

# 研究報告書

## 「ナノサイズ高輝度バイオ光源の開発と生命機能計測への応用」

研究タイプ: 5年型

研究期間: 平成 20 年 10 月～平成 26 年 3 月

研究者: 永井健治

### 1. 研究のねらい

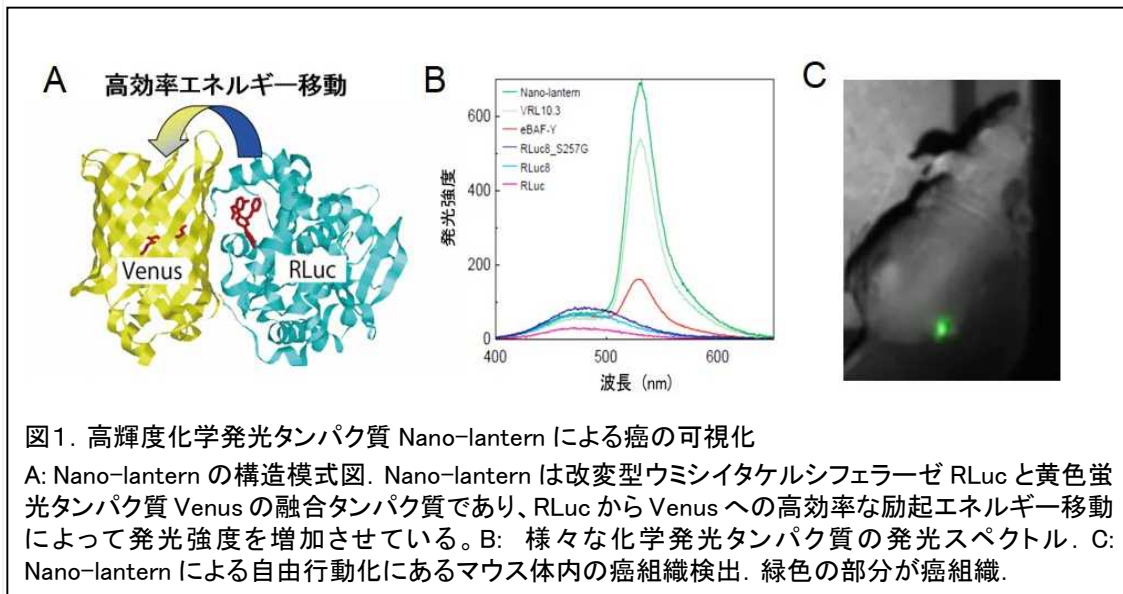
蛍光タンパク質を利用したバイオイメージング技術は生命科学研究に“革命”をもたらした。今や細胞や細胞内小器官、或いはタンパク質 1 分子が蛍光タンパク質で蛍光化され、顕微鏡のもとで観察されている。可視化の対象は細胞内コンパートメントの形や空間分布など、“構造”に焦点がおかれる場合が多いが、工夫次第で細胞内のイオン濃度やシグナル伝達の活性化状態など生体分子や細胞の“機能”を捉えることもできるようになった。また、近年では超解像蛍光観察技術が著しい進歩をとげ、蛍光バイオイメージング分野はまだまだ成長の真っ直中にある。このように、蛍光観察技術が進歩する一方で、試料への光毒性や自家蛍光といった問題は未解決のまま残されている。このような状況の中で、ホタルに代表される発光生物が有する化学発光タンパク質(ルシフェラーゼ)を用いたライブイメージングに注目が集まりつつある。ナノメートルサイズのタンパク質性発光分子であるルシフェラーゼは発光物質ルシフェリンの酸化を触媒して発光させる作用を持つ酵素の総称である。蛍光分子と異なり励起光の照射を必要としないことから、蛍光観察では困難な小動物個体内の生理現象を高いコントラストで可視化するツールとして利用されてきた。しかし、発光強度が極めて低いため画像を得るのに数秒から時には数十分以上の露光時間を必要とし、発光基質を細胞に導入する必要があるなどの欠点が存在した。そこで本研究では、試験管内分子進化とタンパク質エンジニアリングによりルシフェラーゼの発光強度を大幅に向上させ、細胞から個体レベルまでの生理現象をビデオレート(30 画像/秒)で可視化可能にすることを第一の目的に掲げた。また、この高輝度化学発光タンパク質を“ナノスケール局所照明光源”として利用することで、細胞内の生体分子の動態を可視化可能な発光プローブを開発すると共に、光照射によって細胞やタンパク質の機能をコントロールするオプトジェネティクス(光遺伝学)と併用できる解析技術の開発を目指した。さらに、発光基質を自ら産生する細胞を開発し、これまでにない“発光自動化”の達成を狙った。

