

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570207

研究課題名(和文) アンチセンスプローブを用いた生きた細胞の mRNA イメージング

研究課題名(英文) Imaging of mRNA in living cells using antisense probe

研究代表者

岡部 弘基 (Okabe, Kohki)

東京大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：20455398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000 円、(間接経費) 1,230,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、線形アンチセンスプローブを用いた mRNA のイメージングにより翻訳調節や分解の解析を目指した。まず、生細胞内でプローブが優れた結合カインेटクスを有することを発見し、ストレスを受けた際に内在性 mRNA が速やかにストレス顆粒へ局在化する過程を観察した。続いて、任意の mRNA に対するプローブ開発を行った。まず、mRNA の予測二次構造を参考にして設計したプローブに対し、細胞内拡散に着目して mRNA との結合を定量的に評価した結果、標的 mRNA と結合しうる複数のプローブを得た。さらに、プローブの結合率や解離定数を定量化し、内在性 GAPDH mRNA のイメージングと発現量の定量解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Imaging of endogenous mRNA in the cytoplasm of living cells promises a significant comprehension of post-transcriptional regulation. Fluorescently labeled linear antisense 2'-O-methyl RNA probe can provide a powerful tool in probing endogenous mRNA. Here, we investigated the feasibility of using antisense probes to monitor the dynamic behavior of endogenous cytoplasmic mRNAs. First, rapid hybridization of the probe was confirmed, enabling us to visualize the fast localization of mRNA to stress granules under cellular stress. Next, design of potent antisense probe for a given mRNA target was investigated. Referring to the predicted second structure of mRNA, we have designed and prepared antisense probe candidates. Quantitative analysis of the binding efficiency of these probe based on their intracellular mobility provided some competent antisense probes for GAPDH mRNA. Thus, our approach provides a basis for real time imaging of endogenous cytoplasmic mRNA in living cells.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：RNA イメージング 生細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、非翻訳小分子 RNA が発見され、タンパク質翻訳への重大かつ意義深い寄与が明らかにされた。細胞質において mRNA が分解や抑制による積極的な活性制御を受けているため、mRNA を介したタンパク質発現調節に関する研究は、これまで未知の遺伝子発現制御のメカニズムの解明だけでなく、ガンをはじめとする種々疾患の新規治療法の確立に至る広範かつ高い発展性を有している。

しかし、転写や核内での mRNA の運動性などの革新的な研究発展とは裏腹に、既存の mRNA 解析法を用いた細胞質における翻訳制御や mRNA 分解の研究報告はない。この理由は、既法である mRNA タグ化法では大量のタグ蛍光分子を mRNA に導入する必要があるため、内在性 mRNA が受ける重要な代謝機構が働かなくなってしまう等の問題があるからである。現状では、細胞質内において直接 mRNA が受ける翻訳制御や特異的分解による遺伝子発現調節機構を研究することは困難であった。

2. 研究の目的

これまでに、生細胞内において mRNA の構造や配列を改変せずに検出する方法の開発を目指して、mRNA と親和性の高い人工核酸アンチセンス分子による相補結合をプローブとして採用し、高感度イメージング技術を組み合わせることで、内在性 mRNA のイメージング法を開発した。本法は、内在性 mRNA を改変させずに捕捉することのできる唯一の技術であり、細胞質で mRNA が受ける分解や翻訳抑制等の活性制御の研究へと応用出来る潜在性を有する。しかし、本法を RNA 制御の探索へと応用するには、プローブの性能に関するキャラクタリゼーションや任意の標的 mRNA に対するプローブ開発における一般性の確立といった実用的な課題があった。そこで、本研究では、生細胞内におけるアンチセンスプローブの基礎特性や拡張性を検討し、RNA 研究の基盤技術として確立することを目的とした。さらに、本法の有用性を提示するため、細胞質において迅速に起きるダイナミックな mRNA の制御の観察へと応用することを第二の目的とした。

3. 研究の方法

(1) アンチセンスプローブの設計

プローブの設計にあたり、まず標的 mRNA の最適二次構造を予測した。標的 mRNA の配列のうち、翻訳コード配列 (CDS) 全長配列に対し、RNA 二次構造予測プログラム m-FOLD (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu/>) 等を用いて mRNA の最適予測構造を 10 個程度得た

