

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 7 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26251018

研究課題名(和文) 個体深部の生命機能を非侵襲的に操作可能なケミルミノジェネティクス技術の創成

研究課題名(英文) Innovation of chemiluminogenetics capable of noninvasive manipulation of biological functions deep inside body

研究代表者

永井 健治 (Nagai, Takeharu)

大阪大学・産業科学研究所・教授

研究者番号：20311350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,000,000円

研究成果の概要(和文)：発光基質添加によって発生する化学発光タンパク質の励起エネルギーを利用して体内深部の生理機能を非侵襲的に操作可能にする“ケミルミノジェネティクス”ツールの基盤技術開発を行った。先ず、サクラエビ由来のルシフェラーゼと緑色蛍光タンパク質をハイブリッドすることで、従来の化学発光タンパク質Nano-lanternよりも10倍以上明るく光るGeNLを開発した。また、赤色蛍光タンパク質とのハイブリッドによりReNLを開発し、個体深部で発生する光を低照度光療法へ利用する道を拓いた。更に活性酸素産生効率を向上させた光増感蛍光タンパク質Green SuperNovaを開発することに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed several fundamental technologies for “Chemiluminogenetics” which enables noninvasive manipulation of physiological functions in deep tissue or body by using excited state energy of luminescence reaction in chemiluminescent proteins upon substrate addition. First, we fused an Oplopholus luciferase with a green fluorescent protein, yielding a bright chemiluminescent protein, GeNL that has more than 10-fold brightness compared with a previously developed chemiluminescent protein, Nano-lantern. We also developed a red-shifted version, ReNL which can be applied for low illumination light therapy in deep tissue. Furthermore, we developed a genetically-encoded photosensitizer Green SuperNova that can produce more reactive oxygen species than previous photosensitizer.

研究分野：生物物理学

キーワード：発光タンパク質 光感受性タンパク質 オプトジェネティクス 発光基質 ケミルミノジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

チャンネルロドプシンやフォトトロピンに代表される光感受性タンパク質を巧みに利用して細胞やタンパク質の機能を光で操作するオプトジェネティクス技術が近年生命科学で盛んに用いられるようになってきた。これにより細胞内の特定タンパク質の機能制御から動物の行動・思考などに関与する神経回路の時空間的制御まで、様々な空間階層における生理機能を光で制御することが可能となった。また、光増感タンパク質を光照射することで産生される活性酸素を用いて標的タンパク質を不活性化し、得られる表現型からそのタンパク質の機能を解析する光不活性化 (CALI: chromophore-assisted light inactivation) は、従来の RNA 干渉法や遺伝子ノックアウト法では不可能な細胞内のタンパク質を任意の時間に不活性化することが可能であり、より本質的なタンパク質機能解析法として期待されている。さらに、光線力学療法 (PDT: photodynamic therapy) は、光増感物質への光照射によって引き起こされる光化学反応を利用した治療法で、がん組織中に活性酸素を生成させ、その高い酸化能力によってがん組織を死滅させる治療法として知られ、早期肺がん、早期食道がん、胃がん、早期子宮頸がんなど比較的組織表層に存在する癌に対して臨床応用されている。上記の技術はいずれも、光を照射することが不可欠であり、培養細胞や比較的透明度の高い生物個体であれば、工夫を要することなく、標的部位に光を照射できる。しかしながら、体内深部に標的が存在する場合はその部位まで光ファイバーを侵襲的に導入しなければならない。赤外線は比較的深部到達度が高いが、たとえ赤外フェムト秒レーザーなどの光源を利用したとしても、組織表層から高々数ミリメートルまでしか光は届かない。従って、数センチメートル以上の深部にある標的を光照射することは不可能である。今後益々増加することが見込まれる個体レベルでの細胞・タンパク質機能解析や光ファイバーが届かず、かつ複雑に入り組んだ深部癌組織 (膵がんや骨腫瘍、脳腫瘍など) への光線力学療法を適用するには、光ファイバーに依存しない光照射技術の開発が大きなブレークスルーにつながると考えられる。そのような技術として最もふさわしいものは、標的近傍に外部からのエネルギー供給を必要としない光源を設置することである。一般に、発光は光ルミネッセンス、化学ルミネッセンス、熱ルミネッセンス、超音波ルミネッセンス、電気ルミネッセンスなど発光分子を励起する方法によって分類され、それぞれ光エネルギー、化学エネルギー、熱エネルギー、超音波エネルギー、電気エネルギーが励起のためのエネルギー源である。これらの中で外部からのエネルギー供給を必要とせず、深部到達性、非侵襲性の双方を満足するものは化学ルミネッセンスと超音波ルミネッセ

