

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。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、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。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。本論文では、蛍光標識線形アンチセンスプローブによる内在性mRNA蛍光標識法と、回折限界を克服したイメージング技術を組み合わせることにより、SGs内mRNAの局在と運動がナノメートルスケールで解析されている。

本論文は、5章より構成されている。第1章「序論」では、本研究の目的と背景、および概要が記載されている。

第2章「材料及び方法」では、本研究で用いた試料や方法が述べられている。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。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。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。

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」では、まず、SGs内でmRNAが高密度領域を形成していることを明らかにした。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。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、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。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。次に、SGs 内 mRNA 高密度領域が動的な構造であることを明らかにした。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 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。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。

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」では、まず、明滅を利用した mRNA 一分子追跡法の開発について解説されている。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 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。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。次に、mRNA 一分子は SGs 内部で動きが制限されていることを明らかにした。新規開発手法を用いて SGs 内内在性 GAPDH mRNA の一分子運動解析を行った。得られた追跡結果から各軌跡の平均二乗変位を求め、運動様式を自由拡散、制限された拡散、静止に分類した。SGs 内 GAPDH mRNA の運動様式の割合を調べたところ、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%という割合で存在し、SGs 内 mRNA の運動には不均一性があることがわかった。また、制限された拡散に分類された軌跡の拡散係数 (D_{conf}) および制限領域の大きさ (R_{conf}) は、SGs 内で小さくなることが明らかになった。以上の結果から、mRNA が SGs 内で何かしらの構造に繋ぎ止められ動きが制限されていることを示唆された。一方で、自由拡散をする分子の拡散係数 (D_{diff}) には SGs 内と細胞質で大きな変化はなく、SGs 内で一部の mRNA は細胞質と同様の振る舞いを示すという結果が得られた。運動解析で得られた結果を局在解析の結果と合わせて考察すると、繫留機能を持つ構造が mRNA の動きを制限することで高密度領域を形成し、SGs の動的な構造を実現していると考えられる。

第5章「総括及び今後の展望」では、本研究のまとめと今後の展望が記載されている。

以上のように、学位申請者は、蛍光分子の明滅現象を利用した超解像蛍光イメージング法を開発し、SGs 内部に新規の mRNA 高密度領域を発見した。また、生細胞内内在性 mRNA 一分子追跡法を新たに開発し、mRNA のナノメートルスケールでの一分子運動を明らかにした。本研究により、SGs の動的な形成・離散は mRNA 高密度領域が構造的単位として働くことで実現されていることが示唆された。今後、本研究で得られたナノメートルスケールの局在・運動の情報を基に、SGs 構成タンパク質と mRNA の相互作用解析などを解析することにより、SGs の持つ翻訳抑制機構を解明できると期待される。よって本論文は博士（薬学）の学位請求論文として合格と認められる。