

平成21年 5月15日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19614002

研究課題名（和文）ナノドット・多色ルシフェラーゼ融合体による生体 *in vivo* イメージング研究課題名（英文）Molecular *in vivo* photo-imaging by Quantum dot conjugate multicolor luciferase probes

研究代表者

近江谷 克裕 (Ohmiya Yoshihiro)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：20223951

研究成果の概要：

生体深部を *in vivo* イメージングすることを目標に、近赤外蛍光体・多色ルシフェラーゼを融合させ、2つの物質間に生じるエネルギー移動を利用、融合体より最大発光波長650-750nmの光を発する近赤外発光プローブの創製を目的とした。本研究の結果、最大発光波長460nm波長で励起できる近赤外蛍光体とルシフェラーゼ融合体の合成に成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：光生命科学

科研費の分科・細目：時限付き・光生命科学・9031

キーワード： *in vivo* イメージング、ホタルルシフェラーゼ、ウミホタルルシフェラーゼ、ナノドット、近赤外蛍光体

## 1. 研究開始当初の背景

生命科学の分野では、細胞内カルシウム量の変動、細胞内タンパクのリン酸化、エネルギーであるATPの分布或いは遺伝子の転写活性の測定など、細胞内に起きるさまざまな現象を解析することが大変重要であり、その手段として各種分子プローブが作成され、イメージングが行われている。とりわけ細胞内イメージングツールとして各種蛍光タンパクが用いられている。蛍光タンパクは細胞内での発現とほぼ同時期に、補因子を必要とせず、蛍光活性を持つ。細胞内で蛍光活性を指標として蛋白質の局在等に関するモニター蛋白質として利用されているが、励起光を必要とし不均一な蛍光収率等のため定量化は難しく、また、細胞に励起光を当てるため

細胞が損傷され、長時間の観察には適していない。

ホタルやウミホタル発光酵素ルシフェラーゼはレポーター遺伝子として、細胞に与える外来因子の影響の評価、細胞内情報伝達の伝播、或は個々のタンパク群の発現解析等に用いられている。ルシフェラーゼ遺伝子に転写活性領域を挿入、細胞内に遺伝子構築体を導入、レポーター遺伝子を導入した培養細胞を一定時間、薬剤等で処理した後、細胞を集め、発光基質を加えることで、細胞内で合成されたルシフェラーゼ量を測定、転写活性を評価するシステムが構築されている。ルシフェラーゼの発光量から転写活性を評価することから定量性に優れており、既に多くの会社から本システム関連製品が開発、市販化さ

れている。一方、ルシフェラーゼを用いたイメージングの例はそれ程多くないが行われている。例えば細胞内カルシウム量を発光タンパク質イクオリンで、併せてATP量をホタルルシフェラーゼで測定した例 (Sala-Newby GB et al. *Immunology* (1998) 93, 601-9)、また、ホタルルシフェラーゼスプリットアッセイによりタンパク間分子間力の可視化に成功した例もある (Ozawa T et al. *Anal Chem.* (2001) 73, 2516-21) さらに、ウミホタルルシフェラーゼを用いたイメージングでは分泌過程の可視化に成功した例もある (Inouye S et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992) 89, 9584-9587)。ただし、ルシフェラーゼによるイメージングは蛍光タンパクのように1分子レベルの解析や細胞内の極小さいエリアのイメージングには不向きである。これは蛍光タンパクに比べてルシフェラーゼの哺乳類細胞内での安定性が低く、タンパク質としての寿命が短い、或いは転写効率が低いなどのためであり、さらに、細胞の画像解析装置は蛍光に対応したものが多く、発光を効率よく計測するシステムでないためではある。とりわけ生細胞内におけるホタルルシフェラーゼの発光活性が低い、発光シグナルを容易に得ることができないためである。ホタルルシフェラーゼのうち最もイメージングその他に用いられている酵素がアメリカ産ホタル (*Photinus pyralis*) ルシフェラーゼであるが、最近、*in vitro* での半減期が長い、熱安定性を向上させた変異体において、細胞内での発光シグナルの2-25倍程度の向上が見られ、細胞内のイメージングに適したルシフェラーゼであると報告された (Baggett B et al. *Mol Imaging.* (2004) 3, 324-32)。ここでも問題として、ホタルルシフェラーゼでは細胞内のpHに影響され発光色を変える点があり、細胞内では安定な発光とはいえない。

