

氏 名 稲熊 あすみ

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1474 号

学位授与の日付 平成 24 年 3 月 23 日

学位授与の要件 物理科学研究科 構造分子科学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 内在性 mRNA を可視化する蛍光プローブの開発と β アク
チン mRNA の細胞内局在解析

論文審査委員 主 査 教授 青野 重利
教授 桑島 邦博
准教授 古谷 祐詞
准教授 藤井 浩
教授 小澤 岳昌 東京大学
准教授 小島 英理 東京工業大学

論文内容の要旨

本論文は、全四章で構成される。序章では、生命現象を研究する上でのライブイメージングの利点、および既存の mRNA ライブイメージング法の問題点を概説した上で、本研究の目的を記述した。生物試料から空間的情報を得るために広く使われている手法は、サンプルを固定し、特定の観察対象物を染色して、顕微鏡で観察する方法である。しかし、この方法では同一のサンプルで時間的経過を追うことができない。ライブイメージングは生きたサンプルを観察するため、このような問題点を解決できる。

これまでに、mRNA が細胞内の特定の領域に局在することが知られている。しかし、その仕組みや生理的な意義の多くは解っておらず、ライブイメージング法による mRNA の局在や、それに伴う動態の解明によって、これらの現象への理解が深まることが期待されている。既存の mRNA ライブイメージング法には、内在性 mRNA を可視化できないという欠点や、マイクロインジェクションを用いるため、細胞へ与えるダメージが懸念される、といった欠点が存在し、mRNA のライブイメージング法には更なる改良が必要である。本研究では、既存の mRNA イメージング法の持つ欠点を克服し、一分子レベルでの mRNA の動態を可視化できるプローブの開発を目的とした。

第 1 章では、全長の蛍光タンパク質を用いる「全長型プローブ」の開発について記述した。全長型プローブの構成と作動原理について説明し、設計したプローブの有用性を検証した結果と考察を記述した。

全長型プローブは、配列特異性を持つ RNA 結合タンパク質 (*Homo sapiens* Pumilio1 Homology Domain : HsPUM1-HD) と蛍光タンパク質 (Enhanced Green Fluorescent Protein : EGFP) から構成される。HsPUM1-HD は、RNA の認識に関わる数アミノ酸に変異を加えることによって、任意の RNA8 塩基配列に特異的に結合するように改変できる。観察対象の mRNA 配列に合わせて設計した二つの変異型 HsPUM1-HD の間に EGFP を組み込むことで、観察対象の mRNA 内の 16 塩基に特異的に結合し、蛍光標識するプローブを考案した。また、プローブに核移行シグナルペプチド配列 (Nuclear Localization Signal; NLS) を付加することによって、mRNA に結合していないプローブを核内へ局在させ、細胞質内の背景光が低減されるように設計した。このプローブは、プローブの遺伝子を細胞内へ導入することで、細胞内で産生される。このため、リポフェクションを用いて低侵襲的に細胞内へプローブを導入することができる。

本研究では、既に局在や動態が報告されている β アクチン mRNA を可視化することで、全長型プローブの有用性を評価した。作製したプローブの遺伝子を細胞に導入し、落射照明蛍光顕微鏡で観察した。核付近と細胞辺縁部付近に見られたプローブの局在は、過去に報告された β アクチン mRNA の局在と一致した。この結果から、プローブが β アクチン mRNA を可視化できることが示唆された。続いて、免疫沈降により細胞抽出液からプローブを単離し、プローブに結合している mRNA を逆転写 PCR によって増幅したところ、 β アクチン mRNA が検出された。また、*in situ* ハイブリダイゼーションによって β アクチン mRNA を標識し、プローブの細胞内局在と比較したところ、プローブは β アクチン mRNA と共局在を示した。これらの結果から、プローブは β アクチン mRNA に特異的に結合することが証明された。全反射照明蛍光顕微

鏡を用いて、プローブを発現した細胞の観察を行ったところ、輝点状の蛍光シグナルが多数観察された。輝点状に観察される蛍光シグナルは一段階消光を示した。従って、輝点状に観察される蛍光シグナルが一分子の EGFP に由来することが証明され、 β アクチン mRNA を一分子レベルで検出できることを明らかにした。また、観察された輝点は、微小管上を直線的に移動した。輝点の動態が、過去に報告された β アクチン mRNA の動態と酷似していたことから、本研究で作製したプローブは本来の動態を阻害することなく、 β アクチン mRNA を可視化できることが示唆された。

第2章では、二断片に切断した蛍光タンパク質の再構成法を利用した「再構成型プローブ」の原理を説明し、設計したプローブの有用性を検証した結果と考察を記述した。

再構成型プローブは、EGFP の N 末断片を連結した変異型 HsPUM1-HD と、EGFP の C 末断片を連結した変異型 HsPUM1-HD から構成される。これらのプローブは細胞内で発現しても蛍光を示さないが、二つのプローブが mRNA に結合すると EGFP の二断片が近接して EGFP の再構成が起こる。それぞれのプローブが mRNA 内の二つの 8 塩基配列に結合して初めて蛍光を示すプローブとして、再構成型プローブを考案した。

