

氏名	うえだ たかこ 上田 貴子
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博甲第676号
学位授与の日付	平成25年9月25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	The development of pyrene-conjugated oligonucleotide probes for RNA analysis (RNA 発現解析のためのピレン修飾オリゴヌクレオチドプローブの開発)
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

ヒトゲノムプロジェクトの大きな成果の一つに、RNA の多機能性の発見がある。従来タンパク質の設計図と考えられていた RNA は、生命現象を司る中心的な分子であることが明らかになりつつある。RNA 干渉と呼ばれる現象や microRNA の発見、さらにタンパク質をコードしない non-codingRNA の機能に関する新しい知見は、21 世紀の遺伝子科学の方向を大きく変えた。microRNA は遺伝情報の発現制御や生命維持に不可欠必須の分子であり、発生、分化等の生命の根幹に関わる現象、また癌などの重篤な疾患発症などにも深く関与していることが明らかとなっている。今後 microRNA のみならず、他の RNA の機能の再検証、また RNA の新たな機能の解明等、様々な観点からの RNA 研究が加速されるものと思われる。しかしながら、それら研究を遂行するための「RNA を対象とした研究コンセプトとそれに基づく研究手法」の多くは 20 世紀に開発されたものであり、新たな RNA 研究のコンセプト、研究手法の提案が望まれている。

以上の背景に基づき、本研究では RNA 検出・解析（いわば RNA 診断）の基本的原理の確立を目指している。具体的にはピレンを蛍光発色団として持つ、RNA を特異的に検出することが可能な蛍光核酸プローブ（以下、ピレンプローブ）を用いて、(1)多細胞系であるショウジョウバエ初期胚中における mRNA の検出法、ならびに、(2)ヒト培養がん細胞株（HeLa 細胞）中における rRNA、miRNA、snRNA の発現量の定量的評価法の開発を行っている。さらにそれらを発展させて(3)細胞内において複数の標的 RNA を同時に検出することを目指した新規蛍光核酸プローブの開発を行っている。

Chapter 1 では、ショウジョウバエ初期胚を用い、ピレンプローブによる RNA の相対的発現量や発現位置の評価を試みている。初期胚から抽出した totalRNA 中に微量存在する特定の mRNA の検出を行ったところ、標的 mRNA 以外の RNA が多数含まれる溶液中においても、ピレンプローブが RNA に対する配列特異性を維持し、標的 mRNA を検出できること、その際の定量性は遺伝子バンクの情報に矛盾しないことを示している。ついで、固定化したショウジョウバエ初期胚上における標的 mRNA の検出を行い、Krüppel mRNA の発現位置である胚中央領域においてピレンエキシマ蛍光を観察している。多細胞系においても、標的 RNA を配列特異的に検出することが可能なプローブであること示している。以上の結果より、ピレンプローブは溶液中において蛍光強度の値から標的 RNA の定性ならびに半定量的検出に有効であること

を示している。同時に、ピレンプローブの RNA 検出限界及び検出条件については今後検討の余地があることを考察している。

Chapter 2 では、ピレンプローブを用いて HeLa 細胞一細胞あたりの RNA 発現量の定量的評価を行っている。相補鎖オリゴ RNA にピレンプローブを加えた溶液の蛍光強度から検量線を作成することで、抽出 RNA 溶液中の標的 RNA の発現量を蛍光強度から換算し、およそのコピー数を算出している。簡便に標的 RNA の発現量を見積もることができる本方法は、RNA を対象とした新たな医療診断法開発に繋がることを示唆している。

