

生細胞における mRNA の 1 分子動態解析と定量法の開発

船津 高志

Single-molecule Imaging and Quantification of mRNAs in a Living Cell

Takashi FUNATSU

Laboratory of Bio-Analytical Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

(Received September 19, 2008)

In eukaryotic cells, pre-mRNA molecules contain multiple intron sequences that are removed by splicing reactions. Truncated *ftz* pre-mRNA containing one intron and two exons, which mimics RNA under the post-transcriptional splicing, was synthesized and labeled with a fluorescent dye *in vitro* and then injected to the nucleus of Cos7 cell. The injected pre-mRNAs accumulated in 'speckles' in an intron-dependent manner and were spliced and exported to the cytoplasm with a half-time of about 10 min. Dissociation of pre-mRNAs in speckles exhibited rapid diffusion and slow dissociation of about 100 s. The slow dissociation required metabolic energy of ATP. Some pre-mRNAs shuttled between speckles and nucleoplasm, suggesting that pre-mRNAs repeatedly associated with and dissociated from speckles until introns were removed. These results suggest that speckles function as a checkpoint for whether or not mRNAs are appropriately processed. Next, mature mRNAs of truncated β -globin were synthesized, fluorescently labeled *in vitro*, and injected to the nucleus. The trajectories of single mRNA molecules in the nucleus were visualized using video-rate confocal microscopy. Approximately half the mRNAs moved by Brownian motion in the nucleoplasm, except the nucleoli, with an apparent diffusion coefficient of $0.2 \mu\text{m}^2/\text{s}$, about 1/150 of that in water. The remaining mRNAs were stationary with an average residence time of about 30 s. These results indicate that mRNAs are transported to nuclear pores by Brownian motion. Finally, intrinsic c-fos mRNA was fluorescently labeled with Cy3-2'-O-methyl oligo RNA probes and its concentration was measured by fluorescence correlation spectroscopy.

Key words—mRNA; single-molecule imaging; fluorescence microscopy; nuclear speckle

1. はじめに

真核生物では、遺伝情報を蓄えている DNA と、その遺伝情報を基にタンパク質を作るリボソームが存在する細胞質が核膜により区画されている。そのため、真核生物の遺伝情報の発現では、遺伝情報が核から細胞質へと伝えられる必要がある。この伝達を担う物質が mRNA である。mRNA は核で作られたあと、核膜を通過して細胞質へと輸送されたのち、細胞質においてモータータンパク質によって輸送され、あるものはさらに局在化する。mRNA はこれらの過程で様々な制御を受けており、それらが積み重なって細胞による遺伝子発現の制御へとつながっ

ている。しかし、mRNA の一生に関しては、よく分かっていないことが多い。われわれは、蛍光標識した mRNA を核内にインジェクションし、核から細胞質への輸送機構を解析し、さらに個々の mRNA 分子の核内運動をビデオ蛍光顕微鏡で観察した。また、蛍光相関分光法を用いて、生細胞内の特定の mRNA の濃度をリアルタイム定量する方法を開発した。

2. 核スペックルの機能

真核生物の遺伝子は多くのイントロン配列によって分断されており、これらはスプライシング反応により除去される。細胞内において、スプライシング反応の多くは転写と共役して起こり、転写活性部位で行われると思われる。また、スプライシングに必要な因子は、核スペックルと呼ばれる核内ドメインからリン酸化制御のもと転写活性部位へとリクルートされると思われる。核スペックルは、プ

東京大学大学院薬学系研究科生体分析化学教室(〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)

e-mail: funatsu@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 128 年会シンポジウム S36 で発表したものを中心に記述したものである。

ロセシング因子が豊富なインタークロマチン領域に存在する核内構造体である。転写活性化遺伝子の多くが核スペckル内でなく、近傍あるいは離れて存在するので、^{1,2)}核スペckルは転写/スプライシングの主要な場ではなく、プロセシング因子の貯蔵の場であると考えられてきた。しかし、*in situ* hybridizationにより、核スペckルにはプロセシング因子とともに大量の polyA⁺ RNA が蓄積していることが知られている。³⁻⁵⁾ mRNA の大量発現あるいは mRNA が多数のイントロンを含みスプライシングが間に合わない条件では、スプライシングの完了を待たずに転写部位から pre-mRNA を放出してしまうこともあると考えられる。Johnson らは、スプライシング効率の低いイントロン、あるいはスプライシング反応阻害を引き起こす変異が起きたイントロンを含む COL1A1 pre-mRNAs が、核スペckルに蓄積することを示した。⁶⁾ これにより、核スペckルがスプライシング反応が未完の pre-mRNA を核内に抑留する機構に関与している可能性が示された。本研究では、*in vitro* 合成した蛍光標識 *ftz* pre-

mRNA を Cos7 細胞の核内にマイクロインジェクションにより導入し、核スペckルへの pre-mRNA の結合と解離を解析することにより核スペckルの機能を明らかにすることを目的とした。⁷⁾

まず、第 1 イントロンとそれを挟む第 1 エキソン、第 2 エキソンとポリ A 配列を持ち、さらに 5' 末端にキャップ構造を持つ *ftz* pre-mRNA を試験管内で合成し、Cos7 細胞の核内にマイクロインジェクションした (Fig. 1)。対照実験としてイントロンのない成熟型 *ftz* mRNA も同様にマイクロインジェクションした。その結果、*ftz* pre-mRNA は核内に斑点状に局在し、一方 *ftz* mRNA は核小体を除く核質に一様に分布した (Fig. 2)。Ftz pre-mRNA が核スペckルに局在することを、スプライシング因子 ASF/SF2 と GFP の融合タンパク質との共局在を調べることにより確認した (Fig. 2)。インジェクションした *ftz* pre-mRNA が約 10 分でスプライシングされることを、細胞から抽出した mRNA を RT-PCR で増幅し電気泳動法で解析することにより確認した。また、*ftz* pre-mRNA が約 10

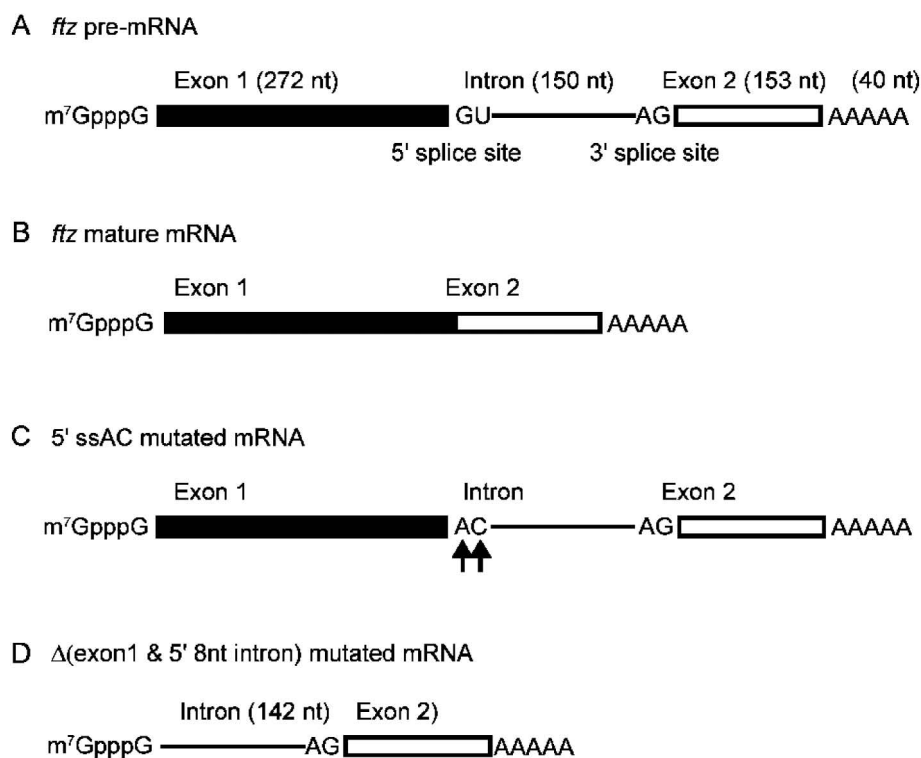


Fig. 1. Structures of mRNAs Used in This Study

(A) *Ftz* pre-mRNA (615 nt). m⁷G capped *ftz* pre-mRNA containing two exons, one intron, and a 40 nt polyA tail. (B) *Ftz* mature-mRNA (465 nt). (C) 5' ssAC mutated mRNA (615 nt). 5' splice site-mutated *ftz* pre-mRNA. Two nucleotides at the 5' splice site were changed from GU to AC as shown by arrows. (D) Δ (exon1 & 5' 8 nt intron) mutated mRNA (335 nt). The 5' exon and 5' splice site of 8 nt of the intron are deleted from the pre-mRNA.

