

平成23年3月2日現在

機関番号： 82401
 研究種目： 若手研究(B)
 研究期間： 2009～2010
 課題番号： 21750182
 研究課題名(和文)
 生細胞内RNAの効率的時空間解析のための励起子制御型汎用的タグシステム
 研究課題名(英文)
 Tag system with exciton controlled fluorescent probes for spatio-temporal analysis of live cell RNAs
 研究代表者
 久保田 健 (KUBOTA TAKESHI)
 独立行政法人理化学研究所・岡本独立主幹研究ユニット・基幹研究所研究員
 研究者番号： 40455340

研究成果の概要(和文)：

プローブと、それが特異的に認識するタグを組み合わせることで、生きた細胞内の mRNA の局在を効率的に画像化する技術の開発を目指した。ここで用いたプローブとは蛍光性物質を結合させた 20 塩基程度の核酸である。タグとはプローブの相補配列であり、ターゲットとなる mRNA に組み込んだ。プローブは培養した細胞に直接注入し、タグを付加された mRNA はベクターを利用して細胞内で発現させた。このプローブ-タグペアを利用することで生細胞内の mRNA を顕微鏡下で画像化することに成功した。

研究成果の概要(英文)：

Probe-tag pair system was applied to develop a technique for visualizing live cell mRNA localization. The probe was a doubly fluorescent dye labeled oligonucleotide to have a fluorescent enhancement property in the presence of the complementary DNA/RNA strand. The tag structure was a complementary sequence to the probe, and it was inserted into a target mRNA strand. The fluorescent probe was microinjected into cells and the tag inserted mRNA was expressed in the same living cells. By using the probe-tag pair, target mRNAs in living cells were successfully visualized.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：蛍光イメージング、RNA、人工核酸、マイクロインジェクション、

1. 研究開始当初の背景

RNA 検出の代表的手法は二つあり、局在を示すならば固定した細胞/組織における *in situ hybridization* (ISH) であり、存在の有無を示すには RT-PCR である。両者は検出シグナルの増幅機構を備えているため感度が高いが、一方で時間的情報を得られないという重大な欠点がある。そのため特定の時間だけ存在するような RNA をうまく捉えることは難しい。発現のタイミングが限られている RNA は重要な機能を持つと期待できるが、そのような RNA を検出するには同一試料での長時間連続イメージングが最も有効である。

ISH やほとんど全ての RNA 検出法の基本は標識した核酸をプローブとして使用する。しかし RNA の高次構造が原因でうまくプローブと結合しないことがあるため、あらかじめ複数のプローブ配列を検討するなど試行錯誤が必要になる。つまり非常に不確実で手間がかかる手法である。また、別の RNA を検出する場合には同様の検討を繰り返すことになり効率が悪く限定的であるといえる。よって、生細胞内 RNA を時空間的に解析するには以下の2つの克服すべき課題が存在する。

- ① 検出の主流である ISH や RT-PCR では同一細胞からの時間情報を得られない。
 - ② ハイブリダイズ型プローブでのターゲット RNA 検出は不確実であると共に限定的である。
- これらの課題を克服すべく新たな技術の開発を目指した。

2. 研究の目的

本研究は特殊な塩基配列構造 (タグ) とそれを確実に認識する励起子制御型蛍光核酸プローブのペアを確立し、RNA の長時間・多色イメージングに適用することで、生細胞内 RNA の時空間解析を効率化する汎用的タグシステムを構築することが目的である。

3. 研究の方法

研究の第一段階としてまずプローブの改良を行う。励起子制御型蛍光核酸プローブは相補鎖を認識して蛍光増強を示す (ライトアップ効果)。しかし他のハイブリダイズ型プローブと同様に自己ダイマーを形成することでも光ってしまう。そのため自己相補的な配列を持たないプローブほど蛍光増強比が大きくなる傾向がある。顕微鏡イメージングの際の蛍光検出を容易にするため、この蛍光増強比が大きいプローブ配列を選び出す。

