

指向性進化法による細胞代謝の多次元的可視化を目指した
オプトジェネティック・ケミオプトジェネティックインジケータの開発
Directed Evolution of a Palette of Optogenetic and
Chemi-Optogenetic Indicators for
Multiplexed Imaging of Cellular Metabolism
課題番号：19H05633

ロバート イー キャンベル (Robert E. Campbell)
東京大学・大学院理学系研究科・教授



研究の概要（4行以内）

本研究では、指向性進化を中心とするタンパク質工学とケミカルバイオロジーの方法論に基づき、細胞内代謝を可視化する新規かつ高性能の蛍光指示薬（インジケータ）の開発を行う。可視光から近赤外に及ぶ複数の指示薬を作ることで、主要な代謝物の動的挙動を同時に解析可能な技術を確立し、神経科学や癌生物学への応用を目指す。

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：タンパク質工学、蛍光、顕微鏡、細胞生物学、代謝物、神経科学、癌

1. 研究開始当初の背景

最近の研究によれば、癌や神経変性疾患など多くの病気は細胞の代謝経路の異常に起因すると考えられている。例えば、癌細胞は好气的条件下でもグルコースをピルビン酸ではなく乳酸へと代謝する事が古くから知られている（Warburg 効果）。しかし、細胞内代謝を迅速かつ非侵襲的に解析するための方法は限られており、新たな手法の開発が強く望まれている。

標的物質と選択的に結合（反応）して蛍光強度が変化するバイオセンサー（インジケータ、蛍光プローブ、とも呼ばれる）は、細胞やモデル動物における標的物質の挙動をリアルタイムに可視化できる有用な実験ツールであり、特に Ca^{2+} イオンを検出するセンサーは世界中の生物学研究者に盛んに利用されている。しかしグルコースや乳酸、ピルビン酸など主要な細胞内代謝物に対する高性能バイオセンサーは殆ど報告されていない。

2. 研究の目的

本研究では、タンパク質の指向性進化（directed evolution）を基盤とする独自の的方法論により、代謝物を標的とする高性能なバイオセンサーを多面的に開発し、細胞内代謝を多次元的に解析することを目指す。より具体的には、可視光～近赤外の幅広い波長で蛍光を発するタンパク質型バイオセンサーに加

えて、有機合成分子とタンパク質とを併用するケミオプトジェネティックセンサーの開発に取り組み、多色蛍光イメージングによって培養細胞およびモデル動物において複数の代謝物の同時解析を行う。併せて、高性能センサーを効率的に作製するための新規方法論の開発にも取り組む。

3. 研究の方法

研究代表者はこれまでに蛍光タンパク質を用いたバイオセンサー開発で世界をリードする成果を収めており、これらの経験を踏まえて本研究を遂行する。バイオセンサーは基本骨格となる発蛍光モジュールと標的結合部位であるセンシングモジュールから構成されるが、これらを適切に組み合わせる上で大腸菌でのスクリーニングを行い、有望な分子を指向性進化させることで高性能センサーを獲得する（図1）。さらに、必要に応じて哺乳類細胞での評価も実施する。ケミオプトジェネティックセンサーの場合には、蛍

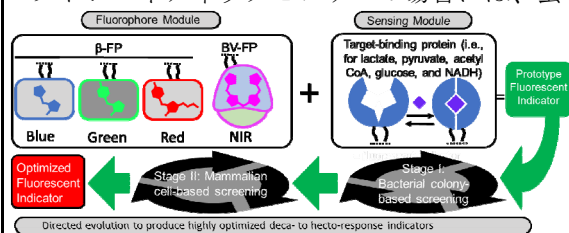


図1. 高性能バイオセンサー開発の方法（概略）

光色素や認識部位となる化合物を有機合成した上でタグタンパク質へと標識し、タンパク質部分を同様に指向性進化させることで高性能センサーを獲得する。

4. これまでの成果

これまでの約2年間で得られた代表的な成果について項目別に説明する。

(1) 高性能乳酸センサーの開発

乳酸は最も基本的な細胞内代謝物の一つであるが、そのセンサー開発は遅れており既報のセンサーはいずれも5未満の蛍光シグナル変化に留まっている。我々は circular permutation を施した緑色蛍光タンパク質 (cpGFP) と乳酸結合ドメインを組み合わせた新規蛍光センサー-LACCO シリーズを作製し、指向性進化によるタンパク質改変を行う事で、最大 45 倍もの蛍光強度変化を示す高性能センサーの開発に成功した (図2)。また、LACCO の発蛍光ドメインを赤色蛍光タンパク質へと変換した R-LACCO シリーズを開発するとともに、乳酸の幅広い生理的濃度範囲に対応するためセンシングモジュールの親和性を調節した類縁体の開発にも成功している。

