

細胞内情報伝達機構の1分子イメージング

「形とはたらき」領域 船津 高志

要 旨

生命現象は様々な生体分子の相互作用によって引き起こされている。1分子蛍光イメージング法を用いて、生きている細胞の内部で個々の分子の振る舞いを直接観察することにより、情報がどのように伝達され変換されるのかを明らかにできると期待されている。本研究では、その第一歩として、生きた細胞の核内で1分子の mRNA の運動を観察することにより、mRNA の核内輸送メカニズムを解析した。その結果、mRNA は核内構造物とダイナミックな結合・解離を繰り返しながらブラウン運動により転写部位から核膜孔まで移動していることが明らかになった。

1. 研究のねらい

ヒューマンゲノムの塩基配列が公表され、世間一般にまでゲノムという言葉・概念が広まってきた。周知のようにゲノムは、真核生物では核に DNA という形で蓄えられている。一方、細胞の一般的な活動を支えているのはタンパク質であり、その生産工場であるリボソームは細胞質に存在している。このため、DNA の遺伝情報を細胞質へと伝える mRNA の転写機構と核外輸送機構は、真核生物の遺伝子発現にとって非常に重要である。

しかし、mRNA のプロセッシングと輸送に関しては、よくわかっていないことが多い。例えば、mRNA は核内で転写された後、スプライシングなどの様々なプロセッシングを受けるが、このプロセッシングが、“いつどこで行われるのか?” (転写された場所でなのか、核内の特定のスプライシング工場でなのか、あるいは、転写されてすぐ行われるのか、そうでないのか?)については不明である。また、転写・プロセッシングされた mRNA がどのような機構で核膜孔まで移動しているのかについても不明である。細胞質に出た mRNAの中には bicoid、oskar や Vgl などのように、細胞質の一部分に局在することが知られているが、局在のメカニズムについても不明な点が多い。

このような細胞内の“場所”や“タイミング”に関する現象を解明するためには、細胞をすりつぶして行う従来の生化学的手法や、固定した細胞を用いて *in situ* hybridization により観察する手法では、多数の分子の平均を観察するため限界がある。我々は、生きた細

