

博士論文

論文題目 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

氏 名 菅原 皓

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

菅原 皓

目次

略記一覧	… 4
第1章 序論	
1-1 mRNA を介する遺伝子発現調節とストレス顆粒の形成	… 6
1-2 細胞内 mRNA の蛍光イメージング	… 8
1-3 蛍光分子の明滅を利用した一分子検出法	… 11
1-4 本論文の概要	… 12
第1章の図	… 15
第2章 材料及び方法	
2-1 細胞培養	… 20
2-2 蛍光標識線形アンチセンスプローブの調製	… 22
2-3 マイクロインジェクション法による生細胞内へのプローブ導入	… 25
2-4 細胞内タンパク質の免疫染色	… 25
2-5 細胞へのストレス負荷	… 27
2-6 RNA 干渉	… 28
2-7 リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)	… 29
2-8 超解像蛍光顕微鏡法	… 31
2-9 超解像蛍光顕微鏡画像を用いたナノスケール分子局在解析	… 33

2-10 蛍光一分子明滅測定	… 34
2-11 細胞内蛍光一分子追跡	… 36
2-12 一分子追跡結果を用いたナノスケール分子運動解析	… 38
2-13 蛍光相関分光法	… 40
第2章の図	… 41

第3章 ストレス顆粒内内在性 mRNA のナノスケール局在解析

3-1 序文	… 45
3-2 明滅を用いた超解像蛍光顕微鏡法の概要	… 46
3-3 明滅を用いた超解像蛍光顕微鏡法の性能評価	… 47
3-4 ストレス顆粒内内在性 mRNA の固定細胞超解像局在観察	… 48
3-5 ストレス顆粒内内在性 mRNA 高密度領域の自動検出	… 49
3-6 ストレス顆粒内内在性 mRNA 高密度領域のサイズと個数の解析	… 50
3-7 ストレス顆粒内内在性 mRNA の生細胞超解像局在観察	… 51
3-8 ストレス顆粒集合離散中の内在性 mRNA の生細胞超解像観察	… 52
3-9 小括	… 53
第3章の図	… 55

第4章 ストレス顆粒内内在性 mRNA のナノスケール運動解析

4-1 序文	… 66
4-2 混雑環境における明滅を利用した一分子追跡法	… 66

4-3	明滅型一分子追跡に適した色素の検討 (<i>in vitro</i>)	… 67
4-4	一分子追跡に適した明滅型色素の生細胞内検討	… 69
4-5	プローブ配列特異性の確認	… 70
4-6	mRNA 標的特異性の確認	… 71
4-7	検出輝点が mRNA 一分子由来であることの確認	… 71
4-8	ストレス顆粒内 GAPDH mRNA の一分子追跡および運動解析	… 72
4-9	ストレス顆粒内 mRNA ナノスケール局在と運動の同時観察	… 74
4-10	小括	… 74
	第 4 章の図	… 76
第 5 章 総括及び今後の展望		
5-1	本研究のまとめ	… 90
5-2	今後の展望	… 92
参考文献		… 94
謝辞		… 99

略記一覽

BSA	bovine serum albumin
DBSCAN	density-based spatial clustering of applications with noise
DEPC	diethyl pryocarbonate
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EMCCD	electron multiplying charge-coupled device
FCS	fluorescence correlation spectroscopy
FISH	fluorescence in situ hybridization
FLuc	firefly luciferase
FRET	fluorescence resonance energy transfer
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GFP	green fluorescent protein
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
MB	molecular beacon
mRNA	messenger RNA
mRNP	messenger ribonucleoprotein
MSD	mean square displacement
NA	numerical aperture
NHS	N-Hydroxysuccinimide
NMR	nuclear magnetic resonance
PALM	photoactivated localization microscopy
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
RISC	RNA induced silencing complex
RNA	ribonucleic acid
ROI	region of Interest
RT-PCR	reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SGs	stress granules

snRNA	small nuclear RNA
STED	stimulated emission depletion
STORM	stochastic optical reconstruction microscopy
TIRF	total internal reflection fluorescence
USDA	United States Department of Agriculture
βME	2-mercaptoethanol

第一章 序論

1-1. mRNA を介する遺伝子発現調節とストレス顆粒の形成

20 世紀は生命科学における飛躍の世紀であった。これまで正体が不明であった遺伝子の実体がデオキシリボ核酸 (DNA) であることが明らかにされた (Watson and Crick, 1953) ことを皮切りに、分子生物学は大きな発展を果たし、セントラルドグマに基づいた遺伝子発現の理解が急速に進んだ。21 世紀に入り、技術の進歩とともに生命科学は更なる発展を続けているが、依然として未解明な課題は数多い。生命現象のより深い理解を実現するには、生命現象を司る個々の分子の詳細な振る舞いを理解していく必要がある。

細胞内では核酸やタンパク質を含む様々な分子の織りなす多様な化学反応が生命現象を支えているが、中でもメッセンジャーリボ核酸 (mRNA) は DNA の持つ遺伝情報をリボソームへと伝達する役割を持ち、遺伝子発現において鍵となる分子である。真核細胞における遺伝子発現の全体像を図 1.1 に示した。核内で DNA から転写された mRNA 前駆体は、5'末端へのキャップ構造の付加、3'末端への poly(A)鎖の付加、スプライシングによるイントロンの除去を経て成熟 mRNA となる。成熟 mRNA は核膜孔を通じて細胞質へと輸送された後、リボソームによる翻訳を受けてタンパク質を生成する。不要となった mRNA は分解され、新たな生体分子の材料となる。このように、真核細胞内の mRNA は核内における転写・成熟過程、細胞質への輸送および局在過程、細胞質における翻訳・分解過程での多様な制御を受け、ロバストな細胞機能を実現している。mRNA を介した多様でダイナミックな遺伝子発現制御を支える構造的特徴として、図 1.2 に示したような RNA 顆粒の形成が知られる (Anderson and Kedersha, 2009) 。代表的な RNA 顆粒として、核スペックル・P-body・ストレス顆粒などが知られる。核スペックルは、多数のスプライシング因子や核内低分子 RNA(snRNA)を

含む核内構造体であり、mRNA 前駆体から成熟 mRNA を生成する成熟過程の核内ドメインとなっていると考えられている(Lamond and Spector, 2003)。P-body は細胞質に見られる RNA 顆粒であり、mRNA タンパク質複合体 (mRNP) の貯蔵や分解を担う(Parker and Sheth, 2007)。さらに、ストレス負荷依存的に形成される細胞質内 RNA 顆粒としてストレス顆粒が知られている。ストレス顆粒はストレス環境下で翻訳抑制機能を担うと考えられている(Anderson and Kedersha, 2002)。このように RNA 顆粒を介する mRNA の制御はそれぞれ細胞機能の維持において重要な役割を果たしており、その制御機構の解明を目指し世界中で研究が進められている。

本研究では以上の RNA 顆粒の中で特に、ストレス顆粒に着目して研究を行った。ストレス顆粒は熱や酸化ストレスなどのストレス負荷に応答して形成される直径 1 μm 程度の RNA 顆粒であり (図 1.3A)、顆粒構成因子として mRNA、RNA 結合タンパク質、翻訳開始因子などが知られている (図 1.3B)。また、ストレス顆粒の形成は神経変性疾患やウイルス感染と関与するという研究結果があり、基礎的な生命科学のみならず医学薬学的見地からも重要な研究テーマとなっている(Li *et al.*, 2013)。ストレス顆粒の構造上の特徴として、膜構造を持たず、顆粒内外を mRNA がシャトリングしている(Zhang *et al.*, 2011)という点があげられる (図 1.3C)。また、ストレス顆粒はストレス負荷に応じて迅速に形成・解離が生じる可逆的な構造体であり、数分から数十分という時間単位で翻訳抑制が行われている。これは、数時間もの時間を要する転写レベルでの制御と比べて短い時間スケールで展開される制御機構であり、ストレス環境下での素早い環境応答を実現するためにストレス顆粒の翻訳抑制機能が重要であることが示唆される。以上のことから、膜構造を持たない RNA 顆粒が介在することにより、細胞内での mRNA を介したダイナミックな遺伝子発現調節が実現されていると考えられる。分子生物学的手法を用いた先行研究により顆粒構成因子が多

く同定され、ストレス顆粒の翻訳抑制機能が明らかにされたが、ストレス顆粒の迅速かつ可逆的な形成・解離を支える物理的構造基盤については依然として不明である。そこで、本研究ではストレス顆粒内の mRNA に着目し、顆粒内部における詳細な局在や運動を解析することとした (図 1.4)。

1-2. 細胞内 mRNA の蛍光イメージング

mRNA を含め生体分子は、構造の決定、存在量の測定、あるいは局在や運動の可視化といった様々な側面から目的に応じて解析が行われる。特に、蛍光イメージング法は標的分子を蛍光標識することで、細胞内における分子の局在や運動を可視化でき、蛍光強度から存在量の測定を行うことも可能な有効な解析手法となっている。

mRNA の蛍光標識法の代表例として蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法 (Fluorescence *in situ* hybridization, FISH) が挙げられる (Rudkin and Stollar, 1977)。FISH 法では固定処理を行った細胞に対し、標的 mRNA と相補的な配列を持つ蛍光標識オリゴ DNA プローブを反応させ、未結合のプローブを洗い流すことで、細胞内で標的 mRNA を検出することが可能となる。さらに、一つの mRNA に対して複数のプローブを結合させ感度を高めることで、細胞内の mRNA の局在を一分子レベルで観察する Single-molecule FISH という技術も近年開発され (Femino *et al.*, 1998)、定量的な解析手法として注目を集めている。

蛍光イメージング法は細胞の破壊を伴わず、観察光による細胞毒性も少ない低侵襲的な手法であり、固定細胞のみならず生細胞内での解析も可能である。しかし、FISH 法は細胞固定処理や未結合プローブの洗浄操作が必要なため、生細胞内での mRNA 観察には適しておらず異なるアプローチがとられている。現在広く使われている mRNA 生細胞蛍光イメージング法として、MS2-GFP システムが知られる (図 1.5A)。MS2-GFP システムは遺伝子改変技術を用いて標的

mRNA にタグ配列を導入し、このタグ配列を認識する MS2 コートタンパク質を GFP と組み合わせて標的 mRNA を可視化する方法である(Bertrand *et al.*, 1998)。MS2-GFP システムの開発者である Singer R. H.らは mRNA 一分子にタグ配列を数十箇所導入することで、一分子 mRNA の可視化に成功した(Fusco *et al.*, 2003)。しかし、MS2-GFP システムでは標的 mRNA にタグ配列を遺伝子的に導入するため、内在性 mRNA と異なる挙動を示す可能性が否定できない。実際、MS2-GFP システムの利用により mRNA の分解が妨げられ、断片化した配列から意図しない検出結果が生じる可能性があることが近年報告されている(Garcia and Parker, 2015)。細胞質の mRNA は輸送・翻訳・分解といった様々な制御を受けており、上述したような分解の阻害やそれに起因する意図しないシグナルの検出は観察結果の解釈を困難にしてしまうと考えられる。そのため、MS2-GFP システムに代わる生細胞に応用可能な細胞内 mRNA 可視化手法が求められている。

生細胞内 mRNA を蛍光標識する他の手法として、FISH 同様に核酸同士の相補的な結合を利用した Molecular beacon (MB) が知られている(Tyagi and Kramer, 1996)。先述したように、生細胞内では未結合プローブを洗浄できないため、ノイズが増大してしまうという問題があるが、MB では蛍光色素とクエンチャーを組み合わせることでノイズの軽減を実現している (図 1.5B)。MB の構造は一本鎖のオリゴ DNA 配列であり、両端が自己相補鎖に、中央部が標的 mRNA と相補的な配列になっている。自己相補鎖が結合しループが形成されていると、MB は標的 mRNA に結合することができないが、自己相補鎖が解離していると、MB は標的 mRNA に結合することが可能となる。前者の状態では両末端にそれぞれ導入された蛍光色素とクエンチャーが近距離にあるため消光シグナルが検出されないが、後者の状態では蛍光色素がクエンチャーから離れるためシグナルが観察される。すなわち、MB は標的 mRNA への結合特異的に蛍光シグナルを得ることができるため、未結合プローブ由来のノイズを大幅に軽減することが

できる。MB は単独では一分子 mRNA を検出する感度を持たないが、MS2-GFP システムと同様に標的となる繰り返し配列を導入し標識を行うことで一分子 mRNA の可視化を実現した先行研究例がある(Vargas *et al.*, 2005)。しかし、この場合も mRNA を遺伝子改変しているため、先述した分解の阻害に伴う問題が生じる恐れがあり、細胞質での翻訳・分解過程のイメージングには適さない。

また、split GFP を用いることで細胞内内在性 mRNA の一分子蛍光イメージングを達成した例が報告されている(Yamada *et al.*, 2011)。Yamada らは RNA 結合タンパク質 Pumilio の RNA 認識部位のアミノ酸を標的 mRNA と結合するように置換し、隣接して結合した時に split GFP が会合して蛍光団を形成するような 2 種の Pumilio を設計し、細胞内内在性 β -actin mRNA の一分子蛍光イメージングを達成した(図 1.5C)。split GFP を用いた手法の抱える課題として、断片化した GFP が会合し一度蛍光団を形成すると、標的 mRNA が存在しなくても蛍光を発するため、翻訳や分解といった速いタイムスケールで生じる mRNA 制御の観察が難しいということが指摘されている(Tyagi, 2009)。

当教室の先行研究では、線形アンチセンスプローブと蛍光共鳴エネルギー移動(Fluorescence resonance energy transfer, FRET)を用いることで生細胞内内在性 mRNA の蛍光イメージングを実現した(Okabe *et al.*, 2011)。本手法では、標的 mRNA 配列に隣接して結合する二種の線形アンチセンスプローブを用い、隣接部位の末端にそれぞれ donor および acceptor となる色素を導入することで標的 mRNA 上に FRET が生じる環境を構築している(図 1.5D)。このような環境下では、標的 mRNA に 2 種のアンチセンスプローブが同時に結合した場合のみ FRET が観測されるため、FRET シグナルを検出することで未結合プローブ由来のノイズを軽減し生細胞内内在性 mRNA の蛍光イメージングを行うことができる。線形アンチセンスプローブは、内在性 mRNA を標的と出来るという点や、結合・解離の速度が速いという点が特長である。これらの特長を生かして、光退色後

蛍光回復法 (Fluorescence recovery after photobleaching, FRAP) を用いた解析により、ストレス顆粒内 mRNA のダイナミクスについて多分子の平均値を観測することに成功している (Zhang *et al.*, 2011)。しかし、一組の線形アンチセンスプローブのみではシグナル不足により十分な感度を得ることができず、線形アンチセンスプローブを用いた一分子 mRNA 蛍光イメージングおよび一分子 mRNA ダイナミクス解析は達成されていない。

以上の先行研究例で示したように、細胞内 mRNA のイメージングには感度をいかにして向上させるかという課題が常に存在する。特に、一分子 mRNA を観察するためには mRNA 一分子に対し数十ものプローブを導入してシグナルを増大させることや、未結合プローブ由来のノイズを極めて低い状態に保ち、一分子観察に十分なシグナルノイズ比を達成することが必要である。さらに、細胞質における翻訳や分解過程での mRNA イメージングを行う際には、遺伝子導入や標識に伴うアーティファクトを考慮に入れる必要がある。

1-3. 蛍光分子の明滅を利用した一分子検出法

本研究ではストレス顆粒内 mRNA を一分子レベルで観察し、ナノメートルスケールで分子の局在と運動を解析することを目的としているが、既存の一分子 mRNA 検出法をストレス顆粒に適用するには大きな障壁がある。それは、既存の手法がいずれも標的 mRNA のシグナルを同時に取得する方法であるという点である。ストレス顆粒内で mRNA は極めて高密度 (~ 100 molecules/ μm^2) で存在しているため、これらを同時に可視化するとストレス顆粒内で蛍光シグナルが重なりあい、全体的にぼやけた画像しか取得できない。ストレス顆粒のような混雑した環境下で一分子由来の蛍光シグナルを分離して取得するには、各フレームで一部の蛍光分子のみを活性化してシグナルを取得する必要がある。そこで、本研究では蛍光分子の明滅現象に着目した。従来、蛍光分子の明滅現象は

観察の妨げになると考えられていたが、10年ほど前にその有用性が見出され、回折限界を克服した蛍光観察が可能となる超解像蛍光顕微鏡法が開発された (Betzig *et al.*, 2006; Rust *et al.*, 2006)。明滅を用いた一分子検出法の概要は以下のとおりである。明滅性能を持つ蛍光分子を利用し、各フレームで一部の分子のみを明状態とすることで、回折限界以内で一分子由来の蛍光シグナルを分離して取得することが可能となる。各フレームで得られた一分子由来の蛍光シグナルに対し、重心位置決定を行うことで、ナノメートルスケールで分子の位置を決定することができる。明滅を用いた超解像蛍光顕微鏡法では以上の手順を数万フレームにわたり繰り返し、最終的に約20ナノメートルの空間分解能で超解像画像を得ることが可能となっている。

本研究では、線形アンチセンスプローブと明滅を用いた一分子検出法を組み合わせることで、ストレス顆粒内内在性 mRNA の詳細な局在と運動をナノメートルスケールで明らかにすることを目的とした。

1-4. 本論文の概要

本論文はストレス顆粒内内在性 mRNA の局在と運動をナノメートルスケールで解析する手法とその結果をまとめたものである。これまで観察が不可能であったストレス顆粒内 mRNA の一分子検出を、線形アンチセンス核酸プローブと明滅性能を持つ色素を組み合わせることにより達成し、ストレス顆粒内における mRNA のナノメートルスケールでの局在と運動を初めて明らかにした。

第一章では、mRNA を介した遺伝子発現調節の重要性について概説し、特にストレス環境下で形成される RNA 顆粒であるストレス顆粒研究についてその現状と課題をまとめた。また、ストレス顆粒内において mRNA の解析を行うにあたり、これまで開発されてきた mRNA の蛍光イメージングによる可視化法につ

いて各手法の特徴を簡単にまとめた。最後に、既存の mRNA 可視化法ではストレス顆粒内 mRNA の一分子観察が困難であることを説明し、明滅を用いた一分子蛍光検出法がその解決策となりうることを示した。

第二章では、本研究で行った実験・解析方法の詳細と使用した試薬・装置などについて記した。

第三章では、ストレス顆粒内内在性 mRNA のナノスケール局在解析についてその手法と結果をまとめた。本研究で局在解析に用いた超解像蛍光顕微鏡法の性能評価を行った上で、線形アンチセンスプローブと超解像蛍光顕微鏡法を組み合わせることでストレス顆粒内の内在性 mRNA を観察できることを示した。また、得られた超解像観察の結果に対しクラスター検出を行い、mRNA がストレス顆粒内でナノメートルスケールの高密度領域を形成していることを明らかにした。さらに、ストレス顆粒内内在性 mRNA の生細胞超解像観察を行い、mRNA 高密度領域のダイナミックな局在変化を明らかにした。

第四章では、ストレス顆粒内内在性 mRNA のナノスケール運動解析を行うにあたり、新たに開発した細胞内内在性 mRNA 一分子追跡法と本手法を用いた解析結果をまとめた。明滅を用いた一分子追跡に最適な蛍光色素を *in vitro* および生細胞内で検討し、2MeSiR を線形アンチセンスプローブと組み合わせて用いることで、効率よく細胞内内在性 mRNA の一分子追跡を行うことが可能であることを示した。また、本手法のプローブ配列特異性、mRNA 配列特異性、および検出輝点が一分子 mRNA 由来であることを確認し、本手法が細胞内 mRNA 一分子追跡法として適切であることを実証した。さらに、本手法を用いてストレス顆粒内内在性 GAPDH mRNA の一分子追跡を行い、ストレス顆粒内における mRNA のナノメートルスケールでの運動を明らかにした。最後に、ストレス顆粒内内在性 mRNA の局在と運動を生細胞内で同時に観察し、mRNA 高密度領域と mRNA 一分子運動の関係を結びつけて考察した。

第五章では、本研究を総括し、本研究の結果から期待される今後の展望について記した。

巻末に、本研究で参考にした文献を一覧にしてまとめた。

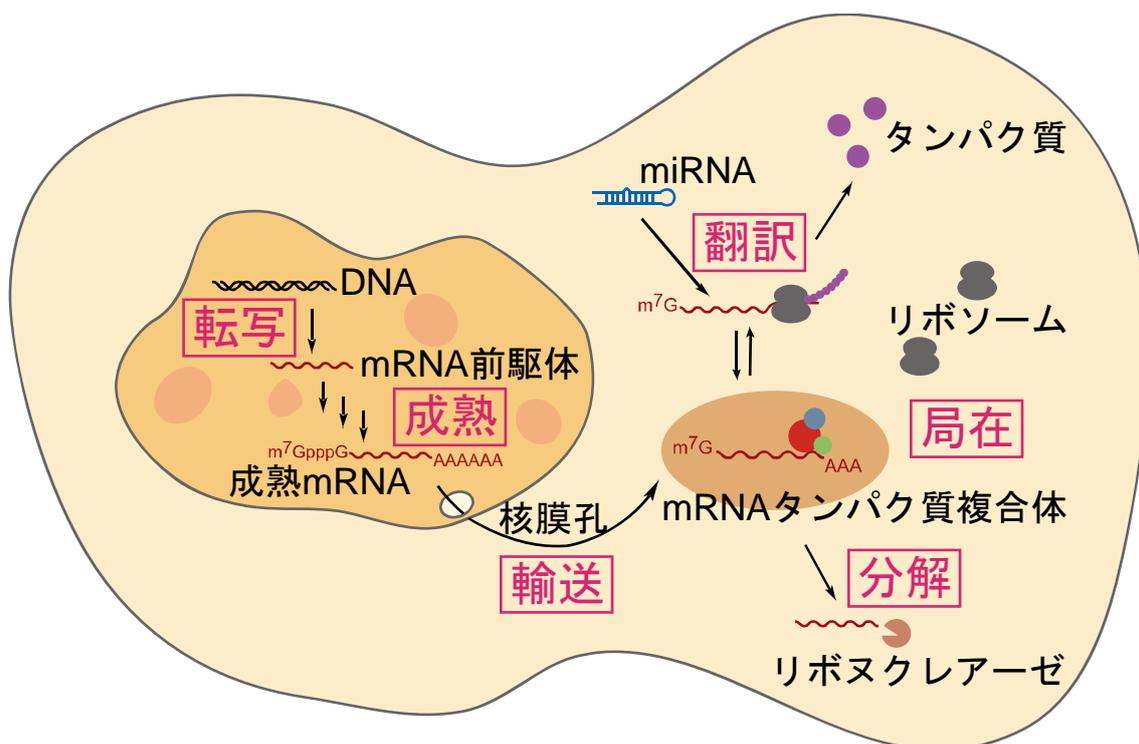


図 1.1 真核細胞における遺伝子発現の全体像

遺伝情報は核内 DNA から転写され mRNA 前駆体が生成される。成熟過程を経た後、mRNA は細胞質へと輸送され適切な場所へ局在化する。細胞質で翻訳因子などのタンパク質と会合し複合体となった mRNA は、リボソームによる翻訳を受けて目的タンパク質を生成する。また、不要になった mRNA はリボヌクレアーゼによって分解され新たな生体分子の材料として再利用される。

