

研 究 報 告 書

「不透明な生体内における細胞内小分子の可視化と光制御法の開発」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研究者：小澤 岳昌

1. 研究のねらい

生物個体が生きた状態で、生体分子の機能や動態を可視化する技術、いわゆる「生体分子イメージング」は、生命科学研究の新たな基盤技術として大きな期待が寄せられている。これまでに緑色蛍光タンパク質(GFP)やその色変異体を用いて、生きた細胞内の生体分子をリアルタイムに可視化する方法が開発されてきた。しかし不透明な生物個体や自家蛍光の強い組織において、生体分子の機能やダイナミクスを検出することは未だ容易ではない。我々はこれまでに、緑色蛍光タンパク質(GFP)や生物発光タンパク質(ルシフェラーゼ)の切断と再構成を利用した「タンパク質再構成法」という、新たなレポータータンパク質の概念を創出し、その応用研究を展開してきた。タンパク質再構成法とは、特定の amino 酸残基で二分して失活させたレポータータンパク質を、近接あるいはペプチド組み継ぎ反応により再連結させ、そのレポーターとしての機能を回復させる方法である(図1)。

本研究ではルシフェラーゼ再構成法を応用展開し、自家蛍光の強い組織や不透明な生体内のサイクリック GMP (cGMP)、タンパク質間相互作用、pH 変化を低侵襲的に時空間解析する技術の開発を目的とした。

2. 研究成果

2-1) コメツキムシ由来ルシフェラーゼの再構成法
最も発光強度が強いコメツキムシ由来のルシフェラーゼ(ELuc)を基に、その切断位置を検討した。ラパマイシン添加により相互作用するFKBPとFRBタンパク質を利用して、FKBP-FRB 相互作用が起きた時に最大応答が得られるフラグメントの取得を目的とした。542 アミノ酸からなる ELuc の N 末側フラグメント1～mアミノ酸(m=406～417)と C 末側フラグメントn～542 アミノ酸(n=389～413)をコードするcDNA を PCR により作製した。N 末側のフラグメント各々には FKBP のcDNA を、C 末側のフラグメント各々に FRB のcDNA を連結した。N 末のフラグメントと C 末のフラグメントを含む融合タンパク質を HEK293 細胞に発現させた。一定時間後にラパマイシンを添加し、発光検出用プレートリーダーを用いて発光測定を行った。その結果、ラパマイシンの

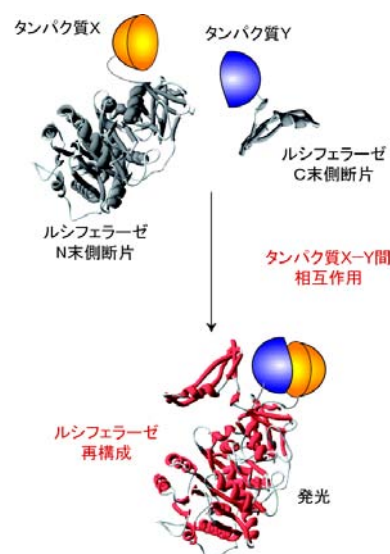


図1. ルシフェラーゼ再構成法の原理。

添加にともない、100 倍以上の大きな発光シグナルの上昇が観測された。N 末フラグメントと C 末フラグメントの最適な組み合わせは、N 末が 1～415 番目のアミノ酸、C 末が 394～542 番目のアミノ酸であることが解った。同様にコメツキムシ由来赤色ルシフェラーゼ(RLuc)についての切断位置を検討した。N 末側フラグメントが 1～414 番目、C 末側フラグメントが 395～542 番目のアミノ酸が、最も高い発光値を示すことが解った。

2-2) ルシフェラーゼ再構成法を用いた生物個体内の cGMP の可視化

これまでに cGMP の可視化には、GFP 誘導体を基にした蛍光プローブが用いられている。しかし生体組織や個体を用いたイメージングでは、その自家蛍光が cGMP 観察の障害となっている。本研究ではルシフェラーゼを用いた cGMP プローブを作製し、自家蛍光の強い生体

組織で観察可能な cGMP イメージング法の開発を目的とした。

cGMP 検出プローブは、ルシフェラーゼの N 末断片と C 末断片との間に、ホスホジエステラーゼ 5 (PDE5) の cGMP 結合ドメインを挿入した融合タンパク質からなる (図2A)。cGMP が PDE5 の cGMP 結合ドメインに結合すると、その立体構造が変化し、二分割したルシフェラーゼが再構成する結果、その発光能が回復する。すなわち cGMP の量に依存して、ルシフェラーゼの発光シグナルが得られる。

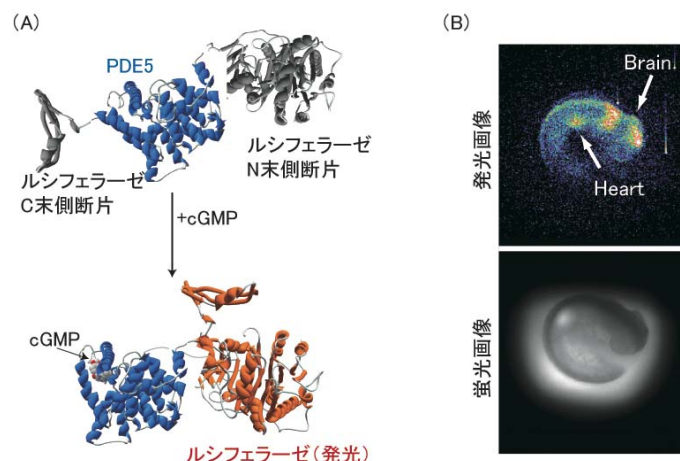


図2. (A) cGMP 発光プローブの原理. (B) ツメガエル卵発生過程の発光イメージング.

大腸菌発現系を用いて、cGMP プローブを精製した。このプローブに cGMP および cAMP を濃度依存的に添加した。その結果、cGMP の生理濃度で 30 倍以上の強い発光強度変化が得られること、また cAMP に対して 100 倍以上の選択性があることが解った。

次にアフリカツメガエル胚の発生過程における cGMP 産生の時空間解析を行った。アフリカツメガエル胚は卵黄を多く含むため自家蛍光が非常に強く、蛍光イメージングが難しい生物の一つである。cGMP 発光検出プローブの mRNA を 4 細胞期のアフリカツメガエル胚にインジェクションし、初期発生過程の cGMP 発光イメージングを行った。神経胚において形成された神経溝より発光が生じ、神経管が形成される尾芽胚まで発光強度の上昇が続いた。また、図 3B に示すように頭部にドット状の発光が、また心臓に一過的な発光が生じた。これは脳・心臓形成と cGMP 濃度上昇の関連を示唆する結果となった。さらに cGMP 産生酵素の阻害剤 ODQ を添加すると、発光強度は速やかに減衰することが解った。

さらに開発した cGMP 発光プローブの応用可能性を実証するために、植物個体で産生する cGMP のイメージングを試みた。まず cGMP 発光プローブを恒常的に発現するシロイヌナズナを作製した。このシロイヌナズナ個体について、塩刺激の有無における cGMP レベルの変動を調べた。その結果、1.5 M NaCl の塩刺激を加えると 0-60 分間に発光上昇が、また塩刺激を取り除くと 60-90 分に発光減衰が検出された。0.75M KCl(塩刺激)および 1.5 M Sorbitol (浸透圧刺激)を加えた場合にも顕著な発光上昇が検出された。以上の結果から、開発した cGMP プローブは自家蛍光の強い動物組織や植物個体において、生理条件下の cGMP 濃度変動を可視化するツールとなることを実証した。本プローブの応答原理を更に応用し、cAMP の発光プローブの開発に成功している。

2-3) マルチカラールシフェラーゼを用いた Smads 間相互作用の可視化

ツメガエル卵の発生過程において、Smads タンパク質は形態形成に重要な役割の担っている。たとえば骨形成因子 (BMP) が膜上のリセプターに作用すると、Smad1 がリン酸化され Smad4 と相互作用し、必要な遺伝子群を転写する。一方、Smad2 は、アクチビンなどの働きによりリン酸化され Smad4 と相互作用し、その生理機能を発動する。本研究では Smad1-Smad4 と Smad2-Smad4 相互作用を同時発光イメージングする技術開発を目的とした。Smad1 には RLuc の N 末側フラグメントを、Smad4 には ELuc の N 末側フラグメントを連結した。一方 Smad4 は、RLuc の C 末側フラグメントに 3 カ所アミノ酸変異を導入した新規フラグメント (McLuc1) を連結した。もし、Smad4 が Smad1 と相互作用すれば赤色のルシフェラーゼ発光が検出される。Smad4 が Smad2 と相互作用すれば緑色のルシフェラーゼ発光が検出される。2 色の異なる発光はフィルターを用いて分離することにより、どちらの相互作用が

起きているか判別が可能となる。

まず培養細胞 COS-7 を用いて, Smad1-Smad4 相互作用による発光シグナル変化を検討した。リセプターの常時活性体を細胞に発現させると, 発現していない場合と比較し 12 倍のシグナル変化が得られた。Smad2-Smad4 相互作用による発光シグナルについても同様に検討したところ, 14 倍のシグナル変化が得られた。次に, 各々の Smad タンパク質をコードする mRNA と黄色蛍光タンパク質 (Venus) の mRNA を, ツメガエル卵の 2 細胞期にインジェクションした。独自に開発した発光顕微鏡を利用し, 卵割から 48 時間の発生過程における個体の形態を Venus で, また Smad 間相互作用の局在をルシフェラーゼの発光により高感度冷却 CCD カメラで連続的に画像取得した。その結果, ステージ 12 から局所的な発光が観察され, ステージ 26 において Smad1-Smad4 相互作用は腹側で, Smad2-Smad4 相互作用は背側で起きていることが解った。ツメガエル卵の発生過程における Smad 間相互作用を初めて時空間解析することに成功した。

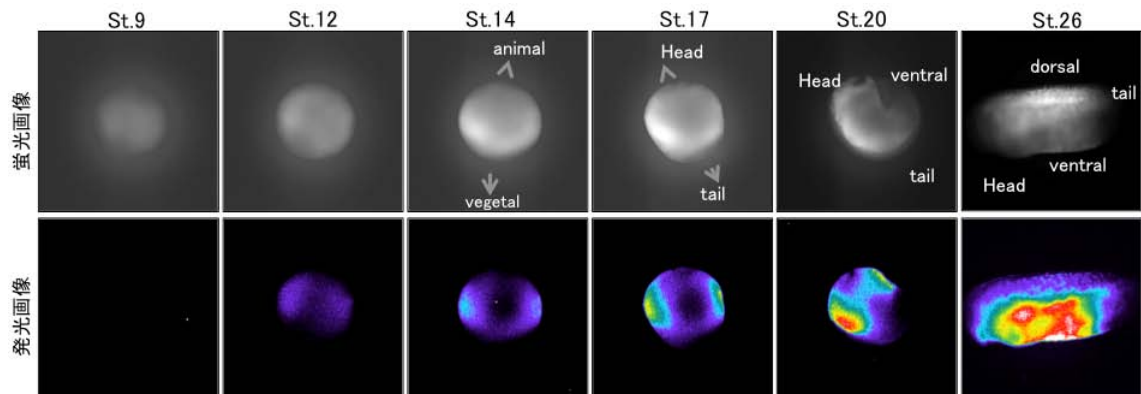


図3. ツメガエル卵発生過程における Smad1-Smad4 相互作用の発光イメージング。

2-4) 光応答性ルシフェラーゼの開発と細胞内 pH 変化のイメージング

pH 感受性プローブは, 細胞内タンパク質輸送の解析やガン細胞の可視化ツールとして期待されている。これまで蛍光性 pH プローブは様々開発されてきたが, 動植物個体に応用可能な発光プローブは未だ開発途上である。本研究では, 細胞内 pH をモニターするルシフェラーゼ発光プローブの開発を目的とした。pH 感受性タンパク質には, 光受容タンパク質フォトロピンの LOV2 ドメインを利用した。LOV2 の明状態と暗状態における構造変化の速度は, pH に依存することが知られている。

LOV2 の N 末端と C 末端に二分割したルシフェラーゼの断片を連結した, 光応答性ルシフェラーゼを開発した (図 4A)。この融合タンパク質は, 暗状態ではルシフェラーゼの発光能を維持することが解った。一方 440 nm の光を照射すると一時的に発光反応が低下し, さらに暗所におくと発光が次第に回復する特徴を有することを明かにした (図 4B)。この発光の回復時間は pH に大きく依存することがわかった。特に, pH7.0 以下の範囲において, 高感度にルシフェラーゼの発光回復時間が増加することがわかった。すなわち, プローブに光照射した後, 発光の回復速度をモニターすることにより, プローブ周囲の pH 変化を検出することができる。一方, 発光基質濃度や ATP 濃度には, 発光の回復時間は影響を受けないことが解った。この基質や ATP の濃度変動による発光値の不安定化は, 発光イメージングの大きな問題点であった。本検出系はこれらの問題点を克服する画期的な検出系となり得る。

次に, タンパク質プローブの利点である細胞内局在性を生かし, ミトコンドリアの自食 (マイトファジー) にともなう pH 変化のインビボ検出を目的とした。光応答性ルシフェラーゼの N 末端に, ミトコンドリア外膜に局在する Tom20 を連結したプローブを作製した。プローブを培養細胞に発現し, プローブをミトコンドリア外膜に局在させた。マイトファジーを誘導する試薬 CCCP を細胞に添加し, 発光の回復時間を測定した。その結果, CCCP 添加後 15 分後から

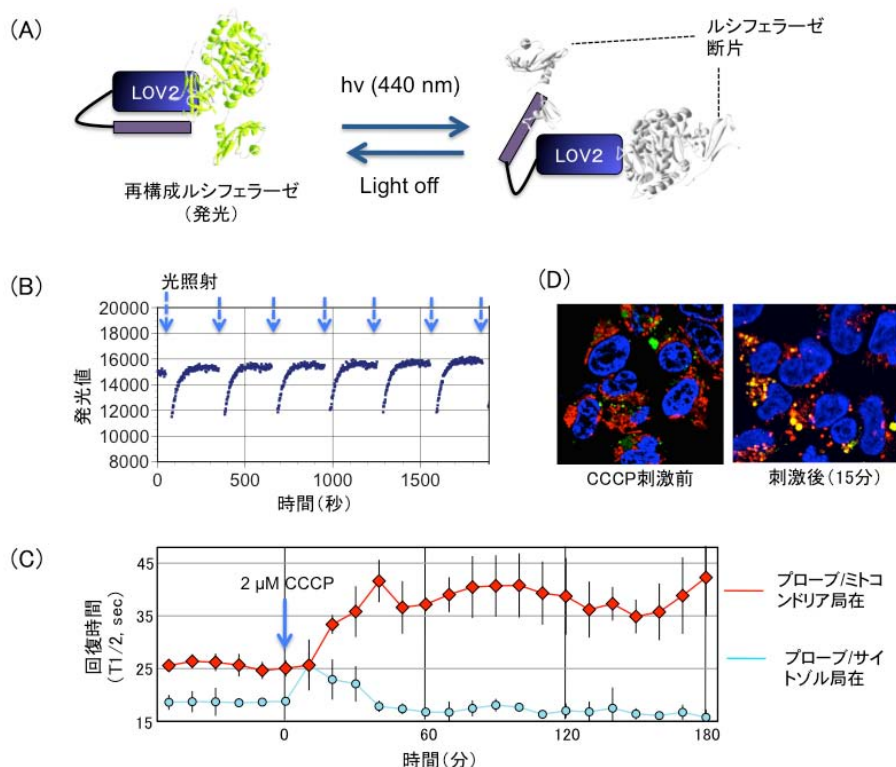


図4. (A) 光応答性ルシフェラーゼの原理. (B) 光照射に伴う一過的な発光値の減少. (C) マイトファジーによる pH の経時変化. プローブをミトコンドリア(赤)とサイトゾル(青)に局在させた. (D) CCCP 刺激によるマイトファジーの蛍光観察. ミトコンドリア(赤), リソソーム(緑), 核(青)を蛍光試薬で染色した.

