジーの進展に伴い、生体分子および生細胞を個々のレベルで操作する技術開発が可能となった。特に原子間力顕微鏡を利用する力学的方法は直接試料に接触し、単一分子をターゲットとして張力や圧力を印加できる。これらの方法を世界のグループと競争して開発していた当研究室ではその後の目標を細胞レベルの操作、すなわち細胞手術に定めて研究課題を申請した。

### 2. 研究の目的

原子間力顕微鏡の持つ広範な操作能力を生かしたタンパク質操作、生細胞操作によるタンパク質および細胞膜の力学物性解明を基盤として、細胞膜および細胞内の機能分子採取、細胞内への機能分子注入法を開発して医学・生物学の基礎技術として確立する。

### 3. 研究の方法

原子間力顕微鏡を用いるタンパク質および生細胞の単一分子レベルでの操作(AFMに付属して用いるイメージインテンシファイアおよびデジタルカメラを用いての操作)を主として用いた。また細胞膜のモデルとしての人工膜を作成するため、LB膜作成装置を購入して用いた。オートクレーブは生細胞培養器具の処理のため購入した。

### 4. 研究の主な成果

(1). 膜タンパク質引き抜き同定  
膜タンパク質は細胞膜中を移動しているものと、一箇所に止まっているものがある。その理由の主たるものは膜タンパク質が細胞内で細胞骨格とよばれる大きな3次元構造とリンカータンパク質を介して連携しているかどうかによる。またこの連携は、細胞の生理的条件により変動することが知られている。そこで、単一分子レベルでの膜タンパク質引き抜き実験で見られる、フォースカーブとよばれる張力・延伸距離の関係から、膜タンパク質と細胞骨格の連携の有無を推定することができることを知った。実験として、まず細胞骨格との相互作用の有無がかなり詳しく調べられている、赤血球膜のバンド3タンパク質とグリコフォリンAを対象とした。バンド3は細胞骨格と連携が強く、グリコフォリンAは弱いか、連携をもたないことが知られている。この二つのタンパク質を脂質膜から引き抜く際のフォースカーブは図1のように異なり、特にバンド3引き抜きの際に見られる複数のフォースピークの出現が、このタンパク質と細胞骨格の連携を力学的に示していることがわかった。細胞骨格を破壊する操作後にはこのようなフォースピークが見られなくなった。

#### 4. 研究の主な成果 (続き)

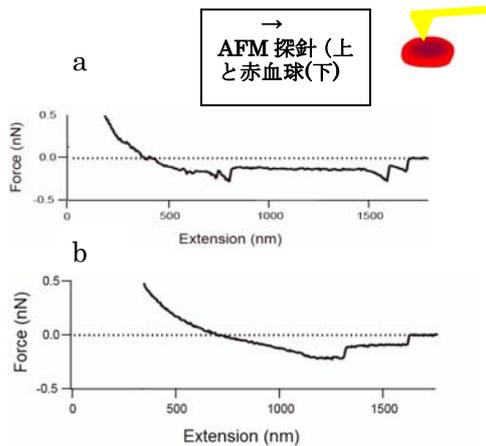


図1 赤血球膜タンパク質引き抜き時のフォースカーブ。(a)バンド3引き抜き、(b)グリコフォリンA引き抜き。縦軸は探針から赤血球への印加力、横軸は引き抜き距離。

#### (2). mRNA 採取・同定

原子間力顕微鏡探針を生細胞内に挿入し、細胞内の mRNA を吸着採取し、この探針を RT-PCR 法の出発材料とし、さらに定量的 PCR 法を使って DNA として増幅後、その量と種類を同定する方法を開発した。探針先端には複数種の mRNA が吸着採取されるので、RT-PCR 法で使用するプライマーとして分析ターゲットとする 5 種類の異なる mRNA 配列を用い、探針一本からそれぞれの mRNA をもとにする DNA を増幅して、その量と種類を経時的にモニターする方法 (図 2) を完成した。

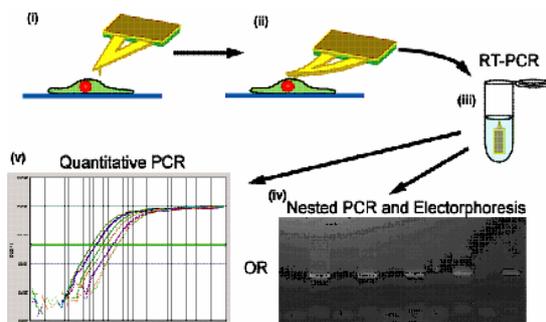


図2 生細胞からの mRNA 採取同定法の概略。(i)細胞と AFM 探針の位置、(ii)細胞の細胞内への挿入、(iii)RT-PCR 法による mRNA の DNA への変換と増幅、(iv)PCR 法により増幅された DNA の同定、(v)PCR 増幅時の定量化による採取 RNA 数の数値化。

この方法を用いて、生細胞内での  $\beta$  アクション mRNA の局在、5 種類の mRNA の増減を示す経時的変化像などを得た。静止時の細胞内では当該 mRNA は各周辺に偏在しているが、活動時には移動方向前面に mRNA の存在が強調されるようになる。こ

れらの結果は細胞を固定して行う in situ FISH 法による結果とよく一致した。

#### 5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

原子間力顕微鏡を使用したナノテクノロジーによる生体分子、生体構造の単一分子レベルでの操作に関しては、当研究室は世界のトップレベルにある。今回の成果は、膜タンパク質引き抜き、mRNA 採取同定の 2 点で世界をリードする成果である。

#### 6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

1) **Ikai, A.**, Afrin, R. and Sekiguchi, H., Pulling and Pushing Protein Molecules by AFM, (2007) *Current Nanoscience* **3**:17-29.

2) Afrin, R. and **Ikai, A.**, Force profiles of protein pulling with or without cytoskeletons studied by AFM, (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **348**:238-244

3) Kim, H., Arakawa, H. Hatae, N., Sugimoto, Y., Matsumoto, O., Osada, T., Ichikawa, A., and **Ikai, A.**, Quantification of the number of EP3 receptors on a living CHO cell surface by the AFM, *Ultramicroscopy* **106**:652-662.

4) Afrin, R., Mohammed T. Alam and **Ikai, A.**, Pre-transition and Progressive Softening of Bovine Carbonic Anhydrase II as Probed by Single Molecule Atomic Force Microscopy, (2005) *Protein Science* **14**:1447-1457.

5) **Ikai, A.**, Nanomechanics of Protein-Based Biostructures, (2004) *Jpn. J. Applied Physics* **43**:7365-7375.

6) Osada, T., Uehara, H., Kim, H., **Ikai, A.**, Clinical laboratory implication of single living cells mRNA analysis, (2004) *Advances in Clinical Chemistry*, **38**:239-262.

7) Afrin, R., Yamada, T. and **Ikai, A.**, Analysis of force curves obtained on the live cell membrane using chemically modified AFM probes, (2004) *Ultramicroscopy* **100**:187-195.

8) Uehara, H., Osada, T., **Ikai, A.**, Quantitative measurement of mRNA at different loci within an individual living cell., (2004) *Ultramicroscopy* **100**:197-201.

ホームページ等

<http://www.ikai.bio.titech.ac.jp/indexen.html>