

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440162

研究課題名(和文) “光励起” と “化学励起” を併用した生細胞蛍光観察技術の構築と実証

研究課題名(英文) Establishment of observation technique for living cells with both photo excitation and chemiexcitation

研究代表者

星野 英人 (Hideto, Hoshino)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：20371073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：従来の蛍光顕微鏡システムを駆使して、研究者の独自技術である自己励起蛍光蛋白質・BAF融合体を導入した安定細胞株を対象に、化学発光による細胞観察を試み、生細胞に対する、ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応に基づく化学発光イメージングの可能性を提示すると共に、幾つかの課題を新たに見出した。最大の問題は、培地成分に依存し、閉鎖型の灌流細胞培養チャンバーシステムでの培地輸液過程に伴う気泡発生であり、シンプルな原理に基づく、気泡除去装置の開発を試みたが、研究期間中には完成に至らなかった。また、更なる高輝度化のためにBAF分子内で起こる共鳴エネルギー転移の効率を更に改善する手法を見出し、国内特許出願を行った。

研究成果の概要(英文)：Making full use of a conventional fluorescent microscope system, we tried chemiluminescent live-cell imaging for the stably expressing cell lines which we introduced the BAF (BRET-based Auto-illuminated Fluorescent-protein)-fusion proteins that are our own technique into, and showed the possibility of the chemiluminescent live-cell imaging based on luciferin - luciferase reaction. In the experiments, we found some problems newly. A major problem was the air bubbles dependent on the required culture medium ingredient and caused by a perfusion process in the closed live-cell micro-observation chamber system. We tried the development of the device to remove the air bubbles based on the simple principle concerned, but did not lead to completion during the research period. Meanwhile, for the purpose of a higher intensity of eBAF-Y, we found a new approach to achieve a higher efficiency of the resonance energy transfer which happens in the BAF molecules, and applied for a Japanese patent.

研究分野：細胞生物学

キーワード：閉鎖型灌流培養観察系 化学発光 生細胞観察

### 1. 研究開始当初の背景

(1) GFP を用いた従来の生細胞の蛍光観察は、経時的定点観察であり、各観察点間に存在する、“インターバル”と呼ばれる非観察時間に起きる事象は観察されない、という盲点を有する。得られた断片的な細胞像から動画を構成する場合において、あたかも細胞が生き生きと動き回る様子や、興味蛋白質の細胞内動態が滑らかに再現され、一見すると細胞現象を完全に理解できたかのような錯覚に陥るが、これは誤りである。即ち、このような非観察時間の存在は、蛍光観察に必須の励起光による蛍光プローブの光褪色や細胞ダメージを回避する必要性に起因する、従来の蛍光観察手法の限界でもあった。

(2) 研究代表者は、かつて天然発光クラゲの自立的 GFP 蛍光発光機構を 1 分子に凝縮した、自己励起蛍光蛋白質・BAF を開発した(文献 )。BAF 発現細胞に、発光基質(具体的にはセレンテラジンという低分子化合物)を培地添加することにより、励起光を当てることなく、化学発光による GFP の生細胞イメージング(化学励起蛍光観察)を実現することが可能になり、シャッター開閉の刹那を除き、細胞の連続観察が可能になる(文献 )。また、GFP と同様に任意の蛋白質に BAF を融合した“化学発光タグ”として興味蛋白質の細胞内動態観察も可能である文献 )。即ち、BAF を利用すれば、従来の蛍光法に加え、セレンテラジン添加による化学発光による長期観察が可能であると考えた。

### 2. 研究の目的

(1) 研究代表者は、過去に所属した研究グループの化学発光イメージング装置を用いて、DNA 傷害性のヒストン H2AX (野生型、以下 H2AXwt と表記)と、最も明るい発光プローブである eBAF-Y との融合体(H2AXwt-eBAF-Y)を安定発現する培養細胞株を用いて、小核(微小核とも呼ぶ)が細胞質内で極短時間に長い距離を動き回ること、小核が細胞核に付かず離れず、細胞核との間に何らかの連絡を保って挙動するように見えること、などを見出していた。更に蛍光観察と化学発光観察を両立可能な、化学発光イメージング装置・LV-200 (オリンパス社)のデモ機を用いて、核内の特定部位での化学発光点滅現象という興味深い事象を観察していた。そこで当該装置を用いた長期的に安定な観察系を構築することを主たる目的とした。

(2) (1)の目的を達成した場合に H2AXwt だけではなく、幾つかの H2AX 変異体での挙動の観察を通して、H2AXwt の挙動と変異体の機能を推測することを更なる目的とした。

