

化学発光タンパク質の高輝度化と バイオイメージングへの展開

Development and Application of a Brighter Chemiluminescent Protein for Bioimaging

永井 健治, 齊藤 健太, 初谷 紀幸

Takeharu Nagai, Kenta Saito and Noriyuki Hatsugai

大阪大学産業科学研究所, 科学技術振興機構さきかけ

要旨 ホタルのルシフェラーゼを代表とする化学発光タンパク質は蛍光観察のように励起光の照射を必要としないことから, 自家蛍光や光応答性を有する生体試料の観察を可能にする。しかし, 放出するフォトン数が少ないため, 画像化には長時間の露光(数秒~分)を必要とし, 蛍光観察ほどには普及していなかった。本稿では我々が開発した高輝度化学発光タンパク質により実現した実時間ライブイメージングと今後の展望について紹介する。

キーワード: 化学発光タンパク質, 蛍光タンパク質, FRET, バイオイメージング, オプトジェネティクス

1. はじめに

蛍光タンパク質を利用したバイオイメージング技術によって, 今や細胞や細胞内小器官はもとより, タンパク質1分子までもが, 顕微鏡のもとで観察されるようになった。観察の対象は細胞内コンパートメントの形や空間分布など, “構造”に焦点がおかれる場合が多いが, 工夫次第で細胞内のイオン濃度やシグナル伝達の活性化状態など生体分子や細胞の“機能”を捉えることもできる。また, 近年では超解像技術が著しい進歩をとげ, 蛍光バイオイメージング分野はまだまだ成長の真っ直中にある。このように隆盛を極めている蛍光技術であるが, 欠点が無い訳ではない。蛍光を観察する以上, 励起光を照射することが不可欠であり, これが様々な問題を引き起こすからである。例えば, どんな生体試料にも NADP や FAD などの蛍光性生体分子が存在し, これらが青や緑の蛍光(いわゆる自家蛍光)を放つため, 観察したい蛍光シグナルが弱い時には, そのシグナルを覆い隠してしまい, 観察が困難になる。植物ではクロロフィルをはじめとする多くの色素が細胞内に存在し, 強いバックグラウンド蛍光を発生してしまうため, 波長によっては外来から導入した蛍光の観察が

できない。さらに, 植物に光を照射すると光合成が起こるように, 光に対する感受性がある細胞が存在し, そのような細胞では蛍光観察における励起光照射は細胞内環境を変化させてしまうため禁忌である。光に感受性の無い細胞でも, 強い光を照射すると細胞内の色素分子による光増感反応で活性酸素が産生され, 細胞毒性を示す。これらの問題は, 一般的な蛍光顕微鏡観察で利用されるサブ W/cm² 程度の励起光強度で起こり得る。一分子蛍光観察や STED などの超解像法のように kW/cm² ~ GW/cm² もの光を照射する場合には間違いなく光毒性・光損傷は免れることができない。しかし, もし励起光を照射せずに蛍光と同様の観察をすることができれば, 蛍光観察に付随するこのような数々の問題を回避することが可能となるであろう。そこで我々はホタルに代表される「生物発光」を用いたライブイメージングに着目した。生物発光は発光タンパク質(ルシフェラーゼ)が発光基質(ルシフェリンなど)の酸化を触媒する事で光が発生する“化学発光”現象である。ホタルやツキヨタケ, ウミシイタケ, 発光バクテリアなど多くの生物が発光タンパク質と発光基質によって発光することが知られている。多くの生物が生物発光を利用していることから, 生物発光を利用すれば生体に優しいバイオイメージングが可能になるに違いない。その潜在的有用性にもかかわらず, 実のところ生物発光は蛍光に比べて明るさが圧倒的に足りないことから, ライブイメージングの道具としてはほとんど利用されてこなかった。

