

論文の内容の要旨

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

【序論】

mRNA は遺伝子発現において遺伝情報を DNA からリボソームへと伝達する役割を担う分子であり、転写・翻訳・分解を含めた様々な段階で多様な制御を受けることにより生命機能を支えている。mRNA を介した遺伝子発現調節は真核細胞のストレス応答においても重要な役割を果たす。細胞に熱や酸化ストレスなどの環境ストレスが加わると、細胞質内の mRNA が RNA 結合タンパク質や翻訳開始因子とともに集合しストレス顆粒 (SGs; stress granules) を形成する (図 1A)。

SGs 構成因子に着目した先行研究により SGs はストレス負荷に伴いタンパク質の翻訳を一時的に抑制する機能を持つことが示されており、遺伝子発現パターンを迅速に変化させることにより細胞の損傷を防いでいるとされる。また、SGs を含む RNA 顆粒の形成は神経変性疾患、ウイルス感染、がんなどの疾患と関与するという研究報告があり、RNA 顆粒の司る遺伝子発現調節機構の解明は生物学ならびに医学薬学的見地から重要な研究テーマである。先行研究により SGs 構成因子の同定は進められてきたものの、

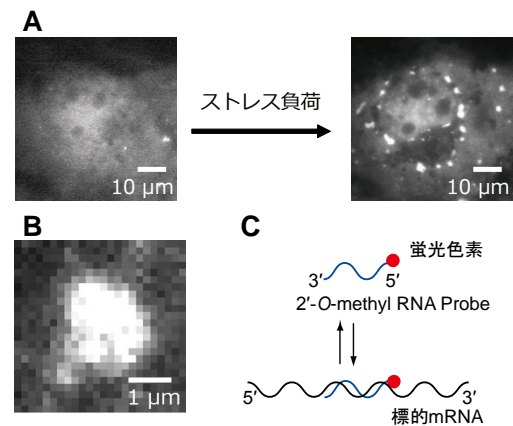


図 1 SGs 内 mRNA の蛍光イメージング

SGs の一過的な形成・離散といったダイナミックな構造を支える分子の局在や運動は明らかにされてこなかった。この原因として、回折限界により空間分解能が制限された従来の蛍光イメージング法では、SGs 内 mRNA のナノメートルスケールでの局在や運動を観察することができなかったということが挙げられる (図 1B)。近年、蛍光分子の明滅現象を活用することにより、回折限界を克服してナノメートルスケールで蛍光イメージングを行う技術が開発されている。そこで、本研究では蛍光標識線形アンチセンスプローブによる内在性 mRNA 蛍光標識法 (図 1C) と回折限界を克服したイメージング技術組み合わせることにより SGs 内 mRNA の局在と運動をナノメートルスケールで解析することを目的とした。

【本論】

蛍光分子の明滅を利用した一分子検出法の概要

本研究では、ナノメートルスケールで mRNA の局在・運動解析を行うにあたり、蛍光分子の明滅現象を活用することとした。蛍光標識された分子が高密度で存在する環境下で従来の方法により蛍光観察を行うと、全体的にぼけた顕微鏡像となり個々の分子を分離して観察することが出来ない (図 2 上段)。一方、蛍光分子の明滅現象を利用し高密度で存在する標的分子の中で、一部のみが蛍光を発する状態とすると、一分子由来の蛍光を観察することが可能となる。取得した一分子由来の蛍光シグナルの重心位置を算出することで、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 (図 2 下段)。本研究では、得られた重心位置情報を積算し画像を再構成することで超解像イメージングを、連続フレームの近傍重心を連結することで一分子追跡を行い、局在と運動のナノスケール解析を実現した。

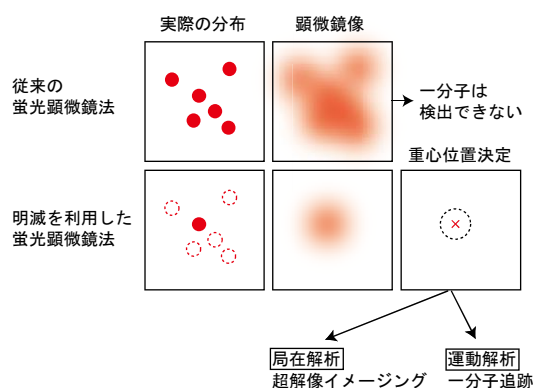


図2 蛍光明滅を用いた一分子検出法

1. 超解像イメージングによる SGs 内 mRNA の局在解析

SGs 内で mRNA は高密度領域を形成していた

Cy5 標識線形アンチセンスプローブにより COS7 細胞内の poly(A)⁺ mRNA を蛍光標識し、SGs を形成させた後に固定した試料を用いて、超解像イメージングによる観察を行った。超解像観察の結果、SGs 内で mRNA は密度差をもって分布し、顆粒内部で高密度領域を形成して分布していることが明らかになった (図 3A)。SGs 内 mRNA 高密度領域についてより詳細な解析を行うために、クラスター解析法を利用して mRNA 高密度領域を自動検出し (図 3B)、検出結果に基づいて定量解析を行った。SGs 内 mRNA 高密度領域の個数とサイズについて解析を行ったところ、mRNA 高密度領域個数は SGs の大きさが大きくなるにつれて増加した (図 3C) が、高密度領域サイズは SGs の大きさの間に問わず直径約 70 nm という常に一定のサイズを持つことがわかった (図 3D)。以上の結果は、SGs 内 mRNA 高密度領域は特定の大きさをもつ構造的単位として機能することを示している。mRNA が小さな集合体を単位として SGs への結合・解離を行うことで、SGs 全体の迅速かつ可逆的な形成・離散が実現されていると考えられる。