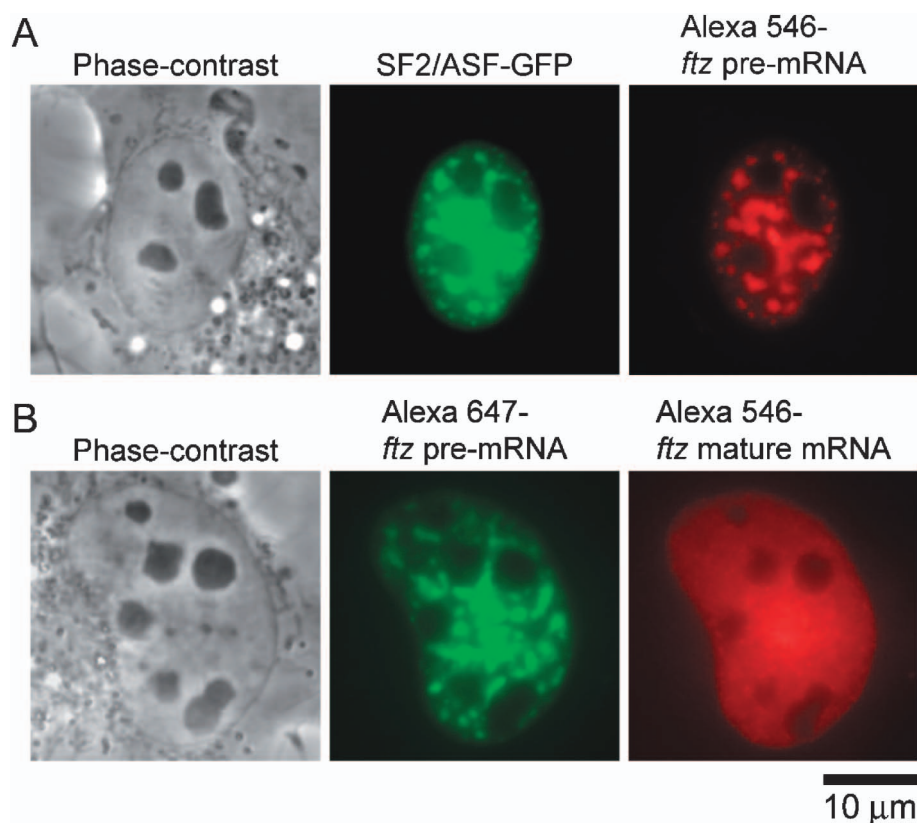


Fig. 2 The Microinjected pre-mRNA Colocalized with the Splicing Factor SF2/ASF

(A) Alexa Fluor 546 labeled *ftz* pre-mRNA was injected into the nuclei of Cos7 cells expressing a fusion protein of GFP and SF2/ASF. The injected fluorescent pre-mRNA was accumulated in speckles within 1 min after the injection. (B) Alexa Fluor 647 labeled *ftz* pre-mRNA and Alexa Fluor 546 labeled mature-mRNA were co-injected and their distribution was compared. The pre-mRNA accumulated in speckles, while mature mRNA was distributed diffusely in the nucleoplasm, except for the nucleoli.

分で核から細胞質に輸送されることを蛍光顕微鏡観察により確認した。このように外来性の pre-mRNA が内在性の pre-mRNA と同様にスプライシングされ核外輸送されることが示された。

次に、pre-mRNA の核スペckルからの解離のダイナミクスを iFRAP (inverse fluorescence recovery after photobleaching) 法を用いて解析した。iFRAP 法とは、微小領域の蛍光分子のみを残して全体の蛍光分子を退色させ、微小領域の蛍光強度の変化から、その領域からの蛍光標識分子の解離を計測する手法である。⁸⁾ 1つの核スペckルを残して核内の蛍光を退色させ、その核スペckルの蛍光強度を解析した結果、時定数 15 秒 (36%) と 130 秒 (64%) の 2つの指数関数の和でフィッティングすることができた (Fig. 3)。前者の値は、観察領域の大きさ (半径 1 μm) と mRNA の核内の拡散定数 ($0.04 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$)⁹⁾ から計算するとブラウン運動によるものと思われた。これを確認するため、アジ化