2. Nano-lantern の開発

様々な化学発光タンパク質がある中で我々はウミシイタケ(*Renilla reniformis*)由来のルシフェラーゼ(RLuc)に着目した。理由は, ホタルのルシフェラーゼのように発光に ATP を必要とせず, 比較的分子量が小さい(ホタルルシフェラーゼが 60 kDa なのに対しウミシイタケルシフェラーゼは 36 kDa)からである。Rluc の発光量子収率は 0.053 であり, これを増加させることが高輝度化に結び付くと考えられた。しかしながら, どのように構造を変えていくべきかの指針が無いためまずは RLuc のタンパク質安定性を向上させることが知られているアミノ酸変異¹⁾を導入し, エラー誘発 PCR 法を用いてランダムに変異を導入し様々な変異体を作成した。この RLuc 変異体ライブラリー遺伝子をバクテリアに発現させてコロニーを形成させ, より明るく発光するものをピックアップすることで, 発光強度が向上した RLuc 変異体を得た。この発光強度の増加は発光基質との反応ターンオーバーの増加に起因しており, 依然として発光量子収率は改善されていないことが示唆された。どのように発光量子収率を改善しようか思案していた頃, 一つの論文が目にとまった。1976年に発表されたその論文にはウミシイタケから精製した RLuc と *Renilla* GFP を混合すると RLuc の発光スペクトルが *Renilla* GFP 様に変化し, かつ発光量が大幅に増加することが記載されていた。発光タンパク質の発光量子収率よりも蛍光タンパク質の蛍光量子収率が高ければ, FRET により

〒567-0047 茨木市美穂が丘8-1
TEL: 06-6879-8480
E-mail: ng1@sanken.osaka-u.ac.jp
2013年10月7日受付

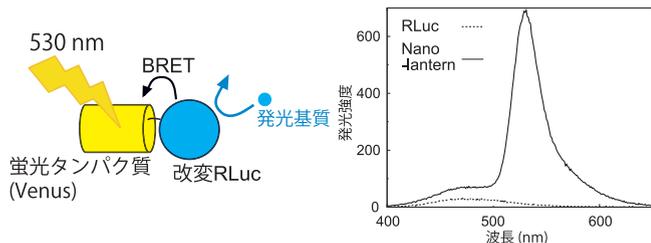


図1 Nano-lantern の模式図と発光スペクトル

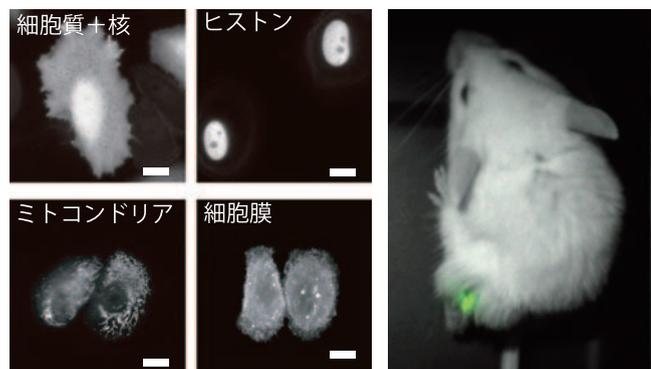


図2 Nano-lantern による細胞観察と自由行動している小動物個体内の癌の検出

発光量を増加させることが可能であるとの説明がなされている²⁾。Renilla GFP の蛍光量子収率が 0.3 であるため、理論上は $0.3/0.053 = 5.6$ 倍発光量が増加するはずであるが、まさに同じ程度の発光量が増加していた。そこで、我々は上記で得られた RLuc 変異体を、高効率に発光構造をとり蛍光量子収率が比較的高い (0.65) 黄色蛍光タンパク質 Venus³⁾ と融合させたタンパク質を作製した (図 1)。融合にあたっては様々な長さのリンカーペプチドや Venus の円順列変異体を用いて FRET 効率の高効率化を図った。大腸菌に発現させ精製したこの融合タンパク質の発光強度を測定したところ、RLuc に比べて発光強度は実に 10 倍以上に達した (図 1)。筆者らはこの高輝度発光タンパク質を自発的に発光する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)」と名付けた⁴⁾。

3. Nano-lantern による細胞・個体イメージング

細胞内における Nano-lantern の性能を検証するために、Nano-lantern に様々な細胞内小器官への局在化シグナル配列や、細胞骨格を構成するタンパク質などを融合し、HeLa 細胞に発現させた。Nano-lantern はそれ自身に蛍光タンパク質 Venus を有することから、青色光を照射して蛍光画像を撮影し、引き続き RLuc の発光基質である coelenterazine-h を培養液に添加して発光画像を撮影した。その結果、蛍光画像と遜色ない発光画像が得られた (図 2)。

次に Nano-lantern を用いてマウスの体内にある癌細胞を検出することができるかどうかを検証した。というのも、癌細胞の成長・転移を調べるために、これまででも蛍光や生物発光

