

第1章 序論	6
1.1 mRNA が受ける制御.....	6
1.2 既存の標識手法による mRNA の1分子イメージングについて.....	7
1.2.1 RNA 結合タンパク質を用いる手法	7
1.2.2 アンチセンス核酸を用いる手法.....	8
1.3 本論文の概要.....	10
第2章 材料及び細胞の培養と実験手法	14
2.1 細胞培養培地とその他の溶液の組成	14
2.2 細胞の培養	16
2.3 CentroidFold を用いた RNA の二次構造予測	16
2.4 プロブの調製.....	17
2.5 インジェクション	18
2.6 利用した顕微鏡とその構成.....	18
2.6.1 FRAP データ取得のための顕微鏡	18
2.6.2 レーザースキャニング型共焦点顕微鏡	20
2.6.3 二波長分岐型スピニングディスク共焦点顕微鏡	21
2.7 細胞の固定	21
2.8 DMD の操作と照射領域の確認.....	22
2.9 FRAP データの取得.....	22

2.10 FRAP データの解析	23
2.10.1 解析に利用したソフトウェア	23
2.10.2 退色領域の蛍光に関する情報の抽出と関数フィッティング	23
2.10.3 結合率の算出	24
2.11 ガラス基板に固定したプローブの輝度追跡	24
2.11.1 データの取得	24
2.11.2 データの解析	25
2.12 輝点の追跡	25
2.13 FLIP (Fluorescence loss in photobleaching)	26
第3章 FRAP による結合率定量のための実験系構築	29
3.1 概要	29
3.2 細胞内におけるアンチセンス核酸の結合評価法	29
3.3 FRAP によるアンチセンス核酸の結合評価の原理	30
3.4 本研究における FRAP による結合評価法の戦略	31
3.5 用いる FRAP のモデルとその条件について	32
3.6 FRAP のための光学系の構築	34
3.6.1 DMD を用いた照射系の構築	34
3.6.2 固定細胞の退色による光学系の評価	35
3.6.3 顕微鏡法による退色領域の蛍光強度の比較	37
3.6.4 局所退色用光学系と共焦点光学系の併用	37

3.6.5 退色領域の退色特性.....	38
3.7 コントロールプローブを利用した実験系の評価.....	39
3.7.1 概要.....	39
3.7.2 標的 mRNA の量の差による蛍光回復速度の違い.....	40
3.7.3 FLUC mRNA 標的プローブを用いた FRAP データのフィッティング.....	40
3.8 小括.....	40
第 4 章 GAPDH mRNA に対するプローブの設計と結合評価.....	52
4.1 概要.....	52
4.2 プローブ配列の選択.....	52
4.2.1 プローブの自己相補性への着目.....	52
4.2.2 選択したプローブ配列の持つ特徴について.....	53
4.3 FRAP によるプローブの結合評価.....	54
4.3.1 自由フィッティングにおける問題点と対策.....	54
4.3.2 設計したプローブの結合評価.....	55
4.4 ACTB mRNA 用プローブ設計への応用.....	56
4.5 考察.....	57
4.5.1 自己相補性が必ずしもプローブと mRNA の親和性を下げない理由について.....	57
4.5.2 本手法の応用可能性について.....	58
第 5 章 アンチセンス核酸プローブを用いた GAPDH mRNA の 1 分子イメージング.....	70
5.1 概要.....	70

5.2 単一種のプローブを用いたイメージング	70
5.2.1 高親和性プローブを選択する意義についての検討.....	70
5.2.2 プローブの結合率と細胞内分布の関係.....	71
5.2.3 高親和性プローブを用いて観察された輝点の追跡.....	71
5.2.4 基板に固定したプローブとの比較による輝点に含まれるプローブ数の算出	73
5.3 複数の高親和性プローブを用いた輝点の追跡.....	74
5.4 考察	75
第6章	83
総括及び今後の展望.....	83
6.1 本研究の総括	83
6.2 今後の展望	84
参考文献一覧.....	86

第 1 章

序論

1.1 mRNA が受ける制御

遺伝子発現を担う分子である mRNA は DNA の持つ遺伝情報をタンパク質産生へ伝えるだけでなく、細胞の適応応答における遺伝子発現調節の標的として中心的な役割を果たしており、さまざまな制御を受けることが知られている。たとえばストレス環境下におけるストレス顆粒 (stress granule, SG) と呼ばれる凝集体の形成がある。SG 内には mRNA の他に RNA 結合タンパク質や翻訳因子が存在し、SG 内の mRNA は翻訳が抑制される。これにより恒常的なタンパク質への翻訳を抑制し、修復に関わるタンパク質産生を優先させることで細胞機能を保護するとともに、ストレスから回復した際の速やかな翻訳再開を可能にすると考えられている [1]。SG の形成および消失は分オーダーで起こり、mRNA の局在と翻訳活性は短時間で大きく変化することが知られている [2]。他の例には microRNA や small interfering RNA を介した RNA の抑制的制御がある。どちらも最終的に RNA 誘起サイレンシング複合体 (RNA-induced silencing complex, RISC) が結合した 20 塩基程度の 1 本鎖 RNA となり、プロセシング体 (processing body, PB) において標的となる特定の mRNA に対し相補的に結合することで、翻訳抑制や mRNA の分解を起こす [3]。そのため、これらの制御は遺伝子特異的である。さらに、SG と PB は近接して配置され、互いに作用していることが知られている [4]。こうした例に見られるように、mRNA はダイナミックに動態・局在を変えるとともに、遺伝子特異的な機構が互いに協調することで、巧妙な遺伝子発現制御を達成している。これらの反応の中心分子である mRNA のダイナミクスや機能発現機構の理解は、細胞機能の理解およびこれを標的とした治療法の開発に必須である。これまでの研究は主に分子生物学的手法に依存しており、制御因子の同定への貢献は大きかったが、それらの細胞内で

の動態は不明なままである。この詳細を明らかにするには、生細胞内で mRNA が受ける制御を直接観察することが有用である。これを可能とする技術、すなわち生細胞内 mRNA の 1 分子レベルでの可視化技術は近年大きな注目を集め、その手法開発も盛んに行われている。

1.2 既存の標識手法による mRNA の 1 分子イメージングについて

既存の mRNA イメージングのための標識手法には、主に結合タンパク質を用いるものとアンチセンス核酸を用いるものがある。これらの方法を用いた細胞内 mRNA の 1 分子イメージングの原理と、その特徴および問題点を以下にまとめた。

1.2.1 RNA 結合タンパク質を用いる手法

RNA 結合タンパク質を用いる手法は、そのほとんどがゲノムの操作を必要とし、広く利用されている手法に MS2 システムがある[5] (図 1-1)。MS2 システムでは、標的の mRNA に MS2 結合サイト (MS2 binding site, MBS) と呼ばれるヘアピン構造を持つ繰り返し配列を挿入する。そして、MBS に特異的に結合する MS2 カプシドタンパク質 (MS2 capsid protein, MCP) に蛍光タンパク質を融合させたタンパク質を発現させる。MCP は 2 量体を形成するが、これが MBS に対し高い親和性を持つ。MBS を mRNA 1 分子に複数個導入することにより、蛍光タンパク質融合 MCP を RNA に複数分子結合させることが可能であり、これにより高いシグナルを得ることができる。この手法を改良したものやこの手法に類似した手法なども数多くあり[6]、mRNA の 1 分子レベルでの検出も可能となっている。これらの手法を用いて、mRNA のプロセッシングや核外輸送などの研究が盛んに行われている。近年では、MBS と GFP 融合 MCP が発現するようなトランスジェニックマウスが作られており[7]、生体レベルでの研究にも有効な手法であると考えられる。

このように MS2 システムなどの RNA 結合タンパク質を用いる手法は有効なものであるが、問題

が存在する。それは、内在性 mRNA と比べて標識 mRNA がはるかに巨大化してしまうことである。MS2 システムの場合、24 回の繰り返し配列を挿入すると挿入される MBS の塩基数は 1200 程度となり、そこに蛍光タンパク質融合 MCP が結合するとその部分は 3 MDa にまで達する[8]。この mRNA の巨大化は mRNA の性質や受ける制御を変化させてしまう可能性がある。実際に、mRNA が分解されにくくなることや[9][10]、SG における動態が変化すること[11]などが知られている。

RNA 結合タンパク質を利用しながらも遺伝子操作をしない手法は、RNA 結合タンパク質を *in vitro* で蛍光標識し、インジェクションによって細胞内に導入する手法である [12][13]。この手法は標的 mRNA に対し、特異的に結合するタンパク質が存在しなければならないため、汎用性が低い。

1.2.2 アンチセンス核酸を用いる手法

アンチセンス核酸を用いる手法はいずれも *in vitro* で調製した蛍光標識されたアンチセンス核酸（アンチセンス核酸プローブ）を細胞内に導入するものである(図 1-2)。この手法の利点は、任意の mRNA に対して特異的な配列を持つプローブが作成可能な点である。固定細胞においては、single-molecule fluorescence *in situ* hybridization (smFISH)と呼ばれる手法によって mRNA の 1 分子イメージングが可能となっている[14]。smFISH では、標的 mRNA に特異的に結合する 20 塩基程度の蛍光分子で標識されたアンチセンスプローブを複数種類導入することで mRNA の標識を行う。この手法は固定細胞に対しては簡便で強力な手法だが、生細胞で 1 分子イメージングは実現されていない。その理由は、固定細胞の場合、mRNA に結合しないプローブを洗い流すことができるため背景光を低減し感度を上げることができるのに対し、生細胞においてはそれができないからである。そのため、生細胞内でアンチセンス核酸プローブを用いた mRNA の 1 分子

イメージングを行うためには、(1) 標識率を上げる、(2) 未結合の状態では蛍光を発しないようにするといったアプローチが必要である。(1) の手法には MS2 システムのように繰り返し配列を標的 mRNA 配列に付加する方法がある[15]。ただし MS2 システム同様、遺伝子操作を必要とし、分子が巨大化するという点から、内在性 mRNA と受ける制御が大きく異なってしまう可能性がある。(2) のアプローチはいくつかあるが、例として蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) の利用がある[16][17](図 1.3)。mRNA の近接した部位を標的とする 2 種のプローブを用意し、隣接する部位に FRET が起こるようドナー・アクセプターの色素をそれぞれ結合させておく。例えば mRNA の 3' 側を標的とするプローブの 3' 端にドナーを、そのすぐ下流を標的とするプローブの 5' 端にアクセプターを標識する。この時、プローブが mRNA に結合していない状態で存在している場合はドナーのみを励起させてもアクセプターは蛍光を発しないが、2 種のプローブがともに単一の mRNA に結合し、2 つの色素が 10 nm 程度以内に近接した時は、ドナーのみを励起させてもそのエネルギーの一部がアクセプターへ移動することでアクセプターも励起され、蛍光を発する。したがって、ドナーのみを励起させ、アクセプターの蛍光を見れば、mRNA に結合しているプローブのみの蛍光を取得することができる。この手法は細胞内の native な RNA を選択的に検出できる優れた方法であるが、2 種類のプローブがそれぞれ独立して同一の mRNA に結合しなければならないため、標識効率が低くなるとともに、エネルギー移動の効率が 100% とならないためアクセプターのシグナルが弱くなる問題があり、感度が低くなる。この手法に似たアプローチで molecular beacon (MB) と呼ばれるプローブを利用したものがある[18](図 1.4)。MB は中央部で標的 mRNA に相補的な配列を持ち、両端には自己相補的な配列を持つ。そのため mRNA 非存在下で MB はその両端を結合させ閉じた構造を取っている。MB の両端には蛍光色素と消光団がそれぞれ結合しており、閉じた構造では蛍光色素が励起されてもそのエネルギーが消光団に移動することで蛍光は発しない。標的 mRNA と結合し MB が開いた構造となり、蛍光色素と消光団が離れることで蛍光が発せられるようになる。この

手法も背景光を減らした観察を可能にするが、mRNA に特異的でない配列を付加し構造を取るようになっているため結合速度および結合率の低下を招き、結果としてシグナルも減少して感度が高まらない問題がある。以上より、アンチセンス核酸を用いた mRNA の可視化は内在性 mRNA の 1 分子検出に対する有力な候補であるが、感度の不足から現状ではこれが達成されていない。

アンチセンス核酸プローブを用いる手法で、背景光を低減させ感度を高めようとするものは様々に開発、検討されているが、これらに共通する問題として、そもそも細胞内でプローブの結合を評価する手法がなく、親和性の高い配列を選択できていないことに根本的な原因があると考えた。

1.3 本論文の概要

本論文は前節の考察から、生細胞内の内在性 mRNA に対するアンチセンス核酸プローブの親和性を評価し、高親和性の配列を選択することが標的 mRNA の 1 分子レベルでの可視化に有効な手法であると考え、検討した内容をまとめたものである。

第 1 章では生細胞における内在性 mRNA イメージングの生物学研究上の重要性について言及し、現状の mRNA イメージング手法の紹介と問題点および本研究の概要を記した。

第 2 章では本研究において使用した試薬・装置などの詳細と実験方法についてまとめた。

第 3 章ではアンチセンス核酸プローブの結合率を生細胞内で定量するための実験系の構築を行い、検討した内容を記した。

第 4 章では高親和性プローブを得るための設計指針を得るために複数のアプローチでプローブの設計を行った結果について記した。

第 5 章では高親和性プローブを mRNA の 1 分子レベルでの可視化に用いた結果について記した。

第 6 章では本研究を総括し、今後の展望を述べた。

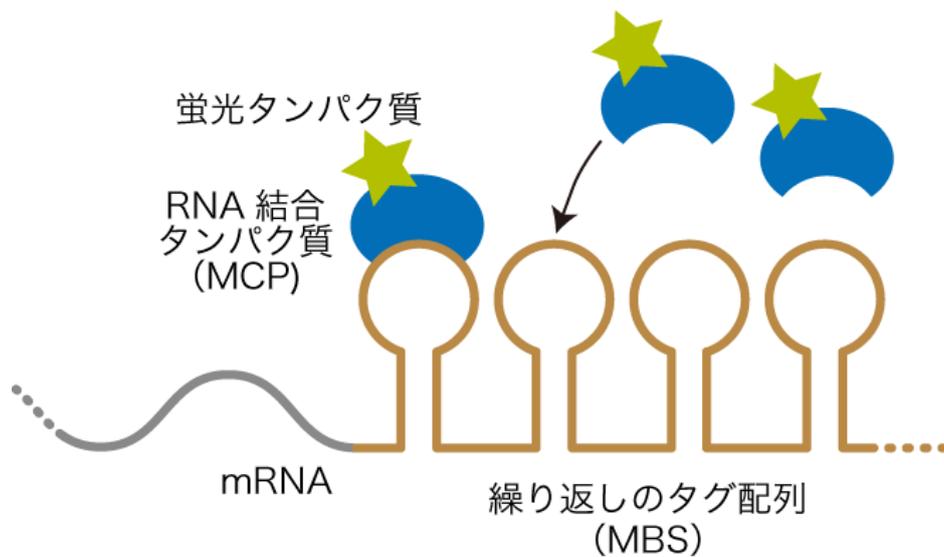


図 1-1 RNA 結合タンパク質を利用した mRNA の標識法

(カッコ内は MS2 システムの場合の名称を表す)

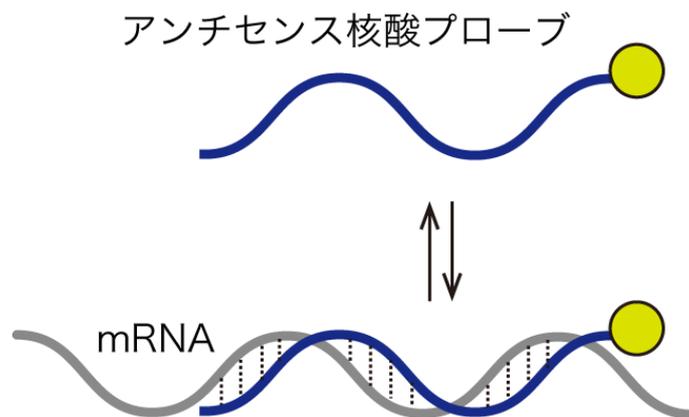


図 1-2 アンチセンス核酸プローブを用いた mRNA の標識法

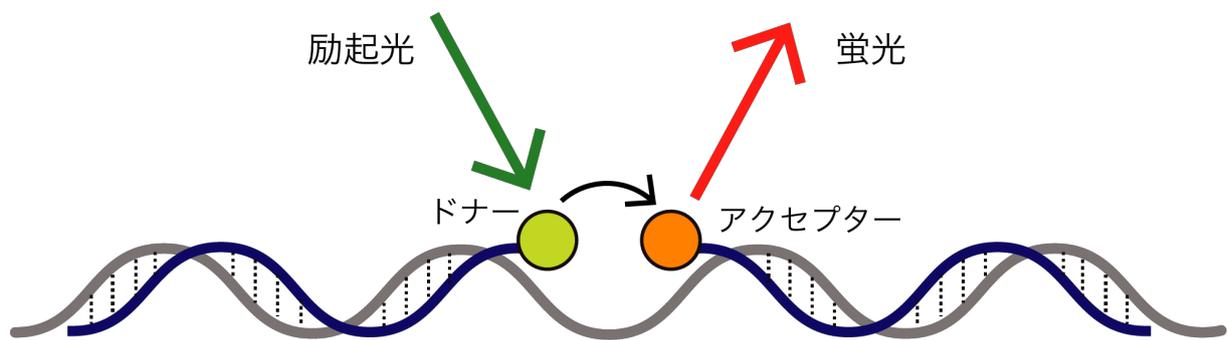


図 1-3 FRET を利用した検出

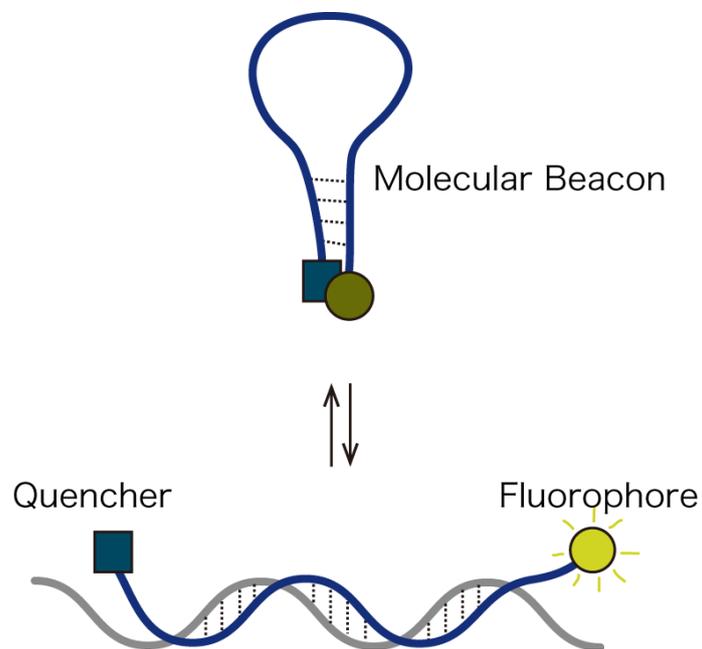


図 1-4 Molecular Beacon の原理

第 2 章

材料及び細胞の培養と実験手法

2.1 細胞培養培地とその他の溶液の組成

DMEM 培地

FBS (Fetal bovine serum, Thermo Fisher Scientific)	50 mL
Penicillin-Streptomycin 100x (Thermo Fisher Scientific)	5 mL
L-Glutamine 200 mM (Thermo Fisher Scientific)	5 mL
MEM Non-Essential Amino Acids 100x (Thermo Fisher Scientific)	5 mL
Sodium Pyruvate 100mM (Thermo Fisher Scientific)	5 mL
2-Mercaptoethanol 55 mM (Thermo Fisher Scientific)	500 µL
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Thermo Fisher Scientific)	up to 500 mL

溶液はクリーンベンチ内で Millipore Express® PLUS Membrane Filters (メンブレン孔径 0.22 µm, Millipore)を通した後、乾熱滅菌済みの広口メジューム瓶(PYREX)内で調製した。

観察用 DMEM-HEPES 培地

FBS (Fetal bovine serum, Thermo Fisher Scientific)	50 mL
100x Penicillin-Streptomycin (Thermo Fisher Scientific)	5 mL

200 mM L-Glutamine (Thermo Fisher Scientific)	5 mL
100x MEM Non-Essential Amino Acids (Thermo Fisher Scientific)	5 mL
100mM Sodium Pyruvate (Thermo Fisher Scientific)	5 mL
55 mM 2-Mercaptoethanol (Thermo Fisher Scientific)	500 µL
DMEM (+25 mM HEPES, Thermo Fisher Scientific)	up to 500 mL

溶液はクリーンベンチ内で Millipore Express® PLUS Membrane Filters (メンブレン孔径 0.22 µm, Millipore)を通した後、乾熱滅菌済みの広口メジューム瓶(PYPEX)内で調製した。

PBS 溶液

PBS (-) タブレット(T900, TAKARA) 5 錠を MilliQ 水に溶解し、全量を 500 mL とした。

インジェクション溶液(PH7.2)

KCl 80 mM

NaCl 4 mM

$\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ 10 mM

細胞固定溶液

Paraformaldehyde 3% (v/v)

Glutaraldehyde 0.1% (v/v)

in PBS buffer

2.2 細胞の培養

本研究では哺乳類細胞としてアフリカミドリザル腎臓由来である COS7 細胞を用いた。細胞培養は標準的なプロトコルに従った。その手順を以下に示す。

1. 60 mm Tissue Culture Dish 接着細胞用 (3010-060, IWAKI) で培養した COS7 細胞(4 mL DMEM 培地中, 80%コンフルエント程度)を用意する。
2. 培地を吸引し、10 mL PBS で洗浄する。
3. 300 μ L Trypsin-EDTA(0.25% Trypsin, 0.2% EDTA in PBS buffer)を加え、37°Cにて3分静置する。
4. 4 mL DMEM 培地を加えて細胞を懸濁し、15 mL 遠沈管 (430791, Corning) に移す。
5. 190 G で5分間遠心する。
6. 上清を吸引し、4 mL DMEM 培地を加え細胞をすべて懸濁する。
7. 新しいシャーレに 1/25 に希釈する。
8. 5% CO₂, 37°Cにて培養する。

なお、顕微鏡観察用のサンプルは 35 mm ガラスベースディッシュ(3911-035, AGC Techno Glass)に細胞懸濁液を希釈したもの(細胞懸濁液 50-400 μ L に DMEM 培地 2 mL)を培養して用いた。培地に含まれるフェノールレッド由来の蛍光の影響を無くするため、顕微鏡観察前に培地を吸引取り 2 mL の PBS で洗浄した後 DMEM-HEPES 培地に交換した。

2.3 CentroidFold を用いた RNA の二次構造予測

CentroidFold [19] (<https://github.com/satoken/centroid-rna-package>) を用いて、mRNA およびプローブ配列の二次構造を予測した。inference engine は McCaskill(BL)を、weight of basepairs は 2² に設定した。

予測させた mRNA 配列は以下の 2 種である。

- Macaca mulatta Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA (Accession number: NM_001195426.1) のコーディング領域(61..1068)
- Cercopithecus aethiops Beta-actin (ACTB) mRNA (Accession number: AB004047.1) のコーディング領域 (11..1138)