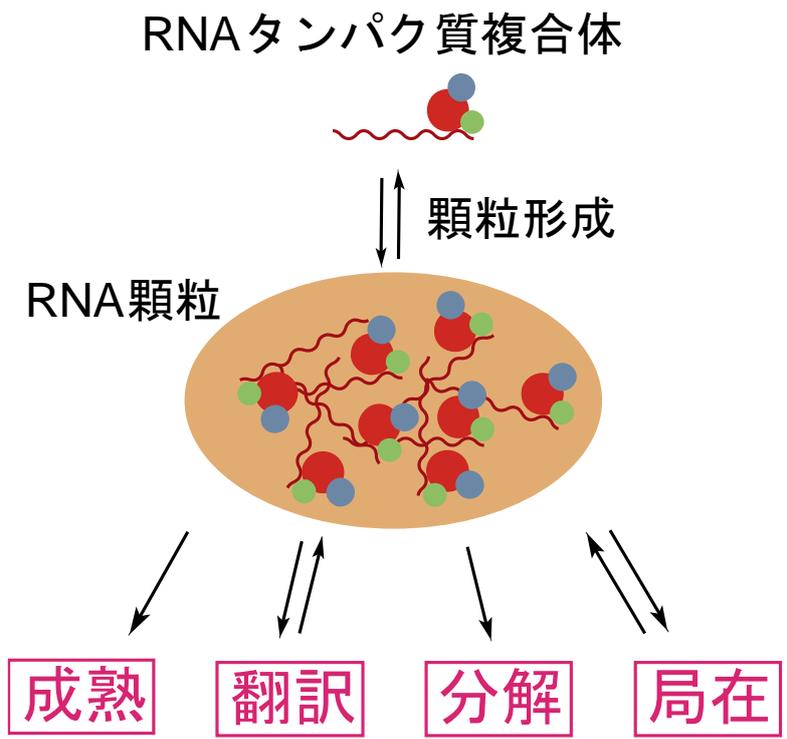


図 1.2 RNA 顆粒形成を介した遺伝子発現の制御

RNA 顆粒の形成は核内における mRNA の成熟過程、および細胞質における翻訳・分解・局在過程での遺伝子発現制御に重要な役割を果たすと考えられている。

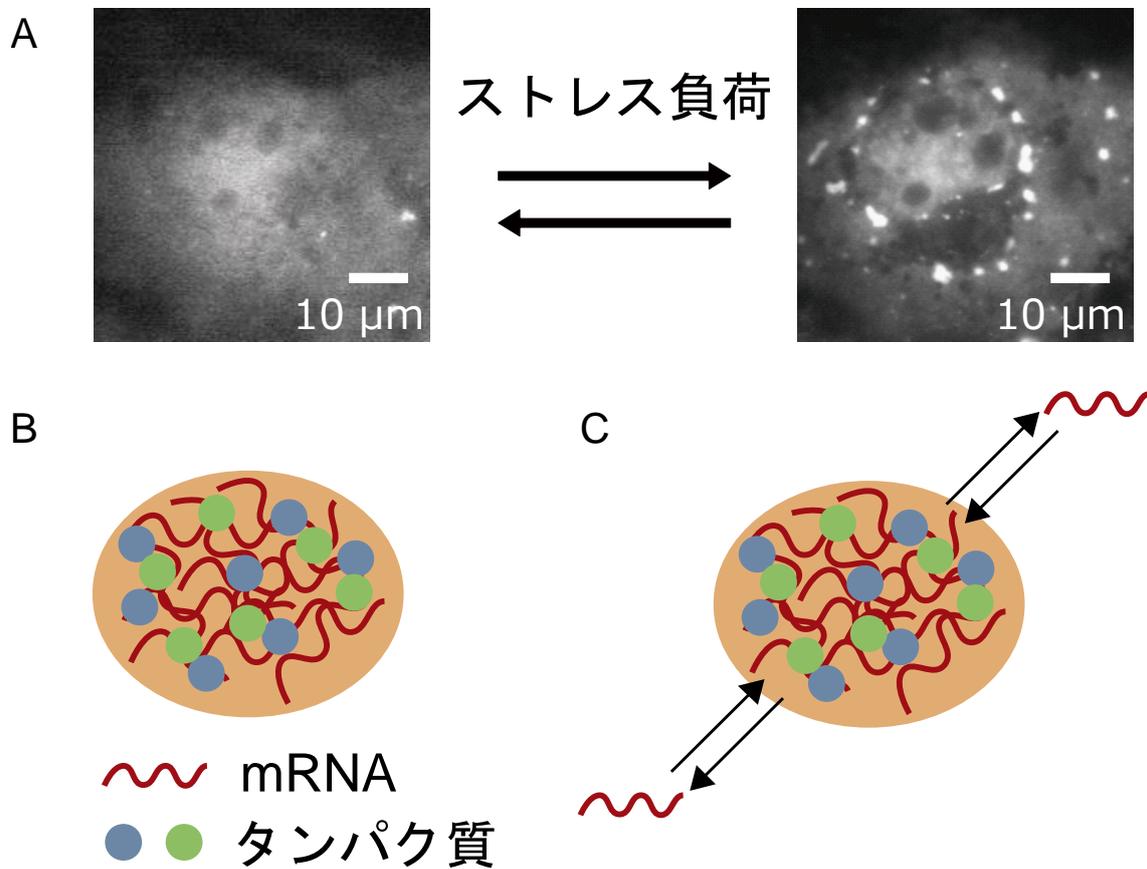
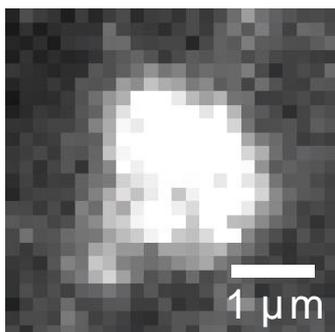


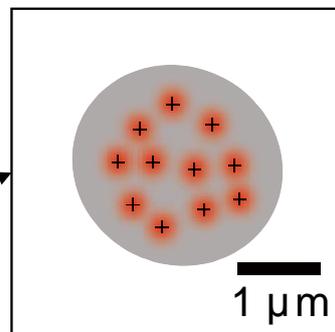
図 1.3 ストレス顆粒の形成

- A** ストレス顆粒形成の様子. Sodium arsenite 刺激によりストレス顆粒を形成させた時の、poly(A)⁺ mRNA の蛍光像.
- B** ストレス顆粒は mRNA、RNA 結合タンパク質、翻訳開始因子などで構成されている.
- C** ストレス顆粒内外を mRNA はシャットリングしている.

ストレス顆粒内 内在性mRNA



局在解析



運動解析

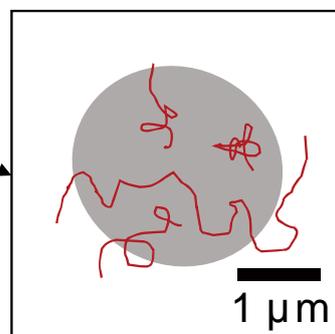


図 1.4 本研究の目的

本研究では、回折限界を克服した蛍光イメージング法により、ストレス顆粒内における内在性 mRNA の局在と運動をナノメートルスケールで明らかにすることを目的とした。

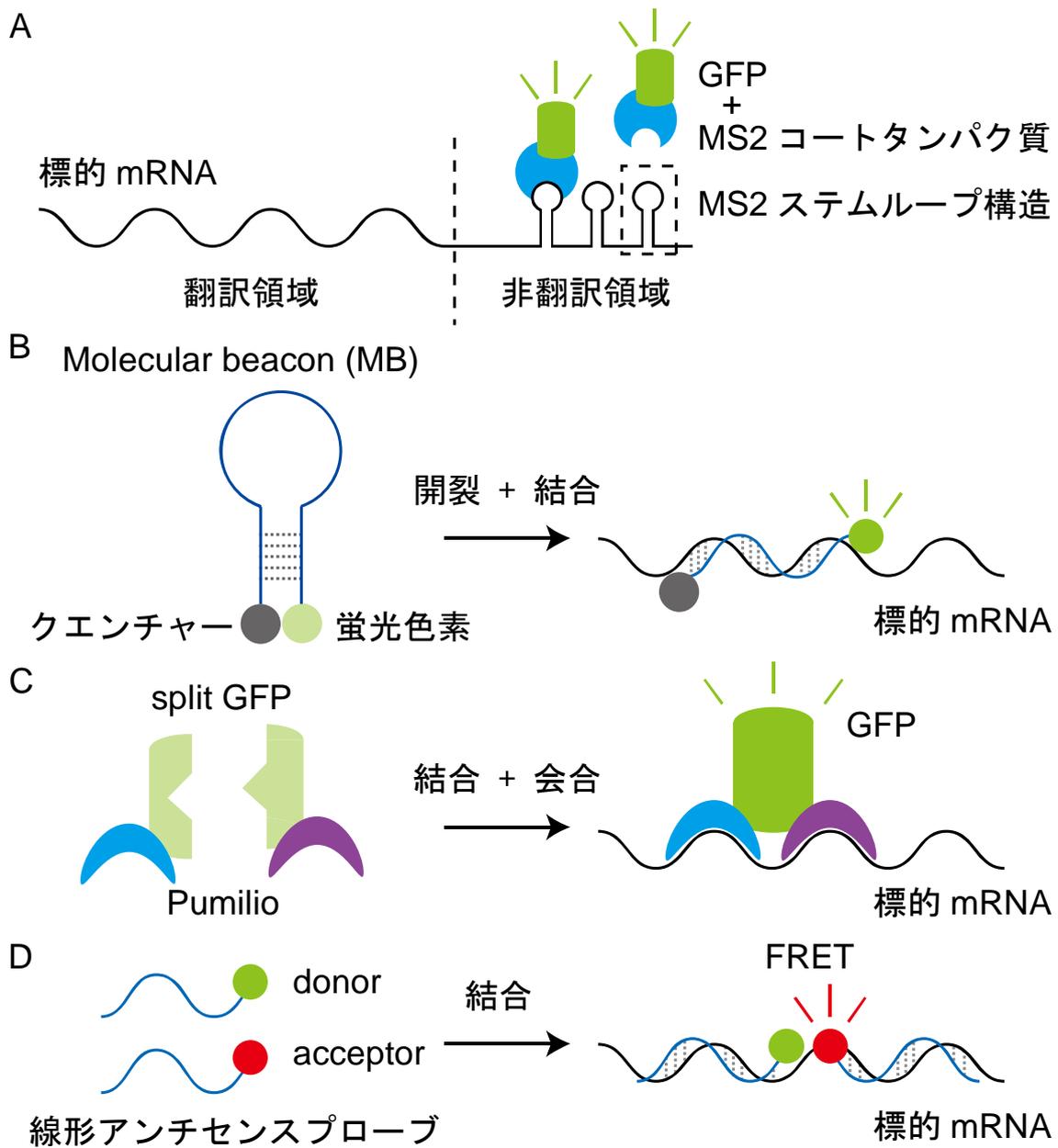


図 1.5 既存の細胞内 mRNA 蛍光標識法

A MS2-GFP システムによる標識.

B Molecular beacon (MB)による標識.

C split GFP による標識.

D 線形アンチセンスプローブによる標識 (FRET を用いた検出法).

第二章 材料と方法

2-1. 細胞培養

本研究では培養細胞株としてアフリカミドリザル腎臓由来の COS7 細胞を用いた。本研究において使用した COS7 細胞株は、理化学研究所バイオリソースセンター細胞材料開発室 (RIKEN BRC) より提供を受けた。細胞培養は、以下のプロトコルに従って行った。

◆ COS7 細胞の継代プロトコル

1. 付着性細胞用表面処理済 100 mm 細胞培養ディッシュ (Cell Culture Dishes, TC treated surface; IWAKI) 上で CO₂ インキュベーター (37°C, 5% CO₂; MCO-19AIC(UV), SANYO) にて培養した COS7 細胞 (10 mL 培地 (DMEM, high glucose, Gibco) で培養、100% コンフルエント) から培地を吸引除去し、10 mL PBS (9.57 mM, pH7.35~7.65, Takara) で洗浄した。
2. 洗浄用 PBS を吸引除去した後、0.05% Trypsin-EDTA, no Phenol Red (Gibco) in PBS を 500 µL 加え、CO₂ インキュベーター (37°C, 5% CO₂; MCO-19AIC(UV), SANYO) にて 3 分間静置した。
3. ディッシュをタップして細胞をディッシュ表面から剥がした。
4. 10 mL DMEM 培地を加えて懸濁操作を行った後、50 mL チューブ (Sterile 50mL Plastic Conical Centrifuge Tube with CentriStar Screw Cap; Corning) へと移した。
5. 遠心機 (テーブルトップ遠心機 4000; KUBOTA) を用いて 190g にて 5 分間遠心分離を行った。
6. 上清を吸引除去し、10 mL DMEM 培地をチューブに加えて細胞を懸濁した。

7. 新しい 100 mm 細胞培養ディッシュにて、細胞懸濁液が 1/20 となるように DMEM 培地を 9.5 mL、細胞懸濁液を 0.5 mL それぞれ加えた。
8. CO₂ インキュベーター (37°C) にて培養し、4 日後に再び継代を行った。

◆ COS7 細胞顕微鏡観察用サンプルの準備

1. 継代プロトコルの手順 7 にて、35 mm ガラスベースディッシュ (グリッド付 ガラスベースディッシュ, カバーガラス厚 No.1S タイプ (0.15~0.18 mm); IWAKI) を用いて、細胞懸濁液が 1/10 程度となるように DMEM 培地を 1.8 mL、細胞懸濁液を 0.2 mL それぞれ加えた。細胞懸濁液の濃度は実験までの時間に応じて適宜調整を行った。上記の比率で混ぜた場合、72 時間程度で 100% コンフルエントとなる。
2. 蛍光観察におけるフェノールレッドの影響をなくするため、顕微鏡観察の前に DMEM 培地を DMEM-HEPES 培地 (DMEM, high glucose, HEPES, no Phenol Red; Gibco) に交換した。

◆ 培地の組成

DMEM 培地 :

- DMEM, high glucose (Gibco)
- 10% fetal bovine serum, qualified, USDA-approved regions (Gibco)
血清非働化 (56°C 30 分間) 処理済み
- 50 U/mL penicillin-50 µg/mL streptomycin (Gibco)
- 2 mM L-glutamine (Gibco)
- 1 mM sodium pyruvate (Gibco)
- MEM non-essential amino acids (Gibco)
0.1 mM glycine
0.1 mM L-alanine
0.1 mM L-asparagine
0.1 mM L-aspartic Acid
0.1 mM L-glutamic Acid

- 0.1 mM L-proline
- 0.1 mM L-serine
- 55 μ M 2-mercaptoethanol (β ME; Gibco)

DMEM-HEPES 培地：

- DMEM, high glucose, HEPES, no phenol red (Gibco)
- 10% fetal bovine serum, qualified, USDA-approved regions (Gibco)
血清非働化 (56°C 30 分間) 処理済み
- 50 U/mL penicillin-50 μ g/mL streptomycin (Gibco)
- 2 mM L-glutamine (Gibco)
- 1 mM sodium pyruvate (Gibco)
- MEM non-essential amino acids (Gibco)
0.1 mM glycine
0.1 mM L-alanine
0.1 mM L-asparagine
0.1 mM L-aspartic acid
0.1 mM L-glutamic acid
0.1 mM L-proline
0.1 mM L-serine
- 55 μ M 2-mercaptoethanol (β ME; Gibco)

2-2. 蛍光標識線形アンチセンスプローブの調製

本研究では細胞内 mRNA の蛍光標識に際し、安定な人工核酸である 2'OMe RNA を骨格に持つオリゴヌクレオチドである線形アンチセンスプローブを用いた (図 2.1)。線形アンチセンスプローブの配列として、mRNA の poly(A)鎖を標的とした poly(U)₂₂ 配列、COS7 細胞内の GAPDH mRNA を標的とした配列 (GAPDH 標的配列)、およびネガティブコントロールとして COS7 細胞内には存在しないホタルルシフェラーゼ mRNA を標的とした配列 (FLuc 標的配列) を用いた。以上の配列の詳細は表 2.1 にまとめた。線形アンチセンスプローブの蛍光標識は、Cy5 標識については既に標識済みのプローブを購入し、他の標識に

については 5'末端にアミノ基を導入したプローブを購入し、各蛍光色素の N-Hydroxysuccinimide (NHS) エステルと反応させることで標識を行った。Cy5 標識 poly(U)₂₂ 配列およびアミノ基導入 poly(U)₂₂ 配列は FASMAC から購入し、アミノ基導入 GAPDH 標的配列、アミノ基導入 FLuc 標的配列は日本バイオサービスから購入した。アミノ基を介した線形アンチセンスプローブの蛍光標識は以下のプロトコルに従って行った。

◆ アミノ基導入線形アンチセンスプローブの蛍光標識

1. 乾燥状態のプローブを 100 μM となるように RNase-free water (DEPC-Treated Water; Ambion)に溶解した。
2. 以下の組成の反応溶液を 1.5 mL チューブ内で調整し、振盪しながら室温で 3 時間反応を行った。

100 μM	線形アンチセンスプローブ	10 μL
0.1 M	蛍光色素 NHS エステル	1 μL
0.1 mM	ホウ酸バッファー (pH 8.5)	1 μL
Total		12 μL

3. 反応後、以下の組成で反応溶液を調整し、-20°Cで 30 分間静置しエタノール沈殿を行った。

	手順 2 で得られた反応溶液	12 μL
	RNase-free water	88 μL
3 M	酢酸ナトリウムバッファー (pH 5.5)	10 μL
100%	冷エタノール	275 μL
Total		385 μL

4. 微量高速遠心機 (CF15RX II 形; HITACHI) を用いて、4°C、15 分、15,000 rpm という条件で遠心分離を行った。
5. マイクロピペットを用いて上清を除いた後、80%冷エタノールを 1 mL 加え、

微量高速遠心機を用いて、4°C、15分、15,000 rpm という条件で遠心分離を行った。

6. マイクロピペットを用いて上清を除いた後、遠心エバポレーターを用いて40°Cで10分間乾燥を行った。
7. 乾燥後、10 μ L の RNase-free water に溶解し、-20°Cで保存した。

蛍光標識済みの線形アンチセンスプローブについて、以下のプロトコルに従い、吸光光度計（V-570 UV/VIS/NIR Spectrophotometer; JASCO）を用いたプローブ濃度と標識率の測定を行った。

◆ 蛍光標識線形アンチセンスプローブの濃度と標識率の測定

1. 約 100 μ M の蛍光標識線形アンチセンスプローブを 4.5 μ L とり、95.5 μ L の RNase-free water と混和した。
2. 吸光光度計を用いて 250~750 nm の範囲の吸収スペクトルを取得した。
3. 蛍光色素由来のシグナルを補正した後の 260 nm の吸光度から RNA の濃度を、各色素の最大吸収波長の吸光度から色素の濃度を算出した。色素の濃度を核酸の濃度で除算することにより、プローブの蛍光標識率を求めた。

本研究で用いた線形アンチセンスプローブの蛍光標識率はいずれも 50~100% 程度であった。

本研究では細胞質の mRNA に着目して観察を行ったため、線形アンチセンスプローブの 3'末端に導入されている Biotin と Streptavidin を反応させ、プローブの細胞核への移行を抑制した。吸光法により求めたプローブ濃度に基づき、プローブ 3'末端の Biotin と Streptavidin が 1:8 のモル比となるように混合し、室温で 20 分間反応させた。

調製した線形アンチセンスプローブ溶液は-20℃で保存した。

2-3. マイクロインジェクション法による生細胞内へのプローブ導入

蛍光標識線形アンチセンスプローブの細胞内への導入はマイクロインジェクション法を用いて行った。専用チップ (Microloader; Eppendorf) を用いてプローブを充填したインジェクション用ガラス製針 (Femtotips II; Eppendorf) をインジェクター (Femtojet Microinjector; Eppendorf) に取り付け、マニピュレーター (Micromanipulator, Eppendorf) により操作することでマイクロインジェクションを行った。インジェクションに先立ち、各実験で用いる濃度となるようにインジェクション溶液 (80 mM KCl, 10 mM K₂PO₄, 4 mM NaCl, pH 7.2) で希釈した後、フィルターチューブ (0.22 μm 遠心式フィルターユニット; Millipore) を用いて、遠心ろ過を行った。超解像蛍光顕微鏡法による局在解析においては、プローブ濃度を 3~10 μM に調整して用い、一分子追跡法による運動解析においては、プローブ濃度は 0.3~1 μM に調整して用いた。

2-4. 細胞内タンパク質の免疫染色

超解像蛍光顕微鏡法で用いたサンプルの免疫染色は以下のプロトコルに従って行った。

◆ 免疫染色のプロトコル

※ 溶液交換はアスピレーターにより前の溶液を吸引除去した後に行った。

1. ガラスベースディッシュ (35 mm ガラスベースディッシュ, カバーガラス厚 No.1 タイプ(0.12~0.17mm); IWAKI) 上で CO₂ インキュベーター (37℃) にて培養した COS7 細胞 (2 mL DMEM 培地で培養、~80% コンフルエント) か

- ら培地を除去し、PBS を 1.5 mL 加え 1 回洗浄した。
2. 化学固定溶液(3% paraformaldehyde (Sigma Aldrich) and 0.1% Glutaraldehyde (Sigma Aldrich) diluted in PBS)を 1.5 mL 加えて 37°Cで 10 分間固定処理を行った。
 3. PBS を 1.5 mL 加え 1 回洗浄した。
 4. 0.2% Triton X100 (SIGMA) を加え、膜透過処理を行った。
 5. PBS を 1.5 mL 加え 1 回洗浄した。
 6. 10% Goat Serum を 100 μ L 加え、37°Cで 60 分間ブロッキング反応を行った。
 7. 一次抗体を Can get signal Solution A (TOYOBO)にて 80 倍希釈したものを 80 μ L 加え、37°Cで 60 分間反応させた。
 8. 1 回洗浄した。
 9. 0.2% Triton X100 を 1.5 mL 加え、室温にて 5 分間振盪しながら 1 回洗浄した。
 10. PBS 1.5 mL により、室温にて 5 分間振盪しながら 2 回洗浄した。
 11. 蛍光標識二次抗体を solution A にて 80 倍希釈したものを 80 μ L 加え、37°Cで 60 分間反応させた。
 12. PBS を 1.5 mL 加え、1 回洗浄した。
 13. 0.2% Triton X100 を 1.5 mL 加え、室温にて 5 分間振盪しながら 1 回洗浄した。
 14. PBS 1.5 mL により、室温にて 5 分間振盪しながら 2 回洗浄した。
 15. 化学固定溶液を 1.5 mL 加え、37°Cで 10 分間反応させた。
 16. PBS を 1.5 mL 加え、1 回洗浄した。
 17. 0.1% (1 mg/mL) 水素化ホウ素ナトリウム (NaBH_4) を 1.5 mL 加え、室温で 7 分間反応させた。
 18. 0.2% Triton X100 を 1.5 mL 加え、1 回洗浄した。
 19. PBS を 1.5 mL 加え、1 回洗浄した。
 20. 20,000 倍希釈した蛍光ビーズ (0.1 μm Fluorescent Beads 580/605, Invitrogen)

溶液 100 μ L を加え、室温で 1 分間反応させた。

21. PBS 1.5 mL により、3 回洗浄した。
22. イメージング溶液 (2.25 mg/mL glucose, 25 U/mL catalase, 25 U/mL glucose oxidase, 71.5 mM β ME in PBS) 200 μ L を加え、カバーガラスで封入した。

2-5. 細胞へのストレス負荷

ストレス顆粒を形成させるにあたり、Sodium arsenite (FLUKA) を用いて COS7 細胞へのストレス負荷を行った。マイクロインジェクション法により線形アンチセンスプローブの導入を行った後、ガラスベースディッシュ内の培地を、最終濃度 0.5 mM となるよう Sodium arsenite を溶解した HEPES-DMEM 培地に交換し、CO₂ インキュベーター (37°C) 内で静置した。固定サンプルについては、ストレス負荷後一定時間経過後に以下のプロトコルに従って化学固定処理を行い、観察試料とした。生細胞サンプルについては、ストレス負荷後一定時間経過後に観察を行った。