ナトリウムと 2-デオキシグルコースを溶液に加えて ATP を枯渇させた細胞で同様の実験を行うと¹⁰⁾、時定数は 10 秒 (18%) と 560 秒 (82%) になった。これにより、時定数約 10 秒の成分はブラウン運動によるものであり、時定数 130 秒の成分は ATP の加水分解反応を必要とする解離過程であることが示された。

次に明らかにすべき問題は、pre-mRNA がスプライシング反応の完了に伴って核スペckルから解離しているのかという点である。この疑問に答えるため、スプライシングされない変異 mRNA を用いて同様の実験を行った。Figure 1(C) の 5' ssAC mutated mRNA はイントロンの 5' splice site の塩基配列を GU から AC に変えたものであり、スプライシング反応が途中で止まってしまう変異 mRNA である。また Fig. 1(D) の Δ (exon1 & 5'8nt intron) mutated mRNA では、第 1 エキソンとイントロン上流 8 塩基を欠失しておりスプライシング反応は起

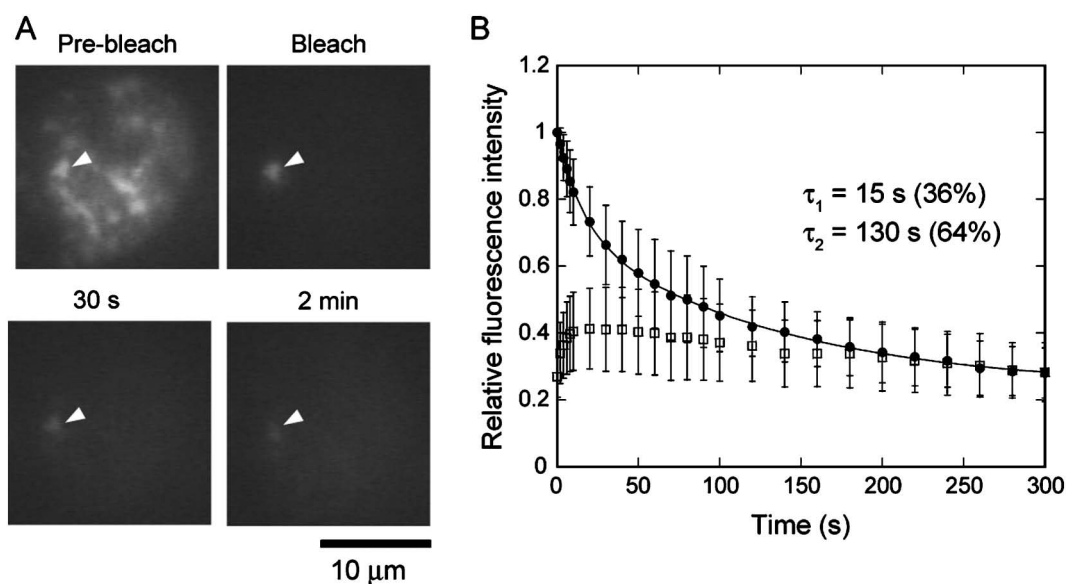


Fig. 3 iFRAP of *ftz* pre-mRNA on Speckles or Nucleoplasm

The iFRAP experiment was performed to analyze the dissociation of mRNA from speckles or the nucleoplasmic region. (A) Fluorescence micrographs of a *Cos7* cell injected by pre-mRNAs before and after photobleaching of the entire nucleus except for one of speckles shown by arrowheads. (B) Time-course of the fluorescence intensity of speckles (closed circles) and adjacent photobleached nucleoplasm (open squares) after photobleaching at time 0. Means \pm S.D. of 14 independent experiments are shown. Rapid dissociation followed by slow dissociation of mRNA from speckles was observed. The fitting line indicates the sum of two exponential functions of time constants of $\tau_1=15 \text{ s}$ and $\tau_2=130 \text{ s}$, respectively.