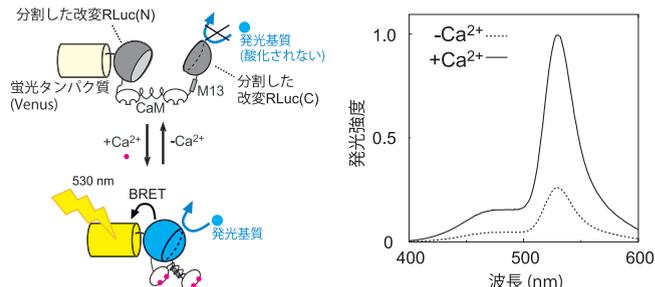


図3 Nano-lantern (Ca²⁺) の構造模式図と発光スペクトル

を用いて行われており、Nano-lantern の性能を調べるにはうってつけの系だと考えたからである。従来、蛍光で検出する場合は励起光を当てるためにマウスの毛を剃って光 (特に励起光) の透過性を上げる必要があった。一方、生物発光で検出する場合はシグナルが弱いために、麻酔して動かないようにし、長時間露光撮影する必要があった。これら従来法で得られた結果と比較するために、Nano-lantern を安定発現するマウス大腸がん細胞 colon26 を作製した。この癌細胞を BALB/c マウスの皮下に移植して数ミリ程度の大きさの腫瘍を作らせた後、毛を剃らず無麻酔で観察したところ、自由に動き回るマウスの背中で光る癌細胞の様子をビデオレート (30 画像/秒) で撮影することに世界で初めて成功した (図 2)。

4. Nano-lantern に基づく生理機能指示薬の開発

さらに我々は、細胞内で重要な働きを持つ生理活性物質を検出する機能性プローブを Nano-lantern を改変することで作製した。まず Nano-lantern の RLuc 部分の内部に Ca²⁺ に結合して構造が変化する calmodulin-M13⁵⁾ を挿入した (図 4)。挿入部位をいくつか検討した結果、228 残基と 229 残基の間に calmodulin-M13 を挿入した融合タンパク質 (Nano-lantern (Ca²⁺) と命名) が最も高い性能を示し、Ca²⁺ の結合により発光強度が 300% 変化した (図 3)。Nano-lantern (Ca²⁺) を HeLa 細胞に発現させたところ、薬剤刺激に伴う Ca²⁺ の変動を PC のメモリ容量限度までビデオレートで観察することができた (図 4)。また、青色光照射により神経を興奮させることができる ChR2 (チャネルロドプシン 2) と Nano-lantern (Ca²⁺) をラット海馬由来の神経細胞に発現させ、光照射に伴う Ca²⁺ の変動を捉える事に成功し、オプトジェネティクスとの併用が可能であることを実証した。

次に、Nano-lantern ベースの cAMP プローブの作製を試みた。cAMP についてはこれまで、PKA や EPAC の cAMP 結合ドメインを用いた指示薬が開発されているが、いずれも cAMP 結合に伴うシグナル変化量が小さいことが問題であった。そのような背景から、筆者らも cAMP 指示薬の作成にあたっては、困難を伴うことを予想した。しかしながら、EPAC1 の 170 番目から 327 番目の領域で Q270E 変異を有する cAMP 結合ドメインを Nano-lantern (Ca²⁺) calmodulin-M13 と置換した Nano-lantern (cAMP) は cAMP の結合により実に 130% も発光強度が上昇した。同じ領域を使用した FRET

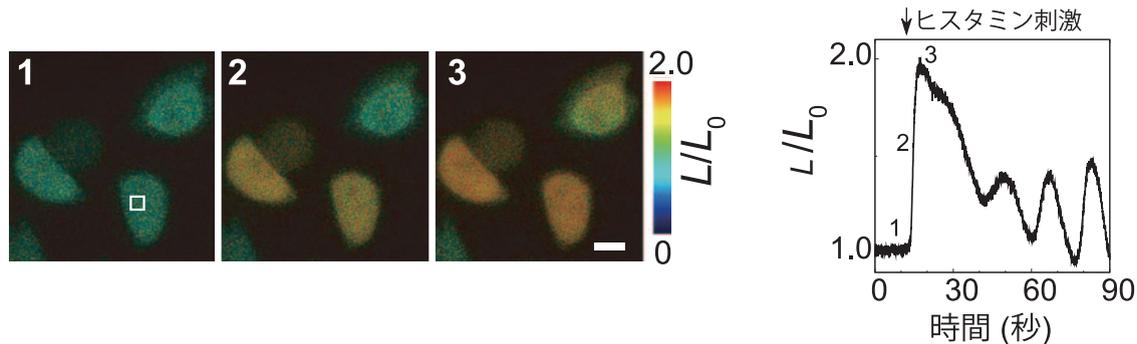


図4 Nano-lantern (Ca²⁺) を使ったビデオレート Ca²⁺ イメージング

型センサーが高々 12%しか変化を示さないのに比べると非常に大きな変化であった。この Nano-lantern (cAMP) を細胞性粘菌に発現させることで、走化性応答過程における cAMP を介したシグナル伝播を可視化することに成功した。