上で、それらに共通するループ配列 (塩基対合していない配列) を抽出した。次に、このループを形成すると予測された配列に相補的なアンチセンスプローブを設計した。

(2) 細胞内におけるアンチセンスプローブのハイブリダイゼーションのカイネティクス

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細胞内に導入し、プローブと mRNA の結合を FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) や FCS (蛍光相関分光法) 等を用いた選択的検出法による定量的イメージングにより経時的に追跡した。得られたパラメータからプローブと mRNA との結合、解離の反応速度定数 (k_{on} や k_{off}) や解離定数 K_d を算出した。

(3) 細胞内の mRNA のイメージング

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細胞質内へと導入後、標的 mRNA 結合させるため、細胞を 10 - 15 分ほど放置した。蛍光像のイメージングには倒立型落射蛍光顕微鏡を用いた。プローブを標識している蛍光色素の波長に応じた波長のレーザーを用いて励起し、ダイクロイックミラーと吸収フィルターによって蛍光のみを集めた後、冷却 CCD もしくは EM-CCD カメラを用いて撮像した。実時間追跡の検討では、顕微鏡上で細胞を培養しながらタイムラプスイメージングを行った。

4. 研究成果

まず、アンチセンスプローブの細胞内における結合カイネティクスを検証した。プローブを生細胞内にマイクロインジェクション法により導入し、2 種プローブの mRNA との結合に伴う FRET を追跡することによりプローブと mRNA との結合、解離の結合速度定数や解離定数を算出した。この結果、アンチセンスプローブは細胞内において、およそ 1 分という短時間で結合することが分かった (図 1)。これはアンチセンスプローブを用いることにより、分オーダーで起こる mRNA の迅速な発現量、局在変化を追跡できる事を示している。

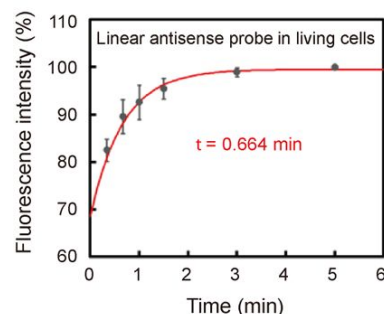


図 1. 細胞内でのアンチセンスプローブの結合

次に、検討したアンチセンスプローブの特性を活かし、迅速な mRNA 局在変化のモニタリングへと応用した。ストレス環境にある細胞において、翻訳中の mRNA がストレス顆粒 (SG) と呼ばれる細胞質の一時的な構造体に蓄積する現象を実時間でイメージング追跡した (図 2)。また、SG 形成と内における内在性 mRNA の振る舞いを詳しく解析するために、アンチセンスプローブを用いて可視化された内在性 mRNA (*c-fos* mRNA、poly(A)⁺ 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 (図 3)。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、すなわち SG は mRNA の翻訳抑制としての機能を有することを示唆している。

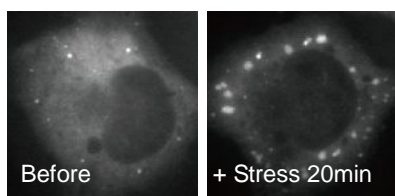


図 2. ストレス負荷による迅速な mRNA 局在変化

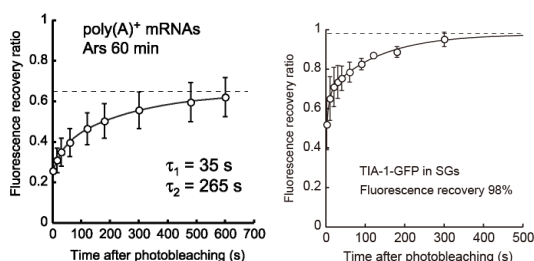


図 3. SG 内に局在する分子の運動性の検討 (左: 内在性 mRNA, 右: SG 局在タンパク質)

次に、本法の mRNA イメージング法として一般性を確立するため、任意の mRNA を標的としたプローブ開発を行った。まず、グリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) の mRNA を標的として、その予測二次構造を参考にしてプローブ配列の設計を行った。次いで、生細胞内におけるプローブ結合を定量的に評価するため、プローブが内在性 mRNA との結合により見かけ分子量が著しく増大して拡散が遅くなることに着目して、アンチセンスプローブの状態を高感度蛍光顕微鏡を用いた細胞内拡散の定量的解析法により詳細に解析した。蛍光褪色後回復法 (Fluorescence recovery after photobleaching, FRAP) 測定の結果、COS7 細

