

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871128

研究課題名(和文) 実時間mRNA発現動態解析による左右軸非対称性形成のシグナル制御機序の解析

研究課題名(英文) Development of real-time detection method of mRNA dynamics for the study of signal regulation system during left-right asymmetry formation

研究代表者

高井 啓 (TAKAI, Akira)

独立行政法人理化学研究所・生命システム研究センター・特別研究員

研究者番号：60637205

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体内イメージングに適したプローブとして近年開発された、超高輝度発光タンパク質Nano-lantern(ナノ・ランタン)の更に高輝度なシアン色・オレンジ色の色調変異体を開発した。これにより細胞内微細構造や遺伝子発現、細胞内カルシウムイオン濃度の動態など、複数の生命現象を高感度かつ同時に解析することが可能となった。さらにこのナノ・ランタンをRNA結合タンパク質と応用することで、標的とするmRNAを特異的に検出する方法を開発した。今後、このmRNA検出法をさらに改良してシグナル標的遺伝子のmRNA動態解析に応用することで、左右軸非対称性形成のシグナル制御機構の解析に取り組む。

研究成果の概要(英文)：In this research, we developed brighter, cyan and orange variants of Nano-lantern, a recently developed super-brilliant yellowish-green luminescent protein which is suitable for in vivo imaging. These multicolor Nano-lanterns enable monitoring of multiple biological events, including dynamics of intracellular microstructures, gene expressions, and calcium ion concentrations. Furthermore, we developed real-time mRNA detection method by combining Nano-lantern with RNA binding proteins. After further improvement of this mRNA detection method, we will apply it in a study of signal regulation mechanisms during left-right asymmetry formation.

研究分野：発生生物学、細胞生物学

キーワード：シグナル伝達 発光イメージング RNAイメージング

1. 研究開始当初の背景

(1) 脊椎動物胚の左右軸形成の最初のイベントは、左向きのノード流によってノード辺縁で細胞内カルシウムイオン濃度の上昇と Nodal シグナルの活性化が左側特異的に引き起こされることだと考えられている。このノード周辺での左側特異的シグナルが最終的に側板中胚葉における左側性のマスター遺伝子 *Pitx2* の発現を誘導する (Hirokawa, Tanaka & Okada, *Curr. Opin. Cell Biol.* 2012; 図1)。しかし、カルシウムシグナルと Nodal シグナルの時間的・空間的關係や、ノード辺縁から側板中胚葉までのシグナル伝達の詳細は未だ不明のままである。また、一般に、発生過程では Nodal 以外にも、Wnt, BMP, FGF など様々なシグナル系が重要な役割を果たしているが、これらのシグナルが左右軸形成にどのように関与しているかについては見解が定まっていない。

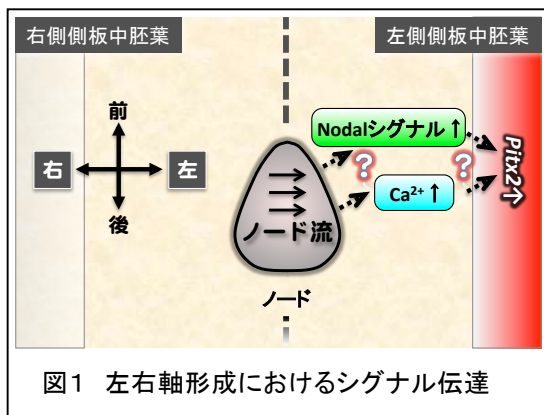


図1 左右軸形成におけるシグナル伝達

(2) 申請者らはこれまでに、脊椎動物初期胚の組織パターン形成におけるシグナル制御機構を解析してきた (Onai, Takai et al., *Evol. Dev.* 2012; Takai et al., *Development* 2010; Arakawa, Matsuo-Takasaki, Takai et al., *Dev. Biol.* 2007)。従来のシグナル解析では主に GFP などのレポータータンパク質を用いたレポーターシステムが用いられていたが、初期胚のパターン形成は短時間に進行するため、レポーターが翻訳・成熟されるまでのタイムラグと、レポーターが代謝・分解されるまでのタイムラグの2種類のタイムラグが問

