

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：23201

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15450

研究課題名（和文）分割型AkaLucを用いたPPAR リガンドの生体内可視定量技術の開発

研究課題名（英文）Development of in vivo imaging and quantification technique for PPAR gamma ligand using split AkaLuc

研究代表者

真野 寛生（Mano, Hiroki）

富山県立大学・工学部・研究員

研究者番号：20787634

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：NanoLuciferase (NLuc)の分割型であるNanoBiT技術を用い、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体（PPAR）のリガンドを高感度に検出し可視化するバイオセンサーを構築するのが目的であった。PPARのLBDと相互作用するLXXLL配列を網羅的にスクリーニングし、LXXLL配列の最適化を行って、相対発光変化量が大きく発光強度の高いものへと改良した。最終的に、PPARリガンドであるRosiglitazoneに反応して発光が約30倍増加し、発光強度の高いバイオセンサーの創出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体（PPAR）の合成リガンドは、糖尿病やアルツハイマー病をターゲットに研究が行われており、本バイオセンサーの開発に成功し実用化できれば、PPARリガンドの体内動態・脳内移行を長期的に調べることが可能となり、医薬品の副作用の有無を評価するなど、医療面で大きく貢献できると考えられる。今回開発に成功したPPARバイオセンサーは、PPARリガンドのスクリーニングにも応用が可能であるため、糖尿病やアルツハイマー病の治療薬の開発にも貢献できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Using NanoBiT technology, which is a split type of NanoLuciferase (NLuc), the purpose was to construct a biosensor that detects and visualizes the ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) with high sensitivity. The LXXLL sequence that interacts with the LBD of PPAR was comprehensively screened, and the LXXLL sequence was optimized to improve the relative light change amount to a large amount and high light intensity. Finally, the luminescence increased about 30 times in response to the PPAR ligand Rosiglitazone, and we succeeded in creating a biosensor with high luminescence intensity.

研究分野：遺伝子工学

キーワード：バイオセンサー PPAR 核内受容体 ルシフェラーゼ 分割型ルシフェラーゼ

### 1. 研究開始当初の背景

ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) の合成リガンドは糖尿病、脳梗塞やアルツハイマー病をターゲットに研究が行われている。特に、PPAR $\gamma$  リガンドの体内動態・脳内移行を長期的に調べることは医薬品の副作用の有無を評価する上で極めて重要である。化合物の生体内移行を評価する方法として、ポジトロン断層撮影法 (PET) イメージングが用いられるが、化合物を放射性物質で標識するため、本来の PPAR $\gamma$  リガンドの物性が失われることや、安全面に問題がある。従って、これらの問題を克服する新規の評価方法の開発が必要である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、分割型ルシフェラーゼ法を用い、生体内における PPAR $\gamma$  リガンドを可視化する検出系を構築することである。また、本検出系は PPAR $\gamma$  リガンドの結合親和性も評価可能であるため、*in vitro* ハイスループットスクリーニング系の確立にも取り組む。本研究の成果は、生体内の PPAR $\gamma$  リガンドの動態や作用機序の解明、および疾患の予防や治療薬開発にも繋がる可能性が高く、医学・薬学の発展に大きく貢献できるものと考えられる。

ロシグリタゾン (Rosiglitazone) などの PPAR $\gamma$  リガンドが PPAR $\gamma$  に結合すると、続いて転写活性化因子と相互作用が起こり、PPAR $\gamma$  リガンド-PPAR $\gamma$ -転写活性化因子複合体を形成して下流の遺伝子を活性化する。この相互作用は、PPAR $\gamma$  内に存在するリガンド結合領域 (LBD) と転写活性化因子内に存在する LXXLL モチーフと呼ばれる特異的な配列を介して起こることが知られている。従って、LBD-LXXLL 間相互作用を検出することは、同時に PPAR $\gamma$  リガンドを検出していると解釈することができる。

タンパク質-タンパク質間相互作用やリガンド-タンパク質間相互作用を発光で検出する方法として、分割型ルシフェラーゼ法が知られる (図1)。本研究では、分割型ルシフェラーゼ法を用い、PPAR $\gamma$  リガンドの結合に起因して生じる LBD-LXXLL 間相互作用を発光で検出する PPAR $\gamma$  バイオセンサーを構築し、PPAR $\gamma$  リガンドの検出を目指す (図2)。

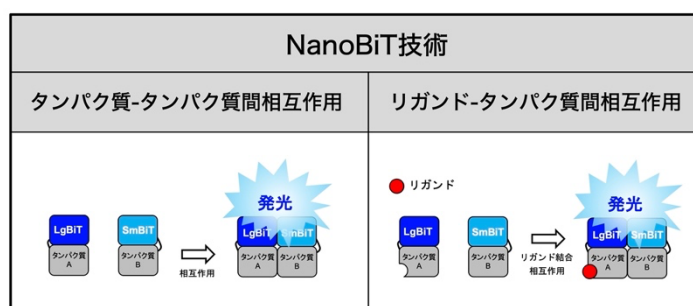


図1. NanoBiT技術の原理

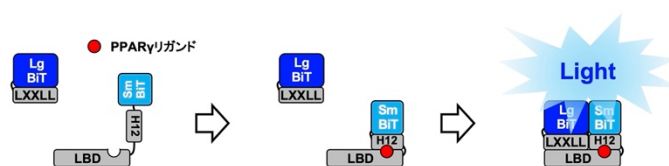


図2 NanoBiT技術を用いたPPAR $\gamma$ リガンドバイオセンサー

### 3. 研究の方法

分割型ルシフェラーゼ法を用いたバイオセンサーを構築する際、相互作用に関与するアミノ酸配列の長さや領域の最適化、分割型ルシフェラーゼ断片各々の組み合わせが極めて重要となる。研究開始当初は、赤色発光を生じる Akaluc の分割型ルシフェラーゼ断片でのバイオセンサー

一の開発を目指していたが、別プロジェクトにおいて N 末及び C 末領域の分割部位の選定が困難を極めたため、発光強度の高いナノルシフェラーゼ (NLuc) の断片である LgBiT および SmBiT から成る NanoBiT 技術を用いて研究を進めることに方針転換した。



図3. PPAR $\gamma$  バイオセンサーをコードするプラスミド DNA の構造

先行研究より、LgBiT-LXXLL および LBD-SmBiT の 2 分子から成るバイオセンサータンパク質をコードするプラスミド DNA を作製し、基本骨格とした (図3)。作製したプラスミド DNA を哺乳動物細胞 (COS-7 細胞) に遺伝子導入してから 48 時間後に Rosiglitazone を添加し、60 分後に発光基質を加え、発光検出が可能なプレートリーダーを用いて発光強度を測定し、発光強度の比較と相対発光変化量の算出を行った。発光強度および相対発光変化量の大きいバイオセンサーを構築するために、LgBiT-LXXLL および LBD-SmBiT バイオセンサー中の LXXLL 配列および (GGGS) $\times$ 3 リンカー配列等の最適化を行った。

#### 4. 研究成果

図3に示した LgBiT-LXXLL を基本骨格とし、LXXLL 配列の種類および長さを調節したプラスミド DNA を複数種作製し、LBD-SmBiT と共発現させた COS-7 細胞に PPAR $\gamma$  リガンドである Rosiglitazone を添加してから 60 分後の発光量および相対発光変化量を比較した (図4)。

