

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2016

課題番号：15H05488

研究課題名（和文）細胞間コミュニケーションをイメージングする生物発光センサーおよび解析基盤の確立

研究課題名（英文）Establishment of bioluminescence sensor and imaging system for monitoring cell to cell communication

研究代表者

服部 満 (Hattori, Mitsuru)

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：20589858

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,200,000円

研究成果の概要（和文）：細胞間でのタンパク質活性の伝播（コミュニケーション）の様子を視覚化するツール及び観察系の開発を行った。高い発光強度を持つルシフェラーゼを用いて新規に細胞内発光センサーを開発した。並行して、倒立型蛍光顕微鏡を基盤として細胞発光観察に適した暗所観察システムを構築した。同システムを用いて実際に細胞内でのGPCR活性を発光検出し、活性が細胞間で呼応している箇所が複数観察された。従い、開発したセンサー及び観察システムにより、細胞間コミュニケーションを解析することが可能となった。

研究成果の概要（英文）：We developed a new bioluminescence tool for monitoring protein dynamics in living cells including cell to cell communication, with newly constructed a microscope observation system. For tracing the temporal changing of cell activity rapidly, we choose the novel luciferase species that has sufficiently high luminescence intensity. We have already established an optical technique for monitoring protein-protein interactions in living cells based on complementation of split fragments of luciferase. In this case, the luciferase was also used as split fragments to monitor the protein that plays a key role in target phenomenon. We also developed a bioluminescence observation system based inverted fluorescence microscope, the set-up in which was with high sensitive and darkness condition. Finally, the luminescent probe in combination with the observation system monitored GPCR activities and the temporal correlation between cell and cell.

研究分野：生体計測

キーワード：ルシフェラーゼ 生物発光 イメージング タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

細胞同士での情報のやりとり (コミュニケーション) は、環境変化に対して全ての細胞が迅速に応答するための効率的な手段であり、細胞集団が分化、再生、分解等を組織的に行う上で不可欠である。様々な方式が既に知られている一方で、一細胞の情報が周りの細胞とどれくらい相関があるのか、どのように他の細胞へと広がって行くのか、といったマクロレベルでの解析は圧倒的に少ない。

細胞間コミュニケーションで具体的に伝わる情報は、細胞集団中の位置情報と、細胞活動のタイミングおよび程度である。これは多くのタンパク質を介して検知され、また伝達される。したがって、個々の細胞のタンパク質活性を測る最適なセンサーがあれば、細胞間での活性のタイムラグから細胞間コミュニケーションを画像化、分析することが可能となる。

申請者はこれまで、生きた細胞中のタンパク質活性を検出すべく、発光タンパク質ルシフェラーゼを基盤とした発光検出法の開発を行ってきた。その過程で、G protein-coupled receptor (GPCR) タンパク質の薬剤活性、時計タンパク質の経時的活性リズムなどを発光シグナルとして検出することに成功した。ルシフェラーゼ発光は、「定量性」、「高 S/N 値」を満たす有効なツールである。さらには BRET 法や再構成法を用いれば、「可逆性」も満たせる。しかしながら、絶対的な発光シグナルが微弱であり、細胞毎の活性を高速に追跡する必要がある細胞間コミュニケーションの解析には不向きであった。

この現状を打破する可能性として、近年、既存の 100 倍以上の発光強度をもつルシフェラーゼが複数開発されている。したがって、これら高発光強度ルシフェラーゼをベースとした検出法を開発すれば、「高シグナル」を満たした、細胞間コミュニケーションの解析に理想的な検出系が確立できると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、細胞間でのタンパク質活性パターンの違い、活性の伝播 (= コミュニケーション) の様子を視覚化するツール及び観察系を開発する。細胞間コミュニケーションをリアルタイムにモニタリングし解析する事で、細胞間コミュニケーションを制御する機構を解明し、組織分化、ガン化組織転移等のテーマに関してマクロな視点からの研究アプローチを提案する。

## 3. 研究の方法

### (1) 高発光強度ルシフェラーゼを用いた

### タンパク質活性発光センサーの開発

細胞間コミュニケーションが予想される具体的なタンパク質を対象として、その活性の強弱を可逆的に検出できる高強度な発光センサーを開発する。

(2) 各細胞のタンパク質活性をリアルタイムでイメージングする顕微鏡システムの構築

開発した発光センサーを用いて、タンパク質活性の時間変化を顕微鏡下で追跡するシステムを開発する。分光フィルターを用いて、複数のタンパク質活性を同時に検出できるモニタリング系を確立する。

(3) 細胞間コミュニケーションの画像化およびパターン変化の解析

構築したイメージングシステムを用いて、タンパク質活性が細胞間を伝播し、また、フィードバックされる様子等を観察する。そのパターンを様々な環境条件、細胞にて比較する。

## 4. 研究成果

### (1) 高発光強度ルシフェラーゼを用いたタンパク質活性発光センサーの開発

研究代表者がこれまで開発してきたルシフェラーゼセンサーは、絶対的な発光量が不足しており迅速な細胞間コミュニケーションを追跡するツールとして難があった。そこで、高い発光強度を誇るルシフェラーゼ NanoLuc を用いて新たに発光センサーを開発した。

NanoLuc による発光センサーの検出対象として、細胞中の遊離ヘムに注目した。細胞内ヘム量の増減を検出する原理として、ヘムがもつ吸収スペクトルを利用した。ヘムは特定の波長の光を吸収する特性があり、蛍光色素がヘムに近接した場合、励起光により発生する蛍光がヘムに吸収されることが明らかとなっている。タンパク質プローブとして蛍光色素を蛍光タンパク質に置き換える。さらに NanoLuc を蛍光タンパク質に融合させる形で配置する事で、ルシフェラーゼによる発光エネルギーの一部が外部へ放出させることなく近傍の蛍光タンパク質の励起エネルギーに変換される (BRET 現象)。この NanoLuc-蛍光タンパク質のアミノ酸配列下流にヘム結合タンパク質を融合させた場合、ヘム結合タンパク質にヘムが結合すると蛍光タンパク質からの発光エネルギーが吸収されるため、最終的に二波長それぞれの発光強度の比を算出する事で、BRET の程度からヘム量の変化が検出可能となる。

同原理の有効性を実証するため、NanoLuc と蛍光タンパク質を繋げてエネルギー移行の効率を確認した。NanoLuc のアミノ酸鎖 N 末側もしくは C 末側に蛍光タンパク質 EGFP を繋げる形で融合タンパク質を設計し、タ

ンパク質発現 DNA プラスミドを培養細胞に導入した。培養細胞に NanoLuc 発光基質を添加して発光させ、スペクトルを測定した。NanoLuc の N 末側に EGFP を繋げた場合と C 末側に繋げた場合では、どちらもスペクトルに 2 つのピーク (440、510 nm) が見られ、それぞれ NanoLuc 由来の発光とエネルギー移行による EGFP からの発光と推察された。よりエネルギー移行が顕著であった C 末側に繋げた設計を採用し、さらにヘム結合タンパク質を EGFP の C 末側に繋げたプローブを設計した。同プローブを細胞内に発現させて発光スペクトルを測定した結果、ヘム結合タンパク質を繋げていない場合と比較して EGFP 由来の発光ピーク (510 nm) が減少していた。したがって、プローブ自発的な発光、さらにはヘムによる吸光といった検出原理が確認された。

既存のヘム検出プローブの多くは蛍光原理のプローブであり、外部からの励起光はそれ自身がヘムに吸光される場合や、生体サンプルからの自家蛍光の原因となるなど検出において様々な問題がある。開発した発光プローブは自発的に発光する事でこれらの問題を解消し、細胞間コミュニケーションにおける優れたツールとなりうる。

## (2) 各細胞のタンパク質活性をリアルタイムでイメージングする顕微鏡システムの構築

細胞間でのタンパク質活性のタイムラグを検出するためには、一つの視野に複数の細胞が捉えられた状態で、リアルタイムに発光反応を撮影する必要がある。したがって、顕微鏡鏡体、分光フィルター、検出機器、データ解析ソフトウェアのセットアップを行い、発光の強弱を連続撮影にて迅速に捉える観察システムを構築する。

システムは、一般の倒立型蛍光顕微鏡をベースにした。ターゲット物質・タンパク質活性の発光撮影用 (複数)、細胞マーカー蛍光の撮影用、それぞれに対して分光フィルターを設置した。-80 に冷却した EM-CCD カメラを検出機器として設置し、全ての装置を接続した PC 上で、専用制御ソフトにて操作を行う形とした。微細な発光の変化をノイズで邪魔されないよう装置全体を暗箱で囲い、外部の光を全て遮断した。

実際に構築したシステムを用いて発光細胞を観察した結果、複数の波長を分光することで発光像及び蛍光像の撮影に成功し、経時変化に応じた発光強度の変動及び細胞移動も追跡できることを確認した。同システムには電動ステージも設置しているため、制御ソフトと組み合わせる事で複数の XY 位置での細胞状況を順次撮影することも可能である。

## (3) 細胞間コミュニケーションの画像化およびパターン変化の解析

2. で構築した観察システムを用いて実際の細胞現象を発光観察し、活性等の細胞間での時間差を画像解析することで、細胞間でのコミュニケーションの有無を確認した。観察では、最初に 1. で開発したヘム検出プローブを使用して観察を試みたが、細胞間での明確な相関関係が確認出来なかった。続いて、本研究以前より用いている、細胞膜レセプター GPCR 検出发光プローブを準備し、ルシフェラーゼ部分を NanoLuc に変更したものを作製して使用した。同プローブを培養細胞に導入し、観察システム下で薬物添加して経時的な GPCR の活性変化をモニタリングした。GPCR 活性を示す発光は細胞膜上で生じたのち、細胞膜を移動するように顆粒状に観察された。そのうちの一部は、隣接する細胞との接地面により強く観察され、さらに隣接する細胞でも接地面に発光が観察された。この観察結果より、薬剤刺激による GPCR 活性が細胞間で膜接触により呼応しており、活性が伝播している可能性が示された。

総じて、高い発光強度をもつ NanoLuc を使用した生体プローブ及び、外部からの光を遮断した高感度な検出系による発光観察システムを開発することで、複数の細胞間での活性の時間差をリアルタイムに検出することに成功し、細胞間コミュニケーションを観察、解析する研究基盤が整備された。

## 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 5 件)

Yamada, T., Yoshimura, H., Shimada, R., Hattori, M., Eguchi, T., Fujiwara, K., Kusumi, A. and Ozawa, T.

Spatiotemporal analysis with a genetically encoded fluorescent RNA probe reveals TERRA function around telomeres.

*Sci. Rep.*, 査読有,

6,2016,38910.

10.1038/srep38910.

Takenouchi, O., Kanno, A., Takakura, H., Hattori, M. and Ozawa, T.

A bioluminescent indicator for highly sensitive analysis of estrogenic activity in a cell-based format.

*Bioconju.Chem.*, 査読有,

7,2016, 2689-2694.

10.1021/acs.bioconjchem.6b00466.

Hattori, M., Kawamura, G., Kojima, R.,

Kamiya, M., Urano, Y. and Ozawa, T.  
Confocal bioluminescence imaging for  
living tissues with a caged substrate of  
luciferin.  
*Anal. Chem.*, 査読有,  
88 (12), 2016, 6231-6238.  
10.1021/acs.analchem.5b04142.

Endo, M., Hattori, M., Toriyabe, H., Ohno,  
H., Kamiguchi, H., Iino, Y. and Ozawa, T.  
Optogenetic activation of axon guidance  
receptors controls direction of neurite  
outgrowth.  
*Sci. Rep.* 査読有.  
6,2016,23976.  
10.1038/srep23976.

Tamaru, T., Hattori, M., Honda, K.,  
Nakahata, K., Sassone-Corsi, P., van der  
Host, G.T.J., Ozawa, T. and Takamatsu, K.  
CRY drives cyclic CK2-mediated BMAL1  
phosphorylation to control the mammalian  
Circadian clock.  
*PLoS Biol.* 査読有.  
13, 2015, e1002293.  
10.1371/journal.pbio.1002293.

〔学会発表〕(計7件)

服部満  
ルシフェラーゼ再構成を基盤とした GPCR シ  
グナルの発光定量検出法.  
日本薬学会第 137 年会  
2017 年 3 月 25 日  
東北大学川内キャンパス (宮城県仙台市)

服部満, 河村玄気, 小嶋良輔, 神谷真子,  
浦野泰照, 小澤岳昌  
共焦点発光イメージングを利用した生細胞  
観察法の開発.  
第 39 回日本分子生物学会年会  
2016 年 11 月 30 日  
パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

服部満, 小澤岳昌  
生物発光イメージングシステムを利用した  
生細胞ハイスループット解析法の開発.  
日本化学会第 96 春季年会  
2016 年 3 月 24 日  
同志社大学京田辺キャンパス (京都府京田  
辺市)

Hattori, M. and Ozawa, T.  
Live cell imaging and in vivo analysis for  
temporal reaction of G protein coupled  
receptor using split Luciferase  
complementation.  
Pacifichem2015  
2015 年 12 月 18 日  
ワイキキビーチマリOTT (ハワイ・ホノル  
ル)

Hattori, M. and Ozawa, T.  
Bioluminescence analysis in living cells  
using NanoLuc luciferase based probes.  
Pacifichem2015  
2015 年 12 月 18 日  
シェラトンワイキキ (ハワイ・ホノルル)

Hattori, M. and Ozawa, T.  
Imaging system for monitoring of  
intracellular acidification in living  
tissues by photo-controllable luciferase.  
Pacifichem2015  
2015 年 12 月 16 日  
ハワイコンベンションセンター (ハワイ・ホ  
ノルル)

服部満, 小澤岳昌  
生物発光イメージングを利用したハイスル  
ープット解析システムの開発.  
日本分析化学会第 64 年会  
2015 年 9 月 11 日  
九州大学伊都キャンパス (福岡県福岡市)

〔図書〕(計1件)

服部満, 小澤岳昌  
化学同人  
先端計測 “三次元発光イメージング” (日  
本化学会編)  
2016, 82-87p

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
服部 満 (HATTORI, Mitsuru)  
福井大学・学術研究院医学系部門・助教  
研究者番号: 20589858

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし

(4) 研究協力者  
なし