

内在性 mRNA を可視化する蛍光プローブの開発と  
 $\beta$  アクチン mRNA の細胞内局在解析

Development of Fluorescent Probe for Visualizing Endogenous mRNA  
and Analysis on Localization of  $\beta$ -actin mRNA in Living Cells

稲熊 あすみ

博士（理学）

総合研究大学院大学  
物理科学研究科 構造分子科学専攻

平成 23 年度



## 謝辞

本研究の遂行にあたり終始ご指導をいただいた東京大学大学院理学研究科化学専攻教授小澤岳昌先生に心より感謝申し上げます。同専攻特任助教吉村英哲先生，並びに山田俊理氏には，多大なるご協力をいただいた。ここに深謝の意を表す。本論文の主査である自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター戦略的方法論研究領域教授青野重利先生，および，副査である同研究領域教授桑島邦博先生，同研究領域准教授藤井浩先生，自然科学研究機構分子科学研究所生命・錯体分子科学研究領域生体分子情報研究部門准教授古谷祐詞先生，外部審査員である東京工業大学大学院生命理工学研究科生命情報専攻准教授小嶋英理先生には，本論文の細部にわたりご助言，ご指導いただいた。深くお礼申し上げます。名古屋大学革新ナノバイオデバイス研究センター特任教授宇理須恒雄先生，東京大学大学院理学研究科化学専攻小澤研究室の各位，そして自然科学研究機構分子科学研究所生命・錯体分子科学研究領域生体分子情報研究部門古谷グループの各位には，日頃より大変お世話になった。この場を借りて謝意を表す。最後に，温かく支えてくれた家族に感謝する。





## 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  $\beta$  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  $\beta$  アクチン mRNA の局在と一致した。この結果から、プローブが  $\beta$  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、 $\beta$  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  $\beta$  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  $\beta$  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  $\beta$  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、 $\beta$  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  $\beta$  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、 $\beta$  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、 $\beta$  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  $\beta$  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、 $\beta$  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、 $\beta$  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  $\beta$  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  $\beta$  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、 $\beta$  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  $\beta$  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  $\beta$  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。



## Abstract

The thesis is composed of four chapters. In the introduction, I overviewed advantages and limitations of the existing methods for mRNA imaging in living cells. Several mRNAs are known to localize at specific compartments of mammalian cells, but the mechanism and physiological significance remain unclear. Imaging of mRNA localization and its dynamics in living cells would lead to an understanding of the biological phenomena. Although various fluorescent probes for mRNAs have been reported previously, the methods include some crucial limitations. A conventional strategy, named molecular beacon methods, uses a probe of an oligonucleotide labeled with synthetic fluorophores. Because the oligonucleotide probes can be designed to have complementary sequences to target mRNAs, the probes have high specificity to the target mRNAs. However, this method necessitates a procedure of injection of the probe to target cells, which is harmful to living cells. Also, genetically encoded probes are useful for live cell imaging of mRNAs because it is sufficient to introduce the expression vector of the probe into target cells. This method using genetically encoded probes is easier and less harmful to the cells than that using microinjection, but is generally necessary for additional sequences of the target mRNA as the recognition site for the probe. After summarizing such backgrounds, I described that the aim of this study was to develop novel probes for imaging mRNAs in living cells and to analyze dynamics of mRNAs in a single mRNA level.

The second chapter focuses on development and evaluation of the “full-length probe”, in which a full-length green fluorescent protein was used. The full-length probe consists of two RNA binding domains called Homo sapiens Pumilio1 homology domain (HsPUM1-HD) and an enhanced green fluorescent protein (EGFP). HsPUM1-HD has an ability to bind to a specific sequence of eight RNA bases. The recognition sequence can be altered by mutation of amino acids, which are involved in RNA base recognition. I designed a full-length probe, which was composed of EGFP sandwiched with two HsPUM1-HD mutants. The HsPUM1-HD mutants were adjusted to bind to a target mRNA, so that the probe specifically labeled the target mRNA with 16-base recognition. A nuclear localization signal (NLS) peptide sequence was connected with the amino

terminus of the probe, so that the free probes were accumulated in the nucleus, whereas the probes binding to  $\beta$ -actin mRNA were localized in cytosol.

In this study,  $\beta$ -actin mRNA was chosen as a target of mRNAs, because the localization of  $\beta$ -actin mRNA and its dynamics inside the cells has been well studied. Cells transfected with the gene of the probe were observed by using an epifluorescence microscope. Fluorescent signals of the probe were localized at the perinucleus and in the periphery of cells. Next, complexes of the probe and mRNAs were isolated from the cells by immunoprecipitation (IP), and  $\beta$ -actin mRNA was amplified with reverse transcription-PCR (RT-PCR) from mRNAs that bound to the probe. The results showed that  $\beta$ -actin mRNA was detected only from the cells expressing the probe. In situ hybridization of  $\beta$ -actin mRNA was also performed in order to compare the localization of  $\beta$ -actin mRNA and the probe. It was shown that the probe was co-localized with a fluorescent oligonucleotide which labeled  $\beta$ -actin mRNA. The results described above demonstrate that the probe recognized  $\beta$ -actin mRNA specifically.

I next observed single  $\beta$ -actin mRNAs using total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy. When the probe was expressed in a live cells, many fluorescent spots were observed. These spots showed a single-step photobleaching. Thus, each fluorescent spot was originated from a single molecule of EGFP in the probe and, therefore, single  $\beta$ -actin mRNAs were observed by TIRF microscopy. The fluorescent spots were overlaid on microtubules, and the spots showed linear movement along microtubules. The localization and dynamics of fluorescent spots are consistent with those of  $\beta$ -actin mRNA reported previously. From these results, it was concluded that the full-length probe enabled to visualize endogenous  $\beta$ -actin mRNAs and to evaluate its localization and dynamics in living cells.

In the third chapter, I described principles of the “split probe”, in which a technique of reconstitution of split EGFP fragments was used. Each of two HsPUM1-HD mutants was fused to split fragments of EGFP. A pair of the split probes does not emit fluorescence because the fragments are separated to each other. When two HsPUM1-HD mutants bind to  $\beta$ -actin mRNAs, the fragments are brought closely to come together and the EGFP is reconstituted in live cells.

I performed immuno-precipitation and RT-PCR for the cells transfected with the gene

of the probes.  $\beta$ -actin mRNA was detected only from the cells that expressed the probes. This suggested that the probe bound specifically to  $\beta$ -actin mRNA in the cells. Next, the localization of the reconstituted EGFP was compared with that of  $\beta$ -actin mRNA in fixed cells. Analysis using in situ hybridization technique was performed on the cells expressing the probes. Fluorescent oligonucleotide probe, which has a character of hybridization to  $\beta$ -actin mRNAs, visualized the localization of  $\beta$ -actin mRNAs, which was colocalized with the fluorescent signals of EGFP. From these results, I confirmed that the probes specifically recognized  $\beta$ -actin mRNAs and emitted fluorescence by split EGFP reconstitution. The cells expressing the probes were further investigated by TIRF microscopy. Fluorescent spots showing single-step photobleaching existed in the cells. This demonstrates that the fluorescent spots are single molecules of EGFP in the split probes. The localization and the dynamics of fluorescent spots on microtubules corresponded to those of  $\beta$ -actin mRNA. All these results together, I concluded that the split probes were useful to visualize  $\beta$ -actin mRNA without inhibiting its inherent localization and dynamics.

In the last chapter, I comprehensively summarized the results and conclusion in this thesis. In this study, I have successfully developed two novel probes for live imaging of mRNAs; the full-length probe and the split probe. It was confirmed that both probes enabled to visualize  $\beta$ -actin mRNAs in living cells. Furthermore, I showed the dynamics of  $\beta$ -actin mRNA in living cells at the single mRNA level. Each of these probes developed in this study has strong advantages, which was briefly summarized in this chapter. In conclusion, both of these probes enabled to label endogenous mRNAs with low invasiveness. The probes will become a powerful tool for the analysis of localization and dynamics of different single mRNAs in living cells.





## 目次

### 序章

1. ライブイメージングの背景 ..... 3
2. 既存の RNA イメージング法 ..... 5
3. 参考文献 ..... 9

### 第 1 章 全長型プローブ

#### 1. 序論

- 1-1. 蛍光タンパク質の特性 ..... 13
- 1-2. RNA 結合タンパク質 HsPUM1-HD の特性 ..... 16
- 1-3. 標的 mRNA:  $\beta$  アクチン mRNA ..... 19
- 1-4. 研究目的とプローブの原理 ..... 21

#### 2. 実験材料と手法

- 2-1. プラスミド作製 ..... 23
  - 2-1-1. プローブの設計
  - 2-1-2. 微小管標識マーカー
- 2-2. 細胞培養と遺伝子導入 ..... 28
- 2-3. ウェスタンブロット ..... 28
- 2-4. 免疫沈降・逆転写 PCR (IP / RT-PCR) ..... 28
- 2-5. *in-situ* ハイブリダイゼーション ..... 29
- 2-6. イメージング ..... 30
  - 2-6-1. 落射照明蛍光顕微鏡
  - 2-6-2. 全反射照明蛍光顕微鏡 (1)
  - 2-6-3. 全反射照明蛍光顕微鏡 (2)

#### 3. 結果と考察

- 3-1. 細胞内における全長型プローブの発現 ..... 34
- 3-2. 標的 mRNA に対する全長型プローブの結合 ..... 36
- 3-3. 細胞内における  $\beta$  アクチン mRNA の局在 ..... 39
- 3-4.  $\beta$  アクチン mRNA の一分子イメージング ..... 41

3-5. $\beta$ アクチン mRNA の動態観測 .....	43
4. 結論 .....	46
5. 参考文献 .....	47

## 第2章 再構成型プローブ

1. 序論	
1-1. 蛍光タンパク質の再構成 .....	53
1-2. 研究目的とプローブの原理 .....	55
2. 実験材料と手法	
2-1. プローブの設計とプラスミド作製 .....	57
2-2. 細胞培養と遺伝子導入 .....	61
2-3. ウェスタンブロット .....	61
2-4. 免疫沈降・逆転写 PCR (IP / RT-PCR) .....	61
2-5. <i>in-situ</i> ハイブリダイゼーション .....	62
2-6. イメージング .....	62
2-7. 飢餓条件と血清刺激 .....	63
2-8. 微小管標識マーカーの安定発現株 .....	63
3. 結果と考察	
3-1. 細胞内における再構成型プローブの発現 .....	64
3-2. 標的 mRNA に対する再構成型プローブの結合 .....	66
3-3. $\beta$ アクチン mRNA の一分子イメージング .....	69
3-4. $\beta$ アクチン mRNA の時・空間的局在変化 .....	71
3-5. 微小管上における $\beta$ アクチン mRNA の動態 .....	73
4. 結論 .....	75
5. 参考文献 .....	76

### 第3章 結論

1. 新規プローブによる標的 mRNA の検出 ..... 81
2. 新規プローブの利点 ..... 82
3. 全長型プローブと再構成型プローブの比較 ..... 84
4. 新規プローブの将来性 ..... 85
5. 参考文献 ..... 87



## 序章



## 1. ライブイメージングの背景

生物の体の仕組み、器官や組織の機能、さらには細胞内における生体分子の働きを明らかにするには、多くの手法が存在する。中でも、生きたサンプルから連続した画像として情報を取り出すライブイメージングは、直接的に生体内の時・空間的变化を知ることのできる優れた手法である。Fura-2 による細胞内カルシウムイオンのイメージングは最も古く、今なお利用されている (Grynkiewicz et al., 1985)。Fura-2 は、ポリアミノカルボン酸からなる蛍光色素である。カルシウムイオンと結合していない時は、380 nm の励起光で 510 nm の蛍光を示す。カルシウムに結合すると Fura-2 の励起波長はシフトして、340 nm の励起光で 510 nm の蛍光を発する。二波長の励起による蛍光強度の比から、存在するカルシウムイオン濃度を画像として取得する。この画期的な研究の発表から今日に至るまで、様々なライブイメージング法が開発されてきた。Fura-2 のような細胞内の金属イオンの可視化から、医療で使用されるコンピュータ断層撮影法 (computerized tomography; CT) や磁気共鳴画像法 (magnetic resonance imaging; MRI) による臓器や骨格などの可視化まで、その検出対象は多岐にわたる。

生命現象を研究する上で、サンプルから空間的情報を得るために広く使われてきた手法は、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。この方法では同一のサンプルを連続して測定することができないため、例えば、ある刺激を加えてからの時間的变化を観察しようとする、時間軸分のサンプルを準備し、それぞれの時点でサンプルを固定していく必要がある。この場合、サンプル間に誤差が生じる可能性がある。また、細胞内の微細な変化や素早い応答を観察する場合に、時間軸ごとにサンプルを作成し、別サンプル間での変化を比較するには限界がある。ライブイメージングは、一つのサンプルで時間を追った観察ができるため、このような問題点を解決できる。

ライブイメージングでは、サンプルに与えるダメージを最小限に抑えることが重要である。特に、細胞内の生体分子をイメージングする際には、細胞へのわずかな影響がアーチ

ファクトとして検出される危険性がある。そのため、蛍光を用いた検出法が多く存在する。蛍光を用いたイメージングは、励起光を蛍光分子に照射し、分子内の電子が励起状態から基底状態に戻る際に放出される光を検出する方法である。蛍光を発するには、励起光以外の補因子を必要としないため、低侵襲的にサンプルを可視化できる利点を有している。

蛍光として放出されるエネルギーは、吸収したエネルギーよりも小さくなるため、蛍光の波長は励起光の波長よりも超波長側にシフトする。このことを利用して、蛍光顕微鏡は設計されている。顕微鏡技術の発展は、イメージング技術の向上に大きく寄与してきた。一般的に蛍光顕微鏡と言った場合に指すのは落射照明蛍光顕微鏡である。落射照明蛍光顕微鏡は、サンプル全体に励起光を照射し、蛍光を検出する。一方、共焦点蛍光顕微鏡は、ピンホールを使って焦点面のみからの蛍光をスキャンする。焦点面の深度を変化させることで、サンプルの三次元像を構築できる。また、全反射照明蛍光顕微鏡は、入射角をつけた励起光が全反射する際に発生するエバネッセント場によってサンプルを励起する(Axelrod, 1981)。通常の顕微鏡観察で取り扱う 400~700nm の励起光の場合で、エバネッセント場の厚みは 50~150 nm 程度であるため、サンプルを観察する際の背景のノイズを抑え、一分子レベルでの蛍光分子の観察を可能にする。近年では、2光子励起によって、脳などの厚みを持ったサンプルの内部のイメージングも可能である(Denk et al., 1990, Wang et al., 2010)。

イメージング技術の発展には、顕微鏡技術の進歩の他に、シグナルを検出するための検出機器、画像解析のためのコンピュータ技術などの開発も貢献してきた。特定の対象を観察するためのプローブの開発も欠かせない。今日、様々な生体内分子や生命現象を可視化するプローブが存在する。しかし、未だ可視化できていない生命現象も多く存在する。また、改良の余地があるプローブもある。今後、標的分子に適した低侵襲的プローブの開発が期待される。



## 2. 既存の RNA イメージング法

生体分子の一つである伝令リボ核酸 (messenger ribonucleic acid; mRNA) は、DNA からタンパク質が作られるセントラルドグマにおいて、設計図としての重要な役割を持つ。生物は、適時適所で遺伝子を発現させ、タンパク質を修飾し、さらに分解することで、環境変化への適応や自身の成長の調節を行う。そのような制御は、DNA やタンパク質の段階のみでなく、mRNA の段階でも行われる。mRNA は遺伝子を元に作られるが、前駆体 RNA はスプライシングを起こし、いくつかの成熟 mRNA が 1 つの遺伝子から作られる。このように、同じ前駆体 RNA からできる成熟 mRNA をスプライシングバリエントという。スプライシングバリエントは、いつ、どこでタンパク質に翻訳されるかの多様性を限られた遺伝子情報から生み出す。また、mRNA には、タンパク質に翻訳される翻訳領域 (coding sequence, CDS) と翻訳されない非翻訳領域 (untranslated region, UTR) があり、UTR の配列や構造によって翻訳制御や局在、安定性の制御が行われる (Wilkie et al., 2003, Conne et al., 2000, Grzybowska et al., 2001)。このように、mRNA は、生物が生きていく上で重要な役割を担っている。mRNA の発現レベルやその局在を知ることで、多くの生物学的知見を得ることができる。

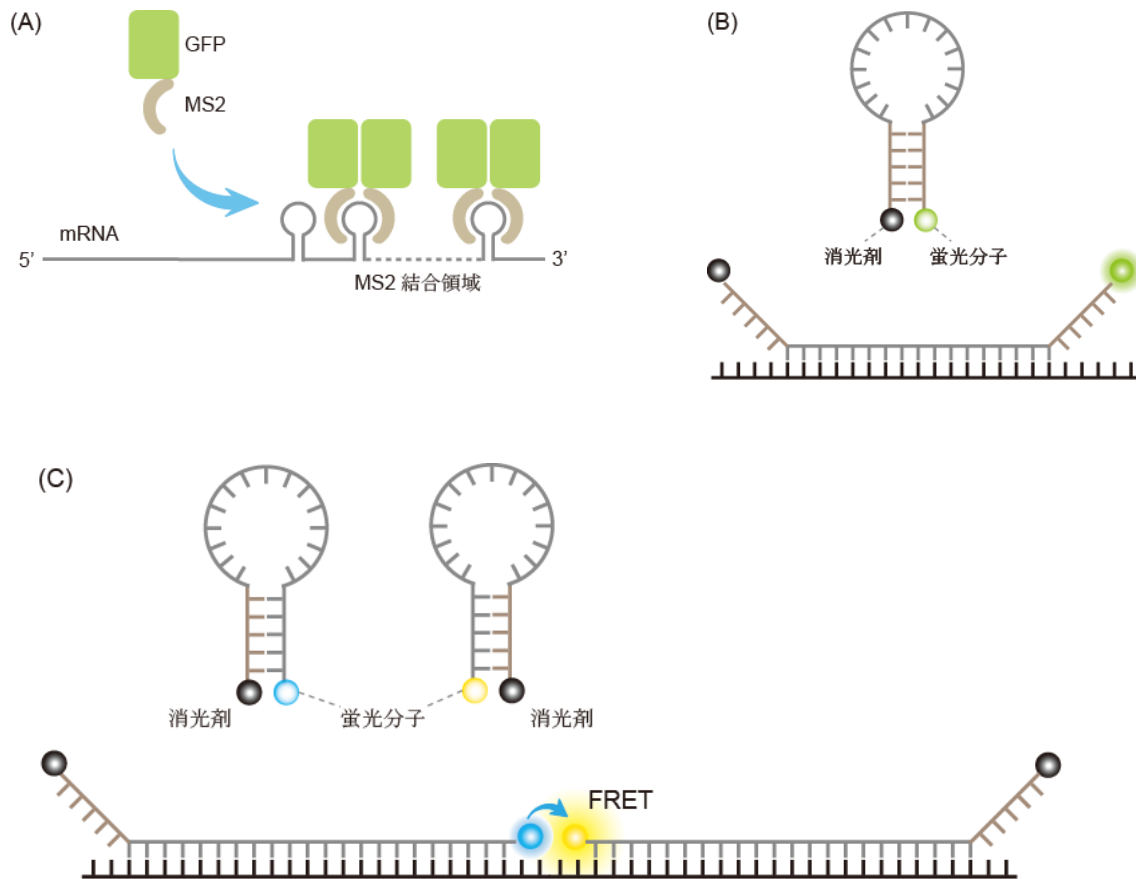
従来の mRNA の研究では、逆転写 PCR (RT-PCR) やノーザンブロット、*in situ* ハイブリダイゼーションなどの手法を用いるため、細胞や組織を破碎もしくは固定する必要があった。しかしこのような手法では、mRNA 本来の生理的機能を見ているとは言えない。mRNA を抽出してから測定するまでの時間や、固定してから観察するまでの時間的ずれが生じる。また、破碎や固定を行うと、1 つのサンプルでの時間的経過を追うことができない。さらに、mRNA は非常に不安定であるため、上記の操作過程で分解される可能性がある。これらの理由から、mRNA のライブイメージング法の開発が非常に注目されてきている。

mRNA をライブイメージングする方法の一つに、MS2 というタンパク質を利用した方法がある (Bertrand et al., 1998) [Fig.1(A)]。この手法では、RNA フェージのカプシドタンパ

ク質である MS2 に GFP を融合させたプラスミドを作製する。もう一つ、興味対象の mRNA 配列の CDS と 3' UTR の間に、19 塩基からなるステムループ構造をとる MS2 結合領域をいくつか組み込んだプラスミドを作製する。これら 2 つのプラスミドを細胞へ遺伝子導入すると、興味対象の mRNA 内に挿入された MS2 結合領域に MS2-GFP (約 41.5 kDa) が二量体を形成して結合し、mRNA が可視化される。24 個の MS2 結合領域を興味対象の mRNA 内に設計すると、平均 33 分子のプロープが結合し、一分子の mRNA を可視化することができる(Fusco et al., 2003)。この手法は、遺伝子にコードされるプロープを用いる為、リポフェクションによって低侵襲的に細胞内へプロープを導入することが可能である。しかし、設計した mRNA が、実際に細胞内で発現している mRNA と同じ動態を示すとは言い切れない。また、検出対象の mRNA に多数のプロープが結合することによる動態異常などのアーチファクトも懸念される。

細胞内在性の mRNA を可視化する手法として、モレキュラービーコンを細胞に導入する方法がある (Tyagi and Kramer, 1996) [Fig.1(B)]。モレキュラービーコンはステムループ構造をとる一本鎖オリゴヌクレオチドプロープで、末端にそれぞれ蛍光分子と消光剤を有する。ループ部分は通常 15~25 塩基で、標的となる mRNA と相補的な配列に設計される。ステム部分は標的 mRNA に関係なく 4~6 の相補的塩基対からなる。通常は蛍光分子と消光剤との距離が近い為蛍光は失われているが、標的 mRNA に対合すると、蛍光分子と消光剤との距離が開いて蛍光を示す。この手法を用いることで、細胞内在性の mRNA を可視化することが可能となる。しかし、モレキュラービーコンは自発的にステム部分が解離することがあり、標的 mRNA に結合せずに蛍光を示すプロープと標的 mRNA に結合して蛍光を示すプロープの区別がつかない。このため、dual FRET モレキュラービーコンが開発された(Tsourkas et al., Anal Chem, 2003) [Fig.1(C)]。dual FRET モレキュラービーコンは、直列に設計された 2 本のモレキュラービーコンの蛍光分子間に起こる蛍光共鳴エネルギー移動(fluorescence resonance energy transfer; FRET)を検出する方法である。dual

FRET モレキュラービーコンでは、例えステム構造が自発的に解離したとしても、FRET が起こらないため、標的 mRNA に結合したモレキュラービーコンからのシグナルを検出できる。しかしながら、モレキュラービーコンを用いる手法はプローブの導入に顕微注入法（マイクロインジェクション）を用いるため、細胞へのダメージが懸念される。また、細胞一つ一つにプローブを導入する必要があるため、多量の解析を行いたい場合にはプローブの導入に手間がかかる。モレキュラービーコンのもう一つの欠点は、細胞質内に導入されたモレキュラービーコンが核内に隔離される点である。このため、核膜孔を自由拡散で通過できないサイズのタンパク質（ストレプトアビジン, 75 kDa, 四量体を形成する）などを、モレキュラービーコンに付加する必要がある (Tyagi and Alsmadi, 2004)。大きなサイズの分子のプローブへの連結は、mRNA 本来の動きを妨げる可能性がある。



**Figure 1. 既存の mRNA ライブイメージング法**

(A) MS2-GFP 法. RNA カプシドタンパク質 MS2 と GFP を融合させたタンパク質の遺伝子と、興味対象の mRNA 配列に MS2 結合領域を組み込んだレポーターRNA の遺伝子を、細胞内で発現させることによって、mRNA を蛍光標識する.