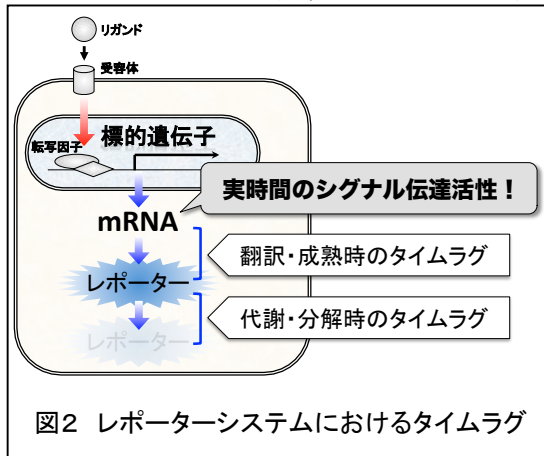


図2 レポーターシステムにおけるタイムラグ

題となっていた (図2)。

2. 研究の目的

(1) 本申請研究では、左右軸形成におけるシグナル伝達機構の解明のため、シグナル伝達動態を実時間で可視化する方法を新たに開発する。その方法として翻訳・代謝の問題が懸念されるレポータータンパク質ではなく、シグナル伝達下流のシグナル標的遺伝子の mRNA そのものを定量的に可視化する方法の開発に新たに取り組む。方法としては RNA 結合タンパク質である MS2 と PP7 を応用し、分割型ルシフェラーゼと組み合わせることで、実時間かつ定量的に mRNA を計測する方法の開発を目指す (研究の方法(2)参照)。上記の方法を用いて脊椎動物初期胚の左右軸形成におけるシグナル伝達動態の詳細を解析することで、左右軸形成機構の解明を目指す。

(2) ルシフェラーゼなどの発光タンパク質を用いた発光イメージングでは、蛍光イメージングとは異なり励起光を必要としない。このため自家蛍光がほとんどなく、シグナル/ノイズ比の良い高感度なイメージングが可能であり、自家蛍光の非常に強い脊椎動物初期胚でのイメージングに適している。さらに初期胚の細胞は励起光による光毒性に弱いこともあり、励起光を必要としない発光タンパク質を用いた発光イメージングが有利である。しかしながらこれまでの発光タンパク質は輝度が低いため感度が悪く、また色のバリエーションが少ないためイメージング法の多チャンネル化が困難であり、実用性に乏しかった。そこで本申請研究では初期胚に適したイメージングプローブであり、かつ上記の mRNA 定量法にも応用可能な発光タンパク質について、発光強度を改善し、色調を変化させた新たな発光タンパク質を開発する。

3. 研究の方法

(1) 高感度・多チャンネル解析のための発光タンパク質の高輝度化・多色化  
 大阪大学の永井健治研究室において最近、黄緑色の超高輝度発光タンパク質 Nano-lantern (ナノ・ランタン, Saito et al., *Nat. Commun.* 2012) が開発された。ナノ・ランタンは発光タンパク質 Venus と改良型ウミシイタケルシフェラーゼのバイブリッドタンパク質であり、ルシフェラーゼから Venus への生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) を人工的に引き起こすことで発光強度の改善・色調の変化を実現している。申請者らは、ナノ・ランタンを開発した永井研究室との共同研究により、ナノ・ランタンの発光タンパク質 Venus とルシフェラーゼの組み合わせを他の様々な発光タンパク質やルシフェラーゼに変更することで、ナノ・ランタンのさらなる高輝度化・発光色調の変化を図った。次に開発したナノ・ランタン色調変異体を用いた発光イ