こらない。いずれの変異 mRNA もマイクロインジェクションすると核スペckルに局在した。mRNA が核スペckルに局在するには、イントロン配列のうち、5' splice site 及びその周辺配列は必要なく、イントロン下流に位置する polypyrimidine tract (PPT) と 3' splice site 付近の配列が必要であるといえる。^{11,12)} 次に、1つの核スペckルの蛍光を残して iFRAP 実験を行ったところ、野生型の mRNA と同様の時定数で解離が観察された。このことから、pre-mRNA の核スペckルからの解離はスプライシング反応と共役していないことが示された。それではイントロンを含んだまま解離した mRNA は再び核スペckルに結合するのだろうか。これを調べるため、核の周辺部の核スペckルを残し、中心付近の核スペckルと核質を退色させた。その結果、周辺部の核スペckルから解離した pre-mRNA が中心付近の核スペckルに再結合することが示された (Fig. 4)。

われわれの研究により、イントロン配列選択的な核スペckル間のシャトル機構が、スプライシング未完の pre-mRNA を核内に拘留するのに役立つことが示唆された。スプライシング反応の阻害が mRNA の核外輸送を阻害することが知られてお

り、⁶⁾ 核スペckルはスプライシング未完のイントロンを含んだままの pre-mRNA を選択的に一定時間集積し、核内に保持することでスプライシング反応の進行を介助する役割があるのではないかと考えられる。

3. mRNA の核内運動

mRNA は核で作られたのち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”¹³⁾ 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、蛍光相関分光法や蛍光退色回復法を用いて解析した結果、拡散説が有力となっている。¹⁴⁾ また、核内の微小領域に紫外線を照射して caged fluorescein (紫外線照射により分解して蛍光を発する物質) で標識した mRNA が蛍光を発するようにし、この蛍光の広がりから mRNA が拡散で移動していることが示された。¹⁵⁾ これらの結果は、mRNA は多数分子の平均を取ると拡散で移動していることを示唆するが、では、個々の分子はどのように運動しているのだろうか？ 一時的な能

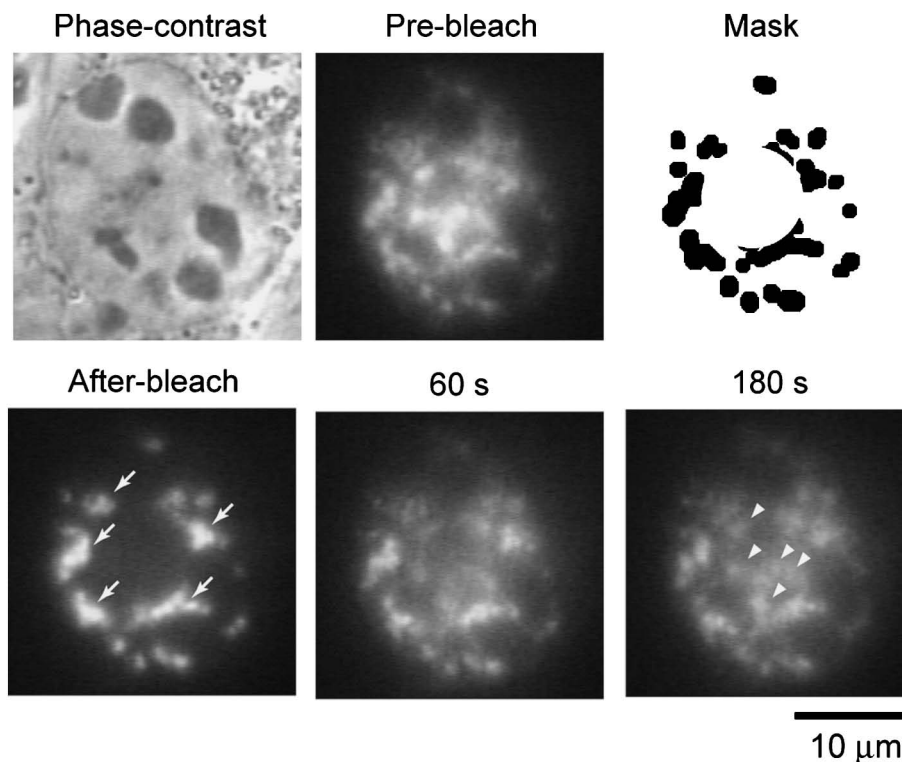


Fig. 4 Pre-mRNAs Dissociated from and Reassociated with Speckles as Revealed by Multi iFRAP

The multi-iFRAP experiment was performed to track the transport of mRNA dissociated from speckles. (A) Phase-contrast and fluorescence micrographs of a Cos7 cell injected with pre-mRNAs before and after photobleaching. The nucleoplasm located within a circle with half the diameter of the nucleus and the outer nucleoplasm except for speckles were photobleached, and then the fluorescence recovery at the speckles in the circle was observed. Arrows indicate unbleached speckles and arrow heads indicate fluorescence-recovered speckles.