胞内の mRNA を研究するための第一歩として、蛍光標識した 1 分子の mRNA の核内運動を共焦点顕微鏡でリアルタイムに観察した。

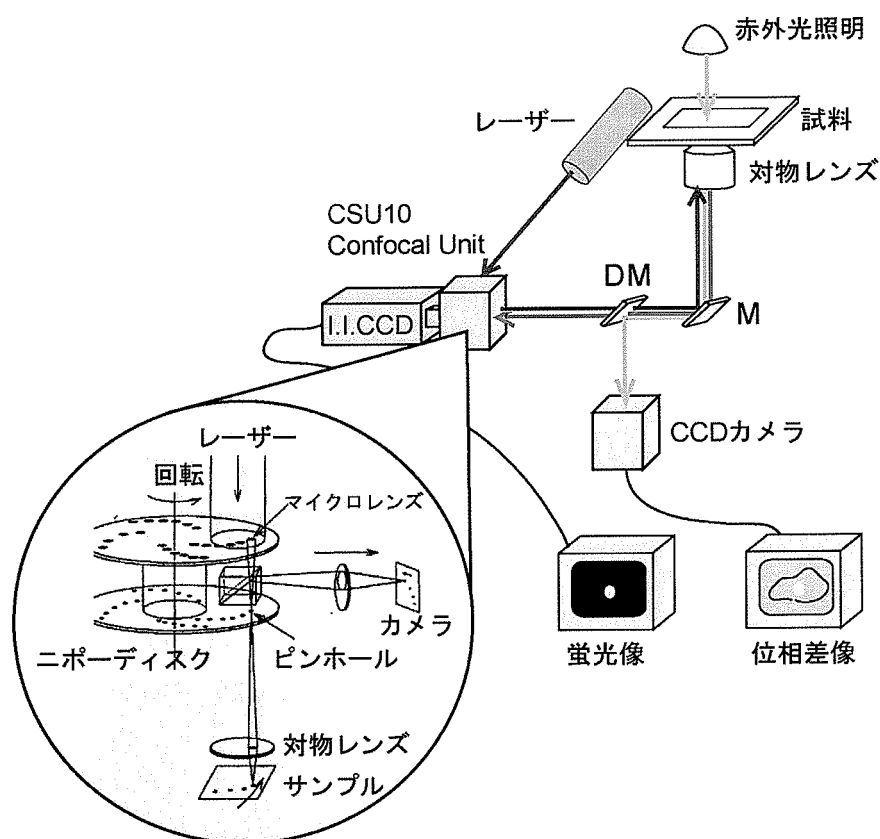
2. 研究方法と成果

2-1 mRNA の核内輸送の機構に関する従来の研究

mRNA は核で作られた後に細胞質へと輸送されるが、転写・プロセッシング部位から遊離した mRNA がどのような機構で核膜孔まで移動するかについて、従来 2 つの説が提唱されてきた。1 つはエネルギーを消費する能動的な輸送による“能動説”、他方はクロマチンの隙間を自由拡散によって移動する“拡散説”である。近年、蛍光標識した mRNA の核内の運動を、蛍光相関分光法 (fluorescence correlation spectroscopy) や蛍光退色回復法 (fluorescence recovery after photobleaching) を用いて解析した結果、拡散説が有力となっているが、一時的な能動輸送や、核内構造物との結合・解離がないのだろうか? といった疑問が残る。そこで、我々は 1 個の mRNA を直接観察することにした。

2-2 生きた細胞内で 1 個の分子を観察する顕微鏡

通常使われる蛍光顕微鏡として、落射蛍光顕微鏡、全反射 (エバネッセント) 蛍光顕微鏡、共焦点蛍光顕微鏡などがあるが、いずれの方法でも 1 分子の蛍光色素の観察が可能である。したがって、目的の生体分子を蛍光色素で標識することにより任意の生体分子の観察が可能である。しかし、それぞれの顕微鏡法によって長所と短所がある。落射蛍光顕微鏡は装置が単純という利点を有するが、観察している面の上下の蛍光が背景光となるので、細胞のように厚みをもった試料の 1 分子観察には適していない。全反射蛍光顕微鏡は、屈折率の異なる物質の界面 (ガラスと水、あるいは細胞と水) で光が全反射する際に形成される“エバネッセント場”を利用しているので、界面から 150nm 程度を局所的に照射する。このため、細胞膜付近の生体分子の観察に威力を発揮するが、細胞内部の観察には適していない。我々はガラスシャーレから 2~10 μm 離れている核内で mRNA を観察するために共焦点顕微鏡を用いた (図 1)。この共焦点顕微鏡では市販の共焦点ユニット (横河電機 CSU-10) と、高感度ビデオカメラを用いて撮影を行っている。通常の共焦点顕微鏡は 1 個のピンホールで画面全体をスキャンするので、1 枚の画像を得るのに時間がかかり、また観察領域も小さい。一方、CSU-10 は、ニポーディスクと呼ばれるピンホールが多数 (~2 万個) あいているディスクが毎分 1800 回転することにより、顕微鏡の視野 (本研究では $45 \times 30 \mu\text{m}$) をリアルタイム (最速で 1 秒間に ~500 枚の画像) で観察することが可能となっている。蛍光色素だけ



ニポーディスク型コンフォーカルユニット

図1 顕微鏡システム

顕微鏡システムはニポーディスクタイプの共焦点ユニット、高感度ビデオカメラ、および照射用の緑色レーザー（波長 532nm）、位相差用の赤外光（波長 800-900nm：蛍光像と同時に観察するためにこの波長を使用）光源などからなる。左下に共焦点ユニットの詳細図を示した。

