

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：23201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14390

研究課題名（和文）生体内の活性型ビタミンDを可視化する高感度なバイオセンサーの開発と応用

研究課題名（英文）Development and application of a highly sensitive biosensor to visualize active form of vitamin D in vivo

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）：活性型ビタミンD（1,25D3）はビタミンD受容体（VDR）のリガンドとして知られる。1,25D3がVDRのリガンド結合領域（LBD）に結合すると、LXXLLモチーフと呼ばれる特異的な配列を介して転写活性化因子と相互作用する。この1,25D3-LBD-LXXLL複合体は、ビタミンD依存的な多くの遺伝子の発現を調節する。我々は、NanoBiT技術を用い、1,25D3のようなVDRリガンドを検出するバイオセンサーを開発した。本研究では、1,25D3に反応して発光が増加する1分子および2分子型バイオセンサーを構築した。さらに、LXXLL配列の長さや種類の最適化も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、NanoBiT技術を用い、活性型ビタミンD（1,25D3）に反応して発光が増加するバイオセンサーの構築に成功した。我々の生体内では、1,25D3は骨形成・骨代謝、免疫、細胞増殖に関連があることから、生体内の様々な現象に重要な役割を果たしている。我々の開発したバイオセンサーは、1,25D3を高感度に検出できることから、これまでの手法では困難であった生体内における1,25D3の時間・空間的解析にも応用が可能であると考えられる。さらに研究が進めば、多くが謎に包まれたままのビタミンDの全貌を明らかにする強力なツールとなる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The active form of vitamin D3 (1,25D3) is well known as ligands of the vitamin D receptor (VDR). After 1,25D3 binds to the ligand binding domain (LBD) of VDR, the subsequent complex interacts with the transcription coactivators via specific sequence called LXXLL motif. This 1,25D3-LBD-LXXLL complex regulates the expression of many vitamin D-dependent genes. We developed the biosensor that detect VDR ligand such as 1,25D3 using NanoBiT technique. In this study, we constructs 1-molecule and 2-molecule-type biosensor increased the light intensity in response to 1,25D3. In addition, we performed optimization of length or type of LXXLL sequence.

研究分野：遺伝子工学

キーワード：バイオセンサー ビタミンD受容体 活性型ビタミンD スプリットルシフェラーゼ NanoBiT

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内において、生理活性の高いビタミン D は活性型ビタミン D [1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D3 (1,25D3)] と呼ばれ、ビタミン D 受容体 (VDR) と結合することで下流の遺伝子の発現を活性化する。特に、骨形成・骨代謝、免疫、細胞増殖に関連があることから、生体内の様々な現象に重要な役割を果たしていることは間違いないが、1,25D3 が微量であることに加え、可視・定量する方法が存在しないことから、例えば、胚発生、臓器形成、発達過程で 1,25D3 がどこに存在するのか？ 生体の脳や腎臓等の臓器のどの部分にどの程度存在するのか？ あるいは癌やアルツハイマー病等の病変組織においては 1,25D3 が不足しているのか？ など、今なお、多くが謎に包まれたままである。そのため、1,25D3 を可視・定量する新技術の開発が求められている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、生体内における 1,25D3 の時間・空間的な局在部位を高感度に可視・定量可能な方法を開発することである。このような技術が構築できれば、上述したようなビタミン D に関する数多くの謎や疑問、さらにはビタミン D の全貌解明に繋がると考えられる。1,25D3 が VDR 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、1,25D3-VDR-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、VDR 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ため、LBD-LXXLL 間相互作用を検出することは、同時に 1,25D3 を検出して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を蛍光や発光で検出する方法として、蛍光共鳴エネルギー転移 (BRET) 法

や分割型ルシフェラーゼ法が知られる (図 1)。

本研究では、これらの技術を組み合わせ、1,25D3 の結合に起因して生じる LBD-LXXLL 間相互作用を蛍光と発光の両方で検出するバイオセンサーを構築し、

1,25D3 の検出を目指す (図 2)。

3. 研究の方法

BRET や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、相互作用に關与する

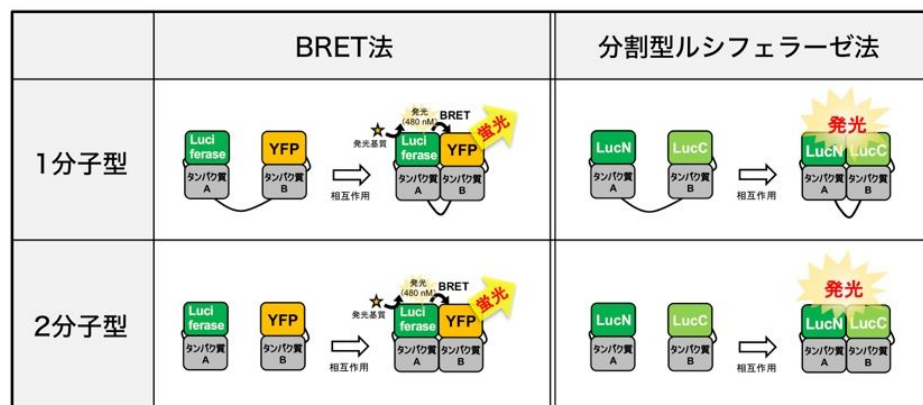


図1. BRET法および分割型ルシフェラーゼ法の原理



図2 分割型ルシフェラーゼとBRET法を組み合わせた1,25D3検出系

アミノ酸配列の長さや領域の最適化、用いる蛍光タンパク質の種類、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、ウミシイタケルシフェラーゼの分割型ルシフェラーゼ断片も検討していたが、発光強度が低く、相対発光変化量も小さかったため、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 に絞って研究を進めることとした。LgBit や SmBit に長さや種類を変えた LBD および LXXLL 配列を様々な組み合わせで繋ぎ合わせた融合タンパク質、すなわちバイオセンサータンパク質をコードするプラスミド DNA を複数種類作製した (図 3)。これらのプラスミド 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 1,25D3 を添加し、60 分後に発光基質を加え、発光の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。第一段階として、2 分子型バイオセンサーを作製し、LXXLL 配列および (GGGGS) \times 3 リンカー配列等の最適化を行った。第二段階は、2 分子型バイオセンサーで優秀な組み合わせを用いて、1 分子型バイオセンサーの作製を行った。最後に、発光強度および発光変化量の大きいバイオセンサーの分子内に蛍光タンパク質を連結し、BRET と分割型ルシフェラーゼ法を組み合わせたハイブリッド型バイオセンサーの構築を行う。

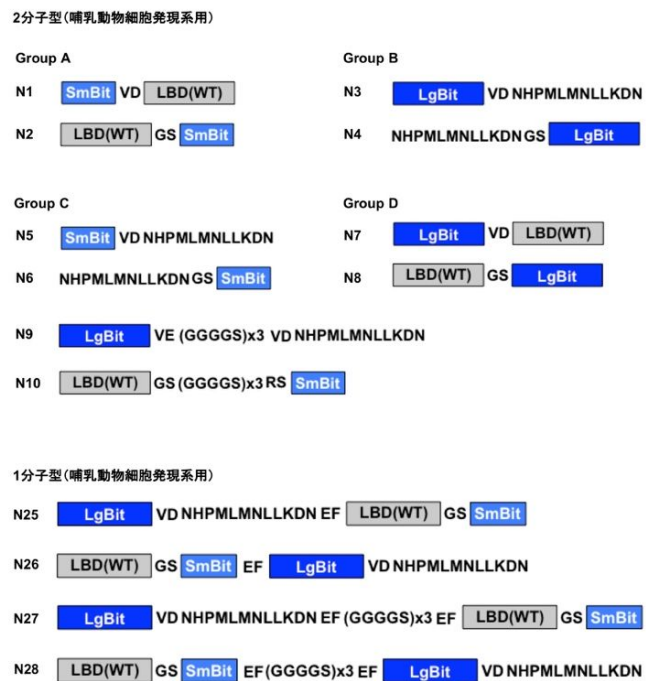


図 3. 1 分子型および 2 分子型バイオセンサーの構造

4. 研究成果

図 3 に示したプラスミド DNA: N1~N8 を COS-7 細胞に発現させ、1,25D3 添加後の発光強度および発光変化量について評価を行ったところ、N2+N3 の組み合わせが発光強度および相対発光変化量が大きい結果が得られた。この N2 および N3 の分子内に (GGGGS) \times 3 リンカーを挿入した N9 および N10 を新たに作製し、さらに、N2 と N3 を 1 分子型にした N25, N26、これらに (GGGGS) \times 3 リンカーを挿入した N27, N28 を作製した。これらの発光強度および相対発光変化量の比較は図 4 に示した。(GGGGS) \times 3 リンカーを挿入した N10+N9 は、発光強度は高くなるものの、相対発光変化量に関しては

(GGGGS) \times 3 リンカーを挿入していない N2+N3 のほうが大きい結果が得られた。一方、1 分子型については、N26 および N25 は発光強度が 2

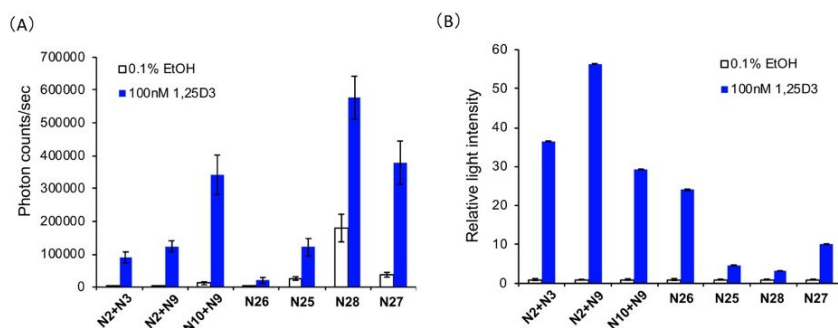


図 4. 1 分子型および 2 分子型バイオセンサー

分子型よりも低くなり、また、相対発光変化量についても2分子型よりも劣る結果となった。(GGGGS)₃ リンカーを挿入した N28 および N27 は、発光強度は高くなったが、相対発光変化量は10倍以下となり、2分子型の40倍よりも劣る結果となった。これらの結果から、1分子型よりも2分子型のほうが優秀であると判断し、2分子型バイオセンサーを進めることとした。次に、N3よりも発光強度が高く、相対発光変化量も大きいLXXLL配列が得られるかどうかを検討した。LXXLL配列の長さおよび種類の異なる29種類を新たに作製(特許出願中により配列は非公表)し、N2+N3 or LXXLL-1~29でCOS-7細胞内に発現させ、発光強度および相対発光変化量についての比較を行った(図5)。N2+N3よりも発光強度の高いLXXLL配列は、6種(LXXLL-9, 12, 14, 25, 26, 27)類得

られた。一方、相対発光変化量の大きいものは7種類得られ、中でも、LXXLL-2, 13, 24は80倍近い変化量であった。しかし、発光強度および相対発光変化量の両方が大きいものは得られておらず、

LXXLL配列の最適

化に関しては今後も検討する必要があると考えている。また、BRETに向けた準備として、N2およびN3に蛍光タンパク質であるYFPを融合したプラスミドDNAを作製し、COS-7細胞に発現させて、発光基質添加後の蛍光を測定したが、こちらは全く蛍光が検出できなかった。今後、YFPの配置部位や(GGGGS)₃ リンカー配列の挿入など、根本的な改良を検討する必要があると考えている。

本申請期間においては、分割型ルシフェラーゼ法とBRET法を組み合わせ、1,25D3を発光と蛍光の両方で検出するという目標までは進まなかったが、1,25D3を発光強度の高いNLucで検出するバイオセンサーの開発に成功した。1,25D3やVDRリガンドの生体イメージングを行うにはまだまだ課題は多く残されているが、最初の第一歩は踏み出せたと思っている。今後、順調に研究が進めば、1,25D3を目で観る時代も遠くないかもしれない。

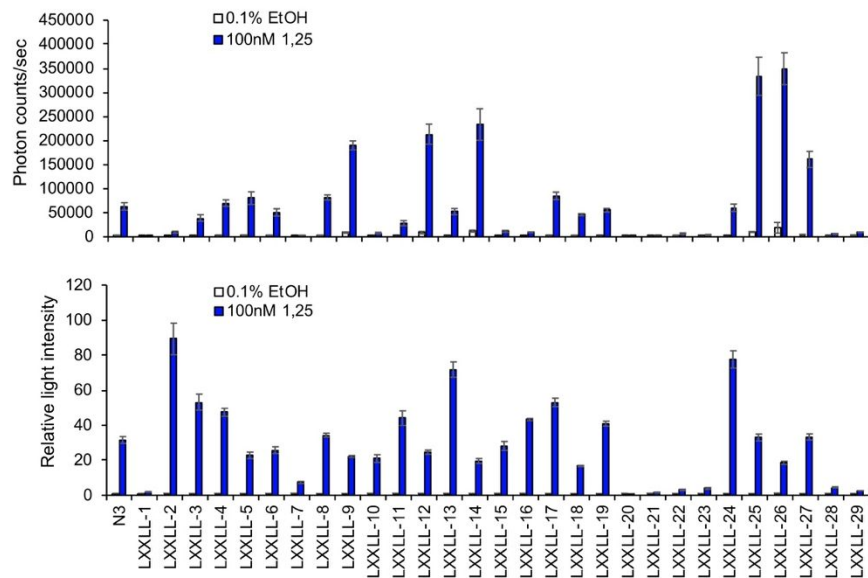


図5. LXXLL配列の検討結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 真野寛生、生城真一、高野真史、橘高敦史、榊利之
2. 発表標題 分割型ルシフェラーゼ法を用いたVDRリガンドの高感度検出系の開発と生体イメージングへの応用を目指して
3. 学会等名 日本ビタミン学会第72回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 真野寛生、生城真一、高野真史、橘高敦史、榊利之
2. 発表標題 分割型ルシフェラーゼ法を用いた核内受容体リガンドの新規検出系と応用
3. 学会等名 内外環境応答・代謝酵素研究会 2019
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 国際特許	発明者 榊利之、真野寛生、 生城真一	権利者 富山県立大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2018/040583	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----