

論文の内容の要旨

論文題目 アンチセンス核酸プローブを用いた生細胞における 内在性 mRNA の 1 分子蛍光イメージング

氏名 武田 駿介

【背景】

遺伝子発現を担う分子である mRNA は、その量、局在、状態などが複雑に制御され、細胞の臨機応変な応答を担っている。この詳細を明らかにするため、mRNA 動態の直接観察は有効な手段である。これまで、mRNA の 1 分子イメージング自体は標的にタグ配列を挿入する手法により実現されているが、遺伝子操作によって mRNA の構造が大きく変わるため、分解や翻訳抑制が阻害される致命的な問題がある。一方、標的 mRNA に相補的な配列を持つプローブを導入することで内在性 mRNA の検出が可能だが、標的に結合しないプローブが高い背景光となるという問を選択する手立てがないことであると考え、本研究では細胞内でプローブと mRNA の親和性を定量的に評価するための新規測定法を構築し、高い結合能を有する配列の選択を実現することを目指した。さらに、得られた高親和性のプローブで mRNA の 1 分子イメージングを目指した。

【方法・結果】

1. 生細胞内におけるアンチセンス核酸プローブの結合評価

mRNA はプローブに比べ長大で複数のタンパク質との巨大複合体であるため、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、光退色後蛍光回復法 (FRAP) による分子拡散測定の利用を試みた。未結合のプローブによる早い蛍光回復と mRNA と結合したプローブによる遅い蛍光回復の寄与の比を求め、細胞内でのプローブの結合率を測定することができると考えた。そこで定量的な解析を可能にするため、スピニングディスク型共焦点顕微鏡法を用いて焦点面以外の領域の蛍光の影響を落射照明に比べ大幅に低減すると共に、デジタルミラーデバイスを用いて特定の領域のみを照射可能にする光学系を構築した。この光学系を用い、COS7 細胞に対し 3 μ M Cy3 標識オリゴ 2'-O-methyl RNA プローブをマイクロインジェクション法により導入し、FRAP データを取得した(図 1A)。得られた回復曲線を、Soumpasis のモデル

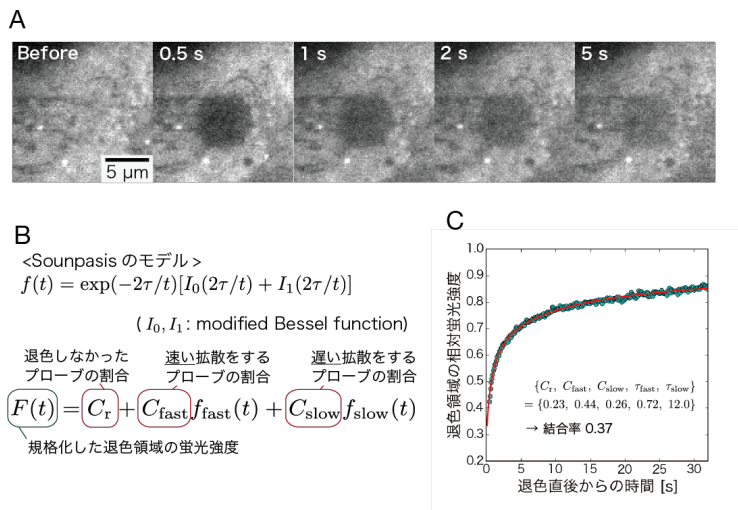


図 1. FRAP 実験と解析 A. GAPDH mRNA 標的のプローブを用いた FRAP 像; B. 解析に用いる関数; C. フィッティング結果

Soumpasis, Biophys. J., 1983) に基づき解析した(図 1B,C)。COS7 細胞に存在しない Firefly

luciferase (Fluc) mRNA を標的としたプローブを用いると 1 成分の拡散としてフィッティングされた一方で、Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA を標的としたプローブではより遅い成分を加えた 2 成分の拡散としてフィッティングされ、プローブと mRNA との結合を示唆する結果を得た。細胞内におけるプローブの結合率を、蛍光回復量全体（早い成分と遅い成分）に対する遅い成分の割合と定義し、以後の結合評価に用いることとした。