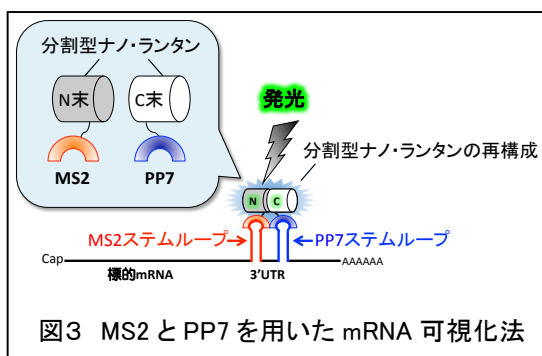
イメージングの応用として、複数の細胞内微細構造や遺伝子発現の動態解析を行った。

### (2) 分割型ナノ・ランタンを用いた実時間イメージング法の開発

分割型ルシフェラーゼはルシフェラーゼをN末端側とC末端側に分割したものであり、これら2つのN末端側とC末端側の断片が近傍に来て再構成することで、本来の発光活性を取り戻すことができる。この分割型ルシフェラーゼの技術をナノ・ランタンに応用することで、新たに分割型ナノ・ランタンを作製した。さらにカルシウムイオン依存的に構造を変化させるカルシウムセンサーペプチドCaM-M13を分割型ナノ・ランタンの間に組み込むことで、カルシウム濃度依存的に発光強度を増加させる発光型カルシウム濃度指示薬を開発した。このカルシウム濃度指示薬を細胞内カルシウムイオン濃度の多チャンネル動態解析に応用することで、分割型ナノ・ランタンによる実時間イメージング法の有効性を評価した。

### (3) RNA結合タンパク質と分割型ルシフェラーゼを利用した新規 mRNA 定量化法の開発

mRNA のライブイメージングでは、MS2 や PP7 などの RNA 結合タンパク質と GFP の融合タンパク質を用いた系が実用化されている (Lionnet et al., *Nat. Methods* 2011)。この手法は、mRNA の局在のライブイメージングで実績があるが、発現量の計測には定量性・シグナル/ノイズ比の点で不十分である。本申請研究ではこの欠点を克服するため、分割型ナノ・ランタンと組み合わせた新たな mRNA の実時間定量化法の開発を試みた。まず、標的遺伝子の 3'UTR 領域に MS2 や PP7 が結合するステムループをタンデムに導入した。次に分割型ナノ・ランタンと融合した MS2 と PP7 を、上記の標的遺伝子の mRNA と同時に発現させることで、分割型ナノ・ランタンの再構成による発光シグナルが特異的に得られるかどうかを検討した (図3)。



## 4. 研究成果

(1) ナノ・ランタンの更なる高輝度化と色調の変化のため、50以上の蛍光タンパク質・ルシフェラーゼの組み合わせを検討した結果、

新たにナノ・ランタンのそれぞれ約2.3倍と約1.5倍の発光強度を持つシアン色とオレンジ色のナノ・ランタンの開発に成功した(図4)。

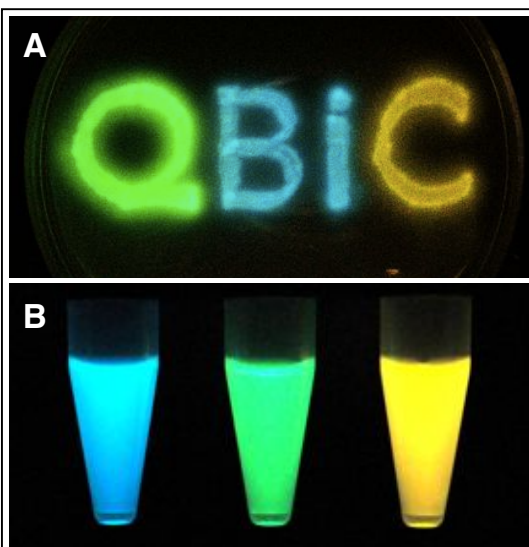


図4 3色のナノ・ランタンの発光

A: 3色のナノ・ランタンを発現した大腸菌コロニー

B: 精製した3色のナノ・ランタンタンパク質の発光

さらにこれら3色のナノ・ランタンの応用可能性の実証実験として、①複数観察対象の高感度・同時イメージング、②初期胚由来細胞での光毒性・自家蛍光フリーの複数遺伝子発現動態解析、③励起光フリーの多色カルシウムイオン濃度計測法の開発を行った。

