

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462828

研究課題名(和文)ビデオレート生物発光イメージング法による骨形成関連タンパク質の分泌動態解析

研究課題名(英文)Bioluminescence imaging for osteogenic protein secretion

研究代表者

鈴木 崇弘 (Suzuki, Takahiro)

愛知学院大学・歯学部・准教授

研究者番号：70298545

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨芽細胞を含めた哺乳類細胞におけるルシフェラーゼの発現において、ヒトで使用頻度の高いコドンのみをシンプルに選択する「Preferred法」でコドン最適化を行った遺伝子が有用であることを示した。また、Preferred法でコドン最適化した遺伝子(nanoKAZ)を用いてオプロフォーラスルシフェラーゼ変異体を発現させ、生物発光イメージング法で可視化した。さらに、ガウシアルシフェラーゼをレポーターとする「ビデオレート生物発光イメージング法」を、3D培養細胞からのタンパク質分泌を可視化する方法として確立した。最終的に、骨芽細胞株におけるタンパク質の極性分泌を可視化することに成功した。

研究成果の概要(英文)：A simple method for preparing codon-optimized gene by choosing only codons preferentially used in human genes was named “preferred human codon-optimization method”. We demonstrated that the preferred human codon-optimized luciferase genes were efficiently expressed in several mammalian cells including osteoblastic cells. Also, we expressed a mutated 19 kDa protein of Oplophorus luciferase (nanoKAZ), a preferred codon-optimized gene, and visualized it by bioluminescence imaging. Furthermore, we demonstrated quantitative visualization of protein secretion from 3D-cultured cells by the method of video-rate bioluminescence imaging using Gaussia luciferase as a reporter. Finally, we succeeded in visualizing polarized protein secretion from osteoblastic cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：イメージング 生物発光 開口分泌 遺伝子発現 3D培養 細胞接着 タンパク質分泌 ルシフェラーゼ

1. 研究開始当初の背景

骨代謝関連疾患の理解と治療法の確立、さらに骨の再生医療実現に向けて、骨代謝の分子機構を知ることは重要な課題である。I型コラーゲン、オステオカルシンなどの骨基質タンパク質、BMP-2などの骨形成因子は、骨芽細胞から分泌される。しかしながら、これら骨形成関連の分泌型タンパク質の分泌動態とその制御機構は、ほとんど不明なままである。骨芽細胞におけるタンパク質の極性分泌動態とその分子機構を解明するためには、生細胞の全細胞表面におけるタンパク質分泌動態の可視化法が必要である。

我々は、「分泌タンパク質の生物発光イメージング法」を独自に開発してきた。本手法は、分泌型ルシフェラーゼ(酵素)がルシフェリン(発光基質)を含む培養液に分泌された瞬間に起こる酵素反応の微弱発光を、外部光を遮断した高感度カメラ顕微鏡システムで可視化する。この原理によって生物発光イメージング法では、生細胞の全細胞表面におけるタンパク質分泌を解析できる。

2. 研究の目的

独自に開発している「分泌タンパク質のビデオレート生物発光イメージング法」をさらに改良し、骨芽細胞のタンパク質分泌動態と分泌極性の局在を明らかにする。具体的には、ルシフェラーゼレポータータンパク質を効率良く遺伝子発現させるためのコドン最適化法を開発し、骨芽細胞における骨形成関連タンパク質の分泌動態と分泌局在を可視化する。さらに、より生理的な培養条件で解析するための基礎的研究として、三次元(3D)培養細胞におけるタンパク質分泌可視化法を確立する。

3. 研究の方法

(1) 簡便なコドン最適化法による生物発光タンパク質の遺伝子発現

各生物種のコドン使用頻度データベース(<http://www.kazusa.or.jp/codon/>)を参照し、ヒトで使用頻度が高いコドンのみを選択する簡便なコドン最適化法を"Preferred human codon-optimization method (Preferred法)"と命名し、本法により各種生物発光タンパク質のコドン最適化遺伝子を人工合成した。これら Preferred法で最適化した遺伝子と、野生型遺伝子、汎用のヒト最適化遺伝子を CHO-K1細胞に発現させ、ルミノメーターを用いて培養上清および細胞内の発光活性を測定し、タンパク質発現量を解析した。

分泌タンパク質の生物発光イメージングに有用な甲殻類由来のガウシアルルシフェラーゼ(*Gaussia luciferase*, GLase)については、マウス骨芽細胞株(MC3T3-E1細胞)、正常ヒト歯肉線維芽細胞(Gin-1細胞)および各種ヒトがん細胞株でも解析を行った。さらに、Preferred法で最適化したGLase遺伝

子については、artificial open-reading frameの有無や数個のコドンの相違について、哺乳類細胞および大腸菌における遺伝子発現解析を行った。

さらに、GLase融合型のヒトBMP-2およびマウスオステオカルシン(hBMP2-GLaseとmOC1-GLase)の発現における、hBMP-2およびmOC1遺伝子のPreferred法によるコドン最適化の有効性について解析した。

