

博士論文概要

論文題目

Fluorescent Detection of Nucleic Acid Using Intelligent Oligonucleotide Probes
Toward Intracellular RNA Imaging

生細胞内 RNA イメージングを志向した
機能性核酸プローブを用いる核酸分子蛍光検出法の開発

申請者

Kazuhiro	Furukawa
古川	和寛

応用化学専攻	化学工学研究
--------	--------

2008 年 12 月

これまでの生命科学研究の主流は、PCR (Polymerase Chain Reaction) や、シーケンシングによる塩基配列取得などに代表される、試験管内 (*in vitro*) の研究が一般的であった。しかしながら、実際の生体内において「何が」「どこで」「どのように」働いているかといった生命現象の根本を理解するには、細胞内 (*in vivo*) における現象を解明する必要がある。一方、RNA (Ribonucleic acid) は、現在の生命科学研究の大きなターゲットとなっている生体分子である。触媒作用をもつ RNA 分子であるリボザイムや、二本鎖 RNA が同じ配列を有する mRNA を特異的に分解する現象である RNA 干渉 (RNA interference; RNAi) の発見により、RNA が生命の起源であるという RNA ワールド仮説までもが提唱されるようになった。また、ゲノム研究と転写産物の網羅的解析によって、タンパク質をコードしない ncRNA (non-coding RNA) が驚くほど多く転写されていることが明らかになった。これらのことから、生体内における RNA の機能解明は、生命科学研究において重要な課題となっている。しかしながら、近年の光学顕微鏡と蛍光化合物の技術的進歩に伴い検出感度や解像度が向上してきたにもかかわらず、細胞内における RNA 検出においては未だ確立された方法がないのが現状である。特に、生きた細胞内における RNA 検出については、既往の報告は皆無に等しい。

以上の点を踏まえ、本研究では、酵素または蛍光発生分子でラベル化したオリゴ核酸 (機能性核酸) を用い、細胞内における新規 RNA 蛍光検出技術を開発した。さらに、本法をヒト生細胞内での RNA の可視化へ応用した。

本論文は 7 章より構成されている。以下に各章の概要を述べる。

第 1 章では、細胞内における RNA 検出法、およびこれらの手法に使用される機能性核酸や蛍光色素等に関する既往の知見および問題点、さらに蛍光発生分子のメカニズムや既往の研究に関して有機化学的な観点から概説し、本研究の意義・目的を明らかにした。

第 2 章では、酵素や抗体を用いてシグナルを増幅する、高感度 FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) 法を細菌細胞に適用し、その問題点を明らかにした。細胞内における RNA には極めて発現量の低い RNA も存在するため、蛍光シグナルを増幅する必要がある。これまでに様々なシグナル増幅手法が開発されてきたが、いずれの手法も酵素や抗体などの高分子を細胞内に浸透させる必要がある。ところが、細菌細胞の細胞壁の性状は菌種によって大きく異なるため、シグナルを得るための細胞壁消化条件に差異が生じる。したがって、複合微生物系にこのような手法を適用する場合、目的とする細菌群を一括して検出できない可能性がある。そこで、細胞壁消化酵素の種類および濃度を変化させた場合における高感度 FISH の検出結果のばらつきについて検討を行った。様々な属に属する 8 菌種を対象とした。各細菌種の細胞壁を細胞壁消化酵素であるリゾチームおよびアクロモペプチダーゼで消化したのち、全真正細菌をターゲットとする EUB338 プローブを用いて FISH, DIG (Digoxigenin) -FISH, CARD (Catalyzed

and Reporter Deposition) -FISH を行った。得られた画像においてプローブ由来のシグナルを発している細胞をカウントし、検出可能な割合を算出した。その結果、菌種によるばらつきを抑え細菌を均一に検出するためには細胞壁を 10mg/ml のリゾチームで処理し、CARD-FISH 法で検出することが有効であり、この方法でも検出不可能な一部の細菌においては、アクロモペプチダーゼ処理が有効であることを明らかにした。以上の結果より、細菌種間における検出感度のばらつきを定量的に把握し、高感度 FISH 法の細菌細胞への適用における知見を得ることができた。しかしながら、依然として全ての菌種を一括の条件で検出することは困難であり、さらには細胞壁消化酵素による処理により細胞は損傷し、生細胞検出は不可能であるという問題点が残った。