①ではナノ・ランタンを用いて微小管など複数の細胞内微細構造を同時発光イメージングすることで、従来の蛍光イメージングと遜色ない画像を1秒程度の露光で高感度を得ることに成功した。②では初期胚由来の細胞としてES細胞を用い、3色のナノ・ランタンを応用することでSox2、Oct4、Nanogの3種類の遺伝子発現を高感度かつ同時に解析することに成功した(図5)。初期胚の細胞では蛍光イメ



図5 ナノ・ランタンを用いた遺伝子発現解析

ージングに必須な励起光による光毒性や自家蛍光が問題となりやすく、励起光が不要なナノ・ランタンを用いた発光イメージングにより、光毒性・自家蛍光フリーの複数遺伝子発現の高感度・同時解析法が実現した。③では分割型ナノ・ランタン技術とカルシウムセンサーペプチドCaM-M13を組み合わせることで、ナノ・ランタン色調変異体を用いたカルシウムイオン指示薬の開発に成功し、新たに励起光フリーのカルシウムイオン濃度の多チャンネル測定法が実現した。本法は今後、光遺伝学などの光操作技術を妨げないカルシウムイオン濃度計測法として、脳科学研究などへの応用が期待される。

以上の成果は国内外の関連学会・学術論文において発表し(Takai et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2015)、全国紙の各新聞媒体やNHKなどの各種報道機関を通じて一般社会へと発表した。

(2) MS2・PP7と分割型ナノ・ランタンを用いたmRNA可視化法の開発は次のように行った。まず、①MS2ステムループおよびPP7ステムループを3'UTRに導入した標的mRNAの発現プラスミド、②分割型ルシフェラーゼのN末・C末とMS2・PP7との融合タンパク質の発現プラスミドをそれぞれ作製し、標的mRNA特異的な分割型ルシフェラーゼの発光が得られるよう①と②の条件を検討した。①に関してはMS2ステムループとPP7ステムループ間のRNA塩基の長さを16ntとし、さらに「MS2ステムループ-16nt-PP7ステムループ」のセットを8回タンデムにすることで、標的mRNAを特異的に検出することができた。また②に関しては分割型ルシフェラーゼのN末・C末とMS2・PP7との組み合わせ、融合する方向、および融合する際のリンカーペプチドの種類を最適化した結果、得られるシグナル強度およびシグナル/ノイズ比の改善に成功した(図6)。しかしながら本法は生体内でmRNAを定量的に検出するにはまだシグナル強度・シグナル/ノイズ比に関して改善の余地があるため、これらの課題を克服した実時間mRNA定量化法の実現に現在取り組んでいる。今後は上記の実時間mRNA検出法を3色のナノ・ランタンと組み合わせ、脊椎動物個体での複数mRNA定量

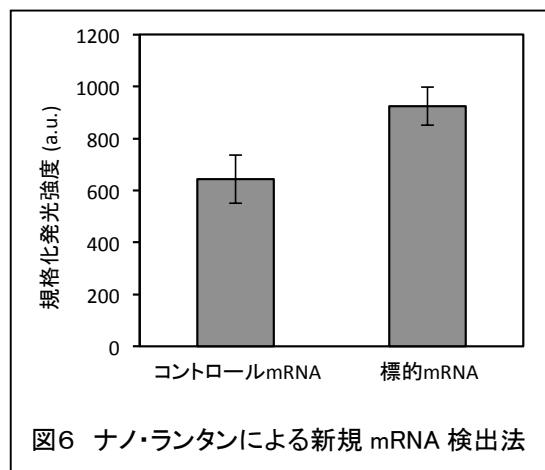


図6 ナノ・ランタンによる新規 mRNA 検出法

化法に応用する。さらにカルシウム濃度計測法と併用して生体内における各種シグナル伝達動態を解析することで、左右軸非対称性形成のシグナル制御機序の解析に取り組む予定である。

#### 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 Takai, A., Nakano, M., Saito, K., Haruno, R., Watanabe, T. M., Ohyanagi, T., Jin, T., Okada, Y. and Nagai, T. Expanded palette of Nano-lanterns for real-time multicolor luminescence imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **112**, 4352-4356 (2015)、査読有  
DOI:10.1073/pnas.1418468112

〔学会発表〕(計7件)

- ① Takai, A., Nakano, M., Nagai, T. and Okada, Y. Development of three color variants of super-brilliant luminescent proteins for multicolor, real-time bioluminescent imaging. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第92回日本生理学会大会 合同大会、神戸国際会議場・展示場(兵庫県・神戸市)、2015年3月21~23日
- ② 高井 啓、中野 雅裕、春野 玲弥、渡邊 朋信、大柳 達也、神 隆、岡田 康志、永井 健治、高感度・マルチカラー発光イメージングのための高輝度発光タンパク質 Nano-lantern の色調変異体の開発、生命動態の分子メカニズムと数理~生命動態システム科学四拠点・CREST・PRESTO 合同シンポジウム~、京都大学芝蘭会館稲森ホール(京都府・京都市)、2015年3月16~17日
- ③ 高井 啓、新規高輝度・マルチカラー発光イメージングプローブの開発とその応用、4D細胞計測全体会議、理化学研究所和光本所(埼玉県和光市)、2015年1月22日
- ④ Takai A., Haruno, R., Nagai, T. and Okada, Y. Development of three color variants of super-brilliant luciferase for multi-color, real time imaging of gene expression and dynamics of organelles and the cytoskeleton without external illumination. ミニシンポジウム(一般公募)、The 2014 American Society for Cell Biology/International Federation for Cell Biology Meeting、フィラデルフィア(ペンシルバニア州、アメリカ)、2014年12月6~10日

- ⑤ Takai, A., Haruno, R., Okada, Y. and Nagai, T. Multicolor imaging of cellular structure with wavelength variants of super-duper luminescent proteins. 第 37 回内藤コンファレンス、ヒルトンニセコビレッジ (北海道・虻田郡ニセコ町)、2014 年 7 月 15～18 日
- ⑥ 高井 啓、春野 玲弥、永井 健治、岡田 康志、超高輝度発光タンパク質の波長変異体による生体内構造・機能のマルチカラーイメージング、第 119 回日本解剖学会総会全国学術集会、自治医科大学 (栃木県・下野市)、2014 年 3 月 27～29 日
- ⑦ 高井 啓、春野 玲弥、永井 健治、岡田 康志、超高輝度発光タンパク質の波長変異体による細胞内構造・機能のマルチカラーイメージング、第 65 回日本細胞生物学会大会、ウインクあいち (愛知県・名古屋市)、2013 年 6 月 19～21 日

[その他]

- ① 2015 年 3 月 24 日付け毎日新聞、産経新聞、日本経済新聞、日刊工業新聞等の紙面、2015 年 3 月 27 日付け科学新聞の紙面、および 2015 年 3 月 24 日 NHK ニュース (関西) 等にて、本研究成果を含む研究内容が紹介された。
- ② 2014 年 10 月の Nature Methods 10 周年記念号の表紙に、本研究成果を含む写真が掲載された。
- ③ 2015 年 6 月の Nature Methods 内の「Tools in Brief」において、本研究成果を含む研究内容が紹介された。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高井 啓 (TAKAI, Akira)

理化学研究所・生命システム研究センター・特別研究員

研究者番号：60637205