

高輝度化学発光タンパク質 Nano-lantern の開発 化学発光イメージングへの誘い

蛍光タンパク質を利用した蛍光ライブイメージング技術の発展により、動植物個体の生理機能を生きたまま可視化することが可能になった。また、多光子顕微鏡や超解像顕微鏡技術などの顕微鏡技術の発展も近年著しい。蛍光観察技術が進歩する一方で、生体試料への光毒性や自家蛍光といった問題は未解決のまま残されている。このような状況のなかで、ホタルルシフェラーゼに代表される化学発光を用いたライブイメージングにも注目が集まりつつある。化学発光は蛍光と違い、外部からの励起光照射を必要としないため自家蛍光や生物個体に対する光毒性・光応答を回避することができる。化学発光の蛍光に対するこのような優位性は以前から認識されていたが、放出するフォトン数が少なく数秒から数十分もの長時間露光が必要なため、これまで時間分解能の高いライブイメージングには使用されてこなかった。しかしながら近年、われわれの開発した高輝度化学発光タンパク質 Nano-lantern を利用することで化学発光ライブイメージングが可能となった。本稿では Nano-lantern の開発とそれを利用した化学発光ライブイメージングについて紹介する。

自然界には発光バクテリア、発光キノコ、夜光虫、発光クラゲ、ホタルなど、実にさまざまな発光生物が存在する。これらの生物はそれぞれに固有のルシフェラーゼと呼ばれる酵素（化学発光タンパク質）をもち、このルシフェラーゼがルシフェリンと呼ばれる発光基質の酸化を触媒することで化学発光が起こる。代表的なルシフェラーゼの一つであるレニラルシフェラーゼ（*Renilla luciferase*; RLuc）は刺胞動物に属するウミシイタケから同定されたルシフェラーゼであり、セレンテラジンをその発光基質とする。分子サイズが比較的小さい（35kDa）こと、ホタルルシフェラーゼと異なり ATP、 Mg^{2+} の補因子を必要としないことから化学発光を利用したスクリーニングなどで使用される機会が多い。しかしながら前述したとおり、蛍光に比べて暗いためこれまでライブイメージングには使われてこなかった。RLuc が暗い理由の一つとして、発光量子収率 (ϕ) が約 0.05 と非常に低いことが挙げられる。これは蛍光イメージングで用いられる代表的な蛍光色素（GFP や Alexa488 など）

の量子収率の 1/10 以下である。われわれは手始めに RLuc にランダムなアミノ酸変異導入を行い、明るさを改善する変異を探索したが、それだけでは RLuc の量子収率を飛躍的に上げることは困難であることに気がついた。そこでわれわれは化学発光タンパク質と蛍光タンパク質間の共鳴エネルギー移動（Förster resonance energy transfer; FRET）を化学発光の明るさの改善に利用することを着想した。FRET はドナー分子からアクセプター分子へと励起エネルギーが移動する現象であり、分子間相互作用を検出する方法としてライフサイエンス分野で応用されている。実は FRET は実験室だけでなく自然界でも広く起こっている。たとえば、前述したウミシイタケの生体内では発光タンパク質（RLuc）と蛍光タンパク質（ウミシイタケ GFP: $\phi=0.3$ ）が強く相互作用し、両者の間でほぼ 100% の高率で FRET が起きる結果、 $0.3/0.05=6$ 倍まで発光強度が上昇し、発光色も青色から緑色にシフトすることが知られている。言い換えればウミシイタケは暗い RLuc からでなく、明るいウミシイタケ GFP から効率良く発光させるために FRET を利用しているのである。この方法を人為的に模倣して高輝度化学発光タンパク質をデザインするにあたり RLuc のアクセプターとなる蛍光タンパク質の選定から始めた。ウミシイタケ GFP は強固な 2 量体構造をとるため、単量体である RLuc との融合タンパク質には適さない。ほかの蛍光タンパク質では何が適しているだろうか？ RLuc の発光スペクトルは、480nm にそのピークをもつ。ドナーに対して適切なアクセプターを選択するには、重なり積分 J を求めることで行える⁽¹⁾。そこからアクセプターは 500nm 近辺に吸収ピークをもつ蛍光タンパク質が望ましいことになる。われわれはモル吸光係数、フォールディング効率、量子収率の高さを検討し、ドナーとして Venus⁽²⁾ を用いることにした。次に、RLuc と Venus のさまざまな融合タンパク質を作成し最も FRET 効率の高いものをプローブとして選び出すことを行った。融合タンパク質の遺伝子構築には Venus だけでなくその円順列変異体 5 種類も利用し、RLuc と Venus の間のアミノ酸リンカーはさまざまな長さを試した。また、RLuc を C 末端、Venus を N 末端側に替えた

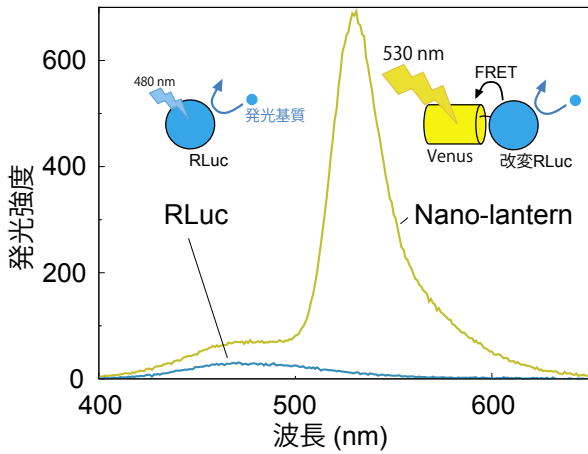


図1 ■ 高輝度化学発光タンパク質 Nano-lantern の開発
RLuc と Nano-lantern の模式図および発光スペクトル。

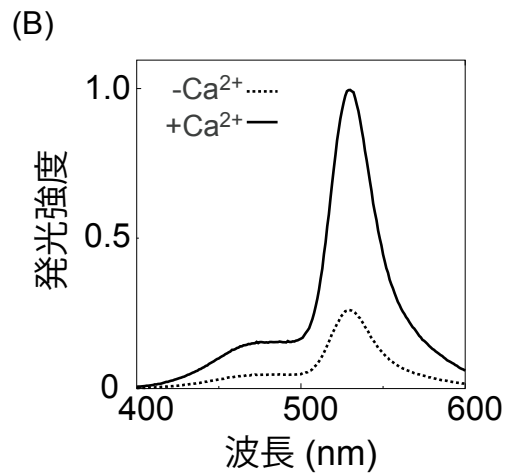
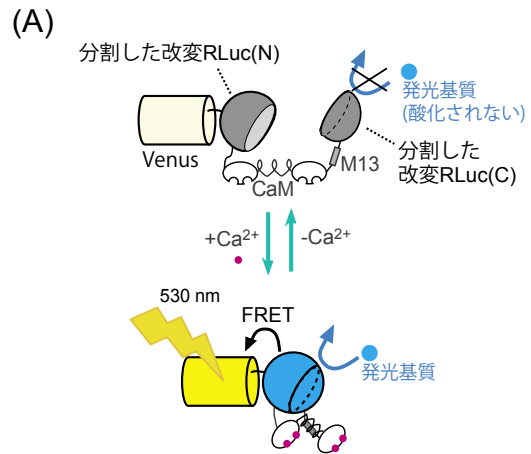


図3 ■ Nano-lantern を応用した Ca^{2+} プロブの開発
(A) Nano-lantern (Ca^{2+}) の模式図と (B) Ca^{2+} ありなしでの発光スペクトル。