2.4 プローブの調製

本研究では 2'-O-methyl RNA の 5'末端に Cy3 もしくは ATTO 647N を、3'末端に biotin を標識したものをを用いた。GAPDH mRNA および ACTB mRNA を標的とした配列は 4 章に記載する。コントロールとして用いた配列を表 2-1 に示す。なお、本研究で用いたプローブは polyU が 22 塩基の他はすべて 20 塩基である。プローブは FASMAC 社もしくは日本バイオサービス社による受託合成により用意した。プローブの核内への移行を防ぐため、3'末端の biotin 標識に Streptavidin (21125, Thermo Fischer Scientific) を付加した。プローブの最終濃度を 3 μ M にする場合の手順を以下に示す。

1. 10 mg/mL の Streptavidin 4.8 μ L に対し 100 μ M のプローブを 1.0 μ L 混合する。
2. 20 分間室温で放置した後、インジェクション溶液を 27.5 μ L 加えて希釈する。
3. 試料を 0.22 μ m メンブレンフィルター (UFC3 0GV 0S, Millipore) に移し、遠心機(KUBOTA 1025)にて 10,000 rpm (約 7100 G) で 7 分遠心する。
4. 得られた溶液を RNase free チューブ(AM12450, Ambion)に移し替え、保存する。

なお、目的とするプローブの最終濃度によって上に述べた手順 1. における試薬の濃度や混合量を変えたが、プローブと Streptavidin の量比が 1 : 8 になるように保った。

2.5 インジェクション

アンチセンスプローブの細胞内への導入にはマイクロインジェクション法を用いた。まず、インジェクション用ガラス製針 (Femtotips II, Eppendorf) に試料を専用のチップ (Microloader, Eppendorf) を用いて導入し、針内に気泡が無いことを確認してインジェクター (FemtJet, Eppendorf) に取り付けた。続いて、顕微鏡の位相差像を確認しながらコントローラ (Micromanipulator, Eppendorf) で針を動かし、針の先端を細胞内に挿入した。インジェクションの操作ごとにインジェクターの条件を調整したが、インジェクション時の圧力としては低圧吐出圧(P_c)を 20–40 hPa 程度にして行った。

2.6 利用した顕微鏡とその構成

2.6.1 FRAP データ取得のための顕微鏡

FRAP データ取得のための蛍光イメージングには、Olympus 社製の倒立顕微鏡 (IX70) を使用した。対物レンズには 60 倍油浸対物レンズ (UplanApo N.A.1.40, Olympus) を用い、Cy3 の観察のため 532 nm レーザー (COMPASS 315M-100, Coherent, ビーム径 0.32 mm) を励起光源として用いた。レーザー光はビームエキスパンダー (LBED-10, シグマ光機) によりビーム径を広げられ、 $\lambda/4$ 板 (WPQ-5320-4M, シグマ光機) により円偏光にした後、細胞全体のイメージングや局所退色のための光学系に導入される。これらの光学系に関しては検討を行っており、詳しくは次章で述べる。最終的に構築した光学系では落射顕微鏡法・スピニングディスク型共焦点顕微鏡法・局所的照射と退色が可能となっており、以下それぞれについて述べる (図 2.1, 図 2.2 参照)。

落射蛍光イメージングでは、レーザー光は焦点距離 50 mm のレンズ (DLB-30-50PM, シグマ光機) で集光されながら光攪拌機 (エヌアンドエヌ) に入射され、光攪拌機から出てきた光はもう

1枚の焦点距離 50 mm のレンズで平行光にされた後、投光管(12-PFAEVA-SP, Olympus)を經由して顕微鏡に入射され、ダイクロイックミラー (Q565LP, Chroma) により反射されサンプルを照射する。サンプルからの蛍光はダイクロイックミラーと蛍光フィルター (HQ610/75M, Chroma) を通過して、冷却 CCD カメラ (ORCA-ER, Hamamatsu Photonics)により検出される。像の取得には画像取得用のソフト (HCImage, Hamamatsu Photonics) を用いた。撮影条件を以下に示す。

露光時間	100 ms
ゲイン	200
オフセット	0
ビニング	2 × 2

スピニングディスク型共焦点イメージングでは、レーザー光は焦点距離 60 mm (DLB-30-60PM, シグマ光機)のレンズによって集光されながら光攪拌機に導入され光攪拌機から出る光はもう 1枚の焦点距離 60 mm のレンズによって平行光にされる。その後、焦点距離 200 mm のレンズ (DLB-30-200PM, シグマ光機)によって集光しながら共焦点スキャナーユニット (CSU21, 横河電機) に導入される。スキャナーのダイクロイックミラーは 532 nm レーザー用にセットし、スキャナーを通った励起光はサイドポートから顕微鏡筐体内に導入される。筐体内のターレットはダイクロイックミラーや蛍光フィルターが無い位置に設定し、励起光は対物レンズを通過してサンプルに照射される。サンプルからの蛍光はスキャナーを通った後、焦点距離 200 mm と焦点距離 250 mm(DLB-30-250PM, シグマ光機)のレンズで構成した 1.25 倍のリレーレンズに導入される。リレーレンズの直後に Cy3 用の蛍光フィルター (ET645/75m, Chroma) を置き、最終的に EM-CCD カメラ (C9100, Hamamatsu Photonics)で検出した。像の取得には付属のソフト (AQUACOSMOS, Hamamatsu Photonics)を用いた。撮影条件を以下に示す。

露光時間	100 ms
------	--------

EM ゲイン	170
オフセット	0
ビニング	1 × 1

局所退色の光学系では、レーザー光は逆向きに取り付けたビームエキスパンダー(LBED-3, シグマ光機)に導入されビーム径が狭められ、デジタルミラーデバイス(Digital Mirror Device, DMD)(DMD Discovery 1100, Texas Instruments)に照射される。DMD が反射したレーザー光は焦点距離 400 mm(DLB-30-400PM)のレンズを通過して顕微鏡のターレットに導入される。レンズは DMD の面が細胞面上で像を結ぶような配置である。ターレットはダイクロイックミラーと蛍光フィルター(XF92, OMEGA OPTICAL)を取り付けたキューブに設定し、レーザー光はダイクロイックミラーで反射されサンプルに照射される。サンプルからの蛍光は落射イメージングと同様に冷却 CCD カメラで検出するか、スピニングディスク型共焦点イメージング用の蛍光取得用光路に導入して EM-CCD カメラで検出した。

それぞれの光路は電動ミラーマウント(8892-K-M, Newport)によって切り替えを可能にした。なお細胞観察時には細胞が入ったガラスボトムディッシュを加熱し 37°C に保った。ヒーターとして顕微鏡用インキュベータ(MI-IBC, オリジナル)を使用した。

2.6.2 レーザースキャニング型共焦点顕微鏡

レーザースキャニング型共焦点蛍光イメージングには Leica 社の TCS SP8 を用いた。Cy3 の観察のために 552 nm レーザーを使用した。ダイクロイックミラーと蛍光フィルターはそれぞれ顕微鏡に内蔵されているものを使用した。画像取得は装置に付属のソフト(LAS-X) により行った。対物レンズには Leica 社の HCX PL APO CS2 60x/1.40 OIL を用いた。試料から出た蛍光はプリズムにより分光し、555-700 nm の蛍光を HyD 検出器(Standard モードもしくは Photon Counting

モード)にて検出した。撮影条件を以下に記す。

取得画像サイズ	512 × 512 pixel
スキャンスピード	400 Hz
ズームファクター	1.75
ピンホールサイズ	1 AU
ラインアベレージ	1
HyD のゲイン	200
レーザーパワー	5%

2.6.3 二波長分岐型スピニングディスク共焦点顕微鏡

倒立型顕微鏡 (Dmi8, Leica) に 60 倍対物レンズ(HC PL APO 63x/Oil CS2, Leica)を用い、スピニングディスク共焦点ユニット (CSU-X1, 横河電機)、イメージスプリッティングユニット (A12801-01, 浜松ホトニクス)、sCMOS カメラ (C13440-20CU, 浜松ホトニクス) をそれぞれ接続した。励起光はスピニングディスク共焦点ユニット付属の 551 nm (最大 100 mW)および 638 nm (最大 140 mW)のレーザーを用いた。励起光および試料からの蛍光は、スピニングディスク共焦点ユニット内のダイクロイックミラー (Di01-T405/488/568/647, Semrock) およびイメージスプリッティングユニット内のダイクロイックミラー(FF640-FDi01, Semrock) と蛍光フィルタ (FF01-690/70 および FF01-593-46, Semrock) で分光して sCMOS カメラに導入した。画像取得は μ Manager を用いて行い、最大出力の励起光での蛍光を、露光時間 100 ms で連続撮影した。

2.7 細胞の固定

以下の手順に従い、細胞を固定した。

1. プローブ導入後 30 分経過後の細胞から培地を吸引する。

2. PBS で洗淨する。
3. 1.5 mL の固定液を加え、37°Cで 30 分インキュベーションする。
4. 固定液を吸引し、PBS で洗淨する。
5. DMEM-HEPES 溶液を 2 mL 加え、観察用サンプルとする。

2.8 DMD の操作と照射領域の確認

DMD はコンピュータに接続し、付属の専用ソフトウェアで操作した。1024 × 768 pixel の白黒 2 値の BMP 画像を読み込ませることで DMD の各ミラーの制御を行った。FRAP データ取得の準備としては、以下の手順で行った。

1. すべてのピクセルが白の画像を読み込ませ、DMD の各ミラーが、レーザーを顕微鏡に導入する向きに設定する。
2. ND フィルターで 0.5%程度の強度にしたレーザーを、局所退色溶光路を介してプローブがインジェクションされた細胞に照射しイメージングを行い、照射領域の確認をする。
3. レーザーの DMD へのおおよその照射位置を目視で確認し、それに対応する領域が白の円形でそれ以外の領域が黒の BMP 画像を作成し DMD に読み込ませる。
4. 手順 2.と同じ操作を行い、設定した円形領域の細胞上での位置を確認する。
5. 手順 4.で得られた円形領域が手順 2.で得られた照射領域とずれている場合には BMP 画像の円形領域の修正を行い再度読み込ませる。

2.9 FRAP データの取得

以下の手順に従い、FRAP データを取得した。

1. まず、スピニングディスク共焦点の光路に設定し、シャッターを開いた後録画を開始する。
2. 2 秒以上の撮影後、電動ミラーとターレットを動かし、局所退色用光路に切り替える。

3. 局所退色用光路のシャッターを短時間開き、局所退色を行う。
4. 局所退色の後すぐにスピニングディスク共焦点用光路に戻す。
5. さらに 30 秒程度録画を継続し、撮影を終了する。
6. 取得した連続画像はマルチページ TIFF 形式に変換し、解析用とする。

2.10 FRAP データの解析

2.10.1 解析に利用したソフトウェア

解析に利用したソフトウェアは以下の通りである。カッコ内はバージョンを表す。

- ImageJ (2.0.0-rc-69/1.52p; Java 1.8.0_172)
- Jupyter 4.4.0 (Python 3.6.0)

また、Python の使用ライブラリは以下の通りである。

- matplotlib (1.4.3)
- Pandas (0.16.2)
- NumPy (1.9.2)
- SciPy (0.16.0)

2.10.2 退色領域の蛍光に関する情報の抽出と関数フィッティング

以下の手順に従い、取得した画像から輝度情報を抽出し、解析した。

1. ImageJ を開き、Analyze → Set measurements で Area, Mean gray value, Display label にのみチェックを入れる。
2. 解析対象のマルチページ TIFF ファイルを開く
3. ROI を次の順で ROI Manager に登録する。カッコ内は選択する ROI の形状である。
 - (1)退色領域[Oval]

(2)細胞全体（辺縁部の暗い領域は除く） [Freehand]

(3)細胞核の部位[Freehand]

(4)背景（細胞のそばの暗い部分） [Rectangular]

4. 登録した 4 つの ROI を選択し、ROI Manager の More » → Multi Measure を選択する。出てくるポップアップは Measure all *** slices (***)には TIFF ファイルに含まれる画像の枚数が入ると One row per slice にチェックを入れ OK を押す。
5. 表示された Results を csv 形式で保存する。画像ファイルと拡張子以前は同じ名称にしておく。
6. Jupyter 上の Python で得られたデータに対して関数フィッティングを実行（関数の詳細は 3 章で述べる）

2.10.3 結合率の算出

2 成分フィッティングを行い得られたフィッティング結果から、すべての蛍光回復のうち、拡散の遅い成分の寄与の割合を結合率として計算した。ただし、フィッティング結果が物理的に妥当でないと判断した場合、その結果は結合率算出に用いないことにした。使用しないデータの基準は以下の通り。

- フィッティングエラーがパラメータ推定値より大きいもの
- $C_r + C_{fast} + C_{slow} > 1.01$ のもの

2.11 ガラス基板に固定したプローブの輝度追跡

2.11.1 データの取得

以下の手順に従い、ガラス基板に固定したプローブの輝度を取得した。

1. 35 mm ガラスベースディッシュ（3971-035, IWAKI）のガラス部分に 3 mg/mL ビオチン化 BSA

5 μL を塗布し、室温で2分吸着させる。

2. PBS 1.5 mL により2回洗浄する。

3. Cy3 標識の 5 nM Fluc mRNA 標的プローブ 50 μL をガラスベースディッシュのガラス部分に乗せ、室温で2分吸着させる。

4. PBS 1.5 mL で2回洗浄する。

5. 観察用培地 2 mL を加え、二波長分岐型スピニングディスク共焦点顕微鏡で露光時間 100 ms で1000枚の連続撮影を行い、取得した画像を TIFF 形式で保存する。

2.11.2 データの解析

以下の手順に従い、プローブ退色に伴う輝度変化を求めた。

1. ImageJ で保存した画像を開き、観察された輝点に対し 4 pixel \times 4 pixel の正方形の ROI を設定する。

2. ROI 内の蛍光強度を 1000 枚分取得し、20 枚分の移動平均を計算する。

3. 移動平均した輝度に対し、n 枚目の輝度と n+20 枚目の輝度の差を求める。

4. 3.で求めた差が 50 以上の時、n-10 枚目の輝度と n+30 枚目の輝度の差を退色に伴う輝度変化として記録する。

2.12 輝点の追跡

二波長分岐型スピニングディスク共焦点顕微鏡で観察された輝点に対し、ImageJ のプラグインである TrackMate (v3.8.0) を用いて運動の軌跡を得た。パラメータの設定は以下の通り。

- Detector: DoG detector
- Estimated blob diameter: 1 μm
- Threshold: 0

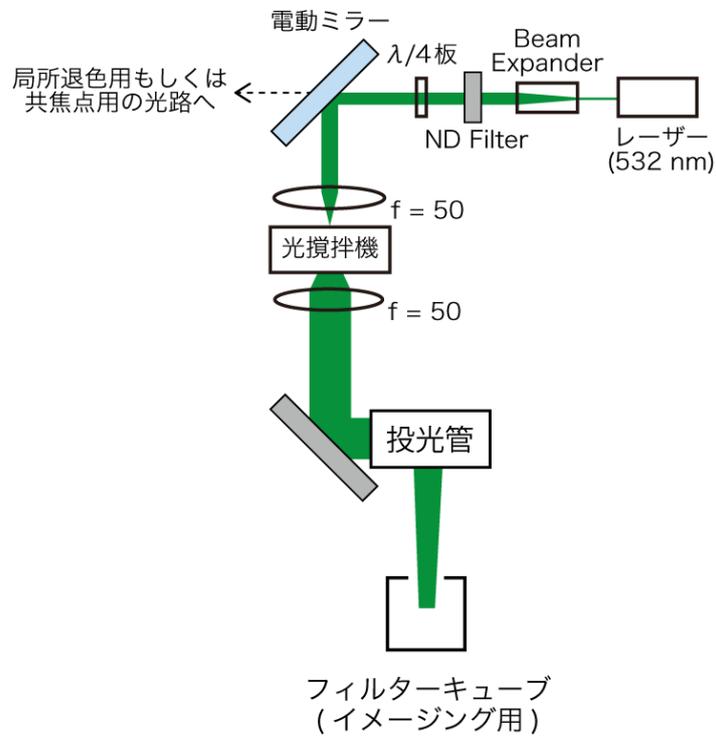


図 2.1 落射イメージング用の光路

f は焦点距離 (単位 mm) を表す。以下同様

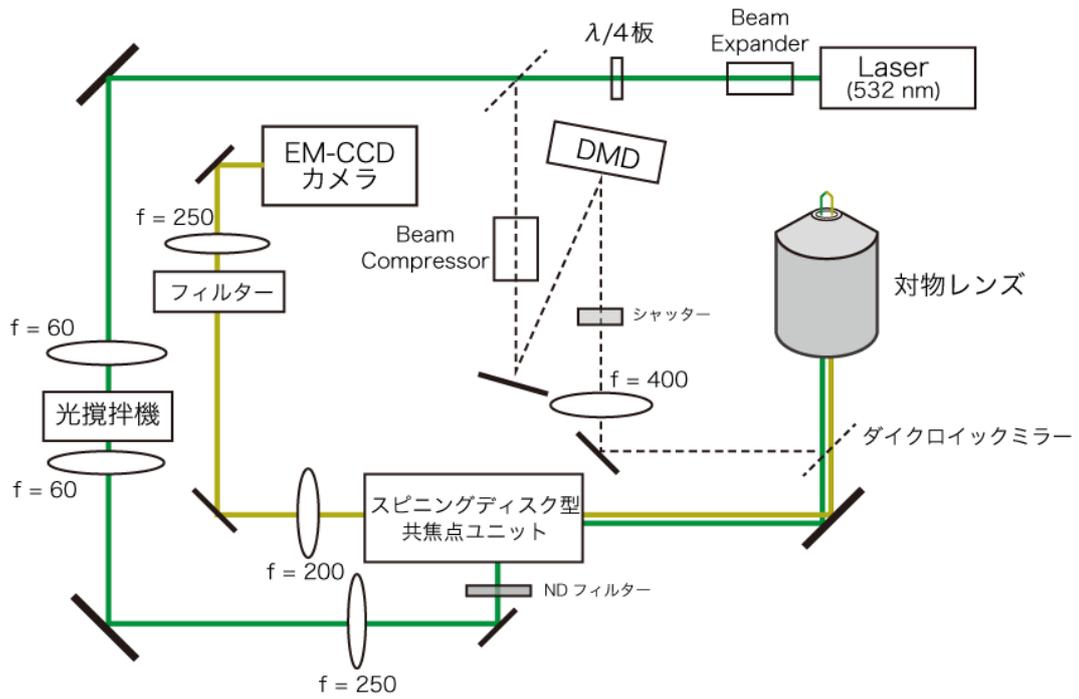


図 2.2 スピニングディスク型共焦点イメージング用の光路と局所退色用の光学系

第 3 章

FRAP による結合率定量のための実験系構築

3.1 概要

本章ではプローブの結合評価に用いる光退色後蛍光回復法 (Fluorescence Recovery After Photobleaching, FRAP) について、この手法を採用した理由と結合評価の方法、そして結合評価のために構築した光学系について述べる。具体的には FRAP に関する適切な理論モデルについての検討を行い、そのモデルが要請する条件を満たす光学系を構築した。

3.2 細胞内におけるアンチセンス核酸の結合評価法

細胞内は多種類の分子が存在し、mRNA には翻訳因子やリボソームなど他種・多数の分子との相互作用がある非平衡状態であるため、合成した mRNA とプローブを試験管内で結合させてそれを評価しても、その結果が細胞内で一致するとは言えない。したがって、最終的にプローブを細胞内で利用しようとする限り、プローブの細胞内での結合能を直接測定する必要があると考えた。そこで本研究では、プローブが mRNA と結合することで拡散が遅くなることに着目し、分子拡散の解析によって結合能を評価することにした。その詳細については次節で述べる。

なお、細胞内での分子の結合を検出するその他の手法として、結合形成に伴う蛍光の変化を検出するものがある。FRET の利用や、周囲の環境によって蛍光を変える分子の利用が挙げられる。アンチセンス核酸プローブと mRNA との結合を検出する場合、2 種のプローブを用いる方法や molecular beacon を用いる方法があるが、いずれも感度が低いという問題があることは 1 章で述べた通りである。周囲の環境に応答する分子としては例えばある種のインターカレーター型の色素の利用[20][21]があり、プローブの適当な塩基を色素に置換することで、結合状態でプローブの蛍光強度が高くなるため結合評価が可能になる。ただし、色素を鎖内に導入する必要がある手

間とコストがかかるほか、プローブが RNA と結合した時にの蛍光強度が配列によって変化するため、結合率の定量は困難である。この手法の利点は背景光が少ないことにあるため、結合率の高い配列の選択を他の手法で行い、組み合わせて利用するのが有効であると考えられる。

3.3 FRAP によるアンチセンス核酸の結合評価の原理

本研究ではプローブとして 20 塩基のアンチセンス核酸を用いるが、標的となる mRNA は数百～数千塩基程度でありプローブに比べはるかに巨大であることに加え、細胞内では多数のタンパク質と巨大複合体を形成するため、プローブが mRNA に結合すれば結合したプローブの拡散は著しく遅くなる (図 3.1A)。したがってプローブの拡散を解析することでプローブがどの程度 mRNA に結合しているかを見積もることが可能となると考えた。

細胞内での分子拡散の解析法として本研究では FRAP を利用することとした。FRAP は溶液中の蛍光分子の拡散を調べる手法である[22]。強力なレーザーを局所的に当てその領域内に存在する蛍光分子を退色させ、その直後からレーザーを弱めて退色領域における蛍光回復を追跡する。このとき、周囲の蛍光分子の拡散が速いほど退色領域への流入が多くなるため蛍光回復が早くなる (図 3.1B)。分子の拡散速度は一般に分子のサイズが大きいほど大きくなり、逆に分子のサイズが小さいほど拡散速度は小さくなる。そのため、ある蛍光分子が、他の分子と複合体を形成しているかどうかを FRAP の解析により明らかにできる。この手法をプローブと mRNA の結合解析に利用することにした。

なお、細胞内の分子拡散を調べる手法は他にも 1 分子追跡法や蛍光相関分光法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS) などがあるが、対象とする分子の拡散速度や濃度によって適切な手法は異なる。1 分子追跡法では 1 分子が追跡できる程度に濃度が薄い (~数 nM) 必要があり、追跡可能となる分子はある程度遅いもの ($D < 1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 程度) に限定される。FCS では直径 0.5 μm 程度の領域の蛍光を取得するため、局所的な mRNA 濃度や状態を大きく反映してしまう。さらに

測定可能な分子の濃度は 1 μM 程度が上限であり、発現量の多い mRNA に対しては適用困難である。FRAP では解析する領域を変えることで調べる対象とする範囲（核・細胞質・ストレス顆粒など）や拡散速度を変えることができ、適応可能な濃度領域が広い（数 nM～上限なし）という利点がある。そのため、対象となる RNA の範囲を広くすることができると考え、FRAP を採用した。

