

## 審査の結果の要旨

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、生きた細胞内における特定の内在性 RNA の蛍光標識技術は無く、生きた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。したがって、生きた細胞内における 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。本論文は、このような現状を鑑み、生きた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、さらに、この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研究開発した結果をまとめたものである。

まず、第1章では、遺伝子発現における RNA の役割や、RNA の検出、定量技術の現状など、本研究の背景が述べられている。

第2章では、本研究で用いた材料と実験方法がまとめられている。特に、キーテクノロジーとなる蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) によるイメージングと、蛍光相関分光法 (FCS) が詳細に説明されている。

第3章では、アンチセンス人工核酸を用いて生きた細胞内における特定の mRNA のリアルタイムイメージング法を確立した。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 FRET を検出した。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。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。調製したアンチセンスプローブは *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ブを用いた場合は FRET 蛍光が観察されず、アンチセンスプローブが標的 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 とプローブを混合した後の 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、プローブと mRNA との結合は速やかに進行することが分かった。次に、生きた細胞内におけるアンチセンスプローブと 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ブ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。一方、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、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 細胞に内在性する *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ロ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體へと変換した。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。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。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。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。

第 4 章では、FCS による生きた細胞内における特定の mRNA のリアルタイム定量法を確立した。第 3 章で確立した蛍光標識法を用い、細胞内に内在する *c-fos* mRNA を蛍光標識し、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。その結果、mRNA と結合、非結合のプローブを、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、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、予め吸光度から定量してあっ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だった。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。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。さらに、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。

第 5 章では、本研究のまとめと展望が述べられている。

以上のように、学位申請者は生細胞において特定の 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 を検出することに成功した。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。よって、本研究を行った岡部弘基は博士（薬学）の学位をうけるにふさわしいと判断した。