
細胞内のタンパク質を検出できる合成 mRNA スイッチの開発： ヒト iPS 細胞の識別に成功

ポイント

- 合成 mRNA ^{注1} スイッチを開発し、生きた細胞の内在タンパク質を検出することに成功しました。
- 内在タンパク質 LIN28A ^{注2} の発現レベルを定量化することにより、ヒト iPS 細胞や iPS 細胞から分化した細胞を生きたまま識別することに成功しました。

1. 要旨

川崎俊輔研究員（京都大学 CiRA）、齊藤博英教授（京都大学 CiRA）らの研究グループは、タンパク質に応答する合成 mRNA スイッチを開発し、生きた細胞内のタンパク質情報に基づいて、その細胞を識別することに成功しました。

細胞の状態は RNA、タンパク質やそれらの構成物質などを含むさまざまな生体分子で調整されています。タンパク質は特にゲノム発現や細胞シグナルの伝達、細胞運命の調整を担う重要な分子です。それゆえ、細胞内のタンパク質を検出して遺伝子発現をコントロールすることができれば、細胞をその状態に応じて制御することができる革新的な技術となります。これまで、細胞内で強制的に産生させた特定の外来タンパク質を検出する技術はありましたが、それらの技術を用いて生きた細胞の目印となる内在のタンパク質を検出することは困難でした。

そこで研究グループは、ヒトの内在タンパク質（LIN28A など）を高感度で検出できる 合成 mRNA スイッチを新たに開発しました。細胞内でタンパク質に結合する RNA の構造を安定化することで、LIN28A をはじめとする、細胞に内在するタンパク質と効果的に反応することを確認しました。さらに、幹細胞で高発現している LIN28A の発現レベルを定量化することにより、ヒト iPS 細胞や iPS 細胞から分化した細胞を、生きたまま見分けることに初めて成功しました。

この研究成果は 2017 年 5 月 19 日正午（グリニッジ標準時間）にイギリスの科学誌「Nucleic Acids Research」でオンライン公開されました。

2. 研究結果

- 1) 生きた細胞内のタンパク質を高感度で検出する合成 mRNA スイッチを開発しました。

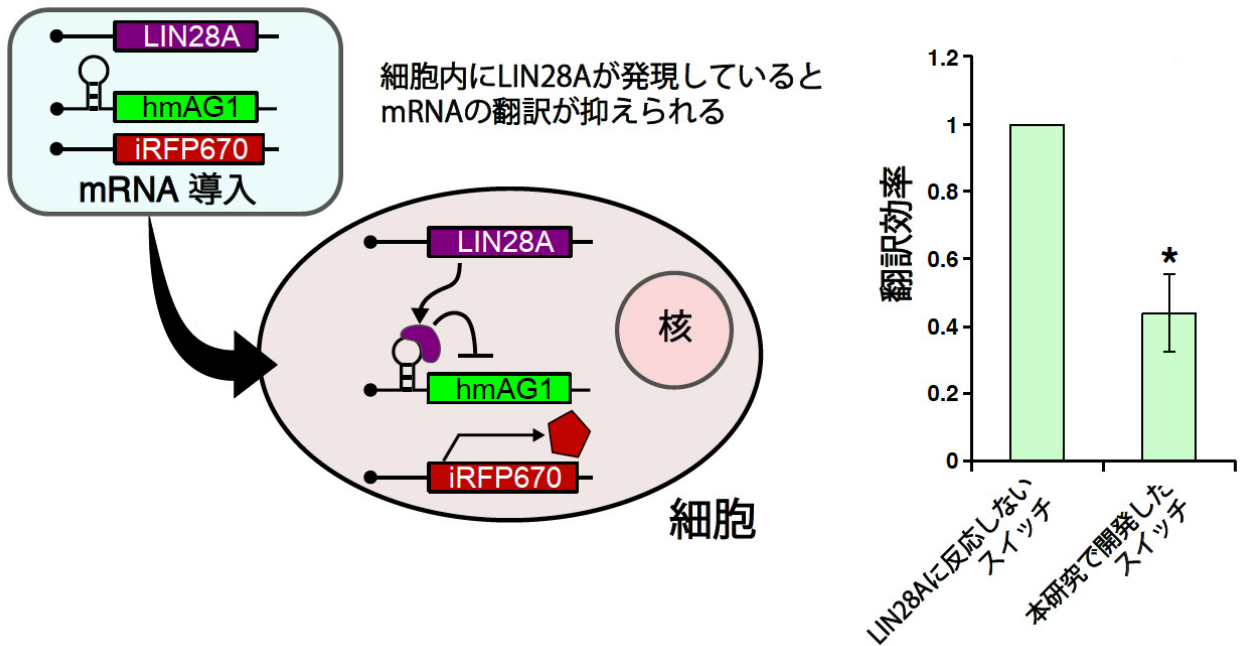


図1 合成 mRNA スイッチの概念図 (左) と翻訳効率 (右)