胞内において実際にプローブが標的 mRNA との結合により有意に拡散が遅くなることを発見した。そこで、GAPDH mRNA を標的とした候補プローブについて標的 mRNA との結合を定量的に評価したところ、プローブ配列により結合率は異なるものの、10 個程度のプローブが内在性 mRNA と結合している結果を得た。新たに得た GAPDH mRNA アンチセンスプローブのうち、親和性の高いプローブを用いて、内在性 GAPDH mRNA のイメージングやストレス依存的局在変化の可視化を行った。

さらに、プローブ拡散の変化に基づいた mRNA の選択的検出法を応用して、細胞内におけるアンチセンスプローブの結合率や解離定数 (K_d) を定量的に解析した。細胞内において高い定量性を発揮する蛍光相関分光法 (FCS) に着目し、FCS によるアンチセンスプローブの定量的解析を行った。FCS 測定により得られたアンチセンスプローブの自己相関関数を解析したところ、細胞内において、プローブは異なる拡散時間を有する二成分として存在した。一方、標的 RNA とは結合することのできないコントロールプローブを導入した細胞においては、ほとんどが拡散時間の早い成分として検出された。更に、mRNA とアンチセンスプローブとの結合反応の解離定数 (K_d) および個々の細胞内におけるアンチセンスプローブと mRNA との結合型・解離型濃度の比から、個々の COS7 細胞に発現している GAPDH mRNA の量を見積もった。

最後に、本法を siRNA により選択的 mRNA 分解を誘導した際の mRNA 発現量の実時間追跡へと応用し、RNA 分解の実時間解析に成功した。

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)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

J. Zhang, K. Okabe, T. Tani, T. Funatsu, "Dynamic association-dissociation and harboring of endogenous mRNAs in stress granules." *Journal of Cell Science*, **124**, 4087-4095 (2011). 査読有

K. Okabe, N. Inada, C. Gota, Y. Harada, T. Funatsu, S. Uchiyama, "Intracellular temperature mapping with a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy" *Nat. Commun.*, **3**, 705 (2012). 査読有

S. Murayama, B. Su, K. Okabe, A. Kishimura, M. Osada, M. Miura, T. Funatsu, K. Kataoka, *M. Kato, "NanoPARCEL: a method for controlling cellular behavior with external light." *Chem.*

Commun., 48, 8380-8382 (2012). 査読有

S. Uchiyama, K. Kimura, C. Gota, K. Okabe, K. Kawamoto, N. Inada, T. Yoshihara, S. Tobita, "Environment-sensitive fluorophores with benzothiadiazole and benzoselenadiazole structures as candidate components of a fluorescent polymeric thermometer" *Chemistry*, 18, 9552-9563 (2012). 査読有

〔学会発表〕(計 2 3 件)

岡部 弘基, "Analysis on Dynamics of Endogenous mRNA in a Living Cells Using Linear Antisense Probe" 6th Tokyo RNA Club (招待講演), 2011 年 6 月 30 日, 東京大学(文京区)

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)

岡部 弘基, "Real Time Imaging of Endogenous mRNA in Stress Granule Using Antisense Probe" 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)

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, 北京市(中国)

Junwei Zhang, 岡部 弘基, "Dynamic association/dissociation and harboring of endogenous mRNAs in stress granules" 17th International Biophysics Congress, 2011 年 11 月 2 日, 北京市(中国)

岡部 弘基, "Imaging of endogenous mRNA in stress granules using linear antisense probe" FASEB Science Research Conferences, 2012 年 06 月 26 日, Steamboat Springs, CO, USA

岡部 弘基, 「生細胞イメージングによる生命機能解明」第 21 回日本バイオイメージング学会学術集会(招待講演), 2012 年 08 月 27 日, 京都国際会館(京都市)

岡部 弘基, 「生細胞内マイクロ RNA の蛍光イメージング」第 21 回日本バイオイメージング学会学術集会, 2012 年 08 月 28 日, 京都国際会館(京都市)

岡部 弘基, "Imaging of temperature distribution in a living cell" 日本生物物理学会第 50 回年会(招待講演), 2012 年 09 月 22 日, 名古屋大学(名古屋市)