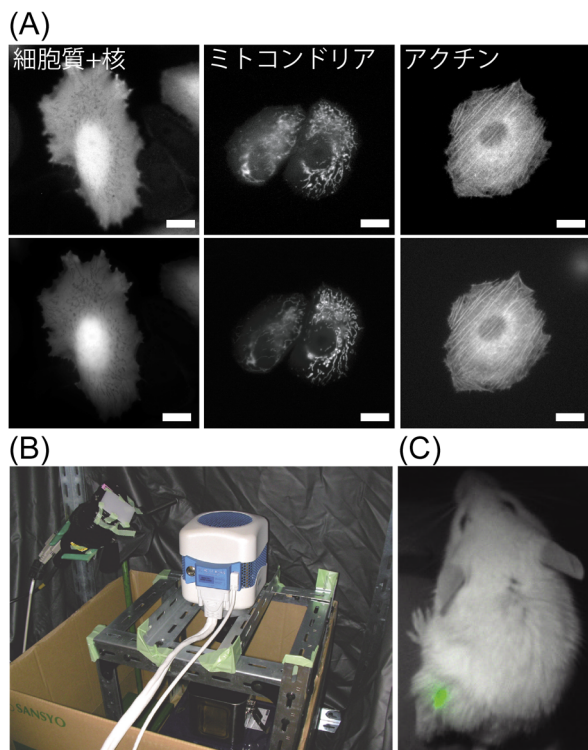


図2 ■ Nano-lantern の細胞レベルと個体レベルへの応用
(A) HeLa 細胞の細胞小器官に局在させた Nano-lantern の化学発光画像 (上段) と蛍光画像 (下段)。蛍光画像は Nano-lantern 内の Venus に対する励起波長を照射して撮影した。スケールバーは 20 μ m。 (B) 小動物の化学発光ライブイメージングシステム。 (C) 自由に動き回るマウス中で緑色 (疑似カラー表示) に光る腫瘍。 ((C) は Web 版でのカラー図, または参考文献 3 の Fig. 2 を参照のこと)。

融合タンパク質も作成した。精製した各融合タンパク質の発光スペクトルから、Venus 由来の発光値 (530nm) と RLuc 由来の発光値の比 (530/480nm 比) を求めることで、最大の FRET 効率をもつ融合タンパク質を選び出した。さらに、RLuc 自体の発光量を改善するために、エラー誘発 PCR 法により RLuc に対してランダムなアミノ酸変異を導入し、発光量を指標にマイクロプレートリーダーでスクリーニングすることで、発光量を改善するアミノ酸変異を見いだした。これを先述の最大の FRET 効率をもつ融合タンパク質に導入することで、その明るさは RLuc の 10 倍以上にも達した (図 1)。われわれはこの融合タンパク質を、ナノスケールの光源という意味を込めて「Nano-lantern (ナノ・ランタン)」と名づけた⁽³⁾。

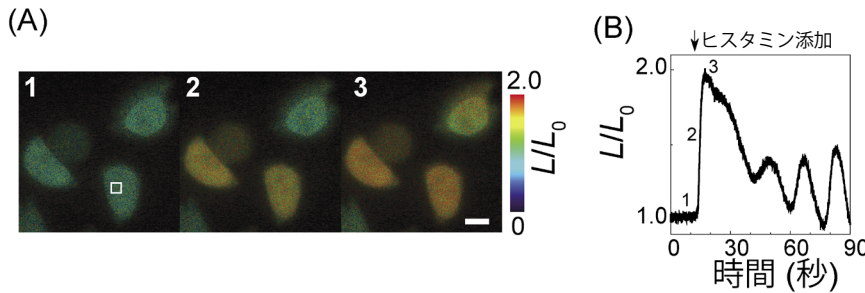


図4 ■ Nano-lantern (Ca²⁺) による細胞内Ca²⁺のビデオレート可視化
(A) Nano-lantern (Ca²⁺) を発現させたHeLa細胞Ca²⁺のビデオレートでの可視化。スケールバーは10μm。(B) ROI (四角で囲んだ領域) 中のCa²⁺の経時変化。

まずわれわれはNano-lanternを細胞内のさまざまな場所に局在させてイメージングができるかどうかを試した。化学発光観察のために市販の専用装置を用いず、手持ちの顕微鏡で細胞レベルでの発光観察をする際のコツについては以前のわれわれの総説を参照されたい⁽¹⁾。Nano-lanternはVenusの蛍光でイメージングした場合と遜色ないクオリティで細胞小器官を可視化することができた(図2A)。次にわれわれは個体レベルでの化学発光イメージングを試みた。個体レベルでの発光観察装置として、Xenogen社IVIS, Biospace Lab社Photon IMAGERが発売されており、これらのシリーズには静止画だけでなく動画が撮影できるものもある。こういった装置をもっていれば容易に個体レベルの化学発光ライブイメージングが行えるであろう。しかしながらこれらの機材は高価(数千万円)であり一研究室でもつことは困難である。そこでわれわれは割と安価に個体レベルの化学発光ライブイメージング環境をセットアップした⁽⁴⁾(図2B)。Nano-lanternを安定発現させたマウス大腸がん細胞株colon26細胞をBALB/cマウスの皮下に移植し数ミリの腫瘍に成長させた。毛をそらず無麻酔で自由に動き回るこのマウスの背中で光る腫瘍部位をビデオレートで可視化することに成功した(図2C)。マウス個体を非侵襲的に観察できることから、経日的な薬剤投与試験への応用が期待される。

