

京都大学	博士（医学）	氏名	八塚 研 治
論文題目	Live-cell imaging of multiple endogenous mRNAs permits the direct observation of RNA granule dynamics (内因性 mRNA の生細胞マルチイメージング法は RNA 顆粒動態の直接観察を可能にする)		
(論文内容の要旨)			
<p>細胞の形態形成、分化、シグナル応答のような様々な生命現象は、タンパク質発現の時間、場所、量などによって決定される。近年、ある種のタンパク質の発現が mRNA の時空間的な動態により制御されていることがわかってきた。細胞質内で翻訳制御を受けている mRNA の多くは、様々な RNA 結合タンパク質とともに巨大なリボ核タンパク質複合体を形成する。この膜を持たない複合体は RNA 顆粒と呼ばれ、RNA の保管や運搬、転写の抑制、不要な RNA の分解など、多くの役割を担っていると考えられているが、その全貌は未だ解明されていない。生細胞内での内在性 mRNA イメージング法は、この分野の発展に大きく貢献することができる。本研究では複数種類の RNA 顆粒を同時観察できるマルチカラーイメージング法の開発を試みた。</p> <p>イメージングには二つの低分子蛍光プローブ（BHQ1-Cy5、DNB-deSO₃DY520）と二種類の RNA アプタマー（BHQ1 アプタマー、DNB アプタマー）を用いた。このプローブは分子内に蛍光基と蛍光クエンチャーの両方を有しており、通常は消光状態となっている。しかし、in vitro selection 法により取得した二つの RNA アプタマーの存在下では、アプタマーがクエンチャーに結合することでその消光がキャンセルされ、蛍光が回復する。この RNA アプタマーは標的 mRNA 配列を認識したときのみ、クエンチャー結合構造を形成するようにデザインされている。つまり、RNA のアプタマーは標的 mRNA 存在下でのみ、プローブと結合し、蛍光を回復させることで標的 RNA を検出することができる。なお、これら二種類のプローブとアプタマーの組み合わせはそれぞれクロスレスポンスを起こさないことが確認されている。</p> <p>これら二つのプローブ及びアプタマーは固定した HeLa 細胞を用いた実験において、β-actin mRNA と cortactin (CTTN) mRNA の識別に成功した。両方のアプタマーで β-actin mRNA を認識した場合、二つの蛍光プローブ由来のシグナルは細胞内の同じ場所に局在し、二種のアプタマーでそれぞれ β-actin mRNA と CTTN mRNA を認識させた場合、二つのプローブ由来のシグナルは別々の場所で観察された。</p> <p>次に、生細胞において、二種類の mRNA の RNA ストレス顆粒(SGs)形成過程を観察した。SGs は細胞ストレスによって誘起され、周囲の RNA 顆粒や遊離 RNA を取り込んで形成されると考えられている。本方法を利用すれば、β-actin と CTTN のそれぞれの mRNA 顆粒がストレス条件下でどのような挙動を示すか観察できると考えた。実際、ストレス負荷前は別々に動いていた β-actin mRNA と CTTN mRNA の顆粒が、ストレスを負荷後は一つの顆粒を形成し、一緒に移動していく様子が観察された。この結果により、SGs がその形成過程において</p>			

周囲の RNA 顆粒と融合しあうことが直接的に確認できたといえる。

これまでに RNA 顆粒内のタンパク質の組成や蛍光物質の取り込みの様子から SGs 形成過程において様々な顆粒が融合していることは示唆されてきたが、内在性 RNA の挙動としてその様子を観察することはできなかった。本研究で開発された内在性 RNA の生細胞内イメージング法は、この SGs 形成のみならず、これまで観察が困難であった様々な RNA 動態を明らかにする研究において有用なツールとなり得る。

(論文審査の結果の要旨)

細胞質内で翻訳制御を受けている mRNA の多くは、様々な RNA 結合タンパク質とともに巨大なリボ核タンパク質複合体を形成する。この複合体は RNA 顆粒と呼ばれ、RNA の保管や運搬、転写の抑制、不要な RNA の分解など、多くの役割を担っていると考えられている。しかし、その全貌は未だ解明されていない。本学位論文では、複数種類の RNA 顆粒を同時観察できるマルチカラーイメージング法を開発している。

イメージングには二つの低分子蛍光プローブと二種類の RNA アプタマーを用いた。このプローブは分子内に蛍光基と蛍光クエンチャーの両方を有しており、通常は消光状態となっている。しかし、RNA アプタマーが標的 mRNA 配列に結合するとプローブの蛍光が回復し、標的 RNA を検出することができる。プローブのクエンチ及び蛍光回復の機構を理解することで、その検出感度の改善にも成功している。

これら二つのプローブ及びアプタマーは、固定細胞及び生細胞でのマルチカラー RNA イメージングに適用された。また、生細胞において、二種類の mRNA の RNA ストレス顆粒(SGs)形成過程を観察することにも成功している。本研究で開発された内在性 RNA の生細胞内イメージング法は、これまで観察が困難であった様々な RNA 動態を観察する有用な方法となり得る。

以上の研究は細胞内の RNA 顆粒の動態の解明に貢献し、遺伝子発現の基礎研究に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 31 年 2 月 28 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降