その結果、相対発光変化量が約 7-8 倍を示す LXXLL 配列は 2 種類

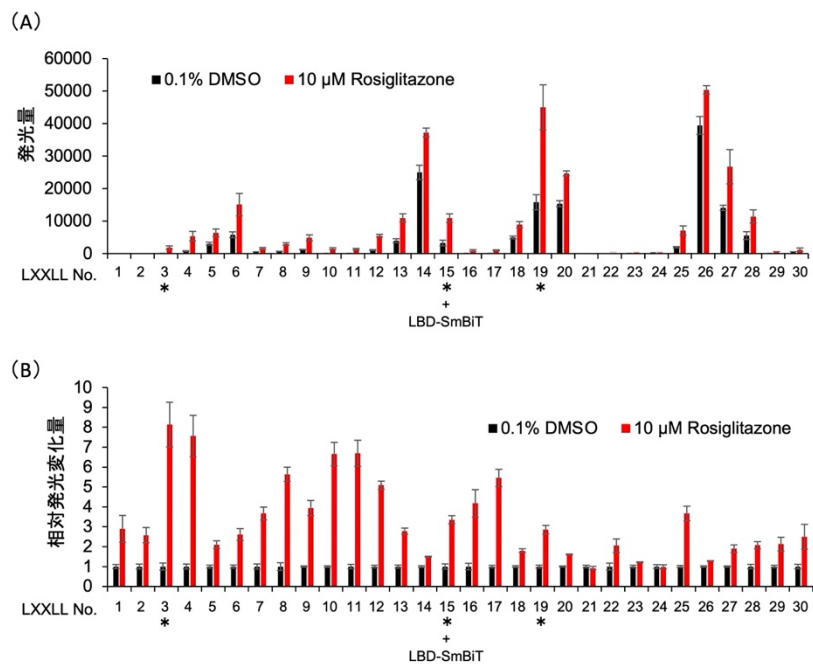


図4. LXXLL配列の検討結果

(LXXLL No.3,4) 得られたが、いずれも発光量が小さかった。一方、発光量が高い LXXLL 配列として、LXXLL No.14,19 および 26 が得られたが、いずれも相対発光変化量が 3 倍以下であった。これらは PPAR $\gamma$  リガンドの非存在下でも発光量が高いことから、LBD と親和性が高い LXXLL 配列であると考えられる。そこで、PPAR $\gamma$  リガンドの非存在下において LBD と LXXLL 配列間の相互作用を妨げ、優先的に LBD と結合するペプチド (抑制配列) をバイオセンサー内に挿入することで、PPAR $\gamma$  リガンド非存在下における LXXLL-LBD 間相互作用を抑制し、PPAR $\gamma$  リガンド添加後の見かけ上の相対発光変化量を大きくするのではないかと考えた。この仮説を念頭に、図5に示すように、LBD の N 末側に PPAR $\gamma$  リガンド非存在下において LBD と親和性の高い抑制配列を繋いだ抑制配列-LBD-SmBiT バイオセンサーを新たに構築した (LXXLL 配列および抑制配列の詳細については、特許出願中により配列は非公表)。抑制配列

を挿入した抑制配列-LBD-SmBiT  
と LXXLL No.19 を共発現させると、PPAR $\gamma$  リガンド添加後の相対発光変化量が約 20 倍まで増加した (図 6)。また、LXXLL No.15 およ

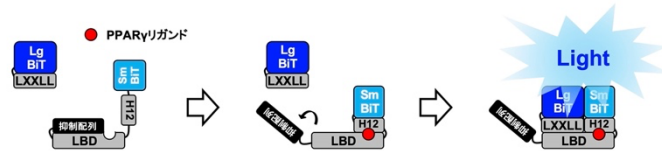


図5. PPAR $\gamma$ リガンドバイオセンサーの改良

び 19 のアミノ酸を一つずつ長さの変更を行った LXXLL No.15-8 および 19-6 は、PPAR $\gamma$  リガンド添加後の相対発光変化量は約 25 倍、35 倍までそれぞれ増加した。しかし、LXXLL No.19-6 は発光量がやや低いため、発光量も相対発光変化量も大きい LXXLL No.15-8 が PPAR $\gamma$  バイオセンサーとして相応しいと判断した。現在、LXXLL No.15-8 および抑制配列-LBD-SmBiT の組み合わせでさらに改良を行っている。

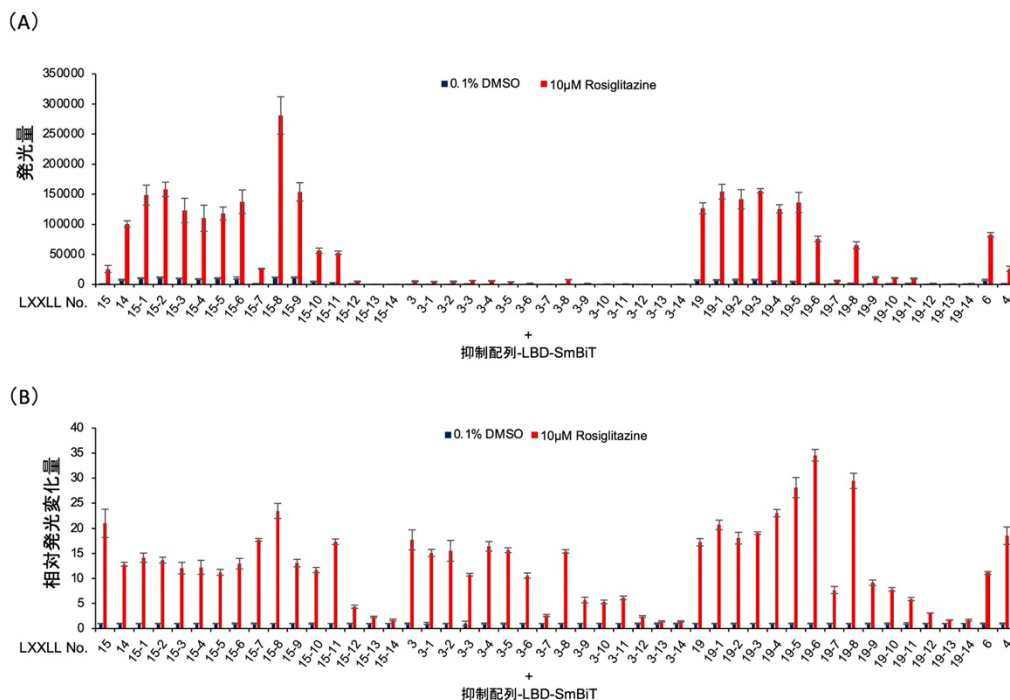


図6. 抑制配列挿入の効果およびLXXLL配列の最適化

本申請期間においては、生体イメージングに有利な Akaluc の分割型ルシフェラーゼ法を用いて PPAR $\gamma$  リガンドを検出するバイオセンサーの構築が目標であったが、発光強度の高い NanoBiT 技術で PPAR $\gamma$  リガンドを検出するバイオセンサーの開発に成功した。NanoBiT の場合、発光波長が短く、深部からの発光を検出するには不利である。生体イメージングに向けて、まだまだ課題は多く残されている。

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

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------