

氏 名	わき れいこ 脇 玲子
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 6 3 0 号
学位授与の日付	平成 24 年 3 月 26 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 ・ 専 攻	工芸科学研究科 生命物質科学専攻
学 位 論 文 題 目	Temporal and Spatial Analysis of RNA Expression in Living Cells Using RNA-specific Fluorescent Probes (RNA 特異的に検出する蛍光プローブを用いた生細胞における RNA 発現の時空間的解析)
審 査 委 員	(主査)教授 村上 章 教授 山口政光 教授 田嶋邦彦 准教授 小堀哲生

論文内容の要旨

本論文は 21 世紀になり急速に進展した生命科学の諸分野のうち、「RNA」科学に関する。FANTOM コンソーシアムの成果をはじめ様々な遺伝子解析の試みから、(1) ゲノム領域の約 70%以上から RNA へと転写されること、(2) その約 98%が蛋白質をコードしない RNA (non-coding RNA ; ncRNA) であること、(3) ncRNA が生命現象を司る物質であること、などが分かってきた。たとえば、遺伝子の発現と non-coding RNA とが密接に関わる緻密な RNA ネットワークシステムが構築されている可能性が論じられている。しかし、RNA の機能については未だ不明な点が多く、RNA の発現機構解析を行うことはすなわち、細胞機能の解明だけでなく、遺伝子疾患への新薬開発のために重要な役割を果たすことを意味する。

RNA は、細胞内で複雑な高次構造を形成しており、さらに蛋白質と複合体を形成している。このタンパク質・RNA 複合体 (RNP) は遺伝子発現に欠かせないことが分かってきている。本研究では RNA の機能を調査するためには、特定の場所 (核、細胞質、オルガネラなど) で構造を保ったままの状態、すなわち *in situ* 解析を行うことが不可欠と考察し、新規 RNA 機能解析法開発、具体的には RNA の発現プロファイリングを RNA ライブイメージング法によりリアルタイムに解析する手法の確立を目指している。

Chapter1 では、蛍光性ビスピレンプローブ (以下ピレンプローブ) を用いて、固定した細胞内の標的 mRNA の検出法を検討している。生細胞内 RNA のリアルタイム検出法確立の前段階として、固定細胞での RNA 検出法確立は必須である。細胞内には、RNA や DNA、蛋白質などが混在しており、かつ膜や小胞で仕切られた構造体が点在している。従って膜を考慮しなくてもよい、より操作の簡便な固定細胞を用いて、ピレンプローブの基礎的知見を得ることを試みている。対象がん細胞として子宮頸癌細胞を選択し、*c-fos* mRNA を標的 RNA としている。その結果、*c-fos* mRNA 検出用のプローブを固定細胞に添加した場合のみ、蛍光発光が観察された。得られた発光のスペクトル解析から、発光が RNA : ピレンプローブ複合体由来であることを証明し、固定細胞内の RNA 検出が可能であること示している。

Chapter 2 では、ピレンプローブを用いて、生細胞内の RNA 検出へ応用した内容を報告してい

る。ピレンプローブの生細胞への送達、ピレンプローブの構造改変（チオエート型結合の採用）により達成している。その結果、生細胞中の *c-fos* mRNA の検出に成功した。得られた発光が、ビスピレン由来の発光であることも確認し、生細胞内の RNA 検出が可能であることが示している。次に、血清や成長因子などによる外部刺激に応答して発現する *c-fos* mRNA のリアルタイム検出を試み、ピレンプローブを添加した系でのみ刺激時間に応じた蛍光発光現象が観察され、生細胞内の RNA の発現プロファイリングを細胞単位でリアルタイムに評価することに成功している。

Chapter 3 では Chapter 2 の成果を、さまざまな RNA に適用し、手法の普遍性を評価している。標的として、初期応答遺伝子からの転写産物群、*c-fos*、*c-jun*、*c-myc* mRNA を選択し、外部刺激に応じて、RNA に特異的な蛍光の検出ならびに蛍光強度の時間依存性を確認している。これらの結果は、それぞれの mRNA に対する他の解析手法（RT-PCR 法）で得られた結果と一致し、ピレンプローブを用いることで細胞内において発現するさまざまな mRNA のプロファイリングが可能であることが示されている。

以上の結果は、従来困難であった生細胞を用いた RNA のリアルタイムイメージングが達成されたことを示している。

論文審査の結果の要旨

最先端生命科学の課題の一つに、RNA の機能解析がある。1990 年代から次々に見いだされてきた多様な RNA の存在とその多様な機能が生命現象に深く関わっていることが報告されている。とりわけ、タンパク質をコードする mRNA の新たな機能や、タンパク質をコードしない非コード RNA (ncRNA) の機能等の解明が、癌などの重篤な疾患との関わりからの視点からも喫緊の課題になっている。これまで RNA の機能解明に用いる分子生物学的手法や生化学的手法は RNA を群として扱っており、個別の RNA が生細胞でリアルタイムにどのように存在し、機能を発揮しているかに関する研究手法の開発が遅れているのが現状である。本論文はこの観点に、蛍光核酸プローブを用いて切り込んでいる。具体的には、特定の RNA が、生細胞中で、いつ、どこで、どのように産生されて機能しているか、すなわち生細胞におけるトランスクリプトームを、プローブに起因する蛍光を顕微鏡下に検出することで解析する手法開発を試みている。

Chapter 1 では、RNA 選択的蛍光プローブによる固定細胞系での癌現遺伝子の検出を行っている。現在までに類似の報告は幾つかなされているが、本研究はそれらのいずれよりも優れた解析結果を示している。Chapter 2 では生細胞を対象とし、特定の RNA のリアルタイム検出に成功している。画期的な成果であると評価できる。Chapter 3 では RNA 発現のカスケード解析法開発をおこなっている。今後の RNA 研究に重要な意味を持つ手法であると考えられる。

以上のように本論文は生体で重要な働きをする RNA の選択的検出ならびに RNA ライブイメージング法に関する極めて重要な手法開発について論じている。その学術的意義は高く、また今後の RNA 研究の重要な手法として高く評価される。

本論文は審査を経た、いずれも申請者が筆頭著者である以下の 2 編の学術論文、

- [1] R. Waki, A. Yamayoshi, A. Kobori and A. Murakami. “Development of a system to sensitively and specifically visualize *c-fos* mRNA in living cells using bispyrene-modified RNA probes” **Chem. Commun.**, 2011, **47**, 4204-4206.

- [2] R. Waki, A. Yamayoshi, A. Kobori and A. Murakami. “Real-time Imaging of RNA Expression in Living Cells Using Bispyrene- modified RNA Probes”

Chem. Lett., 2011, **40**, 1247-1248.

および次の 3 編の参考論文を基に構成されている。

- [1] R. Waki,, T. Ueda, A. Yamayoshi, A. Kobori and A. Murakam. “Real-time monitoring of mRNAs with fluorescence-modified RNA probes in living cells”

Nucleic Acids Symp. Series, 2009, **53**, 153-154.

- [2] R. Waki,, T. Ueda, A. Yamayoshi, A. Kobori and A. Murakami. “Development of time-dependent transcriptome analysis system of mRNA expression using bispyrene-modified RNA probes in living cells”

Proc. of PACIFICHEM 2010,2010, **#208**, 1006.

- [3] R. Waki, A. Yamayoshi, A. Kobori and A. Murakami. “Tracing of cascade pathway for time-dependently expressed transcripts from immediate-early response genes in living cells using RNA profiling probes”

In preparation for ACS Chemical Biology