ンスである。超音波は医療分野で体内診断に利用されているものの、超音波照射によって発光し、かつ生体試料に応用可能な分子は知られていない。一方、化学ルミネッセンスはホタルやウミシイタケ、ヤコウタケなど様々な発光性生物が利用しており、生体試料への導入は古くからおこなわれている。例えばマウス体内にある癌組織の化学発光タンパク質 (ルシフェラーゼ) による可視化が好例である。従って、化学発光を利用すれば非侵襲的に体内深部のオプトジェネティクス解析や CALI、PDT が原理には可能になると考えられる。但し、一般的に化学発光の発光強度は低く、オプトジェネティクス解析や CALI、PDT を効率よく行うには不十分であった。

この欠点を解決する一つの方法としては、発光強度の高いルシフェラーゼの作製が考えられるが、効果的ではない。というのも、一般的に発光体からは射出される光は等方的 (でたらめな方向に) に広がるため、色素に吸収される確率が極めて低くなるからである。例えば GFP を発現した生細胞を全視野蛍光顕微鏡で観察する場合、およそサブ W/cm² のパワー密度で励起光を照射するが、出てくる蛍光のパワー密度は μ W/cm² 程度になり、GFP の蛍光量子収率を考慮に入れると、実に照射した光の 1/1000~1/100000 程度しか GFP に吸収されないことが知られている。従って、射出した光が“直接的”に色素に吸収されるような工夫が必要となる。

2012年に我々は、動き回るマウスの体内に存在する癌組織をリアルタイムに可視化することができる高輝度発光タンパク質 Nano-lantern を開発することに成功した (Saito K ら Nature Communications 2012)。Nano-lantern は化学発光タンパク質であるウミシイタケルシフェラーゼ Rluc と黄色蛍光タンパク質 Venus の融合タンパク質である。Nano-lantern は励起状態にある化学発光基質のエネルギーが高い効率で Venus にフェルスター共鳴エネルギー移動 (FRET) することで発光強度を大幅に増加させている。この方法のポイントは、FRET を介しているため、発光緩和のエネルギーのみならず、励起状態にある Rluc (厳密には Rluc に結合したセレンテラジン) のエネルギー全て、つまり熱過程や三重項への項間交差等で失活するエネルギーをも利用可能になるため、発光を介するよりも利用可能な総エネルギー量が増加する点にある。この原理を利用すれば、極めて効率的に化学ルミネッセンスをエネルギー源として利用でき、例え発光強度の低い化学発光タンパク質を光源として利用したとしても、オプトジェネティクスや CALI、PDT を実現できる可能性がある。但し、発光基質の代謝回転が速い化学発光タンパク質を利用しなければ単位時間あたりに必要なエネルギーを稼ぐことができないため、そのようなタンパク質の開発が必須となる。

2. 研究の目的

従来の化学発光タンパク質を発光基質の代謝回転速度の増加を指標に試験管内進化させ、高代謝回転化学発光タンパク質変異体を得る。さらに、これをチャンネルロドプシン等のオプトジェネティクスツールや光増感タンパク質に高効率な FRET を生じる立体配置で融合することによって、化学発光基質の添加依存的に細胞やタンパク質の機能を活性化・不活性化するツールやそのための基となる化学発光タンパク質を開発する。最終的にはこれらの技術を動物個体に応用し、体内深部の生理機能を非侵襲的に操作可能な極めて汎用性の高い“ケミルミノジェネティクス”技術の基盤を築く。

3. 研究の方法

以下、項目毎に記す。

(1) 高代謝回転化学発光タンパク質の開発

2012年に Fluc や Rluc8 など従来の化学発光タンパク質に比べて 100 倍程度明るい NanoLuc (以下、Nluc) が開発された。基質の代謝回転が速い発光タンパク質変異体の開発を行うために、Nluc に対してエラー誘発 PCR によりランダムに遺伝子変異の挿入を行い、大腸菌に発現させて寒天プレート上にコロニーを形成させ発光基質を投与し、発光強度を計測することで明るい Nluc 変異体のスクリーニングを行った。さらに、発光反応近傍のアミノ酸に変異を導入することで発光強度のさらなる向上を行った。

Nluc の発光ピークは 450nm 付近であるため、Nluc から赤色光増感タンパク質 SuperNova への励起エネルギー移動を行わせることはスペクトルオーバーラップの観点から困難である可能性が考えられた。そこで SuperNova の吸収極大付近に発光ピークをシフトさせることを目的として Nluc から緑色蛍光タンパク質への FRET を高効率に行わせることで緑色に発光するタンパク質の開発を行った。

(2) 活性酸素を産生する発光増感タンパク質の開発

光線力学療法や低照度レーザー療法に付随する物理的侵襲性の問題を克服するために、発光基質との反応によって活性酸素を産生する発光増感タンパク質の開発を行った。青色発光タンパク質 Nluc と光増感分子を高効率に FRET が生じるプローブの開発を試みた。光増感分子には小分子のエオシンやタンパク質性の SuperNova を用いた。エオシンを Nluc に標識するために、Nluc の様々なアミノ酸をシステインに置換し、エオシン-マレイミドを反応させた。SuperNova は Nluc と鎖長の異なるフレキシブルなアミノ酸リンカーで融合した。これらの中から、Nluc 単体と標識あるいは融合コンストラクトとの発光強度の比較によって、最も高い FRET 効率を示すコンストラクションを選択した。その後、発光基質投与に依存した活性酸素産生能を一重項酸素検出試薬 ADPA (anthracene-9,

10-dipropionic acid) を用いて評価した。

(3) 赤色及び近赤外色の化学発光タンパク質の開発

(2) の実験において期待する結果を得ることができなかったため、当初の方針を転換し、基質投与に依存して個体深部で発生する光を、低照度光療法へ応用するための基盤技術開発を目指した。この目的のために、Nluc に様々な赤色蛍光タンパク質を様々な鎖長のアミノ酸リンカーで融合したリコンビナントタンパク質の発光スペクトルを計測し、FRET 効率並びに発光強度の大きなものをスクリーニングした。さらに、リンカーアミノ酸の配列にランダム変異を導入し、より高い FRET 効率を示す融合タンパク質をスクリーニングした。また、個体深部からの光をより効率良く観察するためには更なる長波長化が必要である。そのため近赤外色の発光タンパクの開発にも取り組んだ。Nluc にストークスシフトの大きな赤色蛍光タンパク質 CyRFP と近赤外蛍光タンパク質 miRFP をタンデムにつなぎ、2段階の FRET により長波長化を達成するプローブをデザインした。高効率に FRET を起こす Nluc-CyRFP タンデムプローブを作製後、miRFP を連結させ、CyRFP-miRFP 間の FRET 効率を向上させるためにリンカー長の最適化を行った。

(4) 光増感蛍光タンパク質の波長変異体の開発

光増感蛍光タンパク質の一重項酸素産生効率を向上させるために、発色団および発色団近傍のアミノ酸残基に置換変異を導入した変異体を作製し、活性酸素産生能を評価した。

4. 研究成果

(1) スクリーニングの結果、オリジナルの Nluc よりも約 1.5 倍明るい変異体 Nluc を得た。

緑色の蛍光タンパク質として、量子収率が 0.9 と高い値を持つ mNeonGreen を FRET のアクセプター分子として利用した。そして、mNeonGreen と Nluc をつなぐアミノ酸リンカー長や種類など計 100 種類以上の変異体をスクリーニングした結果、FRET 効率がほぼ 100% となる融合タンパク質を得ることに成功した (図 1)。開発した発光タンパク質を Green_eNano-Lantern (GeNL) と名づけた。

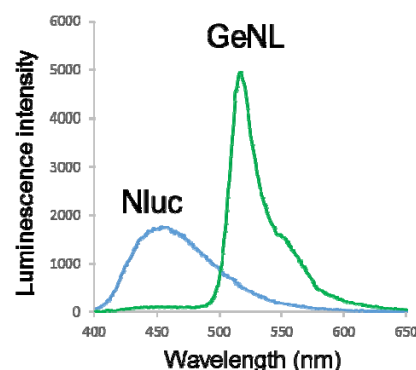


図 1. Nluc と GeNL の発光スペクトル

(2) 作製したコンストラクトの内、特にエオシンで標識されたものは高い FRET 効率を示したものの、一重項酸素の産生を確認することができなかった。

(3) Nluc に連結する赤色の蛍光タンパク質として、tdTomato を利用した。そして、tdTomato と Nluc をつなぐリンカー長や種類を検討した結果、新規赤色発光タンパク質 Red_eNano-Lantern (ReNL, 発光ピーク波長: 約 585 nm) の開発に成功した (図 2)。また、ReNL の生体内において、細胞毒性等を示すことなく発現できることを確認した。近赤外発光タンパク質の開発に関しては、ランダム変異導入と大腸菌でのコロニースクリーニングを用いた改良により高効率に FRET を起こす Nluc-CyRFP タンデムプローブを得た (図 3)。その後、miRFP を連結させたが、近赤外波長に発光ピークを示すタンパク質は得られず、CyRFP-miRFP の FRET 効率向上のための改良の余地があると考えられる。

