

審査の結果の要旨

氏名 武田 駿介

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。この制御機構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という問題がある。一方、標的 mRNA に相補的な配列を持つ核酸プローブ（アンチセンスプローブ）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になるという問題がある。武田は、細胞内でアンチセンスプローブと 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を選択する方法を実現した。さらに、得られた高親和性のアンチセンスプローブで mRNA の 1 分子イメージングに成功した。

本論文は、6 章より構成されている。第 1 章「序論」では、本研究の背景と、目的および概要が記載されている。第 2 章では「材料及び細胞の培養と実験手法」について述べられている。

第 3 章では、「FRAP による結合率定量的ための実験系構築」について述べられている。武田は、mRNA はアンチセンスプローブに比べて大きく、複数のタンパク質との巨大複合体であるため、アンチセンスプローブが mRNA に結合すると拡散が遅くなることに着目した。そして、光退色後蛍光回復法 (Fluorescence Recovery After Photobleaching, FRAP) を用いて、アンチセンスプローブの結合能を評価した。これを実現するために、蛍光強度の回復曲線を適切にフィッティングできる理論モデルについて検討を行い、そのモデルが要請する条件を満たす光学系を構築した。具体的には、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 を標的に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、自由拡散するアンチセンスプローブと、mRNA に結合したアンチセンスプローブの量を定量することに成功した。この量比を用いてアンチセンスプローブの結合能を評価するした。

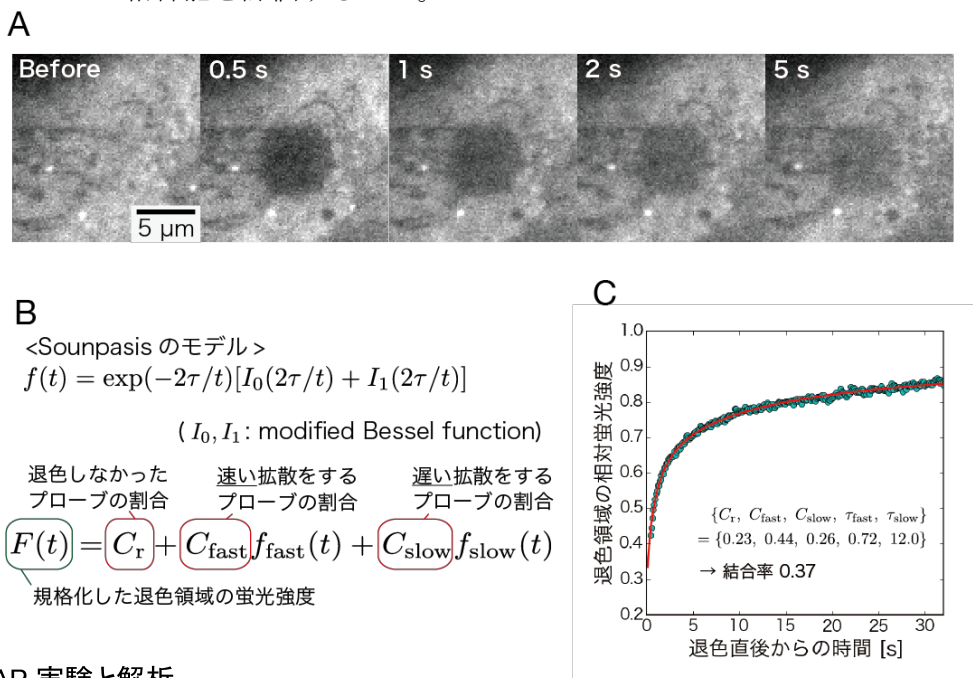


図 1. FRAP 実験と解析

A. GAPDH mRNA に対するプローブを用いた FRAP 像; B. 解析に用いる関数; C. フィッティング結果

第4章では、「GAPDH mRNA に対するプローブの設計と結合評価」について述べられている。武田は、GAPDH mRNA のコーディング領域を標的としたアンチセンスプローブ配列を複数選択した。まず、RNA の2次構造予測ソフトウェアである CentroidFold を用い、アンチセンスプローブが取る2次構造を予測した。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自己相補配列と定義した。可能な989の配列のうち自己相補配列が存在するものは834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。自己相補性が親和性に影響するか確かめるため、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 FRAP 実験により結合評価を行った(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 含有量やアンチセンス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* と細胞内ではアンチセンスプローブの結合能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重要性を確認した。さらに、beta-actin mRNA を標的としたアンチセンスプローブについても同様の結果を得た。

