

Press Release

2020年11月20日

京都大学アイセムス（物質－細胞統合システム拠点）

テロメアをリアルタイムで可視化する新たな手法の開発

- ・染色体上のテロメア DNA 配列への結合時に蛍光が ON になる近赤外合成プローブを開発した。
- ・このプローブを用いてヒト生細胞でテロメアの特異的かつ効果的な可視化を行った。
- ・テロメア研究や細胞の老化度合いの計測、がんなどの疾患の診断など幅広い応用が期待される。

京都大学アイセムス（物質－細胞統合システム拠点）のガネシュ・パンディアン・ナマシヴァヤム（Ganesh Pandian Namasivayam）講師、杉山弘（すぎやま・ひろし）連携主任研究者（兼 理学研究科 教授）、河本佑介（かわもと・ゆうすけ）現 薬学研究科 助教、坪野友太郎（つぼの・ゆうたろう）理学研究科修士課程学生らの研究チームは、独自に開発した合成分子を用いて染色体末端に存在するテロメアをリアルタイムで可視化する新たな手法を開発しました。

テロメアは染色体の末端に存在する特殊な構造体であり、染色体の安定維持に重要な役割を担っています。これまでの研究から、テロメアの長さやその機能異常は細胞の老化やがんなどの疾患と深く関わっていることが明らかとなっています。そのため、テロメアは多くの研究者からの注目を集めており、その機能の解明や病気の診断のためにテロメアを可視化する技術の開発が求められてきました。これまでに生きている細胞においてテロメアを可視化する方法として、細胞外から人工的に改変した遺伝子を導入する方法が用いられてきました。しかし、より簡単で幅広い応用が期待できる合成分子を用いた手法はほとんど報告がありませんでした。

そこで本研究グループは今回、テロメア DNA 配列に特異的に結合する分子と蛍光分子を組み合わせることで、生きた細胞での観察に適した新しいテロメア可視化蛍光分子「SiR-TTet59B」を開発しました。SiR-TTet59B はテロメア DNA 配列に結合したときに蛍光が ON に変わるという性質や、生体に影響を与えにくい長波長領域である近赤外波長の光を吸収・発するという特徴を持っています。この SiR-TTet59B を用いることにより、ヒト生細胞においてテロメアをリアルタイムで特異的かつ効果的に可視化することに成功しました。また、異なる長さのテロメアを持つ二種類のがん細胞を用いてテロメアの可視化を行ったところ、テロメアの長さが長い方ががん細胞においてより強いテロメアの蛍光シグナルが観察されました。この結果から、蛍光シグナルの強さを測定することで SiR-TTet59B がテロメアの長さの計測にも応用可能であることが示唆されました。

一般的に本研究のような合成分子を用いる化学的手法は、人為的に改変した遺伝子導入などを行う生物学的な手法に比べてより簡便であり、複雑な操作が必要とされません。したがって、今回の研究において開発された手法は、テロメアに関する基礎的な研究や細胞の老化度合いの計測、がんなどの疾患診断などへの幅広い応用が期待されます。

本成果は、9月21日に米科学誌「*Journal of the American Chemical Society*」のオンライン版で公開されました。

1. 背景

生物の体はさまざまなタンパク質からつくられており、個々のタンパク質の情報は遺伝子として染色体に記録されています。ヒトなどの真核生物は線状の染色体をもつため、その末端は常に分解や染色体同士の融合などの危機にさらされています。そのような危機から染色体を安定に保護するために、染色体末端にはテロメアと呼ばれる長い DNA の反復配列とそれに結合するさまざまなタンパク質からなる特殊な構造体が存在します。このテロメアの機能に異常が生じると染色体を安定に維持することができなくなり、がんなどの疾患につながります。また、通常テロメアは細胞分裂のたびに短縮し、ある一定の長さまで短縮すると細胞はそれ以上分裂できなくなります。これが細胞老化と呼ばれる現象です。しかし、多くのがん細胞はテロメラーゼという酵素を用いてテロメアを伸長させることで、無限に増殖する能力を獲得しています。このような理由から、テロメアは病理学的にも生物学的にも重要な研究対象となっています。テロメア研究を行う上で、実際にテロメアを可視化するというアプローチはその動態や時空間的な配置、疾患発生との関連を調べるために非常に有用です。これまでに生細胞でテロメアをイメージングする手法として、細胞外からの遺伝子導入により蛍光ラベル化タンパク質^{注1)}を発現させる手法が報告されていますが、手間がかかります。より簡便な解析が期待できる化合物を用いた手法の報告はほとんどありませんでした。

