

細胞内の核酸分子のダイナミクス

中村 史^{1,2*}・内藤 瑞紀²

はじめに

細胞内の環境と比較すると実験で用いられる緩衝液はかなり希薄な溶液である。細胞質では高濃度で存在する巨大分子やオルガネラによって分子クラウディングと呼ばれる環境が形成されている。このような環境において、分子は拡散阻害を受け、排除体積効果により実効濃度は増大し、また細胞内分子の水和に多くの水分子を必要とするため水分子の活量は低下した状態となる。細胞のシグナル伝達、物質生産、代謝などほとんどの反応は細胞質で起こっており、通勤ラッシュの満員電車のような混み合った空間でこれらの反応が迅速かつ正しく進行しなければならない。 *in vitro* で細胞質を再現すると、タンパク質濃度は実に300 mg/mlに到達し、核酸分子は全体で40 mg/mlになるので調製は困難である。代替物質としてPEGなどのクラウディング剤が用いられ、20wt% ~の高濃度の溶液を調製し、試験を行うが、クラウディング剤の性質は実験結果に大きく影響する。筆者らは細胞内で *in situ* 観察することで、細胞質で起こる分子のダイナミクスを正しく観察することを目指し、そのツールとしてナノニードルを開発した。本稿では、モレキュラービーコン修飾ナノニードルを用いたmRNA検出で明らかになってきた知見について紹介したい。

細胞内の核酸分子の挙動に関する知見

2000年以前から細胞内の核酸の拡散係数は調査されており、 $0.1 \sim 40 \mu\text{m}^2/\text{s}$ とその数字は、標的核酸の長さや細胞内の局在によって大きく異なる¹⁻³⁾。Verkmanらは2 kbpのDNAの細胞質における拡散係数は希薄な緩衝液中の100分の1になると報告している¹⁾。また、三好らが緩衝液と比較してクラウディング剤を用いた系でB型DNA二重鎖が不安定化すると報告している一方で⁴⁾、船津らのRNAプローブに対する標的mRNAの応答速度は、*in vitro* と細胞内ではほぼ等価であるように見える⁵⁾。このように分子クラウディング環境下における核酸の挙動については、矛盾のない説明が少し難しい状況があると筆者らは考えている。

ナノニードルによる細胞質の *in situ* 解析

筆者らは生きた細胞の内部を解析するために、AFMの探針を直径200 nmの針状に加工したナノニードルを使用し研究を行ってきた⁶⁾。その過程で、モレキュラービーコンを修飾したナノニードルを細胞へ挿入することで、細胞内のmRNAを検出することに成功した⁷⁾。ナノニードルを挿入した直後に共焦点蛍光顕微鏡を用いて、ナノニードルの全長15 μm をカバーするように三次元走査を行い、蛍光強度を解析する(図1)。

ヒト子宮頸部癌細胞HeLaではハウスキーピング遺伝子であるGAPDHのmRNAが1細胞あたり約2500分子存在することが明らかとなっている。細胞に挿入したナノニードル表面で応答したモレキュラービーコンの分子数を蛍光強度から算出したところ、数千分子と見積もられ、細胞内のほぼすべてのGAPDH mRNAがニードル表面に到達しているものと推察している。ナノニードルを細胞へ挿入する際に機械的な作用によってステムが開裂する可能性もあるが、転写阻害剤actinomycin Dを作用させると作用時間に応じて蛍光強度が減少することから、mRNAのハイブリダイゼーションによって起こっ

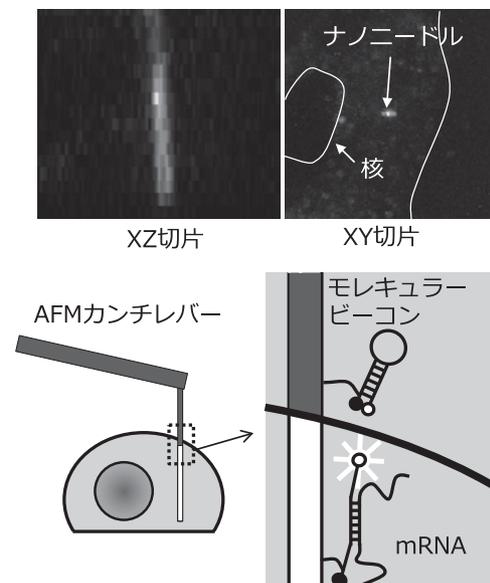


図1. モレキュラービーコン修飾ナノニードルによるmRNA検出の共焦点蛍光像と模式図

*著者紹介 産業技術総合研究所(研究グループ長) E-mail: chikashi-nakamura@aist.go.jp
¹産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門, ²東京農工大学大学院工学府生命工学専攻

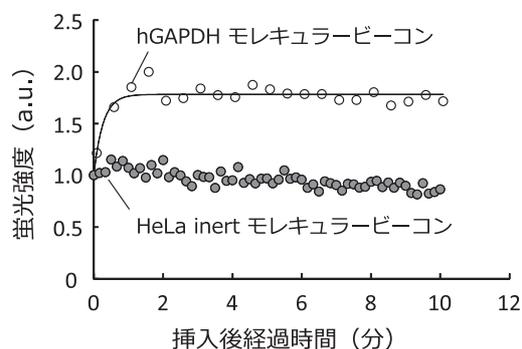


図2. 細胞内のモлекуラービーコンの応答の経時変化

たFRET解消であることが証明された。また、HeLa細胞内でまったく応答しない配列⁸⁾に同じシステムを組み合わせて設計したHeLa inertモлекуラービーコンを挿入してもまったく応答しないことから挿入時の機械的な作用によらないことが明らかとなった(図2)。

ハイブリダイゼーション速度の解析

図2の経時変化から挿入後1分程度で蛍光強度は飽和していることが分かる。そこでハイブリダイゼーション速度(k_{on})に関して解析を行い、緩衝液を用いた*in vitro*試験の結果と比較した。*in vitro*試験では、細胞質模擬緩衝液(25 mM HEPES, 115 mM CH_3COOK , 2.5 mM $MgCl_2$, 0.5 mM TCEP-HCl, pH 7.1)に終濃度1 μM で標的ssDNAを添加し、シリコンウエハに固定されたモлекуラービーコンの蛍光強度の経時変化を測定した。分子クラウディング剤としてPEG200を終濃度20wt%で添加した緩衝液で同様の実験を行った。使用したモлекуラービーコンと標的核酸は、室温では二本鎖の自然解離はほとんど起こらないために k_{off} をゼロと考える。モлекуラービーコンはシリコン表面に固定化されているので、表面との相互作用が二重鎖の解離に影響しているかもしれない。解離のない二次反応速度式から導出される下記の式を用いた回帰により k_{on} を算出した。

$$F(t) = F_{max} \cdot \left\{ \frac{C_{nuc} \cdot (e^{(C_{MB}-C_{nuc}) \cdot k_{on} \cdot t} - 1)}{C_{MB} \cdot e^{(C_{MB}-C_{nuc}) \cdot k_{on} \cdot t} - C_{nuc}} \right\}$$

標的核酸の初期濃度 C_{nuc} 、系中のモлекуラービーコン濃度 C_{MB} としている。*in vitro*試験ではssDNAの k_{on} は $4.7 \times 10^3 M^{-1}s^{-1}$ 、20wt%のPEG200を用いて調製した分子クラウディング緩衝液中では、 $6.6 \times 10^3 M^{-1}s^{-1}$ であった。PEGにより調製した分子クラウディング環境では、速度定数がより大きいことが示された。PEG添加により水の活量は著しく低下しており、ワトソククリック型塩基対は不安定化している⁴⁾。反応後、PEGと