でなく、GFP（緑色蛍光タンパク質）の1分子観察も可能である。さらに本研究では、細胞の形態を蛍光像と同時に観察できるように、赤外光（800～900nm）による位相差顕微鏡を導入した。

2-3 mRNA の観察

運動を観察するためのモデル mRNA として、ヒト β グロビン遺伝子の部分配列からなる mRNA（5' 末端の cap、エキソン、3' 末端の poly A 配列を持つ 405 塩基）を使用した。まず、in vitro 転写系で mRNA を合成し、続いてグアニン残基に蛍光色素 Cy3（緑色の光で励起され、オレンジ色の蛍光を発する）を平均 5～10 個、共有結合させた。この蛍光標識した mRNA を細胞の核にマイクロインジェクションにより導入した。1分子観察に先だって、

蛍光標識 mRNA の核外への輸送速度を測定した。核内にインジェクションされた mRNA は、約 2 時間で半数が核外に輸送された。一方、5' 末端 cap や poly A が無い mRNA をインジェクションした場合、核外への輸送速度は、それぞれ $1/5$ 、 $1/2$ に遅くなり、効果的な輸送には、cap と polyA が両方必要であることが示された。また、アジ化ナトリウムとデオキシグルコースで ATP を欠乏させた場合、mRNA の核外輸送が完全に抑制された。これらの結果は、本研究で用いた外来性の蛍光標識 mRNA が内在性の mRNA と同様の制御のもとに核外に輸送されていることを示している。

観察対象の細胞として、Xenopus A6 細胞を用いた。この細胞は上皮細胞で扁平なため 1 分子観察が容易であるほか、室温 (23°C) で CO₂ インキュベーターを使わなくても培養できるという利点を有する。細胞を蛍光観察する場合、細胞自身が持つ自家蛍光が問題とな

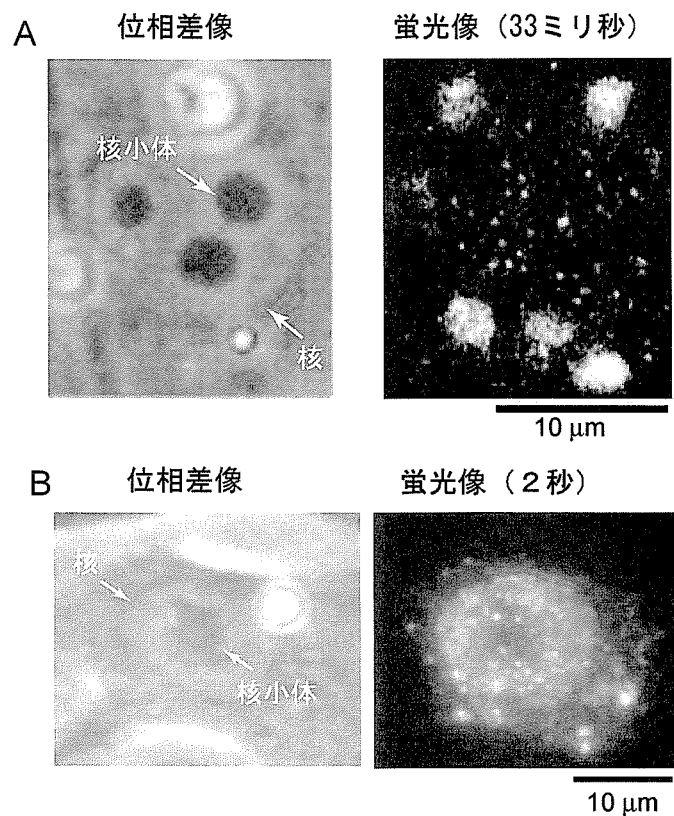


図2 mRNA の核内運動の 1 分子イメージング

蛍光標識した mRNA を A6 細胞の核にインジェクションし、位相差像 (左側) と蛍光像 (右側) を観察した。A: 1 フレーム (33 ミリ秒) のビデオ像。位相差像の中央部にある 3 箇所黒い部分が核小体である。蛍光像で、核の周囲に見られる大きく白い蛍光は、細胞の自家蛍光である。核内の個々の輝点が、1 分子の mRNA に相当する。B: 2 秒間の積算像。mRNA は核小体以外の部分を運動しているため、核小体が暗く、それ以外の核全体がぼんやりと光っている。明るい輝点は動かずに止まっている mRNA である。

る（特に、電子伝達系の酵素群が蛍光を出すため細胞質に自家蛍光が多い）。しかし、1分子の蛍光分子を観察する励起光強度（150W/cm²）で照明しても、核内に自家蛍光が見られず、核内は1分子観察に適していることが明らかになった。核内で個々の蛍光標識分子を観察するためには、回折限界にまで絞り込んだレーザービームの中に存在する分子の平均個数を1以下にしなければならない。このため、濃度を数nM以下にする必要がある。本研究では、体積～1 plの核に、10nMのmRNA分子を～25 flマイクロインジェクションした。この条件では、共焦点蛍光顕微鏡の光断層像に0.2個/μm²の密度で蛍光分子が観察された。

暗黒の核内に蛍光標識したmRNAをインジェクションすると、mRNAの輝点が核内に現れた(図2A)。個々の蛍光mRNAを観察すると、動いているmRNAと止まっているmRNAがいることが明らかになった。ビデオの蛍光像を2秒間積算して位相差像と比較すると、核小体を除く核全体をmRNAが動き回っているため薄ぼんやりと光り、静止しているmRNAが明るい輝点として観察された(図2B)。個々のmRNAの運動をビデオの1フレーム(33ms)毎に解析し、動いているmRNAと止まっているmRNAの割合を求めたところ、両者はほぼ同じになった。この割合は、mRNAをインジェクションしてから1.5時間後まで変らなかった。次に、止まっていたmRNAが動き出すまでの時間をヒストグラムにして解析した結果、平均約30秒の指数関数分布になった(図3A)。このmRNAが、何らかの核内構造物に結合しているものと考えられる。続いて、運動しているmRNAを解析した。水平方向(x,y方向)の変位の二乗(平均二乗変位： $\Delta x^2 + \Delta y^2$)を時間に対してプロットした(図3B)。すると、平均二乗変位は時間に比例することがわかった。このことからmRNAの運動はブラウン運動であることが示唆された(もしmRNAの運動が分子モーターによる能動輸送ならば、

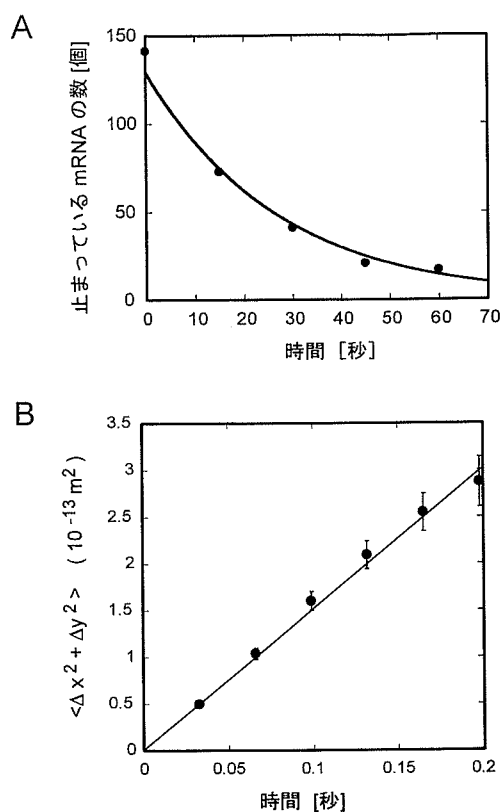


図3 核内における mRNA の運動の解析
A: 止まっている輝点の滞在時間を解析したところ、平均約30秒の指数関数分布になった。
B: 動いている mRNA の平均二乗変位と時間の関係。直線の傾きから、mRNA は拡散定数 $0.4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ でブラウン運動していると見積もられた。エラーバーは標準誤差。

変位が時間に比例するので平均二乗変位は時間の2乗に比例するはずである)。図3Bの傾きから拡散定数を算出すると $0.4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ となった。この拡散定数は同じ mRNA を純水中で計測した場合の約1/100であった。一方、核内の粘性は純水の4倍しかないことが報告されているので、核内の mRNA の拡散が遅いことは、単純な粘性では説明できない。mRNA に結合する多数の結合タンパク質が知られているので、mRNA が mRNA 結合タンパク質と巨大な複合体を形成したり、非常に早い結合・解離を繰り返しながら拡散している可能性が考えられる。mRNA の運動がブラウン運動であることは次の2つのコントロール実験からも支持された。まず、アジ化ナトリウムとデオキシグルコースを培地に加えて ATP を欠乏させても mRNA の運動に変化はなかった。また、 23°C と 30°C で mRNA の運動を測定したところ、温度による粘性係数の分だけ拡散定数が変化した。

ところで、蛍光標識した外来 mRNA が、どの程度内在性の mRNA の運動を反映しているかは、疑問の残るところである。内在性の mRNA の運動を可視化するため、蛍光標識したオリゴ dT (40 塩基) を核にインジェクションして内在性の mRNA の poly A 領域に結合させ、その運動を観察した。その結果、蛍光標識した外来 mRNA と同様のブラウン運動と、同じオーダーの拡散定数が求められた。

以上の結果をまとめると、mRNA は核内構造物とダイナミックな結合・解離を繰り返しながらブラウン運動していた。これは、mRNA の核膜孔への輸送が拡散過程であることを示唆している。A6 細胞の核の直径は $10\sim 15 \mu\text{m}$ なので、mRNA は、拡散により数分で核膜孔に到達できると予想される。一方、前述のように mRNA の核外輸送に約1時間を要しているので、mRNA と核外輸送に必要な因子の結合が律速過程になっていると考えられる。

mRNA は最終的に核膜孔を通過して

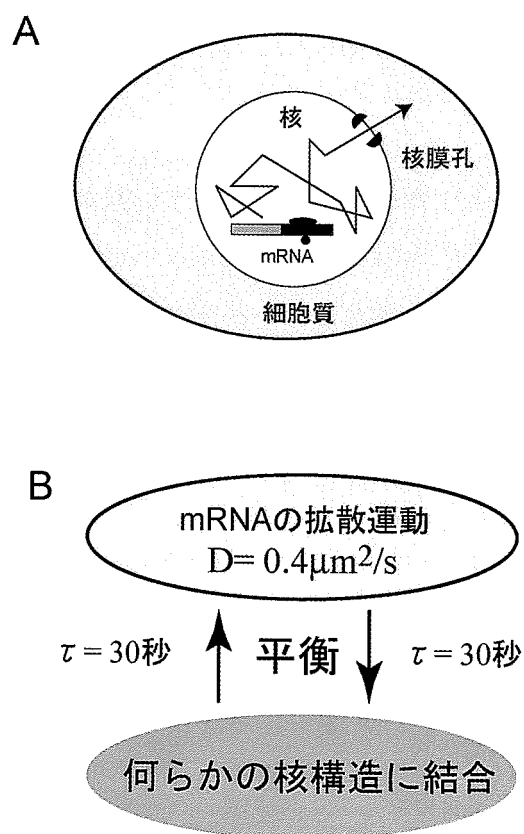


図4 mRNA の核内運動の模式図

mRNA は核内構造物とダイナミックな結合・解離を繰り返しながらブラウン運動で核膜孔に到達すると考えられる。

細胞質へと輸送されるので、核膜孔の mRNA 輸送機構も非常に興味深い。今後はこの点にも注目して研究したいと考えている。

3. 今後の展望

ヒューマンゲノムの解析の進展にともない、様々な遺伝子とタンパク質群の同定は急速に進むと考えられる。その次の課題として、タンパク質の機能や、タンパク質間相互作用の研究が益々重要になるであろう。本研究で開発した、生きた細胞内の1個の生体分子をリアルタイムに観察する手法は、核酸だけでなく、タンパク質やその他の生体分子の研究にも応用が可能である。生物物理学から始まった1分子を見て操作するという“1分子生理学”が、生化学、細胞生物学、分子生物学的な手法と組み合わせたり、さらに発展することを期待したい。

4. 発表リスト

4-1 論文

- (1) Yamaguchi J., Nemoto N., Sasaki T., Tokumasu A., Mimori-Kiyosue Y., Yagi T., and Funatsu T. 2001. Rapid functional analysis of protein-protein interactions by fluorescent C-terminal labeling and single-molecule imaging. FEBS Lett. 502: 79-83.
- (2) Taguchi H., Ueno T., Tadakuma H., Yoshida M., and Funatsu T. 2001. Single-Molecule Observation of Protein-Protein Interactions in the Chaperonin System. Nature Biotech. in press
- (3) Tadakuma H., Yamaguchi J., Ishihama Y., and Funatsu T. 2001. Imaging of Single Fluorescent Molecules Using Video-rate Confocal Microscopy. Biochem. Biophys. Res. Commun. in press.
- (4) Tadakuma H., Shibuya T., Ishihama Y., Tani T., and Funatsu T. Single-molecule observation of mRNA moving within a nucleus of a living cell. submitted.

4-2 総・解説

- (1) 齋藤究、船津高志 1999.「近接場光学の原理と生物科学への応用」蛋白質核酸酵素 vol.44 (5月号) No.6 pp.807-811.
- (2) 船津高志 1999.「1分子の生体高分子を観て操る」高分子 vol. 48 pp.906-909.

- (3) 船津高志、多田隈尚史 1999. 「1分子蛍光イメージング法」non-RF実験の最新プロトコール (羊土社: 栗原靖之、武内恒成、松田洋一編) pp. 165-166.
- (4) 船津高志 (編) 「生命科学を拓く新しい光技術」1999. (総186ページ、共立出版)
- (5) 船津高志、多田隈尚史 1999. 「タンパク質の動き」顕微鏡フル活用術イラストレイテッド 基礎から応用まで (秀潤社: 稲沢譲治、津田均、小島清嗣 監修) pp. 171-174.
- (6) 多田隈尚史、船津高志 2000. 「生きた細胞の核内 mRNA の1分子蛍光イメージング」細胞工学 20: 672-677

4-3 口頭発表

- (1) Funatsu T. 1999. Imaging of single bio-molecules in vitro and in vivo. The 7th JST International Symposium. Molecular Processes and Biosystems. Abstract pp.28. (招待講演)
- (2) Funatsu T. 1999. Imaging of single bio-molecule dynamics in vitro and in vivo. Second Annual Symposium on Japanese-American Frontiers of Science. (招待講演)
- (3) 多田隈尚史、阿藤淳一郎、石浜陽、羽原靖晃、谷時雄、船津高志 1999. 核内における mRNA の運動の1分子イメージング 日本生物物理学会第37回年会 生物物理 39: S207.
- (4) 船津高志 1999. 1分子蛍光イメージング法による生化学・生物物理学 第72回日本生化学会大会 生化学 71: 592. (シンポジウム講演)
- (5) 多田隈尚史、阿藤淳一郎、羽原 靖晃、谷 時雄、船津高志 1999. mRNA の核内運動の1分子蛍光イメージング 第72回 日本生化学会大会 生化学 71: 788.
- (6) 船津高志、多田隈尚史、羽原 靖晃、谷 時雄 1999. mRNA の核内運動の1分子蛍光イメージング 第22回 日本分子生物学会年会 講演要旨集 pp.263. (シンポジウム講演)
- (7) H. Tadakuma, T. Shibuya, Y. Ishihama, J. Atoh, Y. Habara, T. Tani, and T. Funatsu. 2000. Imaging of single mRNA molecules moving within a nucleus of living cells. 8th International conference on laser applications in life sciences.
- (8) 多田隈尚史、山口淳一、上野太郎、石浜陽、船津高志 2000. 1分子蛍光イメージング法を用いた生体分子の観察 日本生物物理学会第38回年会 生物物理 40: S14.
- (9) 多田隈尚史、渋谷利治、石浜陽、谷時雄、船津高志 2000. 細胞核内の mRNA1分子の動きを観察する 日本生物物理学会第38回年会 生物物理 40: S77.

- (10) 船津高志、多田隈尚史、石浜陽、渋谷利治、谷時雄 2000. 細胞核内 mRNA の 1 分子 蛍光イメージング レーザ顕微鏡研究会第26回講演会
- (11) Funatsu T., 2000. Imaging of single bio-molecules in vitro and in vivo. 第5回東洋大学バイオ・ナノエレクトロニクス研究センター・シンポジウム講演集 pp.64-74. (招待講演)
- (12) 山口淳一、香月康孝、船津高志 2000. ネイティブキネシンの運動の蛍光一分子イメージング 第9回日本バイオイメージング学会学術集会
- (13) Tadakuma H., Shibuya T., Ishihama Y., Atoh, J., Habara Y., Tani T., and Funatsu T. 2001. Imaging of single mRNA molecules moving within a nucleus of living cells. 45th Annual meeting of Biophysical Society, U.S.A. . Biophysical J. 80: 148a.
- (14) Tadakuma H., Shibuya T., Ishihama Y., Tani T., and Funatsu T. 2001. Imaging of single mRNA molecules moving within a nucleus of a living cell. The 6-th International Symposium. The Graduate University for Advanced Studies (SOKENDAI). Genome Science in the 21st Century: Information of the Higher-Order Structure beyond the Primary Sequence. March 14-16 at Hayama, Kanagawa, Japan. (招待講演)
- (15) Funatsu T. 2001. Single molecule Imaging of Biological Functions in vitro and in vivo. Fluor 2001 Asia-Pacific Workshop Fluorescence Spectroscopy and Imaging. April 18-21 at University of Sydney. (招待講演)
- (16) 船津高志、多田隈尚史、渋谷利治、石浜陽、谷時雄 2001. 生きた細胞の核内 mRNA の 1 分子蛍光イメージング 日本電子顕微鏡学会第57回学術講演会 (シンポジウム指名講演)
- (17) 山口淳一、根本直人、佐々木亨、徳増亜古、船津高志 2001. 蛍光ピュロマイシンと 1 分子蛍光イメージング法を用いた蛋白質間相互作用の新しい機能解析法 第1回日本蛋白質科学会年会 要旨集 pp.414
- (18) Ishihama Y., Tadakuma H., Shibuya T., Tani T., and Funatsu T. 2001. Imaging of single mRNA molecules moving within a nucleus of living cells. 4th International Conference on Biological Physics. July 30- August 3, 2001. Kyoto International Conference Hall, Kyoto, Japan. Abstracts p41.
- (19) Nemoto N., Yamaguchi J., Sasaki T., Tokumasu A., Mimori-Kiyosue Y., Yagi T., and Funatsu T. 2001. Rapid functional analysis of protein-protein interactions by

fluorescent C-terminal labeling and single-molecule imaging. 4th International Conference on Biological Physics. July 30- August 3, 2001. Kyoto International Conference Hall, Kyoto, Japan. Abstracts p64.

4 - 5 特 許

- (1) 弓場俊輔、船津高志 2001 “局所的遺伝子発現調節法” (2001-136962)