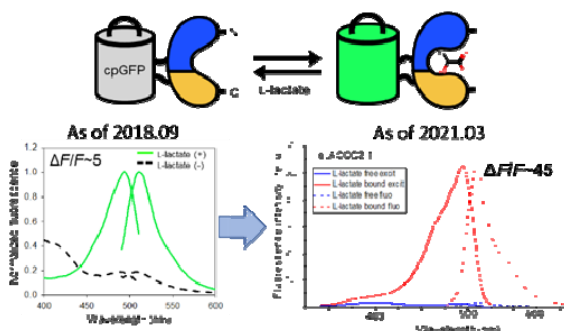


図2. 高性能乳酸センサーの開発

(2) 近赤外蛍光センサーの開発

研究代表者らは 2019 年、近赤外蛍光タンパク質 BV-FP を基盤とする世界初の Ca^{2+} センサーである NIR-GECO1 を報告している (*Nat. Methods*, 2019, 16, 171-174)。しかし NIR-GECO1 およびその改良版は Ca^{2+} に応答して蛍光強度が減弱するタイプのセンサーであり、実用性の観点では課題が残っていた。本研究ではタンパク質工学と指向性進化を駆使することで、 Ca^{2+} 存在下で蛍光強度が上昇するタイプの新規近赤外センサータンパク質の開発に初めて成功した。本センサーは現在改良の途中であり、in vivo 応用に向けて解決すべき課題はいくつか残っているものの、蛍光上昇型センサーの開発が出来たことは特筆すべき成果と考えられる。

(3) 蛍光センサー開発手法の改良

研究代表者らはこれまで、主にランダムに作製した遺伝子ライブラリーを大腸菌にクローニングし、そのコロニーを手作業で評価

する事によってセンサー候補タンパク質の指向性進化実験を行っていた。本項ではこの工程をより論理的または効率的に行うための新たな方法論開発に取り組んだ。具体的には、西安交通大学の Yurong Wen 教授と共にセンサータンパク質の X 線結晶構造解析を行い、複数の構造を解く事に成功した。また研究分担者である東京大学の合田圭介教授を中心にインテリジェント画像活性細胞選抜法 (iIACS) の改良に取り組み、virtual-freezing fluorescence imaging という新たな技術によって高速かつ高感度に細胞の蛍光を識別する事に成功した。

5. 今後の計画

現在開発の途上である複数のセンサーについて、引き続き研究を進めて性能の向上および生物応用を行う。また、ケミオプトジェネティックセンサーに関する研究を加速させると共に、iIACS を始めとする革新的技術を用いた蛍光センサー開発を実証する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

- (1) Y. Nasu, C. Murphy-Royal, Y. Wen, J. Haidey, M.R.S. Molina, A. Aggarwal, S. Zhang, Y. Kamijo, M.-E. Paquet, K. Podgorski, M. Drobizhev, J.S. Bains, M.J. Lemieux, G.R. Gordon, and R.E. Campbell*, “A genetically encoded fluorescent biosensor for extracellular L-lactate”. *bioRxiv*, 2021, 2021.03.05.434048.
- (2) Y. Nasu, Y. Shen, L. Kramer, and R.E. Campbell*, “Structure- and mechanism-guided design of single fluorescent protein-based biosensors”, *Nat. Chem. Biol.*, 2021, in press.
- (3) A. Isozaki, H. Mikami, H. Tezuka, H. Matsumura, K. Huang, M. Akamine, K. Hiramatsu, T. Iino, T. Ito, H. Karakawa, Y. Kasai, Y. Li, Y. Nakagawa, S. Ohnuki, T. Ota, Y. Qian, S. Sakuma, T. Sekiya, Y. Shirasaki, N. Suzuki, E. Tayyabi, T. Wakamiya, M. Xu, M. Yamagishi, H. Yan, Q. Yu, S. Yan, D. Yuan, W. Zhang, Y. Zhao, F. Arai, R.E. Campbell, C. Danelon, D. Di Carlo, K. Hiraki, Y. Hoshino, Y. Hosokawa, M. Inaba, A. Nakagawa, Y. Ohya, M. Oikawa, S. Uemura, Y. Ozeki, T. Sugimura, N. Nitta and K. Goda*, “Intelligent image-activated cell sorting 2.0”, *Lab Chip*, 2020, 20, 2263-2273.
- (4) H. Mikami, M. Kawaguchi, C.-J. Huang, H. Matsumura, T. Sugimura, K. Huang, C. Lei, S. Ueno, T. Miura, T. Ito, K. Nagasawa, T. Maeno, H. Watarai, M. Yamagishi, S. Uemura, S. Ohnuki, Y. Ohya, H. Kurokawa, S. Matsusaka, C.-W. Sun, Y. Ozeki, and K. Goda*, “Virtual-freezing fluorescence imaging flow cytometry”, *Nat. Commun.*, 2020, 11, 1162.

7. ホームページ等

<https://www.chem.s.u-tokyo.ac.jp/campbell>