

論文の内容の要旨

論文題目 生きて細胞内における特定の mRNA のリアルタイム定量

氏名 岡部 弘基

真核生物の遺伝子発現において中心的役割を担う mRNA の一生には、転写、プロセッシング、輸送、局在、分解等の過程があり、複雑かつ多様な遺伝子発現を可能としている。長年の間、mRNA は、核内の DNA が持つ遺伝情報を細胞質に伝える情報伝達分子であると認識されて来たが、近年 siRNA や miRNA などの小分子 RNA や非翻訳 RNA の発見により、積極的に遺伝子発現を調節する機能性分子としても大きな関心を集めている。一方、生理活性分子の機能、動態解析において蛍光イメージング法は時間、空間的な理解の強力なツールとなるが、タンパク質のイメージングと異なり、生きて細胞内における特定の内在性 RNA の蛍光標識技術は無く、生きて細胞内における内在性 mRNA のイメージングはほとんど未開の領域であった。生きて細胞内における RNA 分子のリアルタイム観察は、mRNA や機能性 RNA の動態や機能解析において革新的かつ必須の技術的課題であると考え、本研究では生きて細胞内において配列特異的な内在性 mRNA の蛍光標識法を確立した。さらに、確立した蛍光標識法を応用して、特定の mRNA のリアルタイム定量法を構築した。

【1】アンチセンス人工核酸を用いた特定の mRNA のリアルタイムイメージング

特定のmRNAを可視化するために、蛍光標識したアンチセンス核酸を細胞内にてハイブリダイズさせ、蛍光顕微鏡を用いて観察する方法を考案した。アンチセンス核酸分子としては細胞内に

おいて安定に存在し、RNAへの高い親和性を有する2' O-methyl RNAを選択した。さらに、標的mRNAとハイブリダイズしたシグナルと、未結合のプロープ由来の蛍光とを区別するために、2種類の人工核酸をそれぞれ異なる蛍光団で標識し、ハイブリダイズに伴う2種の蛍光団間に起こる蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を用いて検出することとした(Fig.1)。これら2種のアンチセンスプロープは標的mRNAのそれぞれ隣接する配列に相補的に結合することで、2種の蛍光団間の距離が短くなり、FRETが生じるが、未結合のプロープは蛍光団が接近せず、FRETは生じない。

標的mRNAとして、転写因子AP-1の構成タンパク質であるc-Fosをコードしているhuman *c-fos* mRNAを選択し、これに相補的な16-20塩基の各種核酸骨格を有するドナー(Cy3標識)及びアクセプター(Cy5標識)プロープを設計及び調製した(Fig.1)。調製したプロープの標的mRNAとの結合能を、蛍光分光光度計を用いて評価した。Fig.2に示すように、調製したアンチセンスプロープは*in vitro*転写システムにより合成した*c-fos* mRNA存在下、FRET蛍光として検出された。一方、標的mRNA非存在下、もしくはセンス配列を有するプロープを用いた場合はFRET蛍光が観察されず、アンチセンスプロープが標的mRNAに配列依存的に結合することが確認された。また、標的mRNAとプロープを混合した後のFRET蛍光の時間変化測定を行ったところ、その結合速度定数は $172,000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であり、プロープとmRNAとの結合は速やかに進行することが分かった。