3.4 本研究における FRAP による結合評価法の戦略

前節で述べた蛍光回復測定からプローブの mRNA に対する結合率を求めるためには、分子の運動様式についての情報が必要である。分子が自由な拡散をしているのか、特定の方向性を持った運動をしているのか、あるいは他の分子と結合解離を繰り返しているのか、などといった条件で蛍光回復曲線が変化する。細胞内では不均一な構造が存在することや、一部の mRNA は能動輸送を受けるということから、プローブおよび mRNA は多様な運動様式を持っていると考えられるが、各分子のあらゆる状況をモデルに組み入れる事はできないため、次のような仮定を置くことにする。プローブは、(a) mRNA に結合せず早い拡散をしているか、(b) mRNA に結合し遅い拡散をしているか、(c) 非特異的な吸着などにより拡散をしていない、という 3 状態のみを取り、全体の蛍光回復はこの 3 状態にそれぞれ対応する成分の和で書けるというものである。この仮定に従うと、退色領域の蛍光回復の割合は

$$f(t) = C_{\text{fast}} f_{\text{fast}}(t) + C_{\text{slow}} f_{\text{slow}}(t) \quad (3.1)$$

と書くことができる。 $f(t)$ は時刻 t における退色前に対する蛍光回復の割合を、 C_{fast} と C_{slow} はそれぞれ早い拡散と遅い拡散による蛍光回復が全体の蛍光回復に対して寄与した割合を、 $f_{\text{fast}}(t)$ と $f_{\text{slow}}(t)$ はそれぞれ早い拡散と遅い拡散による蛍光回復について時刻 t における退色前に対する回復の割合を表す。なお、この式には (c) に対応する項が存在しないが、 $t \rightarrow \infty$ のとき拡散する成分はすべて回復するので $f_{\text{fast}}(t), f_{\text{slow}}(t) \rightarrow 1$ となること、および $f(t)$ の定義から、

$$C_{st} = 1 - C_{fast} - C_{slow} \quad (3.2)$$

上記 (3.2) 式の C_{st} がそれに対応する。

プローブの mRNA に対する結合能の評価値として結合率 (BR) を、

$$BR = \frac{C_{slow}}{C_{fast} + C_{slow}} \quad (3.3)$$

上記 (3.3) 式のように、蛍光回復した量のうち遅い成分の拡散が寄与する割合、と定義して、

以後のプローブの結合評価に用いた。

実験的には、退色時の条件に応じて $f_{fast}(t)$ と $f_{slow}(t)$ を決定し、蛍光回復のデータをフィッティングすることで各成分の割合を求め、プローブの結合率を算出することになる。詳細については次節以降に述べる。

3.5 用いる FRAP のモデルとその条件について

FRAP に一般解は存在しないため、数値計算によるシミュレーションを利用した解析[23]や実験結果に合致する経験則に基づく近似式を用いた解析[24]が行われている。本研究では、適当な条件を置くことで得られる解析的な解を利用した。複数の理論モデルの中から、本研究では Soumpasis によるモデル[25]を用いることとした。以下、モデルの詳細について述べる。モデルが要請する条件は次の2つである。

(a) 退色領域の形状が円形で、退色直後の蛍光強度は円形領域の内外でそれぞれ単独の値を取る。

言い換えれば、退色領域が半径 a の円形であるとき、退色中心から r だけ離れた場所の退色直後における蛍光強度 $I(r)$ は、

$$I(r) = \begin{cases} C_1 & r \leq a \\ C_2 & r > a \end{cases} \quad (3.4)$$

となる (ただし $C_1 < C_2$)。

(b) 退色領域の蛍光回復を観察するレーザーの強度が均一なものである。

この条件下で単一の自由拡散によって蛍光回復が起こる時、退色領域の最終的に回復する量に対し、退色直後を $t = 0$ として時刻 t における回復量の割合 $f(t)$ は、

$$f(t) = \exp\left(-\frac{2\tau}{t}\right) \left[I_0\left(\frac{2\tau}{t}\right) + I_1\left(\frac{2\tau}{t}\right) \right] \quad (3.5)$$

となる。すなわち、退色領域の退色後の各時刻における平均蛍光強度を $F(t)$ とすると、(3.4)を用いて

$$\begin{aligned} F(t) &= C_2 + (C_2 - C_1)f(t) \\ &= C_2 + (C_2 - C_1) \exp\left(-\frac{2\tau}{t}\right) \left[I_0\left(\frac{2\tau}{t}\right) + I_1\left(\frac{2\tau}{t}\right) \right] \end{aligned} \quad (3.6)$$

と書ける。 $t = 0$ は退色直後の時刻である。なお、 τ は拡散時間を表し、領域半径 a と分子の拡散係数 D について、

$$\tau = a^2/(4D) \quad (3.7)$$

の関係を持つ。ここで I_0 と I_1 は 0 次および 1 次の第一種変形ベッセル関数を表す。(3.5)式は τ の値によって、(3.1)式における $f_{\text{fast}}(t)$ および $f_{\text{slow}}(t)$ に対応する。

このモデルを利用することにした理由は、用いる実験系がこのモデルの想定する状況に近いと考えたからである。まず (a) については、Digital Micromirror Device (DMD) を用いた照射[26]により、照射領域内のみを効率的に照射でき、標的とした照射領域外を退色することがほとんどなくなり、退色領域内外で 2 値的な蛍光強度を取ると考えたからである (DMD による照射については次節で述べる)。ただし考慮しなければならないのは、拡散時間に対して退色に要する時間が十分短い必要があるということである。Soumpasis のモデルでは退色直後の蛍光量が退色領域の内外で 2 値的になっていることが要請されているが、実際には退色中に周囲の分子の拡散により蛍光回復が始まっているためそのような状況にはなり得ない。したがって退色時間が拡散時

間に比して短いことを確認し、近似して扱うことになる。確認のためには実際に FRAP データを取得し拡散時間を算出し、退色時間と比較を行う必要がある。そのため、系の構築後この確認を行い、拡散時間が退色時間より長いなどの問題があった場合には系に変更を加えることとした。

(b) については通常のイメージングに用いるように細胞全体にレーザーが照射されるようにすればほぼ問題がないため考慮しないこととした。

3.6 FRAP のための光学系の構築

3.6.1 DMD を用いた照射系の構築

DMD とはマイクロミラーの集合体であり、プロジェクター等に利用されている。本研究で用いた DMD Discovery 1100 (Texas Instruments) では、 1024×768 枚のマイクロミラーが $13.68 \mu\text{m}$ の間隔で並んでいる。DMD のそれぞれのミラーは独立して向きを変えることが可能であり、DMD の面が蛍光観察を行う焦点面で像を結ぶように DMD を設置すれば、細胞面上に任意のパターンで照射が可能となる。そこで、既存のイメージング用落射光学系に付け加える形で、DMD を用いた照射系を構築した (図 3.2)。サンプル表面で DMD の面が像を結ぶようにするため、焦点距離 400 mm のレンズ (DLB-30-400-PM, シグマ光機) を配置した。実際に像を設定し、カバーガラス内に封入したプローブを観察し、任意のパターンの照射が可能であることを確認した (図 3.3)。ここで像を円形にし、その領域を覆うようにレーザーを照射すれば細胞面上で円形の照射を行うことが可能となる。なお、DMD に入射する直前のミラーの位置と角度を調整しながらパワーメーター (AQ2150, 安藤電気) で反射光の強度を測定し、DMD 反射後のレーザー強度が高くなるようにした。また、対物レンズから出る光が鉛直方向に出るように DMD 反射後のレーザーが入射するミラーの角度を調整した。

フィッティングによるパラメータ推定の精度を高めるためには、前節で述べたように退色を短時間にし、照射中の蛍光回復を抑える必要がある。また、退色終了から細胞全体のイメージング

を開始するまでの時間を短くする必要がある。これは、退色直後に近い時刻であるほど蛍光回復速度が大きくなるため、この領域のデータが多いほど退色直後の環境をより精度良く推定できるためである。これらの点に留意し、光学系の変更を行った。具体的な内容について以下述べる。

まず、退色時間を短くするためには、退色領域におけるレーザー強度が高いことが必要である。レーザー強度が低いと短時間では十分な退色ができず、蛍光回復量が減少するため感度を下げerる要因となってしまう。通常のイメージングのために、レーザーの出射直後にビームエキスパンダーが置かれているが、このレーザー光が顕微鏡に導入されると比較的広い照射範囲となる。この状態で DMD を用いて局所的な退色を行うと大部分のレーザー光は顕微鏡に行かないことになる。そこで DMD による照射用光路に 3 倍のビームエキスパンダー (LBED-3, シグマ光機) を逆向きに配置し、ビームコンプレッサとして機能させた。ビーム径が $1/3$ になるため、ビーム強度はおよそ $3^2 = 9$ 倍になると考えられる。また、照射時間についてはシャッターのスイッチを 2 度短く押すことで 0.3 秒程度まで短くできたため、この条件でプローブの拡散時間を測定し、さらなる光学系の変更が必要かどうかを検討することとした。これについては 3.7 節で述べる。

3.6.2 固定細胞の退色による光学系の評価

前項までで構築した局所退色用およびイメージング用の光学系を用いて、3.5 節で述べた Soumpasis のモデルが要請するような局所退色が適切に実行できるかを確かめた。細胞にプローブを導入した後に化学固定を行い、露光時間 100 ms で蛍光像の連続撮影を行いながら、局所的退色を行った (図 3.5)。蛍光像の確認により、照射時間が 0.3 秒程度で退色を行えることを確認した。細胞イメージングに適した設定のまま退色中も撮影を続けたため退色時には退色領域より広い範囲で蛍光がカメラの検出上限を超えたが、退色終了後の細胞全体の蛍光像から、想定した退色領域のみを効率的に退色できていることが確認できた。

複数の細胞について同様に撮影を行い、照射領域と照射領域に隣接する領域で退色前後の蛍光強度変化を解析した(図 3.5)。照射領域とそれに隣接する領域および background として細胞の無い領域で Region of Interest (ROI)を設定し(図 3.5A)、照射領域と隣接する領域で平均蛍光強度から background を引いた値をそれぞれ退色前後について求め、退色前を 1 として規格し、退色後の値を比較した(図 3.5B)。その結果、照射領域は約 70%の蛍光が退色されている一方で、隣接する領域では平均で 95%以上の蛍光が残っており、照射領域のみを特異的に退色できていることを確認した。

退色の空間的特異性は確認できたが、退色後も退色領域の蛍光が 3 割程度残っていたため、退色が完了していない可能性を考えた。プローブが固定されていて照射領域の蛍光強度が照射領域内の蛍光分子のみに由来するならば、再び局所的照射を行えば残っていた蛍光の約 7 割が退色され、退色領域の蛍光は約 1 割程度になるはずである。逆にもし退色が完了しているとしたら、照射領域の蛍光が退色領域内の蛍光分子以外の影響を受けていることになり、繰り返し局所的照射を行っても退色領域内の蛍光は一定以下にはならないと考えた。以上の考察より、退色時間が十分であったかを検討するため、同じ領域への繰り返し照射を行った。しかし、複数回照射しても照射領域の蛍光強度は初回の照射時と比べほとんど低下せず、イメージング中の蛍光回復もほとんど見られなかった(図 3.5 C,D)。したがって、退色領域内の蛍光は退色領域内の蛍光分子以外の影響を受けており、実際には 1 回目の退色終了時には退色領域内に蛍光分子はほとんど残っていないことが考えられる。本研究では蛍光強度の解析によりプローブの結合率を求めようとしているため、このような影響は定量性を下げる要因となる。蛍光強度が高く測定されてしまう原因として、本実験で用いている落射顕微鏡法では焦点面以外からの蛍光も一定量検出されるため、ボケを持って広がった焦点面以外に存在する分子からの蛍光が退色領域に影響を与えていると考えた。そのため共焦点顕微鏡法を用いれば、焦点面以外の蛍光を抑えることができるため退色領域内の蛍光が低く検出され、実際の状態に近い像を得ることができ結合率測定の定量性がと期待

した。そこで、局所的退色させた固定細胞を共焦点顕微鏡法で観察し、退色領域の蛍光強度が実際に低く観察されるか確かめることにした。

3.6.3 顕微鏡法による退色領域の蛍光強度の比較

落射顕微鏡法では焦点面以外からの蛍光も一定量検出されるため、退色領域の蛍光回復の定量性が下がる可能性を考えた。そこで、プローブを導入した細胞を化学固定し、局所退色を行って作製したサンプルを、複数の顕微鏡法で観察し退色領域の蛍光強度について比較した。

まず、落射顕微鏡法とレーザースキャニング型共焦点顕微鏡法 (Leica SP8) の比較を行った。解析では、照射領域とそれに隣接する領域、そして背景光の領域を ROI として設定した。このとき、照射領域とそれに隣接する領域の ROI は、その部分の細胞の厚さが同程度となるよう設定した。この基準を設けた理由は、同じ細胞を観察しても共焦点顕微鏡法に比べ落射顕微鏡法では厚みのある領域で蛍光強度が高く観察されやすく、ROI の位置によって結果が変わるからである。

退色領域およびそれに隣接する領域の背景光を引いた蛍光強度平均の比を求め、この値を比較した(図 3.6)。その結果、共焦点顕微鏡法で観察した退色領域の蛍光は落射顕微鏡法で観察した時と比べて 1/5 程度であった。この際、共焦点顕微鏡の検出器 (HyD) は感度の高い Standard モードおよび定量性の高い Photon Counting モードを用いて実験をしたが、いずれのモードを用いても同様の結果が得られた。以上の結果と前項の結果をあわせ、落射顕微鏡法では退色領域内の蛍光の解析精度が落ちるため、共焦点顕微鏡法の方がふさわしいと判断した。そこで、照射系を組み込んだ顕微鏡に共焦点顕微鏡法を導入することにした。

3.6.4 局所退色用光学系と共焦点光学系の併用

局所的退色用光学系を組み込んだ顕微鏡で共焦点イメージングを併用可能にするため、スピニ

ングディスク型共焦点ユニット (CSU21, 横河電機) を導入し、スピニングディスク型共焦点顕微鏡法を利用した (図 3.7)。落射光学系と同様に、励起光は 2 枚のレンズ (DLB30-60-PM, シグマ光機) と光攪拌機で均一な平行光にした後、焦点距離 250 mm のレンズ (DLB30-250-PM, シグマ光機) で集光しながら共焦点ユニットに導入した。共焦点ユニットを通過した励起光は顕微鏡に導入されサンプルを励起する。サンプルの蛍光は共焦点ユニットを通過した後蛍光フィルター (645AF75, Omega Optical) で励起光を除き EM-CCD カメラ (C9100, 浜松ホトニクス) にて検出される。ここで配置の都合上、焦点距離 200 mm のレンズ (DLB30-200-PM, シグマ光機) と焦点距離 250 mm のレンズでリレーレンズを組み、適切に EM-CCD カメラで像を結ぶようにした。

前節までと同様、固定細胞の局所退色の後、細胞を落射光学系と共焦点光学系でそれぞれイメージングし、退色領域の蛍光強度について比較した。その結果、前節と同様、共焦点顕微鏡法を用いた方が退色領域内の蛍光強度が低く観察された (図 3.8)。この結果より、FRAP には落射顕微鏡法より共焦点顕微鏡法の方が適していると判断し、スピニングディスク型共焦点顕微鏡法を用いることとした。

3.6.5 退色領域の退色特性

前節で構築した光学系で局所退色とイメージングを行い、退色の空間的特性を解析した。その結果、退色領域の内外が明確に分かれていることが確認できた (図 3.8 および図 3.9)。退色中心からの距離が 20 ピクセル程度のところまでは退色後の蛍光は退色前に比して 1 割程度であるが、25 ピクセルより遠いところでは 9 割程度かそれ以上になっていることがわかる。1 ピクセルは約 0.21 μm に相当するため、退色領域の半径 4 μm 強の円形領域で、内外が明確でない領域は幅約 1 μm の円筒領域に相当することとなる。面積比で考えれば内外が明確で無い領域は退色領

域の 1/10 以下であり、この退色後の蛍光強度分布を(3.4)式のような箱型と近似しても結果に大きな影響は与えないと判断した。また、共焦点顕微鏡でもピントがずれた部分の影響が完全に無くなるわけではないため、実際には更に明確に退色領域内外が隔てられていると考えられる。半値幅が半径 21 ピクセル (= 4.47 μm) だったため、これを退色領域のサイズとして以後の解析に用いた。

なお、退色中の蛍光像を見ると、照射開始直後では照射領域が全体的に明るくなっているのに対し、その次の像では明るい部分はドーナツ状に観察された(図 3.10)。ドーナツ状の領域は照射領域の縁であり蛍光が弱くなっているということから、この像の時点で照射領域内の蛍光分子の大部分は退色されていると考えられる。露光時間 100 ms の連続撮影で像を取得しているため、0.1 秒未満の照射時間でも十分な退色が実現されている可能性がある。用いた光学系ではシャッター切り替えの都合上 0.3 秒程度未満の照射時間は困難であるが、電子制御可能なものに切り替えるなどすれば照射時間を短くできるため、プローブの拡散時間が照射時間より短い場合でもある程度改良の余地があると考えられる。

3.7 コントロールプローブを利用した実験系の評価

3.7.1 概要

構築した FRAP のための実験系を用いて実際に FRAP データを取得した。COS7 細胞内に存在しないホタルルシフェラーゼ (Fluc) mRNA を標的としたプローブと、mRNA の polyA 鎖を標的とし、細胞内に大量に標的が存在すると考えられる polyU プローブを用い、それぞれの結果を比較した。また、Fluc mRNA 標的のプローブを用いた結果ではフィッティングを行い、退色時間が拡散時間に比べ短いことを確認した。

3.7.2 標的 mRNA の量の差による蛍光回復速度の違い

Fluc mRNA 標的のプロープを用いた場合、退色領域の蛍光は数秒でほとんど回復を完了したが、polyU プロープを用いた場合は退色後 10 秒経過後も蛍光像において退色領域が明確に観察され、蛍光回復が遅いことが確認できた(図 3.12)。Fluc mRNA 標的プロープではプロープの自由な拡散による蛍光回復が起こった一方で、polyU プロープではプロープが mRNA と結合することで拡散が遅くなり、蛍光回復も Fluc mRNA 標的プロープと比べ遅くなったと考えられる。

3.7.3 Fluc mRNA 標的プロープを用いた FRAP データのフィッティング

ネガティブコントロールとしてホタルルシフェラーゼを標的とした配列を用い、FRAP データを取得し解析を行った。ただし、mRNA には結合しないと考えられるため、(3.1)式の拡散速度の遅い成分の項を取り除くとともに、局所照射後も未退色である分子による蛍光の寄与の項を加え、

$$F(t) = C_r + C_{\text{fast}} f_{\text{fast}}(t) \quad (3.8)$$

としてフィッティングを行った。フィッティングには 20 秒分(200 枚)のデータを用いた(表 3.1)。なお、このとき 2.10.3 項の条件に加え、前節の固定した細胞での検討から、 $C_r < 0.05$ となる結果も除外した。解析の結果、拡散時間の平均は 0.72 s であり、退色時間の約 0.3 s と比較すると短くはあるが十分短いとまでは言えず、退色中にもある程度蛍光回復が起こっていると考えられる。3.6.5 項で記述した通り、退色時間の 0.1 秒程度への短縮が期待できるものの、本研究の目的として正確な拡散時間を求めることでなく、速い成分と遅い成分の区別をつけてプロープ間での差を比較することであり、その目的にはかなうと判断したためシャッターの交換などによる退色時間の短縮は行わないこととした。

3.8 小括

DMD を利用した照射系とスピニングディスク型共焦点顕微鏡法を用いて、FRAP によるアンチセンス核酸プロープの mRNA に対する結合率を定量するための光学系を構築した。これを用い

てプローブをインジェクションした後固定した細胞を利用し、局所的退色が可能なことを確認した。また、mRNA に結合するプローブと結合しないプローブで退色後の蛍光回復が異なることを確認した。最後に mRNA に結合しないプローブの FRAP データに対し理論モデルに基づくフィッティングを行って拡散時間を算出し、これが退色時間より長いことを確認した。

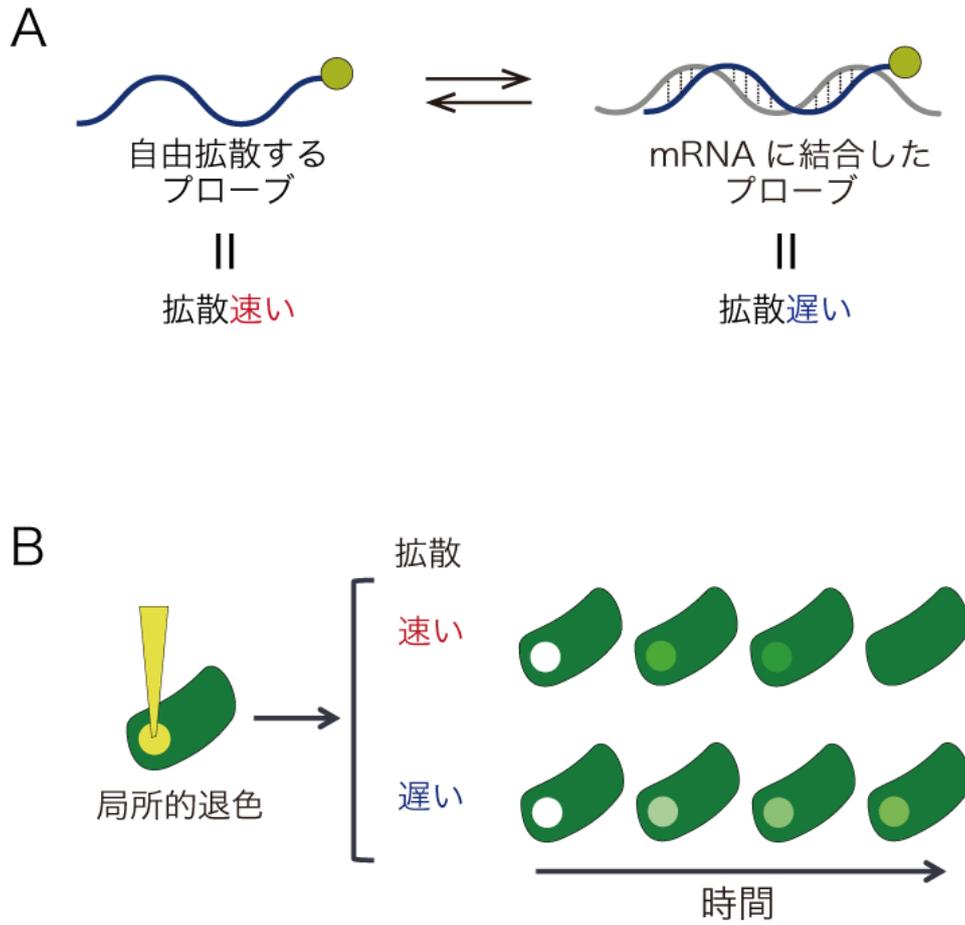


図 3.1 (A) プローブの状態による拡散速度の変化; (B) FRAP の原理

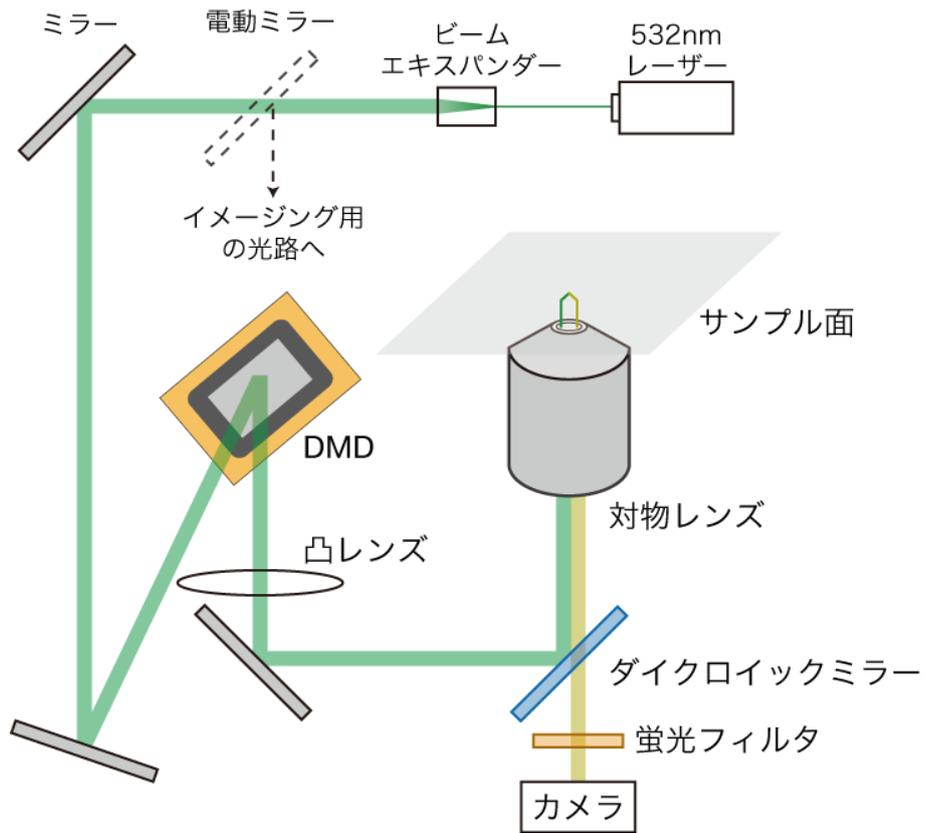
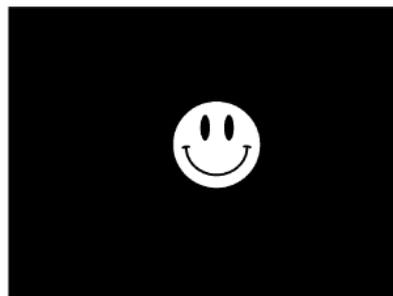
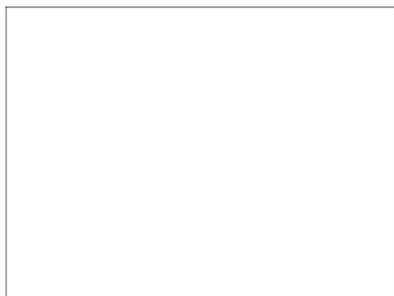