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、われわれは1分子蛍光イメージング法を用いて mRNA の核内での運動を解析した。¹⁶⁾ 運動を観察するためのモデルとして Cy3 で標識した GFP の mRNA と、ヒト β -globin 遺伝子の部分配列からなる mRNA を使用した。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し、蛍光1分子をイメージング可能な共焦点顕微鏡システムで観察した。観察対象の細胞として、*Xenopus* A6 細胞を用いた。核内で個々の蛍光標識分子を観察するためには、濃度を数 nM 以下にする必要がある。本研究では、約 1 pL の体積の核に、10 nM の mRNA 分子を約 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約 0.2 個/ μm^2 の密度で蛍光分子が観察された。核内に蛍光標識した mRNA をインジェクションすると、mRNA の輝点が核小体を除く核質の領域に現れた [Fig. 5(B)]. 個々の蛍光 mRNA の軌跡を観察すると、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 [Fig. 5(C)]. この動いている mRNA と止まっている mRNA の個数の割合を求めたところ、両者はほぼ同じとなり、この割合は、mRNA をインジェクションした5分後から1時間後まで変らなかった。この結果から mRNA が運動と静止の状態を交互に変換していることが示唆された。例えば、Fig. 5(C), (D) の No. 3 の分子は最初の 1.5 秒間は静止しているが、その後で運動を開始している。mRNA の運動を統計的に解析するため、水平方向 (x, y 方向) の変位の 2 乗 (平均二乗変位: $\Delta x^2 + \Delta y^2$) を時間に対してプロットすると、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。また、グラフの傾きから拡散定数を算出すると 0.2 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ となった。一方、mRNA のブラウン運動を 60% ショ糖中で計測し、純水中の拡散定数に換算すると 30 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ だった。よって、核内の mRNA は水溶液中の約 1/150 の拡散定数でブラウン運動していることになる。mRNA の長さを 2 倍 (β -globin mRNA 405 nt, GFP mRNA 800 nt) に変

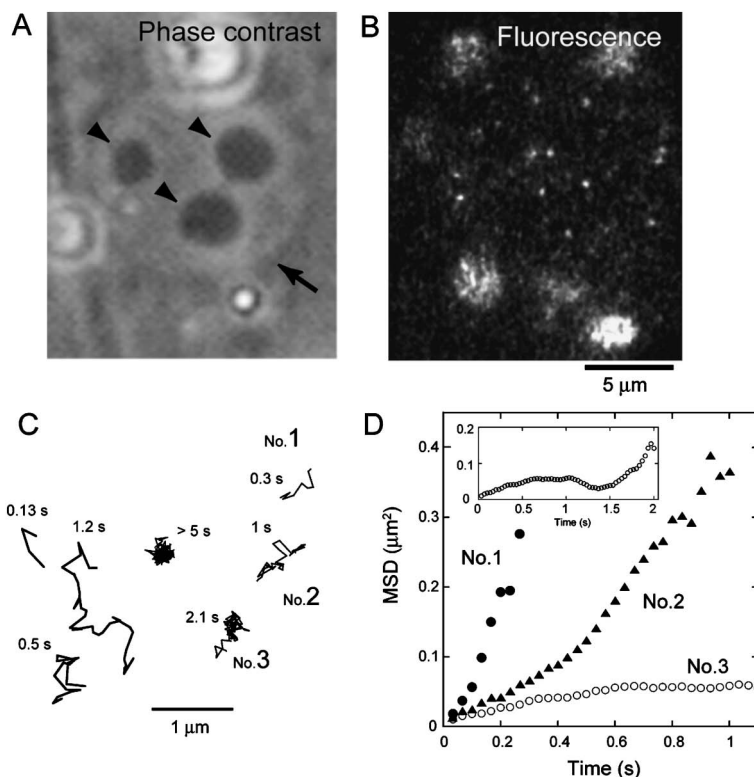


Fig. 5 Imaging of Single mRNA Molecules in Nuclei and Analysis of Their Trajectories

(A) Phase contrast micrograph of A6 cell. (B) Fluorescence micrograph of EGFP mRNA. The small fluorescent spots correspond to individual mRNA molecules, while the large spots represent autofluorescence. (C) Trajectories of the mRNAs. (D) Plot of the mean-square displacement (MSD) versus time for molecules No. 1 (closed circles), No. 2 (closed triangles), and No. 3 (open circles). The inset indicates the plot of No. 3 over a longer observation period.

