

細胞内遺伝子シグナルの解析

阿部 洋^{1*}・古川 和寛^{1,2}・常田 聡²・伊藤 嘉浩^{3*}

これまでの遺伝子発現の解析は polymerase chain reaction (PCR) 法に代表される試験管内での解析が一般的であった。一方、生きている細胞内の遺伝子発現を直接可視化し、検出する技術が開発され始めている。その用途の一つは生命科学研究にあり、特に、今後のRNA研究において重要な研究方法となりうる。また、遺伝子シグナルを解析するのみではなく、セルソーターなどと併用することにより、遺伝子シグナルに基づく細胞分離技術としての利用も可能となると考えられる。

本稿では、生細胞内遺伝子発現を可視化・解析するための蛍光性バイオプローブについて、これまでと今後の展望について解説する。

細胞内遺伝子検出 (FISH法)

細胞内遺伝子発現を観測するために fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法が広く知られている¹⁾。これは、十数年前から生物学研究に使われているもっとも標準的な手法である。プローブには、標的RNA鎖に相補的な蛍光基で修飾されたDNAが用いられる。まず細胞をホルムアルデヒドなどで固定する。この固定処理により細胞は死ぬが、その後の実験処理による細胞構造の崩壊を防ぐことができる。次に、細胞膜を透過性にするにより、蛍光DNAプローブを細胞内に導入する。蛍光DNAプローブは、細胞内で標的RNAに特異的に結合するが、高いバックグラウンド蛍光を発する。標的RNAの蛍光シグナルのみを観測するために、余分なプローブは洗浄される。この洗浄操作のために、細胞は固定され、膜透過処理される必要がある。これまでにFISH法を用いて、大腸菌内の16SリボソームRNA (rRNA) や、ヒト細胞内28S rRNAやmRNAの細胞内局在化解析が報告されている^{2,3)}。しかしながら、この方法は生きている細胞内には適用できない。

分子ペアリングを利用した生細胞内遺伝子検出法

化学固定化した細胞を用いる FISH 法に対し、生きたまま細胞内を観察しようとする取り組みが最近活発に研究されるようになってきている。生細胞内を観察するためには、FISH法のように洗浄ができないため、標的・特異的な蛍光シグナルだけを観測し、非特異的な蛍光シグ

ナルを排除することが重要な課題になる。この目的のために、標的RNA依存的に蛍光シグナルを発生するプローブがこれまで開発されてきた (図1)。これらプローブに共通していることは、蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer; FRET) 原理を基礎にしており、FRETプローブ、モレキュラービーコンプローブ (molecular beacon; MB)、そしてテンプレート化学反応プローブなどがあげられる。これらの検出法は、各々バックグラウンド蛍光の排除の仕方に特徴がある。以下に各手法について紹介する。

FRET法 FRETとは、ある波長で励起された蛍光分子の近傍に別の蛍光分子が存在し、それらの蛍光スペクトルと吸収スペクトルに重なりがある場合に、蛍光分子の励起エネルギーがもう片方の蛍光分子へ移動する現象である。この現象を利用し、2本のDNAプローブにそれぞれ別の蛍光分子をラベルすることにより、標的RNA上でこれらの距離が縮まり、標的遺伝子を検出することが可能である⁴⁾ (図1a)。FRETは、遺伝子検出のみならず、細胞内におけるタンパク質の局在⁵⁾をはじめとして非常に多くの生物学研究に用いられている。

TsujiらはBODIPYとCy5のFRETプローブを用いて生細胞内における*c-fos* mRNAのイメージングに成功した⁶⁾。彼らは、DNAプローブが核内に急速に濃縮してし

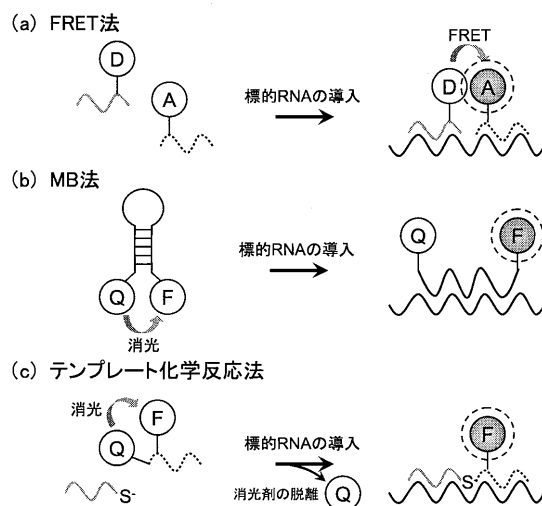


図1. 分子ペアリングによる標的遺伝子特異的蛍光検出。(a) FRET法、(b) MB法、(c) テンプレート化学反応法。

* 著者紹介 ¹ 理化学研究所 伊藤ナノ医工学研究室 (研究員) E-mail: h-abe@riken.jp ³ 同 (主任研究員) E-mail: y-ito@riken.jp
² 早稲田大学先進理工学部

まう問題を回避するため、高分子量のアビジンをプローブに結合している。

モレキュラービーコン (MB) 法 MBとは、両末端に蛍光基と消光基を結合した、ステムループ構造を持つ1本鎖DNAである⁷⁾。ループ部分は標的RNAに対して相補的となっており、ステム部分によって蛍光基と消光基が近傍に存在することにより、蛍光が消光している。しかし、標的RNAと結合することにより、ステムが開くことにより蛍光基と消光基の距離が遠ざかり、蛍光を発する (図1b)。

MBを用いた生細胞内RNA検出についても、いくつかの報告がある^{8,9)}。しかしながら、細胞内にMBを導入すると、細胞内の物質への非特異的な吸着や、細胞内ヌクレアーゼなどによるプローブ鎖の分解によってバックグラウンド蛍光を生じてしまうといった問題がある。そこで、Santangeloら¹⁰⁾は、標的RNAに対して隣り合う2本のMBを設計し、これらが標的の遺伝子上でFRETを起こすシステムを開発し、バックグラウンドを下げることに成功し、ヒト生細胞内の*K-ras* mRNA および *survivin* mRNAを検出した。Chenら¹¹⁾は、これらのバックグラウンド蛍光が核内のみで生じ、細胞質ではほとんど生じないことを見だし、MBと量子ドットをコンジュゲートすることにより、MBの核内への侵入を防ぐことによってバックグラウンドを飛躍的に低減することに成功した。

テンプレート化学反応法 近年、標的核酸をテンプレートとした化学反応により蛍光を発することによって標的RNAを検出する試みが、有機合成化学をバックボーンに持つ多くの研究者によってなされている¹²⁻¹⁴⁾。しか

し、これを生細胞内の遺伝子検出に応用したものは、Koolらのグループによる報告のみである。彼らは、求核性官能基をもつプローブと、蛍光基と消光基を両方持つプローブを合成し、これらが標的RNAをテンプレートとして化学反応を起こすことにより消光基が脱離し、蛍光を発するシステムを開発した (図1c, 図2)。そして、このシステムを用いて大腸菌生細胞内のrRNAの検出に成功している¹⁵⁾。また、4色の蛍光色素を用いたSNPのマルチカラー検出にも成功している¹⁶⁾。

この方法とMB法との決定的な違いは、蛍光シグナルを蓄積できるか否かにある。MB法では、標的RNAに対して一過性のシグナルしか与えないのに対し、この方法では半永久的なシグナルを与える。したがって、DNA-RNAのハイブリダイゼーションが平衡化にあれば、プローブの鎖交換とそれに準ずる化学反応が触媒的に次々と起こり、結果として蛍光シグナルが蓄積する。この触媒的な化学反応の回転を有利に起こすため、脱離基としての消光剤とDNAプローブをつなぐリンカーを最適化すると、最大で約100倍のシグナル増幅が可能となった¹⁷⁾。さらに、Koolと筆者らは、このシステムにFRETを導入することにより、バックグラウンドを低減し、プローブは化学反応の回転によりシグナル増幅能を持つ究極のシステムとなった¹⁸⁾。このシステムにより、ヒト生細胞内の β -actinやGAPDHのmRNAをイメージングすることに成功した。さらに世界で初めてこれらのシグナルをフローサイトメトリーにより定量化することにも成功した。