図 3.2 DMD を用いて構築した照射系の概要

DMD に
設定した像



取得した
蛍光像

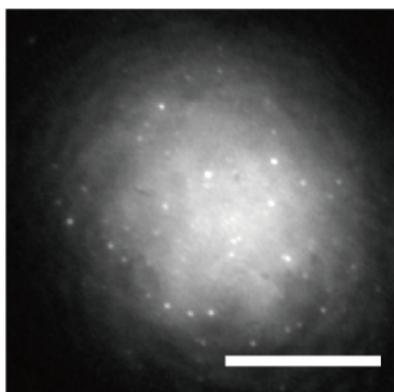


図 3.3 DMD に設定した像とサンプルの蛍光像の関係

(scale bar: 20 μm)

DMD に設定した像の白い部分はマイクロミラーが顕微鏡の方向を向いている領域を、黒い領域はマイクロミラーが顕微鏡とは異なる方向を向いている領域を表す。左列のようにすべてのミラーを顕微鏡に向けると、励起光がそのままサンプルに照射される。右列のように設定することで励起光の一部が顕微鏡に導入され、設定した像の形で照射できる。

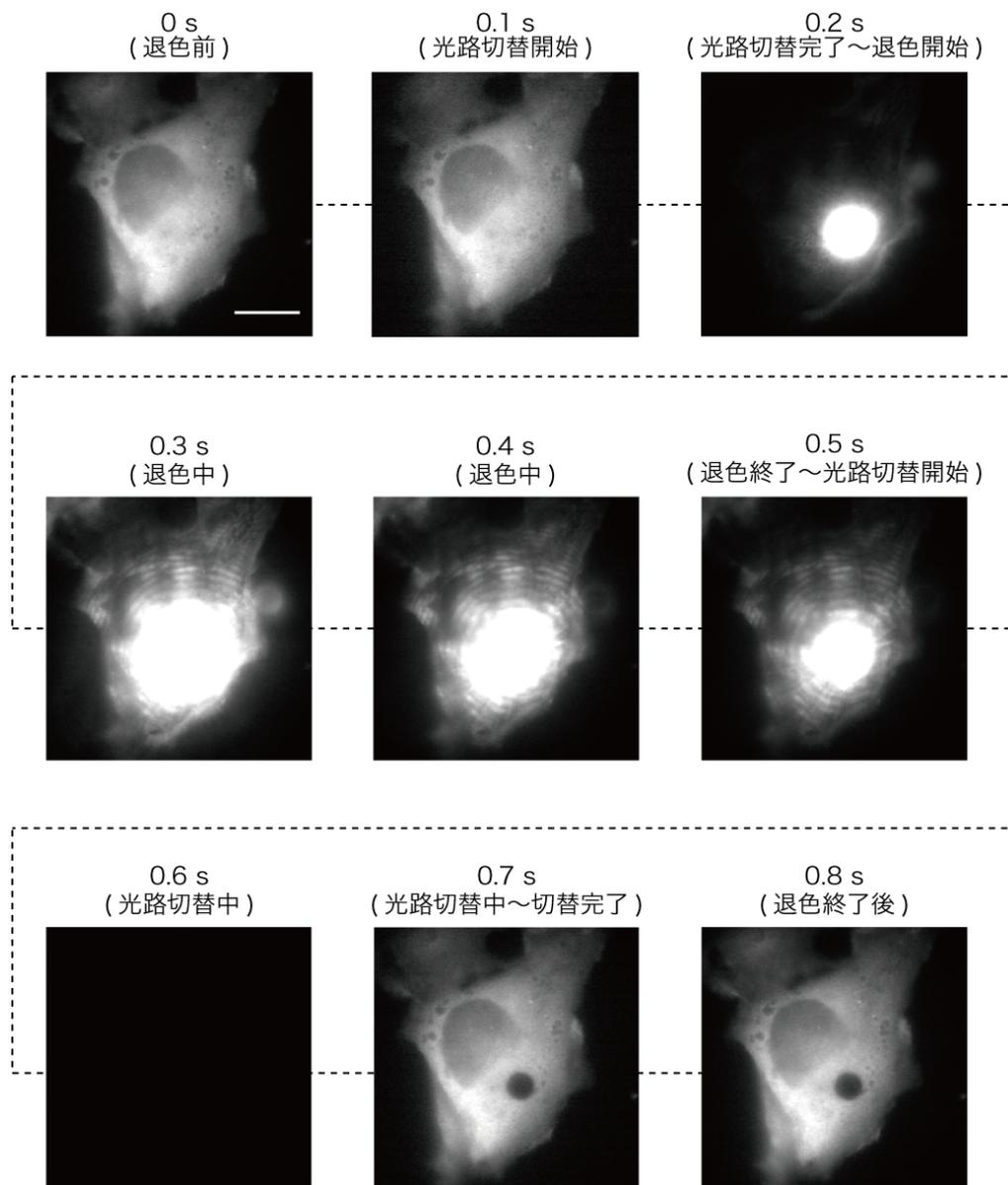


図 3.5 固定細胞の退色前後の蛍光像 (scale bar: 20 μm)

この図の場合、露光時間 100 ms の連続撮影であることと局所的照射中に相当する画像は 4 枚であることから、照射に要した時間 T は $0.2 < T \leq 0.4$ (s) であるとわかる。

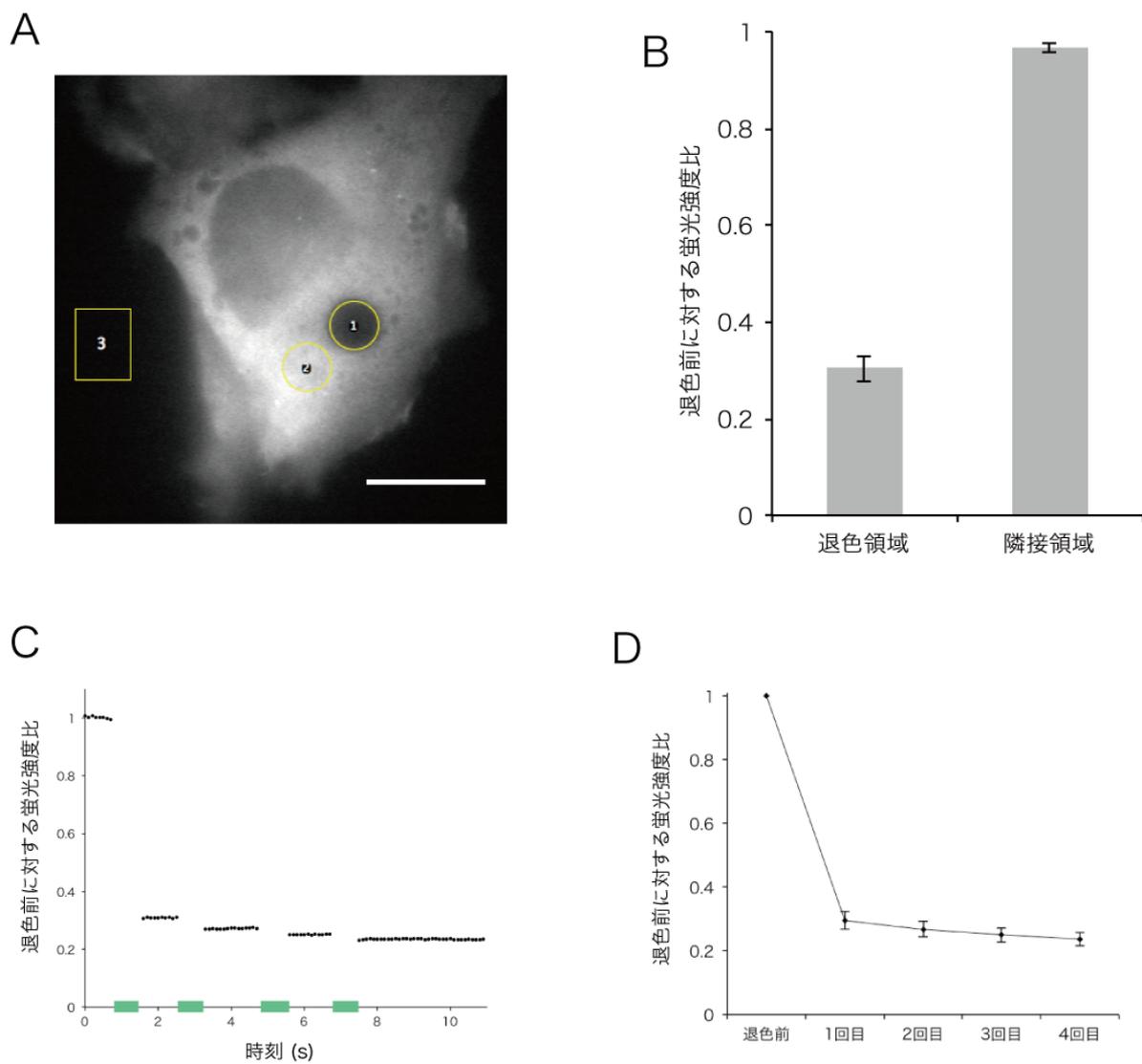


図 3.5 落射光学系での固定細胞の局所退色と解析

- (A) ROI の設定例 (1: 退色領域, 2: 隣接領域, 3: 背景)
- (B) 局所退色に伴う蛍光強度の変化 ($N=8$)
- (C) 繰り返し退色時の退色領域内蛍光強度の変化 (緑線は退色操作を行っている時間を表す)
- (D) 退色回数と退色領域内蛍光強度の関係 ($N=6$)

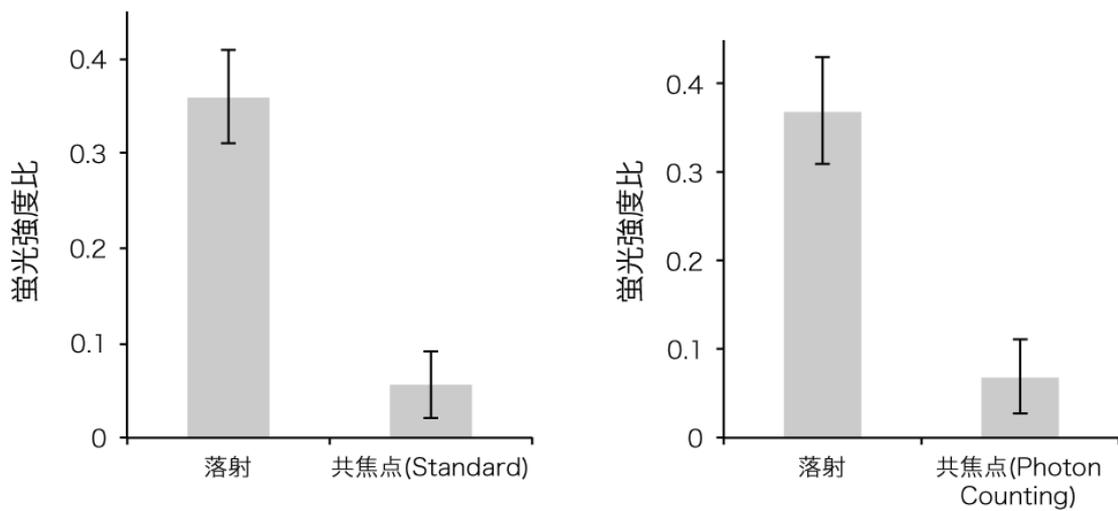


図 3.6 退色領域内の蛍光強度の顕微鏡法による違い

左 Standard モード ($N=10$); 右 Photon Counting モード ($N=6$)

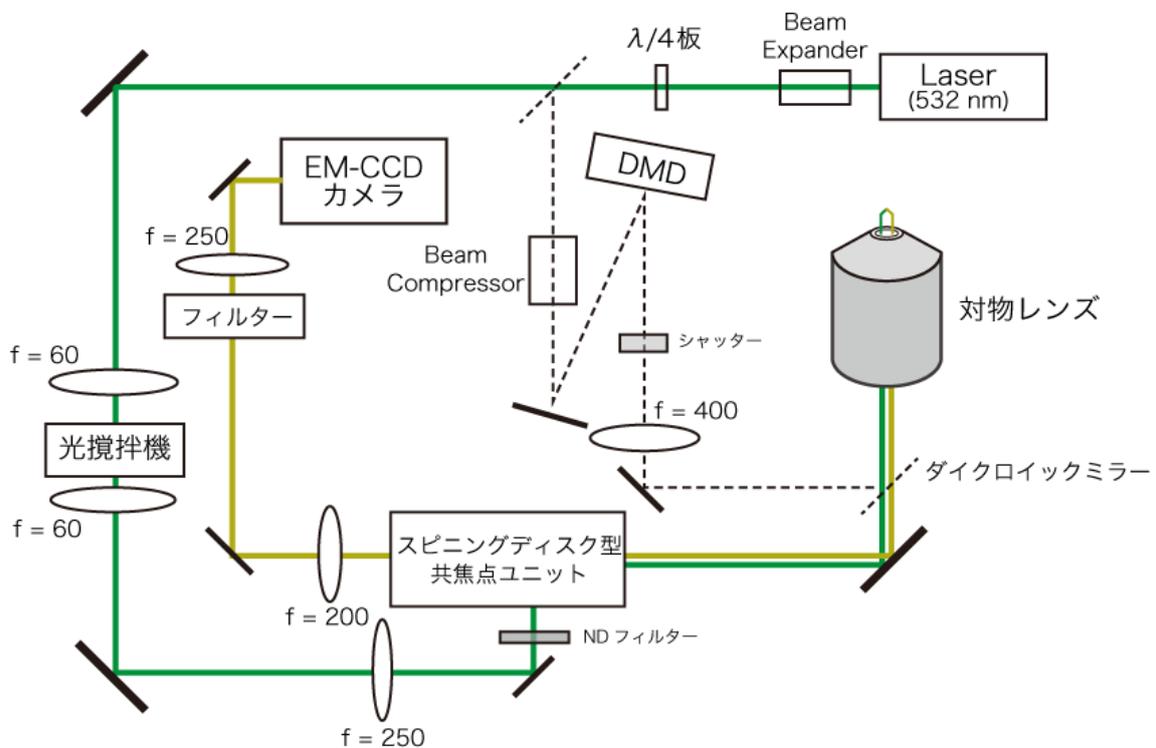


図 3.7 共焦点顕微鏡法を組み込んだ FRAP のための光学系の概要

図中の f はレンズの焦点距離を表す

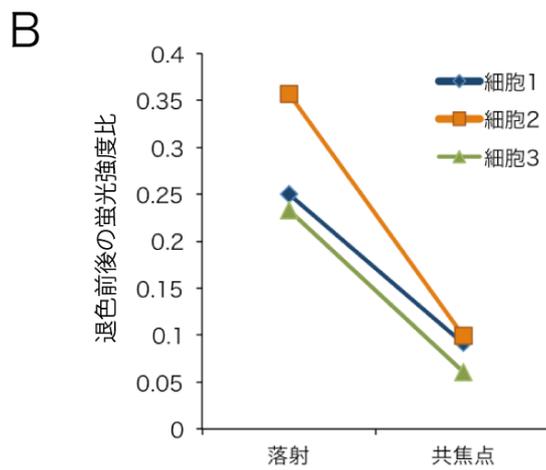
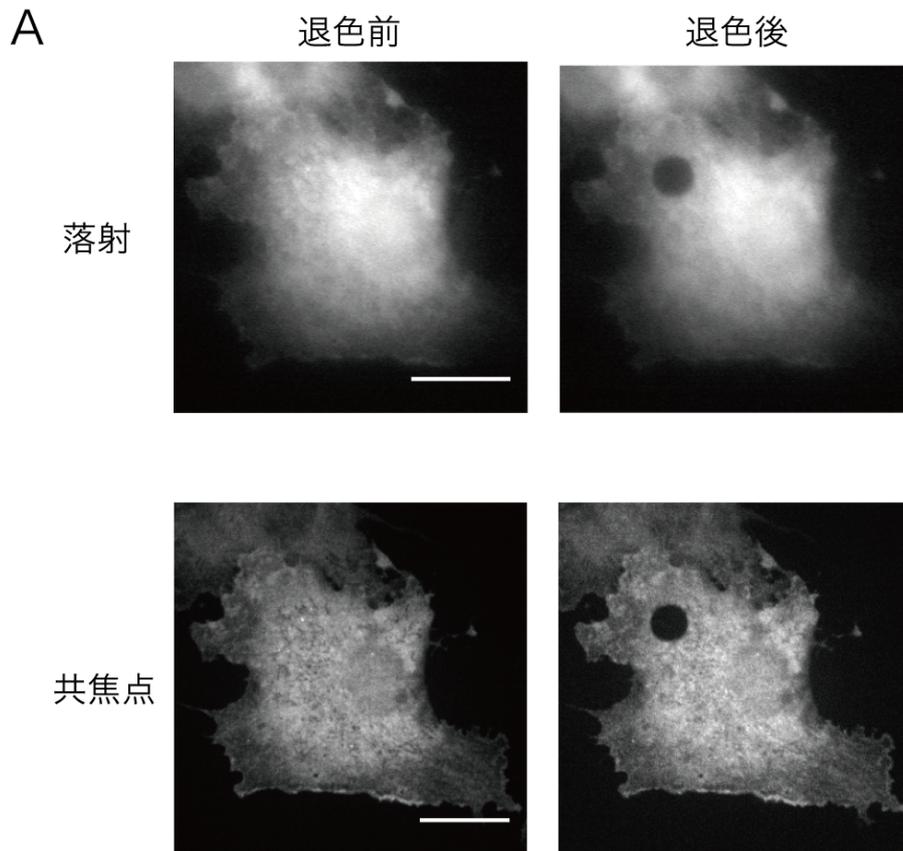


図 3.8 (A) 顕微鏡法による退色領域の像の違い (scale bar: 20 μm);

(B) 顕微鏡法による退色領域の蛍光強度の違い

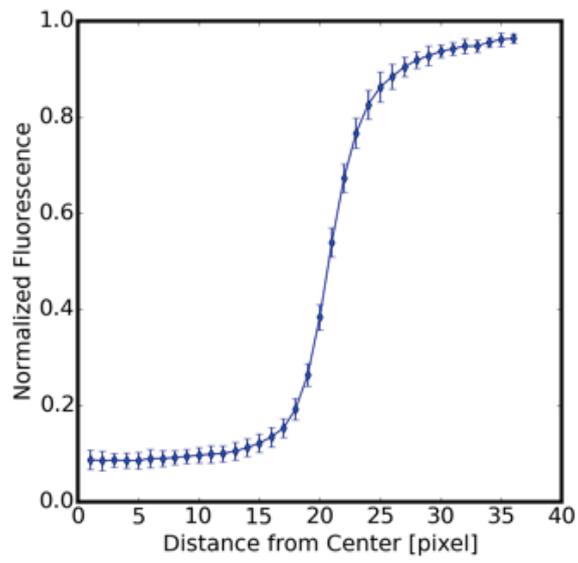


図 3.10 退色領域の空間的特性 (1 ピクセル = $0.21 \mu\text{m}$, $N=7$)

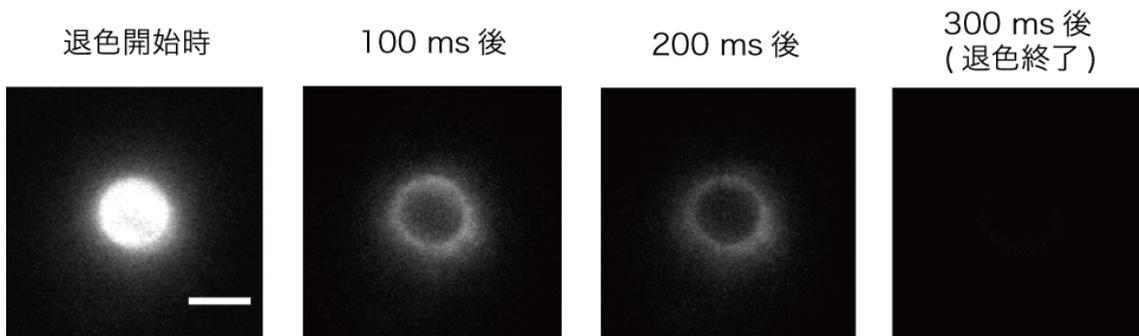


図 3.11 固定細胞の退色中の蛍光像

(露光時間 100 ms の連続撮影, scale bar: $10 \mu\text{m}$)