また、生細胞内で数時間程度に渡って連続して蛍光イメージングを行う予定であるため、プローブの分解を防ぐ必要がある。細胞内に備わっている核酸分解酵素に抵抗性を

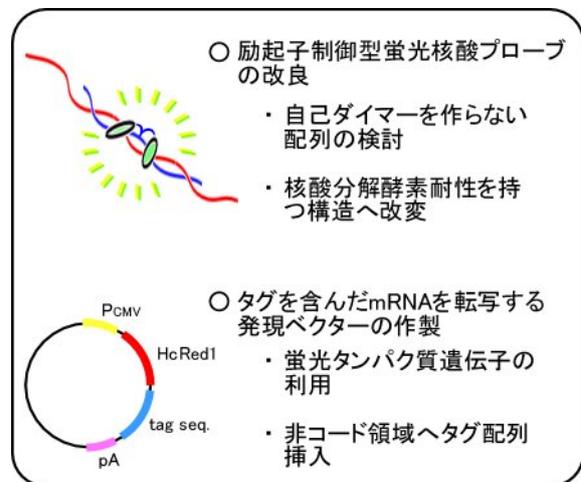
持たせるためにプローブの骨格を天然型から非天然型へ変更する検討を行う。

第二にタグ配列を含んだ mRNA を哺乳類細胞で発現させるためのプラスミドベクターを作製する。配列は既に作製したプローブに相補的とする。ターゲットには蛍光タンパク質の mRNA を選び、タグ配列を非コーディング領域に挿入する。これによりプローブとタグのペアを確立する。

第三段階として哺乳類培養細胞を用いた顕微鏡イメージングを行う。プローブと発現ベクターは同時に細胞に注入する。転写された mRNA にはタグ配列が挿入されており、プローブはその配列を認識して蛍光を示す。数時間の間連続観察することで mRNA の転写と局在の追跡、解析を行う。

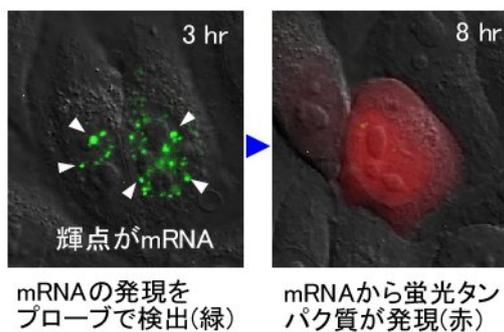
4. 研究成果

2009 年度はまずプローブの改良を行った。励起子制御型蛍光核酸プローブは相補配列とハイブリッドを組むことで数十倍の蛍光輝度上昇を示すことが既に報告されている。しかし従来型のプローブは天然の DNA 骨格で形成されているため細胞内で徐々に分解される。RNA の追跡を実現するためには長時間連続観察が必須である。そのためライトアッププローブの糖骨格を DNA から 2'-O-MeRNA に変更することで分解酵素耐性を付与した。これにより生細胞内で十数時間を超えて連続して蛍光観察ができるようになった。次にライトアップ効果の高いプローブ配列の検討を行った。本研究で使用するプローブは塩基配列によりライトアップ効果に差があるため、ライトアップ比 (プローブ単独での蛍光輝度に対するハイブリッド状態での蛍光輝度) の高い配列を複数検討した。結果ライトアップ比が 20 以上を示す配列を複数抽出した。さらにプローブの相補配列を含む細胞内発現用プラスミドベクターを作製した。ここで、mRNA の細胞内発現をイメージングで容易に確認できるよう蛍光タンパク質をコードした遺伝子を用い、相補配列を含む構造をタグとして非コード領域に組み込んだ。



2010年度はプローブと発現ベクターのペアを利用して生細胞内で転写される mRNA の蛍光検出を試みた。プローブとベクターのペアは同時に HeLa 細胞核にマイクロインジェクション法で注入した。しかしこの条件では細胞から mRNA の蛍光シグナルは得られなかった。mRNA 自身の高次構造や RNA 結合タンパク質によりプローブがタグ配列部分に近づけない可能性があると考え、タグ配列を 64 回つなげて挿入したベクターを改めて作製した。これにはプローブがタグ部分に近づく確率を高めると共にシグナルの増強を期待した。このベクターとプローブのペアを注入した細胞を 10 時間程度連続で観察したところ、初期の数時間の内に核から輝点状の蛍光シグナルが現れた。プローブのみを注入した場合、および転写阻害剤の存在下では輝点は現れないことから、mRNA を検出していると結論付けた。この輝点は核小体と、DAPI で強く染色されるクロマチンが凝集する部位を避けて存在した。また、緑色のプローブと赤色のプローブおよびそれらのペアとなるベクターを作製し同時に使用したところ、2 種類の mRNA を同時にかつ誤認識することなく検出できた。以上のように、プローブとタグのペアを利用することで mRNA を複数同時に感度良くイメージングする新たな手法を開発した。