蛍光発生 (フルオロジェニック) 分子を用いる 生細胞内遺伝子検出法

前節で紹介したMB法、テンプレート化学反応法は、消光基と蛍光剤の分子ペアを用いている。しかし、分子ペアを用いた消光率の最大値は98%程度であり、2%のバックグラウンド蛍光が存在することになる¹⁹⁾。つまり、シグナル/バックグラウンド (S/B) 比は、最大でも50倍となる。さらに、MB法においては、タンパク質への非特異的な吸着、テンプレート化学反応法においては消光剤の加水分解などによるS/B比の減少が報告されている。プローブの更なる高感度化を達成するためには、新たな蛍光のon/offメカニズムが必要である。

近年、生体内分子を検出できる新しい方法として、蛍光発生分子プローブが報告されている²⁰⁾。これらは、化学反応を引き金としてPET (光励起電子移動) 原理や、吸収波長の変化に基づき蛍光発生が起こることを利用するものである。Naganoら^{21,22)}は、一酸化窒素 (NO) を検出標的として、これと反応して、トリアゾール環を形成することにより蛍光発生するジアミノフルオレセイン

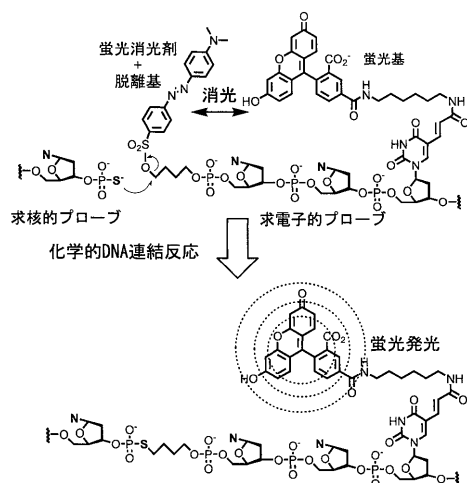


図2. テンプレート化学反応プローブによる標的の遺伝子の検出およびシグナルの増幅。消光基が有機化学反応における脱離基として機能し、化学的な連結反応を起こす。その結果消光基がなくなり生成物は蛍光を発する。

特 集

(DAF)を報告している。また、Changら²³⁾は、検出標的である過酸化水素 (H_2O_2)と反応して、蛍光発光するフルオレセインのホウ素化誘導体を報告している。これら分子の特徴は、一分子で蛍光シグナルのon/offが起こることにある。

我々は、最近になって、このようなフルオロジェニック分子のメカニズムを遺伝子検出に適用することに成功した(図3)²⁴⁾。還元を引き金として蛍光を発する蛍光分子の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、これらが標的の上で酸化還元反応を起こすことにより、標的遺伝子を認識できるシステムを構築した(図3a)。我々の合成した蛍光分子のアジド誘導体は、還元剤である水溶性ホスフィン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し、約2000倍の蛍光を発した。従来のFRETなどを用いるメカニズムが、最大でも50倍のS/B比であったことを考えると、蛍光感度が飛躍的に向上したといえる。そこで、この蛍光分子をDNAプローブに連結し、還元剤を連結したDNAプローブと、標的DNA上で反応させた。その結果、標的DNA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。標的DNA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きわめて優れたS/B比を持つことがわかった。また、本プローブは、細菌細胞内でも働くことがわかっており(図3b)、現在固定化ヒト細胞、さらには生きたヒト細胞への適用を検討している。

蛍光プローブを用いる生細胞内遺伝子シグナルの可視化技術は、現在のところ、基礎研究での応用が報告されているものの、まだ一般的な技術とはなっていない。そのひとつの要因として、細胞へのプローブの導入方法が確立されていないこと、また真核細胞においては、プローブが核内へ濃縮されてしまうといった問題などがある。優れた蛍光プローブの開発とともに、こういった「生細胞ならでは」の課題を1つ1つ克服していく必要がある。そして、分光学的技術の発展と両輪となって進むことも必要であり、両技術の融合により、大きなブレイクスルーが生まれることを期待したい。