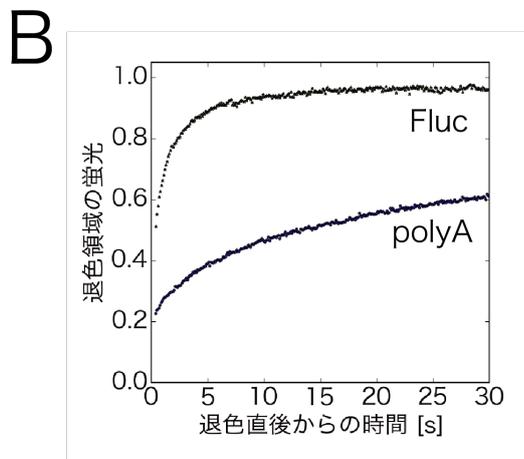
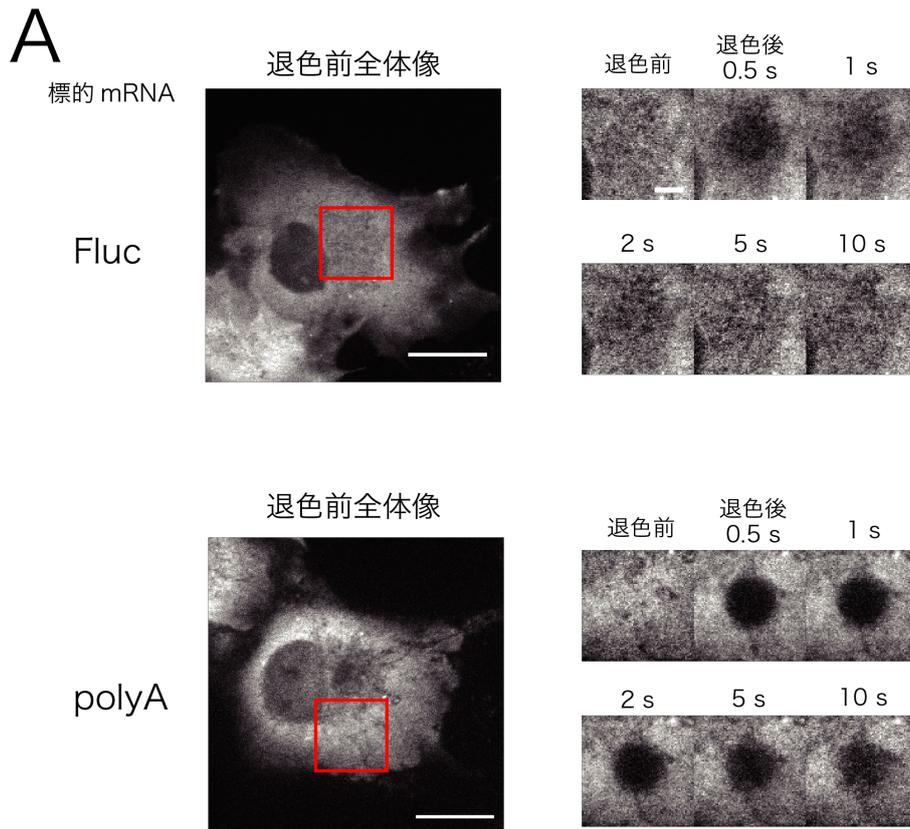


図 3.12 標的 RNA の違いによるプローブの蛍光回復パターンの違い

(A) 退色領域の比較 (左列赤枠の拡大図が右列の図)

(scale bar: 左列 20 μm , 右列 4 μm)

(B) 退色領域内の蛍光の時間変化

表 3.1 Fluc mRNA 標的プローブを用いた FRAP のフィッティング結果 ($N=30$)

C_r	C_{fast}	τ_{fast} (s)
0.21 ± 0.04	0.77 ± 0.05	0.72 ± 0.14

第 4 章

GAPDH mRNA に対するプローブの設計と結合評価

4.1 概要

本章では、第 3 章で構築した FRAP の実験系を用いて、Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA を標的とした複数のアンチセンス 2'-O-methyl RNA プローブの結合評価を行い、標的 mRNA と親和性の高いプローブ配列を選択することを目指した。この際、標的として選択した GAPDH mRNA のコーディング領域は 1008 塩基あり、20 塩基のプローブ配列は 989 種選択可能である。しかしこのすべてについて評価を行うためには費用・時間の両方の点で困難である。そこで、いくつかの特徴に基づいて配列の選択を行い、配列と親和性の関係について考察した。加えて、GAPDH mRNA で検討した配列選択の指針に基づいて、beta-actin (ACTB) mRNA に対するプローブの設計と評価も行った。

なお、本検討において GAPDH mRNA および ACTB mRNA を選択した理由は、両者がハウスキーピング遺伝子であり、細胞周期等によって発現量が影響を受けにくく、発現量が多いからである。そのため、プローブの親和性が高ければ比較的高い結合率が期待でき、プローブの配列と結合能の関係を考察しやすいと考え、両者を選択した。

4.2 プローブ配列の選択

4.2.1 プローブの自己相補性への着目

PCR 実験におけるプライマー設計では目安の一つとして、配列の自己相補性が考慮される。なぜならば、プライマーが分子内で自己相補結合を形成すると、標的と結合するためにはまずその結合を解離させなければならず、エンタルピー的に不利になるからである。これと同様に、アン

チセンス核酸プローブおよび mRNA が自己相補性を持ち、分子内で結合を形成して閉じた構造を取る場合も、両者が二重鎖を形成する上でエンタルピー的に不利となると考えた。そこでプローブおよび mRNA の二次構造予測によって分子内で形成される結合を予測し、プローブ配列の選択に利用することにした。この際、プローブの二次構造予測結果をより重視し、mRNA の二次構造予測結果は参考とした。その理由は、プローブが自己相補的であれば mRNA の標的部位も自己相補的となることや、翻訳される mRNA では翻訳因子の結合により環状構造を取っており[27][28]、二次構造予測の結果とは必ずしも一致しない構造を取っていると考えられたからである。他にも、リボソームによって翻訳が起こっている部位では分子内の結合が解消されている必要があるということも、二次構造予測の結果がそのまま細胞内の構造として存在している可能性は低いと考えた理由である。反対に、プローブは 20 塩基と短いため、予測された二次構造が存在する可能性は mRNA より高いと考えた。本検討ではプローブ配列中の自己相補配列の有無およびその長さを検討事項として用いた。

RNA の二次構造予測ソフトウェアである CentroidFold を用い、プローブの取る構造を予測し、その結果を用いてプローブ配列の選択を行った。

4.2.2 選択したプローブ配列の持つ特徴について

CentroidFold によって二次構造予測した結果について、A と U、G と C、G と U の 3 種のいずれかの結合が 2 塩基以上連続しているものを本稿では自己相補配列と定義した。可能な 989 種類の配列のうち自己相補配列が存在するものは 834 種類あり、割合にして 84.3% と大部分が自己相補的な配列を持っていた。そこで、自己相補的でない配列が高親和性を示すかを確認すると共に、自己相補的な配列を有していても高親和性となることがあるか、またあるとすればどのような配列かということについて、検討を行うことにした。

そこで、自己相補的でない配列の中から4種、自己相補配列を持つ配列から17種を選び、Cy3標識の2'-O-methyl RNAを調製し、3章で構築した実験系を用いてFRAP実験を行った。表4-1にプローブ配列を示しており、特定のプローブを指す際は以下標的配列(Target#)の番号で呼ぶ。FRAPの結果図4-1のように、標的配列によって蛍光回復に異なる結果が見られた。解析については次節で述べる。

4.3 FRAPによるプローブの結合評価

4.3.1 自由フィッティングにおける問題点と対策

フィッティングに用いる関数は(3.1)式および(3.5)式から得られる式に局所照射後も未退色である分子の寄与の項を加え、

$$f(t) = C_r + C_{\text{fast}} f_{\text{fast}}(t) + C_{\text{slow}} f_{\text{slow}}(t) \quad (4.1)$$

とした。ただし、

$$\begin{aligned} f_{\text{fast}}(t) &= \exp\left(-\frac{2\tau_{\text{fast}}}{t}\right) \left[I_0\left(\frac{2\tau_{\text{fast}}}{t}\right) + I_1\left(\frac{2\tau_{\text{fast}}}{t}\right) \right] \\ f_{\text{slow}}(t) &= \exp\left(-\frac{2\tau_{\text{slow}}}{t}\right) \left[I_0\left(\frac{2\tau_{\text{slow}}}{t}\right) + I_1\left(\frac{2\tau_{\text{slow}}}{t}\right) \right] \end{aligned} \quad (4.2)$$

である。フィッティングの対象となる変数は $\{C_r, C_{\text{fast}}, C_{\text{slow}}, \tau_{\text{fast}}, \tau_{\text{slow}}\}$ の5種となる。

この式に基づき、得られたFRAPデータに対してフィッティングを行ったが、蛍光回復の早い、すなわち結合率が低いと考えられるプローブの結果に対しては適切なフィッティングのできないデータが多く見られた(図4-2)。これは、 $C_{\text{slow}} \approx 0$ となることで $C_{\text{slow}} f_{\text{slow}}(t)$ の項の寄与が無くなってしまふことが原因となっていると考えた。言い換えれば、フィッティングされる変数が5つあり、さらに $f_{\text{fast}}(t), f_{\text{slow}}(t)$ が同じ形をしているため、 $C_{\text{slow}} f_{\text{slow}}(t)$ の寄与がほとんど無い場合には物理的に意味のない値に収束しやすくなるということである。この問題を解消するためには、拡散時間を何らかの形で固定するのが有効であると考えた。

そこでまず、3.7節で行ったネガティブコントロールである Fluc mRNA 標的プローブを用いた実験結果を利用した。本研究で結合評価の対象としたプローブはすべて 20 塩基で分子量も大きく変わらないため、すべてのプローブのフィッティングにおいて、 $\tau_{\text{fast}} = 0.72 \text{ s}$ (表 3-1) であるとして早い成分の拡散時間を固定した。次に、定性的に結合が良いと判断した標的配列が 208-227 (表 4.1) のプローブの結果について、早い成分の拡散時間を固定したフィッティングを行った (表 4.2)。フィッティングには Fluc mRNA 標的プローブより 100 枚多い 300 枚 (30 秒) 分のデータを使用し、遅い成分の拡散がより適切にフィッティングできるようにした。これで得られた、遅い成分 (mRNA と結合したプローブ) の拡散時間を利用し、早い成分の場合と同様にしてすべてのプローブのフィッティングにおいて、 $\tau_{\text{slow}} = 12.0 \text{ s}$ として遅い成分の拡散時間も固定することとした。以上のように、拡散時間を早い成分・遅い成分ともに特定の値で固定することで、結合率が低いデータの結果でも信頼性が高く物理的に意味のあると考えられるフィッティング結果が得られるようにした。

4.3.2 設計したプローブの結合評価

前項で述べたように拡散時間を固定して (4.1) 式により FRAP データのフィッティングを行った。フィッティングには 200 枚 (20 秒) 分のデータを使用した。結果を表 4-3, 図 4-2 に示す。

結合率は配列によって大きく異なっていた。コントロールとして用いた逆配列のプローブ 2 種は低い結合率を示し、特にプローブ 208-227 では逆配列との顕著な差が見られた。さらに、図 4-4 に示すように、プローブの CG 含有割合と結合率に明確な関係は見られなかった。そのため、2'-O-methyl RNA の物性や塩基の構成割合が拡散速度の違いを生むわけではないと考えられる。これは結合率とプローブの配列特異性があることを示唆するものである。また、図 4-5 は結合率の高い配列から順に並べたものである。選択した配列のうち最も高い結合率を示したのは自己相

補配列を有しないプローブであったが、その他 3 種の自己相補配列を有しないプローブは他のプローブと比較して同等以下、もしくは細胞内に標的が存在しないコントロールプローブと同等の結合率を示した。その一方で高い結合率を示したプローブにも、自己相補配列を含むものが見られた。これらの結果は、プローブが開いた構造を取ることが、必ずしも高い結合率と結びつかないことを示すものである。プローブの配列と親和性の関係については後に考察する。

4.4 ACTB mRNA 用プローブ設計への応用

前節では GAPDH mRNA 用プローブの結合評価を行ったが、他の mRNA に対しても設計評価を行うことにした。標的として ACTB mRNA を選び、プローブ候補となる配列および mRNA の二次構造を CentroidFold により予測させ、自己相補的な配列から 5 種類、自己相補的でない配列から 3 種類選び (表 4-4)、各プローブについて FRAP データを取得した。その結果、GAPDH mRNA の場合と同様プローブによって蛍光回復に差が見られた。4.2.2 項と同様に (4.1) 式に基づき 418-437 および 619-638 に対して $\tau_{\text{fast}} = 0.72 \text{ s}$ として早い成分の拡散時間を固定したフィッティングを行った(表 4-5)。この結果を利用し、遅い成分の拡散時間の平均値である $\tau_{\text{slow}} = 14.9 \text{ s}$ を固定し、4.2.3 項同様すべてのプローブの結果を再度フィッティングして結合率を算出した(図 4-6)。ACTB mRNA の量が GAPDH mRNA とどの程度異なるかが不明であるため結合率を単純に比較することが出来ないが、結合率としては GAPDH mRNA に対する高結合能プローブと同程度の結合率を有するプローブが得られた。さらに、GAPDH mRNA の結果と同様で、自己相補的でない配列の結合率が高くなるわけではなく、実際に評価した 8 種の配列のうち、結合率平均上位 2 種は自己相補的、最下位は自己相補的ではない配列であった。

4.5 考察

4.5.1 自己相補性が必ずしもプローブと mRNA の親和性を下げない理由について

自己相補的でないプローブが高い親和性を示さないものが見られた一方で、自己相補的であっても高い親和性を示すものが見られた。これは 4.2.1 で述べたように、エンタルピーの点からは考えにくい現象であり、PCR 法のプライマー設計で得られている知見とは異なる部分があるように思われる。

本研究と PCR 法を比較すると、PCR 法のアニーリングでは、プライマーの T_m 値にもよるが、目的の 1 本鎖 DNA とプライマーを 60°C 程度で結合させる。これに比べ、RNA と 2'-O-Me RNA との結合は DNA 同士の結合より強く、さらに実験は 37°C という一般的な PCR に用いる条件と比べて低い温度で行っていることや、標的 mRNA がゲノム DNA のような二重鎖を形成していないといったことを考慮すると、本実験で用いたプローブと mRNA で結合は形成されやすいと考えられ、自己相補的でなければ親和性は高くなるものと考えられる。しかし、4.2 節の結果で、標的 mRNA の分子内水素結合が少ないと予想される領域を標的としたプローブであっても結合率が低いものも多く見られた。このことは細胞内の環境が *in vitro* と異なることが原因と考えられる。例えば、*in vitro* に比して細胞内では遥かに多種の分子が存在しているため、標的 mRNA に何らかの分子が結合することにより、プローブが結合する余地がなくなっているという事が考えられる。しかし、翻訳を受ける mRNA において、コーディング領域の特定の部分が何らかの分子によって常に塞がれているという事は考えにくく、この可能性は低いと言える。

考えられる他の要因として、細胞内の物理化学的性質がある。細胞内に特有の物理的環境がプローブと mRNA の結合形成に影響を与えた可能性を考えた。細胞内は人為的に作成するとゲル化する程の濃厚なタンパク質濃度[29][30]を有しており、分子混雑の影響がある。しかし、細胞内は流動性があり、タンパク質合成などが盛んに行われている。このような多数の化学反応が不均一に存在する非平衡な環境下は、*in vitro* の平衡状態を想定した場合とは大きく異なる可能性

があると考えた。例えば、局所的に多数の分子による発熱反応があれば、その反応によって生じたエネルギーをプローブが受け取ることで、プローブの振る舞いが一時的に *in vitro* とは大きく異なるものになることが考えられる。具体的には、プローブの振動が増えたり、自己相補配列を持つ場合では分子内結合が解消されたりすることが考えられる。このような環境があれば、自己相補的な配列が必ずしも mRNA との親和性を下げる要因とはならないことが考えられる。

他にも、プローブが自己相補的配列により閉じた構造を取っている状態が mRNA との結合形成において著しく不利にならないと考えられる理由として、kissing loop と呼ばれる構造の形成がある。kissing loop は、2つの自己相補配列に挟まれた塩基対を形成していない配列（ループ配列）の塩基が相補的に結合することで形成される構造である[31]。配列が自己相補配列により閉じた構造を取ることで、ループ配列同士が結合する際のエントロピー損失が小さくなるため、部分的な結合形成は自己相補配列がない場合よりも有利に進行する[32] (図 4-7)。この現象の細胞内環境での寄与の程度は明らかではないが、先に述べた細胞内環境の不均一性と同様、自己相補配列を有することが必ずしも mRNA との親和性を下げる要因とならないことが考えられる。

4.5.2 本手法の応用可能性について

FRAP を用いた本手法は、生細胞内でプローブの親和性を評価する手法のため、*in vitro* と細胞内で mRNA とアンチセンス核酸の親和性が一致しないという問題が無い点で有利と考えられる。ただし、FRAP を用いた結合評価には標的 mRNA が多いことが必要であり、標的 mRNA の個数が少ないと本手法は適さない。そのため、細胞内で結合を評価する他の手法が無い限り、発現量の少ない mRNA に対するプローブ設計は困難と考えられる。

本検討ではプローブの調製および FRAP データの取得・解析の点から網羅的解析は行わなかった。もし、網羅的解析を行い解析することが可能になれば、親和性が高くなる配列の特徴を見出

すことが可能になると考えられる。これにより、発現量の低い mRNA に対するプローブにも適用可能な、プローブ配列の選択指針を作成することができると考えられる。この際、発現量の低い mRNA に対しては FRAP 法を用いた結合率の形での親和性の評価は困難だが、細胞に導入して観察される輝点の比較による評価が可能になると考えられる。

表 4-1 使用した GAPDH mRNA 標的プローブの一覧

標的位置	ターゲット配列	プローブ配列
40 - 59	AUUGGGCGCCUGGUCACCAG	CUGGUGACCAGGCGCCCAAU
60 - 79	GGCUGCUUUUAAACUCUGGUA	UACCAGAGUUAAAAGCAGCC
96 - 115	CCAUCA AUGACCCCUUCAU	AAUGAAGGGGUC AUUGAUGG
129 - 148	GGUUUACAUGUUC CAGUAUG	CAUACUGGAACAUGUAAACC
208 - 227	AAUGGAAGCCCAUCACCAU	AUGGUGAUGGGGCUUCCA UU
228 - 247	CUUCCAGGAGCGAGA UCCCU	AGGGAUCUCGCUC CUGGAAG
253 - 272	AUCAAGUGGGGCGAUGCUGG	CCAGCAUCGCCCCACUUGAU
282 - 301	CGUCGUGGAGUCCACUGGCG	CGCCAGUGGACUCCACGACG
364 - 383	UCUGCCCCUCUGCUGACGC	GCGUCAGCAGAGGGGGCAGA
388 - 407	AUGUUCGUCAUGGGUGUGAA	UUCACACCCAUGACGAACAU
408 - 427	CCAUGAGAAGUAUGACAACA	UGUUGUCAUACUUCUCAUGG
491 - 510	UCCAUGACAACUUUGGUAUC	GAUACCAAAGUUGUCAUGGA
493 - 512	CAUGACAACUUUGGUAUCGU	ACGAUACCAAAGUUGUCAUG
548 - 567	CCACCCAGAAGACUGUGGAU	AUCCACAGUCUUCUGGGUGG
571 - 590	CCCUCCGGGAAACUGUGGCG	CGCCACAGUUUCCCGGAGGG
611 - 630	AGAACAUCAUCCCUGCCUCU	AGAGGCAGGGAUGAUGUUCU
661 - 680	AUCCCUGAGCUGAACGGGAA	UUCCCGUUCAGCUCAGGGAU
664 - 683	CCUGAGCUGAACGGGAAGCU	AGCUUCCCGUUCAGCUCAGG
703 - 722	GUCCCCACUGCCAACGUGUC	GACACGUUGGCAGUGGGGAC
766 - 785	GAUGACAUCAAGAAGGUAGU	ACUACCUUCUUGAUGUCAUC
819 - 838	CCUGGGCUACACUGAGCACC	GGUGCUCAGUGUAGCCCAGG
865 - 884	GACACCCACUCUCCACCUU	AAGGUGGAAGAGUGGGUGUC
925 - 944	AAGCUCAUUUCCUGGUAUGA	UCAUACCAGGAAAUGAGCUU

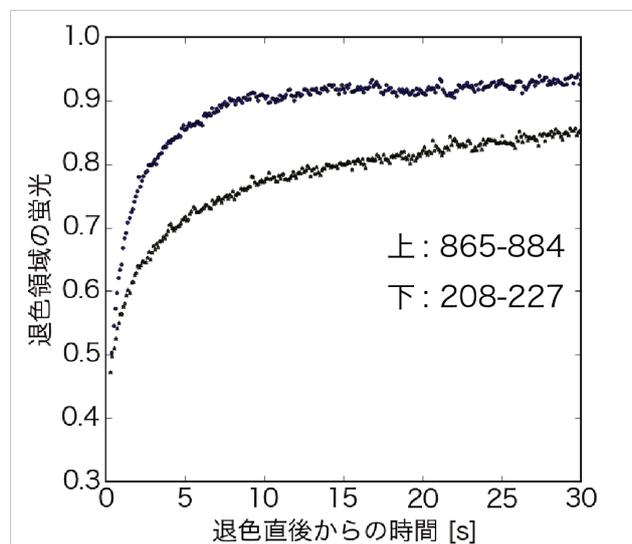
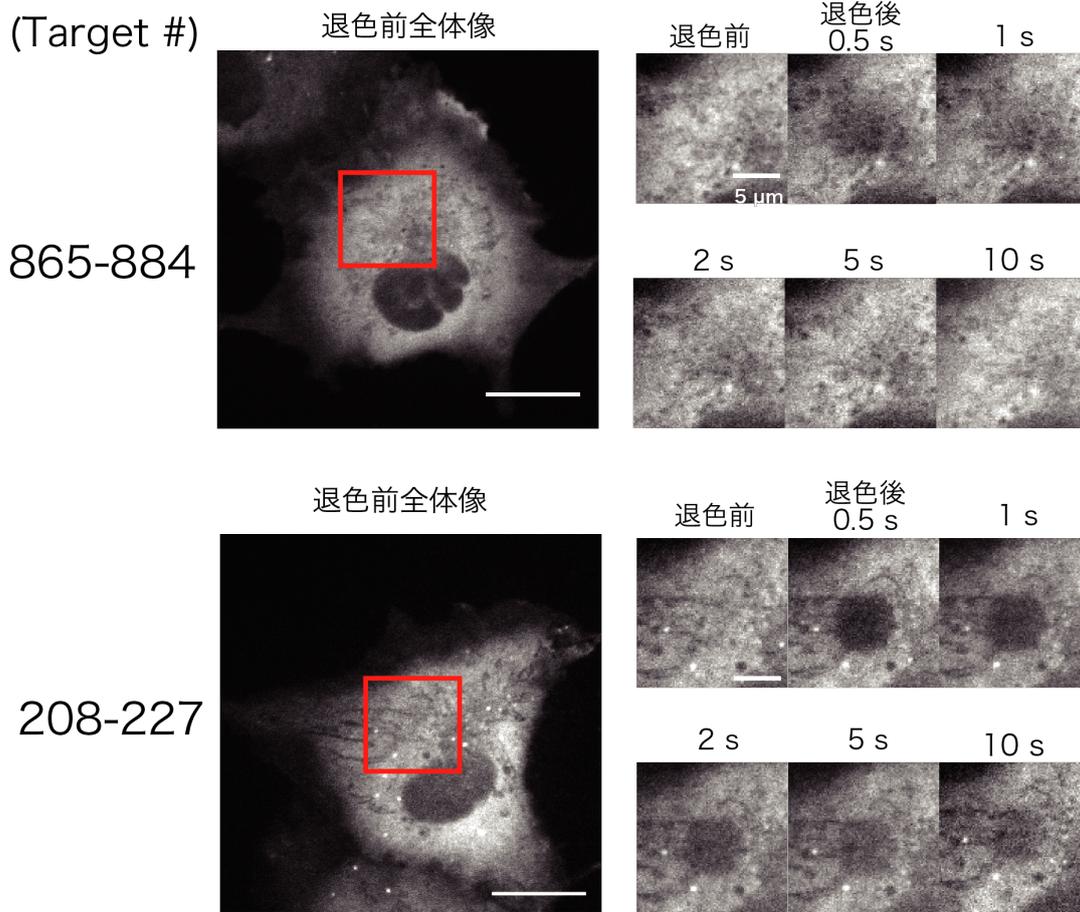


