

審査の結果の要旨

氏名 張 瑋璋

遺伝子調節において、mRNA 代謝の役割は極めて重要である。その一例として、mRNA の代謝調節は真核細胞が不利な環境変化に適応するために行うストレス応答において中心的な役割を果たしていることが挙げられる。真核細胞はストレスを受けた時に、細胞質内にストレス顆粒 (stress granules, SG) を形成する。SG はストレス環境下にはしか存在せず、特定の mRNA を選別、リモデルする働きがあり、mRNA の翻訳制御、分解、貯蔵に機能すると言われている。SG の機能は翻訳調節の一環であり、その制御の対象である mRNA の動態を直接観察することは mRNA の代謝のみならず翻訳調節機構の解明に大変有意義であると考えられる。しかしながら、今までストレス環境中の SG における mRNA の研究は主にタンパク質をマーカーとして用いて間接的にのみ進められてきたため、mRNA の挙動は不明であった。そこで、本論文では、線形アンチセンスプローブを用いて生きた細胞内における内在性 mRNA を可視化し、SG における mRNA のダイナミクスをリアルタイムに解析することにより、細胞がストレスを受けた際の遺伝子発現・調節メカニズムを明らかにしようとしている。

まず、第 1 章では、イントロダクションとしてストレス環境化における mRNA や miRNA の応答など、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、pre-miRNA の調製、光退色後蛍光回復法 (fluorescence recovery after photobleaching, FRAP)、蛍光相関分光法 (fluorescence correlation spectroscopy, FCS) が詳細に説明されている。

第 3 章では、ストレス環境下における mRNA の動態について述べられている。まず、内在性 mRNA を可視化するために、5' 端に Cy3 を、3' 端に biotin-streptavidin を標識した poly(U)₂₂ 2'-O-methyl RNA probe を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、poly(A)⁺ mRNA を標識した。蛍光相関分光法 (fluorescence correlation spectroscopy, FCS) によって、プローブ結合率をその拡散運動から定量解析したところ、生きた細胞内の約 90% のプローブが mRNA に結合していることを確認できた。0.5 mM arsenite により酸化ストレスを負荷して落射蛍光顕微鏡で観察したところ、生きた細胞の内在性 mRNA が集合し、顆粒を形成する様子をリアルタイムに観察することにはじめて成功した。内在性 poly(A)⁺ mRNA はストレスを負荷してから 20 分前後に多くの小さい顆粒が形成し、30 分頃から小さい顆粒は徐々に大きい顆粒へと集合していった。一方、ストレスを負荷していない細胞や、コントロールプローブである poly(A)₁₈ 2'-O-methyl RNA probe が導入された細胞ではこのような変化は見られなかった。また、SG に局在するタンパク質であり、マーカーとして広く用いられている TIA-1 の GFP 融合タンパク質を発現させることで、mRNA 顆粒が SG であることを確認した。引き続き、SG 内の mRNA の動態が FRAP により解析されている。SG に局在するタンパク質を FRAP で調べた先行研究により、SG の構成タンパク質は常に SG 内外を出入りしており、ダイナミックな状態にあることが示唆された。しかし、実際に SG へ集まった内在性 mRNA の動態は不明であった。そこで、本研究では内在性 poly(A)⁺ mRNA を上述の方法で蛍光標識し、ストレス負荷により形成した SG 内の内在性 poly(A)⁺ mRNA のダイナミクスを FRAP で調べた。その結果、SG 中の約 34% の poly(A)⁺ mRNA は動きが制限されており、SG の中に留まっていることを発見した。さらに、蛍光回復曲線は異なる時定数を有する二成分の指数関数で近似することができた。なお、ストレスの負荷時間を変えたり、標的 mRNA を変えて単一種類の mRNA (*c-fos* mRNA) を標識したりしても同様の結果が得られた。蛍光回復曲線から得られた二成分の意味を明らかにするため、FRAP を行う際の光照射範囲を拡大し、時定数 τ_1 , τ_2 の変化を調べた。その結果、 τ_1 は光照射範囲の拡大とともに大きくなったに対し、 τ_2 は変化しなかった。このことから、 τ_1 は自由に運動する mRNA を示し、 τ_2 は運動が制限されている mRNA の SG との結合・解離を表していると考えられた。

第4章では、生細胞における miRNA のイメージングが行われている。近年、miRNA は細胞のストレス応答に関わっていることが報告されている。SG は argonaute protein や、miRNA、RNA editing enzymes などを取り込んで miRNA の機能を調節し、SG 内にある特定の mRNA に機能する可能性が示唆された。このことから、miRNA を調節することで、細胞は特定の mRNA の発現を変化させてストレスに対応している可能性がある。しかし、従来の生化学的手法による細胞集団から回収した構成因子の解析や、タンパク質の相互作用解析法では限界を示しており、一細胞レベルでの miRNA の直接解析法が求められていた。そこで、本研究ではこれまでに構築した内在性 mRNA のリアルタイムイメージング法に加え、miRNA を蛍光イメージングすることにより、その細胞内の動態をはじめ、mRNA の動態との同時解析を目的とした。生細胞において miRNA をイメージングするため、3' 端に Cy3 標識した RNA 骨格の let-7a-1 miRNA guide strand と 3' 端に Cy5 標識した RNA 骨格の let-7a-1 miRNA passenger strand を濃度比 1:1 で反応させ、miRNA/miRNA* duplex を調製した。それを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た。0.5 mM arsenite により酸化ストレスを負荷して落射蛍光顕微鏡で観察したところ、Cy3 が示す guide strand は細胞質に分布し、ストレス応答にともない SG へ集合した。一方、Cy5 が示す passenger strand はほぼ細胞質から消失し、このような変化は見られなかった。また、この結果が標識した蛍光色素に起因しないことを示すため、3' 端に Cy5 標識した guide strand と 3' 端に Cy3 標識した passenger strand を用いて同様の実験を行った結果、Cy5 が示す guide strand はストレス環境下に SG へ集合が見られた。さらに、いかなる strand でも一本鎖で細胞内に導入した場合はストレス応答による局在化は見られなかった。これらの結果から、導入した miRNA が機能して RISC 複合体へ取り込まれること、また miRNA 複合体はストレス環境下で SG に局在することを明らかにした。

第5章では、まとめと今後の展望が述べられている。

以上のように、学位申請者は、線形アンチセンスプローブを用いて、ストレスによる内在性 mRNA の局在変化に伴うダイナミックな制御の可視化に成功した。この過程で、一部の mRNA の動きは SG 内に制限されていることを発見したが、これは生きた細胞の内在性 mRNA のリアルタイムイメージングによって初めて明らかになった結果である。生理的な意味としては、mRNA が SG に留まることで、その翻訳抑制や、リモデルなどを可能にし、mRNA レベルでのストレス応答の中心的な役割を果たしていると考えられる。本法は種々のダイナミックな mRNA 調節の研究への応用が期待される。また、miRNA の mRNA 制御への寄与を解明するため、生細胞内での miRNA の蛍光イメージング法を開発し、miRNA が SG における mRNA 調節に関与することを発見した。miRNA をリアルタイムで追跡することにより、ストレス環境下の局在変化やその役割などの解明はもちろん、miRNA による遺伝調節の研究の展開も期待される。よって、本研究を行った張ジュンウェイは博士（薬学）の学位を受けるにふさわしいと判断した。