◆ 化学固定のプロトコル

※ 溶液交換はアスピレーターにより前の溶液を吸引除去した後に行った。

1. 35 mm ガラスベースディッシュ (IWAKI) 上でマイクロインジェクション法によりプローブを導入した COS7 細胞 (2 mL DMEM 培地で培養、~80% コンフルエント) から培地を吸引除去し、PBS を 1.5 mL 加え 1 回洗浄した。
2. 化学固定溶液(3% paraformaldehyde (Sigma Aldrich) and 0.1% Glutaraldehyde (Sigma Aldrich) diluted in PBS)を 1.5 mL 加えて 37°C で 10 分間固定処理を行った。
3. PBS 1.5 mL により、3 回洗浄した。

4. イメージング溶液(2.25 mg/mL glucose, 25 U/mL catalase, 25 U/mL glucose oxidase, 71.5 mM β ME in PBS)を 200 μ L 加え、カバーガラスで封入した。

2-6. RNA 干渉

COS7 細胞内 GAPDH mRNA を標的とした siRNA3 種について、日本バイオサービスに受託合成を依頼して準備を行った。siRNA の配列を表 2.2 にまとめた。以下の手順に従ってアニーリングを行った。

◆ アニーリングの手順

1. 予め RNase-free water により 50 μ M となるよう溶解した一本鎖 siRNA2 種 (Sense 鎖と Antisense 鎖) をそれぞれ 30 μ L と 5 \times アニーリングバッファー (500 mM potassium acetate, 150 mM HEPES-KOH pH 7.4, 10 mM magnesium acetate) 150 を混合した。
2. サーマルサークルを用いて溶液を 90 $^{\circ}$ C で 1 分間加熱し、スピンドウン後にサーマルサイクラーを用いて 37 $^{\circ}$ C で 60 分間静置した。
3. アニーリング後の溶液は-20 $^{\circ}$ C で保存した。

アニーリング後、以下の手順で siRNA のトランスフェクションを行った。

◆ siRNA トランスフェクションの手順 (イメージング用サンプル)

1. 前日にガラスベースディッシュ (グリッド付ガラスベースディッシュ, カバーガラス厚 No.1S タイプ (0.15~0.18 mm); IWAKI) に COS7 細胞を播種し、トランスフェクション時に~30%コンフルエントとなるように準備をした (培地量: 2 mL/well)。
2. X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent (Roche)を用いて、siRNA 濃度が 0.4

μM となるように溶液調整を行い、各ウェルに $200\ \mu\text{L}$ ずつ添加した。同時に、ネガティブコントロールとして siRNA を含まない溶液を同様に調製し各ウェルに $200\ \mu\text{L}$ ずつ添加した。

3. CO_2 インキュベーター (37°C) に戻し、48 時間経過後にイメージングを行った。

◆ siRNA トランスフェクションの手順 (リアルタイム RT-PCR 用サンプル)

1. 前日に 96 well プレート (Nuncell ションの手順 (リアルタイムマイクロウェルプレート; Thermo Scientific) に COS7 細胞を播種し、トランスフェクション時に~30%コンフルエントとなるように準備をした (培地量: $150\ \mu\text{L}/\text{well}$)。
2. X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent (Roche)を用いて、siRNA 濃度が $0.4\ \mu\text{M}$ となるように溶液調整を行い、各ウェルに $30\ \mu\text{L}$ 添加した。同時に、ネガティブコントロールとして siRNA を含まない溶液を同様に調製し各ウェルに $30\ \mu\text{L}$ ずつ添加した。
3. CO_2 インキュベーター (37°C) に戻し、48 時間経過後にリアルタイム RT-PCR による定量解析を行った。

2-7. リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)

リアルタイム RT-PCR による COS7 細胞内 GAPDH mRNA の定量はリアルタイム PCR システム (LightCycler 480; Roche) を用いて行った。以下に細胞溶解・逆転写・リアルタイム PCR の各ステップについて詳細な手順を示す。

◆ 細胞溶解

1. siRNA のトランスフェクション操作を行った 96 well プレート上の COS7 細胞に RealTime ready Cell Lysis Kit (Roche) に従い作製した反応溶液を各ウェ

ルに 40 μL ずつ添加し、室温で 5 分間静置し細胞溶解液 (Total RNA) を得た。

反応溶液の組成

Realtime ready Lysis Buffer	39.5 μL
Protector RNase Inhibitor	0.5 μL
Total volume	40.0 μL

◆ 逆転写

1. Transcriptor Universal cDNA Master (Roche) を用いて、Total RNA から cDNA を得た。逆転写反応に際し、サーマルサイクラーを以下の設定で使用した。

アニーリング	29°C	10 分
逆転写反応	55°C	10 分
変性失活	85°C	5 分
冷却	4°C	-

反応溶液の組成

Water, PCR Grade	12.5 μL
Transcriptor Universal Reaction Buffer	4.0 μL
Transcriptor Universal Reverse Transcriptase	1.0 μL
Heat-labile nuclease	0.5 μL
Template RNA	2.0 μL
Total volume	20.0 μL

◆ リアルタイム PCR

1. リアルタイム PCR システム (LightCycler 480; Roche) と LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche) を用いて、cDNA から逆転写前の mRNA 量を定量した。リアルタイム PCR の反応プロトコルおよび反応溶液の組成は以下のとおりである。また、本実験で用いた GAPDH および β -Actin のプライマーセットを表 2.3 にまとめた。

	サイクル数	温度	時間
熱変性	1	95°C	5 分
増幅	45	95°C	10 秒
		55°C	10 秒
		72°C	10 秒
Melting	1	95°C	-
		65°C	1 分
		95°C	-
冷却	1	50°C	10 秒

反応溶液の組成

Water, PCR Grade	8.8 μ L
2x Master Mix	10.0 μ L
Forward primer	0.1 μ L
Reverse primer	0.1 μ L
cDNA	1.0 μ L
Total volume	20.0 μ L

- ターゲットとして GAPDH mRNA を、リファレンスとして β -Actin mRNA を用いて、サイクル数の差をコントロールと比較した。

2-8. 超解像蛍光顕微鏡法

本研究では、超解像蛍光顕微鏡法として Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)や Photoactivated localization microscopy (PALM)に代表されるローカリゼーション法を用いた。マイクロインジェクション法により線形アンチセンスプローブを導入したガラスベースディッシュ上の COS7 細胞につい

て、倒立型顕微鏡（NSTORM; Nikon）による斜光照明顕微鏡法を用いて、超解像蛍光顕微鏡法による観察を行った。蛍光標識は酸素除去酵素系（2.25 mg/mL glucose, 25 U/mL catalase, 25 U/mL glucose oxidase）と還元剤（71.5 mM β ME）の存在下で安定した明滅性能を示す Cy5 を固定細胞での観察に使い、生細胞観察では酸素の除去や還元剤の添加が必要なく明滅性能を示す HMSiR を用いた。観察開始前に視野全体をレーザー（647 nm; MPB Communications; 700 mW/cm²）により励起し、色素を明滅状態へと導いた。撮影には EMCCD カメラ（iXon3 Ultra897; Andor）を用い、以下の条件で観察した画像を記録した。

◆ 超解像蛍光顕微鏡法における顕微鏡観察条件

- 励起光：647 nm, 700 mW/cm²
- 対物レンズ：100 倍油浸レンズ（Apo TIRF, oil x100, NA 1.49; Nikon）
イメージセンサーのピクセルサイズは 16 μ m であり、100 倍の対物レンズを用いるとピクセルサイズは試料面において 160 nm に相当する。
- フィルターセット：NSTORM 用フィルターセット
- pre-amp ゲイン：1.0
- EM ゲイン：300
- 露光時間：16 ms（設定値）、18 ms（実測値）
- 撮影枚数：10,000 フレーム以上
- 温度：23°C（固定細胞）、37°C（生細胞）
- 照明方法：斜光照明法

生細胞観察にあたっては観察中の温度維持にあたり、インキュベーション機能付きステージ（INUH-TIZSH-F1; TOKAIHIT）を用いた。

超解像蛍光顕微鏡法における一分子検出と重心位置解析には、NSTORM 付属

のソフトウェアを用いた。NSTORM 解析で用いたパラメータを以下に示した。また、ステージのドリフト補正は NSTORM 付属のソフトウェアを用いて行い、試料面に吸着させた蛍光ビーズの検出結果から補正が適切に行われていることを確認した。

◆ 超解像蛍光顕微鏡法における NSTORM 解析パラメータ

Min. Height:	500
Max. Height:	20000
CCD Baseline:	800
Min. Width:	200 (nm)
Max. Width:	800 (nm)
Initial Fit Width:	400 (nm)
Max. Axial Ratio:	1.5
Max. Displacement:	1.0 (pix)

また、ローカリゼーション法による超解像観察結果の妥当性を確認する目的で行った誘導放出制御顕微鏡法 (Stimulated emission microscopy, STED) による超解像観察は、超解像レーザー顕微鏡システム (Leica TCS STED CW; Leica Microsystems) を用いて行った。

2-9. 超解像蛍光顕微鏡画像を用いたナノスケール分子局在解析

超解像蛍光顕微鏡法により得られた重心位置データに基づき、ストレス顆粒内 mRNA の局在をナノメートルスケールで解析した。重心位置データの集合に対し、クラスター検出を行うことで mRNA 高密度領域の抽出を行った。クラスター検出のアルゴリズムとして、密度に基づいた検出が可能な Density-based spatial clustering of applications with noise (DBSCAN) を利用した。DBSCAN では、距離 ϵ 以内の点を隣接点として繋いでゆき、隣接点の数が p 以上となれば高密

度領域として認識する (図 2.2)。本研究では、一定の基準で mRNA 高密度領域を抽出するために ε と p をそれぞれ 25 nm、100 と固定した。これは空間分解能上分離できない範囲に 10 分子以上が密集している領域に相当する。

2-10. 蛍光一分子明滅測定

カバーガラス上での蛍光一分子明滅測定は 5'末端蛍光標識 3'末端 Biotin-Streptavidin 結合 poly(U)₂₂ 2'OMeRNA 線形アンチセンスプローブを用いて行った。サンプル作製の手順は以下のプロトコルのとおりである。

◆ 蛍光一分子明滅測定用サンプルの作製

1. 18 mm x 18 mm カバーガラス (No. 1S, Matsunami) をプラズマリアクター (FEMTO plasma cleaner, Diener electronic) に 15 分間かけてガラス上のゴミを取り除いた。
2. パラフィルムの上に 3 mg/mL Biotin 化 BSA を 5 μ L 添加し、プラズマ処理済みのカバーガラスをかぶせ、室温で 3 分間吸着させた。
3. PBS を 1.5 mL により、3 回洗浄した。
4. 溶液を吸引除去し、パラフィルムの上に 50 nM 5'末端蛍光標識 3'末端 Biotin-Streptavidin 結合 poly(U)₂₂ 2'OMeRNA 線形アンチセンスプローブを添加し、Biotin 化 BSA 処理済みのカバーガラスをかぶせ、室温で 3 分間結合させた。
5. PBS 1.5 mL により、3 回洗浄した。
6. イメージング溶液 (14.3 mM β ME in PBS) 15 μ L をスライドガラス上に添加し、カバーガラスをかぶせた後マニキュアで封入した。

上記の手順で調製したサンプルを用いて、倒立型顕微鏡（NSTORM; Nikon）による全反射蛍光顕微鏡法を用いて、Cy5, ATTO647N および 2MeSiR の蛍光一分子明滅測定を行った。撮影には EMCCD カメラ（iXon3 Ultra897; Andor）を用い、以下の条件で観察した画像を記録した。

◆ 蛍光一分子明滅測定における顕微鏡観察条件

- 励起光：647 nm, 17.5 mW/cm²
- 対物レンズ：100 倍油浸レンズ（Apo TIRF, oil x100, NA 1.49; Nikon）
イメージセンサーのピクセルサイズは 16 ユニツトであり、100 倍の対物レンズを用いるとピクセルサイズは試料面において 160 nm に相当する。
- フィルターセット：NSTORM 用フィルターセット
- pre-amp ゲイン：1.0
- EM ゲイン：300
- 露光時間：16 ms（設定値）、18 ms（実測値）
- 撮影枚数：10,000 フレーム
- 温度：室温（23℃）
- 照明方法：全反射照明法

上記の条件で、各色素について 3 視野以上データを取得した後、解析を行った。解析の手順は以下のとおりである。

◆ 蛍光一分子明滅測定における画像解析手順

1. 画像処理ソフトウェア ImageJ (Schneider *et al.*, 2012)上で 10,000 フレームの連続画像ファイルを開いた。
2. 全フレームの Max Projection を得ることにより、輝点の位置を抽出し Region

of interest (ROI)を設定・記録した。

3. 各 ROI について 10,000 フレームの蛍光強度変化を解析した。
4. 各 ROI について、バックグラウンドの輝度値を基準に設定した大まかな閾値を元にして暗状態のフレームを判定し、500 フレームの暗状態データからノイズのレベルを取得し、シグナルノイズ比が 5 以上となる点を明状態と判定するように閾値を設定した。
5. 各 ROI の各フレームについて、手順 4 で設定した閾値を元に明状態/暗状態を判定し、明滅回数、一回の明滅イベントにおける明状態の長さ、一回の明滅イベントにおける暗状態の長さ、1 フレームあたりに発する光子数といったパラメータを算出した。ここで、輝度値から光子数への変換は、pre-amp ゲインおよび EM ゲインから算出し、本実験における変換効率は 0.24 (photons/count)であった。
6. 上記の手順で取得した各色素の明滅測定データについて、平均値を算出し色素の明滅性能の比較を行った。

2-11. 生細胞内蛍光一分子追跡

マイクロインジェクション法により線形アンチセンスプローブを導入したガラスベースディッシュ上の COS7 細胞について、倒立型顕微鏡 (NSTORM; Nikon) による斜光照明顕微鏡法を用いて、Cy5, ATTO647N および 2MeSiR を用いた生細胞内蛍光一分子追跡を行った。撮影には EMCCD カメラ (iXon3 Ultra897; Andor) を用い、以下の条件で観察した画像を記録した。

◆ 生細胞内蛍光一分子追跡における顕微鏡観察条件

- 励起光：647 nm, 35 mW/cm²

- 対物レンズ：100倍油浸レンズ（Apo TIRF, oil x100, NA 1.49; Nikon）
イメージセンサーのピクセルサイズは16 μm であり、100倍の対物レンズを用いるとピクセルサイズは試料面において160 nmに相当する。
- フィルターセット：NSTORM用フィルターセット
- pre-amp ゲイン：1.0
- EM ゲイン：300
- 露光時間：16 ms（設定値）、18 ms（実測値）
- 撮影枚数：10,000 フレーム以上
- 温度：37°C
- 照明方法：斜光照明法

観察中の温度維持にあたり、インキュベーション機能付きステージ（INUH-TIZSH-F1; TOKAIHIT）を用いた。

Cy5, ATTO647N, 2MeSiR の生細胞内一分子追跡性能の評価にあたっては、以下の手順で解析を行った。

◆ Cy5, ATTO647N, 2MeSiR の生細胞内一分子追跡性能の評価

1. 20,000 フレーム取得した画像のうち、8001~12000 フレームの画像を抽出した。これは、励起開始後144秒~216秒に相当し、大半の分子が初期明状態から暗状態（可逆的暗状態または不可逆的退色）へと移行している時間である。
2. Gaussian blur 法によるノイズ除去を行った。
3. NSTORM 解析ソフトウェアにより、一分子検出および重心解析を行った。
4. ImageJ のプラグイン TrackMate (<http://fiji.sc/TrackMate>) を利用し、一分子追跡を行った。追跡アルゴリズムは、Nearest Neighbor 法を用い、連続フレーム

において近傍 400 nm 以内の点を結ぶことで軌跡を得た。

5. 得られた軌跡の中で、720 ms 以上追跡できた軌跡の数を各色素についてカウントし、比較を行った。

2-12. 一分子追跡結果を用いたナノスケール分子運動解析

GAPDH mRNA を標的とした 2MeSiR 標識線形アンチセンスプローブを用いて細胞内 mRNA の一分子追跡を行い、得られた画像を以下の手順で解析した。

◆ 細胞内 mRNA の一分子追跡解析手順

1. 一分子追跡画像取得を開始する前に、落射照明法により細胞全体の蛍光顕微鏡画像を取得した。
2. 2-10 で示した観察条件を用いて、30,000 フレームの一分子追跡画像を取得した。
3. 30,000 フレーム取得した画像のうち、25,001~30,000 フレームの画像を抽出した。これは、励起開始後 450 秒~540 秒に相当し、大半の分子が初期明状態から暗状態（可逆的暗状態または不可逆的退色）へと移行している時間であり、ストレス顆粒内のような混雑した領域においても一分子由来のシグナルを分離して取得できる状態を実現できる。
4. Gaussian blur 法によるノイズ除去を行った。
5. NSTORM 解析ソフトウェアにより、一分子検出および重心解析を行った。
6. ImageJ のプラグイン TrackMate を利用し、一分子追跡を行った。追跡アルゴリズムは、Nearest Neighbor 法を用い、連続フレームにおいて近傍 400 nm 以内の点を結ぶことで軌跡を得た。
7. 得られた軌跡の中で、720 ms 以上追跡できた軌跡を抽出した。
8. 一分子追跡画像取得前に撮影しておいた落射照明法による蛍光顕微鏡を用

いて、細胞核とストレス顆粒の位置をそれぞれ抽出し、ROI を設定・記録した。

9. 細胞核とストレス顆粒の ROI に基づいて、追跡結果を核内・ストレス顆粒内・細胞質に分類した。
10. 各軌跡について平均二乗変位 (mean square displacement, MSD) を計算した。MSD は以下の式で定義される。

$$\text{MSD}(t = n \cdot \Delta t) = \langle \Delta r(t)^2 \rangle = \frac{\sum_{i=1}^{N-n} [(x_{i+n} - x_i)^2 + (y_{i+n} - y_i)^2]}{N-n} \quad (1)$$

11. 2 フレーム目~10 フレーム目の 9 フレームの MSD の傾きから拡散係数 D を計算した。
12. 閾値よりも小さい拡散係数をもつ軌跡を静止状態、大きい拡散係数を示す軌跡を運動状態とした。閾値は、空間分解能 (~50 nm) から理論的に計算される値 $D_{\text{threshold}} = (0.05 \mu\text{m})^2 / (4 \times 9 \times 0.018 \text{ s}) \sim 0.004 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ を用いた。
13. 運動状態の軌跡について、以下の関数でフィッティングを行い、 τ が閾値よりも小さいものを制限された拡散、残りを自由拡散に分類した。

$$\text{MSD}(t) = \frac{4R_{\text{conf}}^2}{3} (1 - e^{-t/\tau}) \quad (2)$$

ただし、領域半径を R_{conf} とし、 D_{conf} を $\tau = (R_{\text{conf}}^2 / 3D_{\text{conf}})$ を満たす値とする。

14. 自由拡散に分類された軌跡については MSD の傾きから D_{diff} を計算した。

$$\text{MSD}(t) = 4D_{\text{diff}} t \quad (3)$$

15. 以上のようにして分類された各軌跡の MSD について平均と標準誤差を算出し、MSD と時間の関係をプロットした。
16. 分類結果に基づき静止・制限された拡散・自由拡散それぞれの運動様式の割合を求めた。
17. 制限された拡散に分類された軌跡について制限領域半径 (R_{conf}) と拡散係数 (D_{conf}) を算出し、自由拡散に分類された軌跡について拡散係数 (D_{diff}) を算出した。

18. 手順9で分類した結果に基づき、ストレス顆粒内とストレス顆粒外細胞質の一分子追跡結果を比較した。

2-13. 蛍光相関分光法

線形アンチセンスプローブの結合/未結合状態における拡散係数を測定するために、蛍光相関分光法（Fluorescence correlation spectroscopy; FCS）を利用した。FCSを用いて共焦点領域内における蛍光シグナルの相関をマイクロ秒単位で解析することにより、対象分子の拡散係数を見積もることが可能となる。

GAPDH mRNAを標的とした2MeSiR標識線形アンチセンスプローブを用いて細胞内 mRNAを標識し、細胞質におけるプローブの拡散係数を測定した。

FCSのデータ取得にはレーザー顕微鏡システム（Leica TCS SP8 SMD; Leica Microsystems）を用いた。FCSのデータ解析にはSymPhoTime 64（Picoquant）を用いた。

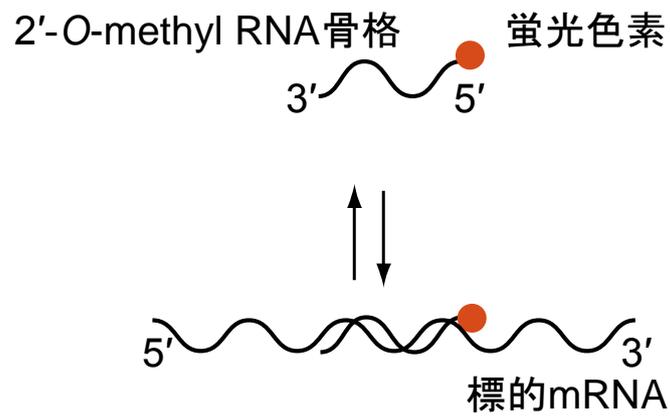
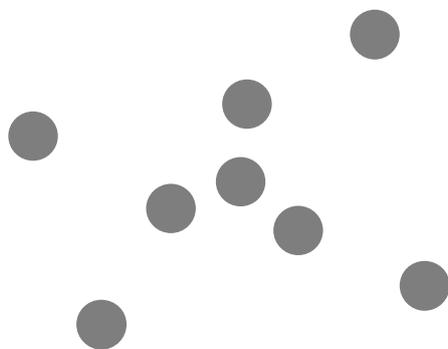


図 2.1 線形アンチセンスプローブの標的 mRNA への結合

線形 2'OMe RNA プローブは配列依存的に標的 mRNA と速やかに結合する。

輝点位置情報



解析結果

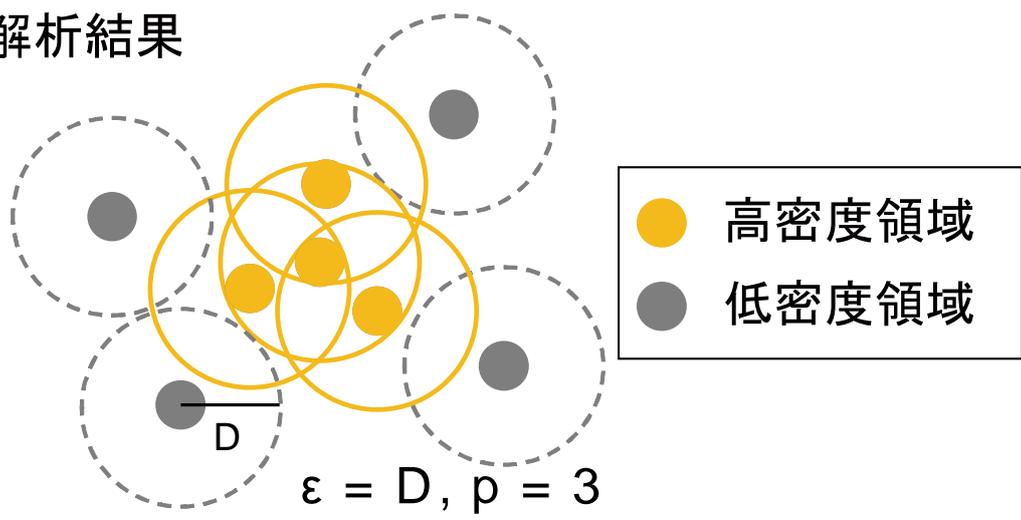


図 2.2 DBSCAN による高密度領域検出例

DBSCAN では距離 ϵ 以内にある点を隣接点としてつなぎ、隣接点の数が p 以上となった領域を高密度領域として認識する。

表 2.1 本研究で用いた線形アンチセンス 2'OMe RNA プローブの塩基配列

配列名	塩基配列
poly(U) ₂₂ 配列	5' -蛍光分子-UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU-biotin-3'
GAPDH 標的配列	5' -蛍光分子- AGCUUCCCGUUCAGCUCAGG -biotin-3'
FLuc 標的配列	5' -蛍光分子- GUUGUUUUGGAGCACGGAAA -biotin-3'