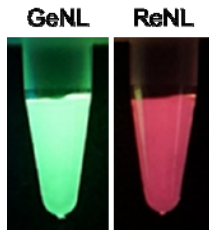


図 2. 精製した GeNL と ReNL タンパク質の発光写真 (家庭用デジタルカメラで撮影)

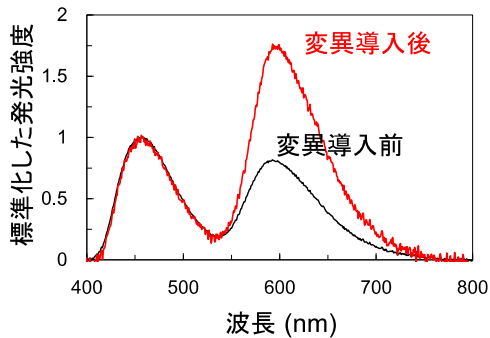


図 3. 高効率に FRET を起こす変異導入前 (黒線) 変異導入後 (赤線) の Nluc-CyRFP の発光スペクトル

(4) SuperNova の発色団構成残基の一つであるチロシン残基をトリプトファン残基に置換し、さらに発色団近傍に V44A 変異を導入することにより緑色蛍光を発する変異体を得た。本緑色変異体は、マンニトールを用いた測定により SuperNova と同等のスーパーオキシド産生すること、さらに ADPA を用いた測定により SuperNova に比べて優れた一重項酸素産生能を持つことが明らかになった (図 4)。

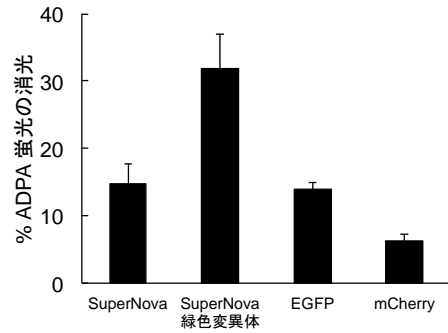


図 4. SuperNova および緑色変異体の一重項酸素産生による蛍光色素 ADPA の消光

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Takemoto K, Iwanari H, Tada H, Suyama K, Sano A, Nagai T, Hamakubo T, Takahashi T, Optical inactivation of synaptic AMPA receptors erases fear memory. *Nat Biotechnol.* 査読有, 35, 2017, 38-47
10.1038/nbt.3710
- ② Suzuki K, Kimura T, Shinoda H, Bai G, Daniels M, Arai Y, Nakano M, Nagai T, Five color variants of bright luminescent protein for real-time multicolor bioimaging, *Nature Communications*, 査読有, 7, 2016, 13718 (Article number)
10.1038/ncomms13718
- ③ Saito K and Nagai T, Recent progress in luminescent proteins development. *Curr. Opini. Chem. Biol.* 査読有, 27, 2015, 46-51
10.1016/j.cbpa.2015.05.029
- ④ Kim K, Lakhanpal G, Lu HE, Khan M, Suzuki A, Kato-Hayashi M, Narayanan R, Luyben TT, Matsuda T, Nagai T, Blanpied TA, Hayashi Y, and Okamoto K. A Temporary Gating of Actin Remodeling during Synaptic Plasticity Consists of the Interplay between the Kinase and Structural Functions of CaMKII. *Neuron*, 査読有, 87, 2015, 813-826,
10.1016/j.neuron.2015.07.023

[学会発表] (計 74 件)

- ① Takeharu Nagai, Super-duper chemiluminescent proteins applicable to wide range of bioimaging, SPIE. Photonics West 2017, SPIE BiOS, 2017 年 01 月 28 日, The Moscone Center (San Francisco, USA)

- ② Takeharu Nagai, Genetically-encoded luminescent indicator applicable in millisecond voltage phenomena, Pacifichem 2015 (The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies), 2015年12月18日, Hawaii Convention Center (Honolulu, Hawaii)
- ③ Takeharu Nagai, Genetically-encoded tools to optically control and image calcium dynamics, the 2014 FASEB SRC on Calcium and Cell Function, 2014年06月02日, Melia Nassau Beach (Nassau, Bahamas)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 健治 (NAGAI TAKEHARU)
大阪大学・産業科学研究所・教授
研究者番号：20311350

(2) 連携研究者

樋口 ゆり子 (HIGUCHI YURIKO)
京都大学・健康長寿社会の総合医療開発ユニット・講師
研究者番号：40402797

菅 裕明 (SUGA HIROAKI)
東京大学・理学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号：00361668

榎木 亮介 (ENOKI RYOSUKE)
北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・助教
研究者番号：00528341

井上 謙一 (INOUE KEN-ICHI)
京都大学・霊長類研究所・助教
研究者番号：90455395