

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19870038  
 研究課題名（和文） 生きた細胞内における内在性 mRNA の定量による遺伝子発現機構の解明  
 研究課題名（英文） Study on gene expression by the quantification of endogenous mRNA in living cells  
 研究代表者  
 岡部 弘基（OKABE KOHKI）  
 東京大学・大学院薬学系研究科・助教  
 研究者番号 20455398

## 研究成果の概要：

近年、mRNA を標的にした遺伝子発現調節が精力的に研究されるなか、生細胞に内在する mRNA を検出することは、遺伝子発現機構の解明に必須の課題である。本研究では、生細胞内における特定の内在性 mRNA 発現量を計測することにより、その動態をリアルタイムに追跡する技術開発を目指した。内在性 mRNA の標識には蛍光性アンチセンスプローブを用い、蛍光顕微鏡により生きた単一細胞内のプローブを定量的に解析することで、標的 mRNA の濃度を算出した。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,370,000	0	1,370,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,720,000	405,000	3,125,000

研究分野：生物物理学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：イメージング・核酸・バイオテクノロジー

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝子発現機構の研究においては、遺伝子産物であるタンパク質に加え、情報伝達分子である RNA 分子も注目されている。しかし、RNA 研究は、そのほとんどを分子生物学的手法に頼っているのが現状であり、ダイナミックな RNA 動態の解明はほとんど未開の領域であった。その原因は、生きた細胞内において、

特定の RNA を可視化する有用な技術がないためである。これまでに開発された最も有用な可視化技術である、RNA 結合タンパク質を利用した mRNA の蛍光標識法は、mRNA の配列を改変する必要があり、細胞に内在するネイティブな mRNA を標的とすることは出来ない。このため、細胞本来の動態・機能の解明への応用には限界があった。特に、RNA の代謝が関与する現象（RNA 干渉、アンチセンス効果、

mRNA 分解)については、従来のいずれの技術でも応用することが出来なかった。このように、遺伝子発現の研究の発展には、RNA の機能を探索可能な内在性 mRNA の解析技術の確立が必須であった。

## 2. 研究の目的

生きた細胞内における内在性 mRNA の直接観察が可能となれば、遺伝子発現機構の理解に大きく貢献すると期待されていることから、本研究では内在性 mRNA の新規観察法の確立を試みた。

本人らの先行研究において、内在性 mRNA の標識法として、人工核酸 2'-O-methyl RNA を骨格としたアンチセンスオリゴプローブが生きた細胞内において標的 mRNA と選択的に結合することを示した。(図 1 参照) 本法による RNA の蛍光標識では、mRNA の配列や構造を改変する必要がない上に、プローブと標的 mRNA との結合解離が速く、RNA の機能を阻害しにくい長所を持つ。

本研究では、生きた哺乳類細胞に発現している内在性 mRNA の発現量の変動を正確に捉えるためには細胞内に発現している mRNA の個数や濃度の定量化が必須であると考え、アンチセンスオリゴ 2'-O-methyl RNA プローブを用いた mRNA 標識法を応用して、生きた細胞内に発現している内在性 mRNA の発現量を定量することを目的とした。

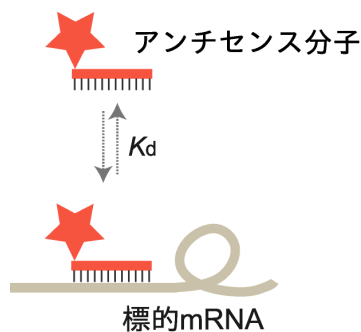


図 1 蛍光性アンチセンス分子を用いた mRNA の蛍光標識法。核酸分子間の相補的結合を利用して標的 RNA の配列や構造を改変することなく蛍光標識することができる。アンチセンスプローブの骨格には人工核酸である 2'-O-methyl RNA を用い、蛍光色素として Cy3 を選択した。

## 3. 研究の方法

標的 mRNA の定量にあたり、mRNA にハイブリダイズさせたアンチセンスプローブの蛍光から見積もることとした。しかし、細胞内に導入されたアンチセンスプローブは標的 mRNA 存在下において、RNA 結合型と非結合型の二つの状態を取っているため、プローブのシグナルは必ずしも mRNA 発現量と一致しない。そこで、これら二状態のプローブをそれぞれ個別に検出・定量することを目指した。そのための測定法として、蛍光相関分光法 (FCS) を採用した。FCS はごく小さい領域内に存在する蛍光分子の発する蛍光強度の揺らぎから、蛍光分子の濃度や分子の大きさを定量的に解析できる方法である。分子量の異なる二種の蛍光分子が混在する溶液中においても、両者の拡散速度が異なればそれぞれを分離して定量することが出来る。生きた細胞内において、アンチセンスプローブは標的 mRNA との結合により分子量が増大するため、拡散定数の違いから FCS によりそれら二状態を独立に定量することが可能であると考えた。実験の方法としては、アンチセンスプローブをマイクロインジェクション法により生きた COS7 細胞内に導入し、標的 mRNA とハイブリダイズさせた後に細胞質内において FCS 解析を行った。

