

科学研究費補助金研究成果報告書

平成24年 5月28日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770162

研究課題名(和文) 生細胞内のmRNAと対応するタンパク質の同時定量による翻訳機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of translation regulation by quantification of mRNA and corresponding protein 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(和文)：本研究の目的は、内在性 mRNA やタンパク質を定量的にイメージングすることにより、細胞内における翻訳調節機構を解明することである。単一細胞内で GFP mRNA および GFP の同時定量を行ったところ、細胞ごとに翻訳の活性がばらついていることが分かった。さらにストレス時の細胞内において、内在性 mRNA のダイナミクスを検討した結果、ストレスを受けた細胞内では翻訳中の mRNA を選択的にストレス依存的な顆粒内に閉じ込めることで翻訳を抑制していることを発見した。

研究成果の概要(英文)：In this study, the translation regulation was investigated by the quantitative imaging of endogenous mRNA and protein in living cells. By quantifying GFP mRNA and its corresponding protein, GFP in the same cell, I observed a considerable cell-to-cell variation in translation activity. Furthermore, the mRNA dynamics analyzed in stressed cells indicated that the translation repression was maintained by harboring endogenous mRNA in stress-induced granules.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：バイオイメージング、mRNA、翻訳

1. 研究開始当初の背景

小分子 RNA の発見により mRNA を介した遺伝子発現調節に大きな注目が集まるなか、細胞質における翻訳調節機構の研究が精力的に進められている。mRNA レベルの発現調節の研究は、そのほとんどを分子生物学的手法により進められており、翻訳に関与する翻訳開始因子や伸長因子などの翻訳因子や、mRNA 結合タンパク質、RNA 切断酵素複合

体 (RISC) などのタンパク質が詳細に解析されている。一方、mRNA 分解や翻訳のダイナミックな動態の解明はほとんど未開の領域である。翻訳調節における mRNA の動態も未知であった。その原因は、生きた細胞内において、内在性 RNA を直接観察する技術が欠如していたせいである。

従来の RNA 蛍光標識法ではネイティブな mRNA を標的とすることは出来なかった

め、研究代表者は先行研究において蛍光性アンチセンス人工核酸 (2'-O-methyl RNA) 分子の相補的結合を用いた特定の内在性 mRNA の蛍光可視化技術を確立した。本法は生細胞内において標的の内在性と迅速に結合し、種々の制御を受ける mRNA のイメージング解析に応用することができる (図 a)。

2. 研究の目的

本研究では、転写後調節における mRNA の機能である翻訳に着目し、研究代表者がこれまでに開発した蛍光性線形アンチセンスプローブを用いた内在性 mRNA のイメージング、定量法を応用して翻訳調節における mRNA 動態のリアルタイム観察や生細胞内の mRNA・タンパク質同時定量による翻訳活性の評価により、翻訳制御のメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、まず生きた細胞内における標的 mRNA および、産物であるタンパク質の同時定量法を開発した。標的としては緑色蛍光タンパク質 (GFP) を選択する。アンチセンス 2'-O-methyl RNA プローブを用いて生細胞内の GFP mRNA 発現量を定量解析するとともに、GFP 発現量をも同時に定量し、単一細胞内において mRNA 一分子により翻訳されるタンパク質の分子数を算出した。このようにして構築した単一細胞内の翻訳の活性を測定する方法を用いて、翻訳制御時における mRNA の局在の変化と翻訳活性を同時に評価した。

さらに、翻訳調節が行われていると報告のあるストレス環境下における細胞内において、mRNA の動態を解明することにより mRNA を介した翻訳調節機構を検討した。方法としては、Cy3 標識アンチセンス 2'-O-methyl RNA プローブを用いて内在性 mRNA を可視化したうえで、ヒ素を用いて細胞にストレス負荷をかけ、リアルタイムイメージングにより mRNA の局在変化を観察した。また、ストレス環境下での mRNA の運動性と翻訳活性の関係を検討した。

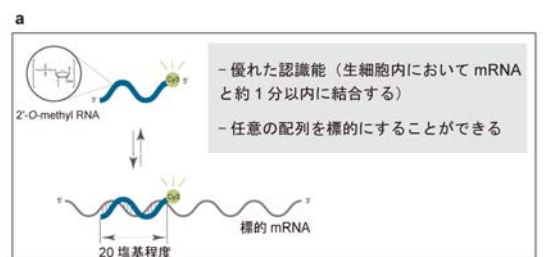
4. 研究成果

まず、蛍光顕微鏡を用いて GFP mRNA とその翻訳産物 GFP 各々の定量を行った。GFP mRNA に相補的な蛍光アンチセンスプローブを複数個設計し、一過的に GFP を発現させた生きた COS7 細胞内へ導入し標的 mRNA との結合を確認した。続いて、このプローブを種々濃度で生細胞内へ導入し、それぞれの細胞内におけるプローブと mRNA との結合比率を、蛍光相関分光法 (FCS) を用いて測定した。この結合型・解離型濃度の比と、プローブと mRNA の解離定数を用いて、個々の細胞