### 3. 研究の方法

当初想定した連携研究者の当初予期せぬ異動により、当該研究で使用する予定であった、

LV-200 を使用することが適わなくなるという、想定外の事態が初年度に生じた。そのため、専ら蛍光観察での条件検討に用いる予定であった、暗室不要のオールインワン蛍光顕微鏡・BZ-9000 を代用する方針に変更した。因みに、BZ-9000 は蛍光観察を主目的とした装置であり、LV-200 よりも感度性能は著しく劣るが、eBAF-Y が非常に明るい発光プローブであるため、化学発光観察用にダイクロックキューブに一部細工を施し、CCD カメラへの全光入力を許容する環境で、検出器の最大感度設定で eBAF-Y の化学発光観察が可能となる(図 1)。



図 1 . 発光専用ダイクロックミラーと装着状態

(1) 細胞株の樹立と蛍光と化学発光の画像取得条件の検討

G418 耐性遺伝子を有し、CMV (サイトメガロウイルス) プロモーターで遺伝子発現を誘導する系で、PCR 法と組換え DNA 手技を用いて幾つかの変異型 H2AX に置換した、変異型 H2AX-eBAF-Y 発現プラスミドを 3 種類構築した。H2AXwt-eBAF-Y 発現プラスミド、並びにこれらの発現プラスミドを細胞に遺伝子導入し、G418 添加条件で長期培養を続けることにより、各種 H2AX-eBAF-Y を安定発現する細胞株を選択し、適切なクローンを増殖させ、保存した。細胞株の選択基準としては、蛍光顕微鏡観察下での各種 H2AX-eBAF-Y の発現輝度(発現レベル)と細胞内での局在性を指標とした。また、長期的に使用する細胞株であるため、継代数の比較的少ないうちに細胞を増やし、当該細胞株を小分けにして凍結保存した。H2AXwt-eBAF-Y 安定発現株に対し、BZ-9000 を用いて蛍光像と化学発光像の取得を試みた。

(2) 培養観察系の構築

米国 BIOTECHS 社の細胞顕微鏡観察用の閉鎖系恒温灌流培養チャンパー・FCS2 システム(図 2)を採用し、BZ-9000 に装着して連続細胞観察のための培養条件の検討を行った。尚、閉鎖系灌流培養培地の送液には、Fisher Scientific 社のペリスタポンプ(超低速)を用いた(図 3)。

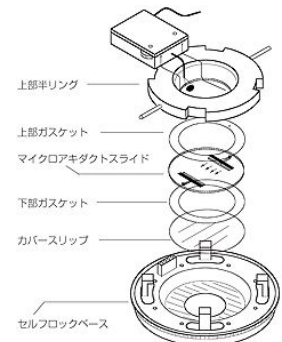


図 2 . FCS2 チャンパー

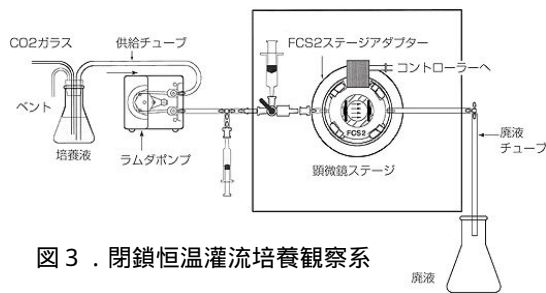


図3 . 閉鎖恒温灌流培養観察系

(3) eBAF-Y の高輝度化 (BRET 効率の改善) BAF の構成要素は、蛍光蛋白質 (例えば GFP) とウミシイタケルシフェラーゼ (RLuc) と両者を繋ぐ、リンカーペプチドであり、過去にリンカーペプチドの配列の検討による、RLuc から GFP へのエネルギー転移効率の最大化を検討したが、無限に近い可能性からの最適化は難しく、暫定的な最大効率を示す BAF が、eBAF-Y である。当初想定装置より光検出感度が劣る BZ-9000 を使用するに当たり、化学発光プローブの高輝度化のアプローチが必要になった。動物培養細胞に存在しない、超好熱性細菌由来の 10kD の人工ドメイン・AD と eBAF-Y と融合し (AD-eBAF-Y の開発)、蛋白質レベルでの化学発光スペクトルを測定することにより、BRET 効率を比較評価した。また、AD-eBAF-Y 単独、並びに H2AXwt との融合蛋白質の培養細胞内での発現プラスミドを構築し、当該蛋白質の細胞内局在性への影響を検討した。

(4) 灌流培養系の培地送液ラインで発生する気泡除去の検討

水道管内に発生する気泡を除去する装置を参考にし、同様の原理でこれを微小化した装置の開発を行った。安価な 3D-CAD ソフトによるフローターの 3D データの作製と当該データに基づく 3D プリンターによる造型を試み、既存プラスチック部材との組合せによる気泡除去装置の作製を試みた。

4 . 研究成果

(1) 細胞株の樹立と蛍光と化学発光の画像取得条件の検討

H2AXwt 以外に、H2AX の翻訳後修飾に関わる変異体 K5R (メチル化リジンを模倣)、K119R (メチル化リジン修飾を模倣)、S139A (DNA 傷害時に特異的なリン酸化修飾が起こらない、即ち H2AX 生じない) との H2AX 変異体-eBAF-Y 融合蛋白質発現プラスミドを構築した。これらをヒト上皮細胞由来の細胞株・GM0637 細胞株にトランスフェクションし、G418 薬剤選択を行うことにより、それぞれに対し当該蛋白質を高発現する安定発現株を取得した。何れの安定発現細胞株でも、通常細胞培養下では核局在を示した。

続いて、ガラスボトムディッシュに接着培養させた H2AXwt-eBAF-Y 安定発現株に対して、恒温培養装置無しの条件で、細胞培養培地にセレンテラジンを終濃度で 30 $\mu$ M とするよう

に添加した。添加直後に BZ-9000 を用いて化学発光画像の取得を開始し、安定した画像取得条件の検討を試みた。因みに、方法の項で記した発光観察用ダイクロックミラーキューブは、蛍光観察用の励起光源などの光が観察系に入らぬように、光源側の穴を塞ぎ、かつ光量を稼ぐために、ダイクロックミラーを外し、全光が CCD に入射するように細工した (図 1)。化学発光イメージングでは、外部光の漏れ込みなど不必要の光が大きな阻害要因になる。

図 4 に H2AXwt-eBAF-Y /GM0637 安定発現株

の同一視野の蛍光画像と化学発光画像を示す。尚、十分な明るさを得るために対物レンズは、10 倍レンズを用いた。また、BZ-9000 は蛍光顕微鏡であるため、CCD カメラのシャッター開放時間の最大設定は 60 秒であるが、CCD カメラの最大感度設定 (但し、ピニ

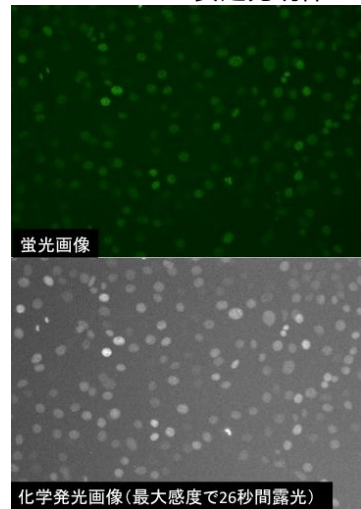


図 4 . H2AXwt-eBAF-Y/GM0637 細胞の蛍光像と化学発光像

ング設定無し) で 20 秒~60 秒の間のシャッター開放時間での化学発光画像の取得は可能であった。また、培地中のセレンテラジンは、明るい化学発光反応と引き替えに eBAF-Y により速やかに消費されるため、化学発光強度の減衰が著しいという、本質的な欠点を有する。露光時間設定を予め固定しなければならぬ顕微鏡システムの制約上、画像取得開始直後と、一定時間経過後では、得られる画像に著しい質的差が生じ、セレンテラジンの終濃度 30  $\mu$ M 添加条件において共用できる最大観察時間は 1 時間弱であり、初期添加濃度を 60  $\mu$ M に引き上げても、初期の発光強度は上昇するものの、観察可能時間の際立った改善は認められなかった。また、セレンテラジンは元来脂溶性の高い化合物のため、それ以上の濃度では基質の析出が認められ、画像のクオリティーに甚だしい影響を及ぼした。以上より、BZ-9000 において 10 倍レンズで、20~60 秒間の露光条件で化学発光観察は可能だが、長時間の安定した化学発光観察のためには、培地灌流による細胞へのセレンテラジンの安定供給が必要であると結論した。尚、図 4 で、H2AXwt-eBAF-Y が集積する部位では、蛍光像で期待されるよりも、同一視野の化学発光像で局所的輝度が高い傾向にあり、蛍光が単に GFP の存在を示す一方で、eBAF-Y の化学発光は、細胞核内でのルシフェラーゼの酵素活性を反映する点を考慮する

