

科学研究費助成事業（科学研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月4日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23655152

研究課題名（和文） 生体内での細胞挙動を可視化する分子プローブ

研究課題名（英文） Molecular probes to visualize cellular processes in vivo

研究代表者

佐藤 守俊 (SATO MORITOSHI)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号：00323501

研究成果の概要（和文）：本研究では、海洋生物である機脚類（ガウシア・プリンセプス）由来のルシフェラーゼを出発物質として、超高輝度の変異体を論理的に開発した。ガウシアルシフェラーゼの酵素活性中心を推定し、部位特異的アミノ酸変異導入を行った。開発した変異体の中には、オリジナルのガウシアルシフェラーゼに比べて、10倍程度高輝度化した変異体や、スペクトルが33 nm長波長化した変異体が含まれ、これらはバイオアッセイにおいて非常に有用なツールを提供する。この変異体の有用性は、BALB/cヌードマウスにおいて、当該ルシフェラーゼ変異体を発現するマウスB16メラノーマ細胞の肺への変異を高感度に可視化できたことでも明らかである。

研究成果の概要（英文）：In this study, a rational development of superluminescent variants of a luciferase derived from *Gaussia princeps* was demonstrated. A putative catalytic center of *Gaussia luciferase* was assigned and modified by a site-directed mutagenesis. The potent variants were found to generate up to 10 times stronger bioluminescence, emitting red shifts of up to 33 nm with natural coelenterazine than native GLuc, rendering an efficient optical signature in bioassays. The advantageous properties were demonstrated with metastases of murine B16 melanoma in BALB/c nude mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：生体機能関連化学

1. 研究開始当初の背景

幹細胞研究や再生医学研究の急速な進展を受けて、細胞の分化が生体のどこで起こるのか、幹細胞から分化した細胞が生体内でどのように振る舞うのか、あるいは特定の遺伝子発現が生体内のどこで起こっているのか、その遺伝子発現を起こした細胞は生体内でどのような挙動を示すのか等の諸問題を可視的に明らかにできる技術の開発が待たれている。

1990年代に始まった緑色蛍光タンパク質（GFP）の科学研究への応用以来、蛍光タンパク質は高輝度化と多色化に関する改良を重ね、特に線虫やゼブラフィッシュ等の透明なサンプルでの可視化研究に対して強力なツールを提供している。蛍光タンパク質全般の問題として、マウス等の不透明なサンプルにおける、励起光の透過不良の問題や自家蛍光の問題等が指摘され続けている。一方、生物発光タンパク質（ルシフェラーゼ）は励起光が必要としないため、蛍光タンパク質のよ

うな自家蛍光の問題に無縁である。このため、生体における理想的なレポーターとしてルシフェラーゼが注目されるようになって久しいが、日進月歩の勢いの蛍光タンパク質の改良研究に比べると、ルシフェラーゼのそれは極めて限定的と言わざるを得ない。ホタルや様々な海洋生物が有するルシフェラーゼやそれをコードする遺伝子 (cDNA) が市販されているが、いずれも天然のアミノ酸配列にほとんど改変を加えることなく用いられているため、生体組織の深部における細胞挙動を追跡する目的に利用するには、その輝度は不十分と言わざるを得ない。我々は輝度などどの点において、ルシフェラーゼが抱えるいくつかの問題については改良の余地が大きいと考え、本研究は、ルシフェラーゼへのアミノ酸変異導入に基づいて同タンパク質の大幅な高輝度をめざす開発研究をスタートさせた。