試験管内で LIN28A に応答して蛍光タンパク質 (hmAG1) の産生量を調節する mRNA スイッチを合成し、LIN28A を産生する mRNA と共に細胞内へ導入させました (リファレンスとして蛍光タンパク質 (iRFP670) を産生する mRNA も導入)。24 時間後、本研究で開発した mRNA スイッチは、細胞内タンパク質 LIN28A が発現している状態では翻訳が抑制されることが分かりました。つまり、合成 mRNA スイッチが細胞内で LIN28A を感知し機能していることが分かりました。

2) 次に、開発した細胞内 LIN28A を検出する合成 mRNA スイッチを用いて、生きたヒト iPS 細胞や iPS 細胞から分化した細胞を識別することに成功しました。

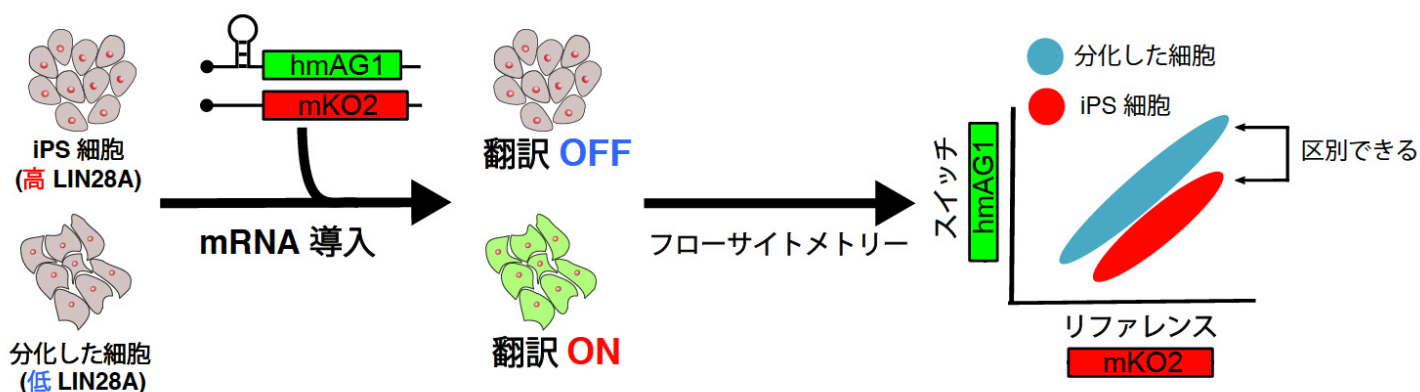


図2 合成 mRNA スイッチを用いてヒト iPS 細胞と分化した細胞を識別する方法

タンパク質 LIN28A は iPS 細胞では発現量が多く、分化した後の多くの細胞では発現量が減少することが分かっています。それゆえ、合成 mRNA スイッチを導入すると、iPS 細胞の中の LIN28A が反応して翻訳が抑制され、hmAG1 の光が弱くなります。分化した細胞では、LIN28A の発現量が

低いので、通常の翻訳を行います。その結果、mRNA 導入後にフローサイトメトリー解析^{注3}を行うと、二層に別れたベルト状の分布を見せ、iPS 細胞と分化した細胞を区別できるようになります。