これまで我々は、世界に先駆けてpHに影響しない発光甲虫由来の赤色、緑色ルシフェラーゼをクローニングした (Viviani VR et al. *Biochemistry* (1999) 38, 8271-9)。これは一つのホタルルシフェリンで多彩な光を生み出す多色ルシフェラーゼ群である。またウミホタルルシフェラーゼをクローン化し青色に発光する酵素を作成した (Nakajima Y et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem* (2004) 68, 948-951)。さらに、我々はこれらの発光色の多色性に注目、世界で最も赤色の光を生み出す発光甲虫由来の赤色ルシフェラーゼは最大発光波長630nmの光であり、生体組織の透過性に優れ、*in vivo* イメージングの可能性が高いと考えられることから、多色発光ルシフェラーゼを遺伝子導入した発光マウスを作成した。しかし、赤色発光を含めて期待された程の光の検出には成功しなかった。赤色

ルシフェラーゼの安定化も一つの考えであるが、さらに長波長側の光を生み出し、透過性の向上を目指し、赤色ルシフェラーゼの高機能変異体の作成を試みたが、十分な成果が得られないのが現状である。

最近、So MKらは量子ドットとルシフェラーゼを融合化することで安定な光を得ることに成功したことを報告した (*Nature biotechnology* (2006) 24, 339-43)。しかし、励起光として用いたルシフェラーゼがウミシイタケルシフェラーゼであることから青色に限定されており、多様な量子ドットを適切には励起できていない点である。よって、問題は励起光の多様性にあることから、我々の多色ルシフェラーゼを励起光とした「ナノドット・多色ルシフェラーゼ融合体による生体 *in vivo* イメージング」に着目した。

## 2. 研究の目的

生体深部を*in vivo*イメージングすることを目標に、近赤外蛍光体・多色ルシフェラーゼを融合させ、2つの物質間に生じるエネルギー移動を利用し、融合体より最大発光波長650-750nmの光を発する近赤外発光プローブの創製を目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究の基本コンセプトはナノドットを多色ルシフェラーゼで励起して、それより波長域の長い光を生み出すということである。そこで、多色ルシフェラーゼの最適化し、ナノドット融合体を開発する。より具体的には、

### 1) 多色ルシフェラーゼの改変・改良

ホタル、ウミホタルルシフェラーゼの発現・精製法を確立する。また、融合化するためにルシフェラーゼの活性・機能相関を明らかにする。

### 2) 多色ルシフェラーゼとナノドットの融合法の検討

ルシフェラーゼのビオチン化条件等を検討、ナノドットとの融合化法を確立する。

### 3) 融合体の特性解析

ルシフェラーゼ・ナノドット融合体の発光活性や発光スペクトルなどの特性を明らかにする

### 4) 発光個体イメージング法の検討

TGマウスをモデルに生体の深部から発する光がどの程度の深さまで*in vivo*イメージングできるか検討する。

## 4. 研究成果

1) 多色ルシフェラーゼ候補の一つ発光甲虫ルシフェラーゼの変異体等を作成、発光特性と構造機能相関より、ドナー発光体として発光色を制御可能な局所構造を検討した。その結果、発光甲虫ルシフェラーゼにおける発光色を決定にかかわる一次構造上の重要な部位の特定には成功した。しかしながら、ナノド

ットと融合させるための適切な部位の特定には至らなかった。また、ナノドットとの融合化を行うためにはドナータンパク質としての安定化が必須であるが、安定化には成功しなかった（発表論文1、2）。

もう一つの多色ルシフェラーゼ候補として、ウミホタルルシフェラーゼを検討した。ウミホタルルシフェラーゼをタンパク質として多量に得るため、始めに酵母における発現・精製系を検討した。その結果、大量なウミホタルルシフェラーゼを得ることに成功した（

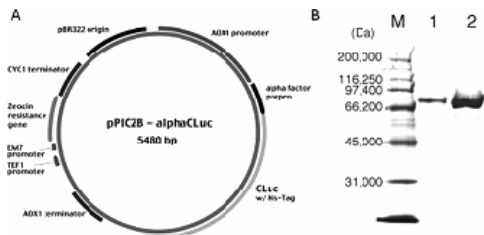
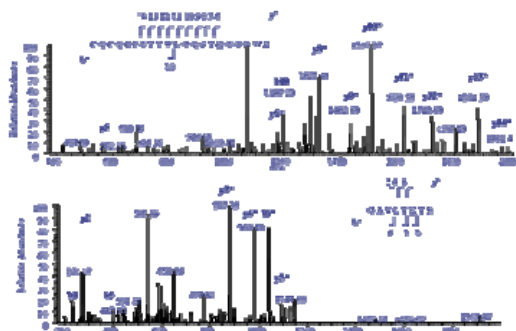


図1 ウミホタルルシフェラーゼの酵母での発現・精製に際し酵母発現ベクター、(5'発現領域を削除することで35%以上の純度で高純度産物)

図1)。さらに、種々のビオチン化法を検討した結果、発光活性が低下することなくビオチン化標識が可能である点を明らかにした。また、MS/MS法によりビオチン化されたアミノ酸残基がLys-180及びLys-203であることを明らかにした（図2）。なお、本成果を別の研究に発展させ、ビオチン化ウミホタルルシフェラーゼを活用して免疫アッセイシステムの構築に成功した。（発表論文3、4）これによって、ドナルルシフェラーゼの構築に成功した。



的に捉えることに成功 (図5)、従来のホタルルシフェラーゼにおける光イメージングの現状を明らかにした (発表論文5)。

今後、これらのデータをコントロールとして、近赤外光プローブの生体内での特性等を明らかにする予定である。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Wu C, Irie S, Yamamoto S, Ohmiya Y: A bioluminescent enzyme immunoassay for prostaglandin E2 using Cypridina luciferase, *Luminescence* 24, 131-133, 2009 (査読あり)
- ② Akimoto H, Kwon HJ, Ozaki M, Yasuda K, Honma K, Ohmiya Y: In vivo bioluminescence imaging of bone marrow-derived cells in brain inflammation. *Biochem Biophys Res Commun* 380, 844-849, 2009 (査読あり)
- ③ 近江谷克裕、星野英人: クラゲの発光システムを利用した1細胞生物発光イメージング、化学と工業、79 巻 122-124 頁、2009 (査読なし)
- ④ Viviani VR, Arnoldi FG, Neto AJ, Oehlmeyer AT, Bechhara FJ, Ohmiya Y: The structural origin and biological function of pH-sensitivity in firefly luciferases, *Photochem Photobiol Sci.* 7, 159-619, 2008 (査読あり)
- ⑤ Viviani VR, Neto AJ, Arnoldi FG, Barbosa JA, Ohmiya Y: The influence of the loop between residues 223-235 in beetle luciferase bioluminescence spectra: a solvent gate for the active site of pH-sensitive luciferases, *Photochem Photobiol*, 84, 138-144, 2008 (査読あり)
- ⑥ Wu C, Kawasaki K, Ogawa Y, Yoshida Y, Ohgiya S, Ohmiya Y: Preparation of biotinylated Cypridina luciferase and its use in bioluminescent enzyme immunoassay., *Analytical Chemistry* 79, 1634-1638, 2008 (査読あり)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 近江谷克裕: ポストゲノム時代における発光イメージングの可能性、第3回ケミカルバイオロジー研究会シンポジウム (2008. 5. 19 東京・学術総合センター)

[図書] (計 1 件)

- ① 近江谷克裕: 「発光生物のふしぎ」ソフトバンク クリエイティブ社, 218p, 2009 年

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

近江谷 克裕 (Yoshihiro Ohmiya)  
北海道大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 20223951

(2) 研究分担者

山野井 慶徳 (Yoshinori Yamanoi)  
東京大・理学系・助教  
研究者番号: 20342636

なお平成20年度は担当していたナノドットの作成が初年度において、十分な成果を挙げることができたため、研究分担者より除外

(3) 連携研究者

なし