

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460089

研究課題名(和文) レチノイン酸可視化プローブ、GEPRAの改良

研究課題名(英文) Improvement of the genetically encoded probe for retinoic acid, GEPRA.

研究代表者

下 園 哲 (Shimozono, Satoshi)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：40391982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：GEPRAとは遺伝子にコードされた蛍光性のレチノイン酸可視化プローブである。レチノイン酸は催奇形性があるため、胎仔においてどのように分布しているのかを知ることは非常に重要である。我々はこれまでGEPRAを用いて小型魚類のゼブラフィッシュ胚におけるレチノイン酸分布を明らかにしてきたが、哺乳類細胞に発現させると凝集体を形成するという問題点、明るさが比較的暗いという問題点があった。我々は今回、凝集体を形成しない明るいGEPRAの開発に成功した(mGEPRAと命名)。またmGEPRAを発現するトランスジェニックマウスの作製にも成功している。

研究成果の概要(英文)：GEPRA is the genetically encoded probe for retinoic acid. Because a high dose uptake of the retinoic acid results in teratogenesis in vertebrates, it is crucial to know how the retinoic acid distribute in embryos. Although we have successfully visualized the retinoic acid distribution in zebrafish, GEPRA had a tendency to form aggregates in mammalian cells when overly expressed. Furthermore, it is not bright because GEPRA utilizes a dim fluorescent protein. To overcome the drawbacks, we extensively engineered the probe. Finally we have obtained a brighter GEPRA without aggregates (we named the improved GEPRA, mGEPRA). We further succeeded in establishing transgenic mouse lines expressing mGEPRA.

研究分野：バイオイメージング

キーワード：蛍光タンパク質 レチノイン酸 FRET 発生生物学

1. 研究開始当初の背景

レチノイン酸は、ビタミン A の代謝物であり、発生、免疫、記憶学習など様々な生体内現象において重要な働きをする。これまで、レチノイン酸は、GFP (Green Fluorescent Protein) や LacZ をレポーターとしたレポーター遺伝子システムにより可視化されてきた。しかしながらレポーター遺伝子システムは、レチノイン酸検出までに時間がかかり、また定量性に欠ける欠点がある。

これまで、CFP (Cyan Fluorescent Protein) をドナー、YFP (Yellow Fluorescent Protein) をアクセプターとする FRET (Fluorescence Resonance Energy transfer) を利用したレチノイン酸プローブ、GEPRA (Genetically Encoded Probe for Retinoic Acid) を開発し、**発生時のゼブラフィッシュのレチノイン酸分布を明らかとした**

しかし、GEPRA にはいくつかの欠点があった。それは、哺乳類において高発現させると細胞内で凝集体を形成すること、また、明るさが比較的暗いことである。特に前者は、マウスへの応用に大きな障害となる。

2. 研究の目的

背景の項において記述したように GEPRA には改善すべき点がある。まずは細胞において形成される凝集体を解消することを目的とする。

また、ゼブラフィッシュ胚は透明であり蛍光イメージングが比較的容易であったが、マウス胚は不透明であり、蛍光イメージングにとって難易度が高い。そのような不利な条件下での蛍光イメージングにおいては、プローブができるだけ明るく、またシグナルの変化が大きいことが望まれる。マウスへの応用を考え、GEPRA を明るさ、反応性の観点からも改良することを目的とした。

3. 研究の方法

[凝集体の解消]

凝集体を解消の検討は哺乳類細胞でのイメージングを用いて行った。GEPRA 遺伝子に遺伝子工学を用いて様々な変更を加え、プラスミドを精製、蛋白質を高発現するヒト培養細胞 HEK293T にトランスフェクション、蛍光顕微鏡を用いた観察により、凝集の有無の判定を行った。

[発光バージョン GEPRA の開発]

現在、ホタルなど様々な生物から発光蛋白質がクローニングされ、蛍光イメージングが行われている。我々はそれら発光タンパク質遺伝子を、GEPRA と組み合わせることにより、発光バージョンの GEPRA 開発を行った。発光観察には、10 秒間程度の露光時間が必要となる場合が多い。GEPRA は 2 波長のシグナルを計測する必要があり、それぞれに 10 秒間程度の露光時間をかけると、レチノイン酸濃度