(B) モレキュラービーコン法. 興味対象の mRNA と相補的な配列を含むオリゴヌクレオチドプローブを細胞内に導入する. プローブの両端にはそれぞれ蛍光分子と消光剤が付加されていて、通常は蛍光を示さない. プローブが標的 mRNA に結合すると、ヌクレオチド鎖の末端に連結した蛍光分子と消光剤との距離が開き、蛍光が回復する.

(C) Dual FRET モレキュラービーコン法. 直列に設計された 2 本のモレキュラービーコンの蛍光分子による FRET を検出する.

### 3. 参考文献

Axelrod D. J Cell Biol. 1981 Apr;89(1):141-5. Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence.

Bertrand E, Chartrand P, Schaefer M, Shenoy SM, Singer RH, Long RM. Mol Cell. 1998 Oct;2(4):437-45. Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast.

Conne B, Stutz A, Vassalli JD. Nat Med. 2000 Jun;6(6):637-41. Review. The 3' untranslated region of messenger RNA: A molecular 'hotspot' for pathology?

Denk W, Strickler JH, Webb WW. Science. 1990 Apr 6;248(4951):73-6. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy.

Fusco D, Accornero N, Lavoie B, Shenoy SM, Blanchard JM, Singer RH, Bertrand E. Curr Biol. 2003 Jan 21;13(2):161-7. Single mRNA molecules demonstrate probabilistic movement in living mammalian cells.

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. J Biol Chem. 1985 Mar 25;260(6):3440-50. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties.

Grzybowska EA, Wilczynska A, Siedlecki JA. Biochem Biophys Res Commun. 2001 Oct 26;288(2):291-5. Review. Regulatory functions of 3'UTRs.

Tsourkas A, Behlke MA, Xu Y, Bao G. Anal Chem. 2003 Aug 1;75(15):3697-703. Spectroscopic features of dual fluorescence/luminescence resonance energy-transfer molecular beacons.

Tyagi S, Kramer FR. Nat Biotechnol. 1996 Mar;14(3):303-8. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization.

Wang BG, König K, Halbhauer KJ. J Microsc. 2010 Apr 1;238(1):1-20. Review. Two-photon microscopy of deep intravital tissues and its merits in clinical research.

Wilkie GS, Dickson KS, Gray NK. Trends Biochem Sci. 2003 Apr;28(4):182-8. Review. Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors.



## 第 1 章 全長型プローブ

**Fluorescent Probe for Imaging Endogenous  $\beta$ -Actin mRNA in Living Cells Using Fluorescent Protein-Tagged Pumilio.**

Yoshimura H, Inaguma A, Yamada T, Ozawa T.

ACS Chemical Biology. 2012, March 2 (Published on line)





## 1. 序論

### 1-1. 蛍光タンパク質の特性

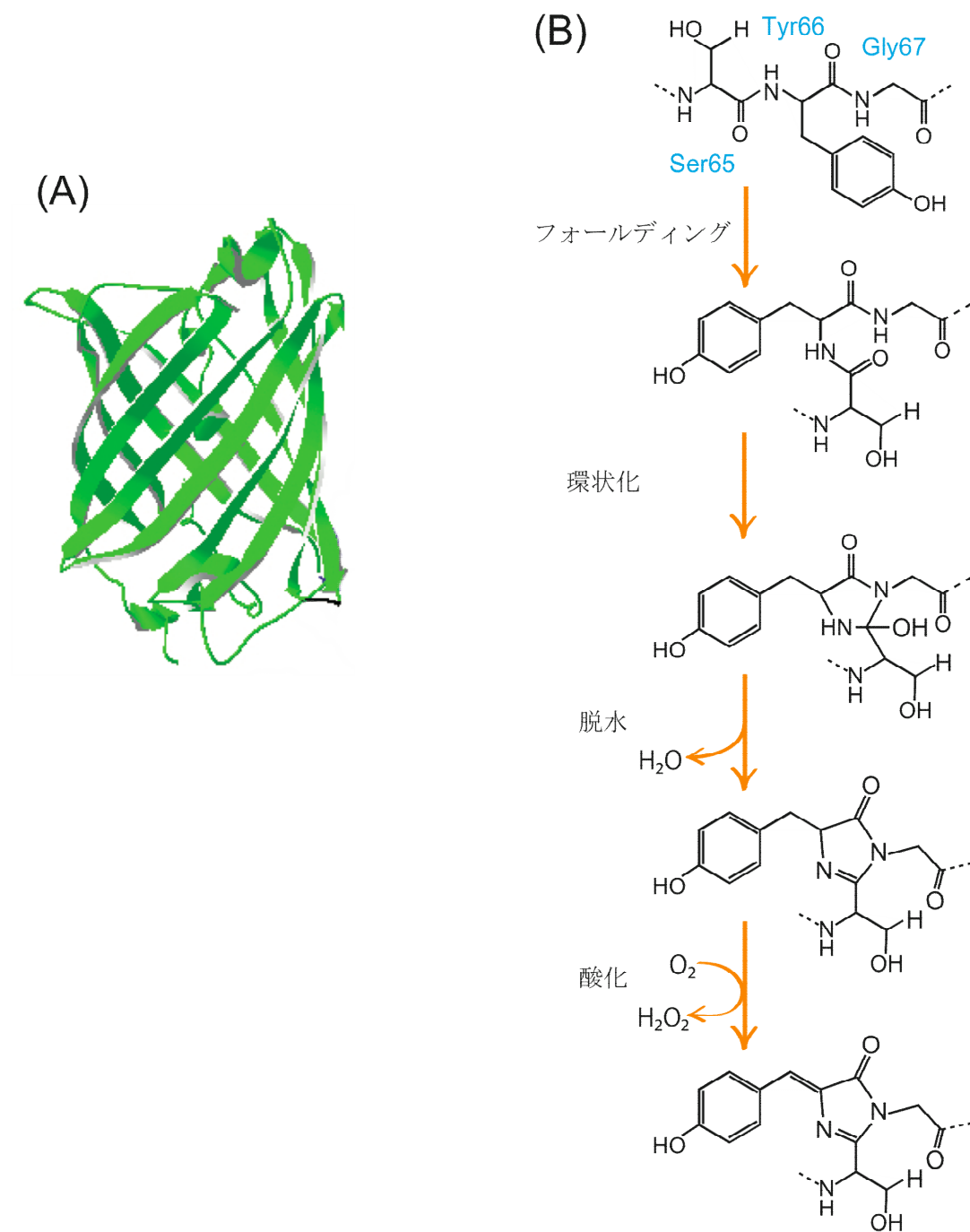
緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein; GFP) は, 1962 年にオワンクラゲ (*Aequorea victoria*) から発見された約 27 kDa のタンパク質である (Shimomura et al., 1962). GFP は, 11 個の  $\beta$  シートによる樽状の構造と, その中を貫く 1 本の  $\alpha$  ヘリックスで構成される (Ormo et al., 1996, Yang et al., 1996) [FIG : 2(A)]. この構造を  $\beta$  カン構造という. 65 番目から 67 番目のアミノ酸 (Ser-Tyr-Gly) から成る発色団 (chromophore) は  $\alpha$  ヘリックスに附属して, 樽状構造の中心に位置する. 発色団の形成には, まずタンパク質が自然に折り畳まれる. 次に Ser のカルボニル基と Gly のアミド基が反応して環化が起こる. その後, 脱水によってイミダゾリンができる. 最後に分子状酸素によって酸化され, Tyr の  $\alpha$ - $\beta$  結合の脱水化で, 六員環と五員環を繋げるように共役二重結合が広がり,  $\pi$  電子が大きく非局在化された発色団 p-hydroxybenzylideneimidazoline になる (Heim et al., 1994, Cubitt et al., 1995, Reid and Flynn, 1997) [FIG : 2(B)].

オワンクラゲの生体内では,  $\text{Ca}^{2+}$  を感知して発光するタンパク質, イクオリン (aequorin) の光エネルギーが GFP へと伝達され, 明るい緑色光を発する. GFP は, 光を発するのに励起光以外の補因子を必要としないため, 生体内分子の標識に適したツールであると言える. 1990 年代に入り GFP の遺伝子が同定され, クローニングされたことを皮切りに, GFP を利用した研究はこれまでにリアルタイムで見ることでできなかった事象を可視化し, 生命科学, 特に分子生物学の分野での研究を飛躍的に前進させた (Prasher, 1992).

野生型 GFP の最大励起波長は 395 nm (第二励起波長は 475 nm), 最大蛍光波長は 509 nm だが, 可視光域の 488 nm に最大励起波長を持つ改良型 GFP (Enhanced GFP; EGFP) が開発され, 広く用いられるようになった (Cormack et al., 1996, 論文内では GFPmut 1 と呼ばれた). また現在では, さらなる改変体やサング由来の蛍光タンパク質も開発され, 緑色以外にも赤や青, 黄色などの蛍光タンパク質が存在する (Matz et al., 1999. Shaner et al.,

2005). これにより、複数種の蛍光タンパク質を組み合わせで解析する、マルチカラーイメージングが可能になった.

ライブイメージングのツールとして、蛍光タンパク質は多くの利点を持つ. 一つは、先に述べたように、励起光のみでシグナルが得られるため低侵襲的検出が可能な点である. サンプルへ与えるダメージが少なく、生きた細胞内の正しい情報を得ることに繋がる. また、遺伝子操作によって操作が可能な点も、蛍光タンパク質の持つ優れた特色の一つである. 興味のあるタンパク質に蛍光タンパク質を融合させるのも、標識化したタンパク質を細胞もしくは生体内へ導入するのも、遺伝子工学という確立された簡単な操作で行える. さらに、蛍光タンパク質でラベルした目的タンパク質の遺伝子を生殖細胞に組み込むことによって、トランスジェニック体を作成することも可能である.



**Figure 2. GFP の構造と発色団の形成**

(A) GFP の構造. 11 個の樽状構造をした  $\beta$  シートと、それを貫く  $\alpha$  ヘリックス.

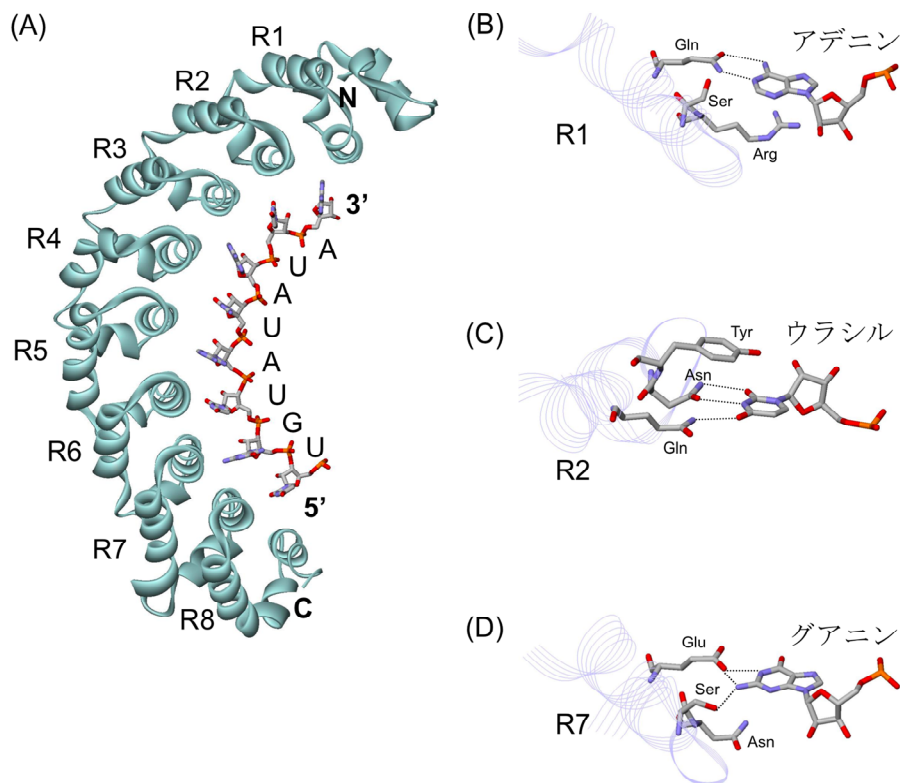
(B) GFP の発色団の形成過程.

## 1-2. RNA 結合タンパク質 HsPUM1-HD の特性

上述したように、蛍光タンパク質を融合することで興味のあるタンパク質の時・空間的局在や機能が明らかにされてきた。mRNA を蛍光タンパク質で標識するには、RNA 結合タンパク質による仲介が必要となる。HsPUM1-HD (*Homo sapiens* Pumilio1 Homology Domain) は、多くの種で保存されている Puf ファミリータンパク質の一つであるヒト Pumilio1 タンパク質内の、RNA に結合する領域 (828-1176 アミノ酸, AAH13398) である。ヒト Pumilio1 の働きは未だ不明な点が多いが、標的 mRNA に結合し、翻訳抑制に関係しているとの報告がある (Morris et al., 2008)。RNA 結合領域が HsPUM1-HD と高い相同性を持つショウジョウバエ Pumilio (*Drosophila melanogaster* Pumilio; DmPUM) は、胚発生の段階で母性 hunchback mRNA や bicoid mRNA 内の nanos 応答エレメント (nanos response element; NRE) に結合し、翻訳阻害によって体節の形成を制御する (Murata and Wharton, 1995, Gamberi et al., 2002)。また、DmPUM の RNA 結合領域 (DmPUM-HD) と HsPUM1-HD を用いた研究で、標的 mRNA 内の UGU という配列が結合のために重要であることが明らかにされた (Zamore et al., 1997)。

X 線結晶構造解析によって HsPUM1HD の詳細な構造が明らかになった (Wang et al., 2001)。HsPUM1-HD は連続した 8 回のリピート構造 (R1 から R8) を持ち、外径約 85Å の半円状の構造をとる [Fig.3(A)]。1つのリピート構造は3つの  $\alpha$  ヘリックスから構成され、2番目の  $\alpha$  ヘリックス内の 3, 4, 7 番目の 3 アミノ酸によって RNA 一塩基を認識する (Wang et al., 2002)。アデニン (A) の認識には、2 番目の  $\alpha$  ヘリックス内の 3 番目のアミノ酸がセリン (Ser) もしくはシステイン (Cys)、7 番目のアミノ酸がグルタミン (Gln) であることが重要である [Fig.3(B)]。ウラシル (U) の認識には、2 番目の  $\alpha$  ヘリックス内の 3 番目のアミノ酸がアスパラギン (Asn)、7 番目のアミノ酸がグルタミン (Gln) であることが重要である [Fig.3(C)]。グアニン (G) の認識には、2 番目の  $\alpha$  ヘリックス内の 3 番目のアミノ酸がセリン (Ser) もしくは、7 番目のアミノ酸がグルタミン酸 (Glu) であることが重要で

ある **[Fig.3(D)]**. これらの原則に従って, HsPUM1-HD のアミノ酸に変異を加えることで, 任意の RNA 配列に結合する変異型 HsPUM1-HD を作製することが可能である (Cheong and Tanaka-Hall, 2006).



**Figure 3. *Homo sapiens* Pumilio1 Homology Domain (HsPUM1-HD) の構造とその RNA 塩基の認識**

(A) HsPUM1-HD の結晶構造と、結合する mRNA の模式図。HsPUM1-HD 内の、R8 から R1 のリピート構造がそれぞれ 1 つの RNA 塩基と結合する。

(B-D) RNA の認識に関わるアミノ酸の側鎖と RNA の模式図。赤は酸素、青は水素、破線は水素結合である。

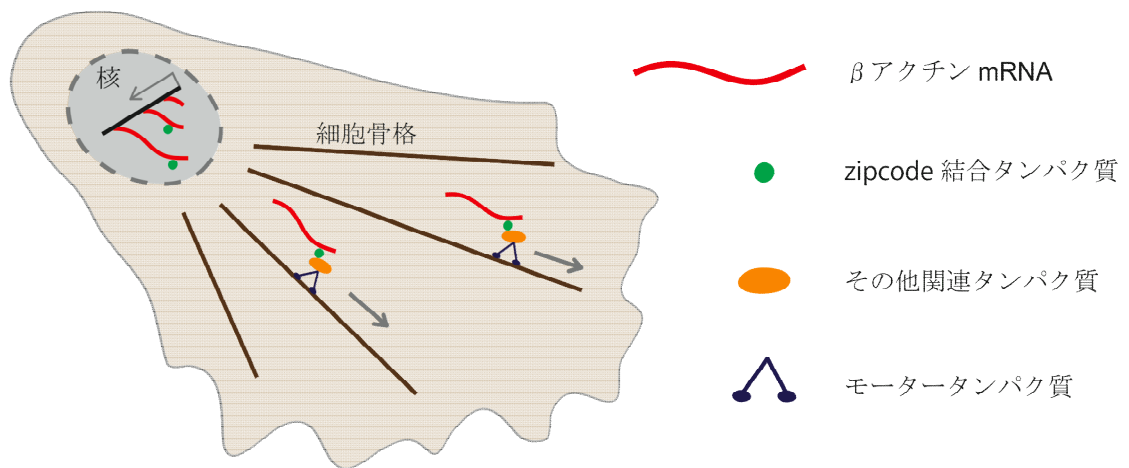
(B) R1 によるアデニンの認識。アデニンの認識には、セリン (Ser) もしくはシステイン (Cys) とグルタミン (Gln) が重要である。

(C) R2 によるウラシルの認識。ウラシルの認識には、アスパラギン (Asn) とグルタミン (Gln) が重要である。

(D) R7 によるグアニンの認識。グアニンの認識には、セリン (Ser) とグルタミン酸 (Glu) が重要である。

### 1-3. 標的 mRNA: $\beta$ アクチン mRNA

新規の mRNA 標識プローブを評価するにあたって、観察対象となる mRNA には知見の豊富な  $\beta$  アクチン mRNA を選択した。  $\beta$  アクチン mRNA は、細胞骨格のアクチンフィラメントを構成するタンパク質の mRNA で、恒常的に発現するハウスキーピング遺伝子として知られている。一般的に、mRNA は核内で転写され、タンパク質へ翻訳される場となる細胞質内へと移動する。多くの mRNA はタンパク質に翻訳された後に細胞内の特定箇所へと運ばれるが、一部の mRNA は翻訳される前に細胞内の特定領域に局在し、タンパク質の局所的発現に関わることが知られている (Martin and Ephrussi, 2009, St Johnston, 2005)。本研究で標的 mRNA とした  $\beta$  アクチン mRNA も細胞内の特定領域に局在を示す mRNA の一種で、繊維芽細胞や神経細胞で核周辺と伸長末端に局在する (Farina et al., 2003, Tiruchinapalli et al., 2003, Yamagishi et al., 2009, Ben-Ari et al., 2010)。この局在には、  $\beta$  アクチン mRNA の 3' UTR 内にある zipcode と呼ばれる 54 塩基の配列が関わっている (Kislauskis et al., 1994)。この zipcode に、zipcode 結合タンパク質とモータータンパク質が結合することによって、  $\beta$  アクチン mRNA は細胞骨格上を運ばれて細胞末端に局在する (Ross et al., 1997, Oleynikov et al., 2003) **[Fig.4]**。  $\beta$  アクチン mRNA は、ニワトリ胚繊維芽細胞 (chicken embryo fibroblast, CEF) ではマイクロフィラメント上を輸送される (Sundell & Singer, 1991)。一方、アフリカミドリザル繊維芽細胞 (COS-7) やマウス神経細胞では微小管上を運ばれることが知られている (Fusco et al., 2003, Bassell et al., 1994)。



**Figure 4.  $\beta$  アクチン mRNA の知見**

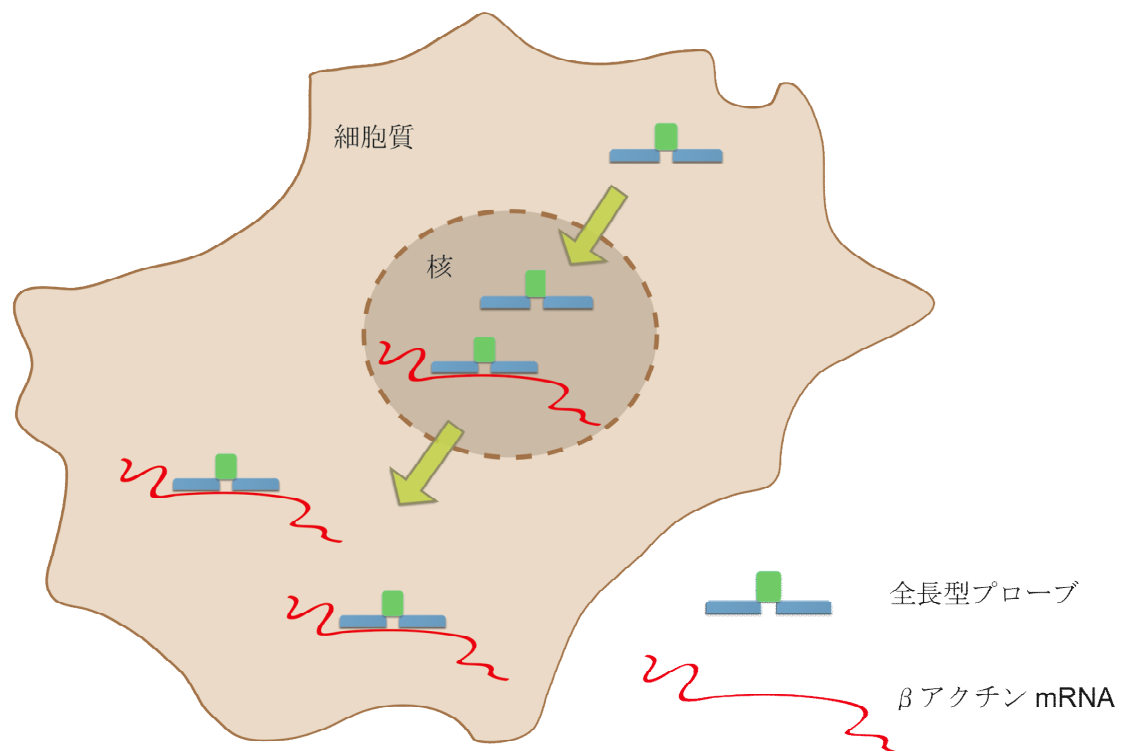
$\beta$  アクチン mRNA の局在機構.  $\beta$  アクチン mRNA の 3'UTR に存在する zipcode に, zipcode 結合タンパク質とモータータンパク質が結合する.  $\beta$  アクチン mRNA は, モータータンパク質によって細胞骨格上を運ばれ, 細胞の末端に局在する.



#### 1-4. 研究目的とプローブの原理

本研究では、新規の mRNA イメージング法を開発することを目的とした。具体的には、遺伝子にコードされるプローブであること、内在性の mRNA を可視化すること、一分子レベルでの検出を可能にすること、mRNA の細胞内動態を妨げないこと、の四点に留意した mRNA ライブイメージング用プローブの開発を目指した。

全長型プローブは、配列特異性を持つ RNA 結合タンパク質 HsPUM1-HD と EGFP、そして核移行シグナル (nuclear localization signal, NLS) から構成される。このプローブは 2 つの HsPUM1-HD を有する。2 つの HsPUM1-HD には、標的 mRNA 内でそれぞれの HsPUM1-HD が結合する配列に合わせて、変異を導入する。一つの HsPUM1-HD が 8 塩基の RNA に結合し、全長型プローブ全体で計 16 塩基を認識する。プローブの結合する配列が偶発的に存在する確率は  $4^{16}$  (約  $4.3 \times 10^9$ ) 分の一である。このプローブはタンパク質で構成されるため、プローブの遺伝子をリポフェクションによって細胞に導入し、細胞内でプローブを産生させることができる。全長型プローブは細胞質内で標的 mRNA に結合し、標的 mRNA を可視化する。また、全長型プローブには核移行シグナルペプチド配列が存在するので、標的 mRNA に結合していないフリーのプローブは核内に局在する。これにより、細胞質内のバックグラウンドを抑えた中で標的 mRNA の観察ができる [Fig.5].



**Figure 5. 全長型プローブの動作原理**

細胞内に発現した全長型プローブは、標的 mRNA に結合し、標的 mRNA を可視化する。

全長型プローブには核移行シグナルペプチド配列が存在するので、標的 mRNA に結合していないフリーのプローブは核内に局在する。

## 2. 実験材料と手法

### 2-1. プラスミド作製

#### 2-1-1. プローブの設計

アフリカミドリザルの腎由来の COS-7 細胞株の内在性  $\beta$  アクチン mRNA を可視化するため、標的 mRNA に特異的に結合するプローブタンパク質の設計を行った。標的 mRNA に結合する変異型 HsPUM1-HD を作製するにあたり、 $\beta$  アクチン mRNA の翻訳領域 (1128 nt) から、8 塩基配列を 2 つ選択した。選択した配列は、HsPUM1-HD の結合に重要である UGU 配列を持ち、野生型 HsPUM1-HD の認識配列 U G U A Y A U A (Y は U または C) に類似した配列である。 $\beta$  アクチン mRNA の上流側から、それぞれの候補箇所を A1 (405-412, UGUAUGUG), A2 (424-431, UGUGCUGU) とした [Fig.6]。A1, A2 に特異的に結合するように、HsPUM1-HD の遺伝子配列に double-PCR 法で変異を加えた変異体を作製し、A1 を認識するものを PumA1 (Q867E, C935S, Q939E), A2 を認識するものを PumA2 (S863N, N899S, Q903E, C935N, C1007S, Q1011E) と命名した。[Fig.7] 各変異型 HsPUM1-HD の遺伝子に目的の変異が導入されたことは、シーケンサー (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, ABI) を用いて確認した。

*pumA2* と *pumA1* の間に全長 *egfp* を組み込み、開始コドン直下に核移行シグナル (*nls*) を組み込んだ、全長型プローブの遺伝子を作製した (*nls-pumA2-egfp-pumA1*)。cDNA のクローニングには大腸菌クローニングベクター (pBluescript, Stratagene) を用い、最後に動物細胞発現用ベクター (pcDNA<sup>TM</sup>3.1(+), Invitrogen) へ組み込んだ [Fig.8]。

#### 2-1-2. 微小管標識マーカー

実験で使用する COS-7 細胞では、 $\beta$  アクチン mRNA は微小管上を輸送されることが知られている (Fusco et al., 2003)。従って、 $\beta$  アクチン mRNA が微小管上を輸送される動態

を可視化することで、本研究で作製したプローブが正常に機能しているか評価することができる。この評価を行う為に、微小管を標識するマーカートンパク質の遺伝子を以下のよう  
に作製した。

ヒト $\alpha$ チューブリンの上流に単量体赤色蛍光タンパク質 (monomeric red fluorescent protein, mRFP) を組み込んだ。大腸菌クローニングベクター (pBluescript, Stratagene) でクローニングを行った後、動物細胞発現用ベクター (pcDNA<sup>TM</sup>4/V5-His(B), Invitrogen) へ組み込んだ。ベクターの CMV プロモーターは、発現量の低い TK プロモーターに組み替えた [Fig.8].

**Cercopithecus aethiops mRNA for beta-actin, complete cds**  
GenBank: AB004047.1

```

1  aactcaogtt atggatgatg atatgcgcgc gctcgttgtc gacaacgget cgggcatgtg
61  caaggccggc ttgcggggcg acgatgcccc tggggcgcgc ttccctcca tcgtggggcg
121 ccccaggcac cagggcgtga tggtagggcat gggtcagaag gattcatatg tgggcgatga
181 ggcccagagc aagagaggca tcctcaccct gaagtacccc atcgagcacg gcatcgtcac
241 caactgggac gacatggaga agatctggca ccacaccttc tacaatgagc tgcgtgtggc
301 tcctgaggag caccgcgtgc tgctgaccga ggccccctg aacccaagg ccaaccgcga
361 gaagatgacc cagatcatgt ttgagacctt caacacccca gccatgtatg tggccatcca
                                A1

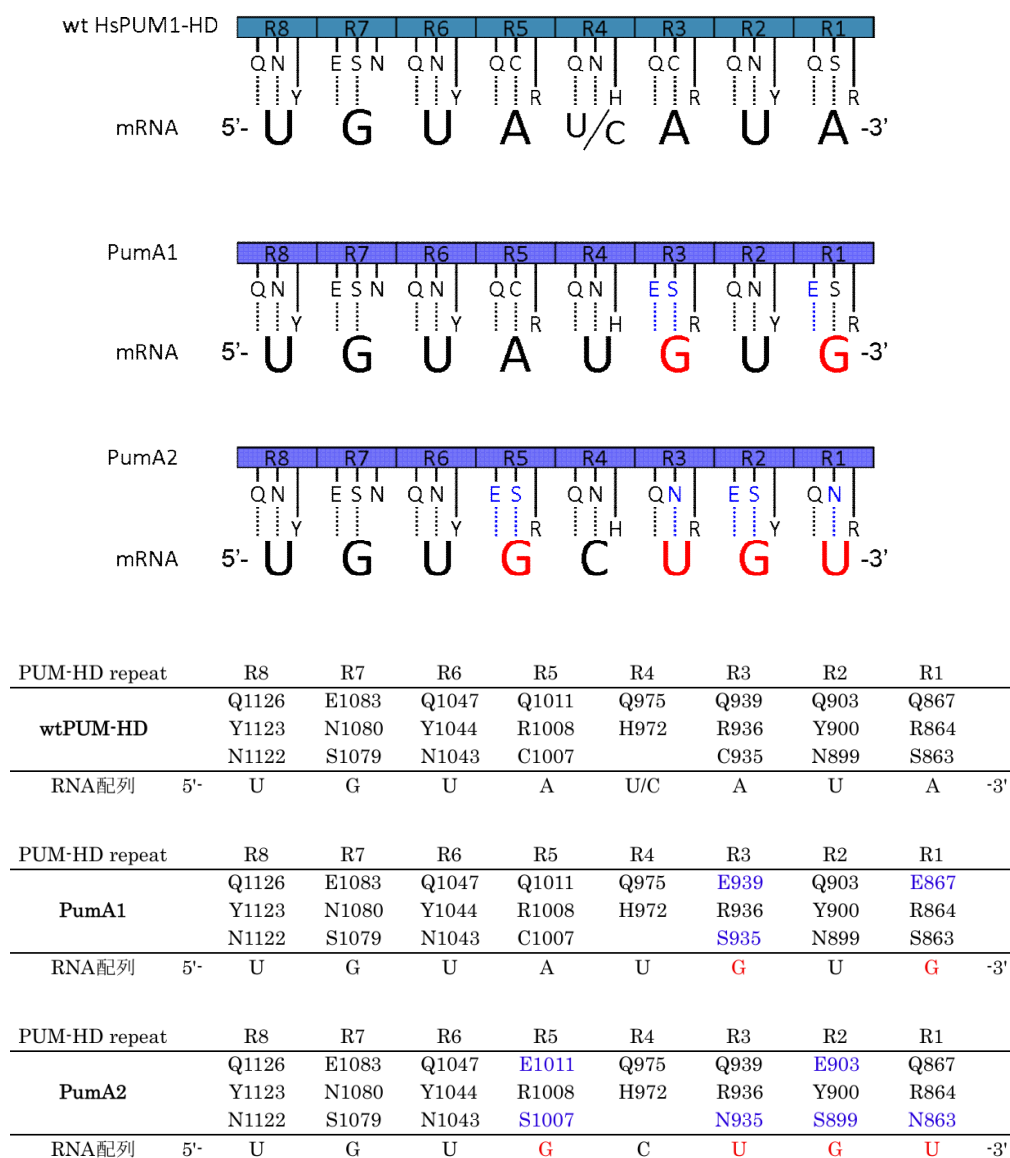
421 ggctgtgtg tcccctgtacg cctctggccg taccactggc atcgtgatgg actccgggtga
                                A2

481 cggggtcacc cacactgtgc ccatctacga ggggtatgcc ctcccccatt ccctcctgcg
541 tctggacctg gctggcgggg acctgactga ctacctcatg aagatcctca ctgagcgcg
601 ctacagcttc accaccacgg ccgagcggga aatcgtgcgt gacattaagg agaagctgtg
661 ctatgtcgcc ctggacttcg agcaggagat ggccaaggcg gcttctagct cctccctgga
721 gaagagctac gagctgcccg atggccaggt catcaccatt ggcaatgagc ggttccgctg
781 ccctgagggt ctcttccaac cttccttctt ggcatgggag tcctgtggca tccatgaaac
841 taccttcaac tccatcatga agtgtgacgt ggacatccgt aaagacctgt acgccaacac
901 agtgcgtgtc ggtggcacca ccatgtaccc tggcattgct gacaggatgc agaaggagat
961 tactgccctg gcgcccagca cgatgaaaat caagatcatt gctcctcctg agcgcaagta
1021 ctctgtgtgg atcggcgggt ccatcctggc ctcgctgtcc acctccagc agatgtggat
1081 cagcaagcag gagtatgacg agtctggccc ctccatcgtc cacogcaaat gcttctag

```

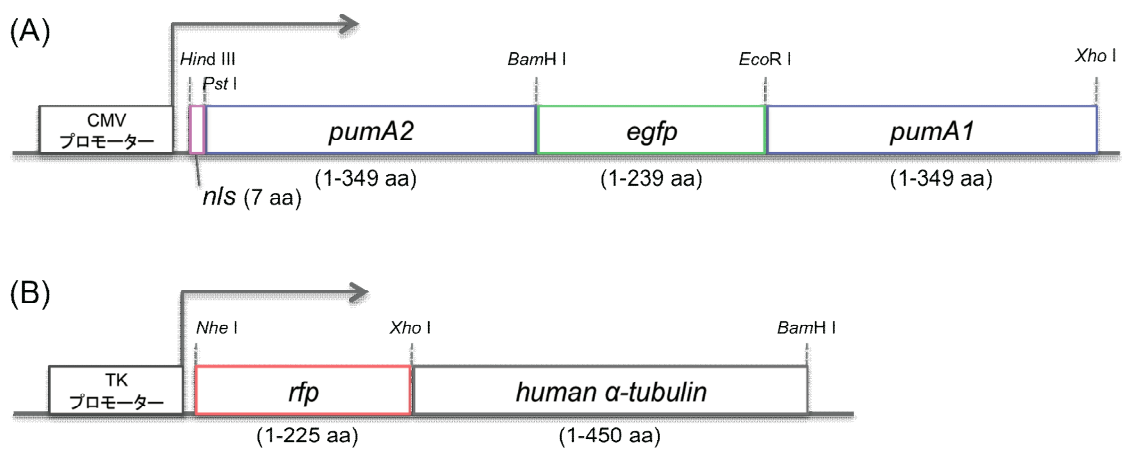
**Figure 6. アフリカミドリザル  $\beta$  アクチン mRNA 内のプローブの結合領域**

COS-7 細胞の由来主であるアフリカミドリザルの  $\beta$  アクチン mRNA の cDNA 配列. プローブ内の変異型 HsPUM1-HD が結合する領域を赤で記した.



**Figure 7. 全長型プローブ内の変異型 HsPUM1-HD の詳細**

全長型プローブ内の変異型 HsPUM1-HD の RNA の認識に関わるアミノ酸の模式図（上）と表（下）. COS-7 細胞の  $\beta$  アクチン mRNA に特異的に結合するよう，HsPUM1-HD に加えたアミノ酸置換を青で示す．野生型 HsPUM1-HD が結合する RNA 配列と，設計した変異型 HsPUM1-HD が結合する RNA 配列で異なる塩基を赤で示した．



**Figure 8.** 全長型プローブと微小管標識マーカの遺伝子構造

(A) 全長型プローブの遺伝子構造.

(B) 微小管標識マーカの遺伝子構造.

## 2-2. 細胞培養と遺伝子導入

COS-7 細胞は、10%のウシ胎児血清 (FBS, Gibco) と 1%のペニシリンストレプトマイシン (Gibco) を含んだダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM, Sigma) で、二酸化炭素濃度 5%, 37 °Cのインキュベータ内で培養した. プラスミドは Lipofectamine™ 2000 Reagent (Invitrogen) および Lipofectamine™ LTX Reagent (Invitrogen)を用いて細胞内に導入した.

## 2-3. ウェスタンブロット

全長型プローブ遺伝子導入後 48 時間の COS-7 細胞を 2x Laemmli サンプルバッファーに溶かし、煮沸後ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った. 細胞溶解物の泳動後、ゲルからニトロセルロース膜 (Hybond ECL Membrane, GE Healthcare) へタンパク質を転移させ、1%のスキムミルクを含む 0.05% Tween20 含有トリス緩衝化生理食塩水 (TBS-Tween 20) でブロッキングを行った. 一次抗体には抗 GFP 抗体 (Anti-GFP antibody from mouse IgG, Roche), 二次抗体には抗マウス IgG 抗体 (anti-mouse IgG antibody, GE Healthcare) を用いた. 検出には発光試薬 (Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents, GE Healthcare) を使用し、撮影は LAS-1000 mini (FUJI FILM) で行った.

## 2-4. 免疫沈降・逆転写 PCR (IP / RT-PCR)

全長型プローブ遺伝子を導入した COS-7 細胞を溶解バッファー (10 mM トリス・塩酸 (pH7.4), 150 mM 塩化ナトリウム, 5 mM エチレンジアミン四酢酸(EDTA), 50 mM フッ化ナトリウム, 0.5% NP-40, タンパク質分解阻害剤 (Protease inhibitor cocktail, Roche))



に溶かし, RNase 阻害剤 (HPRI, TaKaRa) を加えた後, 抗 GFP 抗体 (Anti-GFP antibody from mouse IgG, Roche) と G Sepharose (GE Healthcare) を用いて RNA-タンパク質複合体を回収した. 回収したサンプルからの RNA 抽出には TRIzol (Invitrogen) とクロロホルムを用い, イソプロパノール沈殿, 及びエタノール沈殿を行った後, RNA のペレットを RNase-free の水に溶解した. DNase I (Invitrogen) を加え, 内在する DNA を除去した. 逆転写反応には Superscript III (Invitrogen) と Oligo dT (Invitrogen) を用いた.  $\beta$  アクチンの cDNA を増幅する際の PCR に使用したプライマーを以下に示す. なお, グリセルアルデヒド三リン酸脱水素酵素 (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GAPDH) の mRNA は, 細胞内で恒常的に発現することが知られているため, 内部標準として使用した.