### 2. 研究成果

#### (1)概要

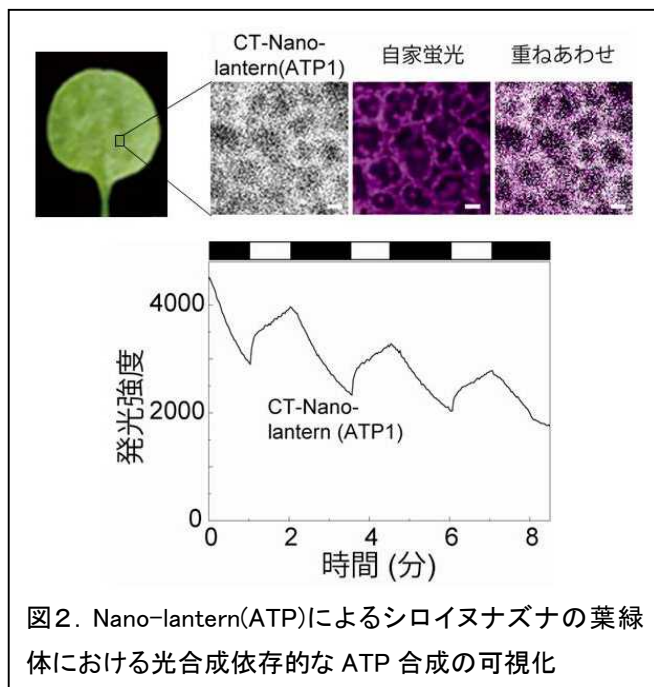
高輝度化学発光タンパク質を開発するために、既存のルシフェラーゼの中でも分子量が比較的小さく、発光に必要な捕因子が少ないウミシイタケルシフェラーゼ(RLuc)にランダム変異を導入し、より明るく発光する変異体 RLuc8-S257G を得た。さらに RLuc-S257G を蛍光量子収率の高い黄色蛍光タンパク質 Venus ( $\Phi=0.7$ ) と高い FRET 効率で融合することで、発光強度を 10 倍以上に増加させることに成功し、Nano-lantern を得た(図 1A, B)<sup>文献1</sup>。Nano-lantern を細胞内の様々な部位に発現させたところ、凝集塊などを形成することなく正しい局在を示し、蛍光に遜色ない画像が得られた。また、癌細胞を Nano-lantern で標識することで、自由に動き回るマウ

スの腰部で光る癌組織をビデオレートで撮影することに成功した(図 1C) 文献<sup>1</sup>。



さらに Nano-lantern の RLuc-S257G 部分に、特定の生体因子の結合に伴い構造が変化するペプチドを挿入し  $\text{Ca}^{2+}$ 、cAMP、ATP を検出する機能プローブ Nano-lantern ( $\text{Ca}^{2+}$ )、Nano-lantern (cAMP)、Nano-lantern (ATP)を開発した。Nano-lantern ( $\text{Ca}^{2+}$ )と ChR2(チャネルロドプシン2)を神経様細胞に共発現することによって、青色光照射依存的な神経興奮を  $\text{Ca}^{2+}$ の上昇としてとらえることに成功しただけでなく、葉緑体に Nano-lantern (ATP)を局在発現させた植物体を作製し、光合成依存的な ATP 産生を世界で初めて観察する事にも成功した(図2) 文献<sup>1</sup>。このような化学発光プローブを光遺伝学ツールと高い時間分解能で併用可能にするために、

CCD カメラの読み出し時間中に光刺激を行う顕微鏡観察刺激システムも構築した文献<sup>2</sup>。また、化学発光イメージングとの併用が可能な光遺伝学ツールとして、光不活性化法に応用可能な単量体型光増感タンパク質 SuperNova 文献<sup>3</sup>や青色光照射によって  $\text{Ca}^{2+}$ を放出するタンパク質 PACR 文献<sup>4</sup>の開発も行い、光で生命機能に摂動を加えながら、化学発光でイメージングする汎用的研究手法を確立した。その一方で、細胞内の化学発光の自動化を達成すべく、発光基質の生合成に関わる酵素遺伝子の単離を様々な発光生物でチャレンジしたがついに成功しなかった。



## (2) 詳細

### 研究テーマ A「高輝度化学発光タンパク質の開発」<sup>文献1</sup>

代表的な化学発光タンパク質の一つであるレニラルシフェラーゼ(*Renilla luciferase*, RLuc)は刺胞動物に属するウミシイタケから同定されたルシフェラーゼであり、セレンテラジンをその発光基質とする。分子サイズが比較的小さい(35 kDa)事、ホタルルシフェラーゼと異なり ATP、 $Mg^{2+}$ の補因子を必要としない事から化学発光を利用したスクリーニング等で使用される機会が多い。しかしながら、蛍光に比べて暗いためこれまでライブイメージングには使われて来なかった。RLuc が暗い理由の一つとして、発光量子収率が約 0.05 と非常に低い事があげられる。これは蛍光イメージングで用いられる蛍光色素の量子収率の 1/10 以下である。まず手始めに RLuc にランダムなアミノ酸変異導入を行い、明るさを改善する変異を探したが、それだけでは RLuc の量子収率を飛躍的に上げるのは困難である事に気がついた。そこで化学発光タンパク質と蛍光タンパク質間の共鳴エネルギー移動(Föster resonance energy transfer, FRET)を化学発光の明るさの改善に利用する事を着想した。FRET はドナー分子からアクセプター分子へと励起エネルギーが移動する現象であり、分子間相互作用を検出する方法としてライフサイエンス分野で応用されている。実際には FRET は実験室だけでなく自然界でも起こっている。例えば、前述したウミシイタケの生体内では発光タンパク質(RLuc)と蛍光タンパク質(ウミシイタケ GFP)が強く相互作用し、両者の間で高効率の FRET が起きており、結果として明るい緑色に発光している事が知られている。言い換えればウミシイタケは暗い RLuc からでなく、明るいウミシイタケ GFP から効率よく発光させるために FRET を利用しているのである。この方法を真似て高輝度化学発光タンパク質をデザインするにあたり RLuc のアクセプターとなる蛍光タンパク質として Venus を用いる事にした。RLuc と Venus の様々な融合タンパク質を作製し最も FRET 効率の高いものをプローブとして選び出すために、融合タンパク質構築には Venus だけでなくその円順列変異体 5 種類も利用し、RLuc と Venus の間のアミノ酸リンカーは様々な長さを試した。また、RLuc を C 末端、Venus を N 末端側に替えた融合タンパク質も作製した。精製した各融合タンパク質の発光スペクトルから、Venus 由来の発光値(530 nm)と RLuc 由来の発光値の比(530/480 nm 比)を求める事で、最大の FRET 効率を持つ融合タンパク質を選別した。さらに、RLuc 自体の発光量を改善するために、エラー誘発 PCR 法により RLuc に対してランダムなアミノ酸変異を導入し、発光量を指標にマイクロプレートリーダーでスクリーニングする事で、発光量を改善するアミノ酸変異を見出した。これを先述の最大の FRET 効率を持つ融合タンパク質に導入する事により、RLuc の 10 倍以上の明るさを有するタンパク質を得ることに成功し、ナノスケールの光源という意味を込めて「Nano-lantern(ナノ・ランタン)」と名付けた。

### 研究テーマ B「Nano-lantern を用いた細胞~個体レベルでのイメージング」<sup>文献1</sup>

Nano-lantern を細胞内の様々な場所に局在させてイメージングができるかどうかを試したところ、Venus の蛍光でイメージングした場合と遜色なくオリティで細胞小器官を可視化できる事ができた。次に個体レベルでの化学発光イメージングを試みるため、Nano-lantern を安定発現させたマウス大腸癌細胞株 colon26 細胞を BALB/c マウスの皮下に移植し数ミリの腫瘍に成長させた。小動物個体レベルでの化学発光イメージングを行うためのシステムを自作して観察した結果、毛を剃らず無麻酔で自由に動き回るこのマウスの背中で光る腫瘍部位をビデオレコー

で可視化する事に成功した。

#### 研究テーマ C「高輝度化学発光タンパク質エンジニアリングによる機能プローブの開発」<sup>文献1</sup>

Nano-lanternを応用し、細胞内で重要な働きを持つ分子を検出するための機能性プローブを作製した。まずその手始めにCa<sup>2+</sup>プローブの作製を行った。FRETや蛍光タンパク質をベースとしたCa<sup>2+</sup>プローブ作製にならない、Nano-lanternの発光タンパク質(RLuc)内部にCa<sup>2+</sup>に結合し構造を変化するカルモジュリン(CaM)とそのターゲットであるM13ペプチドを挿入した。挿入部位を検討した結果、RLucの228番と229番のアミノ酸残基間に挿入した融合タンパク質はCa<sup>2+</sup>有無でのシグナル変化が300%と非常に大きくなることが分かり、Nano-lantern(Ca<sup>2+</sup>)と名づけた。Nano-lantern(Ca<sup>2+</sup>)はこれまでの化学発光タンパク質に比べても非常に明るいため、それを発現させたHeLa細胞のCa<sup>2+</sup>イメージングをビデオレートで行う事に成功した。また、細胞を操作する光遺伝学的手法と今回開発したNano-lantern(Ca<sup>2+</sup>)の併用を行った。代表的な光遺伝学ツールであるChR2(チャネルロドプシン2)は青色光を照射する事で神経細胞を興奮させる事ができるが、蛍光指示薬で使用する励起光でChR2が作動してしまうため、これまで両者の併用は難しかった。Nano-lantern(Ca<sup>2+</sup>)は励起光を必要としないため、ChR2を作用させることなく併用する事が容易にできた。

次にcAMPを検出する機能性プローブの作製を行った。これまでFRETを利用したcAMPが報告されていたが、シグナル変化量が非常に小さく(1-15%)検出が容易でない事が問題となっていた。EPAC1タンパク質のcAMP結合に必要な断片をNano-lantern(Ca<sup>2+</sup>)のCaM-M13に替えて挿入したところ、cAMPの有無でシグナルが130%変化するプローブを作製することができ、Nano-lantern(cAMP)と名づけた。Nano-lantern(cAMP)を発現させたアメーバ細胞の集団を飢餓状態に置いたところ、細胞が集合していく過程でcAMPが細胞間を伝播していく様子を捉えることに成功した。

さらに、ATPを検出するプローブの作製を試みた。FRETを利用したATPプローブ(ATeam)に利用されているFoF1-ATP合成酵素のεサブユニット(mBSUε)をNano-lantern(Ca<sup>2+</sup>)のCaM-M13に替えて挿入したところ、ATPの有無で200%のシグナル変化を示すプローブを作製することができ、これをNano-lantern(ATP)と名づけた。シロイヌナズナの葉緑体にNano-lantern(ATP)を発現させる株を作製し、光照射に伴うATP産生の様子を可視化することに世界で始めて成功した。

#### 研究テーマ D「CCDカメラの読み出し時間中に光刺激を行う顕微観察刺激システムの構築」<sup>文献2</sup>

2

光照射によってタンパク質や細胞の機能を操作する“光遺伝学”的技術が生命科学の分野で近年台頭しつつある。この技術により高い時空間分解能で細胞を刺激し、何が生じるのかを分子レベルで実時間観察するという解析法が今後の生命科学研究において重要になることは疑う余地もない。その為には光遺伝学的技術に蛍光タンパク質などを利用したライブイメージング技術を組み合わせた解析法を確立する必要がある。しかしながら、両技術を併用しようとすると、1)光遺伝学的な刺激光が蛍光観察チャンネルに漏れこみ、S/Nが悪化する、2)蛍光観察に必須の励起光照射が光刺激となってタンパク質や細胞の機能に摂動を与えてしまう、とい

うジレンマがあった。そこで、CCDカメラの読み出し時間中に光刺激を行う顕微観察刺激システムを開発するとともに、上述の実時間観察が可能な高輝度化学発光タンパク質と併用することで、これらの問題を克服することに成功した。