えても同様の結果が得られた。一方、核内の粘性は純水の4倍しかない¹⁷⁾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が核内の構造物と非常に早い結合・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つの実験からも支持された。まず、アジ化ナトリウムと2-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度と30度で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。次に、止まっていたmRNAが動き出すまでの時間を解析した。蛍光の退色を防ぐため、15秒おきに1秒間の露光時間で核内の蛍光mRNAを顕微鏡撮影した [Fig. 6(A)]。任意の時刻0秒で静止しているmRNAをマークし、時間とともに減少する様子を解析した [Fig. 6(B)]。その結果、静止したmRNAは時定数、約30秒で運動を開始して視野から離れることが明らかになった。静止していたmRNAはなんらかの核内構造物に結合していたと

考えられるが、その構造は不明である。

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。1分子を直接観察することにより、mRNAが途中で核内構造物に結合・解離をしながら核膜孔へ拡散していくことが明らかになった。A6細胞の核の直径は10–15 μm なので、mRNAは測定された拡散運動では数分で核膜孔に到達できると予想される。今後、多色に染め分けた様々な種類の生体分子 (mRNA やタンパク質など) を同時に観察できるという蛍光の特性を生かせば、mRNAの核外輸送機構の詳細な理解につながると期待される。

4. 生細胞における mRNA の蛍光相関分光法による定量

次に、蛍光相関分光法 (FCS) による生細胞内の特定の mRNA のリアルタイム定量法を確立した。¹⁸⁾ 人工核酸である 2'-O-methyl RNA のアンチセンスプローブを用いて細胞内に内在する *c-fos* mRNA を蛍光標識し、FCS を用いて生細胞中の発

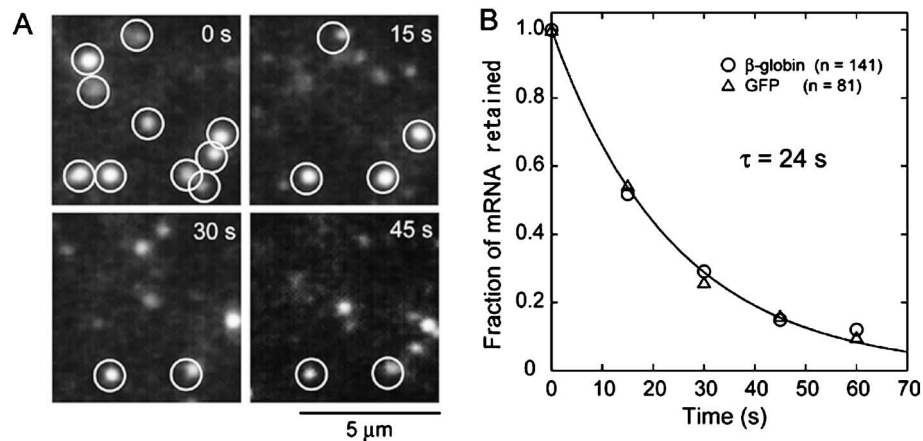


Fig. 6 Duration That the EGFP mRNAs Remain Stationary in the Nucleus

(A) Serial fluorescence video micrographs of EGFP mRNAs. To determine the duration that the mRNAs remain stationary, fluorescence micrographs of mRNA molecules were taken every 15 s. mRNA molecules that stayed in the confocal cross-section for more than 1 s and had an MSD for 1 s of less than $0.1 \mu\text{m}^2$ were indicated by circles. (B) Fraction of mRNA molecules remaining in an optical section as a function of time. The open circles and triangles indicate β -globin (20 cells, $n=141$) and EGFP (12 cells, $n=81$) mRNAs, respectively. The solid line indicates exponential fitting of the data with a time constant of 24 s.