第5章では、「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」について述べられている。結合能の高いアンチセンスプローブを結合評価実験時に比して低濃度(0.75 μM)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。高い結合能を示したアンチセンス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。一方、低い結合能のアンチセンスプローブを用いると観察される輝点が少なくなった。さらに、Fluc mRNA を標的としたアンチセンス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、結合能の高いアンチセンスプローブを選択することにより内在性 mRNA の1分子レベルでの可視化が可能であることを示している。高結合能アンチセンスプローブを用いて観察された輝点の運動解析により、輝点の拡散係数は $0.15 \mu\text{m}^2/\text{s}$ と求められた。また、検出された輝点の輝度解析を行い、1分子の蛍光が観察されていることを確認した。

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 ATTO647N で標識された複数のアンチセンス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観察した。その結果、両方で観察される輝点の分布が重なることが観察された。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3)。同様の実験系で Cy3 標識 Fluc mRNA 標的アンチセンス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。以上の結果より、各種アンチセンス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。

第6章では、「総括及び今後の展望」について述べられている。本研究では、生細胞内でアンチセンス

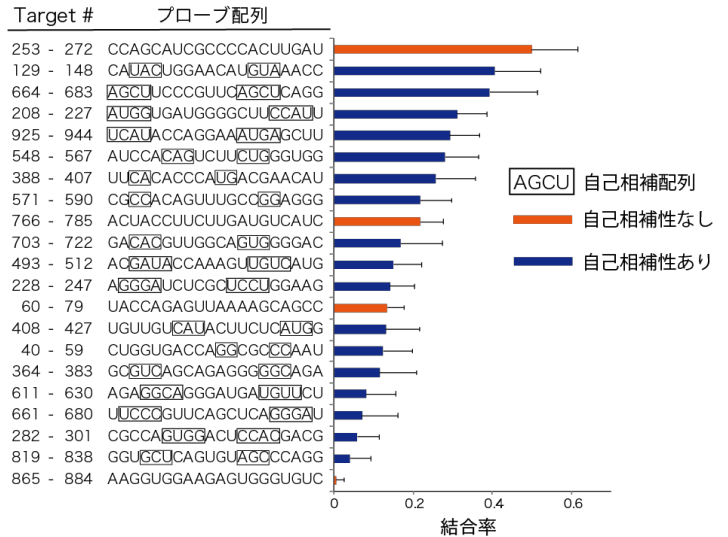


図2. GAPDH mRNA を標的としたプローブの結合評価 Target #は GAPDH mRNA コーディング領域の標的塩基部位を、四角で囲まれた配列は mRNA 二次構造予測による分子内結合形成部位を表す

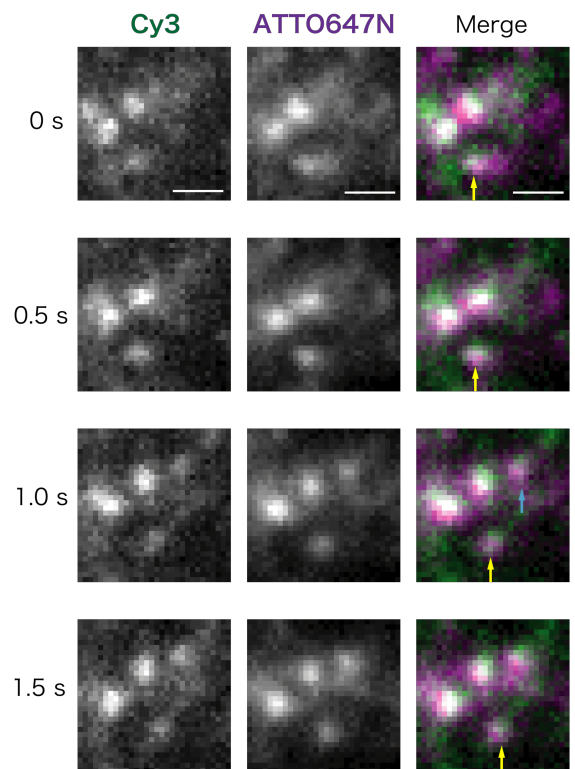


図3. 共局在した輝点が動く様子。黄色矢印は同じ輝点が動く様子を表し、青色矢印は0.5秒時点で観察されなかった輝点が1.0秒時点で観察されたことを表す。scale = 5 μm

核酸プローブの結合を定量する手法を確立した。これにより、高結合能のアンチセンスプローブをスクリーニングすることを可能にした。さらに、得られたアンチセンスプローブを用いて、内在性 mRNA の 1 分子イメージングを実現した。アンチセンスプローブを用いて任意の内在性 mRNA の 1 分子イメージングを実現したことにより、RNA 制御機構の解明への貢献が期待される。よって本論文は博士 (薬科学) の学位請求論文として合格と認められる。