Beta-actin forward primer : 5'-ccaaccgcgagaagatgaccc-3'

Beta-actin reverse primer : 5'-tctccaggaggagctagaag-3'

GAPDH forward primer : 5'-ggagtcaacggatttgg-3'

GAPDH reverse primer : 5'-aagacgccagtggactc-3'

## 2-5. *in-situ* ハイブリダイゼーション

全長型プローブ遺伝子を導入した COS-7 細胞をカバーガラス上で培養し, 3.7% ホルムアルデヒド / PBS で 30 分間固定した. PBS での洗浄後, 70% エタノールで一晩透過処理を行った. 50% ホルムアミド / 2x SSC (300 mM 塩化ナトリウム, 30 mM クエン酸ナトリウム, pH 7.0) による 5 分間のプレハイブリダイゼーションの後, Texas-Red で標識したオリゴヌクレオチドプローブを 0.75 ng /  $\mu$ l 含むハイブリダイゼーションバッファー (50% ホルムアミド, 2x SSC, 1  $\mu$ g /  $\mu$ l 大腸菌 tRNA, 2 mM バナジル-リボヌクレオチド複合体, 0.02% ウシ血清アルブミン, 10% デキストラン硫酸) で, 37 度で一晩ハイブリダイゼーション

ョンを行った．以下に用いたオリゴヌクレオチドの配列を記す．オリゴヌクレオチドプローブの 5' 末端は Texas-Red で標識されている．

anti-sense : 5'-tgtaaaactttgggggatgctcgctccaaccgactgctgtcaccttcaccgttccagt-3'

sense : 5'-actggaacggtgaaggtgacagcagtcggttgagcgagcatccccaaagttttaca-3'

## 2-6. イメージング

### 2-6-1. 落射照明蛍光顕微鏡

ガラスベースディッシュ (Iwaki) 内で培養した COS-7 細胞を落射蛍光顕微鏡 (IX71, Olympus) 下で観察した．光源には 100 W の超高圧水銀ランプを用い，透過率 6% の ND フィルターを使用し励起した．GFP 観察の際には  $480 \pm 10$  nm の励起フィルター， $525 \pm 20$  nm の吸収フィルター，RFP 観察の際には  $565 \pm 10$  nm の励起フィルター， $620 \pm 30$  nm の吸収フィルターを使用した．対物レンズは油浸の 100 倍レンズ (UPlanSApo, NA 1.40, Olympus) を使用し，画像取得は  $-50$  °C に冷却した EM-CCD カメラ (iXon, ANDOR Technology) で，露光時間 100 m 秒，フレームレート 10 fps で行った．画像解析には Meta Morph (Molecular Devices) を用いた [Fig.9(A)]．

### 2-6-2. 全反射照明蛍光顕微鏡 (1)

プローブと微小管の同時観察には，倒立型顕微鏡 (IX71, Olympus) に蛍光励起用レーザー光を導入する二分岐投光管を備え付けた全反射蛍光顕微鏡を用いた．GFP の観察には 488 nm のレーザー (20 mW) を用い，495-540 nm の吸収フィルターを使用した．RFP の観察には 561 nm のレーザー (10 mW) を用い，570-625 nm の吸収フィルターを使用し

た．対物レンズは，全反射照明蛍光顕微鏡専用の油浸の 100 倍レンズ (PlanApo, NA 1.45, Olympus) を使用し， $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  に冷却した EM-CCD カメラ (CascadeII, Photometrics) で露光時間 100 m 秒，ビデオレート 10 fps で画像を取得した．画像解析には Meta Morph (Molecular Devices) を用いた [Fig.9(B)]．

### 2-6-3. 全反射照明蛍光顕微鏡 (2)

倒立型電動顕微鏡 (IX81, Olympus) にレーザーの装備を付け加え，全反射照明蛍光顕微鏡を構築した．GFP の観察には 488 nm のレーザー (50 mW, Spectra-Physics) を用い， $525 \pm 20\text{ nm}$  の吸収フィルターを使用した．RFP の観察には 561 nm のレーザー (50 mW, Showa Optronics) を用い， $609 \pm 27\text{ nm}$  の吸収フィルターを使用した．いずれのレーザーにも，透過率 30% の ND フィルターを付けた．対物レンズは，全反射照明蛍光顕微鏡専用の油浸の 100 倍レンズ (PlanApo, NA 1.49, Olympus) を使用し， $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  に冷却した EM-CCD カメラ (ImagEM, Hamamatsu Photonics) 露光時間 33 m 秒，フレームレート 30 fps で画像を取得した．画像解析には Image J (NIH) を用いた [Fig.9(C)]．

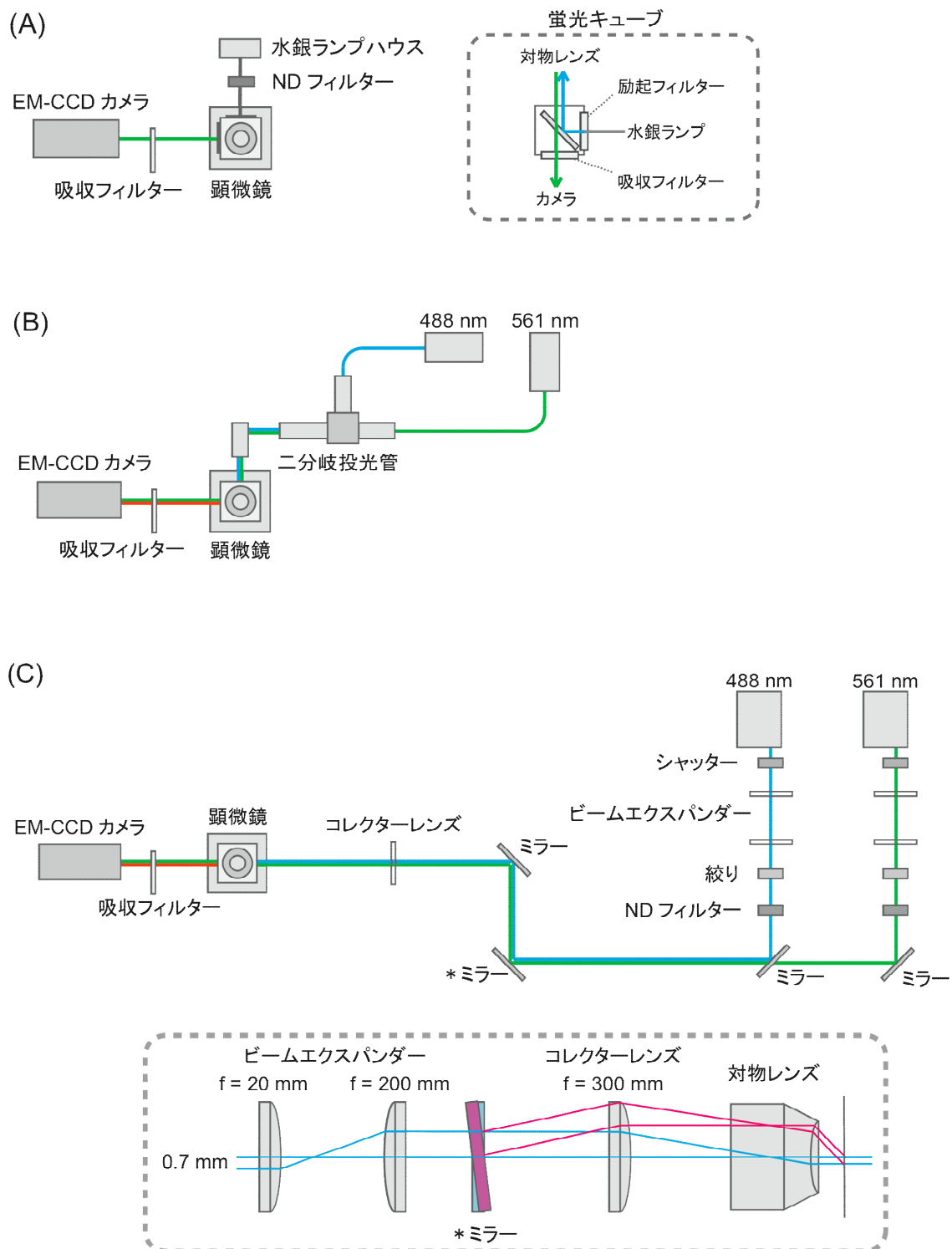


Figure 9. 顕微鏡光路の模式図

次頁に詳細を説明する.

(A) 落射照明蛍光顕微鏡の模式図. 水銀ランプハウスからの光は, 透過率 6% の ND フィルターを通り, 顕微鏡内にある蛍光キューブに入る. 入射光のうち, 励起フィルターで透過された波長が対物レンズを通り, サンプルを励起する. サンプルが放出した蛍光は, 対物レンズを通り, 蛍光キューブに入射する. 吸収フィルターで透過された波長の光が, EM-CCD カメラで検出される.

(B) 全反射照明蛍光顕微鏡 (1) の模式図. 488 nm のレーザーと 561 nm のレーザーからの励起光は, 二分岐投光管で切り替えが可能である. 投光管内にあるミラーの角度を操作することで, 対物レンズ内でのレーザーの入射位置を調節できる.

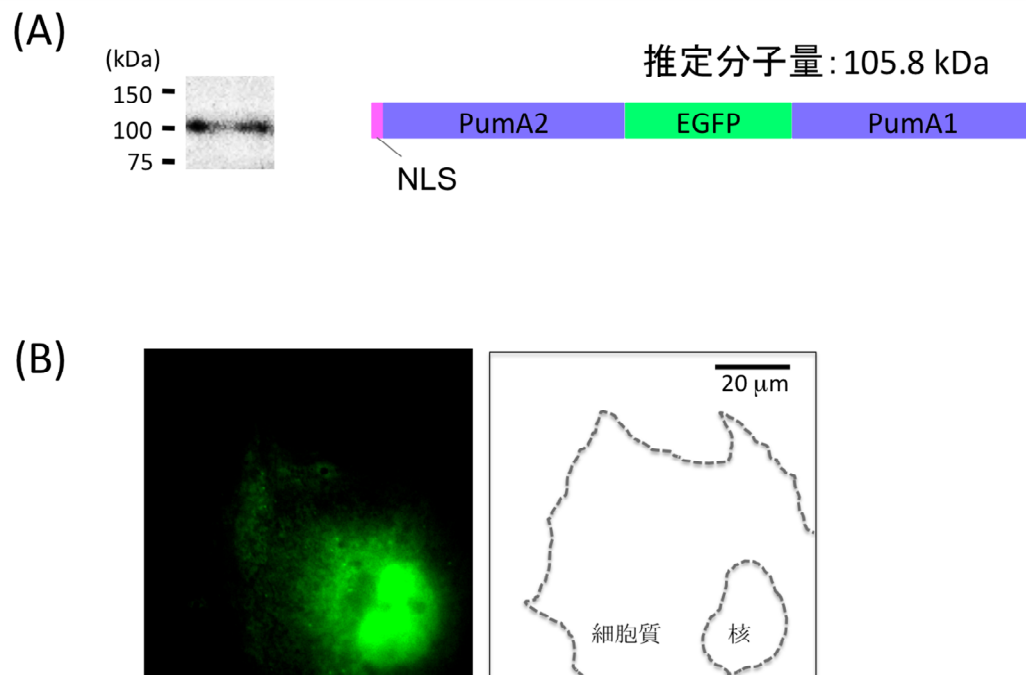
(C) 全反射照明蛍光顕微鏡 (2) の模式図. \*印のミラーの角度を操作することで, 対物レンズに入射するレーザーの位置を調節する.

### 3. 結果と考察

#### 3-1. 細胞内における全長型プローブの発現

全長型プローブをコードする遺伝子が、細胞内で設計したプローブタンパク質を発現することを確認するための実験を行った。COS-7 細胞に全長型プローブの遺伝子を組込んだプラスミドを導入し、回収した細胞を SDS-PAGE した後、抗 GFP 抗体でウェスタンブロットを行った。その結果、100 kDa 強の位置に特異的なバンドが検出された [Fig.10(A)]. 計算から求められた全長型プローブの推定分子量は 105.8 kDa である。ウェスタンブロットで検出されたバンドのサイズが推定分子量と近似していることから、設計した全長型プローブの遺伝子が細胞内で発現していることが確認された。

次に、全長型プローブ遺伝子を導入した COS-7 細胞を落射照明蛍光顕微鏡で観察した。その結果、細胞の核での強い蛍光シグナルと細胞質内での弱い蛍光シグナルを観察した [Fig.10(B)]. 核内に見られる蛍光シグナルは、 $\beta$  アクチン mRNA に結合していない全長型プローブが核移行シグナルペプチド配列によって核内に局在しているためである。一方、細胞質内の蛍光強度は一樣ではなく、核付近と細胞辺縁部付近に強い蛍光シグナルが観察された。これまでの  $\beta$  アクチン mRNA の局在に関する知見によると、 $\beta$  アクチン mRNA は核周辺と細胞辺縁部に局在する (Farina et al., 2003, Tiruchinapalli et al., 2003, Yamagishi et al., 2009). これらの結果から、全長型プローブは COS-7 細胞中で発現していることが確認され、さらに、 $\beta$  アクチン mRNA の細胞内局在が可視化できると期待できる。



**Figure 10. 細胞内における全長型プローブの発現**

(A)全長型プローブの遺伝子を導入した COS-7 細胞に対し、抗 GFP 抗体でウェスタンブロット検出を行った結果(左) と、 全長型プローブの模式図と推定分子量 (右).

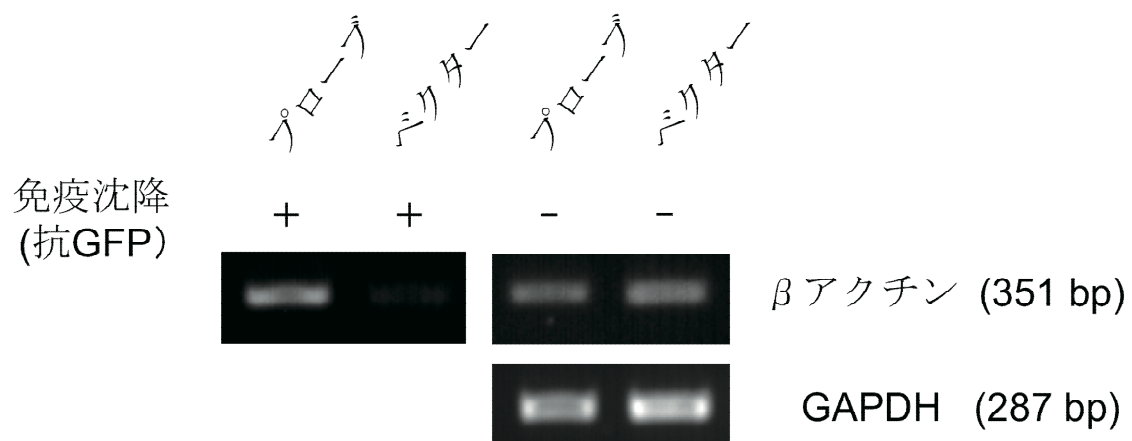
(B) 細胞内における全長型プローブの局在. 全長型プローブの遺伝子を導入した COS-7 細胞を落射照明蛍光顕微鏡で観察した. 全長型プローブの蛍光像 (左) と細胞の輪郭 (右).

### 3-2. 標的 mRNA に対する全長型プローブの結合

細胞内で発現した全長型プローブが、 $\beta$  アクチン mRNA に結合することを確認するため、免疫沈降・逆転写 PCR を行った。全長型プローブの遺伝子を導入した COS-7 細胞から抗 GFP 抗体で RNA-タンパク質複合体を回収し、RNA 抽出を行った後、逆転写 PCR によって  $\beta$  アクチン mRNA を増幅したところ、 $\beta$  アクチン mRNA が検出された [Fig.11]。一方、プローブ遺伝子を導入していない細胞を用いて同様の実験を行ったところ、 $\beta$  アクチン mRNA は検出されなかった。抗 GFP 抗体による免疫沈降を行わず、全 RNA の cDNA に対して  $\beta$  アクチン mRNA の増幅を行ったところ、全長型プローブの発現の有無に関わらず、ほぼ等量の  $\beta$  アクチン mRNA の存在が確認された。また、全 RNA の cDNA に対して、内部標準である GAPDH mRNA の増幅を行ったところ、全長型プローブの有無に関わらず、ほぼ等量の GAPDH mRNA の存在が確認された。すなわち、細胞内における  $\beta$  アクチン mRNA の発現量は全長型プローブの発現の有無に影響されないことが分かる。これらの結果から、全長型プローブが標的 mRNA である  $\beta$  アクチン mRNA 内の配列を認識し、結合することが示された。

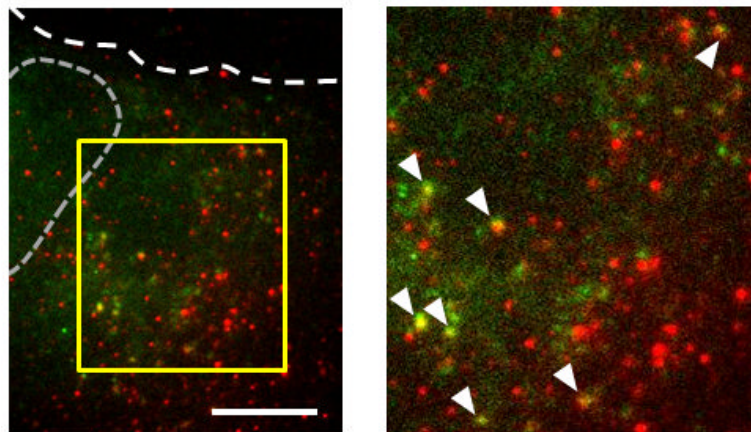
全長型プローブと  $\beta$  アクチン mRNA との結合の特異性を検証するため、全長型プローブを発現した細胞を固定化し、 $\beta$  アクチン mRNA に対する *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、全長型プローブと  $\beta$  アクチン mRNA の細胞内局在を比較した [Fig.12]。全反射照明蛍光顕微鏡で細胞の観察を行ったところ、多くの全長型プローブの輝点が *in situ* ハイブリダイゼーションによって標識された  $\beta$  アクチン mRNA の輝点と共局在する様子が確認された。この結果から、設計した全長型プローブが標的 mRNA である  $\beta$  アクチン mRNA に特異的に結合することが明らかになった。免疫沈降-逆転写 PCR と *in situ* ハイブリダイゼーションの 2 つの結果から、本研究で設計した全長型プローブが  $\beta$  アクチン mRNA に結合し、細胞質内の  $\beta$  アクチン mRNA の局在の蛍光標識を可能にすることが証明された。





**Figure 11.** 免疫沈降・逆転写 PCR による全長型プローブの  $\beta$  アクチン mRNA に対する結合性の解析

全長型プローブの遺伝子を導入した COS-7 細胞を抗 GFP 抗体で免疫沈降し、プローブと共に沈降した mRNA を逆転写した。得られた cDNA を  $\beta$  アクチンのプライマーで PCR 増幅した (左上)。免疫沈降を行わず、全 RNA の cDNA に対して  $\beta$  アクチンのプライマーで PCR 増幅をした (右上)。全 RNA の cDNA に対し、内部標準である GAPDH のプライマーで PCR 増幅をした (右下)。右側の数値はバンドのサイズ。

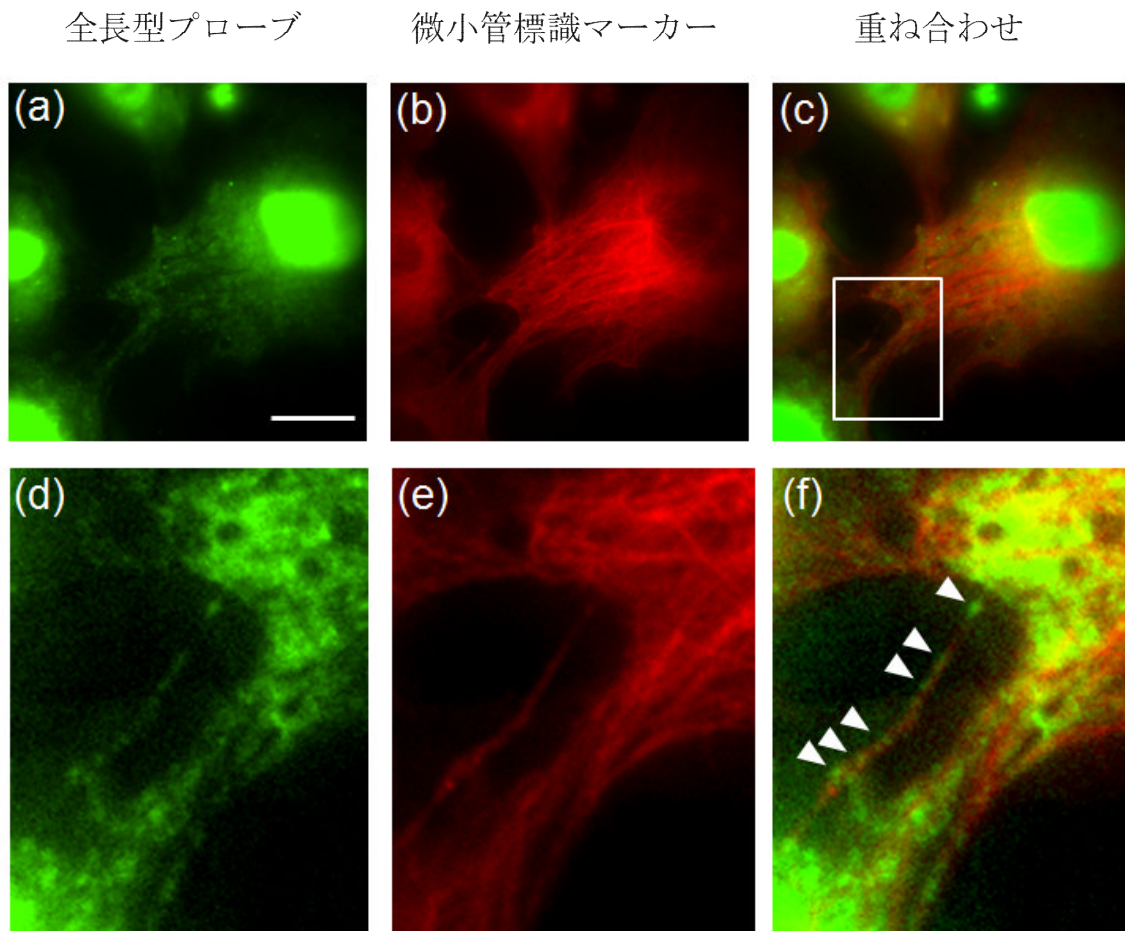


**Figure 12.** *in situ* ハイブリダイゼーションによって蛍光標識された  $\beta$  アクチン mRNA と細胞内で発現した全長型プローブ

全長型プローブの遺伝子を導入した COS-7 細胞を固定し、 $\beta$  アクチン mRNA に対して相補的な配列のオリゴヌクレオチドプローブを結合させ、全反射照明蛍光顕微鏡で観察した。赤： $\beta$  アクチン mRNA。緑：全長型プローブ。白い破線：細胞の輪郭。灰色の破線：核の輪郭。右：枠で囲んだ領域の拡大像。矢頭： $\beta$  アクチン mRNA と全長型プローブとの共局在。スケールバーは 10  $\mu$ m。