現量を定量した。FCSはレーザー顕微鏡の共焦点領域を通過する蛍光分子が発する蛍光のゆらぎを解析し、その領域内の平均分子数と拡散時間を算出できる測定系である。細胞内に導入したアンチセンス 2'-O-methyl RNA プローブは標的 mRNA の発現量依存的に mRNA に結合、非結合の 2 状態を取ることで、FCS 測定により拡散時間の異なる 2 状態を定量し、結合比率から標的 mRNA の濃度を算出した。アンチセンス 2'-O-methyl RNA プローブを Cos7 細胞の細胞質にマイクロインジェクションし、細胞質中のプローブの蛍光を FCS により解析した。その結果、細胞内において、結合、非結合型の 2 成分を検出することができた。多数の細胞に対し同様の解析を行い、細胞内での解離定数 ($K_D=170 \pm 29.6 \text{ nM}$) を算出した。また、解離定数から個々の細胞における *c-fos* mRNA の濃度を $274 \pm 123 \text{ nM}$ と定量した。

5. おわりに

近年、小分子干渉 RNA や非翻訳 RNA が遺伝子発現の制御に係わっているが明らかにされ、RNA 干渉による医療が試みられている。また、RNA の変異に由来する疾患も徐々に明らかにされている。生細胞中で特定の RNA をイメージングしたり定量する技術は、これらの診断や治療に貢献すると期待される。

謝辞 本研究は、谷 時雄教授、徳永和明博士

(熊本大学)、多田隈尚史博士、石浜 陽氏 (東京大学)、渋谷利治博士 (産業技術総合研究所) との共同研究の成果をまとめたものである。記して感謝の意を表します。

REFERENCES

- 1) Wansink D. G., Schul W., van der Kraan I., van Steensel B., van Driel R., de Jong L., *J. Cell Biol.*, **122**, 283–293 (1993).
- 2) Dirks R. W., de Pauw E. S., Raap A. K., *J. Cell Sci.*, **110**, 515–522 (1997).
- 3) Carter K. C., Taneja K. L., Lawrence J. B., *J. Cell Biol.*, **115**, 1191–1202 (1991).
- 4) Carter K. C., Bowman D., Carrington W., Fogarty K., McNeil J. A., Fay F. S., Lawrence J. B., *Science*, **259**, 1330–1335 (1993).
- 5) Huang S., Deerinck T. J., Ellisman M. H., Spector D. L., *J. Cell Biol.*, **126**, 877–899 (1994).
- 6) Johnson C., Primorac D., McKinstry M., McNeil J., Rowe D., Lawrence J. B., *J. Cell Biol.*, **150**, 417–432 (2000).
- 7) Ishihama Y., Tadakuma H., Tani T., Funatsu T., *Exp. Cell Res.*, **314**, 748–762 (2008).
- 8) Dunder M., Hoffmann-Rohrer U., Hu Q., Grummt I., Rothblum L. I., Phair R. D., Misteli T., *Science*, **298**, 1623–1626 (2002).
- 9) Molenaar C., Abdulle A., Gena A., Tanke H. J., Dirks R. W., *J. Cell Biol.*, **165**, 191–202 (2004).

- 10) Shav-Tal Y., Darzacq X., Shenoy S. M., Fusco D., Janicki S. M., Spector D. L., Singer R. H., *Science*, **304**, 1797–1800 (2004).
- 11) Wang J., Gao L. G., Wang Y. L., Pederson T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 7391–7395 (1991).
- 12) Melčák I., Melčáková Š., Kopský V., Večeřova J., Raška I., *Mol. Biol. Cell*, **12**, 393–406 (2001).
- 13) Lawrence J. B., Singer R. H., Marselle L. M., *Cell*, **57**, 493–502 (1989).
- 14) Politz J. C., Browne E. S., Wolf D. E., Pederson T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 6043–6048 (1998).
- 15) Politz J. C., Tuft R. A., Pederson T., Singer R. H., *Curr. Biol.*, **9**, 285–291 (1999).
- 16) Tadakuma H., Ishihama Y., Shibuya T., Tani T., Funatsu T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **344**, 772–779 (2006).
- 17) Seksek O., Biwersi J., Verkman A. S., *J. Cell Biol.*, **138**, 131–142 (1997).
- 18) Okabe K., Ikeda H., Harada Y., Funatsu T., *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf.)*, **49**, 207–208 (2005).