

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 8日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590266

研究課題名（和文） 生物発光長期イメージングによる時計タンパク質の核—細胞質間シャトル機構解析

研究課題名（英文） Analysis of intracellular localization of clock protein by means of bioluminescence imaging technique

研究代表者

中島 芳浩（NAKAJIMA YOSHIHIRO）

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・研究グループ長

研究者番号：10291080

研究成果の概要（和文）：

本研究では、時刻依存的な時計タンパク質の核—細胞質間シャトルを生物発光プローブを用いた長期発光イメージングにより、時計タンパク質の細胞内局在の変化を追跡し、時刻依存的な局在変化の分子機構解明を目的とする。このため発光イメージングに特化した発光プローブの改良、およびイメージング条件の最適化などの基盤技術の構築に成功、さらに時計タンパク質の細胞質と核の間の連続する局在変化の可視化に成功した。

研究成果の概要（英文）：

To visualize intracellular localization of clock protein by means of bioluminescence imaging technique, we have developed an enhanced green-emitting luciferase (ELuc) probe. ELuc exhibits a light signal in mammalian cells that is over 10-fold stronger than that of the firefly luciferase (FLuc), which is the most widely used luciferase reporter gene. We showed that ELuc produces a strong light signal in primary cells and tissues and that it enables the visualization of gene expression with high temporal resolution at the single-cell level. Moreover, we successfully imaged the nucleocytoplasmic shuttling of clock protein (mPER2 and mCRY2) by fusing ELuc at the intracellular level.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、環境生理学（含体力医学・栄養生理学）

キーワード：生物時計

## 1. 研究開始当初の背景

近年の生体時計の分子機構解析の急速な進展により、概日リズムは24時間周期で発現する時計遺伝子群及び被時計遺伝子群によるコアフィードバックループ及びインターロックフィードバックループ機構により作り出されること明らかとなっている。これ

らのループでは、時計遺伝子及び被時計遺伝子群の転写、翻訳、翻訳後修飾の制御に加え、時刻依存的な核移行が極めて重要なステップであることが知られているが、この細胞内移行制御に関する分子機構に関しては、転写制御機構の研究と比べ、方法論的な限界ゆえ未だ不明な点が多い。特に、時間決定に深く

関与する時間依存性の核—細胞質間シャトルに関する詳細な分子機構については未解明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、発光タンパク質ルシフェラーゼをプローブに用い、発光イメージングという新しい細胞内局在の可視化テクニックを駆使することで、既存の技術では困難であった24時間周期で起こる時刻依存的な時計タンパク質の核—細胞質間シャトルの分子機構を解明することを目的とする。

これまで発光イメージングについては、北米産ホタル (FLuc) が発光プローブとして汎用されてきたが、CCD カメラを検出器とする発光イメージングでは発光量の不足により十分な時空間分解能が得られなかった。特に、本研究の目的とするタンパク質の細胞内局在の発光イメージングでは、標的タンパク質とルシフェラーゼを融合させる必要があるため、他のタンパク質との融合によるルシフェラーゼタンパク質のコンフォメーション変化などに起因する発光強度の低下が生じ、ルシフェラーゼを単独で用いた場合と比べ著しい解像度の低下をまねいていた。また、オルガネラレベルでのイメージングには高倍率のレンズを用いる必要があるため、高い時空間分解能での発光イメージングを行うには、従来よりも桁以上高い発光強度を示すルシフェラーゼを用いる必要がある。このため本研究では、研究遂行の鍵となるルシフェラーゼ改良による高発光強度化と、これに伴う発光イメージングの高解像度化についても検討することとした。

本研究の成果は、概日リズム形成における時間決定機構の解明という時間生物学上の貢献に留まらず、これまで蛍光イメージング一辺倒であった細胞生物学のイメージング分野に、生物発光系という根本的に異なる技術を導入することにより、細胞生物学におけるイメージング分野の新たな一角を担う系に発展することが期待される。特に、長時間記録といった広く生物現象に時間的ファクターを加味する上で本システムは有効である。

## 3. 研究の方法

時計タンパク質の細胞内局在制御の研究では、核画分のwestern解析や免疫染色など、生化学・細胞生物学的な手法により解析対象とするタンパク質の解析が行われているが、これらの手法では定量的且つ長時間に渡る連続的な解析は困難である。また、GFPを代表とする蛍光タンパク質を用いた蛍光イメージングにより、時計タンパク質の細胞内局在や核—細胞質間の移行に関与する核移行・核外移行シグナルの解析も多く行われて