### 3-3. 細胞内における $\beta$ アクチン mRNA の局在

過去の研究から、一部の mRNA は細胞骨格上を輸送されることが知られている。例えば、 $\beta$  アクチン mRNA は細胞骨格の一種である微小管上を輸送されると報告されている (Bassell et al., 1994, Fusco et al., 2003)。作製したプローブが  $\beta$  アクチン mRNA の輸送を可視化できるかどうかを検証するために、作製した全長型プローブと微小管との空間的な関係を解析した。微小管を標識するため、微小管の構成タンパク質の  $\alpha$ -tubulin に赤色蛍光タンパク質 (RFP) を融合した微小管標識マーカーのプラスミドを作製した。この微小管標識マーカーのプラスミドと全長型プローブのプラスミドを同時に COS-7 細胞へ導入し、落射照明蛍光顕微鏡で観察を行った [Fig.13]。マーカーによって標識された微小管は、細胞内で繊維状の構造をとり、核周辺から細胞の末端まで広がっている様子が観察された。核付近ではその構造が密に重なり合い、細胞の厚みの薄い末端では微小管の一本一本の繊維構造が確認された。また、細胞末端における微小管の繊維構造に沿って、全長型プローブの局在が確認された。この結果は、これまでに解明されている  $\beta$  アクチン mRNA が微小管上を輸送される事実と一致する (Bassell et al., 1994, Fusco et al., 2003)。従って、微小管上に観察されたプローブのシグナルは、輸送される  $\beta$  アクチン mRNA であると結論づけた。以上より、作製した全長型プローブが標的 mRNA である  $\beta$  アクチン mRNA に結合し、生きた細胞内での mRNA イメージングが可能であることを明らかにした。



**Figure 13.** 細胞内における  $\beta$  アクチン mRNA の局在

COS-7 細胞に、全長型プローブの遺伝子と微小管標識マーカーの遺伝子を導入し、落射照明蛍光顕微鏡で観察を行った。

(a) 全長型プローブ。スケールバーは 20  $\mu\text{m}$ 。

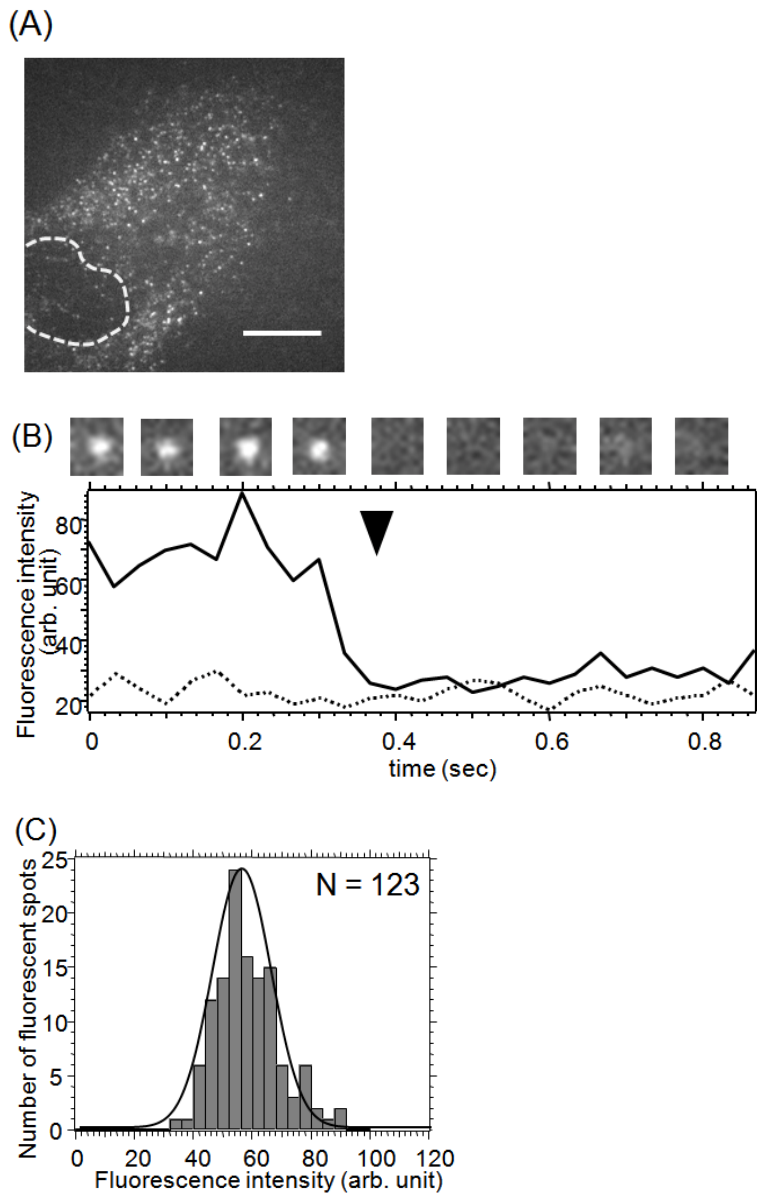
(b) 微小管標識マーカー。

(c) 全長型プローブと微小管標識マーカーの重ね合わせ。

(d-f) (c)の白線で囲まれた領域の拡大像。矢頭は微小管上に局在する全長型プローブを示す。

### 3-4. $\beta$ アクチン mRNA の一分子イメージング

細胞質内における  $\beta$  アクチン mRNA の詳細な動態を解析するため、全反射照明蛍光顕微鏡を用いた観察を行った。全反射照明蛍光顕微鏡は、入射角をつけた励起光がカバーガラスとサンプルの境界で全反射する際に発生するエバネッセント場によってサンプルを励起する(Axelrod, 1981)。通常の顕微鏡観察で取り扱う 400~700 nm の励起光の場合で、エバネッセント場の厚みは 50~150 nm 程度であるため、サンプルを観察する際の背景のノイズを抑え、一分子レベルでの蛍光タンパク質の観察を可能にする。全長型プローブを発現した COS-7 細胞を全反射照明蛍光顕微鏡で観察したところ、細胞内で多くの蛍光シグナルが輝点状に見られた [Fig.14(A)]。これらの輝点をタイムラプス観測したところ、ゆらぎを示す蛍光シグナルの輝点が瞬時に消える様子が取得された [Fig.14(B)]。細胞内に観察された輝点が一段階消光を示したことから、観察された輝点が一分子の EGFP に由来することが解った (Pierce et al., 1997, Mashanov et al., 2003)。また、各輝点における蛍光強度を測定し、その蛍光強度を横軸に統計分布図を作製した [Fig.14(C)]。各輝点の蛍光強度の分布は、単峰型のガウス曲線と一致した。これは、各輝点が同じ数の EGFP に由来することを示す。以上より、全反射照明蛍光顕微鏡によって観察される蛍光シグナルの一輝点は、一分子のプローブ内の EGFP に由来することが証明された。このことから、本研究で作製した全長型プローブは全反射照明蛍光顕微鏡を用いることで、標的 mRNA を一分子レベルで観察できることを実証した。



**Figure 14.**  $\beta$  アクチン mRNA の一分子イメージング

COS-7 細胞に全長型プローブの遺伝子を導入し、全反射照明蛍光顕微鏡で観察を行った。

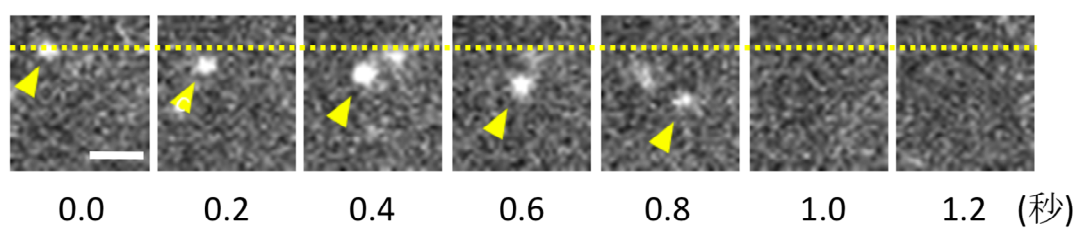
(A) 全反射照明蛍光顕微鏡で観察される全長型プローブの輝点。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。

(B) 全長型プローブの輝点のタイムラプス画像（上）と、輝点の蛍光強度の経時変化（下）。実線は輝点、破線はバックグラウンドの蛍光強度を示す。矢頭は、輝点が消えた時点を示す。

(C) 各輝点の蛍光強度の統計分布図。

### 3-5. $\beta$ アクチン mRNA の動態観測

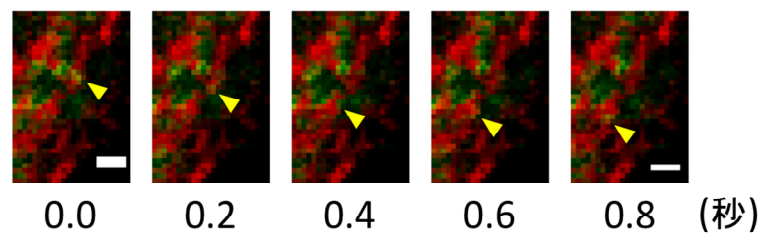
次に、細胞内における  $\beta$  アクチン mRNA 一分子の詳細な動態を調べた。全長型プローブの遺伝子を導入した COS-7 細胞を全反射照明蛍光顕微鏡で観察し、プローブの輝点の軌跡を解析した。多くの輝点が停止、もしくは拡散運動を示す中、直線的な動きをする全長型プローブが存在した [Fig.15]。落射照明蛍光顕微鏡による観察によって COS-7 細胞内において  $\beta$  アクチン mRNA の微小管上の局在が示されたことから、全反射照明蛍光顕微鏡によって観察された直線的動態を示す全長型プローブの輝点が、微小管上を輸送される  $\beta$  アクチン mRNA であることが推測される。この事象を確認するため、 $\beta$  アクチン mRNA と微小管の全反射照明蛍光顕微鏡を用いた観察を行った。その結果、微小管の繊維状構造に沿って直線的に移動する全長型プローブの輝点が確認された [Fig.16]。直線的動態を示す全長型プローブの輝点の平均移動速度は約  $1.7 \mu\text{m} / \text{秒}$  で、微小管上を移動するモータータンパク質の移動速度と一致する (Courty et al., 2006, Hammond et al., 2009)。これらのことから、直線的動態を示す全長型プローブの輝点が、モータータンパク質によって微小管上を輸送される  $\beta$  アクチン mRNA であることが示唆された。



**Figure 15.** 直線的動態を示す  $\beta$  アクチン mRNA

全長型プローブの遺伝子を導入した COS-7 細胞を全反射照明蛍光顕微鏡で観察した。直線的に移動するプローブの輝点。上の画像の枠で囲んだ領域の経時変化を下に示す。破線は、0 秒時点の輝点の位置である。矢頭は、移動する輝点の位置を示す。スケールバーは  $2\ \mu\text{m}$ 。





**Figure 16.** 微小管上を移動する  $\beta$  アクチン mRNA

全長型プローブの遺伝子と微小管標識マーカの遺伝子を導入した COS-7 細胞を，全反射照明蛍光顕微鏡で観察した．微小管上を直線的に移動するプローブの輝点．矢頭は，移動する輝点の位置を示す．緑：全長型プローブ．赤：微小管標識マーカ．スケールバーは 1  $\mu\text{m}$ .

#### 4. 結論

本研究では、全長型プローブを用いた新規の mRNA ライブイメージング手法を開発した。この手法は既存の RNA イメージング法と比べ、いくつかの利点がある。まず、この手法で使用する全長型プローブはタンパク質で構成されるため、遺伝子工学による操作が可能である。モレキュラービーコンは、合成したオリゴヌクレオチドプローブを細胞に導入し、標的 mRNA を可視化する。多くの場合、顕微注入法を用いてモレキュラービーコンを細胞へ導入するため、細胞へ与えるダメージが懸念される。また、細胞一つ一つにプローブを導入する必要があるため、多量の解析を行う場合には手間がかかる。その点、本研究で開発した手法では、プローブの遺伝子を細胞へのダメージの少ないリポフェクションによって同時にたくさんの細胞へ導入することができる。また、プローブの遺伝子を安定的に発現する細胞株を作製することで様々な条件下での実験を容易に行うことが可能である。一方、MS2 タンパク質を用いた RNA イメージング法は、遺伝子にコードされたプローブを用いる点では本研究のプローブと同様であるが、観察対象となる mRNA が外来性であることが本研究の手法と大きく異なる。MS2 を用いたイメージング法では、蛍光標識した MS2 によって検出されるよう、興味対象の mRNA に MS2 結合領域の配列を付加した外来性の mRNA を可視化する。人為的に設計された mRNA が細胞内在性の mRNA と同じ動態を示すとは断言できない。本研究で開発した手法では、プローブ内の RNA 結合タンパク質が標的 mRNA に配列依存的に結合するため、内在性の mRNA のイメージングが可能である。

全長型プローブに標識された  $\beta$  アクチン mRNA の核周辺と細胞末端における分布や微小管上の局在、また一分子レベルでの  $\beta$  アクチン mRNA の動態は、過去に報告された  $\beta$  アクチン mRNA の細胞内局在や動態と一致した。これは、全長型プローブが  $\beta$  アクチン mRNA 本来の局在や動態を阻害することなく、可視化できることを示す。以上より、作製した全長型プローブが、生きた細胞の内在性 mRNA をイメージングする優れたプローブであることを明らかにした。

## 5. 参考文献

Axelrod D. J Cell Biol. 1981 Apr;89(1):141-5. Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence.

Bassell GJ, Singer RH, Kosik KS. Neuron. 1994 Mar;12(3):571-82. Association of poly(A) mRNA with microtubules in cultured neurons.

Ben-Ari Y, Brody Y, Kinor N, Mor A, Tsukamoto T, Spector DL, Singer RH, Shav-Tal Y. J Cell Sci. 2010 May 15;123(Pt 10):1761-74. The life of an mRNA in space and time.

Cheong CG, Hall TM. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Sep 12;103(37):13635-9. Engineering RNA sequence specificity of Pumilio repeats.

Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S. Gene. 1996;173(1 Spec No):33-8. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP).

Courty S, Luccardini C, Bellaiche Y, Cappello G, Dahan M. Nano Lett. 2006 Jul;6(7):1491-5. Tracking individual kinesin motors in living cells using single quantum-dot imaging.

Cubitt AB, Heim R, Adams SR, Boyd AE, Gross LA, Tsien RY. Trends Biochem Sci. 1995 Nov;20(11):448-55. Review. Understanding, improving and using green fluorescent proteins.

Farina KL, Huttelmaier S, Musunuru K, Darnell R, Singer RH. J Cell Biol. 2003 Jan 6;160(1):77-87. Two ZBP1 KH domains facilitate beta-actin mRNA localization, granule formation, and cytoskeletal attachment.

Fusco D, Accornero N, Lavoie B, Shenoy SM, Blanchard JM, Singer RH, Bertrand E. Curr Biol. 2003 Jan 21;13(2):161-7. Single mRNA molecules demonstrate probabilistic movement in living mammalian cells.

Gamberi C, Peterson DS, He L, Gottlieb E. Development. 2002 Jun;129(11):2699-710. An anterior function for the Drosophila posterior determinant Pumilio.

Hammond JW, Cai D, Blasius TL, Li Z, Jiang Y, Jih GT, Meyhofer E, Verhey KJ. PLoS Biol. 2009 Mar 31;7(3):e72. Mammalian Kinesin-3 motors are dimeric in vivo and move by processive motility upon release of autoinhibition.

Heim R, Prasher DC, Tsien RY. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Dec 20;91(26):12501-4. Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein.

Kislauskis EH, Zhu X, Singer RH. J Cell Biol. 1994 Oct;127(2):441-51. Sequences responsible for intracellular localization of beta-actin messenger RNA also affect cell phenotype.

Martin KC, Ephrussi A. Cell. 2009 Feb 20;136(4):719-30. Review. mRNA localization: gene expression in the spatial dimension.

Mashanov GI, Tacon D, Knight AE, Peckham M, Molloy JE. Methods. 2003 Feb;29(2):142-52. Visualizing single molecules inside living cells using total internal reflection fluorescence microscopy.

Matz MV, Fradkov AF, Labas YA, Savitsky AP, Zaraisky AG, Markelov ML, Lukyanov SA. Nat Biotechnol. 1999 Oct;17(10):969-73. Erratum in: Nat Biotechnol 1999 Dec;17(12):1227. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species.

Morris AR, Mukherjee N, Keene JD. Mol Cell Biol. 2008 Jun;28(12):4093-103. Ribonomic analysis of human Pum1 reveals cis-trans conservation across species despite evolution of diverse mRNA target sets.

Murata Y, Wharton RP. Cell. 1995 Mar 10;80(5):747-56. Binding of pumilio to maternal hunchback mRNA is required for posterior patterning in Drosophila embryos.

Oleynikov Y, Singer RH. Curr Biol. 2003 Feb 4;13(3):199-207. Real-time visualization of ZBP1 association with beta-actin mRNA during transcription and localization.

Ormö M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY, Remington SJ. Science. 1996 Sep 6;273(5280):1392-5. Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein.

Pierce DW, Hom-Booher N, Vale RD. *Nature*. 1997 Jul 24;388(6640):338. Imaging individual green fluorescent proteins.

Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. *Gene*. 1992 Feb 15;111(2):229-33. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein.

Reid BG, Flynn GC. *Biochemistry*. 1997 Jun 3;36(22):6786-91. Chromophore formation in green fluorescent protein.

Ross AF, Oleynikov Y, Kislauskis EH, Taneja KL, Singer RH. *Mol Cell Biol*. 1997 Apr;17(4):2158-65. Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein.

Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY. *Nat Methods*. 2005 Dec;2(12):905-9. Review. A guide to choosing fluorescent proteins.

Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. *J Cell Comp Physiol*. 1962 Jun;59:223-39. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*.

St Johnston D. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 May;6(5):363-75. Review. Moving messages: the intracellular localization of mRNAs.

Sundell CL, Singer RH. *Science*. 1991 Sep 13;253(5025):1275-7. Requirement of microfilaments in sorting of actin messenger RNA.

Tiruchinapalli DM, Oleynikov Y, Kelic S, Shenoy SM, Hartley A, Stanton PK, Singer RH, Bassell GJ. *J Neurosci*. 2003 Apr 15;23(8):3251-61. Activity-dependent trafficking and dynamic localization of zipcode binding protein 1 and beta-actin mRNA in dendrites and spines of hippocampal neurons.

Wang X, Zamore PD, Hall TM. *Mol Cell*. 2001 Apr;7(4):855-65. Crystal structure of a Pumilio homology domain.

Wang X, McLachlan J, Zamore PD, Hall TM. *Cell*. 2002 Aug 23;110(4):501-12. Modular recognition of RNA by a human pumilio-homology domain.

Yamagishi M, Ishihama Y, Shirasaki Y, Kurama H, Funatsu T. *Exp Cell Res.* 2009 Apr 15;315(7):1142-7. Single-molecule imaging of beta-actin mRNAs in the cytoplasm of a living cell.

Yang F, Moss LG, Phillips GN Jr. *Nat Biotechnol.* 1996 Oct;14(10):1246-51. The molecular structure of green fluorescent protein.

Zamore PD, Williamson JR, Lehmann R. *RNA.* 1997 Dec;3(12):1421-33. The Pumilio protein binds RNA through a conserved domain that defines a new class of RNA-binding proteins.

## 第 2 章 再構成型プローブ

**Visualization of Nonengineered Single mRNAs in Living Cells Using Genetically Encoded Fluorescent Probes.**

Yamada T, Yoshimura H, Inaguma A, Ozawa T.