Chapter 3 では、細胞内において複数の標的 RNA を同時に検出できる蛍光プローブの開発を行っている。複数の標的 RNA を同一細胞で検出するには、標的ごとに異なる波長の蛍光を発する蛍光剤を必要とするが、励起波長は蛍光分子ごとに異なる。同じ励起波長で波長の異なる蛍光を発するプローブ系を用いれば、一波長による一度の励起で、異なる蛍光を同一視野内で観察することが可能である。そこで、蛍光共鳴エネルギー移動 (Förster resonance energy transfer : FRET) に着目し、同一波長の励起で異なる蛍光を発する新規プローブを、上述のピレンプローブを基に開発している。その結果、ピレンから蛍光剤 Cy3 あるいは Cy5 への FRET が観測され、異なる対象 RNA を青、黄、赤の蛍光発光により識別可能であることを示している。これらの結果は、本法を用いることで細胞内に存在する異なる標的 RNA を、同一波長励起により同一顕微鏡視野において検出できる可能性を示している。

論文審査の結果の要旨

1990 年代以降、RNA の多様な機能が生命現象の根幹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しない non-codingRNA や 22 塩基長程度の短鎖 RNA (microRNA) が、癌などの重篤な疾患と深く関わっていることが明らかにされ、それら RNA の選択的検出、時空間的解析、機能評価等に関する研究の重要性が論じられている。これまでの RNA 研究には分子生物学的手法や生化学的手法が採用されてきたが、これらは RNA を群として扱っており、個別の RNA が生細胞でどのように存在し、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といえる。また、同一細胞系での解析に加え、多細胞系での解析も RNA 診断の観点から求められているのが現状である。本申請論文は 21 世紀の遺伝子診断、とりわけ RNA を対象とした RNA 診断を遂行する上で不可欠な研究コンセプトを提示し、新たなプローブ開発を行っている。

Chapter 1 では、多細胞系検出対象としてショウジョウバエ初期胚を選び、分化の過程で位置特異的に発現する mRNA を、RNA 選択的蛍光プローブにより検出することに成功している。Chapter 2 では細胞一個あたりの RNA 発現量の定量に挑戦している。細胞が何コピーの RNA を発現しているかを定量的に評価することは実質的にまだ報告されていない。申請者は RNA 選択的ピレンプローブを用い、そのプローブの定量的 RNA 検出能を評価した上で、同プローブを細胞内 RNA コピー数評価に適用している。まだ、完全とはいえないが遺伝子データバンクの結果とは大きく矛盾しない結果を得ている。注目すべき成果であると評価でき今後の展開が期待される。Chapter 3 では顕微鏡の同一視野で複数種類の RNA の同時検出を試みている。RNA の識別には異なった蛍光剤を必要とするが、それぞれは異なった至適励起波長を有し、一波長励起ではなし得ない。申請者はピレンからの FRET 法を利用すべく新たな蛍光プローブを開発した。生細胞系でのイメージングに成功すれば今後の RNA 研究に重要な意味を持つものと考えられる。

以上のように本申請論文は生命現象の主役となった RNA の選択的ならびに定量的検出法を提案

し、さらに新たな RNA 検出プローブ開発の方向性を示している。その学術的意義は高く、今後の RNA 研究の重要な手法として活かされるものと思われる。

本論文は審査を経て掲載された以下の 2 編の学術論文（うち 1 編は申請者が筆頭著者である）並びに現在投稿準備中の論文に基づいて作成されている。

1. Ueda, T. Kobori, A. Yamayoshi, H. Yoshida, M. Yamaguchi, A. Murakami.

RNA-based diagnosis in a multicellular specimen by whole mount in situ hybridization using an RNA-specific probe. [doi:10.1016/j.bmc.2012.08.28]

Bioorganic & Medicinal Chemistry, 20, 6034–6039. (2012)

2. Kobori A., Ueda T., Sanada Y., Yamayoshi A., Murakami A..

Dual-fluorescent RNA probes with an extremely large Stokes shift.

Biosci. Biotechnol. Biochem., 77, 1117-1119. (2013) [doi:10.1271/bbb.1210018]

3. Ueda T., Yamayoshi A., Kobori A., Murakami A.

Quantitative analysis of RNA expression with RNA specific probes. *to be submitted.*