文 献

- 1) Levsky, J. M. and Singer, R. H.: *J. Cell Sci.*, **116**, 2833 (2003).
- 2) Behrens, S. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 4935 (2003).
- 3) Molenaar, C. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **29**, e89 (2001).
- 4) Cardullo, R. A. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 8790

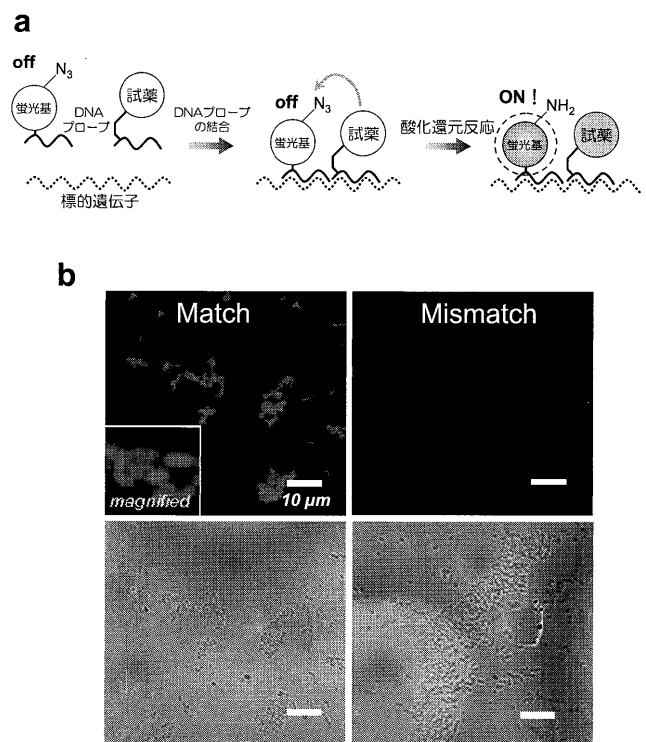


図3. 蛍光発生分子を用いた遺伝子検出。(a) 蛍光基ははじめアジド基の影響によって消光されているが、標的遺伝子上での酸化還元反応により蛍光を発する。(b) 本システムを用いた大腸菌細胞23S rRNAの検出。完全相補鎖のプローブを用いたときのみ蛍光を発している。

- (1988).
- 5) Calleja, V. *et al.*: *Biochem. J.*, **372**, 33 (2003).
- 6) Tsuji, A. *et al.*: *Biophys. J.*, **78**, 3260 (2000).
- 7) Tyagi, S. and Kramer, F. R.: *Nat. Biotechnol.*, **14**, 303 (1996).
- 8) Matsuo, T.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **1379**, 178 (1998).
- 9) Sokol, D. L. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 11538 (1998).
- 10) Santangelo, P. J. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **32**, e57 (2004).
- 11) Chen, A. K. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **35**, e105 (2007).
- 12) Cai, J. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 16324 (2004).
- 13) Grossmann, T. N. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 15596 (2006).
- 14) Sparano, B. A.: *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 4785 (2007).
- 15) Sando, S. and Kool, E. T.: *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 2096 (2002).
- 16) Sando, S. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 1081 (2004).
- 17) Abe, H. and Kool, E. T.: *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 13980 (2004).
- 18) Abe, H. and Kool, E. T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 263 (2006).
- 19) Salvatore, A. E. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **30**, e112 (2002).
- 20) 前田初男ら: *生物工学*, **84**, 169 (2006).
- 21) Sasaki, E. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 3684 (2005).
- 22) Kojima, H. *et al.*: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 3209 (1999).
- 23) Miller, E. W. *et al.*: *Nat. Chem. Biol.*, **3**, 263 (2007).
- 24) Abe, H. *et al.*: *Bioconjugate Chem.*, in press.