○ 生細胞内 mRNA の蛍光イメージング



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)

[雑誌論文] (計 4 件)

① Kubota T, Ikeda S, Yanagisawa H, Yuki M, Okamoto A. Sets of RNA Repeated Tags and Hybridization-Sensitive Fluorescent Probes for Distinct Images of RNA in a Living Cell. PLoS ONE. 5: e13003(2010), 査読有り

② Ikeda S, Kubota T, Yuki M, Yanagisawa H, Tsuruma S, Okamoto A. Hybridization-sensitive fluorescent DNA probe with self-avoidance ability. Org Biomol Chem. 8: 546-551(2010), 査読有り

③ Kubota T, Ikeda S, Yanagisawa H, Yuki M, Okamoto A. Hybridization-Sensitive Fluorescent Probe for Long-Time Monitoring of Intracellular RNA. Bioconjugate Chem 20: 1256-1261(2009), 査読有り

④ Ikeda S, Kubota T, Yuki M, Okamoto A. Exciton-Controlled Hybridization-Sensitive Fluorescent Probes: New Approach to Multicolor Detection of Nucleic Acids. Angew Chem Int Ed 48: 6480-6484(2009), 査読有り

[学会発表] (計 9 件)

① 久保田健, 池田修司, 柳澤博幸, 結城瑞恵, 岡本晃充. タグ-プローブペアを利用した生細胞内 mRNA イメージング. 第 20 回アンチセンスシンポジウム, 2010.12.2-3, 神戸

② 久保田健, 池田修司, 柳澤博幸, 結城瑞恵, 岡本晃充. Hybridization dependent detection of transcribed tagged mRNAs in a living cell. 第 48 回日本生物物理学会年会, 2010.9.20-22, 仙台

③ 久保田健, 池田修司, 柳澤博幸, 結城瑞恵, 岡本晃充. 「プローブ-タグ」ペアを利用した生細胞内 mRNA 発現イメージング. 第 19 回日本バイオイメージング学会年会, 2010.9.9-11, 横浜

④ 久保田健, 池田修司, 柳澤博幸, 結城瑞恵, 岡本晃充. エキシトンプローブを用いた mRNA イメージング. 第 12 回日本 RNA 学会年会, 2010.7.27-29, 東京

⑤ 久保田健, 池田修司, 柳澤博幸, 結城瑞恵, 岡本晃充. 細胞内 mRNA の長時間観察を可能にする蛍光核酸プローブ. 第 47 回日本生物物理学会年会, 2009.10.30-11.1, 徳島

⑥ 久保田健, 池田修司, 柳澤博幸, 結城瑞恵, 岡本晃充. ハイブリダイゼーション依存蛍光核酸プローブによる mRNA のライブセルイメージング. 第 24 回生体機能関連化学シンポジウム, 2009.9.13-15, 福岡

⑦ 久保田健, 池田修司, 柳澤博幸, 結城瑞恵, 岡本晃充. ON-OFF 蛍光オリゴ核酸プローブによる mRNA の長時間連続イメージング. 第 18 回日本バイオイメージング学会 学術集会, 2009.9.3-5, 広島

⑧ 久保田健, 池田修司, 柳澤博幸, 結城瑞恵, 岡本晃充. 核酸検出のための On-Off 蛍光プローブとその応用. がん特定領域 若手ワークショップ, 2009.9.2-5, 蓼科

⑨ 久保田健, 池田修司, 柳澤博幸, 結城瑞恵, 岡本晃充. 蛍光オリゴ核酸プローブの開発と生細胞 RNA イメージング. 第 11 回日本 RNA 学会年会, 2009.7.27-29, 新潟

〔図書〕(計 2 件)

①久保田健, 岡本晃充, 日本組織細胞化学会,
RNA の細胞内局在化の蛍光イメージング
法, 組織細胞化学 2010, (2010), 111-121

②久保田健, 池田修司, 岡本晃充, 日本生物
物理学会, 光化学的に設計された新規蛍光
核酸による DNA/RNA イメージング, 生物
物理, 49, (2009), 310-313

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.riken.jp/lab-www/okamotoiru/
indexj.htm](http://www.riken.jp/lab-www/okamotoiru/indexj.htm)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保田 健 (KUBOTA TAKESHI)

独立行政法人理化学研究所・岡本独立主幹研
究ユニット・基幹研究所研究員

40455340

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし