

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05717

研究課題名(和文) 追従性の高いレポーター遺伝子となる早熟な蛍光タンパク質の開発

研究課題名(英文) Engineering fast maturing fluorescent proteins as improved reporter genes

研究代表者

新野 祐介 (Niino, Yusuke)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・研究員

研究者番号：10584584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：申請者はこれまでに、成熟が速く追従性の高いレポーター遺伝子となる黄色蛍光タンパク質(YFP) Achillesを開発している。本研究では、そのさらなる早熟化と、複数の遺伝子発現動態の同時可視化を目指し、早熟なシアン色蛍光タンパク質(CFP)の開発を行った。これらの新規早熟YFP・CFPを用いてデュアルレポーターを構築し、蛍光観察およびフローサイトメトリーにより、個々の細胞における遺伝子発現二種の同時検出に成功した。また、新規早熟YFPに光安定性の向上も見出し、副産物として、既報の最も光安定なYFPよりもさらに褪色しにくいYFPを創出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蛍光タンパク質は、遺伝子発現動態を調べるためのレポーター遺伝子として広く用いられているが、蛍光タンパク質と異なり、二光子励起顕微鏡による三次元的可視化やフローサイトメトリーによるハイスループット解析が可能である一方、発色団の成熟(特に酸化反応)に時間がかかるため、レポーターとしては追従性の低さが欠点となる。本研究では、酸化反応に特化した開発により早熟YFPをさらに早熟化し、また、組み合わせることで利用可能な早熟CFPを新たに創出できた。より多種の遺伝子発現を同一細胞内で同時検出する展開が望まれるが、今後、本研究の開発スキームを活かした早熟蛍光タンパク質のさらなる多色化が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, I developed a faster maturing variant of the yellow fluorescent protein (YFP) Achilles by finding mutations that accelerate the oxidation process and a fast maturing cyan fluorescent protein (CFP) for the combined use with the Achilles variants. These new YFP and CFP were applied for dual gene expression analysis of single cells by using multicolor imaging and multiparameter flow cytometry. Also, I found the improvement of photostability in the Achilles variants and created a new YFP that is more photostable than the most photostable YFP reported to date.

研究分野：バイオイメージング

キーワード：蛍光タンパク質 レポーター遺伝子 蛍光イメージング タンパク質工学

## 1. 研究開始当初の背景

オワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質 (GFP) に代表される蛍光タンパク質は、研究対象とする遺伝子のプロモーター下流に配してその発現動態を調べるレポーター遺伝子として広く利用されている。ルシフェラーゼを筆頭とした基質を要する発光タンパク質と異なり、蛍光タンパク質はそのペプチド自身を発色団の材料にして、補因子を必要とせずに発光を生むことができる。しかしルシフェラーゼが、そのペプチドが三次構造へとフォールディングした時点で発光活性を獲得するのに対し、蛍光タンパク質が発光活性を得るまでには成熟に時間がかかる。多くの場合、レポーター遺伝子には、研究対象の遺伝子そのものをつないで遺伝子産物の分解もまたモニターするか、PEST 配列などのデグロン (分解シグナル) をつないで半減期を短くし、バックグラウンドを下げることで検出感度を高めて使用する。そのため、従来の成熟の遅い蛍光タンパク質では、短時間の発現変動だと発光を発する頃には遺伝子産物が分解されてしまい、追従することができない。したがって「早熟」な蛍光タンパク質が必要となる (図 1)。

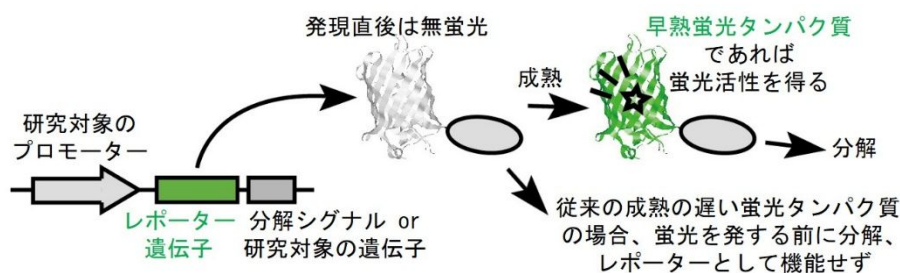


図 1. レポーター遺伝子としての早熟蛍光タンパク質の必要性

申請者の所属研究室では以前、早熟な黄色蛍光タンパク質 (YFP) として Venus (Nat. Biotechnol. 20(1), 87-90 (2002)) を報告している。しかし実際に、マウスの未分節中胚葉で 2~2.5 時間周期の発現振動を示すことが知られる Hes7 遺伝子の蛍光レポーターには、Venus では不足で、申請者が Venus を鋳型に開発したより早熟な YFP Achilles を要した (京都大学 再生医科学研究所 影山龍一郎研究室との共同研究)。

## 2. 研究の目的

蛍光タンパク質が 65~67 番目のトリペプチドから発色団を形成する際には、環化・脱水・酸化のプロセスが必要であり、特に酸化反応に時間がかかることが知られている。Venus の早熟化に重要な変異は、酸化反応を高速化する変異を意図的に模索して得られたものではなく、結果的にこのプロセスに寄与していることがわかったものである。Achilles の開発においても、酸化反応に着目してはいなかった。本研究では、酸化のプロセスに特化したスクリーニングを行い、より早熟な蛍光タンパク質を開発すること、また、複数の遺伝子発現動態の同時可視化ができるよう、Achilles 新規変異体と組み合わせて観察可能なシアン色蛍光タンパク質 (CFP) の早熟変異体を創出することを目的とした。

## 3. 研究の方法

形質転換した大腸菌を低酸素環境で生育し、蛍光タンパク質を酸化反応の手前まで成熟させておき、空気暴露させた際の大腸菌コロニーからの蛍光発生を経時観察することで、酸化のプロセスの遅速を評価する。ランダムに変異導入を行った蛍光タンパク質を発現させた大腸菌から、早熟化に有用な変異を複数発見し、それらを集積させてより早熟な蛍光タンパク質を作出する。哺乳類細胞における早熟化は、顕微鏡下で培養細胞に mRNA でパルス的に遺伝子導入した際の、蛍光発生のタイムコースを調べることで検証する。レポーター遺伝子としての機能は、プロモーター下流に強分解シグナルを融合した早熟蛍光タンパク質を配して蛍光レポーターを構築し、哺乳類培養細胞の系で確認する。最終的には、得られた新規早熟 YFP・CFP に同分解シグナルを融合した上で、異なるプロモーター下に配したデュアルレポーターを構築する。単一細胞内における遺伝子発現二種の同時検出を、マルチカラーイメージングおよびフローサイトメトリーにより試みる。

## 4. 研究成果

### (1) 酸化プロセスの高速な早熟 YFP・CFP の開発

Achilles を鋳型に、酸化反応に着目して行った大腸菌発現系でのスクリーニングにより、有用な変異を複数見出し、重ね合わせることで、元の Achilles よりさらに酸化プロセスの高速な YFP を得た。また CFP において、酸化速度がこの Achilles 新規変異体よりもさらに高い変異体を見出した。哺乳類細胞での評価においても、顕微鏡下で培養細胞に mRNA での遺伝子導入をパルス的に行う実験系で成熟速度を比較した結果、特にこの早熟 CFP は、現在一般的に用いられている明るく成熟の速い CFP mTurquoise2 (Nat. Commun. 3, 751 (2012)) は元より、Achilles やその新規変異体よりもさらに早熟であることがわかった。

### (2) 早熟蛍光タンパク質を用いた遺伝子発現レポーターの構築

現在、レポーター遺伝子アッセイでよく利用されている PEST 配列よりも強力な分解シグナルであるユビキチン G76V を、開発した早熟蛍光タンパク質に融合し、バックグラウンドをより軽減した蛍光レポーターを構築した。NF-

活性レポーターにおける TNF 刺激に対する応答性などで、その機能確認を行った。哺乳類培養細胞に導入し、蛍光顕微鏡で個々の細胞の遺伝子発現の経時変化をモニターできることを確認した(図2)。また、マルチウェルプレートリーダーでの測光により、ルシフェラーゼを用いた発光レポーターと同様にリガンド濃度依存の活性を測定できることを確認した。

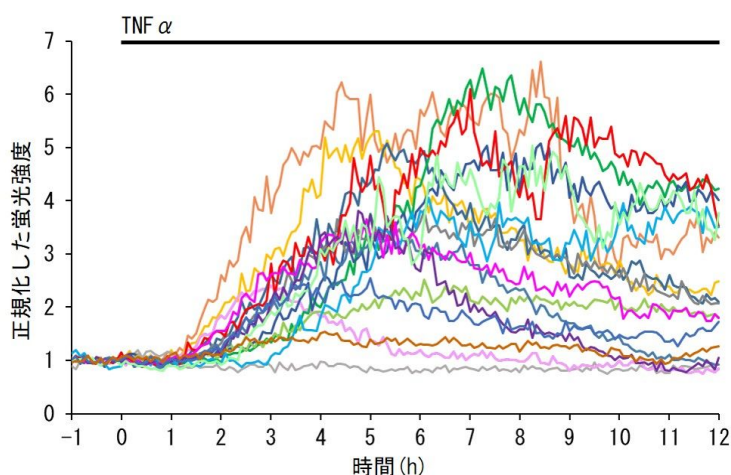


図2. Achilles 新規変異体を用いた NF- 活性レポーターにより取得した HEK293 細胞個々の TNF 応答。内部参照として発現させた赤色蛍光タンパク質の蛍光シグナルおよび刺激前のベースラインで正規化した。

### (3) 副産物としてのより光安定性の高い YFP の創出

観察時の励起光照射によって生じる蛍光タンパク質の褪色は、データ解析に必要な定量性を求める上で問題となる。そのため、光安定性の高さ(褪色しにくさ)は重要な要素である。また、蛍光タンパク質の中でもとりわけ YFP は褪色しやすい傾向がある。申請者は、酸化速度を引き上げた Achilles 新規変異体について評価を行っている際に、光安定性にも向上を見出した。本研究期間中に、既報の YFP の中で最も光安定な YFP mGold が報告されたが (Sci. Adv. 6(43), (2020)) Achilles 新規変異体さらに有効な変異を重ねることで、その mGold を上回る光安定性を持つ YFP を副産物として創出することができた。

### (4) デュアルレポーターを用いた遺伝子発現二種の同時検出

早熟 YFP・CFP それぞれにユビキチン G76V を融合し、単一ベクター上で逆向きに配置した異なるプロモーター下にそれらを配して、デュアルレポーターを構築した (NF- 活性レポーターと CRE (cAMP 応答配列) 活性レポーターなど)。細胞内の蛍光シグナルの内部参照とするため、同一ベクターにて赤色蛍光タンパク質 (RFP) も発現させた。顕微鏡観察をより容易にするため、この RFP を核局在化、蛍光レポーターについても核局在化したコンストラクトもまた構築した。マルチカラーイメージングおよびマルチパラメーターフローサイトメトリーにより、個々の細胞における遺伝子発現二種の同時検出に成功した。

フローサイトメトリーは液中を流して整列させた個々の細胞からレーザーを使って蛍光検出を行う系であるため、発光レポーターを利用することはできない。また、二光子励起顕微鏡や共焦点顕微鏡を用いた三次元的可視化も蛍光レポーターならではの手法であり、レポーターマウスなど生体内や、その固定後、透明化後のサンプル、あるいはスフェロイドやオルガノイドなどの三次元培養系において、一細胞レベルのより詳細な空間的分布情報を得ることが期待できる。今後は、遺伝子発現振動など上下動の激しい現象に対して、同一細胞内での複数同時可視化を応用していく予定である。また、より多種の遺伝子発現を同時検出可能にするために必要な、(より長波長の蛍光タンパク質を含めた) 追従性の高い蛍光レポーターのマルチカラー化に、本研究の早熟蛍光タンパク質の開発スキームは活かすことができると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 新規蛍光タンパク質、及びその利用	発明者 新野祐介、宮脇敦史	権利者 国立研究開発法人理化学研究所
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/037578	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------