次にわれわれはNano-lanternを改変し、細胞内で重要な働きをもつ生理分子を検出するための機能性プローブを作成することにした。まずその手始めにCa²⁺プローブの作成を行った。FRETや蛍光タンパク質をベースとしたCa²⁺プローブ作成に倣い、Nano-lanternの発光タンパク質(RLuc)内部にCa²⁺に結合し構造を変化するカルモジュリン(CaM)とそのターゲットであるM13ペプチドを挿入した⁽⁵⁾。挿入部位を検討した結果、RLucの228番と229番のアミノ酸残基間に挿入した際に

Ca²⁺ありなしでのシグナル変化量が300%^{*1}と非常に大きかった(図3)。これをNano-lantern (Ca²⁺)と名づけた。Nano-lantern (Ca²⁺)はこれまでの化学発光タンパク質に比べても非常に明るいため、それを発現させたHeLa細胞のCa²⁺イメージングを驚くべきことにビデオレートで行うことができた(図4)。また、細胞を操作する光遺伝学的手法と今回開発したNano-lantern (Ca²⁺)の併用を行った。代表的な光遺伝学ツールであるChR2(チャネルロドプシン2)⁽⁶⁾は青色光を照射することで神経細胞を興奮させることができるが、cameleonやG-CaMP, fluo-4など、頻用される蛍光指示薬を励起する青色光を照射するとChR2も光を吸収し作動してしまうため、これまで両者の併用は難しかった。Nano-lantern (Ca²⁺)は励起光を必要としないため、ChR2を作用させることなく併用することが容易にできた。ChR2やLOVドメインを利用した光遺伝学以外にもCALIやケージド化合物といった細胞を光操作するツールとの併用も容易に行うことができると考えている。

次にcAMPを検出する機能性プローブの作成を行った。FRETを利用したcAMPの検出方法がすでにいくつか報告されているが、シグナル変化量が非常に小さく(1~15%)検出が容易でないことが問題となっていた。EPAC1タンパク質のcAMP結合に必要な断片をNano-lantern (Ca²⁺)のCaM-M13に替えて挿入したところ、cAMPありなしでシグナルが130%変化するプローブを作成することができた。これをNano-lantern (cAMP)と名づけた。Nano-lantern (cAMP)を発現させたアメーバ細胞の集団を飢餓状態に置いたところ、細胞が集合していく過程でcAMPが細胞間を伝播していく様子を撮影することに成功した(図5)。

*1シグナル変化量(%)=(変化後のシグナル/変化前のシグナル-1)×100

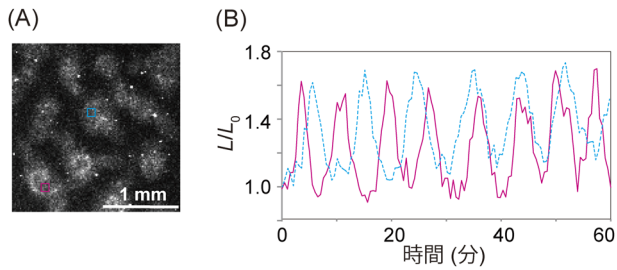


図5 ■ Nano-lantern (cAMP) による細胞間シグナル伝播の可視化

(A) Nano-lantern (cAMP) を発現させた約10万のアメーバ細胞のcAMP可視化。スケールバーは1mm。(B) 2カ所のROI (青の点線とマゼンタの実線) 中のcAMPの経時変化。

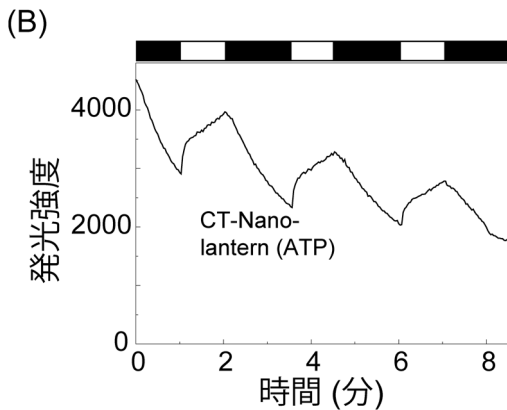
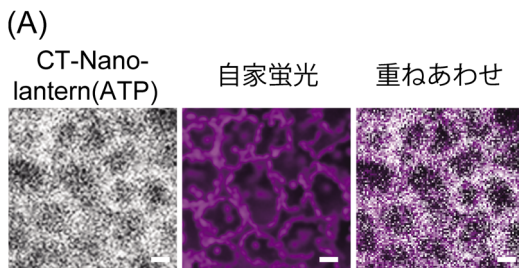