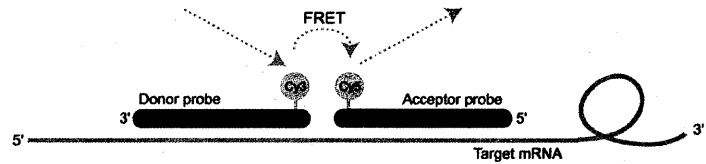


Fig.1 アンチセンスプロープを用いた mRNA の蛍光標識法

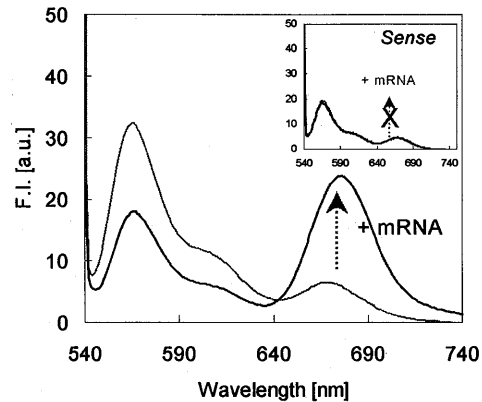
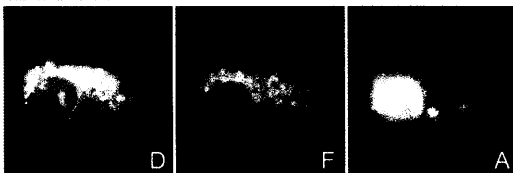


Fig.2 アンチセンスプロープの蛍光スペクトル[ex. 532 nm, 黒線が mRNA 添加後, 挿入図はセンスプロープを用いたスペクトル]

2' O-methyl RNA probes



DNA probes

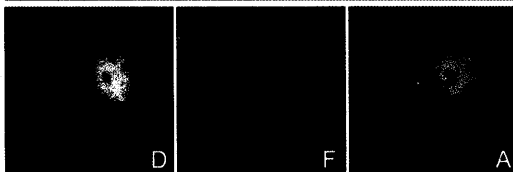


Fig.3 Cos7 細胞中の *in vitro* mRNA とハイブリダイズしたアンチセンスプロープの蛍光像 [D:ドナー, F: FRET, A:アクセプター蛍光像]

次に、生きた細胞内におけるアンチセンスプロープと mRNA の結合安定性を評価するため、*in vitro* 合成した *c-fos* mRNA をあらかじめアンチセンスプロープとハイブリダイズさせた後に、マイクロインジェクションにより Cos7 細胞の細胞質に導入し、落射蛍光顕微鏡を用いて観察した。ドナー蛍光(Cy3)、アクセプター蛍光(Cy5)及び FRET 蛍光(Cy3 を励起した際の Cy5 の蛍光)の 3 種の蛍光像を、それぞれ冷却 CCD カメラを用いて取得した。アンチセンス 2' O-methyl RNA を用いた場合、ドナー蛍光、アクセプター蛍光は細胞全体に分布していたのに対し、FRET 蛍光像においてのみ細胞質

に mRNA 特異的なシグナルが観察された (Fig.3)。一方、FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) 法など化学固定した細胞内の mRNA の検出に用いられる DNA プローブを mRNA とハイブリダイズさせて導入すると、プローブは速やかに核内に移行し (Fig.3)、DNA プローブは mRNA とハイブリダイズしていても生きた細胞内では速やかに解離することが示唆された。以上の検討から、人工核酸である 2' *O*-methyl RNA を用いて FRET 検出することが、ターゲットの mRNA を特異的に検出するのに有効な手法であることが分かった。

続いて、Cos7 細胞に内在性の *c-fos* mRNA を検出するため、アンチセンス 2' *O*-methyl RNA プローブを Cos7 細胞の細胞質にマイクインジェクションにより導入した。プローブの多くは導入後速やかに核内へと移行し、細胞質において標的 mRNA を検出することは出来なかった。そこで、プローブの核内への移行を防ぐため、アンチセンスプローブを、ビオチンを介してストレプトアビジンを結合させて、サイズ効果により核膜孔を通過できない誘導体へと変換した。ストレプトアビジンを結合したドナー及びアクセプタープローブを混合し、Cos7 細胞の細胞質に導入したところ、プローブは核内へ移行せず細胞質に分布した (Fig.4A)。種々の濃度のアンチセンスプローブを導入したところ、濃度依存的に FRET シグナルが得られた (Fig.4B)。一方、ストレプトアビジンを結合したセンスプローブや DNA プローブを導入した細胞においては、FRET シグナルは検出されなかった (Fig.4B)。以上の検討により、ストレプトアビジンを結合したアンチセンス 2' *O*-methyl RNA プローブを用いて細胞内に内在する特定の mRNA を選択的に検出する方法を確立した。