表 2.2 本研究で用いた GAPDH siRNA の塩基配列

配列番号	塩基配列
配列 1	21 mer オーバーハング: UU
	(Sense) 5' CUGGUAAGUGGAUAUUGUUU 3'
	(Antisense) 5' ACAUAUCCACUUUACCAGUU 3'
配列 2	20 mer オーバーハング: UU
	(sense) 5' GCCAAAAGGGUCAUCAUCUU 3'
	(Antisense) 5' GAUGAUGACCCUUUUGGCUU 3'
配列 3	21 mer オーバーハング: UU
	(sense) 5' CUCAUUUCCUGGUAUGACAUU 3'
	(Antisense) 5' UGUCAUACCAGGAAAUGAGUU 3'

表 2.3 リアルタイム PCR 用プライマーセット

ターゲット	塩基配列
GAPDH	20 mer
(Forward)	5' TGGGTGTGAACCATGAGAAG 3'
(Reverse)	5' CTGTGGTCATGAGTCCTTCC 3'
β -Actin	20 mer
(Forward)	5' TAAGGAGAAGCTGTGCTACG 3'
(Reverse)	5' AGGAAGGAAGGTTGGAAGAG3'

第三章 ストレス顆粒内内在性 mRNA のナノスケール局在解析

3-1. 序文

第一章で述べたように、mRNA は遺伝子発現において DNA からリボソームへの遺伝情報の伝達を担っており、核内における転写・成熟過程、細胞質への輸送、細胞質における翻訳・分解といった様々な過程で適切な制御を受けることにより生命機能を支えている。細胞質における翻訳・分解過程では、核内の転写・成熟過程と比べて速やかな遺伝子発現調節を行うことが可能であり、この迅速な制御は急激な環境変化が起きた際の細胞応答に重要な役割を果たしていることが知られる。細胞がストレスを受けた際の mRNA の制御機構として、ストレス顆粒の形成が知られている。ストレス顆粒は熱や酸化ストレスなどのストレス負荷に応答し、細胞質にて可逆的に形成される直径 1 マイクロメートル程度の RNA 顆粒であり、構成因子として mRNA、RNA 結合タンパク質、翻訳開始因子などが知られている (Anderson and Kedersha, 2006)。また、構造的な特徴としてストレス顆粒は膜構造を持たず mRNA が顆粒内外をシャトリングしていることが光退色後蛍光回復法 (Fluorescence recovery after photobleaching, FRAP) を用いた先行研究により明らかにされている (Zhang *et al.*, 2011)。ストレス顆粒の果たす機能については、構成因子を同定した先行研究の結果から、翻訳抑制による迅速な遺伝子発現パターンの変化を通じてストレス時における細胞防御に寄与していると考えられている (Anderson and Kedersha, 2008)。しかし、この迅速な応答の構造基盤と考えられる可逆的な顆粒形成を成立させる物理的機構は未だ明らかにされていない。この原因として、光学顕微鏡法の空間分解能は光の回折限界により制限されており、ストレス顆粒内の mRNA やタンパク質の詳細な局在を観察することが不可能であったということが挙げられる。

そこで、本研究では超解像蛍光顕微鏡法と蛍光標識線形アンチセンスプローブを用いた内在性 mRNA の可視化法を組み合わせることにより、ストレス顆粒内で mRNA のナノスケール局在を明らかにすることとした。

3-2. 蛍光の明滅を用いた超解像蛍光顕微鏡法の概要

光学顕微鏡観察において、空間分解能は二つの物体を分離して観察することが可能な距離を示し、顕微鏡の性能を示す重要な指標の一つである。空間分解能はいくつか定義の方法があるが、ここでは J. W. Strutt による定義である「レイリーの分解能」を採用する。レイリーの分解能は、エアリーディスクに基づいて 2 輝点を分離可能とする距離を定義した値であり、以下の式で表される。

$$\delta = 0.61 \lambda / NA \quad (\text{式 3.1})$$

ここで、 δ : 空間分解能、 λ : 観察光の波長、NA : 開口数 (Nuclear Aperture) である。

高性能の油浸対物レンズであっても開口数は 1.5 程度が限界であるため、空間分解能は観察光の波長の半分程度に制限される。例えば、500 nm の波長の光を発する輝点を NA 1.49 の高開口数対物レンズで観察した場合、理論的な空間分解能は約 200 nm となり、この距離よりも近接して存在する 2 輝点は分離できない (図 3.1)。近年、この回折限界の壁を克服した超解像蛍光顕微鏡法が相次いで開発された。超解像蛍光顕微鏡法には大別して 3 種類の方法が存在する。一つ目は、構造化照明顕微鏡法 (Structured illumination microscopy, SIM) と呼ばれ、縞状の励起光を照射することにより、通常の励起光観察では失われてしまう観察光の高周波成分を取得し、約 100 ナノメートルの空間分解能を実現している (Gustafsson, 2000)。二つ目は、誘導放出制御顕微鏡法 (Stimulated emission

microscopy, STED) と呼ばれる共焦点顕微鏡法に基づく手法で、励起光のスポット径を誘導放出により狭めることに成功し、約 50 ナノメートルの空間分解能を達成している(Klar and Hell, 1999)。三つ目は、ローカリゼーション法と呼ばれ、蛍光分子の明滅現象と一分子重心解析法を組み合わせることにより、約 20 ナノメートルの空間分解能を実現している(Betzig *et al.*, 2006; Rust *et al.*, 2006)。本研究では、一分子観察を基盤として構築され、最も高い空間分解能を達成しているローカリゼーション法をストレス顆粒内内在性 mRNA のナノスケール局在解析に採用することとした。ローカリゼーション法は 2006 年に、二つのグループによってほぼ同時に達成された技術であり、Betzig らは蛍光タンパク質の光活性化を用いた Photoactivated localization microscopy (PALM) (Betzig *et al.*, 2006)を、Rust らはシアニン系蛍光色素の明滅を用いた Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) (Rust *et al.*, 2006)をそれぞれ発表した。図 3.2 に本研究で用いたローカリゼーション法による超解像画像取得手順の概要を示す。図 3.2A において左の画像は Sodium arsenite によりストレス顆粒を形成させ、固定処理を行った後の mRNA 蛍光像である。まず、強い励起光により蛍光分子を明滅状態へと誘導する (図 3.2A 中央)。明滅が安定し、一分子由来のシグナルを分離して観察できるようになったところで、観察を行う。図 3.2A 右図では、ストレス顆粒を含む領域を拡大して示した。黄色の点線で囲った領域がストレス顆粒であり、混雑した環境下でも各蛍光分子を分離して検出できていることを示している。蛍光分子は明滅を繰り返しているため、各フレームでは異なる分子が明状態となって観察される。この条件下で連続画像撮影を行った後、得られた数万枚の画像に対して輝点検出、ガウシアンフィッティングによる重心決定を行うことで、最終的に超解像画像を再構成する (図 3.2B)。

3-3. 明滅を用いた超解像蛍光顕微鏡法の性能評価

本研究で用いた超解像イメージング法の性能評価を行った。図 3.3 は抗 α -tubulin 抗体および Cy5 標識二次抗体を用いて標識した COS7 細胞内微小管の観察例である。図 3.3A に従来の蛍光顕微鏡法による蛍光像を、図 3.3B に超解像蛍光顕微鏡法による観察結果を示した。従来の蛍光顕微鏡法と比較すると、十分分離できていなかった微小管を分離して観察できるようになっていることがわかる。

本手法の空間分解能を定量的に評価した。空間分解能の評価には、ローカリゼーション法による超解像蛍光顕微鏡法の空間分解能の指標として一般的に用いられている重心位置決定精度を用いた(Huang *et al.*, 2008)。重心位置決定精度の解析手順及び結果を図 3.4 に示した。まず、観察を行った際に、検出点が疎な領域から一分子由来の検出点群だと考えられる領域を抽出し、x 方向・y 方向それぞれについて平均値からのずれ $dx \cdot dy$ を求めた (図 3.4A)。数百個の輝点について dx および dy を算出し、統計処理により得られたヒストグラムを正規分布に近似して得られる半値幅を重心位置決定精度とした。以上の手順で解析を行ったところ、本手法の空間分解能は 25 ナノメートルであった (図 3.4B)。

3-4. ストレス顆粒内内在性 mRNA の固定細胞超解像局在観察

本研究では、明滅を用いた超解像蛍光顕微鏡法を用いてストレス顆粒内 poly(A)⁺ mRNA の超解像観察を行った。図 3.5A は従来の蛍光顕微鏡法で観察したストレス顆粒の拡大図である。この領域を超解像観察した結果が図 3.5B になる。従来の蛍光顕微鏡法では空間分解能が制限されているためストレス顆粒全体に mRNA が分布しているように見えるが、超解像蛍光顕微鏡法によりナノメートルスケールで局在観察を行った結果、ストレス顆粒内には mRNA が高密度

で存在している領域と低密度で存在している領域があり、ストレス顆粒内では mRNA が密度差を持った不均一な分布を示すことを発見した。本結果は、ストレス顆粒内 mRNA の観察に超解像蛍光顕微鏡法を導入したことによって初めて明らかになった結果である。

ローカリゼーション法による観察結果の妥当性を確認するために、STED 法によるストレス顆粒内 poly(A)⁺ mRNA の超解像観察を行った。STED 法による観察の結果、ローカリゼーション法で得られたようにストレス顆粒内で mRNA が密度差を持って分布している様子が観察された (図 3.6)。また、STED 法ではローカリゼーション法とくらべて全体的にぼけた画像が得られたが、これはローカリゼーション法と STED 法の空間分解能がそれぞれ約 20 ナノメートルおよび約 50 ナノメートルということを見ると妥当な結果である。

3-5. ストレス顆粒内内在性 mRNA 高密度領域の自動検出

mRNA が高密度で集積している箇所に着目し、高密度領域のサイズと個数について定量解析を行うこととした。mRNA 高密度領域を手動で抽出し解析を行うと、抽出結果にばらつきが生じ定量解析の結果に影響を及ぼすと考え、一定の基準で定量解析を行うために高密度領域の自動検出法を検討した。超解像観察で得られたデータは重心位置情報の集合により成り立っていることから、クラスター解析の手法が応用できると考えた。アルゴリズムを検討した結果、Density-based spatial clustering of applications with noise (DBSCAN) (Ester *et al.*, 1996)が高密度領域の抽出に適していることがわかった。DBSCAN は密度に基づくクラスター分類手法であり、距離 ϵ 以内の点を隣接点として繋いでゆき、隣接点の数が p 以上となれば高密度領域として判断する (図 2.2)。DBSCAN を用いる際は、これら二種のパラメータの値を設定する必要があるが、本研究では一

定の検出基準で解析を行うために、 ϵ を 25 ナノメートル、 p を 100 と固定した。これは本研究で用いた超解像蛍光顕微鏡法の空間分解能（25 ナノメートル）で分離できない範囲に 10 分子以上が密集している領域に相当する。

DBSCAN を用いてストレス顆粒内 mRNA 高密度領域の自動検出を行った。図 3.7A は一つのストレス顆粒の領域を拡大した poly(A)⁺ mRNA の超解像画像である。高密度領域をわかりやすくするため、白黒反転して表示を行った。図 3.7B の検出結果を見ると、図 3.7A で黒く塊となっている領域を検出できていることがわかる。同様の方法を用いて、様々なサイズのストレス顆粒内で検出を行った。

3-6. ストレス顆粒内内在性 mRNA 高密度領域のサイズと個数の解析

自動検出の結果に基づいて、高密度領域とストレス顆粒サイズの関係について定量解析を行った。図 3.8 に示したように高密度領域の個数はストレス顆粒のサイズが大きくなるに従って増大した。一方、図 3.8 に示したように高密度領域のサイズはストレス顆粒のサイズに依らず、直径約 70 ナノメートルという一定の値を示した。この結果から、大きなサイズのストレス顆粒は一定のサイズ（直径約 70 ナノメートル）の高密度領域が集合することによって形成されていると考えることができ、mRNA 高密度領域はストレス顆粒内で構造的単位となって存在していることが示唆された。先行研究により、ストレス顆粒の形成・成熟過程において、初期には小さなストレス顆粒が多数存在し、時間が経過するにつれて個々のストレス顆粒のサイズが増大するとともに顆粒の数が減少するという結果が得られている(Zhang *et al.*, 2011)。また、ノコダゾールにより微小管を破壊したところ、大きなストレス顆粒の形成が阻害され、小さなストレス顆粒のままであったという結果も得られており(Fujimura *et al.*, 2009)、ストレス顆粒

の成熟過程において微小管による輸送が重要な役割を果たしていることが分かっている。以上の結果と本研究で得られた結果を合わせて考えると、ストレス負荷後初期に形成された mRNA 高密度領域が、その構造的単位を保ったまま微小管に輸送されて大きなストレス顆粒を形成してゆくという仮説を立てることができる。今後ノコダゾール処理を行った際の超解像蛍光顕微鏡法による mRNA の観察を行い、さらに微小管と mRNA を共染色した二色での超解像蛍光顕微鏡観察を行うことにより本仮説を実証できると考えている。

3-7. ストレス顆粒内内在性 mRNA の生細胞超解像局在観察

固定細胞での超解像観察に続いて、生細胞内での超解像観察に取り組んだ。固定細胞でローカリゼーション法による超解像観察をする際には、Cy5 の効率的な明滅を誘導するために酸素除去酵素系 (2.25 mg/mL glucose, 25 U/mL catalase, 25 U/mL glucose oxidase) と還元剤 (71.5 mM β ME) の存在下でイメージングを行った。しかし、生細胞を観察する場合は添加物の少ないより生理的な条件下でイメージングを行う手法が好ましい。そこで、生理的な条件下で自発的な明滅性能を持ち、生細胞超解像観察に適した明滅型色素 HMSiR を用いることとした。HMSiR はシリコンローダミン骨格の色素であり、分子内で可逆的にスピロ環を形成することにより明滅を示す(Uno *et al.*, 2014)。HMSiR で標識を行った poly(U)₂₂ 線形アンチセンスプローブを用いて、ストレス顆粒内 poly(A)⁺ mRNA の生細胞超解像観察を行った。生細胞超解像観察の結果、図 3.9 に示すように、ストレス顆粒内 mRNA 高密度領域は時間経過に従って動的な局在変化を示すことが分かった。また、STED 法を用いてストレス顆粒内 poly(A)⁺ mRNA の超解像観察を行った。STED 法による観察の結果、ローカリゼーション法と同様に mRNA 高密度領域の動的な局在変化が見られた (図 3.10)。

回折限界により空間分解能が制限された従来の蛍光顕微鏡法ではストレス顆粒内部の詳細な局在やその変化は観察することができなかつたため、成熟したストレス顆粒は安定な構造であると考えられていた。一方で、FRAP を用いた先行研究により、ストレス顆粒内 mRNA には交換が生じており、mRNA がストレス顆粒内と細胞質をシャトリングしていることが示された(Zhang *et al.*, 2011)。しかし、全体として安定な構造であるストレス顆粒内でダイナミックな分子交換が生じる構造基盤は明らかにされていながつた。本研究では、生細胞超解像蛍光顕微鏡法を導入することにより、顆粒内部で mRNA 高密度領域がダイナミックな局在変化を示すことを明らかにした。本結果は、これまで FRAP のような間接的な手法でしか観察できなかつたストレス顆粒内の動的な環境をイメージングにより直接観察した初めての成果である。

3-8. ストレス顆粒集合離散における内在性 mRNA の生細胞超解像観察

ストレス顆粒集合離散の様子を生細胞内で超解像観察した。ストレス顆粒集合離散の様子を観察するには数十分程度の連続長時間観察を行う必要がある。HMSiR は生理的な条件下の細胞内で優れた明滅性能を示すが、退色の影響により 10 分以上の連続長時間観察は困難であった。そこで、長時間観察を実現するため酸素除去酵素系 (2.25 mg/mL glucose, 25 U/mL catalase, 25 U/mL glucose oxidase) を添加した培地中で観察を行った。ストレス顆粒が形成された後に、ストレス添加 HEPES-DMEM 培地から通常の HEPES-DMEM 培地に交換したところ、図 3.11 に示したように右側のストレス顆粒から一部が切り離され、左側のストレス顆粒に融合している様子が観察された。このストレス顆粒集合離散の際に、mRNA 高密度領域が構造的単位を保ったまま複数集まって移動している様子が観察された (図 3.11)。これは、mRNA 高密度領域がストレス顆粒を構

成する基本的単位となっていることを強く支持する結果である。

本結果をもとに考察すると、ストレス顆粒は mRNA 高密度領域を基盤とする構造をとることで、可逆的かつ迅速な集合・離散を実現していると考えられる。本実験では連続して長時間にわたる生細胞超解像観察を達成するために酸素除去酵素系を用いた。酸素除去酵素系の添加により、細胞死などの目立った細胞応答の変化は見られなかったが、今後ストレス応答への影響の有無について調べる必要がある。また、酸素除去酵素系を含まない培地を用いて生細胞内における連続長時間超解像観察を実現する手法を開発し、本結果と比較を行いたい。

3-9. 小括

本章では、ストレス顆粒内 mRNA の詳細な局在を観察することを目指し、実験系の構築及び画像取得を行った結果を示した。ストレス顆粒内は高密度で分子が存在する混雑した環境であり、光学顕微鏡による内部構造の観察はこれまで達成されていなかった。そこで、本研究では蛍光色素の明滅現象に着目して実験系を構築した。明滅性能をもつ蛍光色素で標識したプローブで内在性 mRNA を標識することにより、ストレス顆粒のような混雑した環境下でも一分子イメージングを行うことが可能となった。さらに、重心位置解析と組み合わせることにより高解像度での画像取得に成功した。超解像観察を行った結果、ストレス顆粒内で mRNA が密度差を伴った不均一な分布をしていることを発見した。

本研究では、mRNA が高密度で集積している領域に着目して定量的な解析を行った。高密度領域の抽出にあたり、クラスター解析の手法を取り入れることにより、一定の基準で定量解析を行う手法を確立した。本手法を用いた結果、ストレス顆粒内 mRNA 高密度領域はストレス顆粒のサイズが増大するに従って

数が増大し、一方で高密度領域のサイズはストレス顆粒のサイズに依らず一定の大きさを保っているという結果を得た。

固定細胞での観察に続き、生細胞内でストレス顆粒内 mRNA の超解像局在解析を行った。生細胞超解像観察の結果、ストレス顆粒内で mRNA 高密度領域が構造的単位を保ったまま動的な局在変化を示すことが明らかになった。さらに、ストレス顆粒集合・離散過程における生細胞超解像観察を行った結果、mRNA 高密度領域が構造的単位を保ったまま複数集まって小さな顆粒を形成し、移動している様子が観察された。

以上の結果から、mRNA 高密度領域が一つの構造的単位となることで、ストレス顆粒の可逆的かつ迅速な集合・離散を実現していると考えられる。本結果はストレス顆粒の蛍光イメージングに、回折限界を克服した超解像蛍光顕微鏡法を導入したことにより初めて実現された成果である。

本研究ではストレス顆粒内 mRNA に着目して研究を進めたが、本研究で用いた手法はタンパク質などの他の生体分子やストレス顆粒以外の顆粒構造に応用可能な手法である。今後、ストレス顆粒内での多色超解像蛍光顕微鏡法による mRNA とタンパク質の相互作用解析や、他の RNA 顆粒への応用を果たし、ストレス顆粒を含めた、より包括的な RNA 顆粒の形成機構の理解を果たしたい。

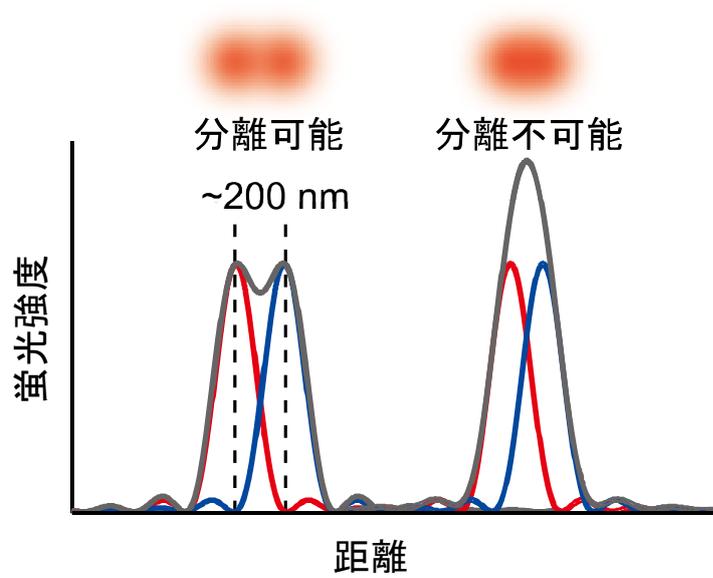
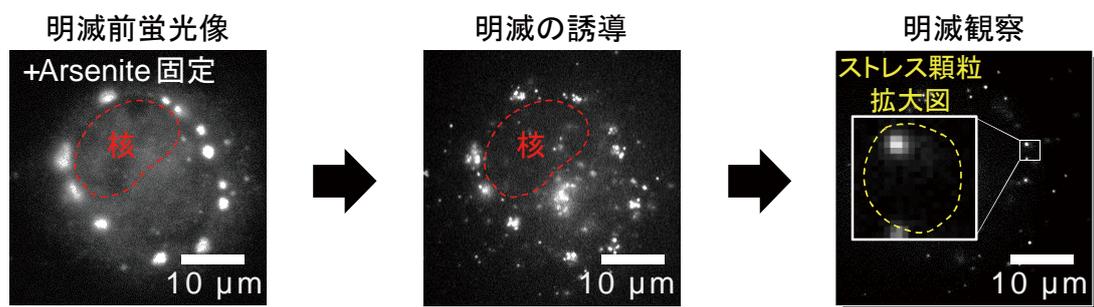


図 3.1 光の回折限界

光学顕微鏡法は光の回折限界により空間分解能が制限されており、二つの輝点が約 200 ナノメートル以内に近づくとシグナルの分離ができなくなる。

A 観察手順



B 解析手順

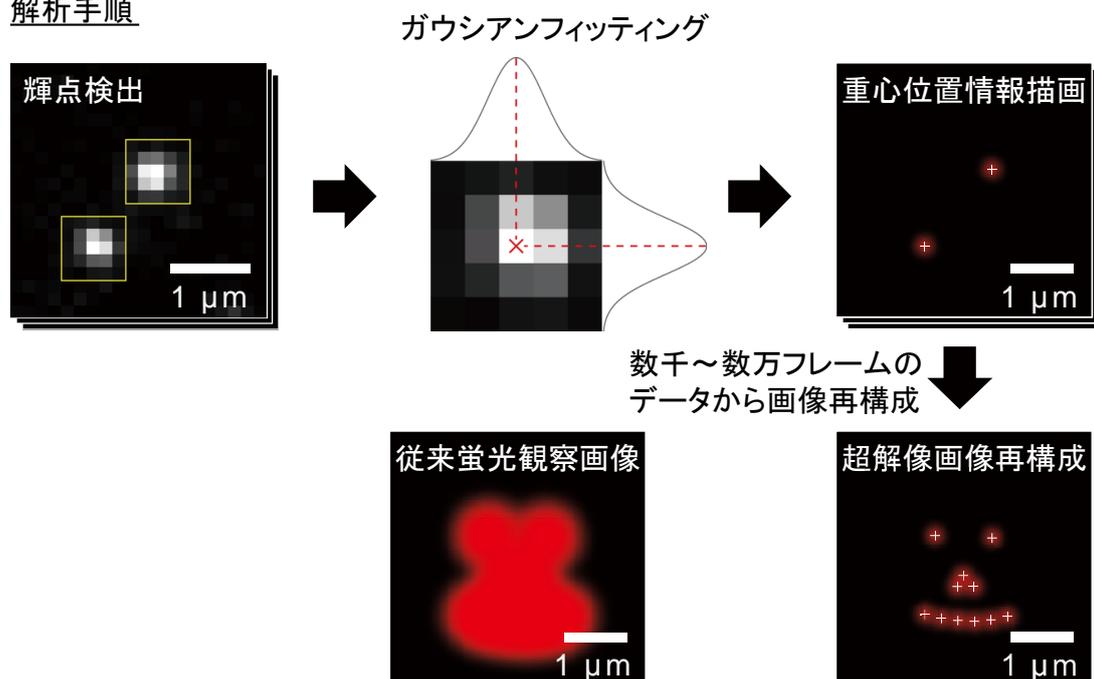


図 3.2 明滅を用いた超解像蛍光顕微鏡法の観察・解析手順

A 超解像蛍光顕微鏡法観察では、強い励起光により蛍光色素の明滅を誘導した後、明滅観察を行った。

B 解析においては一分子由来の輝点を検出した後、ガウシアンフィッティングによりナノメートルスケールで分子の位置を決定し、数千~数万フレームのデータから最終的に超解像画像を再構成した。

以上の手順により、従来の蛍光観察画像と比べて高い空間分解能を得ることができる。

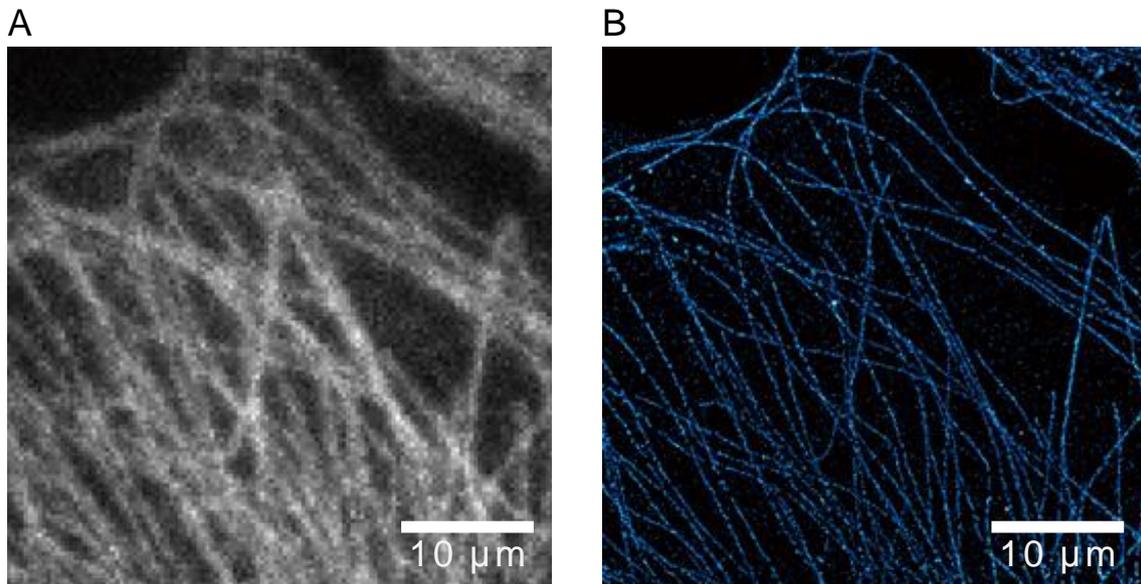
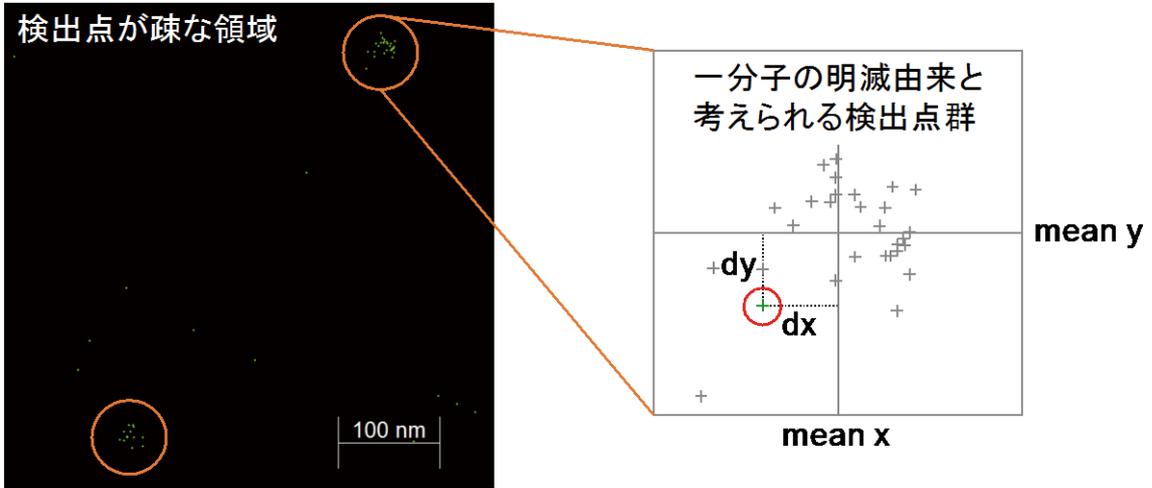


図 3.3 本研究で用いた超解像蛍光顕微鏡法による COS7 細胞内微小管の超解像観察

A 従来の蛍光顕微鏡法による蛍光観察像.

B 超解像蛍光顕微鏡法による超解像画像. 微小管の蛍光標識は抗 α -tubulin 抗体および Alexa647 標識二次抗体を用いた免疫染色により行った.

A



B

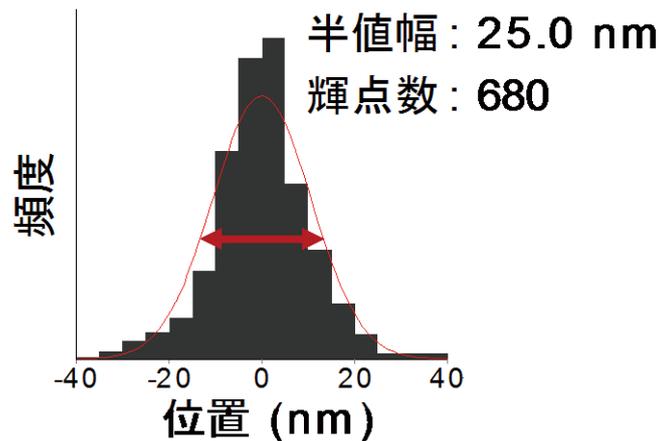
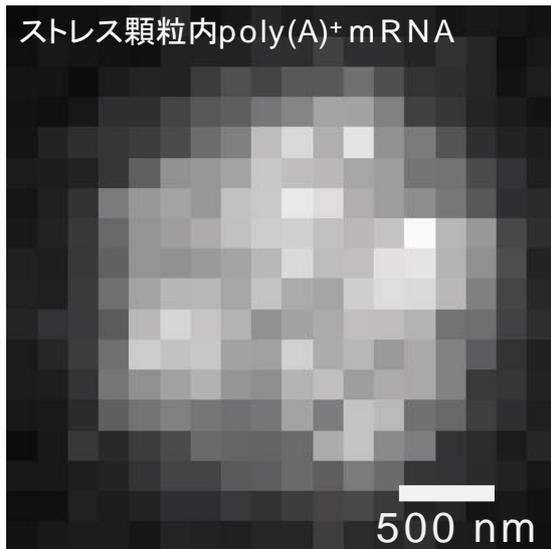


図 3.4 超解像蛍光顕微鏡法の性能評価

A 重心位置決定精度を計測するための検出点の抽出法を示した。細胞内で検出点が疎な領域から、一分子の明滅由来と考えられる検出点群を抽出した。各検出点群において x 方向および y 方向の平均位置を算出し、各検出点について平均位置からのずれ dx および dy を求めた。

B dx と dy についてヒストグラムを作成し、その半値幅を一分子重心位置決定精度とした。680 輝点のデータを集めた結果、半値幅は 25.0 nm であった。

A 従来の蛍光顕微鏡法



B 超解像蛍光顕微鏡法

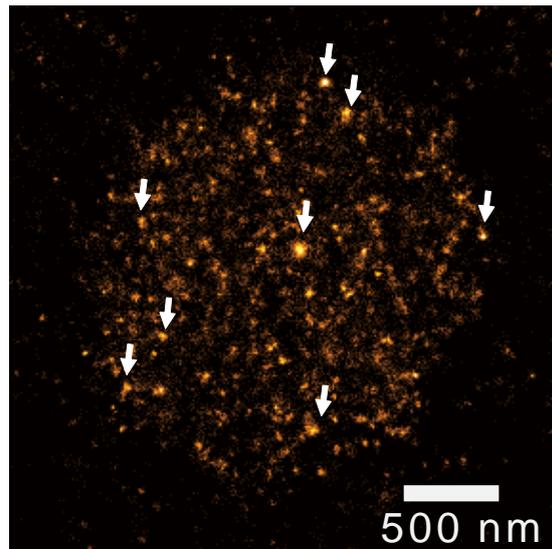


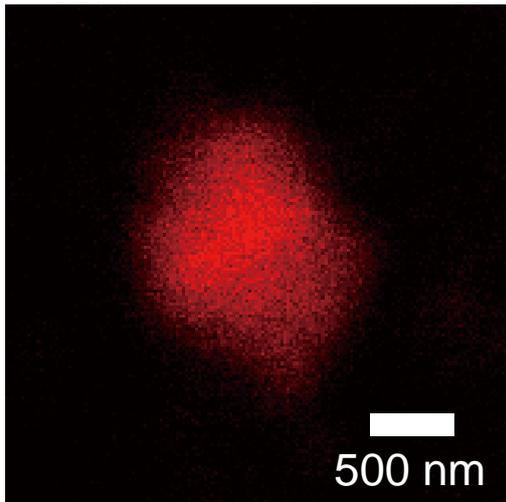
図 3.5 超解像蛍光顕微鏡法（ローカリゼーション法）によるストレス顆粒内 poly(A)⁺mRNA の二次元局在観察

COS7 細胞内 poly(A)⁺mRNA を Cy5 標識線形アンチセンスプローブにより蛍光標識した後、Sodium arsenite で 60 分間処理しストレス顆粒を形成させ固定した。

A 従来の蛍光顕微鏡法によるストレス顆粒内 poly(A)⁺mRNA の蛍光像。

B A と同じ領域の超解像蛍光顕微鏡法による観察像。白矢印は mRNA が高密度で存在している領域を示している。超解像画像は 60,000 フレーム分の重心位置情報から再構成した。

A 共焦点蛍光顕微鏡法



B STED 超解像法

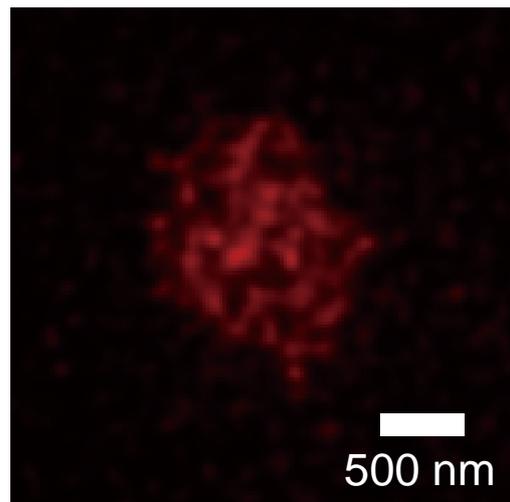


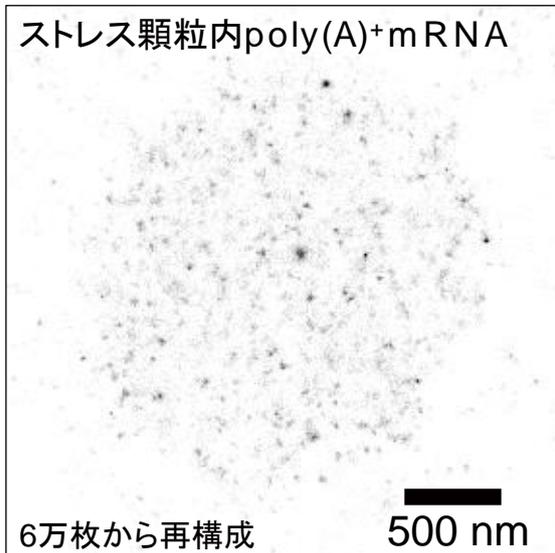
図 3.6 超解像蛍光顕微鏡法（STED 法）によるストレス顆粒内 poly(A)⁺ mRNA の局在観察

COS7 細胞内 poly(A)⁺ mRNA を Cy3 標識線形アンチセンスプローブにより蛍光標識し、Sodium arsenite で 60 分間処理しストレス顆粒を形成させ固定した後に観察を行った。

A 従来の共焦点蛍光顕微鏡法によるストレス顆粒内 poly(A)⁺ mRNA の蛍光像。

B A と同じ領域の STED 法による蛍光観察像。

A 超解像蛍光顕微鏡法



B 高密度領域検出結果

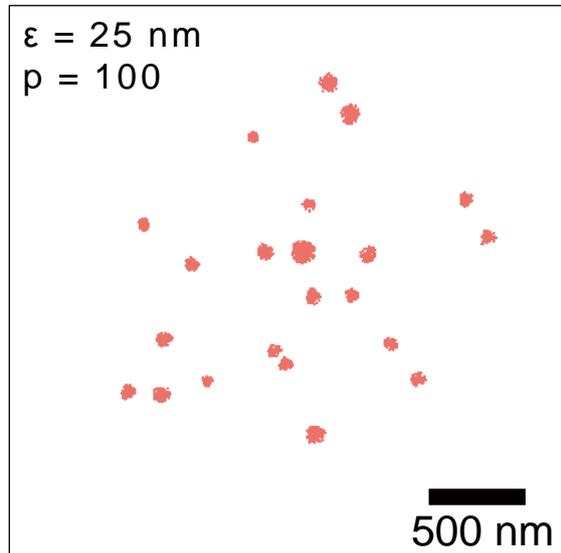


図 3.7 ストレス顆粒内 mRNA 高密度領域の自動検出

COS7 細胞内 poly(A)+ mRNA を Cy5 標識線形アンチセンスプローブにより蛍光標識した後、Sodium arsenite で 60 分間処理しストレス顆粒を形成させ固定した後に観察を行った。

A 従来の蛍光顕微鏡法によるストレス顆粒内 poly(A)+ mRNA の蛍光像。高密度領域をわかりやすくするために白黒反転して表示を行っている。

B A の領域から得られた重心位置データに対し、DBSCAN による高密度領域の自動検出を行った結果。DBSCAN のパラメータは ϵ を 25 ナノメートル、 p を 100 とした。

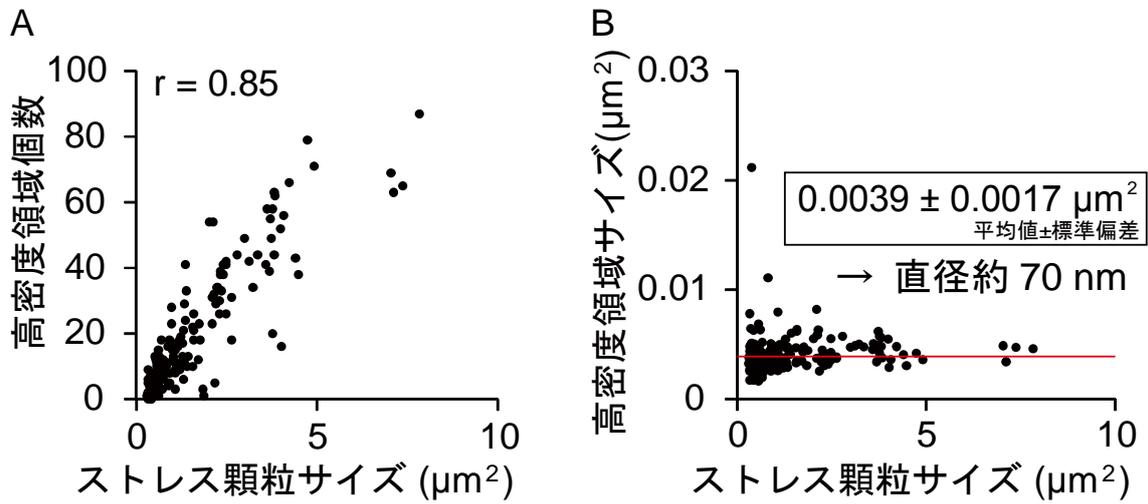


図 3.8 mRNA 高密度領域とストレス顆粒サイズの関係

A ストレス顆粒のサイズを横軸に、mRNA 高密度領域の個数を縦軸に取り、プロットを行った。相関係数を算出したところ 0.85 であった。

B ストレス顆粒のサイズを横軸に、mRNA 高密度領域のサイズを縦軸に取り、プロットを行った。平均値と標準偏差を算出したところ、それぞれ $0.0039 \mu\text{m}^2$ (直径約 70 nm の円) と $0.0017 \mu\text{m}^2$ であった。

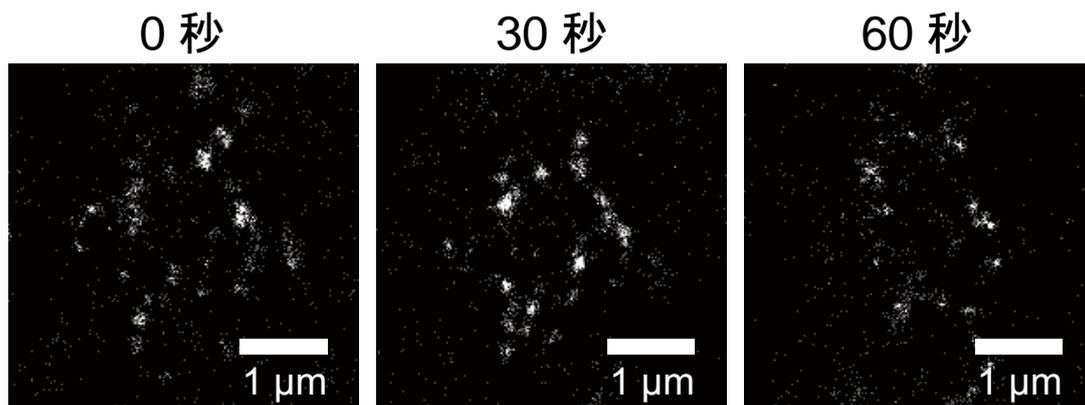


図 3.9 超解像蛍光顕微鏡法（ローカリゼーション法）によるストレス顆粒内 poly(A)⁺ mRNA の生細胞局在観察

COS7 細胞内 poly(A)⁺ mRNA を HMSiR 標識線形アンチセンスプローブにより蛍光標識した後、Sodium arsenite で 60 分間処理しストレス顆粒を形成させ観察を行った。各フレームは 1,800 フレームの輝点データから再構成されており、30 秒毎の局在変化を示した。

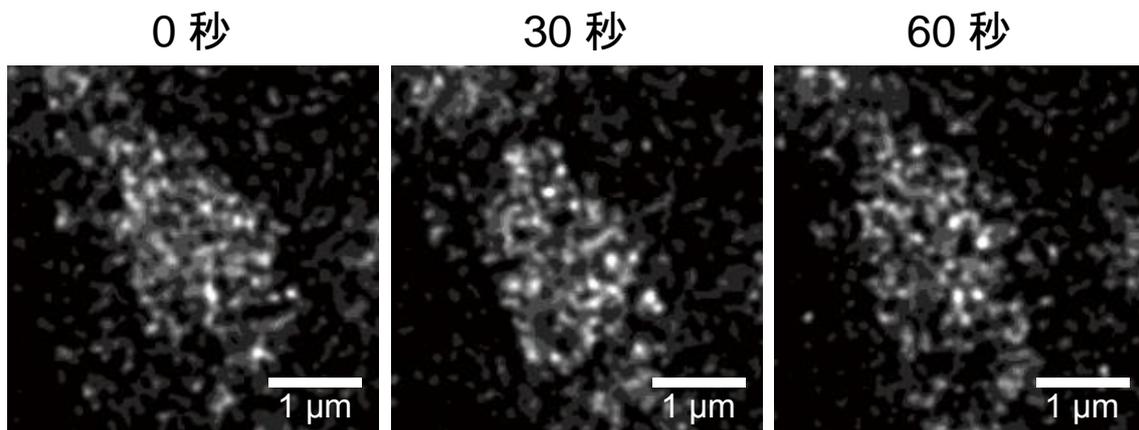


図 3.10 超解像蛍光顕微鏡法（STED 法）によるストレス顆粒内 poly(A)⁺ mRNA の生細胞局在観察

COS7 細胞内 poly(A)⁺ mRNA を Cy3 標識線形アンチセンスプローブにより蛍光標識した後、Sodium arsenite で 60 分間処理しストレス顆粒を形成させ観察を行った。30 秒毎の局在変化を示した。

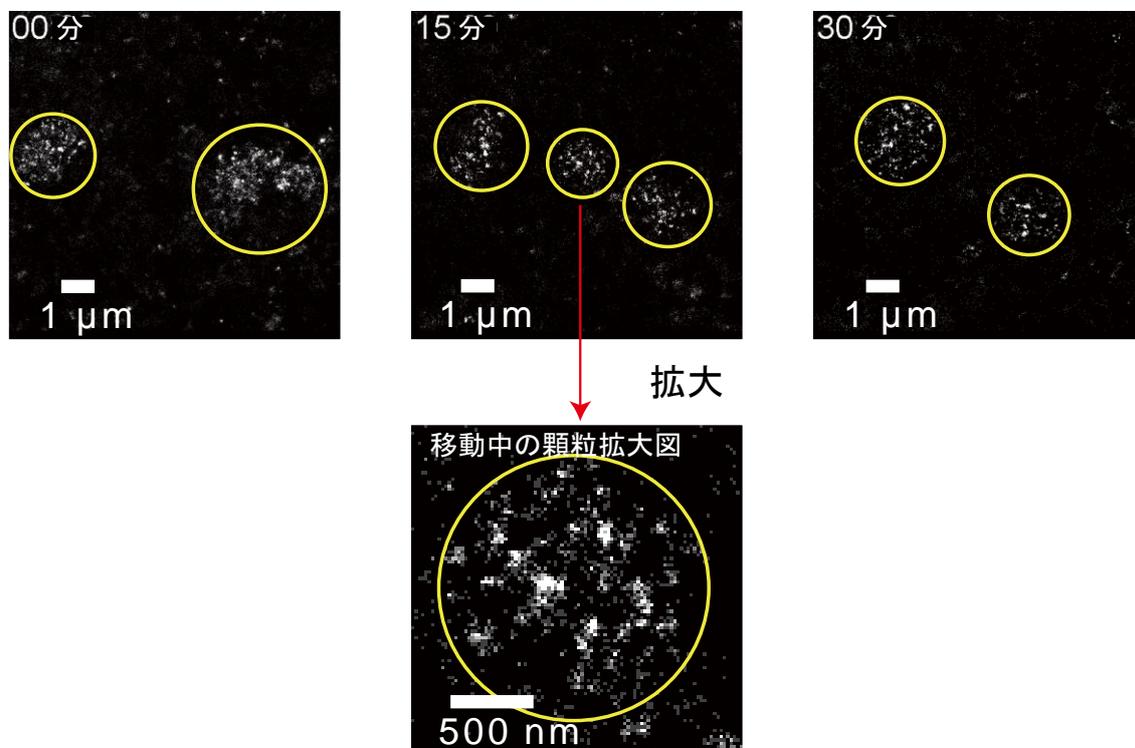


図 3.11 ストレス顆粒集合離散における内在性 mRNA の生細胞超解像観察

COS7 細胞内 poly(A)⁺ mRNA を Cy3B 標識線形アンチセンスプローブにより蛍光標識した後、Sodium arsenite で 60 分間処理しストレス顆粒を形成させ、ストレスを除去した培地に交換した後に観察を行った。数十分にわたる長時間連続超解像観察を行うために、酸素除去系 (2.25 mg/mL glucose, 25 U/mL catalase, 25 U/mL glucose oxidase) を含む培地を用いてイメージングを行った。上段に同一の視野において 15 分毎の局在変化を示した図を、下段に観察開始後 15 分における移動中の顆粒拡大図を示した。

第四章 ストレス顆粒内内在性 mRNA のナノスケール運動解析

4-1. 序文

第三章では超解像蛍光顕微鏡法により、ストレス顆粒内における mRNA の不均一な分布、高密度領域の形成およびその局在変化を明らかにした。超解像局在解析で得られたデータはある時間単位における mRNA 分子集団の位置情報の積算であるため、個々の mRNA 一分子の振る舞いを調べることは難しい。また、前章の生細胞超解像局在解析の結果、ストレス顆粒内の mRNA は数十秒という時間スケールで局在を変化させていることが明らかになったが、そのダイナミックな局在変化を mRNA が一分子レベルでどのような運動を行い実現しているかということは明らかになっていない。そこで、本章ではストレス顆粒内における mRNA 一分子のナノスケール運動解析を行うこととした。

4-2. 混雑環境における明滅を利用した一分子追跡法

本研究では、ストレス顆粒内 mRNA のナノスケール運動解析を行うにあたり、ストレス顆粒のような混雑した環境下で一分子 mRNA を追跡する手法の開発に取り組んだ。従来の一分子 mRNA イメージング法では、核内や細胞質の比較的分子が疎に存在する領域における解析は進められてきたが、ストレス顆粒や他の RNA 顆粒のような分子が高密度で存在する混雑した環境下での mRNA 一分子イメージングはいまだ報告例がない。混雑環境で一分子運動を解析するにあたり、局在解析と同様に蛍光色素の明滅現象に着目した。明滅型蛍光タンパク質を用いて、細胞膜上タンパク質の一分子追跡を行った先行研究があるが (Manley *et al.*, 2008)、明滅型蛍光分子を活用した細胞内一分子追跡の技術はまだ

発展途上である。その理由として、一分子追跡に優れた蛍光色素およびその評価法が確立していないということが挙げられる。混雑環境での一分子追跡を達成するには、各フレームで一部の分子のみが活性化される状況を実現しつつ、それぞれの分子から追跡可能な程度長時間にわたり蛍光シグナルを取得する必要がある。超解像局在解析では各分子の位置情報をのみを必要とするため、各分子由来の蛍光シグナルが重ならないようにだけ注意すればよかったが、一分子追跡を実現するには上記の点に加えて、各分子から追跡に十分な時間連続して蛍光シグナルを取得することを目指さなければならない。すなわち、超解像局在解析に用いた明滅と比べて、長い明状態を持つ明滅型色素が適していると言える（図 4.1）。

本研究では以上の点に留意しつつ、一分子追跡に適した蛍光色素の評価法と新たな mRNA 一分子追跡法の開発を行った。

4-3. 明滅型一分子追跡に適した色素の検討 (*in vitro*)

ストレス顆粒内での mRNA 一分子追跡を実現すべく、長い明状態を持つ明滅性質を示す蛍光色素の検討を行った。自家蛍光の影響の少ない暗赤色色素の中から Cy5、ATTO647N、HMSiR、2MeSiR の 4 種を選択した（図 4.2）。以下に選択した各色素の特徴を示す。Cy5 はシアニン骨格を持つ色素であり、従来から一分子イメージング法を含む蛍光イメージングにおいてよく用いられてきた色素である。Cy5 はチオールおよび酸素除去酵素系存在下で明滅性能を示すことが知られており、ローカリゼーション法による超解像蛍光顕微鏡法で優れた性能を示す(Dempsey *et al.*, 2011)。ATTO647N はカルボピロニン骨格を持つ、高い光安定性を特徴とした色素であり、細胞膜上の蛍光一分子追跡などで利用されてきた(Sahl *et al.*, 2010)。HMSiR はシリコンローダミン骨格を持つ色素であり、第三

章で示したように分子内スピロ環形成により生理的な条件下で優れた明滅性能を示すことから生細胞超解像蛍光顕微鏡法で活用されている色素である(Uno *et al.*, 2014)。2MeSiR は HMSiR を開発する際に性能比較に用いられた色素であり、HMSiR の水酸基が水素原子に置き換わった構造を持つ(Uno *et al.*, 2014)。上記4種の蛍光色素について、明滅性能をガラス基板上で評価した。本検討では、生細胞内の環境を模倣するために mM レベルのチオールが存在する環境下で実験を行った。また、明滅性能の指標として、明滅の回数、1回の明滅イベントにおける明状態の平均持続時間、1回の明滅イベントにおける暗状態の平均持続時間および1フレームあたりのフォトン数を調べた。各色素のフォトン数の時間変化を図4.3に、フォトン数の時間変化から得られた明滅性能のパラメータを表4.1に示した。実験の結果、Cy5 (図4.3A) と ATTO647N (図4.3B) は初めの明状態の後、不可逆的な暗状態へと移行し、今回用いた酸素除去酵素系を含まない実験条件下では明滅性能を持たないことが分かった。一般的に蛍光色素は活性酸素により分解され退色することが知られている。酸素除去系と還元剤が存在する環境下での Cy5 の暗状態はポリメチン鎖へのチオールの付加であることが先行研究により調べられている(Dempsey *et al.*, 2009)。酸素除去系により活性酸素による退色を防ぐことが可能であるが、今回は酸素除去系が存在せず還元剤が存在する条件下で検討を行ったため、チオールによる安定した暗状態への移行よりも活性酸素による退色への移行が優位に働いたと考えられる。超解像局在解析に用いた HMSiR は明滅性能を持つものの、明状態が短く一分子追跡には適さないことが分かった (図4.3C)。一方で、2MeSiR は明滅性能を示し、さらに明状態の時間が長く (平均 0.95 秒)、1フレームあたりのフォトン数も一分子検出に十分な程度 (平均 305 フォトン) であり、一分子追跡に適した明滅を示すことが分かった。2MeSiR の明滅はチオール依存的であり、還元剤 (14.3 mM β ME) を含まない PBS 中では 2MeSiR は明滅を示さなかった (図4.4)。本結果

から、2MeSiR の明滅には色素の酸化・還元が関わっていることが示唆され、先行研究の結果と合わせて図 4.2D に示したような暗状態の構造を推定した。本研究では構造決定は行っていないが、核磁気共鳴法 (Nuclear magnetic resonance, NMR) を活用することで還元剤存在時に見られる 2MeSiR の暗状態構造を決定することが可能であると考えられる。

4-4. 一分子追跡に適した明滅型色素の生細胞内検討

in vitro で蛍光色素の明滅性能評価を行った後、poly(A)⁺ mRNA を標的とした線形アンチセンスプローブを用いて生細胞内で一分子追跡性能の評価を行った。一分子追跡性能は、大半の蛍光分子が暗状態となったタイミング (励起開始後 8,000 フレームから 12,000 フレームまで) における軌跡の数を用いて評価した。Cy5 は初めの数秒で大半が退色してしまい、軌跡を得ることができなかった (図 4.5A, E)。ATTO647N は励起後徐々に退色していき、8,000 フレームから 12,000 フレームの間ではわずかな数だけ軌跡が得られた (図 4.5B, E)。HMSiR については、蛍光シグナル自体は得られていたものの、1 回の明状態の時間が短く追跡できなかったため、軌跡は得られなかった (図 4.5C, E)。2MeSiR では励起開始後時間が経過しても十分な数の軌跡が観察された (図 4.5D, E)。これは、2MeSiR が生細胞内でも明滅性能を示し、退色の影響も少ないからだと考えられる。以上のように、2MeSiR により生細胞内一分子追跡が可能であることを確認した。

in vitro で行った検討により還元剤の存在が 2MeSiR の明滅に重要であるということがわかったが、以上の結果と生細胞内での追跡結果と合わせると、生細胞内の酸化還元状態が 2MeSiR の効率的な明滅を実現していると考えられる。生細胞内の酸化還元状態に関わる分子としてグルタチオンやシステインに代表される生体チオールやアスコルビン酸があるが、これらの分子が 2MeSiR の明滅に

適した環境を構成していると考えている。今回 *in vitro* で行った検討では還元剤である β ME のみを加えた PBS を用いたが、今後、様々な酸化還元条件下での *in vitro* における検討、酸化還元状態を調整した生細胞内検討を組み合わせることで 2MeSiR の詳細な明滅機構が明らかになるだろう。また、酸化還元状態以外に蛍光分子の明滅に影響を与える因子として、温度・酸素濃度・pH などが挙げられる。これらの因子に着目した実験を行うことで、2MeSiR を含めた明滅性能を示す蛍光分子の明滅機構の包括的な理解が可能となるだろう。

4-5. プローブ配列特異性の確認

本手法では細胞内 mRNA の標識に線形アンチセンスプローブを用いたが、プローブ配列特異的な軌跡の検出ができていないことを確かめるために異なる配列を持つプローブを用いて一分子追跡実験を行い、結果を比較した。poly(A)鎖を標的とした配列、GAPDH mRNA を標的とした配列、ネガティブコントロールとして COS7 細胞に存在しないホタルルシフェラーゼ mRNA を標的とした配列の 3 種類のプローブを比較対象として選択し、全て同じ濃度（細胞内での最終濃度：約 10 nM）で細胞内へ導入した。poly(A)鎖を標的とした配列では GAPDH mRNA を標的とした配列よりも多くの軌跡が確認され（図 4.6A, B, D）、本手法では標的 mRNA の存在量を反映した結果が得られることが分かった。また、ネガティブコントロールではほとんど軌跡が観察されなかった（図 4.6C, D）。これは、未結合のプローブは拡散が速すぎて検出できないからだと考えられる。本手法では 55 Hz で一分子追跡の元画像を取得しており、隣り合うフレームで 0.4 μ m 以内の輝点をつなぎ合わせることで行っているため、一分子追跡可能な輝点の拡散係数は $0.4 \times 0.4 \times 55 = 8.8 \mu\text{m}^2/\text{s}$ に制限されている。一方、蛍光相関分光法（Fluorescence correlation spectroscopy, FCS）を用いて測定を行ったところ、細胞

内における結合型線形アンチセンスプローブ由来と考えられる遅い成分の拡散係数は約 $1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ であり、未結合線形アンチセンスプローブ由来と考えられる速い成分の拡散係数は約 $25 \mu\text{m}^2/\text{s}$ であった (図 4.7)。以上の結果から、本手法では拡散係数の大きい未結合の線形アンチセンスプローブは原理上ほとんど検出されず、拡散係数の小さい結合した線形アンチセンスプローブを選択的に検出できると言える。

4-6. mRNA 標的特異性の確認

本手法で検出している軌跡が標的 mRNA 由来であることを示すために、RNA 干渉を用いた実験を行った。RNA 干渉では siRNA を細胞内に導入することにより RNA-induced silencing complex (RISC) を介した標的 mRNA の分解が促され、細胞内での特定の mRNA をノックダウンし存在量を減少させることができる。COS7 細胞内に GAPDH siRNA を導入し RNA 干渉を行い、GAPDH mRNA を標的とした線形アンチセンスプローブを用いて一分子追跡を行ったところ、検出軌跡数の減少を確認した (図 4.8A)。この結果はリアルタイム RT-PCR による定量結果と一貫した結果であった (図 4.8B)。このことから、本手法で検出している軌跡が標的 mRNA 由来であることを確認した。

4-7. 検出輝点が mRNA 一分子由来であることの確認

本手法で検出している輝点が mRNA 一分子であることを確認するため、検出輝点のフォトン数を解析した。蛍光一分子が 1 フレームの間に発するフォトン数の確率分布は正規分布に従うため、検出輝点が一分子由来であればシングルピークのヒストグラムが得られ、輝点が複数分子由来であれば複数のピークか

らなるヒストグラムが得られる。また、フォトン数の時間変化を解析した時に、一分子由来の輝点であればシングルステップでバックグラウンドノイズと同等の明るさに変化するが、複数分子由来の輝点の場合はマルチステップで明るさが増える様子が見られる。COS7 細胞内 GAPDH mRNA を標的とした線形アンチセンスプローブを用いて取得した輝点についてフォトン数の解析を行ったところ、ヒストグラムはシングルピークを示し (図 4.9A)、さらに時間変化を見ると 1 ステップで暗状態へ移行していた (図 4.9B)。以上より、検出輝点が mRNA 一分子由来であることを確認した。

4-8. ストレス顆粒内 GAPDH mRNA の一分子追跡および運動解析

本研究で開発した手法を用いてストレス顆粒内 GAPDH mRNA の一分子追跡を行った。2MeSiR 標識 GAPDH 標的配列線形アンチセンスプローブを COS7 細胞内へ導入後、Sodium arsenite でストレスを負荷し、成熟したストレス顆粒が形成された段階で一分子追跡イメージングを行ったところ、GAPDH mRNA の一分子軌跡を得ることに成功した。図 4.10 では取得した軌跡の運動を自由拡散、制限された拡散、静止の 3 つに分類し示している。なお、運動の分類は以下に示す平均二乗変位解析に基づいて行った。

得られた軌跡を元に平均二乗変位解析を行った。平均二乗変位は運動様式によって時間変化が異なることから、平均二乗変位解析は粒子の運動を定量的に評価する手法として広く活用されている (Biermann *et al.*, 2014; Rossier *et al.*, 2012; Saxton and Jacobson, 1997)。平均二乗変位 (Mean square displacement, MSD) と時間の関係をプロットしたものを MSD-t プロットと呼ぶ。ストレス環境下 COS7 細胞内における GAPDH mRNA の一分子追跡を行い、得られた軌跡に対し平均二乗変位解析を行った結果を図 4.11 の MSD-t プロットに示した。図 4.11

において、実線でストレス顆粒外の細胞質を、破線でストレス顆粒内を示しているが、自由拡散と静止についてはストレス顆粒の内外で大きな運動の変化は見られなかった。一方、制限された拡散では両者に顕著な運動の差が見られることがわかった。

定量的な評価を行うために、得られた MSD-t プロットを理論式に解釈することとした。自由拡散と制限された拡散の平均二乗変位 MSD はそれぞれ以下の理論式で示される。平均二乗変位解析で得られたデータをこれらの式でフィッティングすることにより運動パラメータを算出した。

$$MSD_{diff}(t) = 4D_{diff}t \quad (\text{式 4.1})$$

(D_{diff} : 自由拡散における拡散係数)

$$MSD_{conf}(t) = \frac{4R_{conf}^2}{3} \left(1 - \exp\left(-\frac{3D_{conf}}{R_{conf}^2}t\right) \right) \quad (\text{式 4.2})$$

(D_{conf} : 制限された拡散の拡散係数、 R_{conf} : 制限された拡散の領域半径)

各運動様式の割合と得られた運動パラメータについて詳細な解析を行った結果を図 4.12 に示した。各運動様式の割合を見るとストレス顆粒内では細胞質と比べて静止状態の mRNA の割合が約 3 倍に増加していた (図 4.12A)。制限された拡散について制限領域半径 (R_{conf}) および拡散係数 (D_{conf}) を計算したところ、ストレス顆粒内では細胞質と比べて R_{conf} 、 D_{conf} 共に 35%程度小さくなっていた (図 4.2B, C)。以上の結果より、ストレス顆粒内で大部分の GAPDH mRNA の運動は抑制されていることが明らかになった。一方で、ストレス顆粒内で 15%の mRNA は細胞質と同程度の拡散係数で自由に拡散していた (図 4.12A, D)。このように、ストレス顆粒内では運動が制限された分子と自由に拡散できる分子が共存しており、mRNA が不均一な運動状態を示すことが明らかになった。

また、ストレスを負荷していない定常状態の細胞を用いて同様に一分子追跡および運動解析を行ったところ、ストレス顆粒外細胞質における運動はストレス負荷の有無で大きな変化が見られなかった。本結果により、ストレス環境下においてもストレス顆粒外の GAPDH mRNA は定常状態と同様の振る舞いを示すことが示唆された。今後、細胞質において mRNA と複合体を形成するタンパク質と mRNA との相互作用解析などを行い、定常状態とストレス環境下での mRNA 動態やその制御機構の違いについてより詳細な解析を行いたい。

4-9. ストレス顆粒内 mRNA ナノスケール局在と運動の同時観察

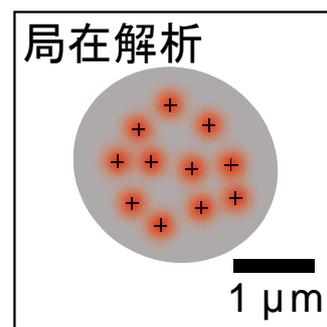
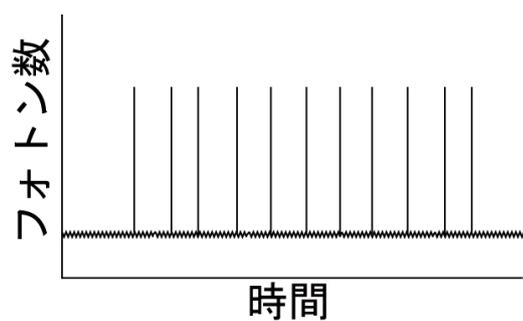
一分子運動解析で得られた結果と、超解像局在解析で確認された高密度領域とを総合して考察するために、ナノスケール局在と運動の同時観察を行った。図 4.13 は、Sodium arsenite により形成させたストレス顆粒内で poly(A)⁺ mRNA の超解像局在と GAPDH mRNA の一分子運動を同時観察した実験結果である。黄矢印で示したように、mRNA 高密度領域付近で mRNA の運動が制限されている様子が観察された。本結果から、高密度領域は mRNA をつなぎ止めており、静止または制限された拡散の基盤構造となっていると考えられる。生細胞超解像観察において mRNA 高密度領域が数十秒程度の時間スケールでダイナミックに局在を変化させていたことを本結果と併せて考えると、高密度領域の核となる構造に個々の mRNA が結合と解離を繰り返しているというモデルを提唱することができる。今後、より長時間にわたるストレス顆粒内 mRNA 一分子追跡法を実現し、本モデルの実証を行いたい。

4-10. 小括

本章では、ストレス顆粒内で一分子 mRNA を追跡する手法の開発、および開発した手法を用いて行ったストレス顆粒内 mRNA のナノスケール運動解析の結果を示した。

蛍光色素の明滅と線形アンチセンスプローブを組み合わせるにより、ストレス顆粒のような混雑した環境内で一分子 mRNA を追跡する手法を開発した。*in vitro* および生細胞内での一分子追跡に適した明滅型色素の検討に加え、プローブの配列特異性、標的 mRNA 特異性について評価を行い、一分子であることの検証を行った結果、本手法を用いて細胞内の特定の mRNA 一分子を追跡できることを確認した。本研究で開発した手法を用いて、ストレス環境下におけるストレス顆粒内および顆粒外細胞質での GAPDH mRNA 一分子のナノスケール運動を明らかにした。ナノスケール運動解析の結果、ストレス顆粒内 GAPDH mRNA の運動様式は 60% が静止している一方で、制限された拡散が 25%、自由拡散が 15% で共存しており、ストレス顆粒内 mRNA の運動には不均一性があることを明らかにした。さらに、mRNA 高密度領域と mRNA 一分子運動の関係を明らかにするために、明滅を用いた超解像蛍光顕微鏡法と一分子追跡法を組み合わせ、ナノスケール局在と運動の同時観察を行った。同時観察の結果、mRNA 高密度領域付近で mRNA の運動が制限されていることを示した。

A 超解像局在解析に適した明滅



B 一分子追跡に適した明滅

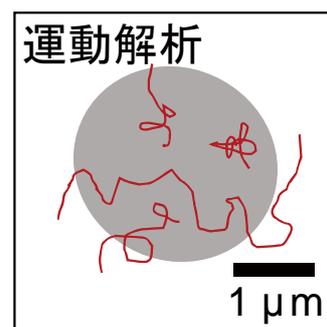
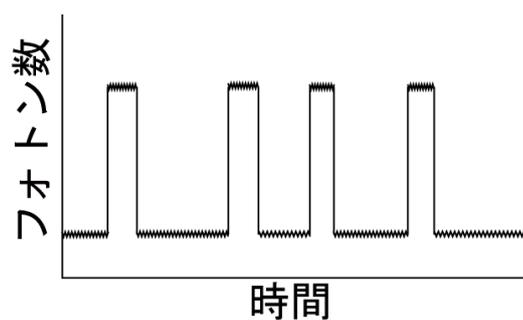
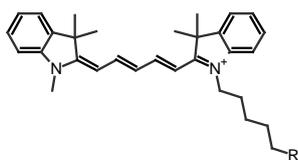


図 4.1 超解像局在解析に適した明滅と一分子追跡に適した明滅

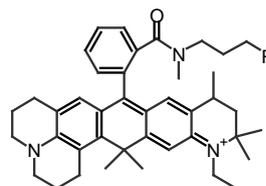
A 超解像局在解析に適した明滅の概念図. 一回の明状態が短い明滅が適している.

B 一分子追跡に適した明滅の概念図. 一回の明状態が長い明滅が適している.

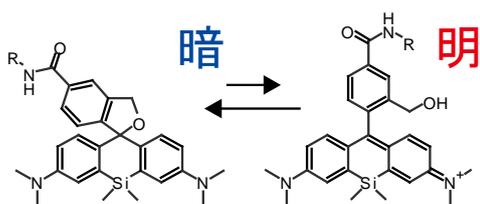
A

Cy5

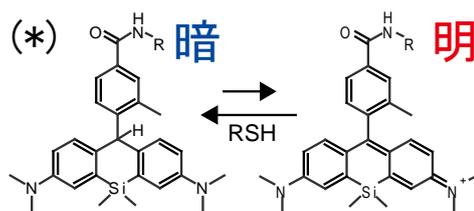
B

ATTO647N

C

HMSiRR = poly(U)₂₂ 2'-O-Methyl RNA

D

2MeSiR

(*) 推定される構造

図 4.2 一分子追跡法の検討に用いた 4 種の暗赤色色素の構造式

A Cy5 の構造式.

B ATTO647N の構造式.

C HMSiR の構造式. HMSiR は分子内でスピロ環を形成することで自発的に明滅を繰り返す.

D 2MeSiR の構造式. 2MeSiR の暗状態の構造式は先行研究から推定した.

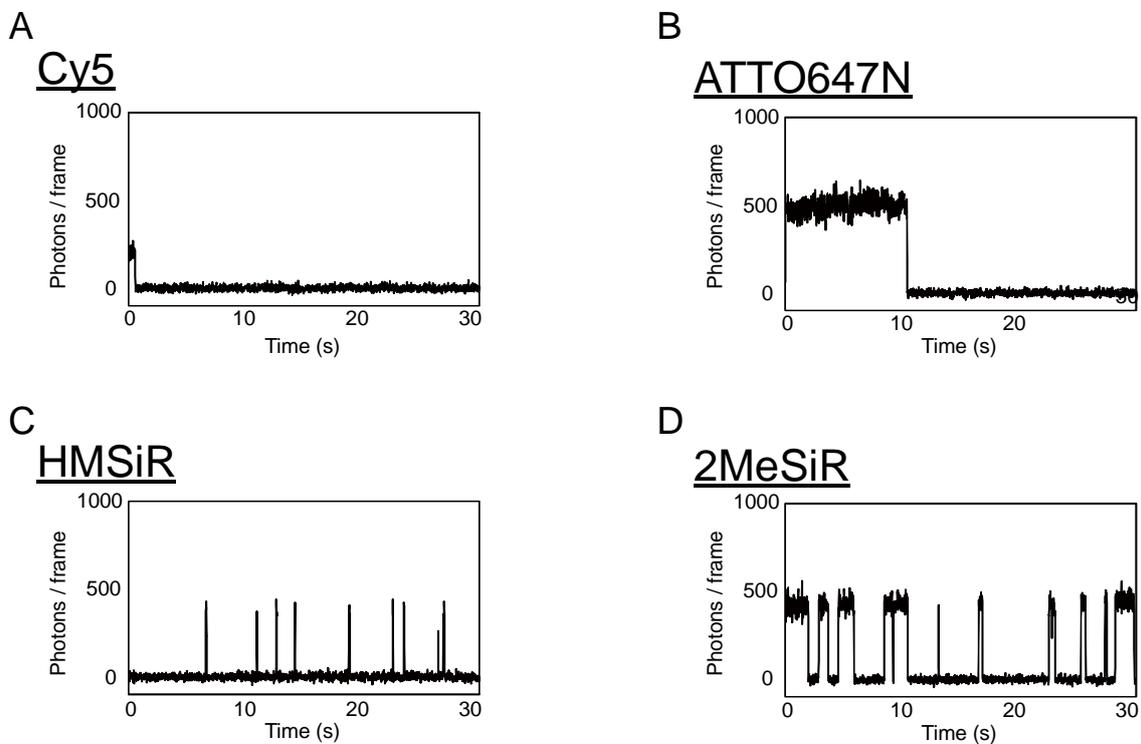


図 4.3 明滅型一分子追跡に適した色素の検討 (*in vitro*)

還元剤 (14.3 mM β ME) を含む PBS(pH 7.4) をイメージング溶液としてガラス基板上で 4 種暗赤色蛍光色素の明滅評価を行った。

A Cy5 の代表的なフォトン数の時間変化.

B ATTO647N の代表的なフォトン数の時間変化.

C HMSiR の代表的なフォトン数の時間変化.

D 2MeSiR の代表的なフォトン数の時間変化.

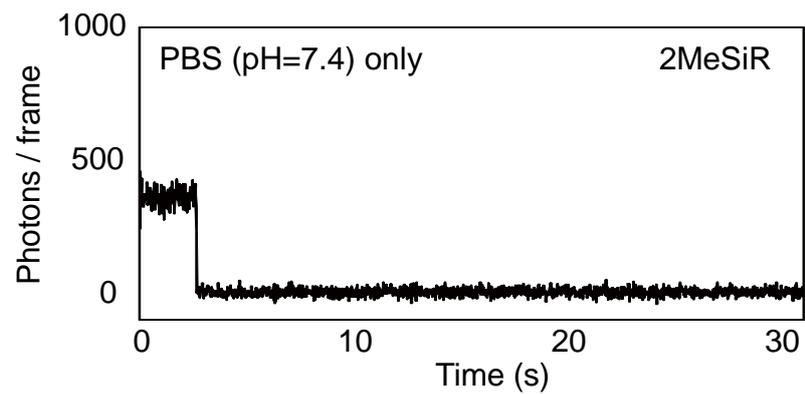


図 4.4 還元剤を含まない PBS 中における 2MeSiR の光子数時間変化

PBS(pH 7.4)をイメージング溶液としてガラス基板上で計測した 2MeSiR の代表的な光子数の時間変化.

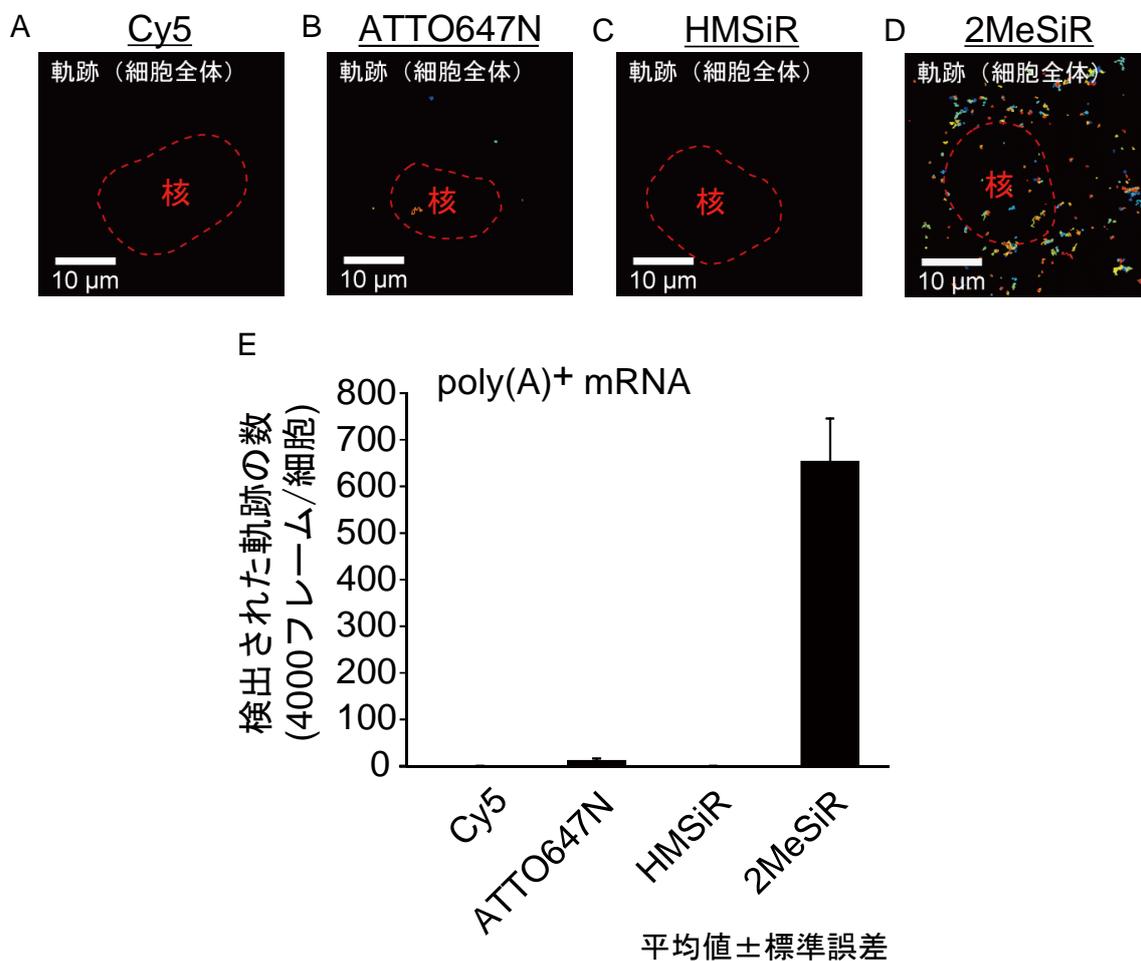


図 4.5 明滅型一分子追跡に適した色素の生細胞内検討

COS7 細胞内 poly(A)⁺ mRNA を標的とした各種蛍光色素標識線形アンチセンスプローブを用いて生細胞内で一分子追跡を行った. 4,000 フレームの追跡結果を表示している.

A Cy5 を標識に用いた際の代表的な軌跡.

B ATTO647N を標識に用いた際の代表的な軌跡.

C HMSiR を標識に用いた際の代表的な軌跡.

D 2MeSiR を標識に用いた際の代表的な軌跡.

E 各色素で検出された軌跡の数.

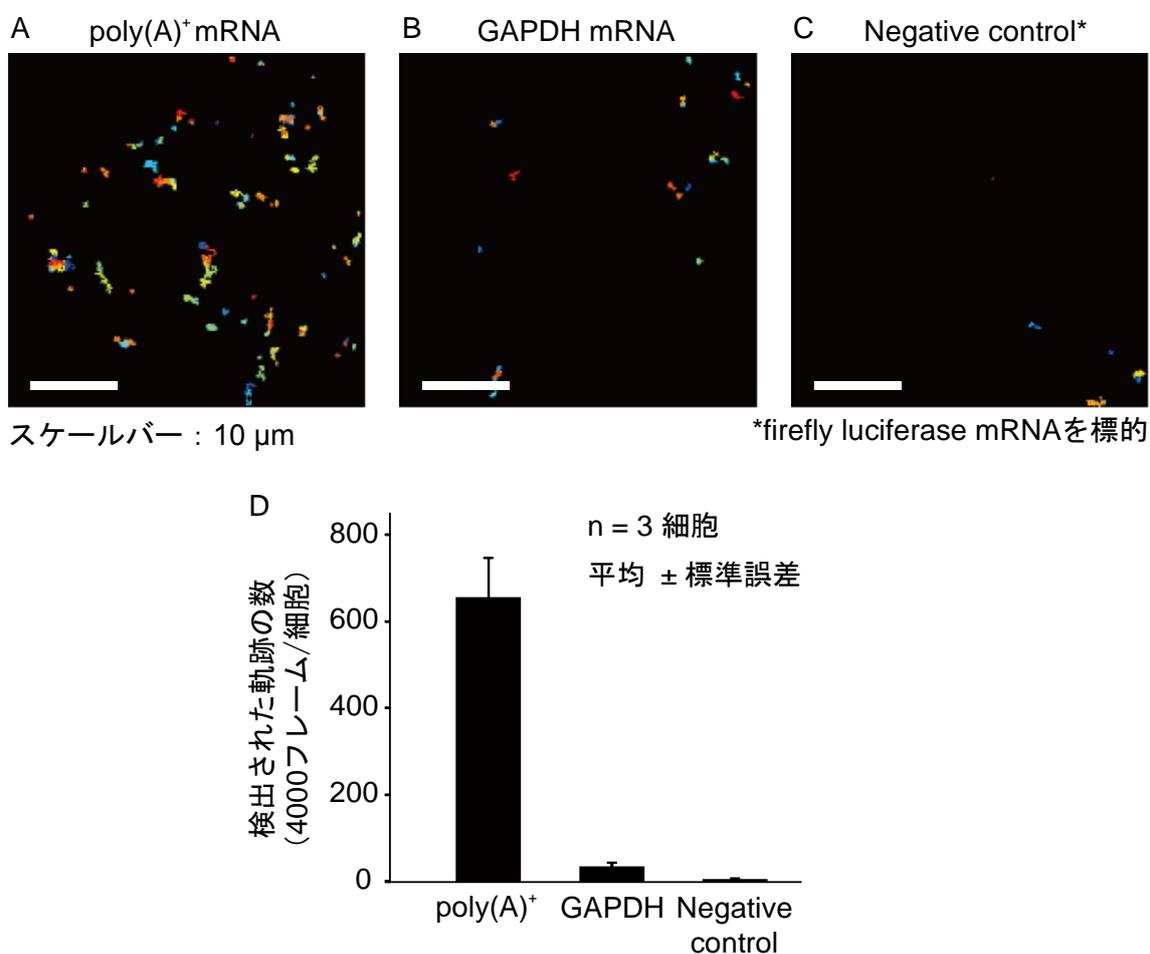


図 4.6 線形アンチセンスプローブ配列特異性の検討

配列の異なる 3 種の 2MeSiR 標識線形アンチセンスプローブを COS7 細胞内に導入し、生細胞内で一分子追跡を行った。4,000 フレームの追跡結果を表示している。

A poly(A)⁺ mRNA を標的とした際の代表的な軌跡。

B GAPDH mRNA を標的とした際の代表的な軌跡。

C ネガティブコントロール配列 (firefly luciferase mRNA) を用いた際の代表的な軌跡。

D 各配列で検出された軌跡の数。

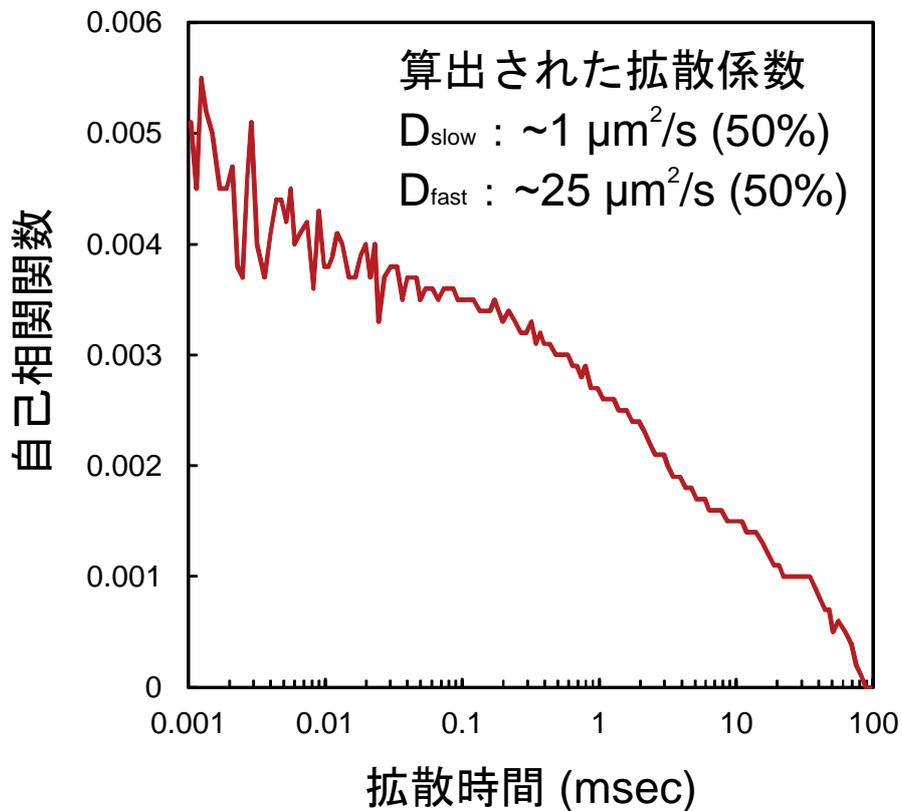


図 4.7 蛍光相関分光法による結合・未結合プローブ拡散係数の測定

蛍光相関分光法を用いて、COS7 細胞内で GAPDH 標的配列線形アンチセンスプローブの拡散係数を測定した。自己相関関数と拡散時間、および共焦点顕微鏡のコンフォーカルボリュームから算出された拡散係数は、速い成分が約 $25 \mu\text{m}^2/\text{s}$ であり、遅い成分が約 $1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ であった。各成分の割合はそれぞれ約 50% であった。

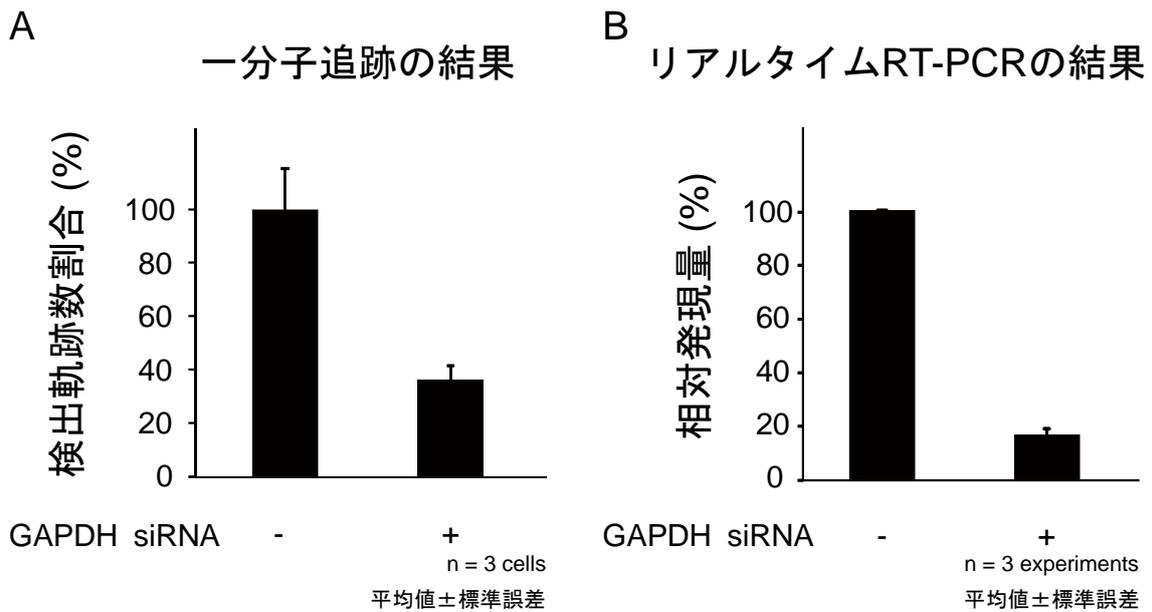


図 4.8 RNA 干渉を用いた標的 mRNA 特異性の確認

GAPDH siRNA を COS7 細胞内に導入し、GAPDH mRNA をノックダウンした。

A GAPDH mRNA を標的とした 2MeSiR 標識線形アンチセンスプローブによる一分子追跡で得られた軌跡数. GAPDH siRNA を導入していない細胞で得られた軌跡の数で規格化を行った。

B リアルタイム RT-PCR により定量した GAPDH mRNA の相対発現量. GAPDH siRNA を導入していない細胞で得られた濃度で規格化を行った。

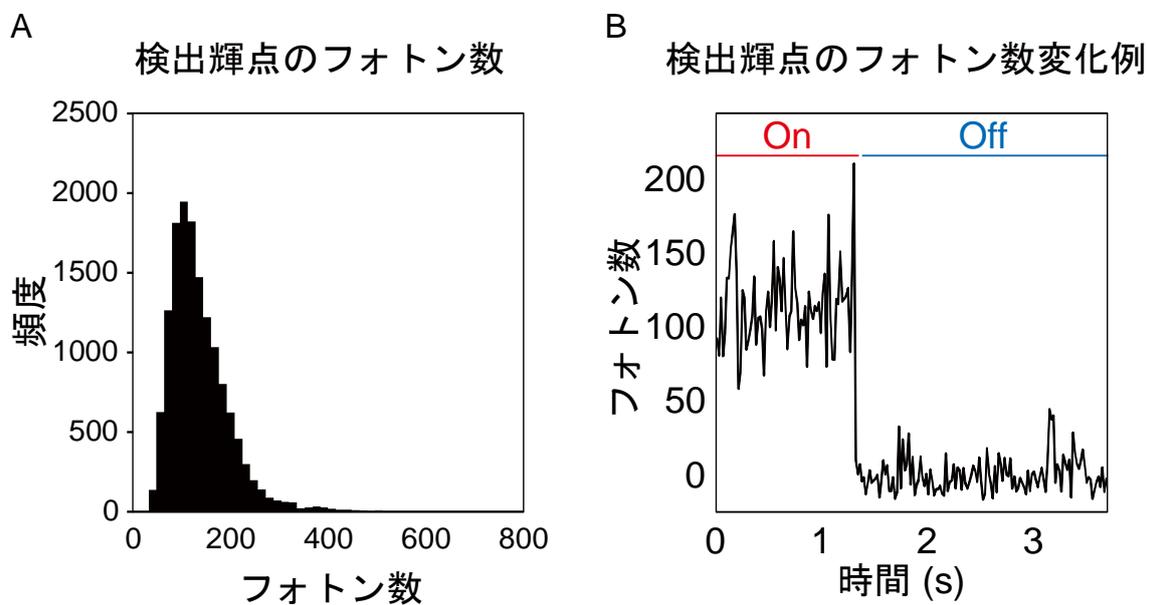


図 4.9 得られた輝点の光子数解析

COS7 細胞内 GAPDH mRNA を標的とした線形アンチセンスプローブを用いて取得した輝点について光子数の解析を行った。

A 検出された各輝点の光子数をヒストグラムにして示した。

B 検出された輝点の代表的な光子数の時間変化。

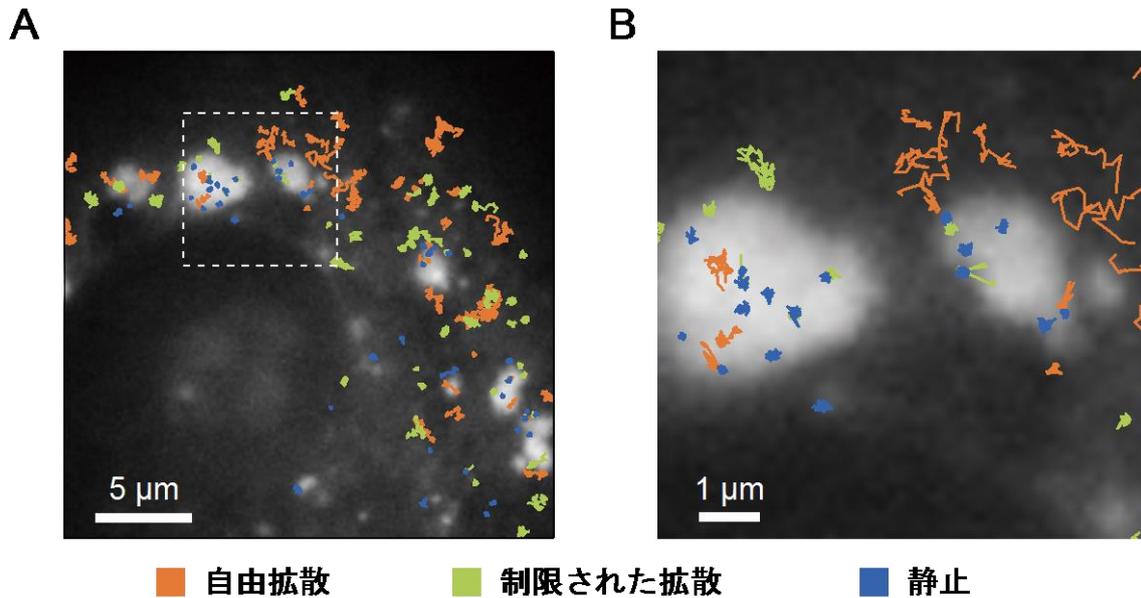


図 4.10 ストレス顆粒内 GAPDH mRNA の一分子追跡

Sodium arsenite によりストレスを負荷した COS7 細胞内において、GAPDH mRNA を標的とした 2MeSiR 標識線形アンチセンスプローブによる一分子追跡を行った。

A 細胞質の軌跡を示した広域像。自由拡散・制限された拡散・静止を色分けして示した。

B ストレス顆粒周辺領域の拡大像。自由拡散・制限された拡散・静止を色分けして示した。

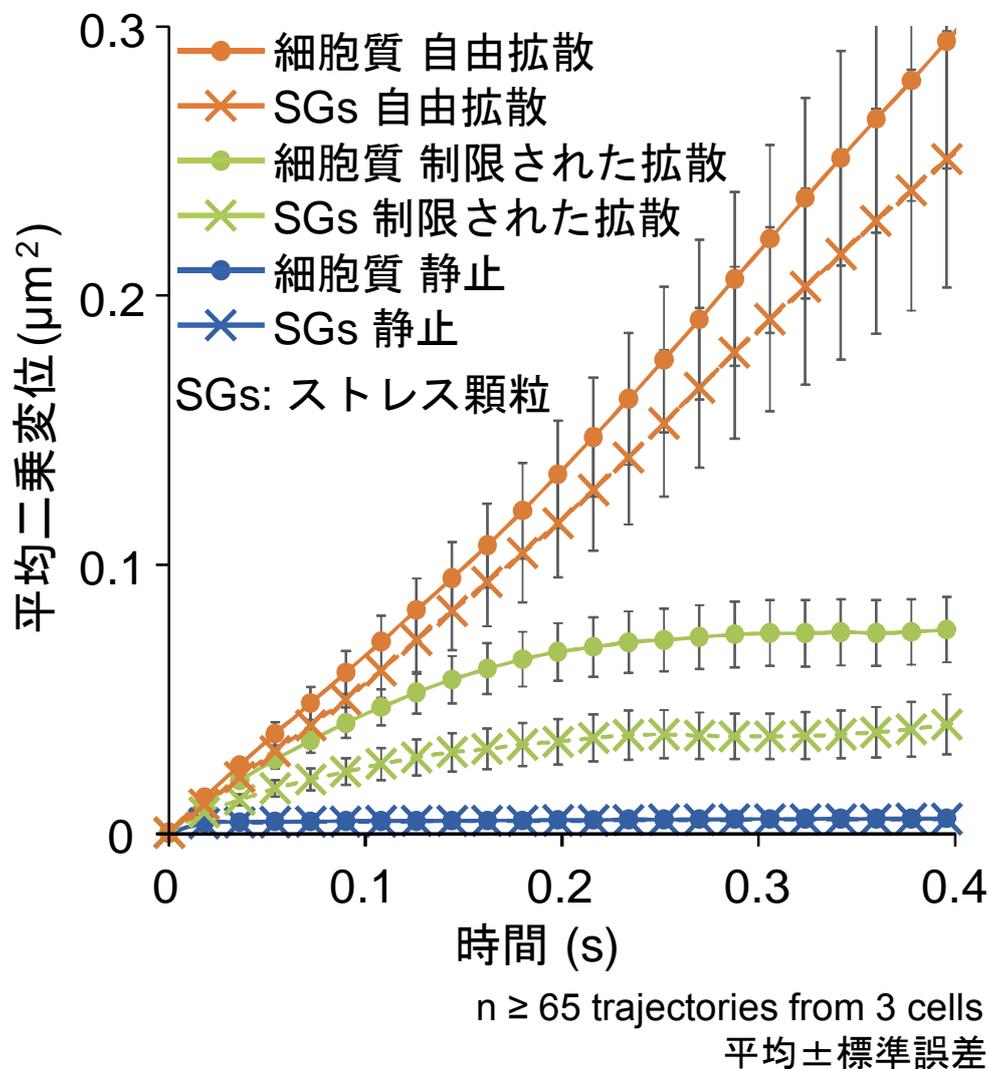


図 4.11 ストレス環境下 GAPDH mRNA 運動の MSD-t プロット

ストレス環境下 COS7 細胞内 GAPDH mRNA の一分子追跡により得られた軌跡について平均二乗変位解析を行い、平均二乗変位と時間の関係をプロットした。ストレス顆粒内と顆粒外の細胞質に軌跡を分類し、それぞれ自由拡散・制限された拡散・静止を色分けして示した。

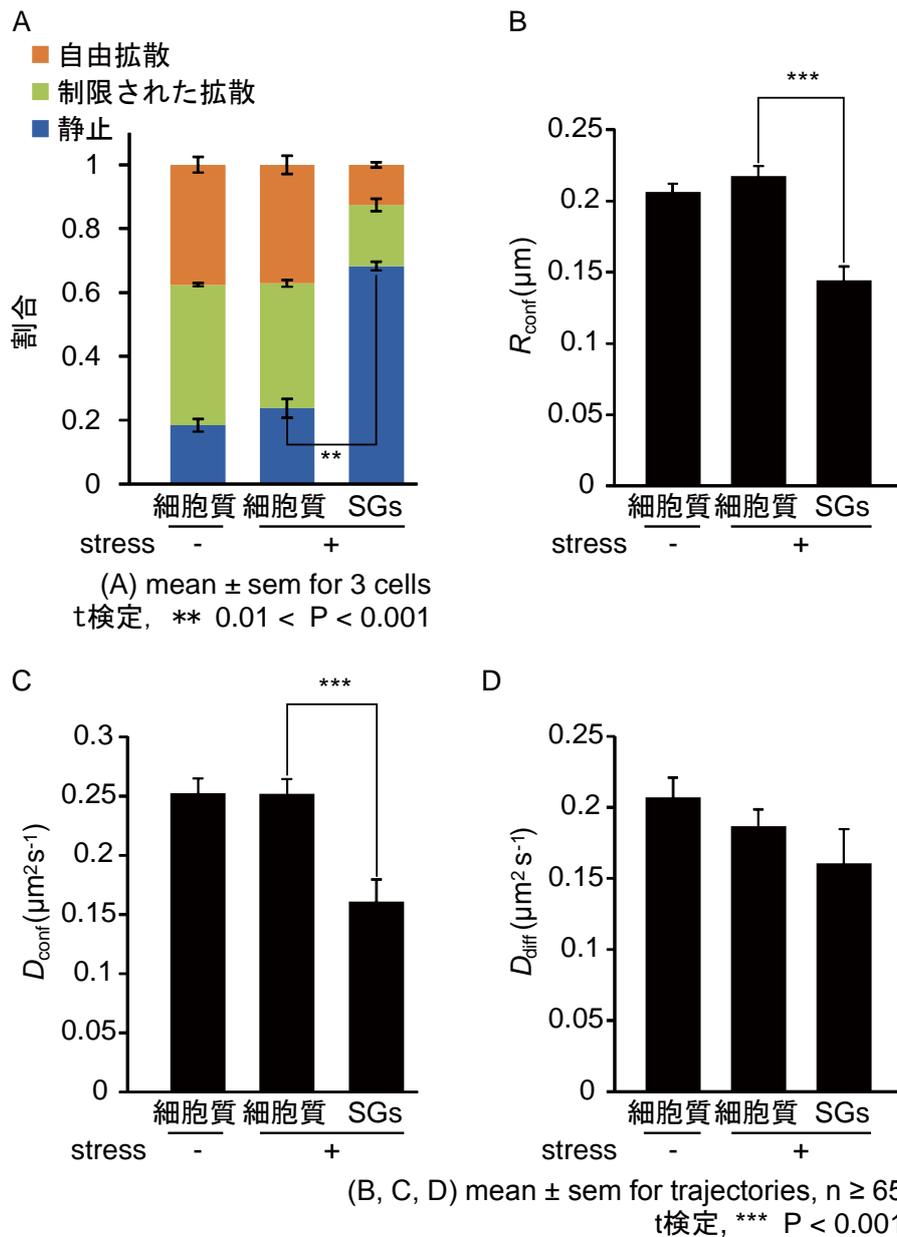


図 4.12 平均二乗変位解析による GAPDH mRNA の一分子運動解析

定常状態の細胞質、ストレス負荷時の細胞質およびストレス顆粒内における各運動様式の割合と運動パラメータを求めた。

- A** 各運動様式の割合.
- B** 制限された拡散運動における領域半径.
- C** 制限された拡散運動における拡散係数.
- D** 自由拡散運動における拡散係数.

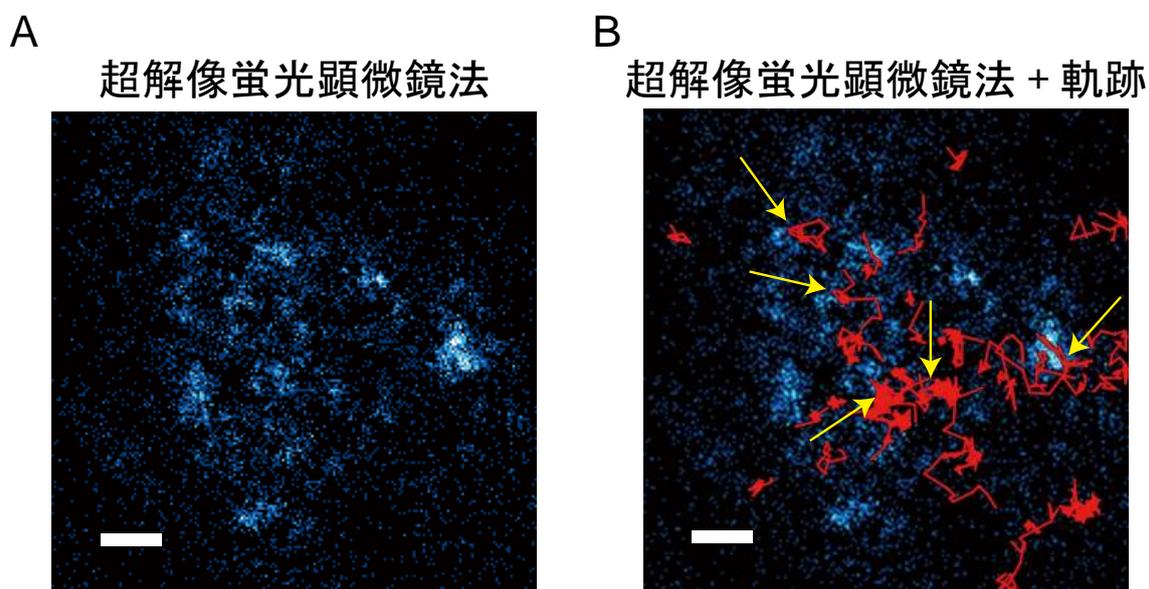


図 4.13 ナノスケール局在と運動の同時観察

Sodium arsenite によりストレスを負荷した COS7 細胞内において、poly(A)⁺ mRNA を標的とした HMSiR 標識線形アンチセンスプローブによる超解像局在解析および GAPDH mRNA を標的とした Cy3B 標識線形アンチセンスプローブによる一分子追跡を行った。

A 超解像蛍光顕微鏡法により取得したストレス顆粒内 poly(A) mRNA のナノスケール局在。

B poly(A) mRNA のナノスケール局在と GAPDH mRNA の一分子運動の軌跡を重ねて表示した。黄矢印は mRNA 高密度領域付近で mRNA の運動が制限されていた例を示す。

表 4.1 暗赤色蛍光色素 4 種の明滅性能評価 (*in vitro*)

色素名	明滅回数	明状態の長さ (秒)	暗状態の長さ (秒)	フォトン数
Cy5	1.1	0.41	NA	250
ATTO647N	1.5	10	NA	630
HMSiR	11	0.10	5.3	300
2MeSiR	19	0.95	2.9	260

第五章 総括及び今後の展望

5-1. 本研究のまとめ

本研究はストレス顆粒内における内在性 mRNA の局在と運動をナノメートルで明らかにすることを目的として行った。

従来、光学顕微鏡を用いた観察では回折限界により空間分解能が 200 ナノメートル程度に制限されていたため、分子が高密度で存在するストレス顆粒内で mRNA の詳細な局在や運動を観察することは極めて困難であった。そこで、本研究では蛍光分子の明滅現象に着目し、明滅型蛍光色素と線形アンチセンスプローブによる内在性 mRNA 標識法を組み合わせた実験系を構築した。蛍光分子の明滅現象を活用し、各撮像フレームで一部の分子のみが蛍光を発する状態とすることにより、ストレス顆粒内での mRNA 一分子検出を実現した。一分子検出により得られた分子の重心位置に基づいて、ナノメートルスケールでの mRNA の局在と運動の解析を行った。以下に局在解析と運動解析について、概要をまとめた。

本研究ではまず、ストレス顆粒内 mRNA のナノスケール局在を、明滅型蛍光色素で標識した mRNA の一分子重心位置情報を数千～数万フレームにわたり取得し積算することにより可視化した。ナノスケール局在観察の結果、直径 1 μm 程度のストレス顆粒内には mRNA が高密度で存在する領域と低密度で存在する領域があり、ストレス顆粒内 mRNA が密度差を持った不均一な局在を示すことが明らかになった。続いて、mRNA が高密度で存在する領域に着目して、その数やサイズについて定量的な解析を行った結果、mRNA 高密度領域はストレス顆粒内で直径約 70 ナノメートル程度の一定のサイズを持った構造的単位であることが示された。さらに、生細胞内でストレス顆粒内 mRNA のナノスケール局

在を観察したところ、mRNA 高密度領域が数十秒程度で局在を変化させるダイナミックな構造であり、ストレス顆粒の可逆的な集合・離散が mRNA 高密度領域を基盤構造として実現されていることが示唆された。

本研究では続いて、ストレス顆粒内 mRNA のナノスケール運動の解析に取り組んだ。ストレス顆粒内 mRNA のナノスケール運動を明らかにするにあたり、蛍光分子の明滅に基づく新規の細胞内内在性 mRNA 一分子追跡法を開発した。暗赤色素 4 種について *in vitro* および生細胞内で性能評価を行い、2MeSiR がチオール存在下で明滅性能を示し、生細胞内 mRNA 一分子追跡に適した色素であることを示した。続いて、2MeSiR で蛍光標識をした線形アンチセンスプローブを用いることにより、細胞内で特定の mRNA を特異的に標識し、一分子追跡を行うことが可能であることを確認した。新規に開発した mRNA 一分子追跡法を用いて、ストレス顆粒内 GAPDH mRNA のナノスケール運動を解析した。運動解析の結果、ストレス顆粒内 GAPDH mRNA の 60%は静止しており、25%は制限された領域内で拡散し、15%は自由に拡散していることが明らかになった。ストレス顆粒内では顆粒外の細胞質と比べて静止状態の割合が約 3 倍に増えており、制限された拡散の領域半径と拡散係数が 35%程度減少していたことから、ストレス顆粒内は mRNA の分子運動が抑制される環境であることが示された。また、運動が抑制された分子が増加する一方で、一部の mRNA は自由に拡散することが可能であり、ストレス顆粒内で GAPDH mRNA が不均一な運動を示すことを明らかにした。さらに、局在と運動をナノメートルスケールで同時に観察した結果、ストレス顆粒内 mRNA 高密度領域付近で mRNA 一分子運動が抑制されている様子が観察された。以上の結果から、ストレス顆粒内では mRNA を繋ぎ止める高密度領域を構造的単位として大きな顆粒を形成することで、可逆的かつ迅速な集合・離散を実現していることが示唆された。

5-2. 今後の展望

本研究では、これまで観察が困難であったストレス顆粒内 mRNA の詳細な局在と運動を明らかにすることができた。迅速かつ可逆的なストレス顆粒形成の物理的構造基盤はこれまで不明であったが、本研究で得られた結果により、ストレス顆粒の構造基盤として mRNA 高密度領域が重要であることが示唆された。本研究の成果により、ストレス顆粒研究において新たな知見をもたらすことができたと自負している。特に、蛍光イメージングにより直接分子の局在と運動を可視化した本研究は、従来行われてきた顆粒構成因子の分子生物学的な解析では達成することのできない顆粒形成の物理的な考察を可能にした。本研究の次の段階として、分子生物学的研究によりストレス顆粒の形成と機能に重要であることが判明した因子を阻害、あるいは活性化した時に mRNA の局在や運動がどのように変化するかを調べることでストレス顆粒形成機構の詳細が解明できると考えられる。また、本研究では蛍光イメージング法により細胞内のストレス顆粒を直接可視化した。また、*in vitro* での再構成実験によるアプローチも近年盛んに行われている (Molliex *et al.*, 2015)。Molliex らは再構成実験を通じて、RNA 結合タンパク質の液-液相分離が顆粒の集合を引き起こすという仮説を提唱している。本研究で開発した一分子解析手法を *in vitro* 再構成系に応用し、mRNA と RNA 結合タンパク質および他の構成因子の同時解析を行うことで、液-液相分離と顆粒形成の関係をより詳細に調べることが可能となるだろう。今後、分子生物学的知見と物理的知見の統合を進め、ストレス顆粒形成機構の全容解明を果たしたい。

本研究で開発した mRNA のナノスケール局在・運動解析手法は、ストレス顆粒のみならず、様々な RNA 顆粒に応用可能である。RNA 顆粒形成を介した遺

伝子発現制御は細胞機能において重要な機能を果たしていると考えられているが、その形成機構や機能については不明なことが多い。今後、本手法を疾患に関わる RNA 顆粒や発生過程に寄与する RNA 顆粒へと応用し、RNA 顆粒が司る生命現象の理解に貢献したい。

参考文献

- Anderson, P., and Kedersha, N. 2002. Stressful initiations. *J. Cell Sci.* **115**(16): 3227–3234.
- Anderson, P., and Kedersha, N. 2006. RNA granules. *J. Cell Biol.* **172**(6): 803–8.
- Anderson, P., and Kedersha, N. 2008. Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends Biochem. Sci.* **33**(3): 141–150.
- Anderson, P., and Kedersha, N. 2009. RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**(6): 430–436.
- Bertrand, E., Chartrand, P., Schaefer, M., Shenoy, S. M., Singer, R. H., and Long, R. M. 1998. Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast. *Mol. Cell* **2**(4): 437–445.
- Betzig, E., Patterson, G. H., Sougrat, R., Lindwasser, O. W., Olenych, S., Bonifacino, J. S., Davidson, M. W., Lippincott-Schwartz, J., and Hess, H. F. 2006. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* **313**(5793): 1642–1645.
- Biermann, B., Sokoll, S., Klueva, J., Missler, M., Wiegert, J. S., Sibarita, J.-B., and Heine, M. 2014. Imaging of molecular surface dynamics in brain slices using single-particle tracking. *Nat. Commun.* **5** 3024.
- Dempsey, G. T., Bates, M., Kowtoniuk, W. E., Liu, D. R., Tsien, R. Y., and Zhuang, X. 2009. Photoswitching mechanism of cyanine dyes. *J. Am. Chem. Soc.* **131**(51): 18192–3.
- Dempsey, G. T., Vaughan, J. C., Chen, K. H., Bates, M., and Zhuang, X. 2011. Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging. *Nat. Methods* **8**(12):

- 1027–1036.
- Ester, M., Kriegel, H. P., Sander, J., and Xu, X. 1996. A Density-Based Algorithm for Discovering Clusters in Large Spatial Databases with Noise. *Second Int. Conf. Knowl. Discov. Data Min.* 226–231.
- Femino, A. M., Fay, F. S., Fogarty, K., and Singer, R. H. 1998. Visualization of single RNA transcripts in situ. *Science* **280**(5363): 585–590.
- Fujimura, K., Katahira, J., Kano, F., Yoneda, Y., and Murata, M. 2009. Microscopic dissection of the process of stress granule assembly. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1793**(11): 1728–1737.
- Fusco, D., Accornero, N., Lavoie, B., Shenoy, S. M., Blanchard, J. M., Singer, R. H., and Bertrand, E. 2003. Single mRNA molecules demonstrate probabilistic movement in living mammalian cells. *Curr. Biol.* **13**(2): 161–167.
- Garcia, J. F., and Parker, R. 2015. MS2 coat proteins 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* **21**(8): 1393–1395.
- Gustafsson, M. G. 2000. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J. Microsc.* **198**(2): 82–87.
- Huang, B., Jones, S. A., Brandenburg, B., and Zhuang, X. 2008. Whole-cell 3D STORM reveals interactions between cellular structures with nanometer-scale resolution. *Nat. Methods* **5**(12): 1047–1052.
- Klar, T. A., and Hell, S. W. 1999. Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy. *Opt. Lett.* **24**(14): 954–956.
- Lamond, A. I., and Spector, D. L. 2003. Nuclear speckles: a model for

- nuclear organelles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**(8): 605–612.
- Li, Y. R., King, O. D., Shorter, J., and Gitler, A. D. 2013. Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis. *J. Cell Biol.* **201**(3): 361–372.
- Manley, S., Gillette, J. M., Patterson, G. H., Shroff, H., Hess, H. F., Betzig, E., and Lippincott-Schwartz, J. 2008. High-density mapping of single-molecule trajectories with photoactivated localization microscopy. *Nat. Methods* **5**(2): 155–157.
- Molliex, A., Temirov, J., Lee, J., Coughlin, M., Kanagaraj, A. P., Kim, H. J., Mittag, T., and Taylor, J. P. 2015. Phase Separation by Low Complexity Domains Promotes Stress Granule Assembly and Drives Pathological Fibrillization. *Cell* **163**(1): 123–133.
- Okabe, K., Harada, Y., Zhang, J., Tadakuma, H., Tani, T., and Funatsu, T. 2011. Real time monitoring of endogenous cytoplasmic mRNA using linear antisense 2'-O-methyl RNA probes in living cells. *Nucleic Acids Res.* **39**(4): e20.
- Parker, R., and Sheth, U. 2007. P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol. Cell* **25**(5): 635–646.
- Rossier, O., Oceau, V., Sibarita, J.-B., Leduc, C., Tessier, B., Nair, D., Gatterdam, V., Destaing, O., Albigès-Rizo, C., Tampé, R., Cognet, L., Choquet, D., Lounis, B., and Giannone, G. 2012. Integrins $\beta 1$ and $\beta 3$ exhibit distinct dynamic nanoscale organizations inside focal adhesions. *Nat. Cell Biol.* **14**(10): 1057–1067.
- Rudkin, G. T., and Stollar, B. D. 1977. High resolution detection of DNA-RNA hybrids in situ by indirect immunofluorescence. *Nature* **265**(5593): 472–473.
- Rust, M. J., Bates, M., and Zhuang, X. 2006. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat.*

- Methods* **3**(10): 793–795.
- Sahl, S. J., Leutenegger, M., Hilbert, M., Hell, S. W., and Eggeling, C. 2010. Fast molecular tracking maps nanoscale dynamics of plasma membrane lipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**(15): 6829–6834.
- Saxton, M. J., and Jacobson, K. 1997. Single-particle tracking: applications to membrane dynamics. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **26** 373–399.
- Schneider, C. a, Rasband, W. S., and Eliceiri, K. W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**(7): 671–675.
- Tyagi, S. 2009. Imaging intracellular RNA distribution and dynamics in living cells. *Nat. Methods* **6**(5): 331–338.
- Tyagi, S., and Kramer, F. R. 1996. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.* **14**(3): 303–308.
- Uno, S., Kamiya, M., Yoshihara, T., Sugawara, K., Okabe, K., Tarhan, M. C., Fujita, H., Funatsu, T., Okada, Y., Tobita, S., and Urano, Y. 2014. A spontaneously blinking fluorophore based on intramolecular spirocyclization for live-cell super-resolution imaging. *Nat. Chem.* **6**(8): 681–689.
- Vargas, D. Y., Raj, A., Marras, S. A. E., Kramer, F. R., and Tyagi, S. 2005. Mechanism of mRNA transport in the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**(47): 17008–17013.
- Watson, J. D., and Crick, F. H. 1953. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**(4356): 737–738.
- Yamada, T., Yoshimura, H., Inaguma, A., and Ozawa, T. 2011. Visualization of nonengineered single mRNAs in living cells using genetically encoded fluorescent probes. *Anal. Chem.* **83**(14): 5708–5714.

Zhang, J., Okabe, K., Tani, T., and Funatsu, T. 2011. Dynamic association-dissociation and harboring of endogenous mRNAs in stress granules. *J. Cell Sci.* **124**(23): 4087–4095.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、丁寧かつ熱心なご指導、ご鞭撻を賜りました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心より感謝いたします。

日々の実験や考察について多大なるご指導、ご助言を賜りました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厚くお礼申し上げます。

HMSiR および 2MeSiR を恵与していただくとともに、本研究に貴重なご指導、ご助言を賜りました東京大学大学院薬学系研究科薬品代謝化学教室の浦野泰照教授、宇野真之介博士、東京大学大学院医学系研究科生体物理医学専攻医用生体工学講座生体情報学教室の神谷真子助教に心より感謝申し上げます。

本研究の開始にあたり、様々なご助言をいただきました名古屋大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科学の坂本明彦博士に深く感謝いたします。

本研究を通じてご助言、ご協力を頂きました東京大学大学院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支えてくださった家族と友人に心より感謝いたします。

2016年 1月

菅原 皓