Analytical Chemistry. 2011, July 15; 83 (14), 5708-5714



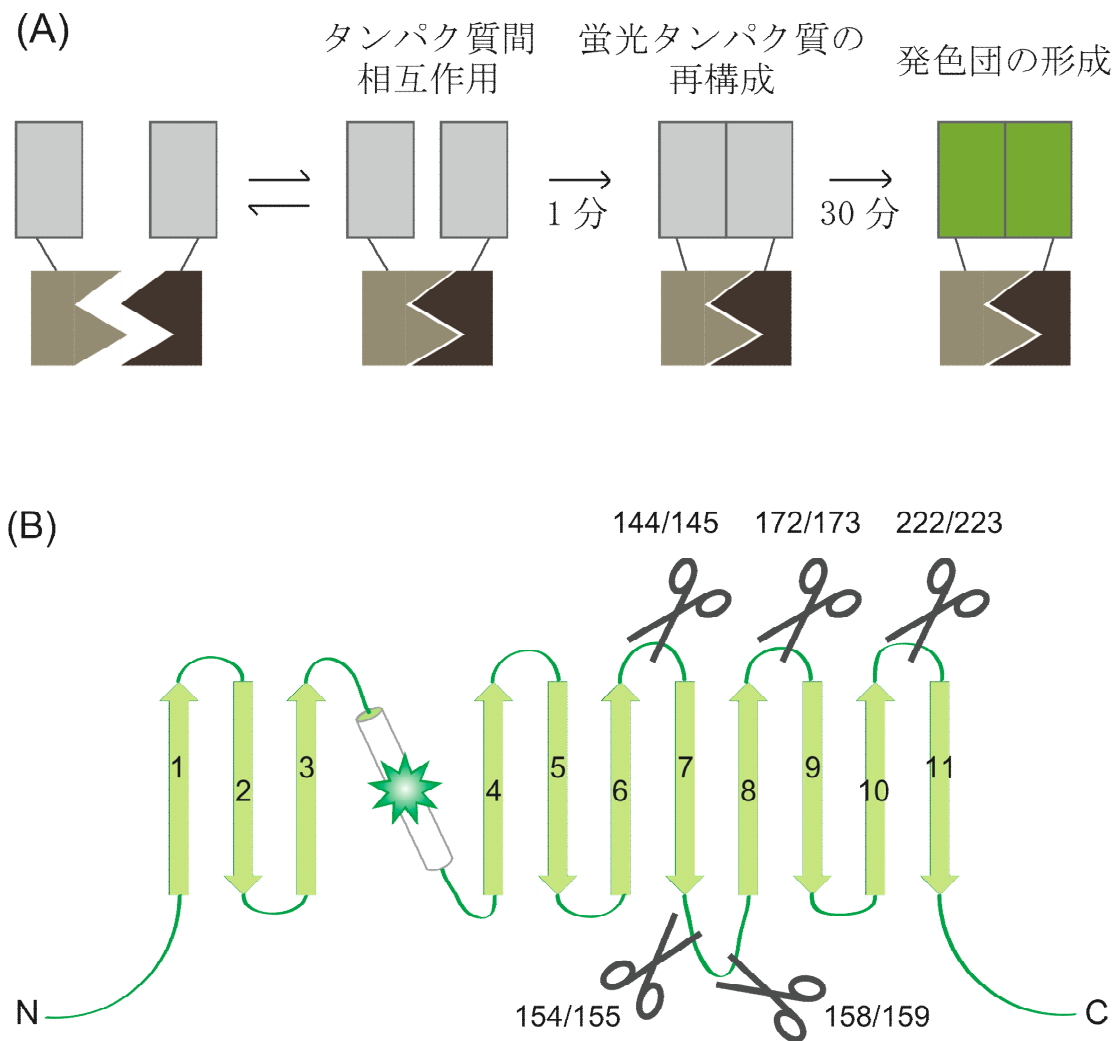


## 1. 序論

### 1-1. 蛍光タンパク質の再構成

蛍光タンパク質は、 $\beta$ シートを繋ぐループ領域の特定の位置で二断片に切断すると、 $\beta$ カン構造が形成されなくなり、蛍光能を失う。それら二断片の蛍光タンパク質を、相互作用する 2 つのタンパク質に連結すると、タンパク質間の相互作用により 2 つの蛍光タンパク質の断片が接近する。接近した蛍光タンパク質は高次構造の再構成が起き、発色団が形成され蛍光能を取り戻す (30 分~)(Ghosh et al., 2000, Ozawa et al., 2000, Hu et al., 2002)[FIG.17(A)]. 再構成を起こすよう二断片に切断する箇所はいくつか報告されている (144/145: Nagai et al., 2001, 154/155: Hu et al., 2002, 158/159: Mervine et al., 2006, 172/173: Hu and Kerppola, 2003, 222/223: Cabantous and Waldo, 2006)[FIG.17(B)].

この蛍光タンパク質の再構成法は、タンパク質間相互作用のイメージングや、相互作用するタンパク質の網羅的解析に利用されてきた (Rose et al., 2010, Ozawa et al., 2003).



**Figure 17. 蛍光タンパク質の再構成**

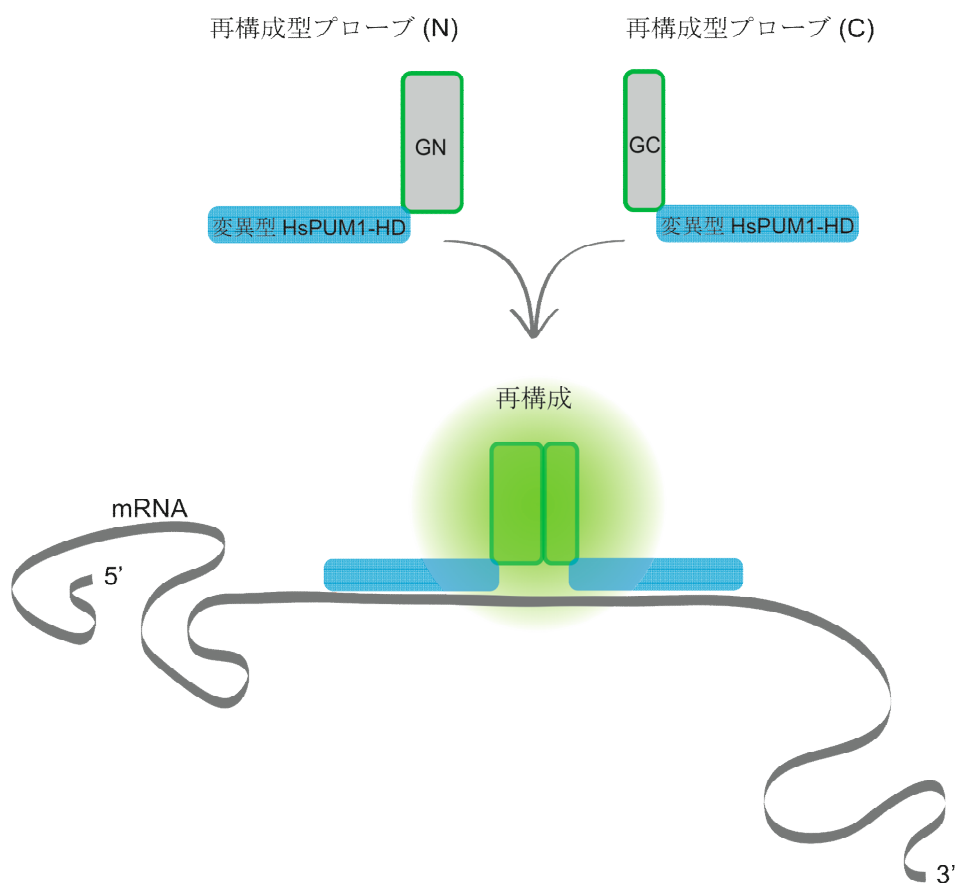
(A) 蛍光タンパク質の再構成の機構. 蛍光タンパク質の断片（灰色）が相互作用を示すタンパク質に連結されると，蛍光タンパク質の断片が接近し，蛍光タンパク質の再構成が起こる．発色団が形成され，蛍光を示すようになるまで 30 分以上を要す．

(B) 再構成を起こす 2 断片にする切断箇所. 154/155 などの数字は，それらのアミノ酸間で切断することを意味する．

## 1-2. 研究目的とプローブの原理

全長型プローブでは、標的 mRNA に結合していないフリーのプローブのシグナルを細胞質内から排除するために、核移行シグナルペプチド配列をプローブに付加した。しかし、過剰に発現したプローブが完全に核内へ隔離されず、バックグラウンドが高いという難点が生じた。このため、本研究では、全長型プローブで目指した、遺伝子にコードされるプローブであること、内在性の mRNA を可視化すること、一分子レベルでの検出を可能にすること、mRNA の動態を妨げないこと、の四点に加え、バックグラウンドを抑えた mRNA ライブイメージング用プローブの開発を目指した。

本章で取り上げる mRNA 標識プローブは、第 1 章で取りあげた全長型プローブと区別するため、「再構成型プローブ」と呼ぶ。再構成型プローブは、配列特異性を持つ HsPUM1-HD に EGFP の N 末断片を融合した「再構成型プローブ (N)」と、HsPUM1-HD に EGFP の C 末断片を融合した「再構成型プローブ (C)」の二つのタンパク質から成る [Fig.18]。HsPUM1-HD には、標的 mRNA 内の隣接した 2 つの 8 塩基配列に特異的に結合するよう、アミノ酸に変異を導入する。再構成型プローブ (N) と再構成型プローブ (C) の遺伝子を細胞に導入すると、それぞれのプローブタンパク質が産生されるが、再構成型プローブ (N) も再構成型プローブ (C) も蛍光は示さない。これら 2 つのプローブが標的 mRNA に結合すると、EGFP の N 末断片と C 末断片が近接して、EGFP が再構成して蛍光シグナルが得られる。この方法では、再構成型プローブ (N) と再構成型プローブ (C) が標的 mRNA に結合して初めて蛍光を示すので、細胞内に存在する標的 mRNA に結合していないフリーのプローブからのバックグラウンドを抑えることができる。なお、この原理を利用した、動物細胞内でのミトコンドリア RNA (NADH dehydrogenase subunit 6; ND6) と、植物内での RNA ウイルス (タバコモザイクウイルス) の可視化が報告されている (Ozawa et al., 2007, Tilsner et al., 2009)。



**Figure 18. 再構成型プローブの原理**

細胞内に発現した再構成型プローブ (N) と再構成型プローブ (C) は、それぞれ単独では蛍光を示さない。変異を加えた HsPUM1-HD が標的 mRNA に結合することで、EGFP の二断片が近接し、再構成する。再構成した EGFP によって標的 mRNA が可視化される。GN：EGFP の N 末断片。GC：EGFP の C 末断片。

## 2. 実験材料と手法

### 2-1. プローブの設計とプラスミド作製

マウス胚繊維芽細胞の NIH 3T3 細胞株を用いるため、マウスの  $\beta$  アクチン mRNA の翻訳領域に結合するプローブを設計した。全長型プローブの設計と同様に、マウスの  $\beta$  アクチン mRNA の翻訳領域 (1128 nt) から、HsPUM1-HD の結合に重要である UGU 配列を持ち、野生型 HsPUM1-HD の認識配列 U G U A Y A U A (Y は U または C) に類似した 8 塩基配列を選択した。プローブは、二分割した EGFP の再構成を用いて検出するため、候補として挙げた 8 塩基配列から 2 つの候補箇所の距離の近い配列を選択した。 $\beta$  アクチン mRNA の上流側から、それぞれの候補箇所を A3 (474-481, UGUACGUA), A4 (493-500, UGUGCUGU) とした [Fig.19]。A3, A4 に特異的に結合するよう、HsPUM1-HD の遺伝子配列に double-PCR 法で変異を加えた変異体を作製し、A3 を認識するものを PumA3 (C935S, Q939E), A4 を認識するものを PumA4 (S863N, N899S, Q903E, C935N, C1007S, Q1011E) と命名した [Fig.20]。各変異型 HsPUM1-HD の遺伝子に目的の変異が導入されたことは、シーケンサー (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, ABI) を用いて確認した。

PumA3 の N 末には、EGFP の N 末断片 (GN : 1-158 アミノ酸) の配列を組み込み、C 末には FLAG タグを組み込んだ融合タンパク質の遺伝子を作製した。この遺伝子によってコードされるプローブを「再構成型プローブ (N)」と呼ぶ。一方、PumA4 の C 末には、EGFP の C 末断片 (GC : 159-239 アミノ酸) の配列を組み込んだ融合タンパク質の遺伝子を作製した。この遺伝子によってコードされるプローブを「再構成型プローブ (C)」と呼ぶ。cDNA のクローニングは大腸菌クローニングベクター (pBluescript, Stratagene) を用いて行い、最後に動物細胞発現用ベクター (pcDNA<sup>TM</sup>3.1(+), Invitrogen) へ組み込んだ [Fig.21]。

# Mus musculus actin, beta (Actb), mRNA

GenBank: NM\_007393.3

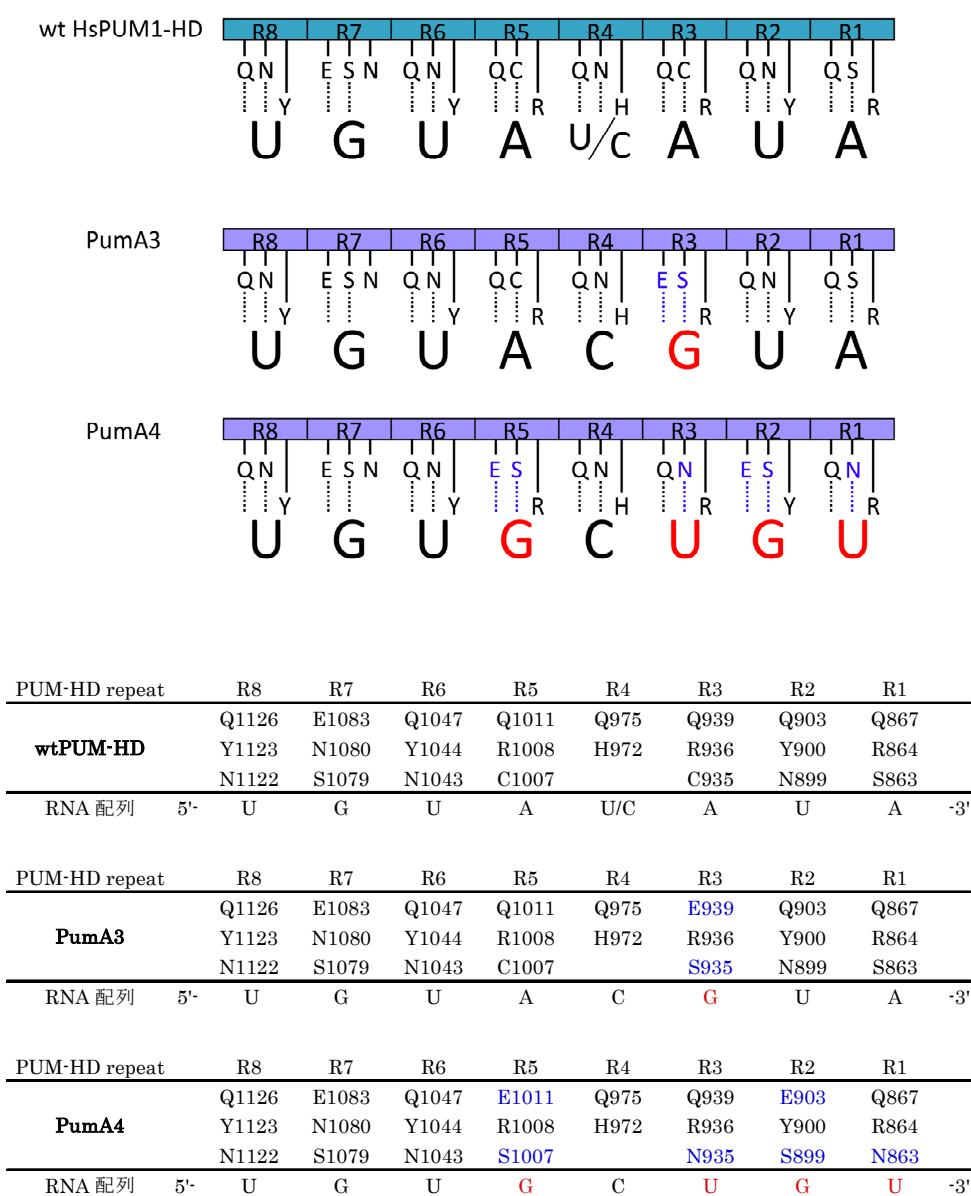
```

1  ctgtcgaagtc gcggtccaccc gcgagcacag cttcttttga gtccttctgt tgccgggtcca
61  caccgcgccac cagttcgcca tggatgacga tatcgctgcg ctggctcgtc acaacggctc
121 cggcatgtgc aaagccggct tcgcggggca cgatgctccc cgggctgtat tcccctccat
181 cgtgggcccgc cctaggcacc aggggtgtgat ggtgggaatg ggtcagaagg actcctatgt
241 gggtagcagag gccagagca agagaggat cctgaccctg aagtaccca ttgaacatgg
301 cattgttacc aactgggacg acatggagaa gatctggcac cacaccttct acaatgagct
361 gcgtgtggcc cctgaggagc accctgtgct gctcaccgag gccccctga accctaaggc
421 caaccgtgaa aagatgaccc agatcatgtt tgagaccttc aacacccag ccatgtagct
                                     A3
481 agccatccag gctgtgctgt cctgttatgc ctctggctgt accacaggca ttgtgatgga
                                     A4
541 ctccggagac ggggtcacc acactgtgac catctacgag ggctatgctc tccctcacgc
601 catcctgcgt ctggacctgg ctggccggga cctgacagac tacctcatga agatcctgac
661 cgagcgtggc tacagcttca ccaccacagc tgagagggaa atcgtgcgtg acatcaaaga
721 gaagctgtgc tatgttgctc tagacttcga gcaggagatg gccactgccg catcctcttc
781 ctccctggag aagagctatg agctgcctga cggccaggtc atcactattg gcaacgagcg
841 gttccgatgc cctgaggctc ttttccagcc ttccttcttg ggtatggaat cctgtggcat
901 ccatgaaact acattcaatt ccatcatgaa gtgtgacgtt gacatccgta aagacctcta
961 tgccaacaca gtgctgtctg gtgggtaccac catgtacca ggcattgctg acaggatgca
1021 gaagagagatt actgctctgg ctccctagcac catgaagatc aagatcattg ctccctctga
1081 gcgcaagtac tctgtgtgga tcgggtggctc catcctggcc tcactgtcca ccttccagca
1141 gatgtggatc agcaagcagg agtacgatga gtccggcccc tccatcgtgc accgcaagtg
1201 cttctaggcg gactgttact gagctgcgtt ttacaccctt tctttgacaa aacctaaactt
1261 gcgcagaaaa aaaaaaata agagacaaca ttggcatggc tttgtttttt taaatttttt
1321 ttaaagtttt ttttttttt ttttttttt tttttaagtt tttttgtttt gttttggcgc
1381 ttttgactca ggatttaaaa actggaacgg tgaaggcgac agcagttggt tggagcaaac
1441 atcccccaaa gttctacaaa tgtggctgag gactttgtac attgttttgt tttttttttt
1501 ttttggtttt gtcttttttt aatagtcatt ccaagtatcc atgaaataag tggttacagg
1561 aagtccctca cctcccaaaa agccaccccc actcctaaga ggaggatggt cgcgtccatg
1621 ccctgagtc accccgggga aggtgacagc attgcttctg tgtaaattat gtactgcaaa
1681 aattttttta aatcttccgc cttaataact catttttggt ttttaattct gaatggccca
1741 ggtctgaggc ctcccttttt tttgtccccc caacttgatg tatgaaggct ttggtctccc
1801 tgggaggggg ttgaggtgtt gaggcagcca gggctggcct gtacactgac ttgagaccaa
1861 taaaagtgca caccttacct tacacaaa

```

**Figure 19. マウス  $\beta$  アクチン mRNA 内のプローブの結合領域**

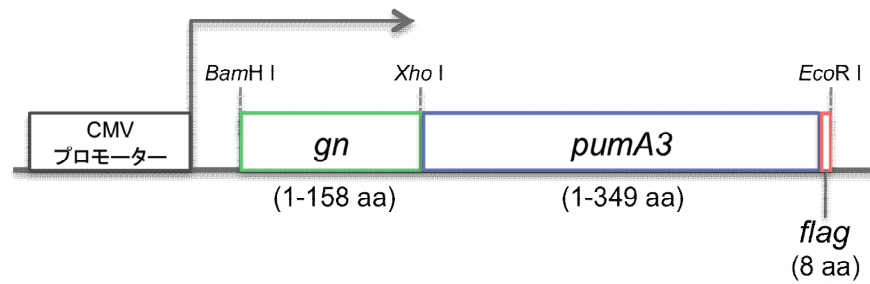
NIH 3T3 細胞の由来主であるマウスの  $\beta$  アクチン mRNA の cDNA 配列. プローブ内の変異型 HsPUM1-HD が結合する領域を赤で示した.



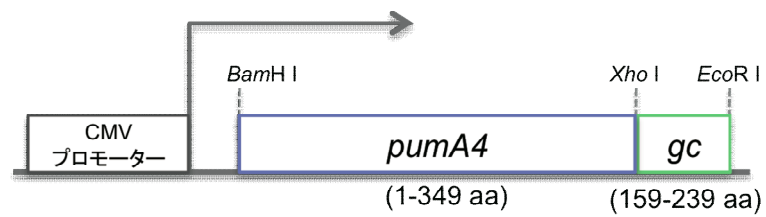
**Figure 20.** 再構成型プローブ内の変異型 HsPUM1-HD の詳細

再構成型プローブ内の変異型 HsPUM1-HD の RNA 認識に関わるアミノ酸の模式図 (上) と表 (下). NIH 3T3 細胞の  $\beta$  アクチン mRNA に特異的に結合するよう, HsPUM1-HD に加えたアミノ酸置換を青で記した. 野生型 HsPUM1-HD が結合する RNA 配列と, 設計した変異型 HsPUM1-HD が結合する RNA 配列で異なる塩基を赤で示した.

### 再構成型プローブ(N)



### 再構成型プローブ(C)



**Figure 21.** 再構成型プローブの遺伝子構造

再構成型プローブ (N) と再構成型プローブ (C) の遺伝子構造を模式的に示した.



## 2-2. 細胞培養と遺伝子導入

マウス胚繊維芽細胞の NIH 3T3 細胞は, 10%の仔牛血清 (CS, Gibco) を含んだダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM, Gibco) で, 二酸化炭素濃度 5%, 37 °Cのインキュベータ内で培養した. プラスミドは Lipofectamine™ LTX (Invitrogen) を用いて細胞内に導入した.

## 2-3. ウェスタンブロット

全長型プローブの検出と同様の手法でウェスタンブロットを行った. 再構成型プローブ (N) の一次抗体には抗 FLAG 抗体 (ANTI-FLAG M2 monoclonal Antibody, SIGMA-ALDRICH), 再構成型プローブ (C) の一次抗体には抗 GFP 抗体 (Anti-GFP antibody from mouse IgG, Roche) を用いた.