岡部 弘基, 「生きた細胞内の温度イメージング」第 85 回日本生化学会大会(招待講演), 2012 年 12 月 14 日, 福岡国際会議場(福岡市)

岡部 弘基, 「生きた細胞内の温度イメージング」分子化学研究所所長招聘研究会「2020 年の光分子科学を語る」(招待講演), 2013 年 01 月 23 日, 分子科学研究所(岡崎市)

岡部 弘基, 「定量的蛍光イメージングによる細胞機能解析」第 3 回 NMMS セミナー(招

待講演)2013 年 01 月 31 日東京大学(文京区) 岡部 弘基, "IMAGING OF TEMPERATURE DISTRIBUTION IN A LIVING CELL" Biophysical Society 57th Annual Meeting, 2013 年 02 月 04 日, Philadelphia, PA, USA

岡部 弘基, "Imaging of Temperature in a Living Cell" RSC Publishing-iCeMS Joint International Symposium Cell-Material Integration and Biomaterials Science(招待講演), 2013 年 03 月 19 日, 京都大学(京都市)

岡部 弘基, 「生細胞内の温度計測」第 90 回日本生理学会大会(招待講演), 2013 年 03 月 27 日, タワーホール船堀(江戸川区)

岡部 弘基, 「生細胞内の温度イメージング」第 17 回酸素ダイナミクス研究会(招待講演), 2013 年 08 月 03 日, 弘前大学(弘前市)

岡部 弘基, 内山聖一, 稲田のりこ, 原田慶恵, 船津高志, "Imaging of temperature in a living cell using a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy" 19th International Workshop on "Single Molecule Spectroscopy and Ultrasensitive Analysis in the Life Sciences" 2013 年 09 月 04 日~2013 年 09 月 06 日, Berlin, Germany

石河敏成, 岡部 弘基, 船津高志, 「生細胞内における microRNA のイメージング」日本バイオイメージング学会第 22 回学術集会, 2013 年 09 月 15 日~2013 年 09 月 16 日東京大学(文京区)

岡部 弘基, "Real-Time Monitoring of mRNA Decay in Living Cells" International Symposium on Nanomedicine Molecular Science 2013 (NMMS2013)(招待講演), 2013 年 10 月 08 日~2013 年 10 月 10 日, 東京大学(文京区)

菅原皓, 岡部 弘基, 坂本明彦, 船津高志「超解像イメージングにより明らかとなったストレス顆粒内 mRNA の詳細分布」日本生物物理学会第 51 回年会, 2013 年 10 月 28 日~2013 年 10 月 30 日, 京都国際会館(京都市)

②石河敏成, 岡部 弘基, 船津高志, 「生細胞内における microRNA のイメージング」日本生物物理学会第 51 回年会, 2013 年 10 月 28 日~2013 年 10 月 30 日, 京都国際会館(京都市)

②岡部 弘基, 原田慶恵, 船津高志, "Real-time monitoring of mRNA decay in living cells" Biophysical Society 58th Annual Meeting, 2014 年 02 月 15 日~2014 年 02 月 19 日, San Francisco, CA(米国)

③菅原皓, 岡部 弘基, 坂本明彦, 船津高志, "Super-resolution fluorescence imaging reveals nanoscale organization of stress granule", Biophysical Society 58th Annual Meeting, 2014 年 02 月 15 日~2014 年 02 月 19 日, San Francisco, CA(米国)

〔図書〕(計 3 件)

岡部 弘基, 『線形アンチセンスプローブを

用いた生細胞内の内在性 mRNA の蛍光イメージング』実験医学, Vol. 29, No.13 (8月号) 2011.

岡部弘基, 『観るだけでなく測る: 定量的イメージングによる細胞機能解析』バイオイメージング, Vol.22 No.1, p2-9, 2013.

岡部弘基, 『蛍光性ポリマー温度センサーを用いた生細胞内の温度測定とイメージング』実験医学, Vol.31 No.11 (7), p1799-1805, 2013.

〔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 : 2 0 4 5 5 3 9 8

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

船津 高志 (FUNATSU, TAKASHI)
東京大学大学院・薬学系研究科・教授
研究者番号 : 0 0 1 9 0 1 2 4