図 4-1 プローブによる蛍光回復パターンの違い

左列 (scale bars: 20 μ m) の赤枠の領域の時間変化が右列(scale bars: 5 μ m)である。プロットはそれぞれの解析結果を表す。

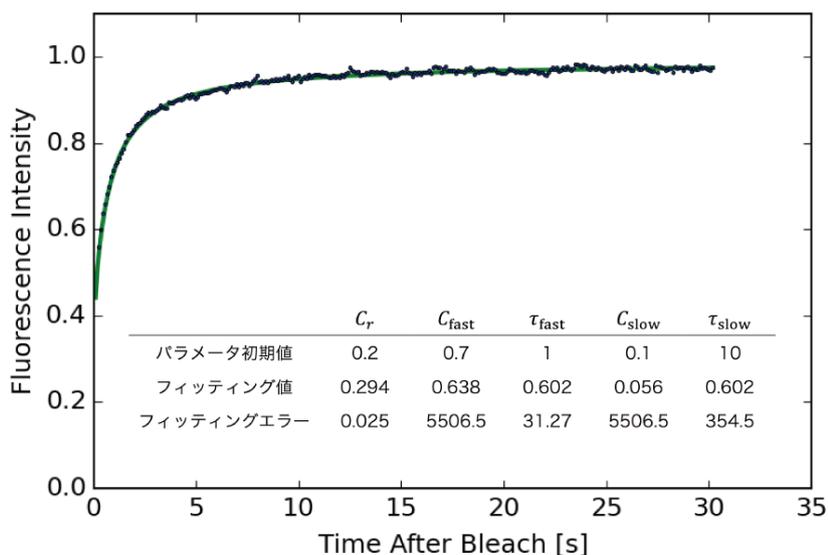


図 4-2 蛍光回復の早いプローブの FRAP データ解析例

この例ではプローブは 865-884 を使い、30 秒分 (300 枚) の FRAP データに対しフィッティングを行った。一見するとフィッティングが適切に行われたように思われるが、 $\tau_{fast} = \tau_{slow}$ となっており成分分離ができておらず、フィッティングエラーもフィッティング値に対して極めて高い値となっている。

表 4-2. $\tau_{fast} = 0.72$ (s) で固定したプローブ 208-227 のフィッティング結果

C_r	C_{fast}	C_{slow}	τ_{slow} (s)
0.188 ± 0.022	0.482 ± 0.042	0.223 ± 0.048	11.97 ± 5.85

表 4-3.GADPH mRNA 標的プローブの FRAP データ解析結果

($\tau_{fast} = 0.72 s$, $\tau_{slow} = 12.0 s$ で固定)

Target #	C_r	C_{fast}	C_{slow}
40 - 59	0.146 ± 0.055	0.739 ± 0.093	0.103 ± 0.057
60 - 79	0.068 ± 0.029	0.791 ± 0.037	0.124 ± 0.043
96 - 115	0.089 ± 0.043	0.814 ± 0.070	0.068 ± 0.046
129 - 148	0.063 ± 0.026	0.520 ± 0.095	0.360 ± 0.107
208 - 227	0.193 ± 0.026	0.490 ± 0.056	0.222 ± 0.058
228 - 247	0.220 ± 0.060	0.630 ± 0.068	0.104 ± 0.045
253 - 272	0.118 ± 0.047	0.406 ± 0.116	0.401 ± 0.094
282 - 301	0.173 ± 0.058	0.748 ± 0.058	0.048 ± 0.045
364 - 383	0.189 ± 0.065	0.672 ± 0.088	0.088 ± 0.074
388 - 407	0.054 ± 0.031	0.690 ± 0.093	0.241 ± 0.101
408 - 427	0.242 ± 0.061	0.635 ± 0.057	0.099 ± 0.064
491 - 510	0.079 ± 0.044	0.753 ± 0.101	0.149 ± 0.089
493 - 512	0.130 ± 0.032	0.720 ± 0.045	0.129 ± 0.063
548 - 567	0.177 ± 0.046	0.543 ± 0.068	0.213 ± 0.064
571 - 590	0.140 ± 0.032	0.487 ± 0.066	0.294 ± 0.072
611 - 630	0.221 ± 0.024	0.686 ± 0.062	0.061 ± 0.057
661 - 680	0.161 ± 0.049	0.765 ± 0.075	0.060 ± 0.079
664 - 683	0.104 ± 0.042	0.497 ± 0.092	0.327 ± 0.109
703 - 722	0.161 ± 0.067	0.651 ± 0.095	0.133 ± 0.085
766 - 785	0.135 ± 0.053	0.653 ± 0.043	0.184 ± 0.055
819 - 838	0.241 ± 0.063	0.709 ± 0.064	0.031 ± 0.042
868 - 887	0.247 ± 0.051	0.711 ± 0.082	0.025 ± 0.041
925 - 944	0.132 ± 0.051	0.549 ± 0.079	0.229 ± 0.070
(Control #1)	0.236 ± 0.063	0.732 ± 0.062	0.018 ± 0.025
(Control #2)	0.213 ± 0.061	0.717 ± 0.062	0.055 ± 0.054
(Control #3)	0.237 ± 0.071	0.729 ± 0.052	0.018 ± 0.037

(Control #1, Fluc mRNA 標的; Control #2, 868-887 の逆配列; Control #3, 208-227 の逆配列)

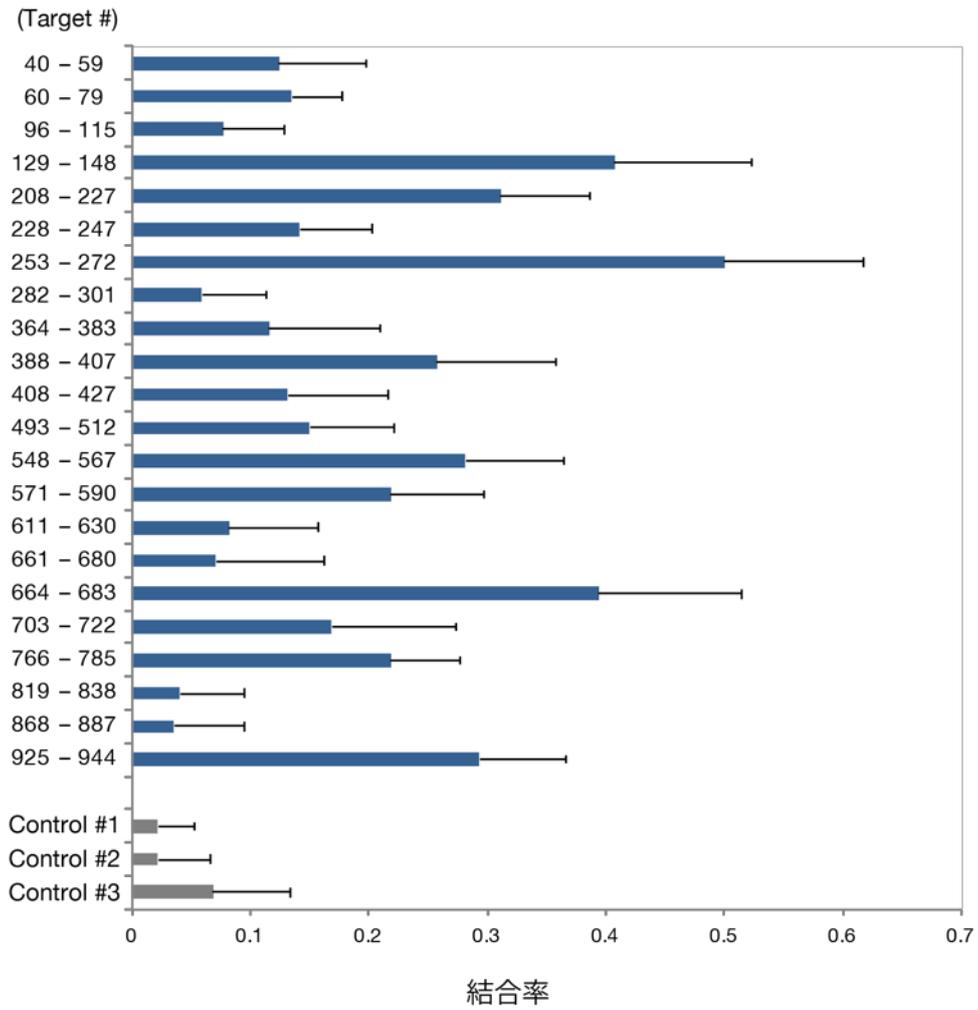


図 4-3. FRAP による結合評価の結果

(Control #1, Fluc mRNA 標的; Control #2, 868-887 の逆配列; Control #3, 208-227 の逆配列)

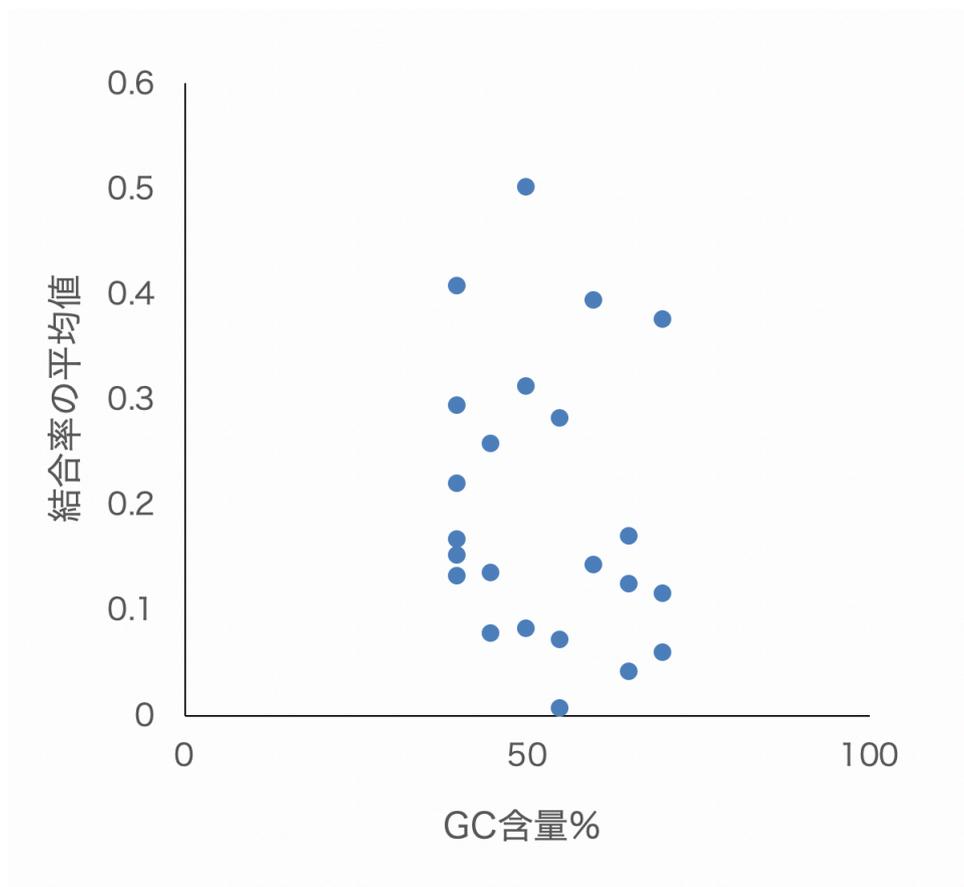


図 4-4. プローブの GC 含有率と mRNA に対する結合率の関係

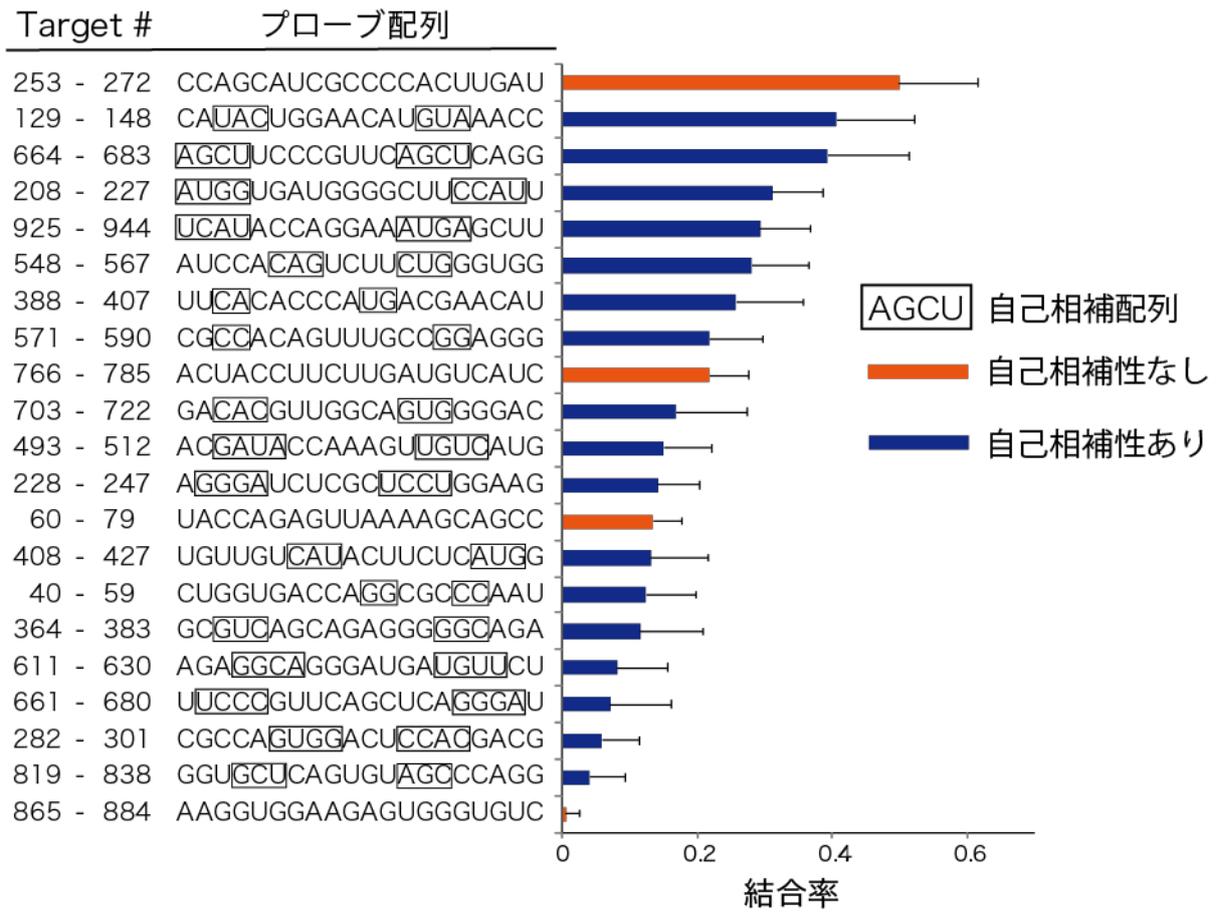


図 4-5. 結合率とプローブ配列の関係

結合評価結果を結合率平均の降順で並べたもの。ここで自己相補配列は Centroid fold による予測でお互いに結合すると予想された 2 塩基以上連続する配列を指す。自己相補配列があるものを自己相補性ありとした。

表 4-4. ACTB mRNA 標的プローブの配列

Target #	ターゲット配列	プローブ配列
150 - 169	UGGGUCAGAAGGAUUCAUUAU	AUAUGAAUCCUUCUGACCCA
418 - 437	CCAGGCUGUGCUGUCCCUGU	ACAGGGACAGCACAGCCUGG
575 - 594	CUCAUGAAGAUCCUCACUGA	UCAGUGAGGAUCUUCAUGAG
619 - 638	GGCCGAGCGGGAAAUCGUGC	GCACGAUUUCCCGCUCGGCC
707 - 726	AGCUCCUCCCUGGAGAAGAG	CUCUUCUCCAGGGAGGAGCU
790 - 809	UCUCUCCAACCUUCCUCC	GGAAGGAAGGUUGGAAGAGA
1017 - 1036	AGUACUCUGUGUGGAUCGGC	GCCGAUCCACACAGAGUACU
1058 - 1077	UCCACCUUCCAGCAGAUGUG	CACAUCUGCUGGAAGGUGGA

表 4-5. $\tau_{fast} = 0.72$ (s) で固定した ACTB mRNA 標的プローブの

FRAP データに対するフィッティング

Target #	C_r	C_{fast}	C_{slow}	τ_{slow} (s)
418-437	0.171 ± 0.052	0.526 ± 0.058	0.214 ± 0.065	17.54 ± 7.20
619-638	0.150 ± 0.021	0.542 ± 0.048	0.259 ± 0.058	11.48 ± 4.69

表 4-6 ACTB mRNA 標的プローブの FRAP データ解析結果

Target #	C_r	C_{fast}	C_{slow}
418 - 437	0.147 ± 0.043	0.529 ± 0.040	0.211 ± 0.045
575 - 594	0.097 ± 0.038	0.824 ± 0.072	0.074 ± 0.055
619 - 638	0.163 ± 0.042	0.556 ± 0.047	0.252 ± 0.047
707 - 726	0.239 ± 0.044	0.673 ± 0.056	0.056 ± 0.038
1058 - 1077	0.248 ± 0.070	0.622 ± 0.066	0.102 ± 0.072
150 - 169	0.129 ± 0.055	0.643 ± 0.082	0.209 ± 0.078
790 - 809	0.118 ± 0.069	0.847 ± 0.061	0.012 ± 0.029
1017 - 1036	0.040 ± 0.018	0.692 ± 0.082	0.229 ± 0.102

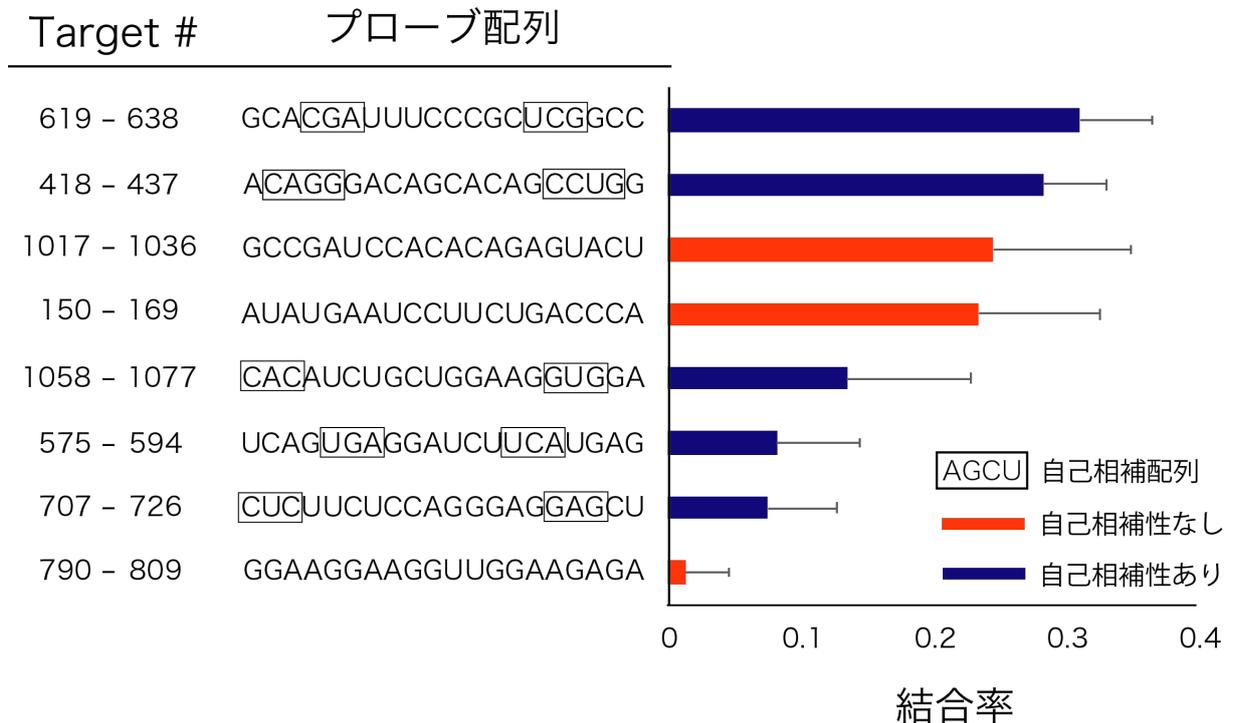


図 4-6. ACTB mRNA 用プローブの結合評価結果

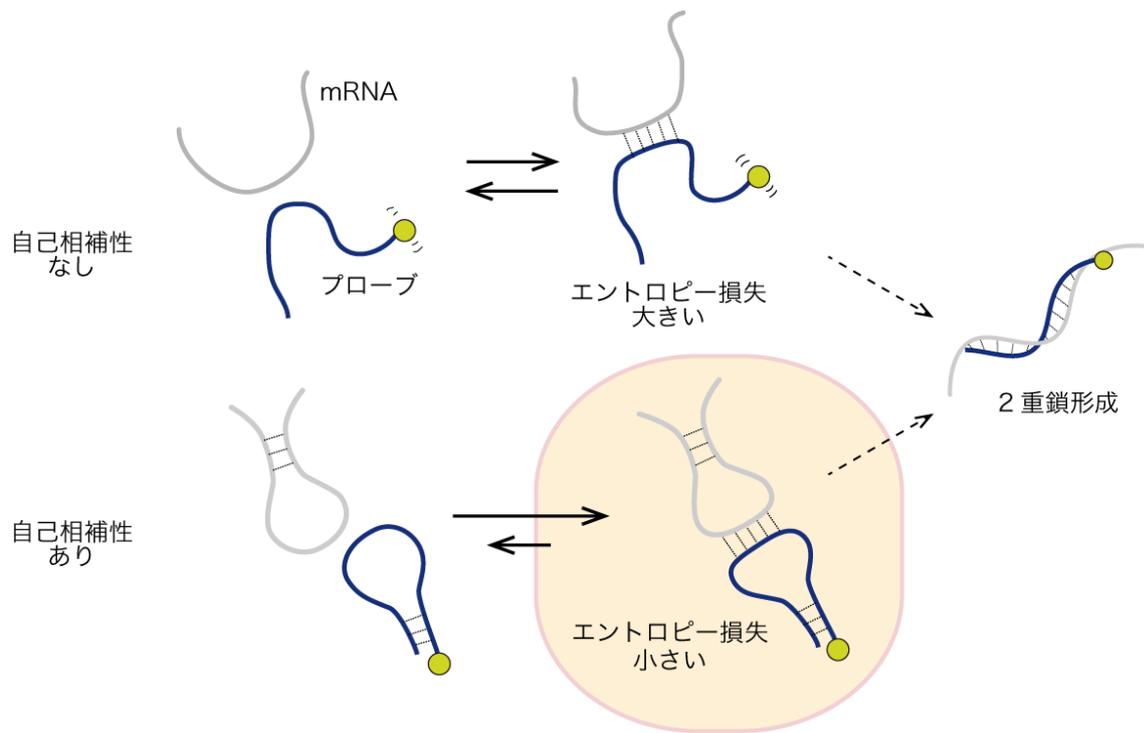


図 4-7. プロブの自己相補性の有無と想定した結合様式の違い

プローブと mRNA の結合形成の初期段階において、プローブに自己相補性があることで図中の色付きで囲ったような構造 (kissing loop) を取ることができ、自己相補性が無い場合と比べ結合形成が進行しやすくなると考えた。