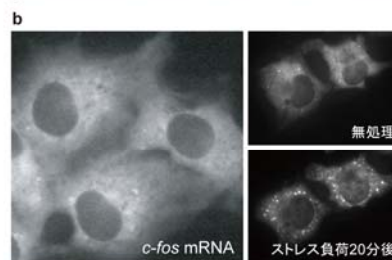
に発現している GFP mRNA の濃度を算出した。さらに、生細胞内 GFP の濃度を定量するために、FCS を用いて GFP 発現細胞内の GFP を定量的に解析した。GFP の発現量の多い細胞については FCS で正確な定量が行えなかったものの、細胞の蛍光強度と GFP 濃度の校正直線を作成することにより高発現の細胞内においても GFP 濃度を定量することが出来た。以上の検討により、単一細胞内において GFP mRNA 及びそれに対応する GFP の同時定量が可能となった。

次に、開発した単一細胞内 GFP mRNA および GFP の同時定量法を行って、mRNA と対応するタンパク質の同時定量を行った。まず COS7 細胞に GFP 遺伝子を導入し、GFP を安定に発現する細胞株をクローニングして GFP 発現 COS7 細胞を作製した。この細胞内において mRNA と GFP の同時定量を行い、個々の細胞で得られた GFP 濃度を GFP mRNA 濃度で除することにより、単一細胞内における mRNA 一分子により翻訳されるタンパク質の平均分子数を算出した。その結果、各細胞内の翻訳活性は細胞間で大きくばらついていることを発見した。

さらに翻訳制御が起きていると報告されているストレス時の細胞内において mRNA の動態 (局在や発現量) と翻訳活性の関連を検討した。ヒ素を用いて酸化ストレス負荷をかけた COS7 細胞において、アンチセンスプローブを用いて内在性 mRNA のタイムラプスイメージングを行い、内在性 mRNA がストレス顆粒 (stress granules, SG) へ局在する過



2'-O-methyl RNA 骨格を有する線形アンチセンスプローブによる mRNA の可視化



内在性 mRNA の蛍光イメージングとストレス負荷による局在変化

図. a 本研究で用いた蛍光性アンチセンス 2'-O-methyl RNA プローブによる内在性 mRNA の標識法. b アンチセンスプローブを用いて可視化した内在性 c-fos mRNA とストレス負荷による mRNA のストレス顆粒 (SG) への蓄積.

程を可視化した(図 b)。続いて、ストレス時に SG へ局在した内在性 mRNA ダイナミクスと翻訳活性の関連を調べるため、mRNA の運動性を蛍光褪色後回復法 (Fluorescence recovery after photobleaching, FRAP) を用いて検討した。その結果、SG 内において内在性 mRNA は抑留されている成分や SG との結合・解離の平衡状態にある成分が検出された。一方、SG に局在しているタンパク質は自由に拡散し、細胞質との間でシャトリングしていた。この結果はストレスを受けた細胞内では、翻訳中の mRNA を選択的に SG 内に閉じ込めることで翻訳を抑制していることを示唆している。

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 2 件)

①岡部弘基、原田慶恵、張ジュンウェイ、多田隈尚史、谷時雄、船津高志、” Real time monitoring of endogenous cytoplasmic mRNA using linear antisense 2'-O-methyl RNA probes in living cells.” NUCLEIC ACIDS RESEARCH、査読有、**39**、2011、e20.

②張ジュンウェイ、岡部弘基、谷時雄、船津高志、” Dynamic association-dissociation and harboring of endogenous mRNAs in stress granules.” JOURNAL OF CELL SCIENCE、査読有、**124**、2011、4087-4095.

[学会発表] (計 9 件)

①岡部弘基「蛍光相関分光法を用いた生細胞内の mRNA の解析」第 18 回バイオイメージング学会学術集会、2009 年 9 月 5 日、就実大学 (岡山市) (招待講演)

②岡部弘基「線形アンチセンスプローブを用いた生細胞の内在性 mRNA のリアルタイム追跡」、生物物理学会第 47 回年会、2009 年 10 月 30 日、アスティとくしま (徳島市)

③岡部弘基、”REAL TIME MONITORING OF ENDOGENOUS MESSENGER RNA USING LINEAR ANTISENSE PROBE”、Biophysical Society 54th Annual Meeting、2010 年 2 月 22 日、Moscone Convention Center (米国サンフランシスコ市)

④岡部弘基「生きた単一細胞内の内在性 mRNA のイメージングと定量」日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 30 日、岡山大学 (岡山市) (招待講演)

⑤岡部弘基「生細胞内における内在性 mRNA

のリアルタイムイメージング」第 12 回日本 RNA 学会年会、2010 年 7 月 27 日、一橋記念講堂 (千代田区)

⑥岡部弘基、”REAL TIME IMAGING OF ENDOGENOUS CYTOPLASMIC MRNA USING LINEAR ANTISENSE 2'-O-METHYL RNA PROBES IN LIVING CELLS” Biophysical Society 55th Annual Meeting、2011 年 3 月 9 日、Baltimore Convention Center (米国ボルティモア市)

⑦岡部弘基「Real Time Imaging of Endogenous mRNA in Stress Granule Using Antisense Probe」第 13 回日本 RNA 学会年会、2011 年 6 月 17 日、京都国際会館 (京都市)

⑧岡部弘基「線形アンチセンスプローブを用いた生細胞内の mRNA イメージング」、日本バイオイメージング学会第 20 回学術集会、2011 年 9 月 1 日、千歳科学技術大学 (千歳市)

⑨岡部弘基、”Real time imaging of endogenous mRNA using linear antisense probes in living cells”、17th International Biophysics Congress、2011 年 11 月 2 日、国家会議センター (中国北京市)

[図書] (計 1 件)

岡部 弘基、羊土社、実験医学、クローズアップ実験法、2011、Vol. 29、2161-2166.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

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