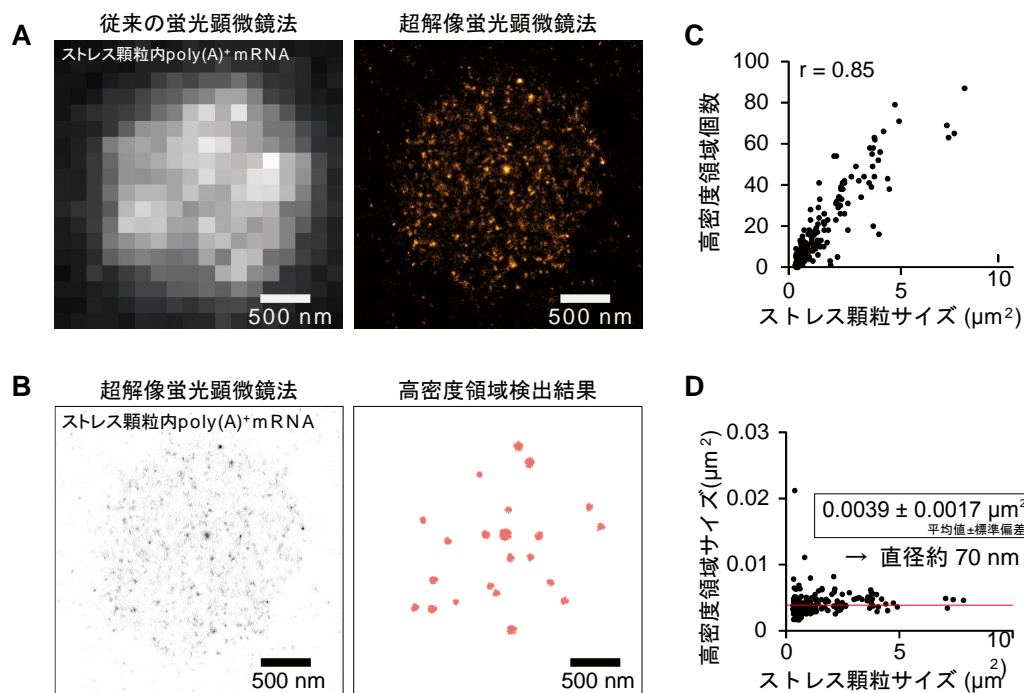


図 3 固定細胞 SGs 内 mRNA の超解像観察

SGs 内 mRNA 高密度領域は動的な構造であった

固定細胞で観察された高密度領域が生細胞内でどのような振る舞いを示すかを調べるために、生きた細胞内で利用可能な明滅型色素 HMSiR を用いて、生細胞内超解像イメージングを行った。poly(A)+ mRNA を標識して観察した結果、SGs 内

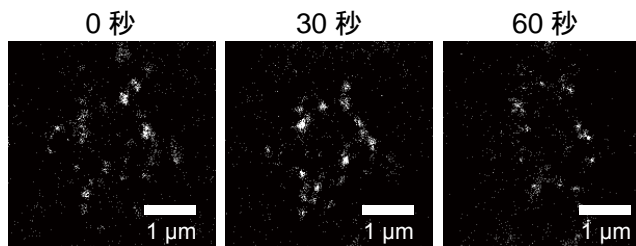


図 4 生細胞 SGs 内 mRNA の超解像観察

mRNA 高密度領域は生細胞内で同じ場所に留まって存在するのではなく、時間経過に従って局在が変化するダイナミックな構造であることを発見した (図 4)。本実験で得られた結果は、固定細胞における超解像局在解析から導かれた、mRNA 高密度領域が構造的単位として機能するという仮説を支持する結果である。

2. 一分子追跡法による SGs 内 mRNA の運動解析

明滅を利用した mRNA 一分子追跡法の開発

SGs 内で mRNA 一分子の運動を解析するために、蛍光色素の明滅を応用した新規の mRNA 一分子追跡法を開発した。物理化学的性質を元に一分子追跡に最適な色素を検討したところ、ローダミン誘導体である 2MeSiR (図 5A) がチオール存在下で安定な明状態を持つ明滅を示すことを見出した (図 5B)。細胞内にはチオールが豊富に存在することから、生細胞内でも同様の現象を引き起こすことが可能であると考え、励起光条件や解析手法を検討した結果、生細胞内での mRNA 一分子追跡に成功した (図 5C)。