おり、極めて高い時間・空間分解能での解析が可能であるが、励起光照射による細胞障害や蛍光タンパク質の減衰のため、長時間に渡る連続したイメージングは困難である。本研究では、これらの技術的問題を克服した新規ルシフェラーゼを用いた発光イメージング系を駆使することで、時計タンパク質の細胞内局在の変化を連続的に長時間可視化し、核—細胞質間シャトルの分子機構解明を試みる。

## 4. 研究成果

### (1) 発光イメージング用ルシフェラーゼの発光特性の解析

最初に、申請者らが独自に開発した発光イメージング用ルシフェラーゼ (ELuc) の物理化学的特性及び細胞内の特性について、最も汎用されているホタルルシフェラーゼ (FLuc) を比較対象に解析した。ELuc は哺乳類細胞において、FLuc よりも10倍以上強い発光を示すことが明らかとなっているが、この理由について解明するため、両ルシフェラーゼタンパク質を精製し、酵素学的特性について検討した。その結果、 $K_m$ 、 $V_{max}$ 、 $K_{cat}$ 等の物理化学特性はFLucと比較して相違いは認められなかったが、ELucの*in vitro*でのdecay kineticsはFLucのそれよりも数倍遅いことが明らかとなった。さらに、細胞内での特性について比較検討した結果、ELucの発現量及び安定性はFLucと比較し、各々数倍高いことが判明した。以上の結果より、ELucの持つdecay kinetics、高発現及び高安定性により、従来のルシフェラーゼに比し強発光を放つことが明らかとなった。

### (2) 発光イメージング用ルシフェラーゼを用いた1細胞発光イメージングでの発光強度および解像度の検証

ELucを用い、実際にオルガネラレベルでの高解像度な発光イメージング画像が得られるかを検証した。細胞質、ペルオキシソームおよび核にELucが局在化するよう、各々の局在化配列を付加したELucを作製し、これらをマウス繊維芽細胞NIH3T3に一過的に発現させ、発光イメージングを行った。この際、同様に各々の局在化配列を付加したFLucも作製し比較した。その結果、ELucを発現させたNIH3T3細胞での発光イメージングの発光強度は、いずれのオルガネラ局在においてもFLucの10倍以上の強度を示すことが確認された。またイメージング画像での時空間分解能はFLucのそれらよりも有意に高い解像度を得られることが明らかとなった。特にペルオキシソームの発光イメージングでは、ELucを用いた場合のみ典型的なドット状のペルオキシソームの画像を得ることができた。さらに、長期発光イメージングにおけるELucの有用性を検証するため、時計遺伝子

Per2のプロモーターにELucあるいはFLucを連結させたベクターを作製、ラット由来アストロサイトに一過的に導入し、発光イメージングに供した。その結果、ELucでは4日間に渡る高振幅な発光リズムが1細胞レベルで定量可能であるが、FLucでは発光量不足のため1細胞レベルでの定量化は困難であることが判明した。また、露光時間もFLucと比較し1/4以下で定量可能な発光シグナルを得られることも判明した。以上の結果より、ELucを発光プローブとして用いることにより、従来よりも高い時空間分解能での発光イメージングが可能であることが明らかとなった。

続いてELucを用い、オルガネラレベルでの長期発光イメージングでの時空間分解能について検証するため、核移行配列を有するタンパク質を核内にリクルーとし、細胞質-核間をシャトルすることが知られているimportin $\alpha$ の発光イメージングを行った。ELucとimportin $\alpha$ の融合遺伝子を作製し、NIH3T3細胞に一過的に発現させ、3分間隔での発光イメージングを行ったところ、約30分間隔で細胞質と核が順次発光するイメージング画像が得られ、importin $\alpha$ の細胞質-核シャトルの発光イメージングに成功した。これらの結果よりELucを発光プローブとして用いることで、オルガネラレベルでのタンパク質の細胞内局在の変化を高解像度でイメージングできることが明らかとなった。