## 4. 研究成果

まず蛍光相関分光法 (FCS) を用いて、生きた細胞内に導入したアンチセンスプローブの拡散速度について詳細な解析を行った。生きた COS-7 細胞に蛍光標識アンチセンスプローブをマイクロインジェクションにより導入し、細胞内に内在する *c-fos* mRNA とハイブリダイズさせた後に、細胞質において FCS 測定を行った (図 2a 参照)。FCS による解析の結果、アンチセンスプローブは細胞内において、異なる拡散時間を有する 2 成分として存在した。2 成分の由来は、mRNA との結合型及び解離型 (プローブ単独) であると考えられた。実際、mRNA と結合しないセンスプローブは同条件において、早い拡散時間の成分のみであったことから、アンチセンスプローブは標的 mRNA と結合していることや mRNA の結合により拡散速度が低下することが確認された (図 2b 参照)。

次に、種々の濃度のアンチセンスプローブを導入して同様の実験を行い、細胞内に導入したプローブの濃度に対する結合型濃度をプロットした。その結果、細胞内に導入するプローブ濃度が高濃度であるほど結合状態にあるプローブ濃度も上昇するが、その上昇はやがて一定値へと飽和する曲線となった。

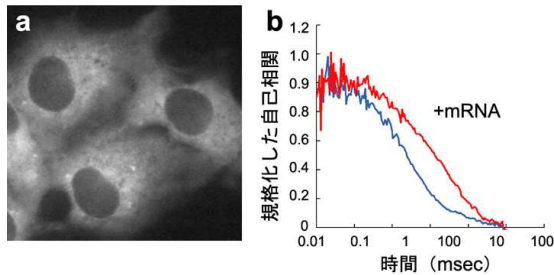


図 2 FCS を用いた生きた細胞内のアンチセンス分子の解析。a アンチセンスプローブを導入した COS7 細胞の蛍光像 b 細胞内のアンチセンスプローブを FCS により解析した結果。標的 mRNA と結合することのできるアンチセンスプローブ（赤線）は結合出来ないセンスプローブ（青線）より拡散が遅い。

これに対して二種の反応基質間の化学反応に関する平衡状態の式を用いてフィッティングすることにより、*c-fos* mRNA とアンチセンスプローブとの結合反応の解離乗数 ( $K_d$ ) を算出した。続いて、個々の細胞内におけるアンチセンスプローブと *c-fos* mRNA との結合型・解離型濃度の比と、上記に決定したアンチセンスプローブの結合解離定数 ( $K_d$ ) から、個々の COS-7 細胞に発現している *c-fos* mRNA の濃度を求めたところ、99.2 から 752 nM の範囲でばらついており、その平均は  $274 \text{ nM} \pm 123 \text{ nM}$  (178 細胞) であった (図 3 参照)。

さらに、開発したアンチセンス人工核酸を用いた内在性 mRNA の定量法の妥当性を評価した。FCS 解析では、蛍光分子のブラウン運動を解析するため、細胞内において完全に

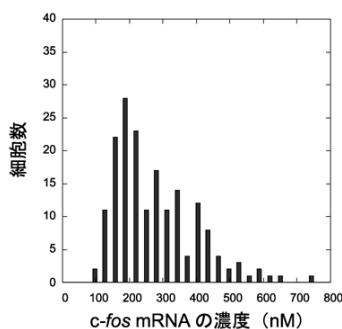


図 3 アンチセンスプローブを用いて定量した COS7 細胞内に発現している *c-fos* mRNA の濃度のヒストグラム。

停止した分子は解析対象とならないことや、観察領域が細胞と比べてごく小さいゆえに解析結果が細胞全体の性質を反映していないという可能性がある。そこで、mRNA の検出と定量に用いるアンチセンスプローブの

生細胞内における運動性に関する検討を蛍光褪色後回復法 (FRAP) により行うとともに、開発した方法を用いて生きた単一細胞内における内在性 mRNA のリアルタイムプロファイリングを行った。FRAP による検討の結果、アンチセンスプローブは生細胞内において自由に運動しており、標的 mRNA に関しても停止している成分は検出されなかった。このことは開発した mRNA 定量法が妥当であることを示している。

さらに、内在性 mRNA のリアルタイムな追跡として、これまで検出が困難であった初期遺伝子 *c-Fos* の早い応答のリアルタイムイメージングを試みた。COS7 細胞に蛍光アンチセンスプローブを導入し、薬物により標的遺伝子 *c-Fos* を誘導したところ、細胞質において内在性 *c-fos* mRNA の発現誘導を追跡することに成功した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 4 件)

岡部 弘基、「Real Time Monitoring and Quantification of Endogenous mRNA in Single Living Cells」、米国細胞生物学会 (ASCB) 第 48 回年会、2008 年 12 月 13 日、米国カリフォルニア州サンフランシスコ市

岡部 弘基、「生きた細胞内における内在性 mRNA の検出と定量」、第 60 回日本細胞生物学会大会、2008 年 6 月 29 日、神奈川県横浜市

岡部 弘基、「Real time quantitation of an endogenous mRNA in single living cells」、第 52 回米国生物物理学会年会、第 16 回国際生物物理学会大会 (合同開催)、2008 年 2 月 3 日、米国カリフォルニア州ロングビーチ市

岡部 弘基、「生きた単一細胞における内在性 mRNA のリアルタイム定量」、日本生物物理学会第 45 回年会、2007 年 12 月 22 日、神奈川県横浜市

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡部 弘基 (OKABE KOHKI)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：20455398

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし