

早稲田大学大学院 理工学研究科

博士論文審査報告書

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

2009 年 2 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、生体内における RNA (Ribonucleic acid) 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ている。さらに、本法をヒト生細胞内での RNA の可視化へ応用している。

本論文は 7 章より構成されている。以下に各章の審査概要を述べる。

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・目的を明らかにしている。

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ている。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、本研究では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ている。様々な属に属する菌を対象として、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 を検討している。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 10 mg/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示している。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ている。一

方,本手法を用いても全ての菌種を一括の条件で検出することは困難であること,また,細胞壁消化酵素による処理により細胞が損傷を受け,生細胞検出は不可能であるという問題点があることを明らかにしている。

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ている。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ている。本システムでは,還元を引き金として蛍光を発生するローダミン-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。この反応によって還元前と比較して約2000倍の緑色蛍光を発生することを見出している。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ることを示している。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生しないことを示し,本蛍光発生システムが優れたシグナル/バックグラウンド比を持つことを明らかにしたことは高く評価できる。

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生する,ナフソローダミン-アジド誘導体を合成した結果をまとめて報告している。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し,還元前と比べて約550倍の赤色蛍光を発生することを見出している。また,この化合物は,DNAプローブに連結することにより,標的核酸を検出可能であることも示している。このような波長域の異なる2種類の蛍光発生分子を用いれば,細胞内における2種類のRNA分子を同時に検出することも可能であり,生体内におけるRNA機能解明の新しいツールとなることが期待できる。

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の検出を試みている。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いことを示している。このように、本プローブが細胞内においても有効に働くことを明らかにしたことは意義深い。

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ている。さらに、これを用いてヒト生細胞内メッセンジャー RNA (mRNA) の検出を行っている。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起こらないため、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°C)・4 時間で約 50 回の化学反応の回転が見られ、これによって蛍光シグナルを 50 倍に増幅できることを示している。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である。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できること見出している。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できることから、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と評価できる。

第 7 章は本論文の総括である。

以上、本論文では、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) を用いた新規 RNA 蛍光検出技術の開発についてまとめている。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 の可視化に応用している点は非常に独創性が高い。本成果は、今後の RNA 研究およびバイオイメージング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できる。よって、本論文は博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認める。

2009 年 2 月

審査員 (主査) 早稲田大学教授 博士 (工学) 東京大学 常田 聡
早稲田大学教授 工学博士 (早稲田大学) 酒井清孝
早稲田大学教授 工学博士 (早稲田大学) 平沢 泉
ベルリン・フンボルト大学教授

PhD (マインツ大学) Oliver Seitz