2. GAPDH mRNA を標的としたプローブの結合能の比較

GAPDH mRNA のコーディング領域を標的としたプローブ配列を複数選択し、FRAP を用いて結合評価を行った

(図 2)。その結果、配列によって結合率は大きく異なっていた。しかし、一般に核酸のハイブリダイゼーションで考慮される GC 含有量やプローブの自己相補性とは相関が見られなかった。この結果から、*in vitro* と細胞内環境が異なることが示唆され、細胞内で結合評価を行うことの有効性を確認した。

また、beta-actin mRNA を標的としたプローブも複数配列を選択肢結合評価も行い、GAPDH mRNA 標的と同様の結果を得た。

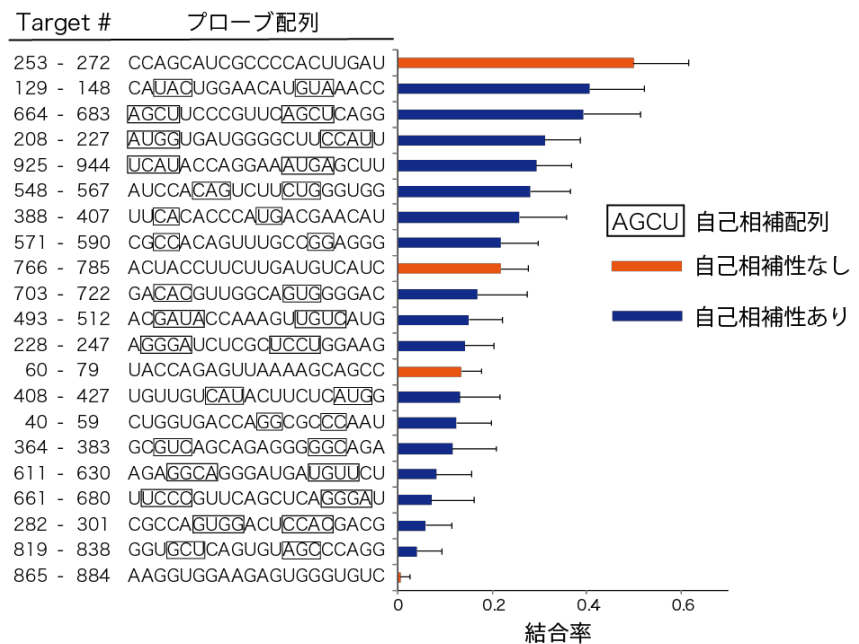


図 2. GAPDH mRNA を標的としたプローブの結合評価
Target #は GAPDH mRNA コーディング領域の標的塩基部位を、四角で囲まれた配列は mRNA 二次構造予測による分子内結合形成部位を表す

3. 各種のプローブを用いた mRNA イメージングの比較

結合能の高いプローブを結合評価実験時に比して低濃度 (0.75 μ M) で COS7 細胞に導入することで背景光を低減し、1 分子 GAPDH mRNA の可視化を試みた (図 3)。結合評価実験で高い結合率を示したプローブを用いると、多くの輝点が動く様子が観察された。輝点は細胞質に広く分布していた。また、結合率の低いプロ

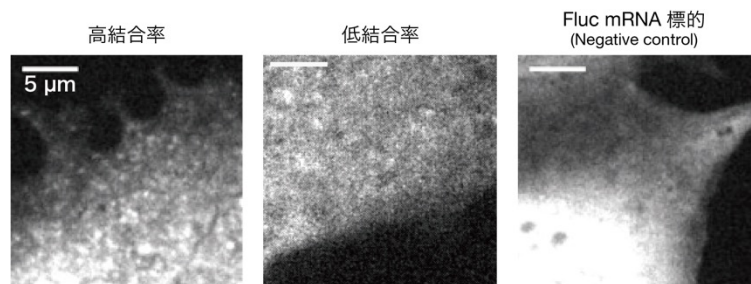


図 3. プローブの結合率と細胞内分布の関係

ープを用いると観察される輝点が少なくなった。さらに、Fluc mRNA を標的としたプローブでは輝点はほとんど観察されなかった。以上の結果は、結合能の高いプローブを選択することが内在性 mRNA の 1 分子レベルでの可視化に必要であることを示唆した。

