

機関番号：10101
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2008～2010
課題番号：20770115
研究課題名（和文） 生物発光—蛍光 2 重エネルギー移動によるカスパーゼ 3 活性化指示薬の開発
研究課題名（英文） Development of caspase-3 indicator based-on bioluminescence-fluorescence double resonant energy transfer
研究代表者
齊藤 健太 (SAITO KENTA)
北海道大学・電子科学研究所・特任准教授
研究者番号：60374659

研究成果の概要（和文）：本研究では生物発光共鳴エネルギー移動（BRET）を利用した発光量増強技術と蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）に基づく指示薬作成技術を結びつけ発光性 Ca²⁺ 指示薬 BRAC の開発とその性質の解析および BRAC を利用し生きた細胞内（HeLa 細胞）および植物（シロイヌナズナ）内の Ca²⁺ イメージングを行った。その後生物発光—蛍光 2 重エネルギー移動についての研究を行い蛍光タンパク質 Venus と橙色・赤色系蛍光タンパク質との相性の良い FRET ペアを探索していくつか該当する蛍光タンパク質を見つけた。しかしながら両者の FRET 効率は低く満足の行く結果が得られていないため赤色系タンパク質に改良を加えたり新規に開発する事が今後の新たな研究課題になると考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, first, bioluminescence resonance energy transfer (BRET) based Ca²⁺ indicator, BRAC was developed and tested to evaluate its physiochemical properties. Second, BRAC was used to visualize Ca²⁺ dynamics in living cells (HeLa cells) and living plant (*Arabidopsis thaliana*) leaf. Finally, to make the indicator based on bioluminescent-fluorescent double resonant energy transfer, appropriate FRET acceptor for FRET donor Venus were investigated in possible orange to red fluorescent protein candidates. However FRET efficiency between Venus and these orange to red fluorescent proteins were poor, so additional studies should be needed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：バイオイメージング、細胞内情報伝達

1. 研究開始当初の背景

ポストゲノム時代に入り分子イメージングと呼ばれる、生きた生物個体内の生体分子の挙動を低侵襲的に可視化する研究の重要性が増している。分子イメージングのためには、生きた個体・組織において生体情報が、「いつ」、「どこで」、「どのように」細胞内・細胞間を伝播していくのかを正確に可視化できる機能イメージング指示薬の開発が必須である。指示薬によるイメージングは、蛍光と生物発光を用いたものが主に行われている。しかしながら蛍光性の指示薬は励起光が細胞へ及ぼす光毒性、励起光が引き起こす生理学的な応答、励起光による内在性物質の自家蛍光シグナルが発生するという問題がある。また発光性の指示薬は明るさやダイナミックレンジについては改善の余地が多く残されている。

2. 研究の目的

以上の研究背景を受けて私は生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) を利用した発光量増強技術と蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) に基づく指示薬作成技術を結びつけ、蛍光イメージングの弱点を克服するための生物発光-蛍光 2 重エネルギー移動による指示薬開発、特に細胞内シグナル伝達 (Ca^{2+} やカスパーゼ 3 等) を可視化する指示薬の開発を目的として研究を開始した。この指示薬は発光性であるため蛍光性の指示薬が有する励起光が細胞へ及ぼす光毒性、励起光が引き起こす生理学的な応答、励起光による内在性物質の自家蛍光シグナルが発生するという問題を回避することができる。また発光性の指示薬

が持つ明るさやダイナミックレンジの問題については BRET による発光量増強と BRET-FRET² 重蛍光移動により解決することが可能と考えられる。

3. 研究の方法

(1) 指示薬開発の最初の段階として、発光タンパク質 Rluc と蛍光タンパク質 Venus を用いた Ca^{2+} 指示薬の開発を行った。これには Venus の 5 種類の円順列変異体を用いたこれら Venus 変異体と Rluc を適切なリンカー配列でつなぐ事で BRET 効率の最適化を行った。

(2) 作成した発光性 Ca^{2+} 指示薬を利用した発光イメージングを行った。これは培養細胞 (HeLa 細胞) と植物個体 (シロイヌナズナ葉) の両方で行った。

(3) 2 重エネルギー移動のための蛍光タンパク質 Venus と赤色系蛍光タンパク質ペアの探索を行った。

4. 研究成果

(1) 発光タンパク質 Renilla Luciferase (RLuc) とそのエネルギーを効率良く受け取る蛍光タンパク質として Venus を、それぞれ BRET のドナー・アクセプターとして用いた。両者の間に、 Ca^{2+} 結合に伴ない構造が変化するタンパク質、カルモジュリン (CaM) および結合標的として M13 ペプチドを挿入した (図 1)。ただの Venus だけでなく、円順列変異型 Venus をアクセプターとして試した。これらの中で、最適な BRET 効率の変化が起こるコンストラクトを発光性 Ca^{2+} 指示薬 (BRAC) と名付けた。

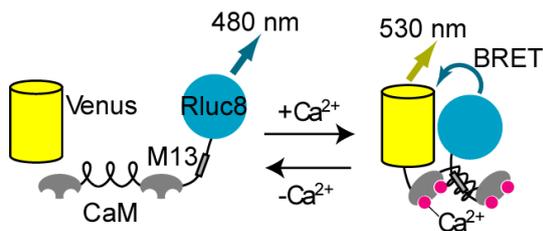


図1 BRAC 模式図

(2) BRAC の開発とその性質: 作成したコンストラクトを大腸菌株 JM109[DE3]にてタンパク質発現を行いニックルアガロースカラムを用いて精製した。すべてのコンストラクトについて Ca^{2+} タイトレーションを行いその中から最大の Dynamic Range (60%) を持つものを BRAC と名付けた。解離定数 (K_d 値) は $1.9 \mu\text{M}$ 、生理的 pH に対しては安定した応答を示すことがわかった。

(3) BRAC による細胞内 Ca^{2+} イメージング: BRAC は HeLa 細胞に発現させ、Venus の蛍光を確認する事で発現した細胞を探すことができた。発現した HeLa 細胞にたいして、 $10 \mu\text{M}$ のヒスタミン刺激を加えることで、数十秒周期での Ca^{2+} 振動を確認する事ができた。

(4) BRAC による植物個体 Ca^{2+} イメージング: 次に BRAC を安定的に発現する植物 (シロイヌナズナ) を作成した。シロイヌナズナは病原性細菌への抵抗の際、感染してから 90 分後に Ca^{2+} が感染部位においてシグナルとして作用している事が先行研究からわかっている。シロイヌナズナ葉に感染抵抗性を示す病原性細菌を塗布したところ塗布後約 90 分後に Ca^{2+} 上昇が確認された。一方感染性を示す病原性細菌を塗布したところ Ca^{2+} 上昇は起こらなかった (図 2)。

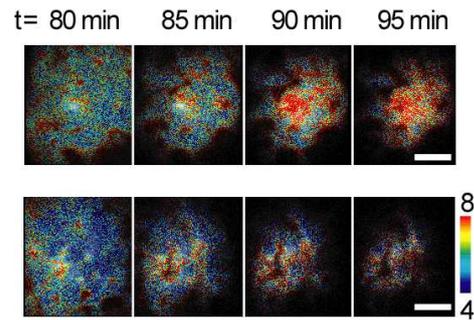


図2 シロイヌナズナ感染部位における Ca^{2+} イメージング。上段は感染抵抗性を示す細菌を感染した葉、下段は感染否抵抗性を示す細菌を感染した葉。青→赤の擬似カラーを Ca^{2+} 濃度に割りあてて表示している。

(5) 生物発光-蛍光 2 重エネルギー移動についての研究を行った。Venus と橙色・赤色系蛍光タンパク質との相性の良い FRET ペアを探索し、いくつか該当する蛍光タンパク質を見つけたものの、FRET 効率は非常に低く、満足の行く結果が得られなかった。この結果を踏まえ、赤色系タンパク質に改良を加えたり新規に開発する事も視野に含めて今後の研究を進めたいと考えている。

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 1 件)

① Kenta Saito, Noriyuki Hatsugai, Kazuki Horikawa, Kentaro Kobayashi, Toru Matsu-Ura, Katsuhiko Mikoshiba, Takeharu Nagai.

“Auto-luminescent genetically-encoded ratiometric indicator for real-time Ca^{2+} imaging at the single cell level.”

PLoS ONE, 5: e9935, 2010 査読有

[学会発表] (計 1 件)

① Kenta Saito, Takeharu Nagai

“Auto-luminescent genetically-encoded
ratiometric indicator for real-time Ca²⁺
imaging at the single cell level.”

ECS 2010 Warsaw

2010.9.6-10

Warsaw Ochota Campus ・ ワルシャワ

[その他]

ホームページ等

<http://nano.es.hokudai.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

齊藤 健太 (SAITO KENTA)

北海道大学 ・ 電子科学研究所 ・ 特任准教授

研究者番号 : 60374659

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし