

平成17年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

ふりがな(ローマ字)		IKAI ATSUSHI					
①研究代表者氏名		猪飼 篤			②所属研究機関・部局・職		東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授
③研究課題名	和文	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					
	英文	Time lapse nano-analysis of single cell components: Development of Harvesting, Identification and Injection Methods of Functional Molecules					
④研究経費		平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	総合計
17年度以降は内約額 金額単位：千円		28,300	21,600	15,800	15,800	0	81,500
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者）							
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）				
猪飼 篤	東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授	生体ナノ力学	研究全体の総括・タンパク質の材料力学・細胞膜穿孔法の開発				
長田 俊哉	東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教授	神経生化学	単一生細胞内機能分子の経時的分析法の確立				
荒川 秀雄	物質・材料研究機構・ナノマテリアル研究所・アソシエートディレクター	バイオナノテクノロジー	細胞膜および細胞内から採取した少数機能分子の種別同定と定量法の開発				
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>本研究課題の当初の目的は、次に挙げる個別課題を完遂し、これらの手法の総合としての生細胞手術法を開拓する点にあった。手法は主として生体構造およびタンパク質等生体高分子の力学的個別操作を基本としているので、個々の試料の材料力学的物性評価法の開拓・確立も本研究課題の重要な一部をなしている。当初課題を申請書から抜粋すると以下ようになる。</p> <p>1) 生細胞穿孔：生細胞への障害を最小限にとどめる方法で細胞膜に数100nm径の孔を開け、そこから生細胞内にAFM探針を挿入して機能分子の採取と注入を行う方法を開発する。人工的に開けた孔の治癒状況をモニターすると同時に穿孔が生細胞に与える損傷効果についても詳細に検討する。</p> <p>2) mRNAの経時的採取：上記の穿孔法で開けた孔を利用して、生細胞の細胞質からオリゴdT処理AFM探針を用いてmRNAを採取し、RT-PCR法による増幅・同定する現在開発中の方法を完成し、医薬品の効果を細胞レベルでモニターする簡便かつ新規な方法へと発展させる。</p> <p>3) 膜タンパク質等の採取：同様に、機能化探針を持つAFMを使用して、細胞内および細胞膜からタンパク質複合体を採取し、その成分を単一分子同定にまで精度を高めた蛍光抗体法により同定・定量する方法を開発する。</p> <p>4) DNA及び薬物の注入：AFM探針先端に光照射により解裂する架橋剤を使用してDNAや医薬品を固定し、細胞膜に開けた孔から探針を挿入し光照射によって医薬品を探針から解放した後、注入医薬品の効果をモニターする。</p>							

⑦これまでの研究経過 (研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。)

1.1 原子間力顕微鏡を利用した生細胞内からの mRNA 採取実験を行って次の結果を得た。

図 1 に示すように、先端曲率半径数 10nm の原子間力顕微鏡探針を細胞表面に押し付け、細胞内に挿入された探針を数分後に引き上げると、探針先端には細胞内のいろいろな構造が付着している。この中から、RT-PCR (Reverse transcriptase polymerase chain reaction) 法を用いての増幅が可能な mRNA の同定を行った。探針を細胞から引き抜いた後、RT-PCR 用に準備したチューブに移し、探針に吸着している mRNA を基質としてその配列を DNA 配列に読み替えて PCR 法で増幅する。プライマーとして、細胞内の存在を分析したい mRNA 配列の一部と相補的な配列をもつものを用い、増幅には定量的 PCR 法を採用することにより、特異的 mRNA の定量を可能とした。

1.2 特異的 mRNA の細胞内局所変化：

本方法を適用することにより、同じ β アクチン mRNA でも、細胞内局在が異なることが明確に証明される。繊維芽細胞の 4 ヶ所の局所に別々に探針を穿刺した後、それぞれについて定量的 RT-PCR を適用し、図 2 に見るように、核付近に多く核から遠い位置では少ないことを確認した。

1.3 特異的 mRNA の細胞内存在の経時的変化：

本方法の応用として、単一生細胞を 5 時間にわたって生存させ、3 時間生存後に培地にシクロヒキシミド含有の FBS の添加による細胞活性化後のその間に 4 回細胞穿孔による mRNA の採取を行って個々の細胞における 5 種類の mRNA の経時変化を見ることに成功した。