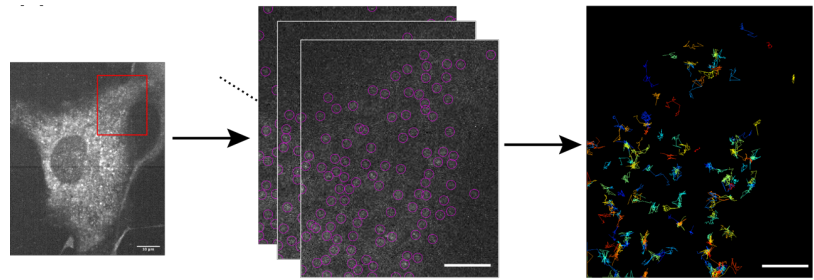


図 4. 輝点の検出と運動解析の例
(scale は全体像で 10 μm , 拡大像で 5 μm)

高結合率プローブを用いて観察された輝点の運動解析(図 4)により、輝点の拡散係数は $0.15 \mu\text{m}^2/\text{s}$ と求められ (図 5)、先行研究において別のプローブを用いて定量された mRNA の拡散係数と同程度だった。また、検出された輝点の輝度解析を行い、1 分子プローブの蛍光が観察されていることを確認した。

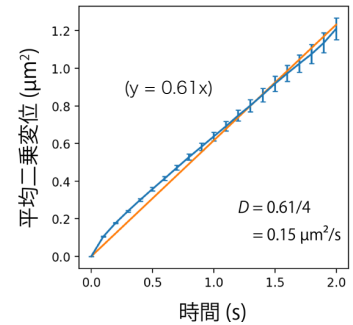


図 5. 輝点の運動解析による拡散係数の計算

4. 1 分子 mRNA のイメージングによるプローブと mRNA の結合の確認

観察されている輝点が GAPDH mRNA 由来であることを示すため、GAPDH mRNA を標

的とした Cy3 もしくは ATTO 647N で標識された複数のプローブを配列の重複が無いよう選

び (Cy3 標識から 5 種、ATTO 647N 標識から 4 種、それぞれ $2.5 \mu\text{M}$ になるよう調製)、これを同時に COS7 細胞に導入することで GAPDH mRNA を 2 色で標識し、両者のシグナルの共局在を示すことを目指した。この際、総プローブ濃度が高くなるため、背景光を低減するため光退色蛍光減衰測定法 (FLIP) を用いた(図 5)。細胞の一部 ($23 \mu\text{m} \times 9 \mu\text{m}$ の長方形領域) に高出力レーザーを 4 分間照射し、照射領域を通過するプローブの大部分を退色させた。次に、2 波長分岐型スピニングディスク共焦点顕微鏡を用いて、Cy3 と ATTO 647N の蛍光を同