これらの結果から、他のセンサードメインに置換するだけで高性能な機能プローブができるのではないかと確信した。実際、FoF1-ATP 合成酵素の ε サブユニットに置換したところ、200%のシグナル変化量を持つ ATP プローブ Nano-lantern (ATP) を作製することができた。Nano-lantern (ATP) を葉緑体に発現させた遺伝子導入シロイヌナズナを作製し、これまで自家蛍光や光応答の問題があり蛍光での観察が困難であった植物の葉における ATP の可視化を試みた。その結

果、光合成による葉緑体内での ATP 産生と ATP 消費の動態を可視化する事に成功した (図5)。

5. 展 望

Nano-lantern およびそこから生み出されたプローブは遺伝子にコードされているため、任意の生物の多様な組織における計測を可能にする。Nano-lantern を用いることで、特別な処置をする事無くマウスを生物発光で観察できるため、多くの疾病の原因究明やより効果的な創薬スクリーニングが期待される。また、励起光を必要としない Nano-lantern は、照射により細胞の活動やタンパク質の機能を制御する「オプトジェネティクス」技術⁶⁾と組み合わせることが容易である。例えば、神経ネットワークの制御と神経活動の計測を同時に行うことができるため、複雑で実験が困難であった高次神経活動(行動, 思考, 記憶)の動作原理に迫る事が可能となるであろう。

文 献

- 1) Loening, A.M., Fenn, T.D., Wu, A.M. and Gambhir, S.S.: Consensus guided mutagenesis of Renilla luciferase yields enhanced stability and light output., *Prot. Eng. Des. Sel.*, 19, 391-400 (2006)
- 2) Ward, W.W. and Cormler, M.J.: In vitro energy transfer in Renilla Bioluminescence., *J. Phys. Chem.*, 80, 2289-2291 (1976)
- 3) Nagai, T. et al.: A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications., *Nat. Biotechnol.*, 20, 87-90 (2002)
- 4) Saito, K., Chang, Y.F., Horikawa, K., Hatsugai, N., Higuchi, Y., Hashida, M., Yoshida, Y., Matsuda, T., Arai, Y. and Nagai, T.: Luminescent proteins for high-speed single-cell and whole-body imaging., *Nat. Commun*, 3, 1262 (2012)
- 5) Horikawa, K., Yamada, Y., Matsuda, T., Kobayashi, K., Hashimoto, M., Matsu-ura, T., Miyawaki, A., Michikawa, T., Mikoshiba, K. and Nagai, T.: Spontaneous network activity visualized by ultrasensitive Ca²⁺ indicators. yellow Cameleon-Nano., *Nat. Methods*, 7, 729-732 (2010)
- 6) Deisseroth K.: Optogenetics., *Nat. Methods*, 8, 26-29 (2011)

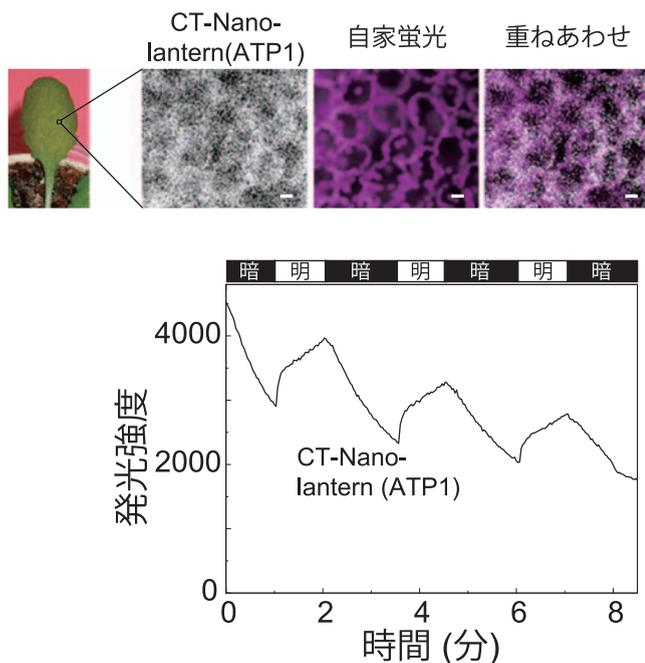


図5 Nano-lantern (ATP) によるシロイヌナズナの葉緑体における光合成依存的な ATP 合成の可視化