再構成型プローブを発現した細胞に対し、免疫沈降・逆転写 PCR 法を行った。その結果、 β アクチン mRNA がいずれのプローブからも検出されたことから、二つのプローブは共に β アクチン mRNA に結合することが示された。また、プローブの遺伝子を導入した細胞で、 β アクチン mRNA を *in situ* ハイブリダイゼーションによって標識したところ、 β アクチン mRNA と EGFP が共局在する様子が観察された。この結果から、再構成型プローブが β アクチン mRNA に特異的に結合し、EGFP の再構成が起きることが確認された。続いて、プローブを発現した細胞を全反射照明蛍光顕微鏡で観察した。細胞内では、輝点状の蛍光シグナルが一段階消光を示した。これは、輝点が一分子の EGFP に由来することを意味し、一分子の β アクチン mRNA の観察が可能であることを証明した。血清刺激に対する輝点の局在変化や、微小管上を移動する輝点の動態は、 β アクチン mRNA の過去の知見に一致した。このことから、作製したプローブが局在や動態を妨げずに β アクチン mRNA を可視化できることが示唆された。

第3章では、第1章と第2章を総括し、結論を述べた。本研究では、新規の mRNA イメージング用プローブとして、全長型プローブと再構成型プローブを開発し、その作製に成功した。まず、作製した両プローブが標的 mRNA に特異的に結合することを証明し、これらのプローブによって可視化された β アクチン mRNA が、これまでに報告されている局在や動態を示すことを実証した。両プローブにはそれぞれ利点があり、利点に応じた使い分けによって、多くの生物学的知見を得られることが期待される。全長型プローブは、EGFP の再構成に伴う発色団の形成に時間を要しないため、mRNA のスプライシングや、前駆体 mRNA から成熟 mRNA への修飾過程など、転写直後の mRNA の観察に適していると考えられる。一方、再構成型プローブは、mRNA に結合して初めて蛍光を示すため、mRNA に結合していないプローブに由来する背景光が抑えられる。このことから、mRNA の輸送や翻訳、分解などの過程における一分子の mRNA 観察に有用的であると考えられる。

開発したいずれのプローブも、低侵襲的に内在性 mRNA を可視化することができる。本研究により開発したプローブを利用し、様々な mRNA の細胞内局在と動態を観察することにより、

それらの仕組みや生理的意義の解明が期待される。

本論文は、生細胞内に存在する mRNA 分子の動態を 1 分子レベルで可視化する手法の開発に関する研究結果をまとめたものである。

本論文は全 4 章からなる。第 1 章では、mRNA 可視化解析についての序論として、mRNA の細胞内局在および動態の生理学的意義、また既存の mRNA 可視化法について述べている。近年、細胞遊走や発生分化などの生理現象に伴い、一部の mRNA が細胞内の特定の部位に局在することが報告されている。従って、mRNA の局在や動態を可視化解析することは、様々な生理現象の発現機構を理解する上で極めて重要である。これまでに生細胞内の mRNA の可視化検出法として、モレキュラービーコン法や MS2 システムと呼ばれる手法が開発されている。しかしこれらの手法では、シグナル/ノイズ比が悪く、個々の mRNA 分子の動態を追跡できない、プローブの細胞への導入を効率よく行えないなど、様々な問題が存在した。これらの従来法の問題点を指摘した上で、本研究の目的が内在性 mRNA を生細胞内で 1 分子可視化できるプローブの開発であることを示し、その開発意義を説明している。

第 2 章は、全長の GFP を用いた β アクチン mRNA 可視化プローブの開発に関して記述している。このプローブは、RNA 結合タンパク質 Pumilio 中の RNA 結合ドメイン PUM-HD の変異体と、緑色蛍光タンパク質 EGFP を利用し、 β アクチン mRNA 中の 2 カ所の 8 塩基配列を特異的に認識するように設計されている。本プローブを用いて、生細胞内の β アクチン mRNA を 1 分子レベルで可視化解析できることを実証した。また、 β アクチン mRNA が細胞内において、方向性を持って輸送される様子、および細胞骨格の一種である微小管上に局在している様子を観察することに成功した。開発したプローブは、1 分子のプローブを用いて 1 分子の内在性 mRNA の動態を可視化できる世界で初めてのプローブであり、mRNA の動態解析を行う上で大きな意義を有している。

第 3 章は、分割 GFP を用いた β アクチン mRNA 可視化プローブの開発に関して記述している。このプローブは、分割 GFP が近接時に再構成する現象を用いることで、プローブが β アクチン mRNA に結合した時に初めてプローブが蛍光性となるように設計されている。開発したプローブは、第 2 章で述べた全長 GFP を用いたプローブの改良型であり、プローブの信頼性を向上させることに成功した。プローブを発現させた生細胞を用いた解析では、生細胞内の β アクチン mRNA を 1 分子レベルで可視化解析し、方向性のある運動や微小管との共局在を観察したことに加え、細胞に血清で刺激を与えた際の mRNA の局在変化を解析することに成功した。本プローブは β アクチン mRNA の 1 分子動態の観察に加え、細胞に刺激を加えた際の局在変化の解析にも成功したことで、様々な mRNA 細胞機能発現機構の解明に向けて非常に有用なツールになることが期待される。

最終章である第 4 章では、本研究で開発された 2 種類の β アクチン mRNA プローブの利点とこれからの課題を要約し、プローブ開発の学術的意義、既存の検出法に対する利点、今後応用可能な研究対象、および将来的な研究展望について記述されており、最後に研究全体を総括している。

以上のように、本博士論文で行った研究では β アクチン mRNA 可視化プローブの開発を通じ、生細胞内における内在性 mRNA 1 分子の動態解析法を世界で初めて確立したものであ

り、生命科学の実験手法の新たな方向性を示したものとして高く評価できる。また、本論文の成果の一部は、すでに査読付きの国際的学術雑誌に一報が公表され、もう一報が投稿中であり、語学力に関しても学位授与に十分なレベルに達していると判断された。以上より、本論文は博士（理学）の学位授与に値すると審査委員全員一致で判断した。