研究テーマ E「化学発光タンパク質と併用が可能な光遺伝学的ツールの開発」<sup>文献 3, 4</sup>

蛍光タンパク質は、タンパク質や細胞を蛍光標識するためのツールとして生命科学研究で大いに利用されている。一方、励起光照射により僅かながら発生する活性酸素によって周囲の分子を酸化して不活性化する光増感分子としての利用も原理的には可能であると考えられている。しかしながら、一般的な蛍光タンパク質は光照射による活性酸素の産生量が少なく、また KillerRed と呼ばれる活性酸素の産生能が高い蛍光タンパク質は 2 量体を形成するため、他のタンパク質との融合が困難であった。そこで KillerRed をタンパク質進化学により改変し、単量体型で効率よく活性酸素を産生する新しい蛍光タンパク質 SuperNova を開発した。さらに、SuperNova を用いて AuroraB や Cofilin などの特異的なタンパク質の不活性化やアポトーシスの誘導などに成功した。今後、光遺伝学(オプトジェネティクス)用のツールとなり、化学発光イメージングと併用することで多種多様なタンパク質や細胞の時空間的な機能の解析が可能になると期待される。

次に、光照射によって細胞内の  $Ca^{2+}$ 濃度を上昇させることが可能な人工タンパク質 PACR (Photo-Activatable  $Ca^{2+}$  Releaser)を開発した。PACR は  $Ca^{2+}$ 結合タンパク質(Calmodulin)、 $Ca^{2+}$ -Calmodulin 結合ペプチド(M13)、光感受性ドメイン(LOV2)の3者を融合した構造を有し、青色光照射による LOV2 ドメインの立体構造変化によって、Calmodulin-M13 間の相互作用が阻害され、 $Ca^{2+}$ に対する親和性が低下する結果、 $Ca^{2+}$ が Calmodulin から放出される。最大の利点は遺伝子にコードされているためシグナル配列や特異的プロモーターの付加によってミトコンドリアや ER などの細胞小器官や、筋肉や神経などに発現が可能であることである。実際に HeLa 細胞に PACR を発現させた系では青色光照射によって核内など、細胞内局所的に  $Ca^{2+}$ 濃度を変化させることができた。さらに、モデル動物の一種である線虫の接触神経細胞へ PACR を発現させたところ、青色光照射により線虫の運動を操作することに成功した。

### 3. 今後の展開

オプトジェネティックバイオイメージング解析法の確立：更なる高輝度化、多波長化、長期観察のための発光基質生合成系の完成と高い時間分解能で光遺伝学との併用が可能な汎用的顕微鏡システムの構築を行い、生命科学研究の標準解析法を確立する。

### 4. 評価

#### (1)自己評価

申請時に提案した課題 3 つのうち 2 つ、つまり「高輝度化学発光タンパク質およびそれを用いた生理機能プローブの開発」と「生命機能計測への応用」は当初の目的にかなう成果をあげることができた。さらに、最終年度には更なる高輝度化を達成することができ、誰もが簡単に使える汎用的ツールにまで発展させることができたと自負している。その一方で、最もさがけ研究らしいリスクの大きなテーマであった「発光基質の生合成に関わる酵素遺伝子の単離」には、多くの時間と労力を割いたものの、ことごとく失敗に終わってしまった。このテ

マはバイオイメーjingのみならず様々な分野への波及効果が期待できるだけに、失敗から得た教訓を生かして、近い将来必ずや成功させたい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

蛍光タンパク質を利用したバイオイメーjing技術により、動植物の生理機能を可視化できるようになり、広く普及している。しかし、蛍光に必要な光照射による試料の光損傷や、自家蛍光によるコントラストの低下、さらには意図しない活性化を引き起こすなどの問題もある。

永井研究者は、これらの問題あるいは課題を解決する手段として、励起光照射を必要としない化学発光タンパクに着目した。化学発光タンパクを使用する上での最大の課題は高輝度化であった。ウミシイタケルシフェラーゼをもとに、ランダム変異の導入などにより、10倍以上の輝度の化学発光タンパクを開発し、Nano-lantern と名付けた。さらに、特定の生体因子の結合に伴い構造が変化するペプチドを挿入し Ca<sup>2+</sup>、cAMP、ATP を検出する各種機能プローブを開発した。これにより、光遺伝学ツールを用いた光刺激依存的な神経興奮を Ca<sup>2+</sup>の上昇としてとらえることに成功しただけでなく、葉緑体に Nano-lantern (ATP)を局在発現させた植物体を作製し、光合成依存的な ATP 産生を世界で初めて観察する事にも成功した。