標的DNAを含まない緩衝液に置換すると蛍光の増大が観察されるが、これはモлекуラービーコンと標的DNAのワトソククリック型塩基対の安定化によると考えられる。

続いて細胞内の k_{on} について評価を行った。mRNAは骨格タンパク質をレールとして能動的に輸送されるものもあるが、細胞質のGAPDH mRNAはブラウン運動により自由拡散していると考えられる。HeLa細胞内のGAPDH mRNA初期濃度は、分子数2500に対して排除体積を細胞体積の90%と多めに見積もり細胞質実効容積を0.1 pLとしたうえで、42 nMというやや高め濃度で回帰を行った。*in vitro*試験の結果に対して、細胞内で観察されたmRNAの k_{on} は $4.4 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ であった。この値は*in vitro*試験の結果と比較して、二桁上大きい値である。ヒトGAPDHのmRNAは1.2 kb以上あり、19 baseのRNAと比較して遙かに大きく、分子拡散の点で不利であるにもかかわらず、細胞内でこのような高い k_{on} が観察された。

まず、核酸の拡散について考える。分子クラウディング環境中では排除体積効果によって k_{on} が上昇することは*in vitro*試験の結果からも示されている。しかし、HeLaのGAPDH mRNAは細胞中にほぼ均一に分散しているので、約2500分子がすべて結合するには、ナノニードルから遠位にあるmRNAも表面に到達しなければならない。細胞内のGAPDH mRNAの拡散係数は、過去のデータから大きくても $0.5 \mu m^2/s$ 程度と推察される。細胞内の空間はナノニードル表面まで最大で10 μm 程度と考えると、すべてのmRNA分子のニードルまでの到達に少なくとも1分以上の時間を要することになる。筆者らの測定結果を満足するには、細胞質のmRNAの拡散係数は少なくとも数 $\mu m^2/s$ 以上である必要がある。過去に報告されている拡散係数は、蛍光色素や複数のGFPで標識されたDNAやRNAの動態を測定したものであり、分子が混み合った環境では、周囲の分子との相互作用を受けるなど、より不利になる条件で測定されている可能性が高い。筆者らの測定では無標識のmRNAのハイブリダイゼーションを観察しているため、本来の分子拡散を反映する結果であるといえる。

本測定系ではmRNAのターンオーバーを一切考慮していないが、数分でフィードバックがかかるとは考えにくいので、 k_{on} の評価では問題ないと考えている。細胞内は希薄溶液中の拡散係数と同等の数 $10 \mu m^2/s$ であり、mRNAの拡散律速はないと考える。さらに、標的GAPDH配列のDNA-DNAとDNA-RNAの二本鎖形成の ΔG に大きな差はないことを考慮すると、得られた細

胞内の高い k_{on} は、希薄溶液と比較して細胞質より二本鎖を安定化する環境であることを示唆する。この結果はGaoらのRNAの分子内ヘアピンの T_m および ΔG が緩衝液と比較して細胞質で増大するという最近の報告と矛盾しない⁹⁾。いずれにしても無標識のmRNAの拡散係数は過去の報告と異なるものになると筆者らは考えている。

おわりに

本稿では、ナノニードルを用いることによって生きた細胞内に観察場を提供することが可能であることを示した。はっきりした結論は得られないものの、細胞質は核酸のハイブリダイゼーション速度が大きい空間となっていることが結果から示唆された。この現象に潜むメカニズムは細胞内のバイオインターフェースの速度論を支配する根源的要素であると筆者らは考えており、核酸のみ

ならず細胞内の生体分子のダイナミクスの解析にナノニードル技術を今後も生かしていきたいと考えている。

文 献

- 1) Lukacs, G. L. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **275**, 1625 (2000).
- 2) Politz, J. C. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 6043 (1998).
- 3) Tadakuma, H. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **344**, 772 (2006).
- 4) Miyoshi, D. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 7957 (2006).
- 5) Okabe, K. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **39**, e20 (2011).
- 6) Obataya, I. *et al.*: *Nano Lett.*, **5**, 27 (2005).
- 7) Kihara, T. *et al.*: *Biosens. Bioelectron.*, **26**, 1449 (2010).
- 8) Nitin, N. *et al.*: *Bioconjug. Chem.*, **19**, 2205 (2008).
- 9) Gao, M. *et al.*: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **55**, 3224 (2016).