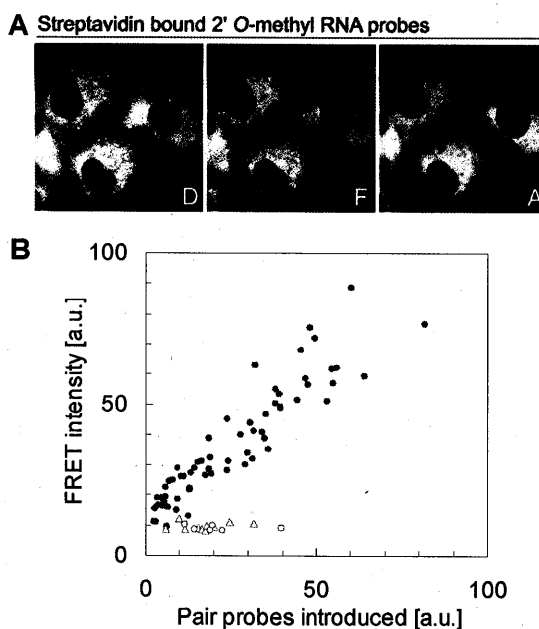


Fig.4 ストレプトアビジンを結合したプローブを用いた細胞内における内在性 *c-fos* mRNA の FRET による検出 [A 蛍光像, B 導入したプローブの量と FRET 蛍光強度の関係 (●アンチセンス, ○センス, △DNA プローブ)]

【2】蛍光相関分光法を用いた特定の mRNA のリアルタイム定量

確立した蛍光標識法により、細胞内に内在性の *c-fos* mRNA を蛍光標識し、蛍光相関分光法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS) を用いて生きた細胞における発現量の定量を試みた。FCS は対物レンズによって絞り込まれたレーザー光による共焦点領域を通過する蛍光分子の発する蛍光のゆらぎを解析することにより、その領域内平均分子数と拡散時間を算出できる測定系である。細胞内に導入したアンチセンス 2' *O*-methyl RNA プローブは標的 mRNA の発現量依存的に mRNA に結合、非結合の 2 状態をとるので、FCS 測定を行うことで、拡散時間の異なる 2 状態をそれぞれ定量し、結合比率から標的 mRNA の濃度を算出できると考えた。

まず *in vitro* にて、FCS による mRNA の定量を行った。In vitro 合成した *c-fos* mRNA と Cy3 標識アンチセンス 2' *O*-methyl RNA プローブを混合後、Cy3 を励起して FCS により解析した (Fig.5 挿入図)。プローブは mRNA との結合、非結合型を、それぞれの拡散時間の違いから分離して定量することが出来た。また、mRNA 濃度一定条件における種々濃度のアンチセンスプローブの FCS 測定から、

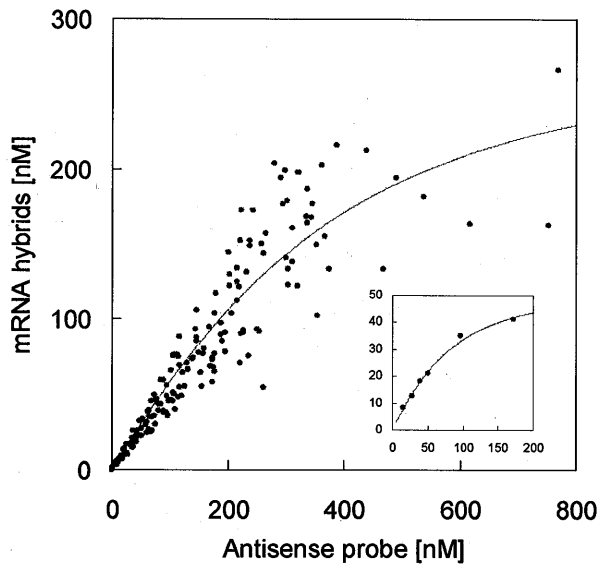


Fig.5 FCSによる mRNA の定量. 導入したアンチセンスプローブの濃度と mRNA に結合したプローブ濃度の関係 [挿入図は *in vitro* における結果]