2. 研究内容と成果

DNA に結合する化合物の一つとして、ピロール-イミダゾールポリアミド (PIP) が知られています。この化合物は主にピロールとイミダゾールという二種類の分子から構成されており、それらの分子の並び方を変えることでゲノム上の任意の DNA 配列に結合させることができます。本研究では、ヒトテロメア DNA 配列を標的とした PIP に近赤外蛍光分子シリコンローダミン (SiR) を結合させることで、テロメア DNA 配列への結合時に蛍光が ON になる近赤外発蛍光性 PIP プロープ「SiR-TTet59B」を新たに開発しました。SiR-TTet59B のもつ発蛍光性と近赤外プローブという二つの性質は、イメージングにおいてバックグラウンドのシグナルを減少させるという利点や蛍光観察のために照射するレーザーによる細胞への光毒性が低いという利点があり、生細胞でのイメージングに役立てることができます。

次に、ヒトがん細胞の一種である U2OS 細胞を用いて、実際に SiR-TTet59B が生細胞でテロメアを可視化できるのかを検証しました。細胞外化合物の細胞質内への移行を補助する Endo-Porter というペプチド^{注2)}とともに SiR-TTet59B を細胞に添加し、共焦点顕微鏡で観察したところ、テロメアを特異的に可視化できていることがわかりました。また細胞核全体の 3D 画像を取得し、そこから得られる核内のテロメアシグナルの量を計測することにより、SiR-TTet59B はこれまでに報告されているイメージング手法と同等以上のテロメア可視化能を持つことが示唆されました。

続いて、SiR-TTet59B がテロメア動態の観察に応用が可能なかを調べました。細胞分裂においては、複製された染色体が二つの細胞にそれぞれ均等に分配されるためにテロメアはダイナミックな動きを示します。分裂期の細胞をタイムラプスイメージングにより観察することで、SiR-TTet59B は分裂過程におけるテロメアのダイナミックな動態を可視化できることが示されました。また、間期の細胞におけるテロメアの動きをハイスピードイメージングにより観察しました。その結果、テロメラーゼに依存しないテロメア伸長機構^{注3)}をもつがん細胞において、二つのテロメアが相互作用する様子を 194 ミリ秒の時間間隔でリアルタイムに捉えることにも成功しました。

さらに、SiR-TTet59B がテロメアの長さの計測に適用できるのかを調べるために異なる長さのテロメアをもつ二種類のヒトがん細胞、HeLa 1.3 と HeLa S3 細胞を用意しました。HeLa 1.3 細胞は HeLa S3 細胞に比べて約 2 から 10 倍長いテロメアを持っていることが知られています。これらの細胞を用いてテロメアの可視化を行ったところ、HeLa 1.3 細胞においてより強いテロメアシグナルが観察されました。このことから、将来的にテロメアのシグナル強度を測定することで SiR-TTet59B はテロメアの長さの測定に応用できる可能性が示唆されました。

3. 今後の展開

本研究で開発されたテロメアのイメージング手法は、今後テロメアの機能解析や病気の発生機序の解明などのさまざまな研究に役立てられることが期待できます。また細胞の老化度合いの計測や疾患診断への応用も考えられます。

さらに、PIPはその設計を変えることでゲノム上の任意のDNA配列を標的とすることができるため、今回の研究は疾患などに関連したその他の重要なDNA配列の可視化を可能とするさまざまな近赤外発蛍光性プローブの開発にもつながります。

4. 用語解説

- 注1 蛍光ラベル化タンパク質:ある特定のタンパク質に対して人工的に蛍光タンパク質を融合させたもの。この融合タンパク質を用いることで、標的となるタンパク質を特異的に可視化することができる。
- 注2 ペプチド: 2個以上のアミノ酸がペプチド結合によりつながった物質のこと。
- 注3 テロメラーゼ非依存型のテロメア伸長機構: テロメラーゼを用いる代わりに、他のテロメアDNA配列を鋳型として用いることでテロメアを伸長する機構。がん細胞の約85~90%はテロメラーゼを用いたテロメア伸長を行うが、残りの10~15%は上記の機構を用いていることが知られている。

5. 論文タイトル・著者

“A Near-Infrared Fluorogenic Pyrrole-Imidazole Polyamide Probe for Live-Cell Imaging of Telomeres”

(参考訳: 近赤外発蛍光性ピロール-イミダゾールポリアミドプローブを用いたテロメアの生細胞イメージング)

著者: Yutaro Tsubono, Yusuke Kawamoto, Takuya Hidaka, Ganesh N. Pandian, Kaori Hashiya, Toshikazu Bando, and Hiroshi Sugiyama

Journal of the American Chemical Society | DOI:10.1021/jacs.0c04955