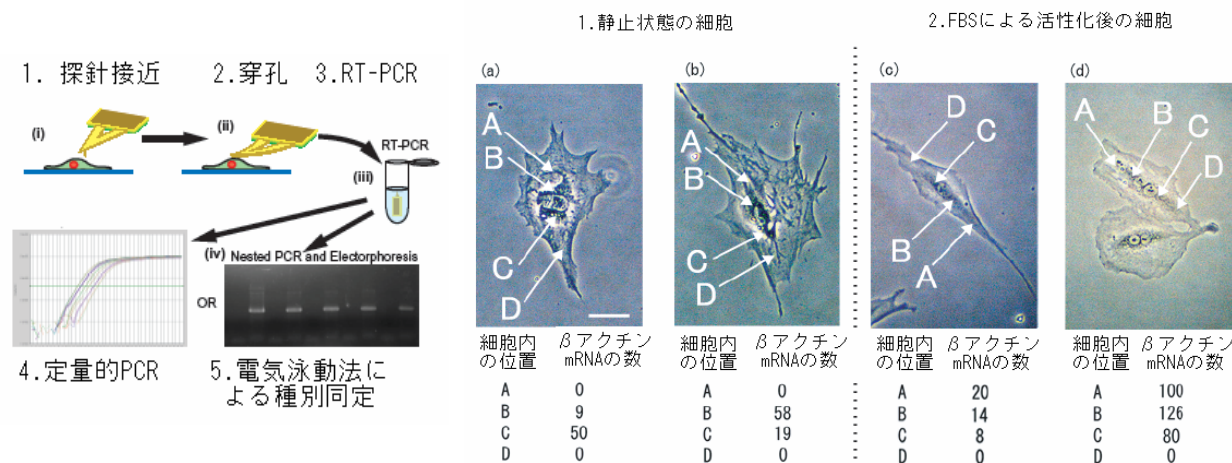


図 1. 単一生細胞からの mRNA 採取と増幅・同定法

図 2. 静止細胞と FBS による活性化を受けた細胞内の β アクチン mRNA の局在量

2.1 赤血球の主要膜タンパク質であるバンド 3 とグリコフォリンに対して特異的結合をするレクチンの相互作用力測定と膜タンパク質引き抜きに要する力を比較する実験を行った。両タンパク質とレクチンの相互作用力は 160pN 程度であり、タンパク質を細胞膜から引き抜く力は 230pN と大きく、膜タンパク質と脂質膜の結合強度が大きいことが示された。

3.1 無修飾探針およびリパーゼ/プロテアーゼ修飾探針を用いた細胞膜穿孔実験を行い、単に力学的に穿孔するより酵素で細胞膜を溶かす作用を併用して穿孔を容易にすることに成功した。

4.1 膜タンパク質および水溶性タンパク質の力学的強度を単一分子延伸実験および圧縮実験から推定する方法を開発した。タンパク質は従来考えられていたより小さいヤング率を持つことを示した。リガンド結合により硬くなることも示された。

⑧特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

1. 生細胞内からの経時的 mRNA 採取とその同定

単一細胞を対象として、経時的に細胞内機能分子の定量を続ける方法はこれまで存在しなかった。本研究では、原子間力顕微鏡の探針を用いる分子採集法とその後の RT-PCR 法の改善をすることにより、細胞内局所の mRNA 濃度を単一生細胞について経時的に測定することを可能とした。この方法は完全に無侵襲とはいえないが、分子採取のために細胞膜にあける穴の大きさは $1\mu\text{m}$ 程度であるため、生細胞への影響は少ないと考えられるが、その程度については今後の検討が必要である。この方法を利用して、現在までに個々の細胞内でのアクチン mRNA の局在とその細胞の活性状態による変化、5 種の mRNA の単一細胞内の局所存在量の時間変化、細胞穿孔状態のモニターなどの成果を挙げている。

2. タンパク質分子の力学的強度と力学操作

本研究を推進する間に明らかになってきた重要な発見に、細胞膜およびタンパク質の力学強度の問題がある。本研究で膜タンパク質などを原子間力顕微鏡探針に共有結合で結合して引き抜く実験を行っているが、その際に必要な基礎的データとしての細胞膜と膜タンパク質の結合の強さ、膜タンパク質および一般的にタンパク質の力学的強度、膜タンパク質と特異的リガンドとの結合の強さなどが必要である。しかし、このような測定は従来散発的にしか行われておらず、生体構造の成り立ちをその人工操作を行うために、我々は単一球状タンパク質の力学的強度を測定することからはじめた結果、従来特殊な繊維状タンパク質について数 GPa と推定されていたタンパク質のヤング率が、球状タンパク質では 0.1GPa のレベルであることを明らかにした。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

(○) Osada, T., Uehara, H., Kim, H. and Ikai, A., mRNA analysis of single living cells, *Journal of Nanobiotechnology* 1, 2-9 (2003).

Afrin R., Arakawa, H., Osada, T. and Ikai, A. Extraction of Membrane Proteins from Living Cell Surface Using the Atomic Force Microscope and Covalent Crosslinkers, *Cell Biochem. and Biophys.* 2003 39 101-118 (2003)

Ikai, A. and Afrin R. Toward mechanical manipulations of cell membranes and membrane proteins using an atomic force microscope: (an invited review). *Cell Biochem Biophys.* 39 (3) 25 7-77 (2003).

Kim, H., Arakawa, H., Osada, T., Ikai, A. Quantification of cell adhesion force with AFM: distribution of vitronectin receptors on a living MC3T3-E1 cell. *Ultramicroscopy.* 97 (1-4) 359-63 (2003).

Yamada, T., Arakawa, H., and Ikai, A., Zeptomole level detection of proteins picked up on a probe of atomic force microscope using total internal reflection fluorescence microscope. *FEBS Letters* 569, 59-64 (2004).

Afrin R, Yamada T, Ikai A. Analysis of force curves obtained on the live cell membrane using chemically modified AFM probes. *Ultramicroscopy.* 100 (3-4) 187-95 (2004).

Afrin, R., Okazaki, S. and Ikai, A. Force spectroscopy of covalent bond rupture vs. protein extraction. *Applied Surface Science* 238 (1-4) 47-50 (2004).

(○)Uehara, H., Osada, T. and Ikai, A., Quantitative measurement of mRNA at different loci within an individual living cell *Ultramicroscopy* 100 (3-4) 197-201(2004).

Kim, H., Satoshi Tsuruta, Hideo Arakawa, Osada, T. and Ikai, A. Quantitative analysis of the number of antigens immobilized on a glass surface by AFM. *Ultramicroscopy* 100 (3-4) 203-210 (2004).

Ikai, A. Nanomechanics of Protein-Based Biostructures *Jpn. J. Appl. Phys.* 43 7365-7375 (2004).

(○)Afrin, R., M. T. Alam and Ikai, A., Pre-transition and Progressive Softening of Bovine Carbonic Anhydrase II as Probed by Single Molecule Atomic Force Microscopy. *Protein Science* (2005) (in print).

Ikai, A. Local Rigidity of a Protein Molecule, *Biophysical Chemistry* (2005) (in print).

猪飼 篤 「一分子一細胞操作」第20回医用高分子研究会講座 平成15年2月3日

猪飼 篤 単一生細胞のナノ分析と細胞手術(平成15年2月10日 21世紀の細胞利用テクノロジー)

Ikai, A. "Development of Nanotechnology for the Single Cell Surgery" in International Symposium on "Application of Nanotechnology for Biomaterials and Artificial Organs" Tokyo Medical and Dental University (TMDU) 2003.02.20-21

猪飼 篤 「単一生細胞を対象とする機能分子マッピングと採取・同定法」平成15年3月11-12日
日本再生医療学会第2回総会 シンポジウム7 細胞操作・評価技術の最前線

Afrin, R. and Ikai, A. "Membrane Protein Uprooting from Live Cells Studied by Atomic Force Microscopy". Oxford 2003 Scanning Probe Microscopy, Sensors and Nanostructures, Hethrop Park, Oxford, UK. May 23-26, (2003).

Afrin, R. and Ikai, A. Force Mechanics and Identification for Uprooting Protein Molecules from a Single Living Cell". "New Horizons in Molecular Sciences and Systems: An Integrated Approach" Okinawa, JAPAN. October 16-18, 2003.

Ikai, A., (Invited talk) "Nano-mechanics of Protein Based Biostructures" International Conference: Seeing at Nanoscale II 2004 October 13-15.

Uenara, H., Kunitomi, Y., Osada, T. and Ikai, A. "The method to examine time dependent mRNA expression of single living cell and application" 77th 日本生化学会大会(2004年10月13日-16日)

Afrin, R. and Ikai, A. Analysis of Force Curves Obtained on Red Blood Cells by Single Molecule Force Spectroscopy". 5th International Conference on Biological Physics, Gothenburg, SWEDEN. August 23-27, 2004.

Ikai, A., (Invited talk) "Nano-mechanics of Protein Based Biostructures" International Conference: Seeing at Nanoscale II 2004 October 13-15.

Uenara, H., Kunitomi, Y., Osada, T. and Ikai, A. "The method to examine time dependent mRNA expression of single living cell and application" 77th 日本生化学会大会(2004年10月13日-16日)