## 2-4. 免疫沈降・逆転写 PCR (IP / RT-PCR)

プローブ遺伝子を導入した NIH 3T3 細胞を溶解バッファー (10 mM トリス-塩酸 (pH7.4), 150 mM 塩化ナトリウム, 5 mM エチレンジアミン四酢酸(EDTA), 50 mM ブッ化ナトリウム, 0.5% NP-40, タンパク質分解酵素阻害剤 (Protease inhibitor cocktail, Roche)) に溶かし, RNase 阻害剤 (HPRI, TaKaRa) を加えた. 再構成型プローブ (N) の遺伝子を導入したサンプルは抗 FLAG 抗体 (ANTI-FLAG M2 monoclonal Antibody, SIGMA-ALDRICH) を, 再構成型プローブ(C)の遺伝子を導入したサンプルは抗 GFP 抗体 (Anti-GFP antibody from mouse IgG, Roche) を用い, Protein G Sepharose (GE Healthcare) で RNA-タンパク質複合体を回収した. 以下, RNA の抽出と逆転写反応は, 第 1 章 2-4 の「実験材料と手法」に載せた手法と同様に行った. 得られた cDNA に対し, PCR 増幅に使用したプライマーを以下に示す.

Beta-actin forward primer : agatgaccagatcatgtttgag

Beta-actin reverse primer : cagtaatctccttctgcatcctg

GAPDH forward primer : gatgacatcaagaagggtgtga

GAPDH reverse primer : ggtccagggtttcttactcctt

## 2-5. *in-situ* ハイブリダイゼーション

手法は第1章 2-5 に同様である。用いたオリゴヌクレオチドの配列を以下に記す。オリゴヌクレオチドプローブの5'末端は TAMRA で標識されている。

anti sense : 5'-ttaggttttgtcaaagaaagggtgtaaaacgcagctcagtaacagtccgc-3'

sense : 5'-gcggactgttactgagctgcggttttacaccctttctttgacaaaacctaa-3'

## 2-6. イメージング

倒立型電動顕微鏡 (IX81, Olympus) にレーザーの装備を付け加え、全反射照明蛍光顕微鏡を構築した [Fig.8(C)]. GFP の観察には 488 nm のレーザー (50 mW, Spectra-Physics) を用い、 $525 \pm 20$  nm の吸収フィルターを使用した。RFP の観察には 561 nm のレーザー (50 mW, Showa Optronics) を用い、 $609 \pm 27$  nm の吸収フィルターを使用した。対物レンズは、全反射照明蛍光顕微鏡専用の油浸の 100 倍レンズ (PlanApo, NA 1.49, Olympus) を使用し、 $-80$  °C に冷却した EM-CCD カメラ (ImagEM, Hamamatsu Photonics) で画像を取得した。画像解析には Image J (NIH) を用いた。

## 2-7. 飢餓条件と血清刺激

血清による刺激を与える前に、プローブの遺伝子を導入した NIH 3T3 細胞を、0.2%の CSを含むDMEMで24時間培養し、飢餓状態にした。培地を、MEMアミノ酸溶液 (Gibco), NEAA (Gibco), 2.5 g / l グルコース, 2 mM グルタミン, 1 mM ピルビン酸ナトリウム, 10 mM HEPES (pH 7.4) を含んだハanks平衡塩溶液 (HBSS, Gibco) に置換し、観察を行った。観察を行った細胞に CS を最終濃度 10%になるよう加え、一時間後に観察を行った。

## 2-8. 微小管標識マーカーの安定発現株

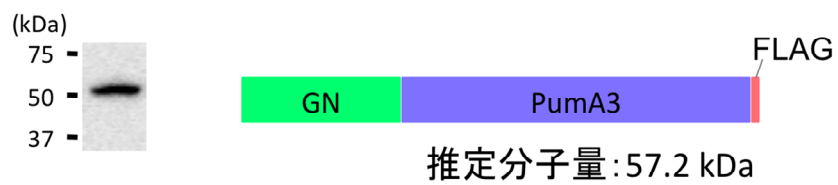
第 1 章 2-1-2 に記載した微小管標識マーカーのプラスミドを NIH 3T3 細胞に導入した48時間後、1 mg / ml の G418 を含む選択培地に細胞を移し、1 週間培養した。安定的に導入した遺伝子の発現をしている細胞のコロニーを選択し、継代培養した。

### 3. 結果と考察

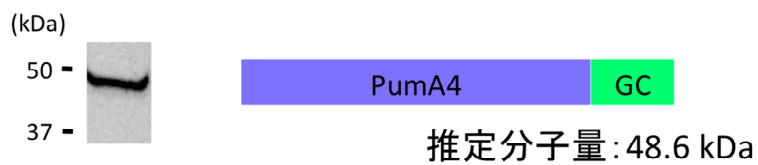
#### 3-1. 細胞内におけるプローブの発現

作製したプローブの遺伝子が細胞内で発現することを確認する実験を行った。COS-7 細胞にプローブ遺伝子を導入し、回収した細胞を SDS-PAGE 後、各抗体にてウェスタンブロットを行った。再構成型プローブ (N) のプラスミドを導入したサンプルでは 50 kDa 強の位置に特異的なバンドが検出された。再構成型プローブ (C) のプラスミドを導入したサンプルでは 50 kDa 弱の位置に特異的なバンドが検出された [Fig.22]。推定される各プローブの分子量は、再構成型プローブ (N) が約 57.2 kDa、再構成型プローブ (C) が約 48.6 kDa である。各プローブの推定分子量とウェスタンブロットで検出されたバンドのサイズが近似していることから、設計した各プローブが細胞内で発現していると判断した。

### 再構成型プローブ(N)



### 再構成型プローブ(C)



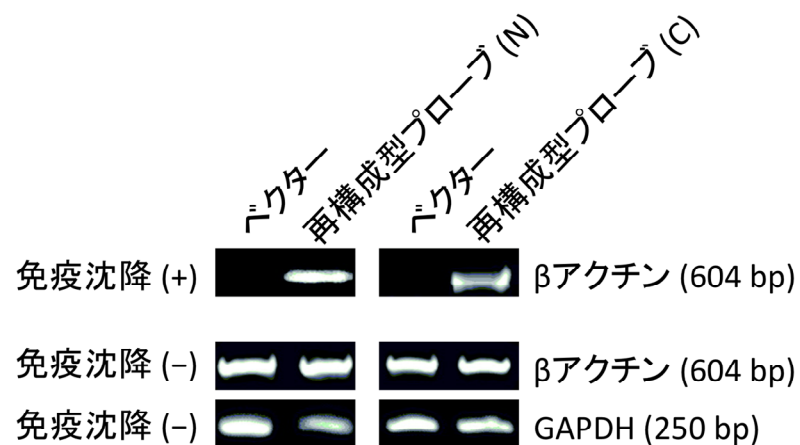
**Figure 22.** 細胞内における再構成型プローブの発現

再構成型プローブを導入した NIH 3T3 細胞に対し、ウェスタンブロット検出を行った結果（左）と、再構成型プローブの模式図と推定分子量（右）。再構成型プローブ（N）には抗 FLAG 抗体、再構成型プローブ（C）には抗 GFP 抗体を用いた。

### 3-2. 標的 mRNA に対するプローブの結合

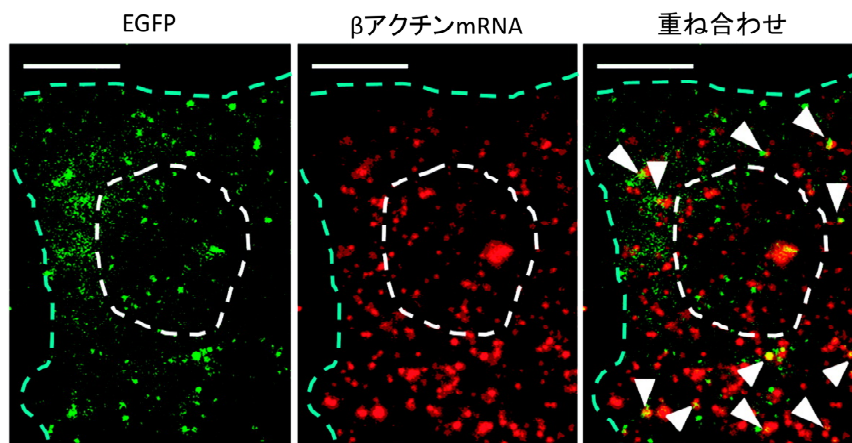
細胞内で発現した再構成型プローブが、標的 mRNA の  $\beta$  アクチン mRNA に結合することを検証するため、免疫沈降・逆転写 PCR を行った。再構成型プローブ (N) と再構成型プローブ (C) の遺伝子を導入した NIH 3T3 細胞から、それぞれ抗 FLAG 抗体と抗 GFP 抗体で RNA-タンパク質複合体を回収した。また、プローブの遺伝子を導入していない NIH 3T3 細胞に対しても、同様に免疫沈降を行った。それらのサンプルから RNA を抽出し、逆転写 PCR で  $\beta$  アクチンの増幅を行い、電気泳動を行ったところ、再構成型プローブ (N) と再構成型プローブ (C) の遺伝子を導入したサンプルでのみ特異的なバンドが検出された [Fig.23]。一方、免疫沈降を行わずに、全 RNA に対して  $\beta$  アクチンの増幅を行ったところ、プローブの発現の有無に関わらず、等量の  $\beta$  アクチン mRNA の存在が確認された。また、細胞内で恒常的に発現することが知られている GAPDH の増幅を行ったところ、プローブの発現の有無に関わらず、ほぼ等量の GAPDH mRNA の存在が確認された。これらの結果から、再構成型プローブ (N) と再構成型プローブ (C) が  $\beta$  アクチン mRNA 内の配列を認識して、結合することが解った。

次に、標的 mRNA である  $\beta$  アクチン mRNA に再構成型プローブ (N) と再構成型プローブ (C) が結合することで、EGFP の再構成が起ることを検証するため、再構成型プローブ (N) と再構成型プローブ (C) の遺伝子を導入した NIH 3T3 細胞を固定し、 $\beta$  アクチン mRNA に対するオリゴヌクレオチドプローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行った [Fig.24]。EGFP と  $\beta$  アクチン mRNA の細胞内局在を、全反射照明蛍光顕微鏡を用いて比較したところ、多くの EGFP の輝点が *in situ* ハイブリダイゼーションによって標識された  $\beta$  アクチン mRNA の輝点と共局在した。この結果から、再構成型プローブ (N) と再構成型プローブ (C) が  $\beta$  アクチン mRNA に結合して、EGFP の再構成が起き、蛍光シグナルが検出されることが明らかになった。



**Figure 23.** 免疫沈降・逆転写 PCR による再構成型プローブの  $\beta$  アクチン mRNA に対する結合性の解析

再構成型プローブの遺伝子を導入した NIH 3T3 細胞から、プローブと共に免疫沈降された mRNA を逆転写し、得られた cDNA を  $\beta$  アクチンのプライマーで PCR 増幅した (上段). 免疫沈降は、再構成型プローブ (N) の遺伝子を導入した細胞では抗 FLAG 抗体、再構成型プローブ (C) の遺伝子を導入した細胞では抗 GFP 抗体で行った. 免疫沈降を行わず、全 RNA の cDNA に対して、 $\beta$  アクチンのプライマーで PCR 増幅を行った (中段). 全 RNA の cDNA に対して、内部標準の GAPDH のプライマーで PCR 増幅を行った (下段). 右側の数値はバンドのサイズを示す.



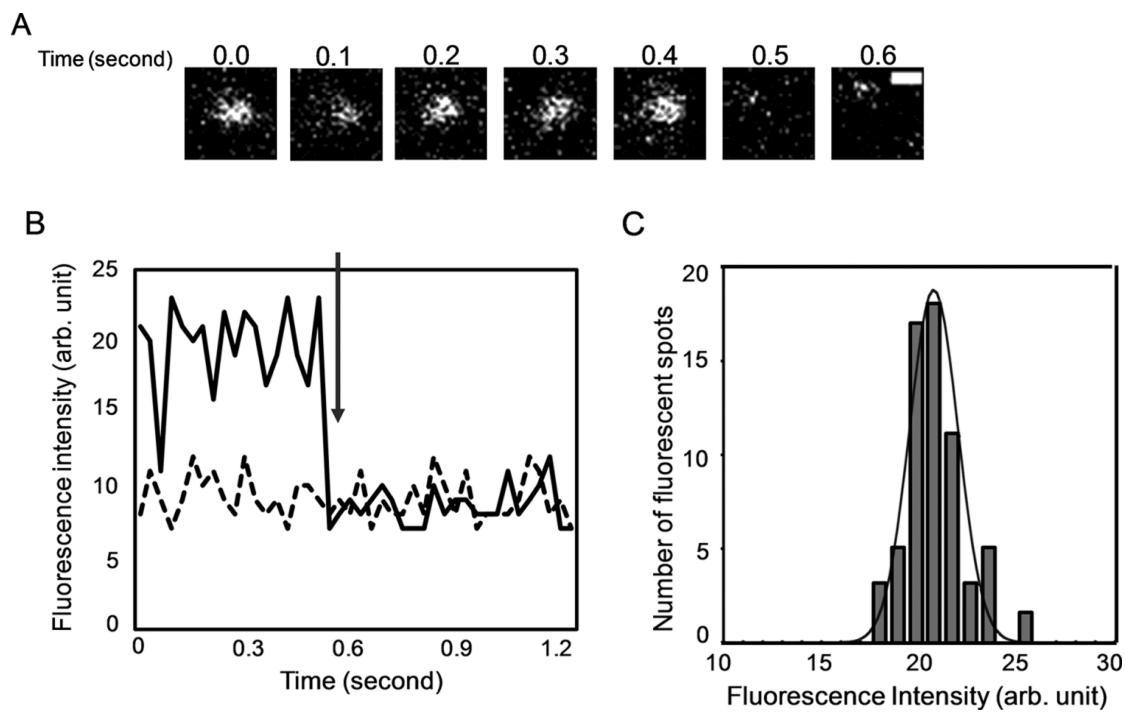
**Figure 24.** *in situ* ハイブリダイゼーションによって蛍光標識された  $\beta$  アクチン mRNA と細胞内で発現した再構成型プローブ

再構成型プローブの遺伝子を導入した NIH 3T3 細胞を固定し、 $\beta$  アクチン mRNA に相補的な配列のオリゴヌクレオチドプローブを結合させ、全反射照明蛍光顕微鏡で観察した。青色の破線:細胞の輪郭. 白い破線:核の輪郭. 再構成した EGFP によるプローブの輝点 (左) と、オリゴヌクレオチドによって標識された  $\beta$  アクチン mRNA (中央) の 2 つの画像を重ね合わせた (右). 矢頭はオリゴヌクレオチドプローブと再構成型プローブの共局在を示す。スケールバーは 8  $\mu\text{m}$ .



### 3-3. $\beta$ アクチン mRNA の一分子イメージング

全反射照明蛍光顕微鏡を用いて、細胞内で一分子の  $\beta$  アクチン mRNA が検出可能であるかどうかを検証した。再構成型プローブを発現した NIH 3T3 細胞を全反射照明顕微鏡で観察したところ、細胞内に存在する、ゆらぎを持ったプローブの蛍光シグナルの輝点が瞬時に消失する様子が観察された [Fig.25(A, B)]. また、細胞内で観察された各輝点の蛍光強度を測定し、蛍光強度を横軸に統計分布図を作製したところ、単峰型のガウス曲線と一致した [Fig.25(C)]. これらの結果から、全反射照明蛍光顕微鏡によって観察された蛍光シグナルの輝点は一分子の EGFP に由来することが解った。従って、作製した再構成型プローブは全反射照明蛍光顕微鏡を用いることで、一分子の  $\beta$  アクチン mRNA を可視化できることが証明された。



**Figure 25.  $\beta$  アクチン mRNA の一分子イメージング**

再構成型プローブの遺伝子を導入した NIH 3T3 細胞を, 全反射照明蛍光顕微鏡で観察した.

(A) 再構成型プローブの輝点のタイムラプス画像. スケールバーは 400 nm.

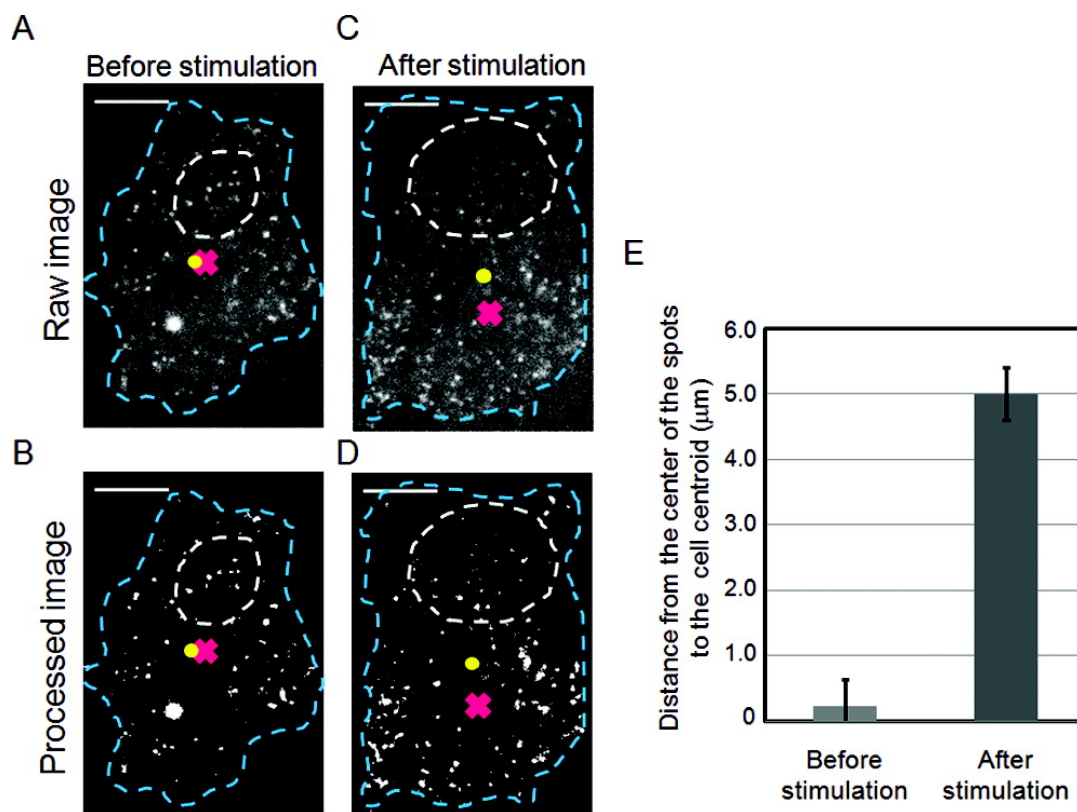
(B) (A)の輝点の蛍光強度の経時変化. 実線は輝点, 破線はバックグラウンドの蛍光強度.

矢印は蛍光シグナルが消失した時点を示す.