図6 ■ Nano-lantern (ATP) による光合成経路のATP産生の可視化

(A) Nano-lantern (ATP) を葉緑体内に発現させたシロイヌナズナ葉の画像。スケールバーは20 μ m。(B) 光照射による葉緑体内のATPの変化。

さらにATPを検出するプローブの作成を試みた。FRETを利用したATPプローブ (ATeam)⁽⁷⁾ に利用されているFoF1-ATP合成酵素の ϵ サブユニット (mBSU ϵ) をNano-lantern (Ca²⁺) のCaM-M13に替えて挿入したところ、ATPありなしでのシグナル変化量が200%にも達するプローブが作成できた。これをNano-lantern (ATP) と名づけた。シロイヌナズナに遺伝子改変を行

い、Nano-lantern (ATP) を葉緑体に発現させる株を作成した。蛍光プローブでは励起光が植物に光応答を引き起こすために光照射によるATP合成の様子を観察することはこれまでできなかった。われわれはNano-lantern (ATP) を葉緑体に発現するシロイヌナズナ葉を用いることで、光照射に伴うATP産生の様子を可視化することに世界で初めて成功した (図6)。

高輝度化学発光タンパク質Nano-lanternおよびそれを利用した機能性プローブにより、これまで蛍光ライブイメージングではできなかったことが可能になった。しかし、Nano-lanternのFRET効率はその発光スペクトルから20%程度と見積もられており、用途の多様化だけでなくこの点においてもまだ伸び代がある。さらに化学発光タンパク質の性能は量子収率だけで決まるわけではない。発光基質の代謝回転速度の向上によっても明るさの改善が見込まれる。また発光基質のほうを改良していくことも可能だろう。しかしながら、昨今ブームとなっているオプトジェネティクスとの併用という点においてNano-lanternは蛍光分子に勝っているため、今後より多くの研究者が化学発光をイメージング手段として取り入れていくのではないかとおおいに期待している。

- 1) 齊藤健太, 永井健治: 化学と生物, **49**, 555 (2011).
- 2) T. Nagai *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **20**, 87 (2002).
- 3) K. Saito, Y. F. Chang, K. Horikawa, N. Hatsugai, Y. Higuchi, M. Hashida, Y. Yoshida, T. Matsuda, Y. Arai & T. Nagai: *Nat. Commun.*, **3**, 1262 (2012).
- 4) K. Saito, Y. Higuchi, Y. Arai & T. Nagai: *Protocol Exchange* (2013), doi:10.1038/protex.2013.024
- 5) K. Horikawa, Y. Yamada, T. Matsuda, K. Kobayashi, M. Hashimoto, T. Matsu-ura, A. Miyawaki, T. Michikawa, K. Mikoshiba & T. Nagai: *Nat. Methods*, **7**, 729 (2010).
- 6) F. Zhang *et al.*: *Nature*, **446**, 633 (2007).
- 7) H. Imamura, K. P. H. Nhat, H. Togawa, K. Saito, R. Iino, Y. Kato-Yamada, T. Nagai & H. Noji: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 15651 (2009).

(齊藤健太^{*1}, 永井健治^{*2}, ^{*1}東京医科歯科大学脳統合機能研究センター, ^{*2}大阪大学産業科学研究所)



プロフィール



齊藤 健太 (Kenta SAITO)

＜略歴＞1998年北海道大学理学部生物科学科卒業／2005年同大学理学研究科化学専攻博士後期課程修了／同年同大学電子科学研究科特任助教／2012年大阪大学産業科学研究科特任准教授を経て同年より東京医科歯科大学助教＜研究テーマと抱負＞神経変性疾患解明のための新規測光法・イメージング手法の開発＜趣味＞コーヒー、パン屋巡り



永井 健治 (Takeharu NAGAI)

＜略歴＞1992年筑波大学第二学群生物学類卒業／1998年東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻博士後期課程修了／同年理化学研究所基礎科学特別研究員／2001年JSTさきがけ研究員／2005年北海道大学電子科学研究科教授を経て2012年より大阪大学産業科学研究科教授＜研究テーマと抱負＞バイオイメージング全般、少数性生物学、グリーンバイオロジー＜趣味＞登山、スキー、ドライブ、飲酒しながらの科学談義

Copyright © 2014 公益社団法人日本農芸化学会