が急激に変化する時に必然的にアーティファクトが生じる。このアーティファクトは、得られた変異体が真のシグナルを出しているのか、それとも単なるアーティファクトにすぎないのかの判定を困難にする。従って感度の面においては劣るが、Orca-D2 (浜松ホトニクス) という、2 波長の画像を同時に計測可能なカメラを用いて、レチノイン酸に対する応答の有無を検討した。

[明るさ、反応性の改良]

GEPRA は比較的暗い蛍光タンパク質を用いて作製されている。明るい蛍光タンパク質に変更するとシグナルの変化が極端に小さくなるためである。入手可能な様々な蛍光タンパク質を GEPRA に導入し、その反応を蛍光顕微鏡を用いて検討した。

4. 研究成果

[凝集体の解消]

GEPRA の凝集を抑えるべく、様々な遺伝子工学的工夫を GEPRA に加えた。その結果、元々の細胞では、GEPRA を発現する細胞の約 70% 程度に凝集体もしくは凝集体由来の細胞死 (死につつある細胞) が観察された。一方で、遺伝子工学的に改良を加えた GEPRA (mGEPRA, mammalian GEPRA と命名) において凝集体は観察されなかった (図 1)。

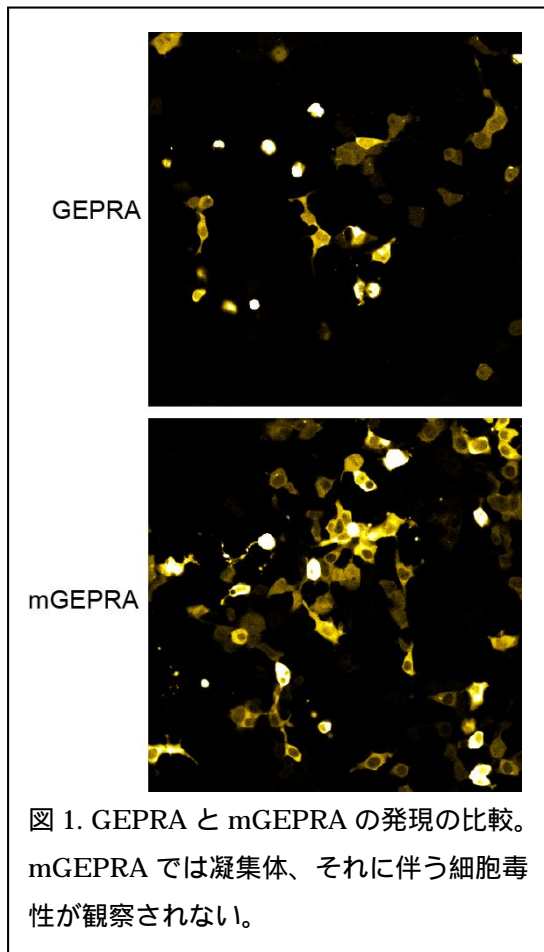


図 1. GEPRA と mGEPRA の発現の比較。mGEPRA では凝集体、それに伴う細胞毒性が観察されない。

またレチノイン酸に対する反応を比較した所、その反応性は落ちていなかった(図2)。つまり反応性を保ち、凝集体(細胞毒性)を解消することに成功した。

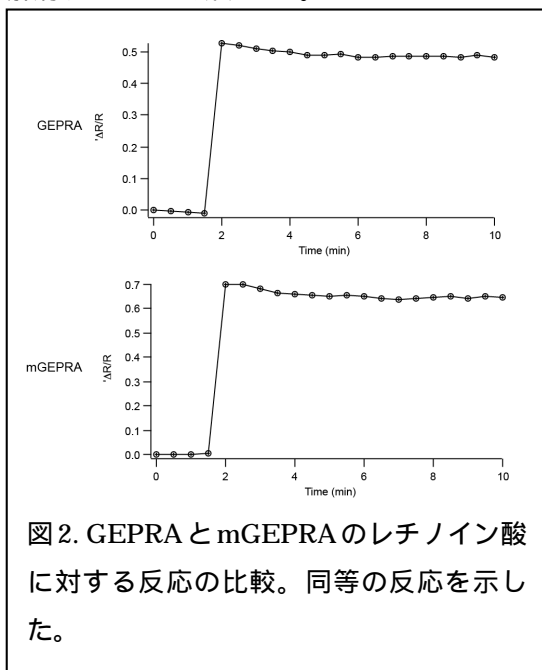


図2. GEPRAとmGEPRAのレチノイン酸に対する反応の比較。同等の反応を示した。

[発光バージョンの開発]

動物個体を用いたイメージングにおいて深部からの観察を達成する一つの手法は、発光を用いることである。BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer)の原理を用いて、発光バージョンのGEPRAを開発することに成功した。シグナルの変化率は現時点では約20%と比較的小さいものの、発光イメージングにおいてはバックグラウンドが低いので、十分にレチノイン酸イメージングが行えるのではないかと考えられる。まずはそのレチノイン酸分布が明らかになっているゼブラフィッシュ胚に本技術を適用し、有用性を検討したい。また、更なるシグナル変化率の上昇を目指して、改良を加えていきたいと考えている。

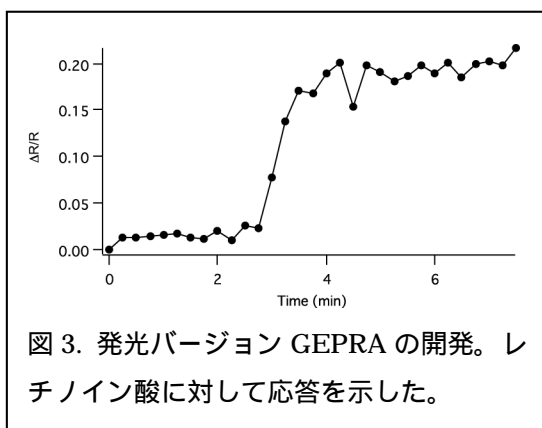
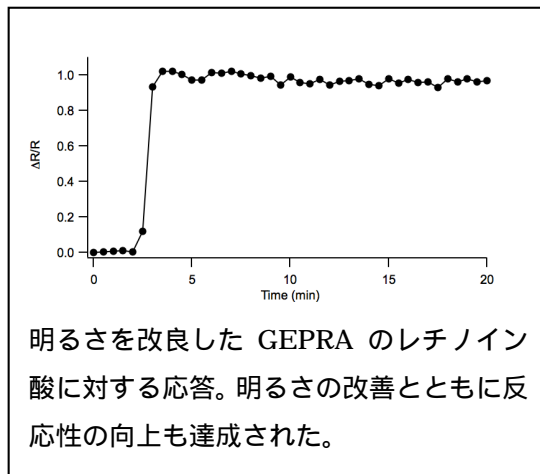


図3. 発光バージョン GEPRA の開発。レチノイン酸に対して応答を示した。

[明るさ、反応性の改良]

GEPRAにおいて用いているCFPは、比較的暗いシステムを用いている。FRETのドナーである

CFPにより明るい変異体を用いることで、GEPRAの明るさを改善することを目指した。未発表のCFP変異体を用いることで、mGEPRAの明るさを改善することに成功した。またそのレチノイン酸に対する反応性を検討したところ旧来のGEPRAと比較して30%程度反応性が向上していた。更に特徴づけを進めているところである。



明るさを改良したGEPRAのレチノイン酸に対する応答。明るさの改善とともに反応性の向上も達成された。

[トランスジェニックマウス]

哺乳類細胞での発現を改善したGEPRAを開発することに成功したので、トランスジェニックマウスの作製を試みた。CFP-YFP間のFRETを用いたプローブにおいては、CFPとYFPの配列の相同性の高さからトランスジェニック動物作製時に組換えがおり、全長のcDNAを組み込むことが困難であることが知られていた。しかし、京都大学の松田道行教授のグループが、トランスポゾンを用いることでトランスジェニックマウスを作製できることを示している。我々も松田教授開発の手法を用いてトランスジェニックマウスの作出を行った。新生児はLEDライトによる照明



GEPRAトランスジェニックマウスの新生仔(右)。左はコントロール。

により蛍光が観察できる程明るく現在、胎仔から様々な臓器を取り出し、レチノイン酸濃度分布の検討を行っているところである。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 生体内レチノイン酸グラディエントの可視化(招待講演)

下園 哲、宮脇 敦史

第 347 回 脂溶性ビタミン研究総合委員会
平成 27 年 7 月 17 日、理化学研究所 鈴木
梅太郎ホール、埼玉県和光市

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下園 哲 (SHIMOZONO, Satoshi)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号: 40391982

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()