(2) 新規分泌型ルシフェラーゼ nanoKAZの解析と生物発光イメージングへの応用

細胞質と分泌経路の両方で高い発光活性を示すことで注目される甲殻類由来のオプロフォーラスルシフェラーゼ(*Oplophorus luciferase*)変異体(nanoKAZ/nanoLuc)について、Preferred法で最適化した遺伝子(nanoKAZ)と汎用のヒト最適化遺伝子(nanoLuc)の比較を行いながら、nanoKAZタンパク質の生化学的解析と生物発光イメージング解析を行った。

(3) 生物発光イメージングによる3D培養細胞におけるタンパク質分泌解析

3D培養細胞におけるタンパク質分泌の可視化法を確立する目的で、モデル系としてインスリン分泌の分泌動態を解析した。具体的には、インスリンとGLaseの融合タンパク質(Insulin-GLase)をラット膵島に発現させ、分泌動態を生物発光イメージングで解析した。また、ラット膵細胞株INS-1EからサブクローニングしたInsulin-GLase定常発現株(iGL細胞)を用いて、細胞塊(膵島様スフェロイド)を形成させ、生物発光イメージング解析を行った。

(4) 生物発光イメージングによる骨形成関連タンパク質の分泌動態解析

GLase融合型のオステオカルシン(OC1-GLase)、BMP-2(BMP2-GLase)、I型コラーゲン(COL1A2-GLase)およびMMP-2(MMP2-GLase)を骨芽細胞株に発現させ、開口分泌動態をビデオレート生物発光イメージング法で可視化し、その分泌動態と分泌極性について解析を行った。

4. 研究成果

(1) 簡便なヒトコドン最適化法による生物発光タンパク質の遺伝子発現

ルシフェラーゼや発光タンパク質の微弱な発光酵素反応を検出する生物発光イメージング法では、哺乳類細胞で外因性のルシフェラーゼ遺伝子を高発現させることが有効となる。一般的な人工遺伝子合成では、哺乳類細胞で導入遺伝子を効率的に発現させるために、遺伝子のコドン最適化がソフトウェアを使用した複数の方法で行われている。これに対して我々は、ヒトで使用頻度が高いコドンのみを選択する、簡便なコドン最適化法(Preferred法)の有効性について検討した。

4種のルシフェラーゼ(北米産ホタルルシフェラーゼ、ゲンジボタルルシフェラーゼ、GLase、オプロフォーラスルシフェラーゼ変異体)と2種の発光タンパク質(イクオリン、クライティン)について、Preferred法でコドン最適化した遺伝子を人工合成し、CHO-K1細胞に発現させたところ、すべてが野生型遺伝子よりも高い発光活性を示した。特に、分泌タンパク質の生物発光イメージングに有用なGLaseについては、各種ヒトがん細胞株、正常ヒト歯肉線維芽細胞およびMC3T3-E1マウス骨芽細胞株において、Preferred法で最適化した遺伝子(pGLuc)が汎用のヒト化遺伝子(hGLuc)より高い発光活性を与えた。

また、通常のPreferred法で最適化した遺伝子はartificial open-reading frameを持つ一方で、哺乳類細胞および大腸菌でのGLase発現量に影響が無いことを示した。さらに、シグナルペプチドを含む185アミノ酸残基に対する5~10個の使用頻度の高いコドン同士の置換は、GLase発現量に影響が無いことを示した。

骨芽細胞株であるMC3T3-E1細胞におけるBMP-2またはオステオカルシンのGLase融合タンパク質の発現については、GLaseに加えてBMP-2やオステオカルシンもPreferred法でコドン最適化した遺伝子を用いることにより、融合タンパク質の発現量が増大し、生物発光イメージング像を改善することができた。さらに骨芽細胞株以外でも、マウス腓細胞株であるTC6細胞でのプログルカゴンとGLase融合タンパク質の発現において、Preferred法でコドン最適化した遺伝子を用いることで発現量が増大し、発光イメージング像が改善された。

以上の結果からPreferred法は、哺乳類細胞においてルシフェラーゼを含む様々なタンパク質の遺伝子発現を効率的に行う上で、簡便で有用なコドン最適化法であると考えられた。

(2) 新規分泌型ルシフェラーゼ nanoKAZ の解析と生物発光イメージング

Preferred法でコドン最適化したオプロフォーラスルシフェラーゼの変異19 kDaタンパク質(nanoKAZ)遺伝子を用いて、細胞質および分泌経路に発現させたnanoKAZタンパク質を生物発光イメージング法により可視化できた。また、オプロフォーラスルシフェラーゼのシグナルペプチドが哺乳類細胞においても分泌シグナルとして機能することを明らかにした。

また、シグナルペプチドを有するnanoKAZは通常の小胞体-ゴルジ装置を介した経路で分泌される一方で、意外なことに、細胞質で発現させたnanoKAZは、小胞体-ゴルジ装置の経路を介さない非典型的な機構で分泌されることが明らかになった。発光イメージング解析により細胞質発現の

nanoKAZが細胞膜に局在することが示された。これにより、細胞質発現のnanoKAZは細胞膜における何らかの機構により細胞外に分泌されると考えられた。

(3) 生物発光イメージングによる3D培養細胞におけるタンパク質分泌の可視化

ラット膵島をマトリゲルでコーティングしたガラスボトムディッシュで培養し、Insulin-GLase発現用アデノウィルスを用いて1日間感染させ、分泌タンパク質の生物発光イメージングを行った(対物レンズ20倍)。その結果、高グルコース刺激から数分以内に、膵島表層全体が一斉に同調しながら周期変動する、Insulin-GLase分泌の発光が可視化された。また、INS-1E細胞から樹立したInsulin-GLase定常発現株であるiGL細胞は、非接着性の培養ディッシュで1-2日間培養することで、容易に膵島様の細胞塊(スフェロイド)を形成した。ガラスボトムディッシュにiGL細胞塊を1-2日間培養して接着させ、分泌タンパク質の生物発光イメージングを行った。その結果、iGL細胞塊においては、高グルコース刺激数分後から、細胞集団が一斉に同調し、周期的なインスリン分泌が1時間以上観察された。iGL細胞におけるインスリンの開口分泌は、ガラス接着面ではほとんど観察されず、細胞間接着部位に局在していた。

以上の結果から、インスリン分泌をモデル系として、3D培養細胞の分泌タンパク質の可視化法として本イメージング法を確立し、タンパク質分泌における細胞間接着の重要性を示唆した。

(4) 生物発光イメージングによる骨形成関連タンパク質の分泌動態と分泌極性

各種骨形成関連タンパク質の分泌局在解析を行い、オステオカルシン、I型コラーゲン、MMP-2の基底(Basal)側、BMP-2の上方(Apical)側への極性分泌を示唆した。特に、オステオカルシンはI型コラーゲンやBMP-2と比較して、高頻度に分泌が行われることが示唆された。また、基底側に分泌されるオステオカルシンの開口分泌は、"kiss-and-run"の機構により行われることが示唆された。

また、I型コラーゲンの分泌については、骨芽細胞は線維芽細胞よりも分泌頻度が低い可能性が示唆された。

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)

Suzuki T, Kanamori T, Inouye S: Quantitative visualization of synchronized insulin secretion from 3D-cultured cells. *Biochem Biophys Res*

Commun, **486**: 886-892, 2017. (査読有)

DOI: [10.1016/j.bbrc.2017.03.105](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.03.105)

Yokawa S, Suzuki T, Inouye S, Inoh Y, Suzuki R, Kanamori T, Furuno T, Hirashima N: Visualization of glucagon secretion from pancreatic cells by bioluminescence video microscopy: Identification of secretion sites in the intercellular contact regions. *Biochem Biophys Res Commun*, **485**: 725-730, 2017. (査読有)

DOI: [10.1016/j.bbrc.2017.02.114](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.02.114)

Inouye S, Suzuki T: Protein expression of preferred human codon-optimized *Gussia* luciferase genes with an artificial open-reading frame in mammalian and bacterial cells. *Protein Expr Purif*, **128**: 93-100, 2016. (査読有)

DOI: [10.1016/j.pep.2016.08.006](https://doi.org/10.1016/j.pep.2016.08.006)

Inouye S, Sahara-Miura Y, Sato J, Suzuki T: Codon optimization of genes for efficient protein expression in mammalian cells by selection of only preferred human codons. *Protein Expr Purif*, **109**: 47-54, 2015. (査読有)

DOI: [10.1016/j.bbrc.2014.06.140](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.06.140)

〔学会発表〕(計 4 件)

横川慧, 鈴木崇弘, 井上敏, 伊納義和, 鈴木亮, 古野忠秀, 平嶋尚英: 細胞接着を介した膵島細胞のグルカゴン分泌調節機構の解明. 第 38 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム. 名古屋市立大学大学院薬学研究科 (愛知県・名古屋市), 2016. 11. 18.

横川慧, 鈴木崇弘, 井上敏, 伊納義和, 鈴木亮, 古野忠秀, 平嶋尚英: 生物発光イメージング法を用いた膵島細胞からのグルカゴン分泌の可視化解析. 第 25 回日本バイオイメージング学会学術集会. 名古屋市立大学薬学部宮田専治記念ホール (愛知県・名古屋市), 2016. 9. 5.

鈴木崇弘, 井上敏: 膵細胞塊における同調性インスリン分泌の可視化. 第 15 回生命科学研究会. メルパルク東京 (東京都・港区), 2016.6.25.

鈴木崇弘, 江頭美喜, 河合達志, 金森孝雄, 井上敏: 哺乳類細胞における効率的なルシフェラーゼ遺伝子発現のためのコドン最適化と生物発光イメージング: 歯学研究への応用. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会. 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター (新潟県・新潟市), 2015. 9. 13.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

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

鈴木 崇弘 (SUZUKI, Takahiro)

愛知学院大学・歯学部・准教授

研究者番号: 70298545

(2) 研究分担者

水野 光政 (MIZUNO, Mitsumasa)

愛知学院大学・歯学部・助教

研究者番号: 20609812

(3) 連携研究者

井上 敏 (INOUE, Satoshi)

JNC (株)・横浜研究所・企画研究員

研究者番号: 40426622

(4) 研究協力者

()