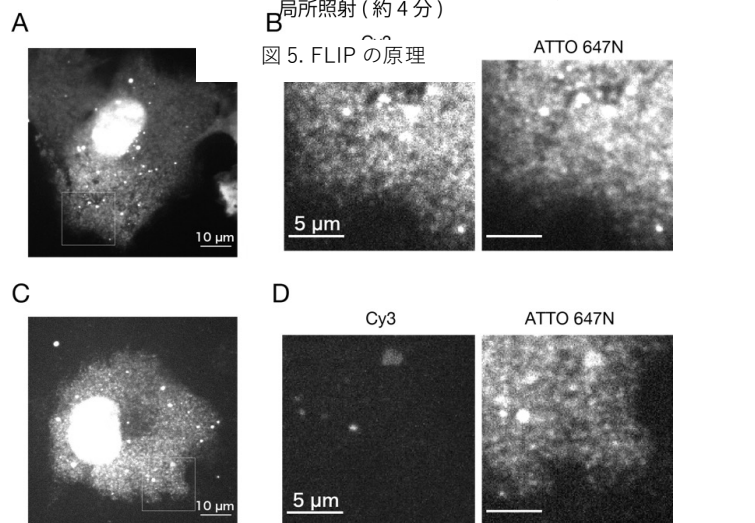
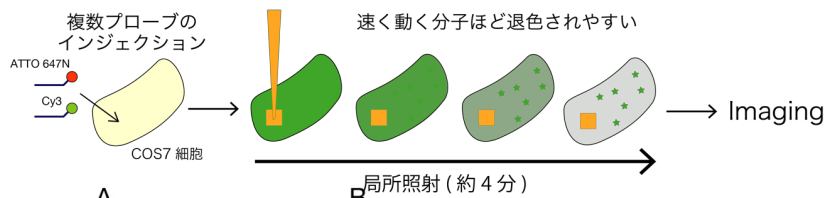


図 6. FLIP を用いた mRNA イメージング。
A,B. 2 色とも GAPDH mRNA が標的のプローブを用いた結果; C,D. Cy3 標識 Fluc mRNA 標的のプローブと ATTO647N 標識 GAPDH mRNA 標的のプローブを用いた結果; A,C. 全体像(ATTO 647N); B,D. 拡大像

時に観察した。その結果、両者で観察される輝点の分布が重なることが観察された (図 6A,B)。より詳細な観察により、それぞれの色素由来の輝点が共局在して動く様子が観察された (図 7)。同様の実験系で Cy3 標識 Fluc mRNA 標的のプローブを用いたコントロール実験では、Cy3 の蛍光でのみ輝点が顕著に観察されなくなった(図 6B,C)。以上の結果より、各種プローブに配列特異性があり、同じ標的 mRNA 分子と結合していることを示した。

【総括】

本研究では、生細胞内でアンチセンス核酸プローブの結合を定量し評価する手法を確立した。さらに、得られたプローブを用いて、内在性 mRNA の 1 分子イメージングを実現した。プローブの自己相補性に着目した配列設計は他種の mRNA に適用可能であり、任意の内在性 mRNA の 1 分子イメージングの実現および既存手法で解析できなかった RNA 制御機構の解明への貢献が期待される。また、プローブの自己相補性に関する知見は細胞内環境の特殊性を示唆するものであり、細胞内 RNA の物理化学的性質の調査を通じて細胞内の高分子の状態とその制御機構の解明に貢献できる可能性が考えられる。

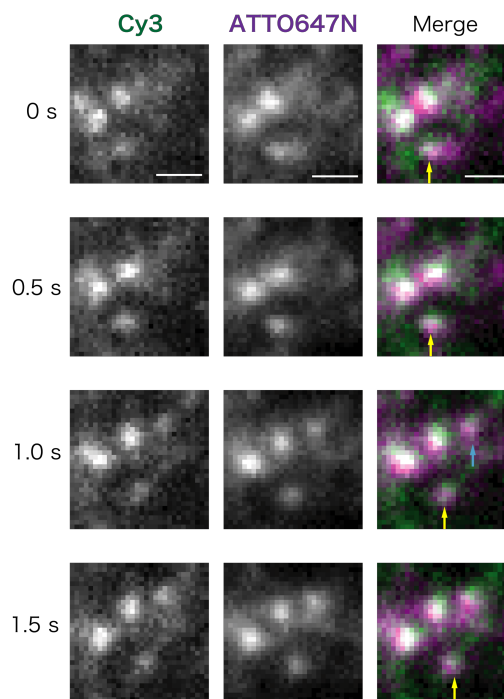


図 7. 共局在した輝点が動く様子。
(図 6A,B 同様 2 色とも GAPDH mRNA 標的のプローブを用いた結果)
黄色矢印は同じ輝点が動く様子を表し、青色矢印は 0.5 秒時点で観察されなかった輝点が 1.0 秒時点で観察されたことを表す。scale = 5 μ m