2. 研究の目的

本研究でアミノ酸変異を導入するのは海洋生物の橈脚類 (ガウシア・プリンセプス) 由来のルシフェラーゼである。このガウシアルシフェラーゼは、天然物であるセレンテラジンを基質として、これを酸化する酵素である。この酵素反応で生成した励起分子が緩和する過程で、強い生物発光が発生する。我々は上述の酵素反応が起こる活性中心近傍に集中的にアミノ酸変異を導入して発光強度を指標として変異体をスクリーニングすることにより、高輝度変異体を単離できるのではなかと考えた。ちなみに、ガウシアルシフェラーゼは極めて結晶化が困難なタンパク質であり、その構造は明らかになっていない。我々も当該ルシフェラーゼの生物発光特性を合理的に改変するために結晶化を試みているが成功には至っていない。従って、様々な手法でガウシアルシフェラーゼの活性中心を推定し、その近傍のアミノ酸を狙って変異を導入した。

なお、本研究で、部位特異的なアミノ酸変異導入を行うための出発物質として、ガウシア由来のルシフェラーゼに注目した理由の一つは、既存のルシフェラーゼの中で最も輝度が高いルシフェラーゼであることが挙げられる。もう一つの理由は、基質である D-ルシフェリン以外にアデノシン三リン酸 (ATP) を要求するホタル由来のルシフェラーゼとは異なり、ガウシア由来のルシフェラーゼは、基本的には、基質であるセレンテラジンさえあれば生物発光を生起するという非常にシンプルなルシフェラーゼである点が挙げられる。

3. 研究の方法

本研究ではまず、ヒト由来の細胞における当該タンパク質の発現を向上させるために、ガウシアルシフェラーゼをコードする遺伝子配列のコドン、ヒトの細胞において優先的に用いられているコドンに変更すべく、cDNA の全合成を行った。このようにコドンをヒト化したガウシアルシフェラーゼの cDNA をベクターに挿入する。このベクターを鋳型として、かつ変異の入ったオリゴ DNA をプライマーとして用いてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行い、ガウシアルシフェラーゼをコードする遺伝子の狙った箇所に特定の変異を導入する。このように変異を導入したガウシアルシフェラーゼを哺乳類由来の細胞に発現させる。なお、ガウシアルシフェラーゼは本来分泌タンパク質なので、本研究では、ガウシアルシフェラーゼのカルボキシ末端にリシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ロイシン (KDEL) からなるアミノ酸配列を連結し、当該ルシフェラーゼが細胞外に分泌されず、細胞の小胞体に留まるように設計する。その上で、ガウシアルシフェラーゼを発現する細胞の培養液にセレンテラジンを添加して、ルミノメーターやプレートリーダー等でガウシアルシフェラーゼからの生物発光を測定する。このように細胞レベルでの検討に基づいて、最も高輝度化したガウシアルシフェラーゼ変異体をスクリーニングする。

次に、マウス生体 (*in vivo*) において当該ガウシアルシフェラーゼ変異体の生物発光の評価を行うために、当該ルシフェラーゼ変異体をガン細胞に発現させ、それをマウスの皮下に移植したり、マウスの尾静脈に注入する。前者はマウス体内においてガン細胞の増殖を観察するモデル実験系を提供し、後者は当該ガン細胞の肺への転移モデルを提供する。このようにガウシアルシフェラーゼの変異体を発現するガン細胞を導入したマウスを、超高感度の EMCCD カメラを設置した暗箱の中で観察することにより、当該ガウシアルシフェラーゼ変異体のマウス生体での評価を行う。ちなみに、上記したマウス生体での生物発光イメージングを行う直前に、基質であるセレンテラジンを当該マウスの尾静脈より注入することとする。

4. 研究成果

(1) ガウシアルシフェラーゼの高輝度変異体の開発

ガウシアルシフェラーゼは極めて結晶化が困難なタンパク質であり、その構造は明らかになっていない。我々も当該ルシフェラーゼの生物発光特性をできるだけ合理的に改

変するために結晶化を試みているが成功には至っていない。従って、我々は、ガウシアルシフェラーゼのハイドロパシプロットを行ったり、ガウシアルシフェラーゼを様々な箇所で二分化するなどして、その活性中心を推定した。そして、そのように推定された活性中心近傍のアミノ酸を狙って集中的にアミノ酸変異を導入した。このようにアミノ酸変異を導入して取得した変異体のうち最も明るいものは、オリジナルのガウシア由来のルシフェラーゼに比べて約 10 倍程度高輝度化していることが明らかになった (図 1)。ちなみにガウシアルシフェラーゼ変異体の高輝度化の主要な原因は、酵素反応のターンオーバー速度の大幅な向上であることが明らかになった。