発光回復時間が増加した(図4C). このCCCP刺激による応答の時間変化は、マイトファジーの蛍光イメージングによる時間変化と一致することがわかった(図4D).

開発したプローブの重要な特徴は、従来のルシフェラーゼの「発光量」に基づく分析ではなく、「発光回復時間」という新たな指標を導入することで、基質やATPの濃度に依存しない確度の高い検出系が確立できた点にある。従って、マイトファジーや細胞のガン化など、数時間から数日にわたる細胞内pH変動でも、基質やATPの濃度変動を考慮することなく、定量分析できる画期的な手法となることが期待できる。今後はガン細胞のモニタリングなどに応用が期待できる。

3. 今後の展開

独自に開発したタンパク質再構成法を基軸として、ルシフェラーゼを用いた分子プローブを開発し、蛍光イメージングでは困難であった自家蛍光の強いツメガエル卵やシロイヌナズナ植物個体をモデルとして、個体内ではたらく生体分子イメージングを可能にした。また、ルシフェラーゼの発光回復時間(LOV2構造変化の速度)を指標とする、全く新たな原理に基づいた発光イメージング法を創出したことは大きな成果である。現在ルシフェラーゼを用いた発光イメージングは、顕微鏡開発を含め世界に浸透し始めている一方、解決すべき課題が数多く顕在化してきた。その一つは空間解像度の改善である。現状の発光イメージングは蛍光イメージングと比較すると、平面解像度において未だ劣っている。また組織深部からのシグナルを検出することはできるが、正確な深度情報は得ることはできない。3次元空間解像度を如何に上げるかは今後の重要な課題である。また現在の技術では、時間分解能が秒オーダーであり生体内の早いシグナルを追跡することができない。時間分解能の向上は、より発光強度の強いルシフェラーゼの開発により達成されるであろう。今後は、これらの課題を一つずつ解決すると同時に、新たな生理現象やシグナルを可視化するプローブ開発をさらに進める予定である。このような生物個体の細胞内小分子やシグナル伝達を解析する新たな基盤技術

の開拓は、生命のより深い理解に繋がるものと期待される。

4. 自己評価

ルシフェラーゼの生物発光を利用して、自家蛍光の強い組織や個体のなかで働く生体分子のイメージングを可能にしたことは大きな成果である。これまでルシフェラーゼはフォトンカウントによる定量分析に応用されてきたが、検出感度の不足から分子イメージングを実現することは容易ではなかった。本研究では、顕微鏡の光学系の改良や高感度 CCD カメラの活用により、ルシフェラーゼプロローブの微弱な発光が検出できるようになり、自家蛍光の強い生体内のシグナルを追跡できることを実証したことは、当初の目的を達成し得たといえる。さらにツメガエル卵の cGMP 発光イメージングにより、cGMP の新たな役割や植物個体内の cGMP の機能について、予期していなかった新たな生理現象が見えてきたことは大きな成果であった。現在生化学実験および分子生物学実験おこない、cGMP の生理的意義を探究している段階にある。新規発光イメージングから新たな生理現象を発見する最終ゴールには期間内に達成できなかったが、発光イメージングによる生物個体のイメージングを実現し、その大きな可能性を提示することが十分にできた点は大きな成果である。

5. 研究総括の見解

自己評価にも記載されているように自家蛍光の強い細胞内発光イメージングを本研究者が開発したルシフェラーゼ分割・再構成法を確立し、さらに多色での分子間相互作用のイメージングにも成功している。cGMP 産生のイメージングは大変立派な成果である。自家蛍光の強いツメガエル卵の初期発生段階のイメージングは新しい発見をもたらしている。そのほか多彩な研究が成功裏に進められている。マウス個体での現象・解析への発展を期待したい。

多大な努力と困難な問題を着実に解決されての独創性の高い素晴らしい成果である。高く評価したい。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

	• N. Hida, M. Awais, M. Takeuchi, N. Ueno, M. Tashiro, T. Singh, M. Hayashi, K. Ohmiya and <u>T. Ozawa</u> , “High-Sensitivity Real-Time Imaging of Dual Protein-Protein Interactions in Living Subjects Using Multicolor Luciferases”, PLoS ONE, 4, e5868 (2009).
	• M. Takeuchi, Y. Nagaoka, T. Yamada, H. Takakura and <u>T. Ozawa</u> , “Ratiometric Bioluminescence Indicators for Monitoring Cyclic AMP in Live Cells Based on Luciferase-Fragment Complementation”, Anal. Chem., 82, 9306–9313 (2010).
	• N. Misawa, A.K.M. Kafi, M. Hattori, K. Miura, K. Masuda and <u>T. Ozawa</u> , “Rapid and High-sensitivity Cell-based Assays of Protein-protein Interactions Using Split Click Beetle Luciferase Complementation: An Approach to the Study of G Protein-coupled Receptors”, Anal. Chem., 82, 2552–2560 (2010).
	• S. B. Kim and <u>T. Ozawa</u> , “Creating Bioluminescent Indicators to Visualize Biological Events in Living Cells and Animals” Supramol. Chem., 22, 439–448 (2010).
	• A.K.M. Kafi, M. Hattori and <u>T. Ozawa</u> , “Luciferases for the Study of Protein-Protein Interactions in Live Cells and Animals”, Nano Life, 1, 45–62 (2010).

(2)特許出願

研究期間累積件数: 5件(海外2件、国内3件)(非公開を希望)

(3)受賞

・小澤岳昌、バイオビジネスコンペ JAPAN バイオ先端知賞(武田計測先端知財団)
(2009 年 3 月)

・小澤岳昌、第7回(平成22年度) 日本学術振興会賞 (2011年2月)

(4)著書

・小澤岳昌,「RNA イメージング法」実験医学増刊, 26, 59-67 (2008).

・小澤岳昌,「発光タンパク質で細胞内をみる」, 未来材料, vol 9, p28-35 (2009).

・小澤岳昌,「RNA とタンパク質局在のイメージング(新しい地平をひらく分析手法の最前線)」化学フロンティア, 北森武彦編, 111-118, 化学同人(2009).

・小澤岳昌,「生体分子の機能を可視化するGFP再構成法」化学と工業, 62, 129-132 (2009).

・小澤岳昌,「蛍光・発光タンパク質を用いた再構成法による分子イメージング」実験医学, 28, 27-32 (2010).

(5)招待講演

招待講演(国際)

・T. Ozawa, “Optical Imaging of Biomolecules in Living Cells and Animals Using Split-Reporter Reconstitution Analysis”, 1st Workshop in the Advanced Light Microscopy (DKFZ), Heidelberg, Germany (2008).

・T. Ozawa, “Fluorescent and Bioluminescent Proteins Engineered by Protein Splicing to Visualize Biological Function”, VIII European Symposium of the Protein Society, Zurich, Swiss (2009).

・T. Ozawa, “Fluorescent and Bioluminescent Probes for Visualizing Biological Functions in Living Cells”, NF- κ B Training Session & Symposium, Liverpool, UK (2009).

・T. Ozawa, “Fluorescent and Bioluminescent Proteins Engineered for Visualizing Biological Function in Live Cells”, Annual Meeting of Korean Society for Molecular Imaging, Seoul, Korea (2010).

・T. Ozawa, “Fluorescent and Bioluminescent Proteins Engineered to Visualize Biological Function in Single Living Cells”, Single Cell Analysis Summit, San Diego, USA (2010).

招待講演(国内)

・小澤岳昌,「タンパク質再構成法を用いた生体分子イメージング」, 薬物動態学会 23 回年会(熊本)(2008).

・小澤岳昌,「GFP 再構成技術を用いた生体分子の可視化」, 日本化学会第89春季年会(千葉), 3月(2009).

・小澤岳昌,「新規光プローブが拓く生体分子イメージング」, 第 31 回日本光医学・光生物学会(大阪)(2009).

- ・小澤岳昌,「分子プローブが拓く生細胞内シグナルの可視化法」, 2009 年電気化学秋季大会(東京)(2009).
- ・小澤岳昌,「生きた動物体内における分子機能イメージング」, 日本分子イメージング学会第 5 回学術集会(滋賀)(2010).