第 5 章

アンチセンス核酸プローブを用いた GAPDH mRNA の 1 分子イメージング

5.1 概要

本章では、前章までで得られた高親和性プローブの応用先として、GAPDH mRNA を 1 分子レベルで可視化することを目指した。

5.2 単一種のプローブを用いたイメージング

5.2.1 高親和性プローブを選択する意義についての検討

生細胞内 mRNA をイメージングするために、アンチセンス核酸プローブを用いた標識する際に問題となるのは、未結合のプローブによる高い背景光である。単に標的 mRNA にプローブを多く結合させるためには導入量を増やせば良いのだが、このとき未結合のプローブが増えるため、プローブ導入量を増やすほど signal/ background 比に相当する (mRNA に結合したプローブの量) / (未結合のプローブの量) の比は小さくなる。結果として mRNA に結合したプローブ由来のシグナルを観察することを困難にする。そのため、プローブの導入量が少ない状態で、mRNA と結合しているプローブの量を増やすことが求められる。

以上のことから、未結合のプローブを減らした状態で mRNA と結合したプローブの蛍光を観察するためには、親和性の高いプローブを選択して用いることが有用であると考えた。この際、前章までで評価したプローブが利用でき、1 分子 mRNA 由来のシグナルを可視化できる可能性があると考えた。そこで GAPDH mRNA を標的とし、高い結合率を示したプローブを用いて、GAPDH mRNA の 1 分子レベルでの可視化を目指した。

5.2.2 プローブの結合率と細胞内分布の関係

プローブの結合率の違いと細胞内分布の関係を観察するため、4章で結合率の高かった配列 664-683, 結合率の低かった 493-512 およびネガティブコントロールである Fluc mRNA 標的プローブの3種を用いた。結合評価実験で用いた条件である 3 μ M よりも低い 0.75 μ M にプローブをそれぞれ調製し、COS7 細胞にマイクロインジェクション法により導入した。導入 1 時間以降に、スピニングディスク型共焦点顕微鏡法により観察を行った。その結果、高結合率のプローブを用いた際には細胞内でプローブの分布が不均一となり、特に胞の辺縁部では輝点が観察され、輝点追跡が可能だった(結果については次節で述べる)(図 5.1)。一方で、ネガティブコントロールである Fluc mRNA 標的としたプローブを用いると、プローブは細胞質内におよそ均一に分布する様子が見られた。また、低結合率のプローブを用いた際にはほぼ Fluc mRNA 標的プローブと同様の結果だった。以上の結果は、プローブの結合率が高いことで mRNA の 1 分子可視化を実現できる可能性を示したものである。

5.2.3 高親和性プローブを用いて観察された輝点の追跡

前節で高親和性プローブを用いたときに得られたイメージング結果について、ImageJ のプラグインである TrackMate を使って輝点の追跡を行い、運動状態の解析を行った。100 ms/frame で連続撮影した像に対し輝点検出を行い、隣接フレーム間で 1 μ m 以内にある輝点を同一分子由来とした。20 フレーム以上連続して同一分子由来の輝点として検出されたものについて、軌跡を得た。(図 5-4A)。

隣接フレーム間の距離を 1 μ m とした理由は以下である。ランダムウォークする粒子が時間 t を経過した際の平均二乗変位 $\langle r^2 \rangle$ と拡散係数 D の関係は、二次元で観察する場合、

$$\langle r^2 \rangle = 4 \tau D$$

の関係を持つ。FRAP での結果に基づき $D = 0.41 \mu\text{m}^2/\text{s}$ とし、 $\tau = 0.1$ 秒後に動く距離 r は、

$$\sqrt{4 \tau D} = \sqrt{4 \times 0.1 \text{ s} \times 0.41 \mu\text{m}^2/\text{s}} = 0.40 \mu\text{m}$$

を標準偏差に持つ正規分布に従うと考えられる。ここで $1 \mu\text{m}$ は標準偏差の 2.5 倍に相当するため、高確率で $r < 1 \mu\text{m}$ となる。実際にその確率を求めると、正規分布表から

$$0.4938 \times 2 = 0.9876 \rightarrow 98.8\%$$

となる。20 フレーム分連続で観察できる確率は、

$$0.9876^{20} = 0.7791... \rightarrow 77.9\%$$

となるため、大きく結果に影響を与えないと判断した。なお、実際には蛍光分子が焦点面から外れたり、退色したりすることによっても追跡できなくなることが考えられる。

図 5-2A に見られるように、観察された輝点の場所は細胞の端に向かうほど少なかったが、これは細胞の厚みに応じたものであると考えられ、特定の場所に局在して分布している様子は観察されなかった。また、輝点の運動も特定の方向性を持って運動している様子も見られなかった。これらは観察している mRNA がブラウン運動様に動いていることを示唆している。

ブラウン運動により粒子がランダムに動くと、平均二乗変位は時間に比例する。そこで、得られた軌跡により Mean-square displacement (MSD) -t プロットを作成した (図 5-2B)。各細胞から得られた MSD の結果をすべて合わせて解析した結果、ほぼ線形となり、全体として空間的に制限されない運動をしていると考えられた。得られたプロットから、拡散係数は $0.15 \mu\text{m}^2/\text{s}$ であった。

先行研究に基づくと、細胞質中の mRNA の拡散係数は $0.1-0.4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ という結果が得られており、これらの結果と一致する [33][34][35]。一方で、4 章の FRAP での、GAPDH mRNA に結合した遅い成分の拡散は $0.41 \mu\text{m}^2/\text{s}$ であり、同種同標的のプローブを使用していながら 2 倍以上

の差が見られている。しかし、FRAP では動かない分子の寄与は除外されて解析される一方で、本章の SPT では分けることができない。FRAP 解析で動かない分子として評価された分子は、最終的な蛍光回復をしない割合 ($1-C_r-C_{fast}-C_{slow}$) になり、この値は C_{slow} に比して、664-683 では 0.95 倍だったため、この分の寄与を考えると、FRAP と SPT で大きく結果が異ならないと考えられる。

5.2.4 基板に固定したプローブとの比較による輝点に含まれるプローブ数の算出

高親和性プローブを用いて観察された輝点が 1 分子由来の輝点であることを確かめるため、ガラス基板に固定したプローブの蛍光強度との比較を行った。

まず、ガラス基板に固定したプローブを長時間観察し、Cy3 が退色していく様子を記録した。結果の例を図 5-2A,B に示す。この例では 2 段階で退色しており、蛍光強度変動が約 70 で同程度であるため、この領域にたまたま 2 分子のプローブが存在していたことが考えられる。退色に伴う蛍光強度変動を解析すると、単峰性の分布であった(図 5-2C)。正規分布を仮定し、累積分布 (図 5-2D) に対してフィッティングを行うことにより、退色に伴い平均 68.5 の輝度変化が起こると求められた。この値は 1 分子蛍光分子に由来する輝度と考えられる。

次に、前節で追跡された輝点が、その周囲と比べてどれだけ高い輝度を持つかを調べた(図 5-2E)。1 つの軌跡に対し各フレームでの輝点の輝度を求め、その平均をその軌跡に対応する輝度とした。その結果、ガラス基板に固定したプローブと比較し、1 から 4 分子程度の輝度に相当する結果が得られた。その中で最も頻度が高かった輝度は 100-120 の範囲で、ガラス基板に固定したプローブと比較すると 1 分子と 2 分子の間になるが、細胞内では蛍光分子が自由に動けるため、一部のフレームで同じ領域に他のプローブも存在していることが考えられるため、これは 1 分子に由来するものと考えられる。また、一部の軌跡は複数のプローブが 1 輝点中に存在し、同時に動いて

いるという結果であった。この輝点に含まれるプローブの数は、ガラス基板に固定したプローブの結果との比較により、2-3 分子程度と考えられる。原因は複数考えられるが、一つはプローブはビオチンを介してストレプトアビジンと結合させているため、低い確率ながら 1 分子のストレプトアビジンに複数のプローブが結合したものが観察されていること、もう一つには、複数の GAPDH mRNA が集まった構造を取っていることが考えられる。

5.3 複数の高親和性プローブを用いた輝点の追跡

前節までで 1 分子 mRNA 由来と考えられる輝点の観察を行った。ただし、観察した輝点はプローブに由来するものであり、標的の mRNA 以外の分子と結合している可能性も考えられる。そこで、同じ mRNA に複数のプローブを用いて 2 種類の色素で標識し、観察される 2 色のシグナルが重なることにより標的が同一分子であることを示すことを目指した。このとき、5.2.1 節で述べたように、1 分子の mRNA に複数のプローブを結合させるために導入量を増やすことが必要であるが、これは背景光の上昇につながるため、シグナルを観察することが困難になる。そのため、プローブを導入した細胞の一部にレーザーを当て続け、その領域を通過するプローブを退色させる手法 (Fluorescence loss in photobleaching, FLIP) を用いた(図 5-4A)。早く動く分子ほど退色領域を通過する確率が高いため退色されやすく、動きの遅い退色されにくい。そのため FLIP により速く動く未結合のプローブを多く退色させ、動きの遅い mRNA に結合したプローブを観察可能にできると考えた。

Cy3 標識と ATTO 647N 標識のプローブを、標的配列が重複しないように調製して混合し、COS7 細胞にマイクロインジェクション法で導入した後、核に近い細胞質領域にレーザーを照射して FLIP を行い、その後の像を観察した。プローブの組み合わせとして、ATTO 647N 標識のプローブはすべて GAPDH mRNA 標的 (208-227, 548-567, 571-590, 664-683, 各 2.5 μ M) とし、Cy3 標識のプローブの標的は、GAPDH mRNA (228-247, 253-272, 388-407, 703-722, 766-785,

各 2.5 μ M)、firefly luciferase (Fluc) mRNA (COS7 に存在しない標的, 12.5 μ M)、Poly(A) mRNA (細胞内に豊富に存在, 12.5 μ M) の 3 種いずれかを用いて比較した (図 5-4B)。いずれの組み合わせでも、ATTO 647N の側で輝点が観察されたが、Cy3 標識の標的が Fluc mRNA の時、P-body と考えられる著しく輝度の高い点を除き ATTO 647N 側で見られたような輝点は観察されなかった。Cy3 標識プローブの標的が GAPDH mRNA もしくは Poly(A) mRNA の場合、それぞれ輝点が観察され、ATTO 647N 標識 GAPDH mRNA 標的プローブと似たような分布が見られた。詳細な比較のため細胞の一部を拡大して比較すると (図 5-4C)、いずれも輝点の存在している領域は類似していたが、Poly(A)を用いた場合には輝点の数が多く、細胞内の分子の個数を反映している結果であった。

さらに、Cy3, ATTO 647N で共に GAPDH mRNA を標的とした際の結果で、図 5-5D のように、共局在する輝点が動く様子が観察された。プローブが同じ標的分子と結合していることを示すもので、Fluc mRNA, polyA mRNA 標的の結果との比較により、観察された輝点が GAPDH mRNA に由来するものであると考えられる。

5.4 考察

本章では、アンチセンスプローブを用いて内在性 GAPDH mRNA を可視化することを試みた。プローブの濃度を高めると背景光によって観察されにくくなるという問題から、導入濃度を下げる事によりこれが可能になると考え、輝点の追跡を行った。追跡された輝点は、核酸結合タンパク質を用いる既存手法、アンチセンス核酸プローブを用いた先行研究と矛盾しない拡散係数を持っていた。

本手法の利点は、標的 mRNA の配列を変える必要がないことである。UTR 領域にタグ配列を挿入する手法は検出力を上げるために有用であるが、翻訳調節が変わる可能性があるため、本手

法は mRNA の細胞内ダイナミクスの解析に有用な手法であると考えられる。なお、タグ配列を挿入する手法と本手法に共通して、mRNA の検出は拡散速度の違いによるものであるため、標的が少分子で拡散が速いものには適さず、別の手法が必要になると考えられる。

5.2.3 で、単一種のプローブを用いた際にも複数個のプローブに由来する輝点が一部観察された。プローブの調製時に 1 分子のストレプトアビジンに複数分子のプローブが結合したものが観察されていたことが考えられ、これはガラス基板に固定したプローブでも観察されていた。その他の可能性として、定常状態においても mRNA 同士の集合体を形成していて、その中に複数分子の GAPDH mRNA が存在していて、これが観察されたことが考えられる。プローブ導入量を調節して比較することで、これが実際に存在するか、また存在するとすればどのくらいの mRNA が存在するのかが明らかにできると考えられる。

ストレス環境下や分解の過程等を除く、定常状態で mRNA が複数分子の集合体を形成している可能性は、これまで先行研究でもあまり検討されていない。関連する可能性のある先行研究としては、タグ配列と FISH 法を用い、神経細胞内の beta-actin mRNA を可視化した研究がある [36]。これによると、beta-actin mRNA が特定の部位まで輸送され翻訳が活性化されるまでは、mRNA は何らかの分子にコーティングされ、外部からの分子 (FISH プローブ) がアクセスしにくい状態になっている。コーティングの分子実態は当該先行研究では明らかにされていないが、mRNA 同士の集合体が形成されることで外部からの分子のアクセスが制限された可能性は考えられる。このような未解決の現象の解明にも寄与しうるものと考えられる。

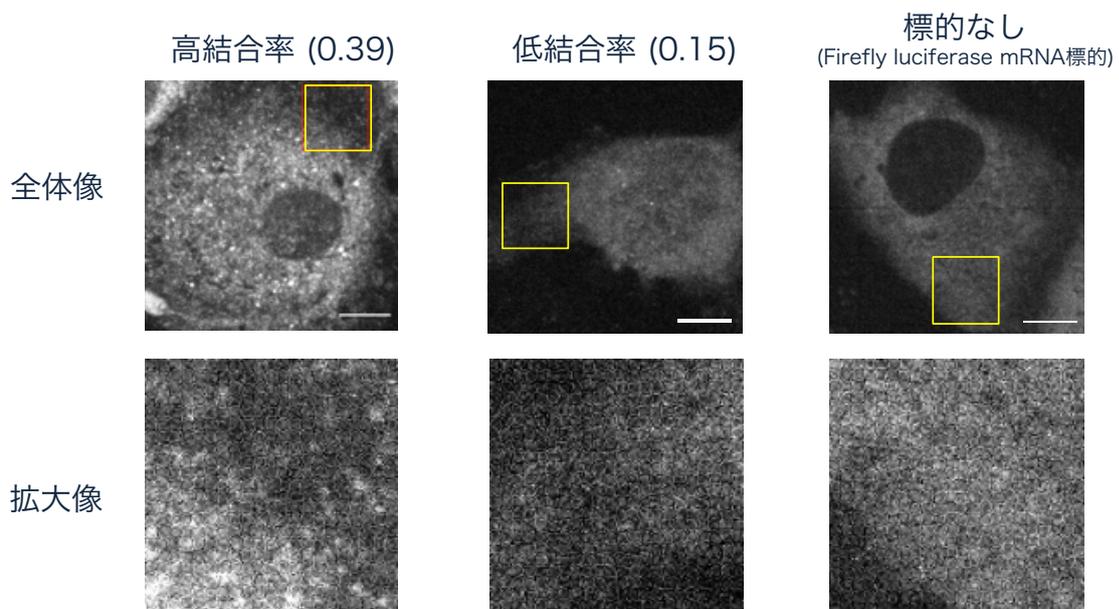


図 5-1 プローブの細胞内分布の違い

全体像のスケールバーは 10 μm , 拡大像は全体像の黄色の正方形領域に対応した 1 辺 10 μm の領域の部分を拡大したものである。

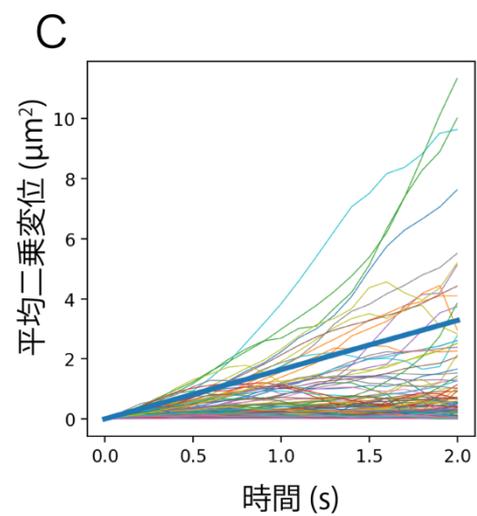
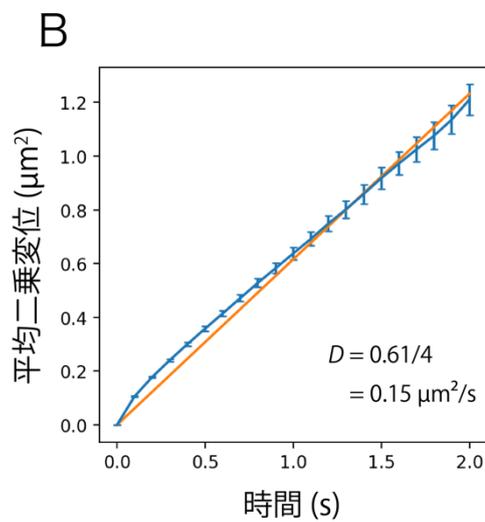
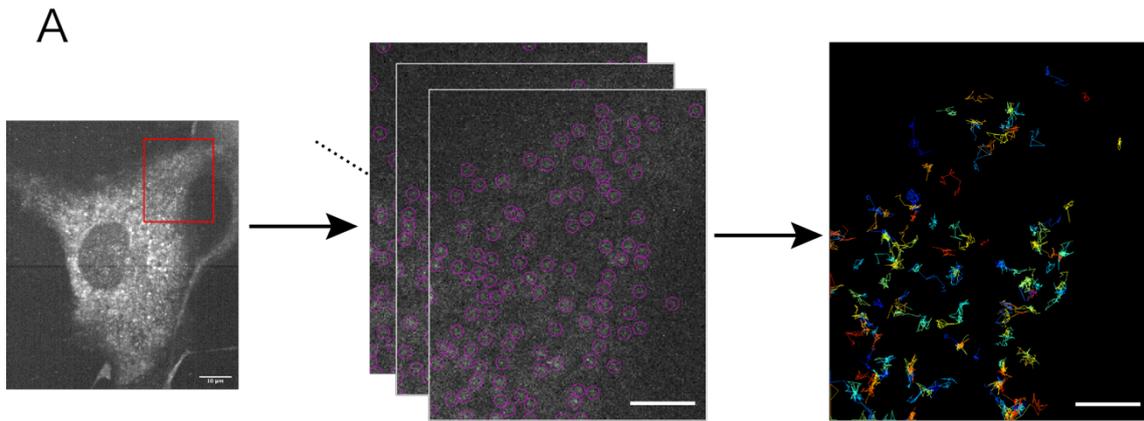


図 5-2. 輝点の抽出と解析

(A). 解析手順の模式図。得られた輝点と軌跡の結果例を示す。(scale bar: 拡大前 $10 \mu\text{m}$, 拡大像 $5 \mu\text{m}$) (B). 得られた軌跡による MSD-t plot ($N=1415$, $\text{mean}\pm\text{S.E.}$) (C). 100 個のランダムに選んだ軌跡の結果を並べたもの。青太線は FRAP の結果 ($D=0.41 \mu\text{m}^2/\text{s}$) による想定を表す。