と、“単に存在する”のでは無く、“どのように存在するか”という状態情報までも可視化する潜在性を秘めている査証ではないか、と大いに興味深い。細胞内状態と化学発光輝度の関係性については、種々のアプローチにより今後明らかにしていきたい。

### (2) 培養観察系の構築

長期間の連続培養観察のために、蛍光顕微鏡・BZ-9000 で用いる観察用恒温培養装置の選定に際して、当初、別のある装置を選定したが、発注直前に当該装置が BZ-9000 顕微鏡のステージ耐荷重性能（カタログに当該情報の記載なし）を満たさないことが判明し、改めて代替装置の選定からやり直さざるを得なかった。そのため、灌流培養装置の入手までに当初の想定以上の時間を要した。選定した恒温培養装置は、装置本体の価格と化学発光観察に用いるセレンテラジンが比較的高価な試薬であることから、培地量を最小限にする目的で、閉鎖系の灌流恒温培養装置とした。当該装置は、カバースリップ上で細胞を培養する形式で、当該カバースリップを専用チャンバーに装着し、構成される閉鎖微小空間内（25~100  $\mu\text{l}$ ）に細胞培地を輸液して、培地と共に常にフレッシュなセレンテラジンを供給し、併せて、当該細胞株の化学発光反応で生じ、細胞内に蓄積すると化学発光反応の阻害要因となる酸化セレンテラジンを観察系から除去することを期待したものである。チャンバー内容量 50 $\mu\text{l}$  で約 300  $\mu\text{l}/\text{h}$  の超低速度で輸液した予備的検討の結果、一晚灌流培養後にチャンバー空間内に気泡が集積し、培地が干上がって乾燥状態となり細胞が死滅する現象が度々認められた。培地成分を検討の結果、培地の緩衝能力を維持するための炭酸水素ナトリウムに由来するガスが主要因ではないかと推察された。

### (3) eBAF-Y の高輝度化（BRET 効率の改善）

BAF 内で生じる高効率共鳴エネルギー転移を裏付ける、RLuc と GFP の相対的空間配置は明らかになっておらず、エネルギー転移効率を更に改善するためのアミノ酸配列の推定は、過去の経験から甚だ難しいと考えられた。そのため、アプローチ法を根本的に見直し、10kD という小さい分子サイズで、蛋白質構造が比較的固いと推定され、動物培養細胞に存在しない、超好熱細菌由来の人工ドメイン（Artificial Domain、以下 AD）との融合体の可能性を検討した。AD と eBAF-Y を繋ぐ融合体（AD-eBAF-Y）の大腸菌発現プラスミドを作製し、組換蛋白質を連携研究者（上垣氏）の協力を得て大腸菌内生産し、精製蛋白質を得た。当該組換蛋白質の化学発光スペクトルを別の連携研究者（丹羽氏）に依頼して測定した。当初、全くの思いつきのアプローチであったが、AD との融合化により、eBAF-Y 分子内で生じる、従来の BRET 効率（525nm/480nm 比）よりも、より効率の高い、BRET を表す化

学発光スペクトルパターンを得た（図 5）。

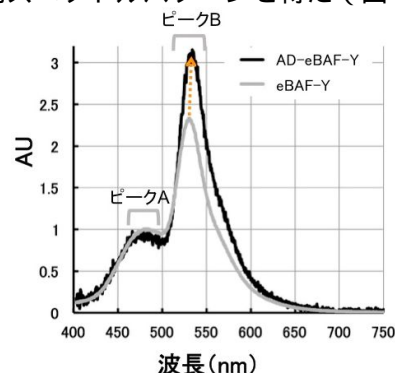


図 5 . AD 付加による eBAF-Y の BRET 効率（ピーク B/ピーク A 比）への著しい改善効果

BAF のような 1 分子 BRET プロブのエネルギー転移効率を詳細に検討した研究は甚だ少なく、付加的なドメインを融合することで BRET 効率が改善されるという知見は未だ報告されていない。そのため、BRET 効率の改善手法として国内特許出願を行った。また、この AD-eBAF-Y の動物培養細胞発現プラスミドを新たに構築し、細胞内での局在性を検討した。その結果、推定分子量が 77kD であるにも関わらず、eBAF-Y と同様に細胞内で細胞質と核の両方に一様に分布した。また、H2AXwt との融合体・H2AXwt-AD-eBAF-Y も H2AXwt-eBAF-Y と同様の核内局在性を示し、細胞内局在性には付加的な AD 部分の影響は認められなかった（図 6）。

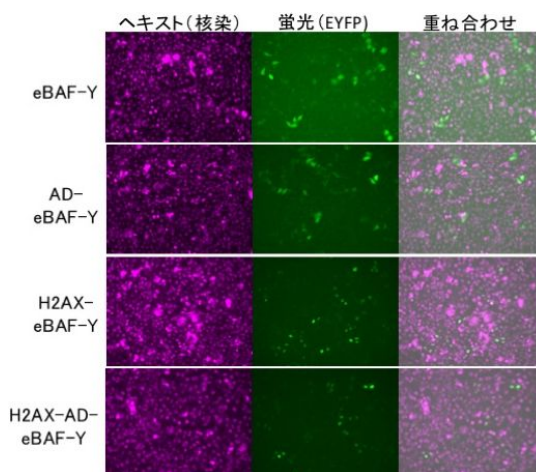


図 6 . 一過性発現における AD-eBAF-Y の細胞内分布への影響

尚、期待された AD-eBAF-Y による BZ-9000 における感度上昇効果に関しては、最大感度設定で 15 秒~50 秒であり、残念ながら eBAF-Y に比して特段の改善は認められなかったが、よりカメラ感度の高い化学発光専用の画像観察システムでは、十分な効果を発揮するものと期待される。今後、1 分子 BRET プロブの更なる高輝度化を図る一つの手段としては注目に値するものである。

(4) 灌流培養系の培地送液ラインで発生する気泡除去法の検討

前述(2)の項で触れた、輸液用シリコンチューブ内で発生した気泡が当該灌流チャンバーの細胞培養空間に蓄積し、細胞が乾燥ストレスで死滅する問題に関して、輸入代理店を通して製造元に問い合わせたところ、気泡発生は、当該 FCS2 システムを閉鎖恒温観察培養系では、現在避けては通れない現象であるという、驚くべきネガティブ情報を知らされた。尚、製造元からは、輸液チューブをループさせるだけの、全く本質的な問題解決に至らない対処法を提案されて途方に暮れた。色々対処法となりそうなアイデアを検討した結果、輸液管内に発生し、輸液を阻害する空気を取り除くための“空気弁”の存在を見出した。その原理を図7に示した。

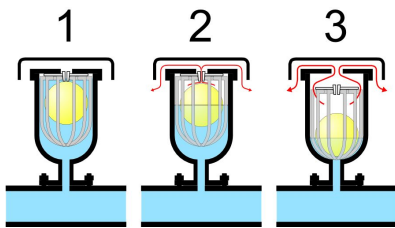


図7.“空気弁”の原理図

基本的には、極小の小型“空気弁”を作製し、閉鎖培養系の滅菌性を維持するために、脱気部位にペントフィルターを装着するという基本アイデアである。弁理士と相談・検討した結果、当該ペント装置の原理自体は公知であるが、問題点と解決実現の対処法に関しては特許性が十分生じる可能性が期待できるということであった。

当該装置実現の方策を検討したところ、企業への外注製作は高額なため、比較的安価な3Dプリンターで部材を作製する方策を選択し、“123D Design”などの安価、もしくはフリーの3D-CADソフトで3Dデータを自作することとした。幾つかの3D-CADソフトを入手・試用検討し、最終的に“XYZMaker”というフリーソフトを3Dデータ作成に用いた。当初、所属研究室に既存の樹脂溶融積層方式の3Dプリンターでの部材作製を試みたが、必要とされる部材の小ささから十分な精度が得られないことが判明し、光硬化積層型の3Dプリンターでの出力を選択した。漸く、3Dデータ作成に慣れ、安定した部材を作製できる技術が身についてきたところで、まだ当該装置の完成には至っていないが、今後も完成を目指したい。幾つかの未解決の課題が残されているが、これらを解決出来れば、特許出願することを視野においている。

<引用文献>

星野英人、中島芳浩、近江谷克裕、Nature Methods, 4, 637-639, 2007

星野英人、Exp.Opin.Drug Disc., 4, 373-389, 2009

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計1件)

名称: BRETの共鳴エネルギー転移効率を向上させる方法

発明者: 星野英人、上垣浩一、丹羽一樹

権利者: 国立研究開発法人産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: 特願 20150068694

出願年月日: 平成26年3月30日

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

星野 英人 (HOSHINO, Hideto)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号: 20371073

(2)連携研究者

上垣 浩一 (UEGAKI, Koichi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究グループ長

研究者番号: 00356544

丹羽 一樹 (NIWA, Kazuki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・計量標準総合センター物理計測標準部門・主任研究員

研究者番号: 30443211