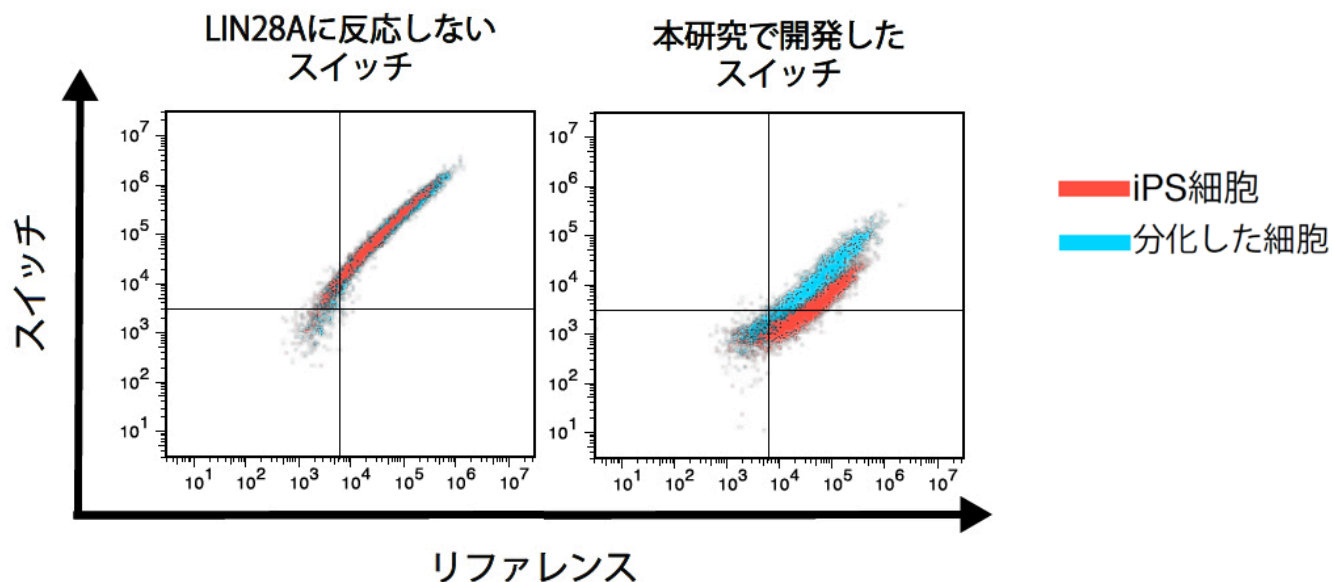


図3 本研究のフローサイトメトリー解析結果

3. まとめ

本研究グループは、生きたヒトの細胞内のタンパク質を高感度で検出し、翻訳制御システムに情報伝達する mRNA スイッチを開発しました。さらに、この手法を使ってタンパク質 LIN28A の発現量を生きたまま細胞内で定量することにより、ヒト iPS 細胞と分化した細胞を識別することに成功しました。

LIN28 タンパク質の発現量は多くの疾患やがんなどと相関があり、LIN28 を検知する mRNA スイッチは将来、iPS 細胞の識別だけでなく、がん細胞の識別などにも使われることが期待されます。また、合成 mRNA スイッチで検出するタンパク質は、実験者のニーズに合わせて変更可能です。そのため、今後細胞内部のタンパク質量を生きたまま定量できる新たな技術や、必要な細胞を自在に識別・純化する方法、あるいは効率的に細胞をリプログラムする手法として発展することが期待できます。

4. 論文名と著者

○ 論文名

Synthetic mRNA devices that detect endogenous proteins and distinguish mammalian cells

○ ジャーナル名

Nucleic Acids Research

○ 著者

Shunsuke Kawasaki^{1,2}, Yoshihiko Fujita², Takashi Nagaike³, Kozo Tomita³, Hirohide Saito²

○ 著者の所属機関

1. 京都大学大学院 医学研究科
2. 京都大学 iPS 細胞研究所 未来生命科学開拓部門
3. 東京大学大学院 新領域創成科学研究科 メディカル情報生命専攻

5. 本研究への支援

本研究は、下記機関より資金的支援を受けて実施されました。

- 日本学術振興会・文部科学省 科学研究費補助金「基盤研究 S」
- 日本学術振興会・文部科学省 科学研究費補助金「新学術領域研究」
- 内藤記念科学奨励金
- キヤノン財団
- 中谷医工計測技術振興財団

6. 用語説明

注 1) mRNA

メッセンジャー（伝令）RNA のこと。DNA 上の遺伝情報は mRNA に転写された後、mRNA からタンパク質となり（翻訳され）、細胞内で機能する。mRNA とタンパク質の相互作用を利用して、細胞内の目的のタンパク質が発現しているときのみ反応する合成 mRNA を使って、mRNA の翻訳をコントロールする概念を「mRNA スイッチ」と呼ぶ。

注 2) 内在タンパク質 LIN28A

ヒトの細胞内に存在するタンパク質であり、細胞の初期化や幹細胞の維持に関わる。ヒト iPS 細胞は、Lin28A を高発現している。初期化遺伝子の一つである *Lin28* によって符号化される。

注 3) フローサイトメトリー解析

流動細胞計測法。レーザー光を用いて光散乱や蛍光測定を行うことにより、水流の中を通過する単一細胞の大きさ、DNA 量など、細胞の生物学的特徴を解析することができる。