第 3 章では、前述の問題点を解消するため、酵素などの高分子を用いることなくシグナルを増幅することが可能であり、なおかつ生きた状態の細胞を検出することが可能であると考えられる、標的核酸分子を鋳型とした有機化学反応による核酸の蛍光検出法を開発した。これまでに、標的上での消光基の脱離反応を利用した核酸検出法が報告されているが、水溶液中での加水分解によるバックグラウンド蛍光が非常に大きいのが問題であった。そこで本研究では、さらにシグナル／バックグラウンド比を高めて高感度化を図ることを目的として、標的核酸上での酸化還元反応を引き金として蛍光を発生するシステムを開発した。本システムでは、還元を引き金として蛍光を発するローダミン-アジド誘導体を結合した DNA プローブと、還元剤を結合した DNA プローブを合成し、これらが標的上で隣り合うことによって酸化還元反応を起こし、標的核酸を認識することが可能となる。ローダミン-アジド誘導体とは、ローダミンの片側のアミノ基をアジド基に変換した化合物であり、還元剤と反応することにより、アジドがアミンに還元され、共鳴構造が変化することにより吸収スペクトルが変化する。また、この反応によって還元前と比較して約 2000 倍の緑色蛍光を発した。次に、この蛍光分子を DNA プローブに連結し、還元剤（トリフェニルホスフィンおよびジチオスレイトール）を連結した DNA プローブと標的核酸上で反応させた。その結果、標的核酸上での 2 つのプローブの化学反応に由来する蛍光シグナルが観察された。一方、標的核酸が存在しない場合においてはほとんど蛍光を発さないことから、本蛍光発生システムは優れたシグナル／バックグラウンド比を持つことがわかった。

第 4 章では、第 3 章で述べた化合物と同様のメカニズムで赤色蛍光を発する、ナフソローダミン-アジド誘導体を合成した。ローダミン-アジド誘導体と同様に、この化合物は還元剤との反応で共鳴構造が変化することによって吸収スペクトルが変化する。還元前と比べて約 550 倍の赤色蛍光を発した。また、この化合物は、ローダミン-アジド誘導体と同様に、DNA プローブに連結することにより、標的核酸の検出に用いることが可能であった。このように、波長域の異なる 2 種

類の蛍光発生分子の合成に成功し、これらを用いることにより、細胞内における 2 種類の RNA 分子を同時に検出する可能性を示した。

第 5 章では、本システムが、細胞内で有効に機能するかどうかを検討するため、ホルムアルデヒド固定した大腸菌細胞内の rRNA の検出を試みた。プローブ配列の設計は、既往の研究を参考に、アクセシビリティの高い部位を選択した。実際に大腸菌細胞内にローダミン-アジド誘導体およびトリフェニルホスフィンを結合したプローブを導入したところ、完全相補鎖のプローブを用いた場合に強いシグナルが得られたのに対し、スクランブル配列のプローブについてはシグナルが得られなかったことから、本プローブは細胞内においても有効に働くことがわかった。

第 6 章では、第 3 章から第 5 章で述べた、還元を引き金とする蛍光発生メカニズムをさらに発展させるため、フルオレセイン-メチルアジド誘導体を合成した。さらに、これを用いてヒト生細胞内メッセンジャー RNA (mRNA) の検出を行った。フルオレセイン-メチルアジド誘導体とは、フルオレセインの水酸基をメチルアジド基で保護した化合物であり、アジド基の還元続く加水分解によってメチルアジド基が脱保護され、蛍光を発する。この化合物はローダミン-アジド誘導体と異なり、ホスフィン分子との結合によるアザイリドの形成がされないため、ターゲット核酸を触媒とした化学反応の回転が期待できる。実際に、試験管内での反応では、等温条件下 (37℃)・4 時間で約 50 回の化学反応の回転が見られ、これによって 50 倍の蛍光シグナルの増幅が観察された。このシグナル増幅は、細胞内において低発現量の RNA を検出する場合に、有効になると考えられた。実際に、ヒト白血病細胞 HL60 の 28S rRNA およびベータアクチン mRNA をターゲットとして、フルオレセイン-アジド誘導体およびトリフェニルホスフィンを結合したプローブを導入したところ、それらに対応するシグナルが、フローサイトメトリーおよび蛍光顕微鏡下で観察することが可能であった。本法は、酵素などの高分子を用いることなくシグナルを増幅することが可能であることから、生細胞内における低発現の RNA 検出において、有効な手段である。

第 7 章は本論文の総括である。

以上、本研究では、酵素または蛍光発生分子でラベルしたオリゴ核酸（機能性核酸）を用い、新規 RNA 蛍光検出技術を開発した。さらに、蛍光発生システムの改良により化学反応の回転を起こすことによって、生細胞内での低発現 RNA の可視化にも応用できることを明らかにした。以上のことから、本成果は、今後の RNA 研究およびバイオイメーjing技術に大いに寄与することが期待される。さらに、フローサイトメトリー・セルソーターと組み合わせることにより、生細胞の選別技術に応用することも可能であると考えられ、微生物学、分子生物学、再生医療学等、様々な分野への応用が期待される。