アンチセンスプローブの濃度を変化させて解析を行ったところ、発現している mRNA の濃度の不均一性を反映して各プローブ量における結合量にばらつきを示した (Fig.5)。多数の細胞について解析を行ったところ、細胞内における解離定数 ($K_D = 170 \pm 29.6$ nM) を算出することができた。また解離定数から個々の細胞における *c-fos* mRNA の濃度を定量した (Fig.6)。また、本定量法を用いて、転写阻害剤アクチノマイシン D 処理をした時の *c-fos* mRNA の減少を検出することが出来た。

【3】まとめ

本研究において私は特定の mRNA のリアルタイム検出を行うために、内在性の mRNA を選択的に検出可能なラベル法を確立した。本法では FRET に基づき標的 mRNA と結合したプローブのみを検出するため、未結合のプローブと共存下でも選択的に検出可能であり、生きた細胞においてリアルタイムに内在性の *c-fos* mRNA を検出することが出来た。また、確立したラベル法を用いて生きた細胞内に内在する mRNA を蛍光標識し、細胞内のプローブの結合・非結合型の拡散定数の違いを利用してそれらの分子数を FCS で計測した。以上により、生きた個々の細胞において内在性の mRNA の濃度をリアルタイムに定量することに初めて成功した。

アンチセンスプローブと *c-fos* mRNA との解離定数 ($K_D = 44.5 \pm 6.80$ nM) を算出した。また、解離定数から算出した mRNA の濃度は、吸光度から定量した濃度とほぼ一致した。続いて、生きた細胞において FCS を用いた同様の検討をするため、ストレプトアビジンを結合したアンチセンス 2' *O*-methyl RNA プローブを Cos7 細胞の細胞質にマイクインジェクションにより導入し、細胞質におけるプローブの蛍光を FCS により解析した。細胞質における FCS 解析条件の最適化を行ったところ、細胞内においても、結合、非結合型の 2 成分を検出することが可能であった。一方、センスプローブを導入した細胞内では、ほとんどのプローブは非結合型であった。発現している *c-fos* mRNA の濃度は細胞個々に異なるが、導入するアンチセンスプローブの濃度を変化させて解析を行ったところ、発現している mRNA の濃度の不均一性を反映して各プローブ量における結合量にばらつきを示した (Fig.5)。多数の細胞について解析を行ったところ、細胞内における解離定数 ($K_D = 170 \pm 29.6$ nM) を算出することができた。また解離定数から個々の細胞における *c-fos* mRNA の濃度を定量した (Fig.6)。また、本定量法を用いて、転写阻害剤アクチノマイシン D 処理をした時の *c-fos* mRNA の減少を検出することが出来た。

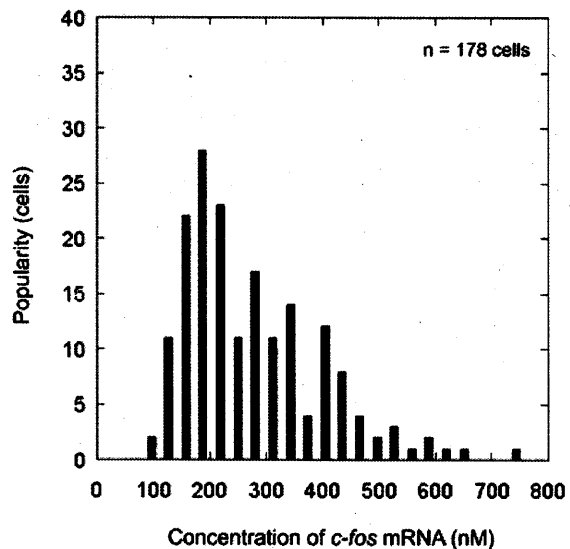


Fig.6 FCS により定量した Cos7 細胞に内在する *c-fos* mRNA の濃度. 178 細胞の結果をヒストグラムに示した。