(C) 細胞内で観察された輝点の蛍光強度の統計分布図. (N=69)

### 3-4. $\beta$ アクチン mRNA の時・空間的局在変化

細胞内における  $\beta$  アクチン mRNA の時・空間的な動態を解析した。再構成型プローブの遺伝子を導入した NIH 3T3 細胞を、飢餓条件で 24 時間培養した。飢餓状態の細胞内のプローブを全反射蛍光顕微鏡で観察した [Fig.26(A)]. 細胞内における  $\beta$  アクチン mRNA の分布を調べるため、逆重畳積分によって取得画像を処理し、バックグラウンドのノイズを排除した [Fig.26(B)]. 細胞内で観察された全てのプローブの輝点の位置を計測し、それらの平均値が示す輝点の中心を計算した。また、細胞の中心座標も計算した。算出された輝点の中心は、細胞の中心とほぼ同じに位置した。これは、飢餓状態にある NIH 3T3 細胞内で、 $\beta$  アクチン mRNA が細胞全体に等しく分布することを示す。次に、同じ細胞に血清刺激を加え、一時間後に観察を行った。血清を加えたことにより、輝点の中心は、細胞の中心から細胞末端である仮足の方向に  $5.0 \pm 0.4 \mu\text{m}$  移動した [Fig.26(C, D, E)]. 血清刺激の前後のプローブの分布の比較から、 $\beta$  アクチン mRNA が血清刺激により方向性を持って移動したことが明らかになった。マウス繊維芽細胞での血清刺激による  $\beta$  アクチン mRNA の局在変化は過去に報告されており、またニワトリ胎児繊維芽細胞でも血清刺激による  $\beta$  アクチン mRNA の局在変化が観察されている (Hill et al., 1994, Tyagi & Alsmadi, 2004). このことから、再構成型プローブが一分子レベルで細胞内在性の  $\beta$  アクチン mRNA の時・空間的動態を可視化できることが証明された。



**Figure 26.** 血清刺激による  $\beta$  アクチン mRNA の時・空間的局在変化

再構成型プローブの遺伝子を導入した NIH 3T3 細胞を全反射照明蛍光顕微鏡で観察した。

(A) 0.2% FCS 下で 24 時間培養した NIH 3T3 細胞内の  $\beta$  アクチン mRNA の局在。黄色の点は細胞の中心、赤の十字はプローブの輝点の中心を示す。白の破線は核、青の破線は細胞の輪郭を表す。スケールバーは 8  $\mu\text{m}$ 。

(B) (A)の画像を逆重量積分によって加工した。

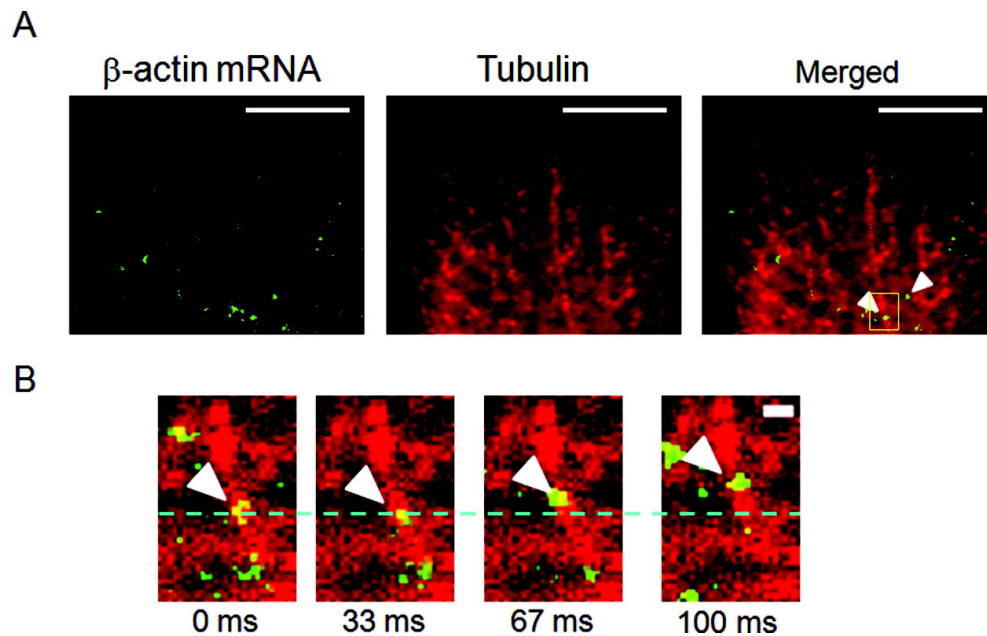
(C) (A)の細胞を最終濃度 10% FCS の培地で 1 時間培養した後の  $\beta$  アクチン mRNA の局在。

(D) (C)の画像を逆重量積分によって加工した。

(E) 血清刺激前後の細胞の中心から輝点の中心までの距離。(N=4)

### 3-5. 微小管上における $\beta$ アクチン mRNA の動態

COS-7 細胞で、 $\beta$  アクチン mRNA が微小管上を輸送されることは過去に報告されており、また本研究内でも全長型プローブを用いて同様の事実を確認した (Fusco et al., 2003)。このことから、NIH 3T3 細胞における微小管上の  $\beta$  アクチン mRNA 一分子の動態を解析した。微小管標識マーカー安定発現株に再構成型プローブの遺伝子を導入し、全反射照明蛍光顕微鏡で観察を行った。細胞質内の微小管の繊維状構造上にプローブの輝点を確認された [Fig.27(A)]。また、それらの輝点は細胞末端の仮足に向かって微小管上を移動した [Fig.27(B)]。輝点の移動速度は、約  $1.8 \mu\text{m} / \text{秒}$  であった。これらの結果は、再構成型プローブで、NIH 3T3 細胞中の  $\beta$  アクチン mRNA がモータータンパク質によって微小管上を輸送される様子を可視化することに成功したことを示す。微小管上を移動するモータータンパク質には、大きく分けてキネシンとダイニンがある。キネシンには、微小管のプラス端からマイナス端へ動く種類とマイナス端からプラス端へ動く種類とがある。ダイニンはプラス端からマイナス端へ移動する。NIH 3T3 細胞で観察された  $\beta$  アクチン mRNA が微小管上を細胞末端へと、マイナス端からプラス端へ移動したことから、 $\beta$  アクチン mRNA はキネシンによって輸送されると示唆される。



**Figure 27. 微小管上における  $\beta$  アクチン mRNA の動態**

微小管標識マーカー安定発現株の NIH 3T3 に再構成型プローブの遺伝子を導入し、全反射照明蛍光顕微鏡で観察を行った。

(A) 細胞質における再構成型プローブの局在。再構成型プローブ（左）の画像は、逆重量積分によって加工した。白の矢頭は、微小管上に局在する再構成型プローブを示す。スケールバーは 8  $\mu\text{m}$ 。

(B) (A)の黄色の枠で囲んだ領域の拡大像のタイムラプス画像。矢頭はそれぞれの時点での再構成型プローブの輝点の位置を示す。破線は、最初の画像での輝点の位置を示す。スケールバーは 800 nm。

#### 4. 結論

本研究では、蛍光タンパク質の再構成に基づく新規のプローブを作製した。再構成型プローブは全長型プローブと同様に、モレキュラービーコンによる RNA イメージング法の欠点であった侵襲性と、MS2 を利用したイメージング法の内在性 mRNA を検出できないという欠点を克服した。また、再構成型プローブは標的 mRNA に結合して初めて蛍光を示すため、標的 mRNA に結合していないフリーのプローブに由来するバックグラウンドシグナルが抑えられ、全反射蛍光顕微鏡を用いた一分子の蛍光タンパク質による一分子の mRNA の検出が可能である。血清刺激による  $\beta$  アクチン mRNA の細胞末端への局在変化や、微小管上を細胞末端へと輸送される  $\beta$  アクチンの動態は、過去に報告された  $\beta$  アクチン mRNA の性質と一致する。以上のことより、開発した再構成型プローブが、細胞内在性の標的 mRNA を本来の局在や動態を阻害せずに可視化できることを明らかにした。

## 5. 参考文献

- Fusco D, Accornero N, Lavoie B, Shenoy SM, Blanchard JM, Singer RH, Bertrand E. *Curr Biol.* 2003 Jan 21;13(2):161-7. Single mRNA molecules demonstrate probabilistic movement in living mammalian cells.
- Ghosh I, Hamilton AD, Regan L. *J Am Chem Soc.* 2000;122(23):5658-59. Antiparallel Leucine Zipper-Directed Protein Reassembly: Application to the Green Fluorescent Protein.
- Hill MA, Schedlich L, Gunning P. *J Cell Biol.* 1994 Sep;126(5):1221-9. Serum-induced signal transduction determines the peripheral location of beta-actin mRNA within the cell.
- Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK. *Mol Cell.* 2002 Apr;9(4):789-98. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation.
- Ozawa T, Nogami S, Sato M, Ohya Y, Umezawa Y. *Anal Chem.* 2000 Nov 1;72(21):5151-7. A fluorescent indicator for detecting protein-protein interactions in vivo based on protein splicing.
- Ozawa T, Sako Y, Sato M, Kitamura T, Umezawa Y. *Nat Biotechnol.* 2003 Mar;21(3):287-93. A genetic approach to identifying mitochondrial proteins.
- Ozawa T, Natori Y, Sato M, Umezawa Y. *Nat Methods.* 2007 May;4(5):413-9. Imaging dynamics of endogenous mitochondrial RNA in single living cells.
- Rose RH, Briddon SJ, Holliday ND. *Br J Pharmacol.* 2010 Feb;159(4):738-50. Review. Bimolecular fluorescence complementation: lighting up seven transmembrane domain receptor signalling networks.
- Tilsner J, Linnik O, Christensen NM, Bell K, Roberts IM, Lacomme C, Oparka KJ. *Plant J.* 2009 Feb;57(4):758-70. Live-cell imaging of viral RNA genomes using a Pumilio-based reporter.



Tyagi S, Alsmadi O. Biophys J. 2004 Dec;87(6):4153-62. Imaging native beta-actin mRNA in motile fibroblasts.



## 第 3 章 結論



## 1. 新規プローブによる標的 mRNA の検出

本研究では、内在性 mRNA のライブ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の 2 種類を開発し、それらのプローブを用いて標的 mRNA が検出できることを実証した。まず、細胞内の  $\beta$  アクチン mRNA に結合するようにそれぞれのプローブを設計し、免疫沈降・逆転写 PCR や *in situ* ハイブリダイゼーションといった生化学的手法を用いた評価を行った。免疫沈降・逆転写 PCR では、プローブの遺伝子を導入した細胞から、抗 GFP 抗体もしくは抗 FLAG 抗体でプローブと mRNA の複合体を免疫沈降し、プローブに結合した mRNA に  $\beta$  アクチン mRNA が存在することを証明した。また、*in situ* ハイブリダイゼーションでは、固定した細胞内で、 $\beta$  アクチン mRNA の配列に相補的なオリゴヌクレオチドプローブと、作製したプローブが共局在することを確認した。これらの結果は、開発した全長型プローブと再構成型プローブが、細胞内で内在性の  $\beta$  アクチン mRNA に結合することを示唆している。全長型プローブと再構成型プローブのいずれのプローブも、プローブ内の 2 つの変異型 HsPUM1-HD によって標的 mRNA 内の 16 塩基を特異的に認識して、結合する。mRNA の塩基は 4 種類あるため、プローブの結合する配列が偶発的に存在する確立は  $4^{16}$ (約  $4.3 \times 10^9$ ) 分の一である。本研究内ではプローブの結合解離定数を求める実験を行っていないものの、過去の文献で、変異を加えた HsPUM1-HD の標的 mRNA 配列への選択性が高いことは明らかにされている (Cheong and Tanaka-Hall, 2006, Ozaawa et al., 2007)。特に、HsPUM1-HD の標的 mRNA の認識に重要とされている UGU 配列を保存して設計した変異型 HsPUM1-HD では、その結合解離定数は  $\sim 1.3 \pm 0.38$  nM である (Cheong and Tanaka-Hall, 2006)。また、野生型 HsPUM1-HD の標的 mRNA への結合解離定数が  $0.48 \pm 0.21$  nM であるのに対し、一部の変異型 HsPUM1-HD では、標的 mRNA への結合解離定数が  $0.051 \pm 0.004$  nM と、野生型以上の選択性を持つものも存在する。このような知見は、本研究のプローブに使用した変異型 HsPUM1-HD が  $\beta$  アクチン mRNA への高い選択特異性を持つことを示している。

一方、ライブイメージングによっても、作製した全長型プローブと再構成型プローブが標的 mRNA を検出することを検証した。全長型プローブのライブイメージングでは、COS-7 細胞の核周辺及び細胞末端でのプローブの局在が確認された。この局在は、マウス神経細胞やニワトリ胎児の繊維芽細胞で報告されている  $\beta$  アクチン mRNA の局在と一致する (Tiruchinapalli et al., 2003, Farina et al., 2003, Yamagishi et al., 2009)。再構成型プローブのライブイメージングでは、飢餓状態で培養した NIH 3T3 細胞の細胞内全体に分布したプローブが、血清刺激によって細胞末端の仮足の方向に局在を変化させる様子を捉えた。この局在変化は、過去に報告されたマウスやニワトリ胎児の繊維芽細胞内の  $\beta$  アクチン mRNA の血清刺激への応答と一致する (Hill et al., 1994, Tyagi & Alsmadi, 2004)。また、蛍光標識された微小管上を、約  $1.7 \mu\text{m} / \text{秒}$  の速度で移動する全長型プローブと約  $1.8 \mu\text{m} / \text{秒}$  の速度で移動する再構成型プローブが観察された。これらの速度は、微小管上を移動するモータータンパク質の速度とほぼ一致する (Courty et al., 2006, Hammond et al., 2009)。全長型プローブと再構成型プローブの局在や動態が先行研究で解明された  $\beta$  アクチン mRNA のそれらと一致することから、開発したプローブが標的 mRNA に結合し、内在性  $\beta$  アクチン mRNA のライブイメージングを可能にすることを証明した。更に、いずれのイメージングの結果も知見の  $\beta$  アクチン mRNA の局在や動態と同じであることから、作製したプローブが標的の内在性の  $\beta$  アクチン mRNA の局在や動態に影響を与えないことが示唆された。

## 2. 新規プローブの利点

本研究で作製したプローブは、EGFP によって標的 mRNA を検出する。蛍光タンパク質は、シグナルの検出に励起光を使用するので、サンプルの細胞に与えるダメージが少ない。開発したプローブは全てタンパク質で構成されるため、プローブの遺伝子をリポフェクシ

ョンによって低侵襲的に導入できる。プローブの低侵襲性は、生きた細胞内の正しい情報を得るために非常に重要である。既存の RNA イメージング法の一つであるモレキュラービーコンを用いた手法では、一つ一つの細胞に顕微注入法（マイクロインジェクション）を使い、プローブを導入する必要があるため、細胞に与える物理的損傷と、手間が欠点であった。本研究のプローブは、全長型プローブも再構成型プローブも遺伝子にコードされるため、一度に多くの細胞へリポフェクションで導入することが可能である。また、遺伝子にコードされるプローブであるため、安定的にプローブを発現する細胞株を作製でき、多くのサンプルを容易に準備することも可能である。

遺伝子にコードされるプローブといった点では、MS2-GFP を用いた RNA イメージング法も、本研究のプローブ同様に低侵襲性である。しかしながら、観察対象の mRNA が人為的に設計した外来性の mRNA という点が、MS2-GFP 法の最大の欠点である。DNA から転写された前駆体 mRNA は、スプライシングや修飾を受けることによって成熟 mRNA になる。これらの複雑な機構を排除して設計された外来性の mRNA が、本来の内在性 mRNA と同じ性質を示すとは限らない。本研究の全長型プローブ、及び再構成型プローブの長所は、内在性の mRNA を可視化できる点である。プローブ内の HsPUM1-HD に変異を導入して、容易に標的 mRNA の配列に合わせたプローブの設計ができる。このため、MS2-GFP を用いた手法では得られない、内在性 mRNA 本来の情報を取得できる。

MS2-GFP を用いた手法で一分子の mRNA を観察するには、24 個の MS2 結合領域を興味対象の mRNA 内に設計する必要がある (Fusco et al., 2003)。MS2-GFP は約 41.5 kDa のタンパク質である。それらが二量体を形成して、複数の MS2 結合領域を含む検出対象の mRNA に結合する。また、モレキュラービーコンを用いた手法でも、プローブが核内に移行するのを防ぐ為、核膜孔を通過できない大きなサイズのタンパク質などを付加する必要がある。mRNA の一分子解析において、サイズの大きなプローブによる標識では、mRNA の本来の動きや働きを妨げる可能性がある。本研究のプローブは、全長型プローブも再構

成型プローブも約 105.8 kDa である。また、一分子の mRNA に対して一分子のプローブが結合するように設計されている。全反射照明蛍光顕微鏡を用いたイメージングで、細胞中に観察された輝点が一段階消光を示したことから、開発したプローブが標的 mRNA を一分子レベルで検出できることを証明した。全長型プローブと再構成型プローブを用いた mRNA イメージング法は、一分子の mRNA を一分子の蛍光タンパク質で検出する初めての手法である。この手法を用いることによって、細胞内に存在する mRNA の個々の動きを観察でき、mRNA をバルクで取り扱ってきた研究で見過ごされてきた可能性のある、mRNA のマイナーな動態や現象、マイノリティの mRNA の詳細の解明に繋がることが期待される。また、MS2-GFP を用いた手法に比べて、一分子の mRNA を可視化するのに必要なプローブのサイズが小さいため、本来の mRNA の機能や動態を阻害する可能性が少ないと示唆される。

### 3. 全長型プローブと再構成型プローブの比較

本研究では、全長型プローブと再構成型プローブの二種類のプローブによる mRNA イメージング法を開発した。全長型プローブには、核移行シグナルペプチド配列を付加することで、標的 mRNA である  $\beta$  アクチン mRNA に結合していないフリーのプローブを細胞質内から排除するよう工夫した。しかし、過剰に発現したプローブが完全に核内へ隔離されず、バックグラウンドが高いという難点が生じた。一方、再構成型プローブは、標的 mRNA に結合して初めて蛍光を示すよう設計されている。このため、全長型プローブに比べて再構成型プローブの方がバックグラウンドのシグナルを抑えることができ、高いシグナル・ノイズ比での検出を可能にした。従って、細胞質内の mRNA の観察や、発現量が低いと期待される mRNA の検出には、全長型プローブよりも再構成型プローブが適すると判断される。



再構成型プローブにも欠点が存在する．再構成型プローブ (N) と再構成型プローブ (C) が標的 mRNA に結合し，二断片の EGFP が再構成した後，発色団が形成され，蛍光を示すまでに 30 分以上の時間経過が必要である (Hu et al., 2002, Kerppola, 2008, Rose et al., 2010)．また，再構成型プローブ (N) と再構成型プローブ (C) が標的 mRNA に結合しても EGFP の再構成が起きない可能性もある．一方，全長型プローブは始めから EGFP の高次構造が形成されているため，結合から蛍光を示すまでのタイムラグが生じない．このため，転写直後の前駆体 mRNA の観察や，前駆体 mRNA から成熟 mRNA への過程などの，早い段階の mRNA の観察には全長型プローブが適していると考えられる．

#### 4. 新規プローブの将来性

本研究のプローブは，標的 mRNA の配列に合わせて HsPUM1-HD のアミノ酸に数カ所の変異を加えるだけで，配列特異性を持つプローブを設計することができる．最近になって，RNA 塩基のシトシンを選択的に認識して結合するために必要な 3 アミノ酸が解明されたこともあり，プローブの設計の自由度が広がった (Filipovska et al., 2011)．また，HsPUM1-HD の 5 番目と 6 番目の繰り返し構造の間に HsPUM1-HD を組込むと，16 塩基の RNA に配列特異的に結合することが明らかにされた (Filipovska et al., 2011)．16 塩基認識型の変異型 HsPUM1-HD を本研究のプローブに応用すれば，32 塩基を認識する特異性の高いプローブの設計が可能になる．細胞内には，様々な種類の mRNA が存在する．mRNA の以外にもトランスファーRNA (tRNA) やリボソーム RNA (rRNA)，ミトコンドリア RNA (mtRNA)，またマイクロ RNA (miRNA) や低分子核内 RNA (snRNA) などの非翻訳 RNA (non-coding RNA) が存在することが知られている．これらの RNA の動態や機能は，未だ多くの謎に包まれている．mRNA のみでなく，非翻訳 RNA の謎を解き明かす為にも，本研究で開発したイメージング法が役立つことが期待される．

RNA は生命活動に不可欠な因子である。近年、DNA のメチル化などのエピジェネティクスが注目されるようになってきたが、mRNA もスプライシングや翻訳制御、局在、安定化など、転写後に様々な修飾を受けることで、翻訳されるタンパク質の多様性を生み出す。この機構には、タンパク質や非翻訳 RNA による制御が関わっていると考えられているが、その詳細は未だ解明できていない。生体内の mRNA がどういったタンパク質や非翻訳 RNA と作用して修飾を受けるかを理解する上では、RNA とタンパク質を同時に観察することが必要となる。例えば、興味対象の mRNA と作用すると考えられる候補タンパク質に、本研究のプローブと FRET を起こす蛍光タンパク質を融合させることで、mRNA とタンパク質の時・空間的解析が可能となる。もしくは、mRNA 内の配列と非翻訳 RNA の配列に、それぞれ再構成型プローブ (N) と再構成型プローブ (C) を設計することで、mRNA と非翻訳 RNA の相互作用を可視化することもできる。RNA のイメージング法の開発によって、今後大きな発展が期待される。

## 5. 参考文献

- Cheong CG, Hall TM. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Sep 12;103(37):13635-9. Engineering RNA sequence specificity of Pumilio repeats.
- Courty S, Luccardini C, Bellaiche Y, Cappello G, Dahan M. *Nano Lett*. 2006 Jul;6(7):1491-5. Tracking individual kinesin motors in living cells using single quantum-dot imaging.
- Farina KL, Huttelmaier S, Musunuru K, Darnell R, Singer RH. *J Cell Biol*. 2003 Jan 6;160(1):77-87. Two ZBP1 KH domains facilitate beta-actin mRNA localization, granule formation, and cytoskeletal attachment.
- Filipovska A, Razif MF, Nygard KK, Rackham O. *Nat Chem Biol*. 2011 May 15 ;7(7) :425-7. A universal code for RNA recognition by PUF proteins.
- Fusco D, Accornero N, Lavoie B, Shenoy SM, Blanchard JM, Singer RH, Bertrand E. *Curr Biol*. 2003 Jan 21;13(2):161-7. Single mRNA molecules demonstrate probabilistic movement in living mammalian cells.
- Hammond JW, Cai D, Blasius TL, Li Z, Jiang Y, Jih GT, Meyhofer E, Verhey KJ. *PLoS Biol*. 2009 Mar 31;7(3):e72. Mammalian Kinesin-3 motors are dimeric in vivo and move by processive motility upon release of autoinhibition.
- Hill MA, Schedlich L, Gunning P. *J Cell Biol*. 1994 Sep;126(5):1221-9. Serum-induced signal transduction determines the peripheral location of beta-actin mRNA within the cell.
- Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK. *Mol Cell*. 2002 Apr;9(4):789-98. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation.
- Kerppola TK. *Annu Rev Biophys*. 2008;37:465-87. Review. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells.
- Ozawa T, Natori Y, Sato M, Umezawa Y. *Nat Methods*. 2007 May;4(5):413-9. Imaging dynamics of endogenous mitochondrial RNA in single living cells.

Rose RH, Briddon SJ, Holliday ND. Br J Pharmacol. 2010 Feb;159(4):738-50. Review. Bimolecular fluorescence complementation: lighting up seven transmembrane domain receptor signalling networks.

Tiruchinapalli DM, Oleynikov Y, Kelic S, Shenoy SM, Hartley A, Stanton PK, Singer RH, Bassell GJ. J Neurosci. 2003 Apr 15;23(8):3251-61. Activity-dependent trafficking and dynamic localization of zipcode binding protein 1 and beta-actin mRNA in dendrites and spines of hippocampal neurons.

Tyagi S, Alsmadi O. Biophys J. 2004 Dec;87(6):4153-62. Imaging native beta-actin mRNA in motile fibroblasts.

Yamagishi M, Ishihama Y, Shirasaki Y, Kurama H, Funatsu T. Exp Cell Res. 2009 Apr 15;315(7):1142-7. Single-molecule imaging of beta-actin mRNAs in the cytoplasm of a living cell.