

論文審査の結果の要旨

氏名 山田 俊理

本論文は、生細胞内における RNA を一分子レベルで蛍光イメージングする新規分析手法の開発を纏めている。

本論文は全 5 章からなる。第 1 章では、まず現在の RNA 研究における分析手法、および優位性と問題点について概説している。既存の RNA 研究が分子生物学的に手法に大きく依存している一方で、今後は生きた細胞内における RNA の時空間情報が求められている点を指摘し、既存の RNA イメージング手法として、相補的な核酸塩基対による RNA 可視化法と、MS2 タンパク質を用いた RNA 可視化法の二例を紹介している。これら既存の手法は特異性が低く、背景光も高いといった問題点を挙げ、内在性の RNA を特異的かつ一分子レベルの感度で検出する分析技術の必要性を述べている。本章では最後に、配列特異的に標的 RNA を認識する RNA 結合タンパク質 (PUMILIO) 及び蛍光タンパク質再構成法について言及しており、この両技術を組み合わせた新しい RNA 蛍光イメージング技術を提案している。

第 2 章では、第 1 章にて提案した RNA 検出技術を用いて、細胞骨格の構成因子であるアクチンの mRNA を可視化した研究について報告している。先ず開発したアクチン mRNA 蛍光プローブの標的 mRNA に対する特異性を評価している。次に細胞内のアクチン mRNA 動態を、全反射蛍光顕微鏡を用いて 1 分子観察する技術を報告している。この技術を用いて、アクチン mRNA が細胞内の末端へと輸送され、細胞端に局在することを明らかにしている。

第 3 章では、染色体の末端のテロメア領域から転写される、タンパク質をコードしない RNA “TERRA” について、その構造と機能に関するこれまでの知見を紹介している。次に細胞内在性の TERRA を検出する蛍光プローブの検出原理を概説し、その具体的な開発方法と蛍光プローブの特性評価の結果を報告している。まず、TERRA 検出プローブの TERRA に対する結合能を生化学的に測定し高い親和性を有することを確認している。また、細胞内の TERRA 上でプローブが蛍光を発することを蛍光顕微鏡観察により確認し、蛍光プローブの TERRA に対する特異性を確認している。さらに、蛍光プローブが TERRA 本来の機能を阻害しないことを、テロメアの長さを測定することにより検証し、蛍光プローブの細胞内毒性が極めて低いことを述べている。

第 4 章では、TERRA 可視化のために開発した上記蛍光プローブを用いて、生きた細胞内における TERRA の動態を解析している。TERRA が細胞内でダイナミックな運動をしていることを、全反射蛍光顕微鏡による観察から発見している。さ

らに, この TERRA の動態について動径分布関数と拡散係数を用いて, TERRA の細胞核内における空間分布や運動を定量的に解析し, TERRA がテロメア近傍に局在すること, また TERRA がテロメア近傍に束縛された拡散運動を有することを見出している. さらに, テロメア近傍において hnRNPA1 と相互作用することを 1 分子イメージングにより示している. これらの実験結果を踏まえ, TERRA が hnRNPA1 のテロメアへの局在を阻害する機能モデルを提案している.

最終章である第 5 章は, 本研究で開発された RNA 可視化のための蛍光プローブ開発の学術的意義, 既存の分析法に対する本蛍光プローブの優位性, 今後応用可能な研究対象, および将来的な研究展望について記述しており, 研究全体を総括している.

なお本論文は, 吉村英哲氏, 島田林太郎氏, 服部満氏, 江口正敏氏, 藤原政宏氏, 楠見明弘氏との共同研究の成果をまとめたものであるが, 論文提出者が主体となって実験およびデータ解析を行ったものであり, 論文提出者の寄与が十分であると判断した.

したがって, 博士 (理学) の学位を授与できると認める.