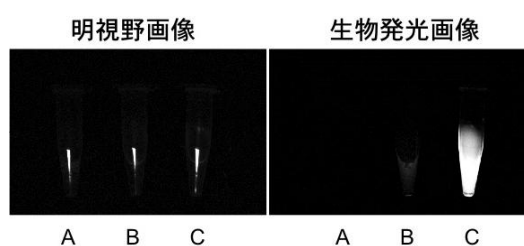


図 1 サンプルチューブに入ったホタルルシフェラーゼ (A), ガウシアルシフェラーゼ (B), および筆者らが開発した高輝度変異体 (C) の明視野画像と生物発光画像。

(2) ガウシアルシフェラーゼの高輝度変異体をマウス生体で用いたガン細胞の *in vivo* イメージング

生体の深部でのイメージングにおいて、ガウシアルシフェラーゼの高輝度変異体の有効性を評価するために、悪性黒色腫由来の細胞に高輝度変異体を発現させ、この細胞をマウスの尾静脈に注射して肺への転移を観察した。高輝度変異体では肺全体に悪性黒色腫細胞が転移している様子が観察できた (図 2)。一方、オリジナルのガウシアルシフェラーゼを用いて同様のイメージングを行ったところ、転移細胞の密度が高い部位のみから生物発光シグナルが観察され、高輝度変異体のようにより少数の細胞の挙動を可視化することは困難であった。

(3) 展望

本研究で我々が開発したガウシアルシフェラーゼの高輝度変異体は、線虫やショウジ

ョウバエ、ゼブラフィッシュ等の透明性の高いモデル小動物はもちろんのこと、特にマウス等の透明でない生体サンプルでのイメージングにおいて極めて強力なツールを提供すると思われる。本研究で開発した、ガウシアルシフェラーゼの高輝度変異体の応用範囲としては、生体におけるきわめて少数のガン細胞や幹細胞等の挙動を高感度に追跡するための細胞トラッキング、遺伝子発現を高感度に可視化するレポーター、カルシウムイオンやタンパク質間相互作用等の高感度イメージングを実現する生物発光プローブ等が考えられる。また、生物発光タンパク質や上述のような生物発光プローブが、蛍光タンパク質や蛍光プローブでは必須の励起光を必要としないことを考えると、神経細胞を脱分極させて当該細胞に活動電位を生じさせるチャンネルロドプシンや、逆に神経細胞を過分極して神経細胞の活動電位の発生を阻害するハロロドプシンを用いるオプトジェネティクス技術との相性が非常に良いと考えられる。一方、蛍光タンパク質や蛍光プローブは、オプトジェネティクス技術と併用するには交差励起を心配しなくてはならない。生物発光タンパク質の改良研究はまだ緒に就いたばかりであり、今後の更なる開発研究が大いに期待される。



図 2 悪性黒色腫由来の細胞にルシフェラーゼを発現させ当該細胞の肺への転移をマウス生体でイメージング。ガウシアルシフェラーゼ (左) と筆者らが開発した高輝度変異体 (右) の比較。

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)

Kim, S.B., Suzuki, H., Sato, M., and Tao, H.
(2011). Superluminescent variants of marine
luciferases for bioassays. *Anal. Chem.*, 83,
8732–8740. 査読有
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac2021882>

[その他]

ホームページ等

<http://satolab.c.u-tokyo.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤守俊 (SATO MORITOSHI)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授
研究者番号：00323501

(2)研究分担者

特記事項なし

(3)連携研究者

特記事項なし