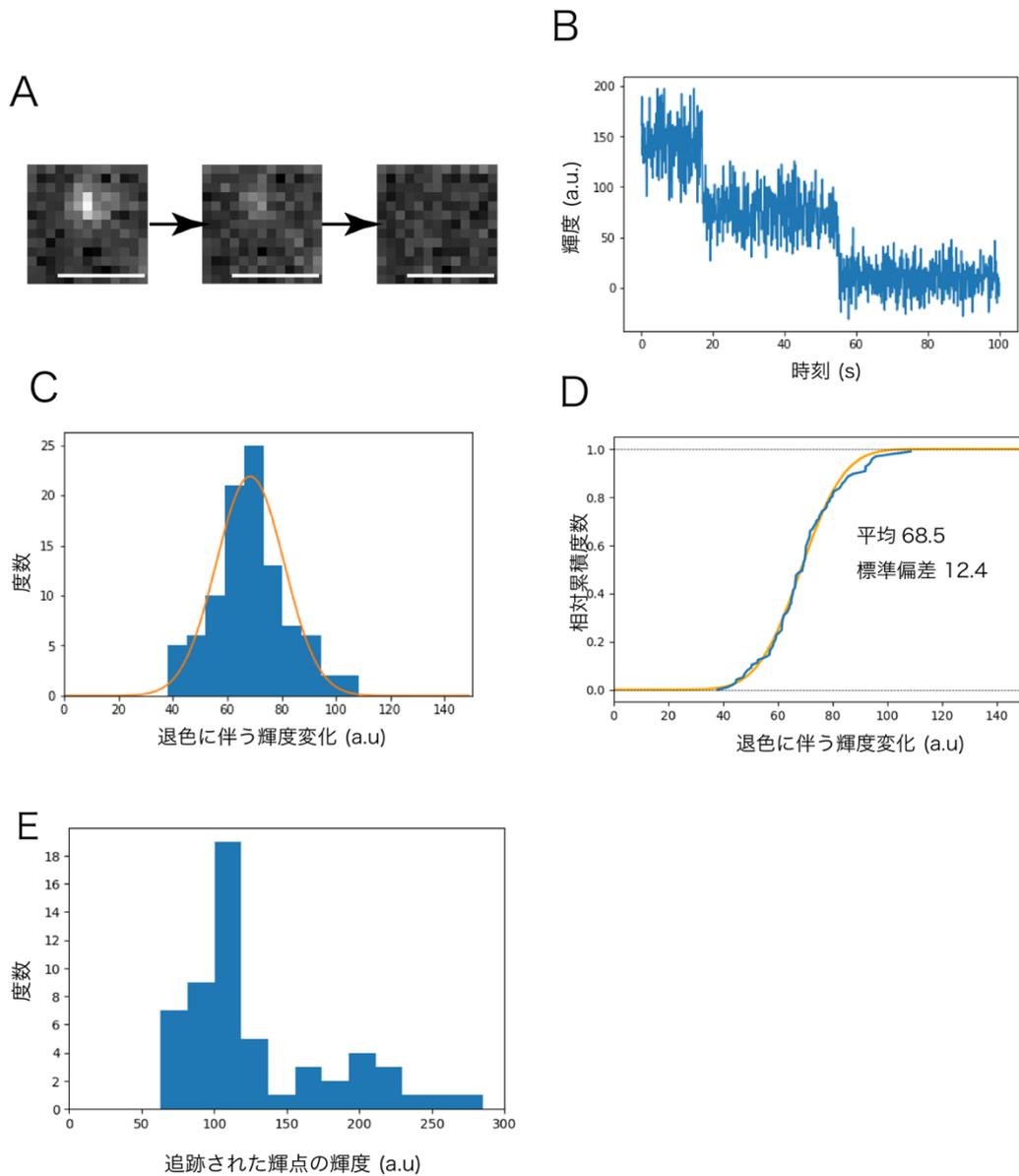
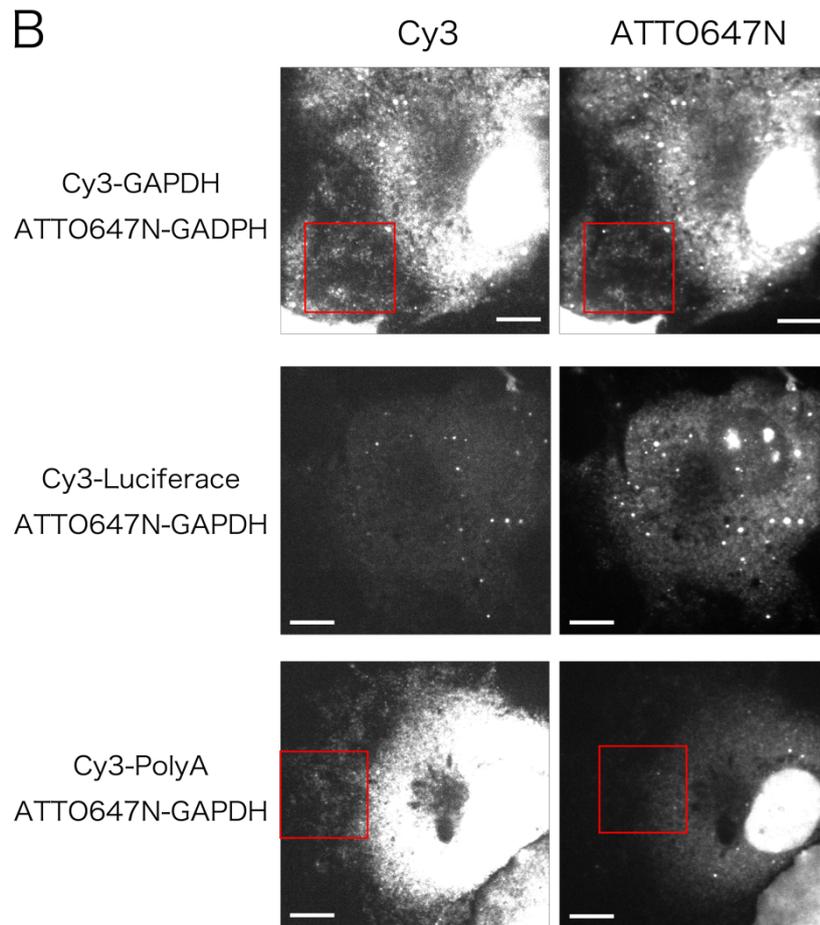
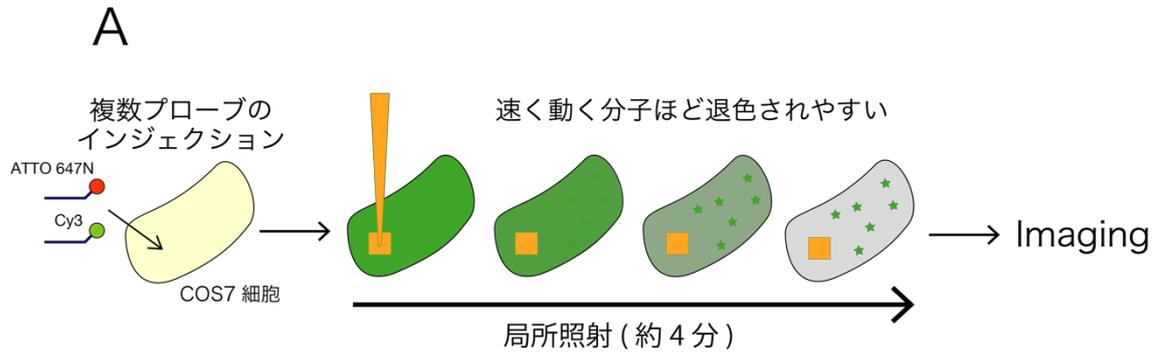


図 5-3. 輝点の輝度解析

(A)-(C): ガラス基板に固定したプローブの輝度解析 (A). 色素が 2 段階で退色する様子の観察例。画像は $1.4 \mu\text{m} \times 1.4 \mu\text{m}$ (B). (A)の輝点の解析結果。縦軸は輝点のない領域の輝度を基準にしている。(C). 退色に伴う輝度変化の解析結果のヒストグラム。オレンジの線は(D)の結果をもとに描いている。(D). 輝度変化の相対累積度数と正規分布によるフィッティング。(E). 軌跡を得られた輝点の輝度評価。



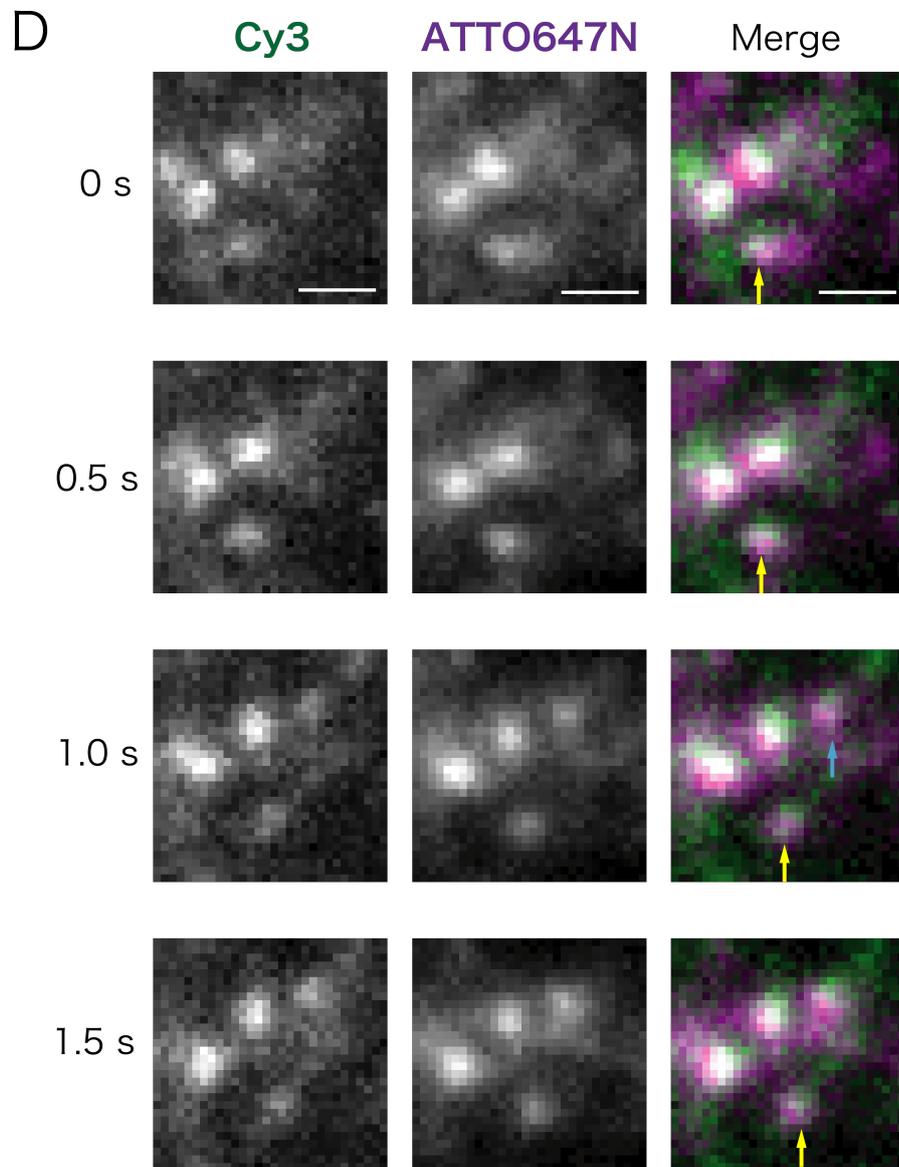
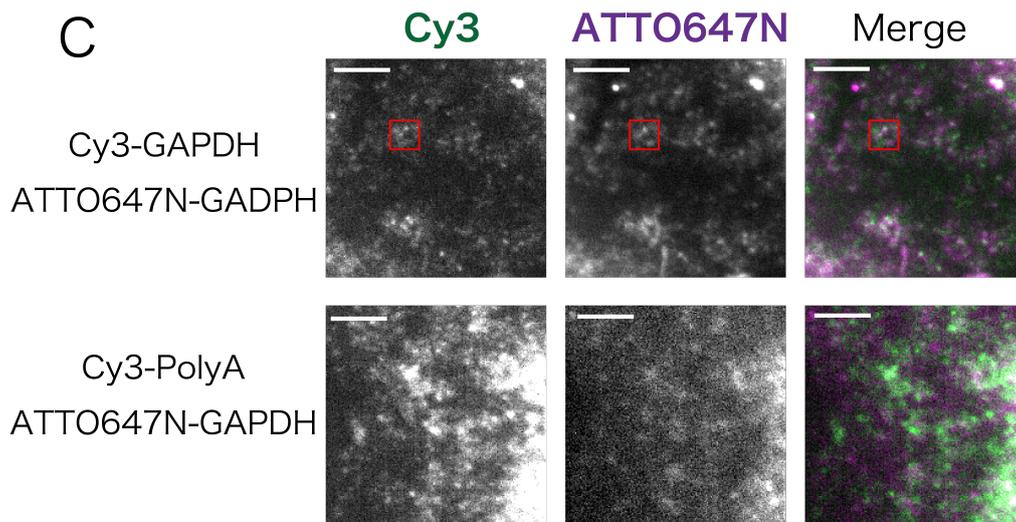


図 5-4. FLIP を用いた mRNA の 2 色イメージング

(前項からの続き)

(A). FLIP 実験の概要。(B). イメージングの結果。左列はプローブの色素と標的とした mRNA の組み合わせを示す。各列でコントラストは同一に設定している。scale = 10 μm 。(C). (B)の赤枠領域の拡大像によるプローブによる分布の違いの比較。scale = 5 μm 。(D). (C)の赤枠領域の拡大像による共局在した輝点が動く様子。黄色矢印は同じ輝点を、青色矢印は 0.5 秒時点で観察されなかった輝点が 1.0 秒時点で観察されたことを表す。

第 6 章

総括及び今後の展望

6.1 本研究の総括

本研究は、アンチセンス核酸プローブを用いて生細胞内における内在性 mRNA の 1 分子イメージングを実現することを目的に行った。アンチセンス核酸プローブを用いる手法では、標的 mRNA に結合しないプローブが背景光となる。そのため親和性の高い配列を選択することが必要だが、これまで生細胞内でプローブの親和性を測定する手法が無いことが問題と考えた。

まず、アンチセンス核酸プローブと内在性 mRNA の細胞内での親和性を定量するため、プローブが mRNA と結合することにより拡散速度が低下することに着目し、Digital Mirror Device を用いた細胞内局所照射系とスピニングディスク型共焦点顕微鏡法を利用した光褪色後蛍光回復法 (FRAP) の実験系を構築した。

次にこれを用いてプローブと mRNA の拡散速度の差を定量的に解析することにより、生細胞内の GAPDH mRNA および ACTB mRNA に対して相補配列を有する種々のアンチセンス 2'-O-methyl RNA プローブの結合評価を行った。プローブが自己相補的な場合、mRNA との結合形成でエンタルピー的に不利であると考えられるが、結合評価の結果、プローブの自己相補性と mRNA に対する親和性に関係は見られなかった。

さらに、FRAP による結合評価で得られたプローブで生細胞内の GAPDH mRNA のイメージングを行った。親和性の高いプローブを用いると mRNA 由来と考えられる輝点が観察された。輝点の運動を追跡すると自由な拡散をしており、拡散係数は先行研究において別のプローブを用いて定量された mRNA と同程度だった。運動追跡した輝点の輝度解析により、1 分子の蛍光が観察されていることを確認した。また、プローブが GAPDH mRNA と結合していることを示すため、

Cy3 または ATTO 647N のいずれかの、波長の異なる色素で標識されたプローブを複数結合させることで 2 色で標識し、それぞれの色素由来の蛍光が重なることを確認した。以上の解析より、本研究で開発した内在性 mRNA を標的としたアンチセンス核酸プローブが、mRNA の 1 分子イメージング観察に有効であることを示した。

6.2 今後の展望

アンチセンス核酸プローブは任意の mRNA に対して適用可能であり、本研究で用いた手法は標的の遺伝子改変を必要としない。また、本研究ではプローブの色素は汎用されているものを用いたが、これを他の研究で開発された任意の色素に置き換えることができる。そのため、本手法を他の遺伝子に用いたり、他の手法と併用したりといった応用がしやすいと考えられる。

本手法により、MS2 システムをはじめとした遺伝子操作を必要とする手法では解析できないような、細胞質におけるダイナミックかつ遺伝子特異性の高い内在性 mRNA の制御機構の解明への貢献が期待される。例えば、特定の遺伝子が特定のタイミングで発現変動する発生過程・翻訳調節の研究や、1 分子 mRNA の特定の複数箇所を標的としたイメージングによる細胞内内在性 mRNA の構造解析がその対象として挙げられる。

また、標的 mRNA に対するプローブを網羅的に FRAP 法で結合評価することにより、親和性の高い配列を得るための一般則を見出すことが期待される。同時に、in vitro での結合評価との比較を行うことにより、細胞内環境の特殊性についても新たな知見を得られると考えられる。

5 章のイメージング結果では、定常状態でも複数分子の mRNA を含む集合体が形成されていることが示唆された。液-液相分離が定常状態の mRNA においても起こっている可能性が考えられる。これにより臨機応変な翻訳調節が実現されているとすれば、その詳細を解明するために、遺伝子改変や、タンパク質結合による mRNA 分子巨大化が起こらない本手法の利点は大きいと考えられる。

以上のように、細胞内 mRNA の可視化や物理化学的性質の調査を通じ、細胞内高分子の状態とその制御機構の解明へ貢献できる可能性が考えられる。

参考文献一覽

- [1] J. R. Buchan and R. Parker, “Eukaryotic Stress Granules : The Ins and Outs of Translation,” *Mol. Cell*, vol. 36, no. 6, pp. 932–941, 2009.
- [2] S. Mollet *et al.*, “Translationally Repressed mRNA Transiently Cycles through Stress Granules during Stress,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 19, no. 10, pp. 4469–4479, Jul. 2008.
- [3] M. R. Fabian, N. Sonenberg, and W. Filipowicz, “Regulation of mRNA Translation and Stability by microRNAs,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 79, pp. 351–379, 2010.
- [4] P. Anderson, N. Kedersha, and P. Ivanov, “Stress granules, P-bodies and cancer,” *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.*, vol. 1849, no. 7, pp. 861–870, 2014.
- [5] E. Bertrand, P. Chartrand, M. Schaefer, S. M. Shenoy, R. H. Singer, and R. M. Long, “Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast.,” *Mol. Cell*, vol. 2, no. 4, pp. 437–445, 1998.
- [6] A. R. Buxbaum, G. Haimovich, and R. H. Singer, “In the right place at the right time: visualizing and understanding mRNA localization,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 16, no. 2, pp. 95–109, 2014.
- [7] H. Y. Park *et al.*, “Visualization of dynamics of single endogenous mRNA labeled in live mouse.,” *Science*, vol. 343, no. 6169, pp. 422–4, Jan. 2014.
- [8] D. Grünwald and R. H. Singer, “In vivo imaging of labelled endogenous β -actin mRNA during nucleocytoplasmic transport.,” *Nature*, vol. 467, no. 7315, pp. 604–7, 2010.
- [9] I. Golding, J. Paulsson, S. M. Zawilski, and E. C. Cox, “Real-time kinetics of gene activity in individual bacteria,” *Cell*, vol. 123, no. 6, pp. 1025–1036, 2005.
- [10] J. F. Garcia and R. Parker, “MS2 coat protein bound to yeast mRNAs block 5' to 3' degradation and trap mRNA decay products: implications for the localization of mRNAs by

- MS2-MCP system,” *Rna*, pp. 1–3, 2015.
- [11] J. Zhang, K. Okabe, T. Tani, and T. Funatsu, “Dynamic association-dissociation and harboring of endogenous mRNAs in stress granules.,” *J. Cell Sci.*, vol. 124, no. Pt 23, pp. 4087–95, 2011.
- [12] J. P. Siebrasse, R. Veith, A. Dobay, H. Leonhardt, B. Daneholt, and U. Kubitscheck, “Discontinuous movement of mRNP particles in nucleoplasmic regions devoid of chromatin.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 51, pp. 20291–20296, 2008.
- [13] H. Yoshimura, A. Inaguma, T. Yamada, and T. Ozawa, “Fluorescent probes for imaging endogenous β -actin mRNA in living cells using fluorescent protein-tagged pumilio,” *ACS Chem. Biol.*, vol. 7, no. 6, pp. 999–1005, 2012.
- [14] A. Raj and S. Tyagi, *Detection of individual endogenous RNA transcripts in situ using multiple singly labeled probes.*, 1st ed., vol. 472, no. 10. Elsevier Inc., 2010.
- [15] A. Raj, P. Van Den Bogaard, S. A. Rifkin, A. Van Oudenaarden, and S. Tyagi, “Imaging individual mRNA molecules using multiple singly labeled probes,” vol. 5, no. 10, pp. 877–879, 2008.
- [16] S. Sixou, F. C. J. Szoka, G. A. Green, B. Giusti, G. Zon, and D. J. Chin, “Intracellular oligonucleotide hybridization detected by fluorescence resonance energy transfer (FRET),” vol. 22, no. 4, pp. 662–668, 1994.
- [17] K. Okabe, Y. Harada, J. Zhang, H. Tadakuma, T. Tani, and T. Funatsu, “Real time monitoring of endogenous cytoplasmic mRNA using linear antisense 2'-O-methyl RNA probes in living cells.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 39, no. 4, p. e20, Mar. 2011.
- [18] S. Tyagi and F. R. Kramer, “Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization,” *Nat Biotech.*, vol. 14, no. 3, pp. 303–308, Mar. 1996.
- [19] K. Sato, M. Hamada, K. Asai, and T. Mituyama, “CENTROIDFOLD : a web server for RNA

- secondary structure prediction,” vol. 37, no. May, pp. 277–280, 2009.
- [20] O. Köhler, D. V. Jarikote, and O. Seitz, “Forced intercalation probes (FIT Probes): Thiazole orange as a fluorescent base in peptide nucleic acids for homogeneous single-nucleotide-polymorphism detection,” *ChemBioChem*, vol. 6, no. 1, pp. 69–77, 2005.
- [21] F. Hövelmann *et al.*, “Brightness through local constraint--LNA-enhanced FIT hybridization probes for in vivo ribonucleotide particle tracking,” *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 53, no. 42, pp. 11370–11375, 2014.
- [22] D. Axelrod, D. E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson, and W. W. Webb, “Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics.,” *Biophys. J.*, vol. 16, no. 9, pp. 1055–69, Sep. 1976.
- [23] J. Mai, S. Trump, I. Lehmann, and S. Attinger, “Parameter importance in FRAP acquisition and analysis: a simulation approach.,” *Biophys. J.*, vol. 104, no. 9, pp. 2089–97, May 2013.
- [24] E. J. *et al.*, “Nuclear membrane dynamics and reassembly in living cells: Targeting of an inner nuclear membrane protein in interphase and mitosis,” *J. Cell Biol.*, vol. 138, no. 6, pp. 1193–1206, 1997.
- [25] D. M. Soumpasis, “Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments.,” *Biophys. J.*, vol. 41, no. 1, pp. 95–97, 1983.
- [26] T. Fukano, H. Hama, and A. Miyawaki, “Similar diffusibility of membrane proteins across the axon-soma and dendrite-soma boundaries revealed by a novel FRAP technique.,” *J. Struct. Biol.*, vol. 147, no. 1, pp. 12–8, 2004.
- [27] S. E. Wells, P. E. Hillner, R. D. Vale, and A. B. Sachs, “Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors,” *Mol. Cell*, vol. 2, no. 1, pp. 135–140, 1998.
- [28] N. Malys and J. E. G. McCarthy, “Translation initiation: Variations in the mechanism can be

- anticipated,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 68, no. 6, pp. 991–1003, 2011.
- [29] R. J. Ellis and A. P. Minton, “Join the crowd,” *Nature*, vol. 425, no. 1, pp. 27–28, 2003.
- [30] A. P. Minton, “How can biochemical reactions within cells differ from those in test tubes?,” *J. Cell Sci.*, vol. 119, no. 14, pp. 2863–2869, 2006.
- [31] D. R. Forsdyke, “A stem-loop ‘kissing’ model for the initiation of recombination and the origin of introns.,” *Mol. Biol. Evol.*, 1995.
- [32] N. Salim *et al.*, “Thermodynamic and kinetic analysis of an RNA kissing interaction and its resolution into an extended duplex,” *Biophys. J.*, vol. 102, no. 5, pp. 1097–1107, 2012.
- [33] D. Fusco *et al.*, “Single mRNA Molecules Demonstrate Probabilistic Movement in Living Mammalian Cells,” *Curr. Biol.*, vol. 13, no. 2, pp. 161–167, Jan. 2003.
- [34] Z. Lu *et al.*, “RNA Duplex Map in Living Cells Reveals Higher-Order Transcriptome Structure,” *Cell*, vol. 165, no. 5, pp. 1267–1279, 2016.
- [35] 皓菅原, “一分子蛍光イメージング法を用いた ストレス顆粒内 mRNA の局在 ・ 運動ナノスケール解析,” 博士論文, 2016.
- [36] B. Turner-Bridger *et al.*, “Single-molecule analysis of endogenous β -actin mRNA trafficking reveals a mechanism for compartmentalized mRNA localization in axons,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 115, no. 41, p. 201806189, 2018.

謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導ご鞭撻およびご援助を頂いたすべての方に感謝の意を表します。

東京大学大学院薬学系研究科 生体分析化学教室の船津高志教授には、私が学部生の頃より一貫して温かいご指導とご鞭撻を頂きましたこと、心より御礼申し上げます。

東京大学大学院薬学系研究科 生体分析化学教室の岡部弘基助教には、日々の実験や考察について懇切にご指導、ご助言を賜りましたこと、心より感謝申し上げます。

本研究を通じて多くのご助言、ご協力をいただきました、東京大学薬学系研究科 生体分析化学教室の皆様には深く感謝いたします。

最後に、本研究を行うにあたり終始見守り、常に心の支えとなってくださった家族と友人に心より感謝いたします。

本研究では日本学術振興会の特別研究員奨励費（17J10818）の助成を受けました。ここに記して感謝の意を表します。

2020年 2月

武田 駿介