### (3) 複数種のルシフェラーゼを用いた多色発光イメージング

ELucが時計遺伝子Bmal1のプロモーターの制御下で発現・発光する組換えマウス(Bmal1-ELuc)を作出し、視交叉上核のスライス培養における長期発光イメージングを行った。その結果、ELucを用いることにより、従来のホタルルシフェラーゼを導入した視交叉上核スライス培養での発光イメージングよりも時間分解能が5倍以上高いイメージングが可能であることを明らかにした。続いて、Bmal1と逆位相で発現することが知られている時計遺伝子Per2のプロモーターの制御下で赤色発光タンパク質が発現する組換えマウス(Per2-SLR2)を作出し、Bmal1-ELucとの掛け合わせにより、Bmal1プロモーター及びPer2プロモーターの制御下で緑色及び赤色発光タンパク質が各々発現するデュアルカラーマウスを世界に先駆けて樹立した。色分離計測法により中枢及び末梢組織における各々の発現変動を同時に測定、Bmal1及びPer2は各組織においてほぼ完全に逆位相の発現を示すが、それらの周期及び位相は組織特異性を示すことを明らかにした。また、発光イメージングにおいて、ELucと併用するための鉄道虫由来ルシフェラー

ゼ赤色発光ルシフェラーゼの改良を行った結果、部位特異的変異を導入することにより、細胞内安定性及び発光強度を増加させることに成功した。さらに、マウス繊維芽細胞NIH3T3を用い、ELucを細胞質に、一方SLRを核に集積させ、2種の光学フィルターにより各々の発光を分離することで、オルガネラレベルでの分解能を持つデュアル発光イメージングにも成功した。

### (4) 時計タンパク質の細胞内局在変化の長期発光イメージング

時計タンパク質の細胞内局在化の時間変動を可視化するため、ELucと時計遺伝子mPer2あるいはmCry2と融合した融合タンパク質がmPer2プロモーターに支配下で発現するベクターを作製、これをマウス繊維芽細胞NIH3T3に一過的に導入し長期発光イメージングを行った。その結果、mPER2-ELucおよびmCRY2-ELuc融合タンパク質は、測定開始後1日程度まで、数時間間隔での細胞質と核内の移行を繰り返すイメージング画像を得ることに成功した。一方、CRY2タンパク質では核移行配列に変異を導入したCRY2-ELuc融合タンパク質は常に細胞質に留まったことから、本研究で得られた発光イメージング画像はCRY2の生理的な時刻依存的局在変化を捉えていることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ①Y. Nakajima, T. Yamazaki, S. Nishii, T. Noguchi, H. Hoshino, K. Niwa, V.R. Viviani, Y. Ohmiya, Enhanced beetle luciferase for high-resolution bioluminescence imaging, PLoS One, 5 (2010) e10011. 査読有  
DOI : 10.1371/journal.pone.0010011
- ②Y. Nakajima, Y. Ohmiya, Bioluminescence assays: multicolor luciferase assay, secreted luciferase assay and imaging luciferase assay, Expert Opin. Drug Discover. 5 (2010) 835-849. 査読有  
DOI:10.1517/17460441.2010.506213
- ③T. Noguchi, T. Michihata, W. Nakamura, T. Takumi, R. Shimizu, M. Yamamoto, M. Ikeda, Y. Ohmiya, Y. Nakajima, Dual-color luciferase mouse directly demonstrates coupled expression of two clock genes, Biochemistry 49 (2010) 8053-8061. 査読有

DOI:10.1021/bi100545h

④X. Li, Y. Nakajima, K. Niwa, V.R. Viviani, Y. Ohmiya, Enhanced red-emitting railroad worm luciferase for bioassays and bioimaging, Protein Sci. 19 (2010) 26-33. 査読有

DOI : 10.1002/pro.279

⑤Y. Lee, J. Lee, I. Kwon, Y. Nakajima, Y. Ohmiya Y, G.H. Son, K.H. Lee, K. Kim, Coactivation of the CLOCK-BMAL1 complex by CBP mediates resetting of the circadian clock, J. Cell Sci. 123 (2010) 3547-3557. 査読有

DOI : 10.1242/jcs.070300

〔学会発表〕（計 1 件）

①Nakajima, Y., Ohmiya, Y., Development of enhanced beetle luciferase for high-resolution bioluminescence imaging, Pacificchem 2010、2010年12月17日、ハワイコンベンションセンター

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中島 芳浩 (NAKAJIMA YOSHIHIRO)

独立行政法人 産業技術総合研究所

健康工学研究部門 研究グループ長

研究者番号 : 10291080