一期生を募集した平成 20 年度に初めて 5 年型が発足した。永井研究者は 5 年型にふさわしいスケールの大きな研究計画を提案し、一期生でただ一人 5 年型として採用された。得られた成果はバイオサイエンスとして画期的なものであるが、化学エネルギーにより働く Nano-lantern は細胞の中から照らす新しいタイプのナノ光源と位置づけることもできる。加えて、その研究姿勢や領域会議における議論、他の研究者との共同研究など、あらゆる場面で際立った貢献があったことを特記しておく。今後の活躍を信じてやまない。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Saito K, Chang YF, Horikawa K, Hatsugai N, Higuchi Y, Hashida M, Yoshida Y, Matsuda T, Arai Y, Nagai T. A luminescent protein for high-speed single-cell and whole-body imaging. **Nature Communications**, 3, 1262, 2012
2. Chang YF, Arai Y, Nagai T. Optogenetic activation during detector 'dead time' enables compatible real-time fluorescence imaging. **Neuroscience Research** 73, 341-347, 2012
3. Fukuda N, Matsuda T, Nagai T. Optical control of Ca<sup>2+</sup> concentration in live specimen with a genetically encoded Ca<sup>2+</sup> releasing molecular tool. **ACS Chem. Biol.**, in press
4. Takemoto K, Matsuda T, Sakai N, Fu D, Noda M, Uchiyama S, Kotera I, Arai Y, Horiuchi M, Fukui K, Ayabe T, Inagaki F, Suzuki H, Nagai T. SuperNova, a monomeric photosensitizing fluorescent protein for chromophore-assisted light inactivation. **Scientific Reports**, 3, 2629, 2013.
5. Saito K, Hatsugai N, Horikawa K, Kobayashi K, Matsu-ura T, Mikoshiba K, Nagai T. Auto-luminescent genetically-encoded ratiometric indicator for real-time Ca<sup>2+</sup> imaging at

(2)特許出願

研究期間累積件数: 3件

1.発明者:永井健治、新井由之

発明の名称:光学顕微鏡、および、光学顕微鏡のオートフォーカス装置

出願人:大阪大学

出願日:2012/11/26

出願番号:特願 2012-257426

2.発明者:永井健治、松田知己、福田憲隆

発明の名称:光駆動カルシウムイオン制御タンパク質

出願人:北海道大学

出願日:2011/2/1

出願番号:特願 2011-020234

3.発明者:永井健治、松田知己、高橋里佳

発明の名称:光増感性蛍光タンパク質

出願人:北海道大学

出願日:2010/2/3

出願番号:特願 2010-22603

(2)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表(国際招待講演 56 件、国内招待講演 69 件)

1. Nagai T. Manipulation and visualization of biological function with genetically encoded molecular spies. 2013 ASCB annual meeting, 2013. 12. 14. New Orleans, USA
2. Nagai T. "Genetically-encoded functional probes applicable in conjunction with photo-manipulation technologies", Optogenetics2013, 2013.9.27 (Keio University, North Hall, Tokyo, Japan)
3. Nagai T. "Revolutionary bioimaging with super-duper luminescent proteins.", Fluorescent proteins and biological sensors III, Janelia Farm, USA, 2012.11.5
4. Nagai T. "Auto-luminescent genetically encoded indicators for real time in vivo imaging" SPIE 2011 Smart Nano+Micro material and Devices 2011.12.5 (Swainburne Univ. of Technology, Melbourne, Australia)
5. Nagai T. "Toward invention of high performance genetically-encoded luminescent indicators for functional imaging in living organisms" Symposium to commemorate 150 years of German-Japan friendship, 2011.07.15 (Mirai CAN Hall, Tokyo, Japan)

受賞

第 10 回日本学術振興会賞

第 21 回木原記念財団学術賞応用科学賞

著作 (欧文誌4件、和文誌 24 件)

1. 新井由之、永井健治「CCD のデッドタイムを利用した光刺激法が可能にする蛍光・化学発光イメージングとオプトジェネティクスの高時間分解能併用」生化学(印刷中)
2. 松田知己、永井健治「光スイッチング機能プローブで挑む細胞の個性」生体の科学(印刷中)
3. 齋藤健太、永井健治「高輝度化学発光タンパク質 Nano-lantern の開発」化学と生物(印刷中)
4. Nagai T. Real time imaging of biological phenomena with super-duper luminescent proteins. CYTOLOGIA(印刷中)
5. 永井健治、齋藤健太、初谷紀幸「化学発光タンパク質の高輝度化とバイオイメージングへの展開」顕微鏡 48(3), 1-3, 2013

#### プレスリリース

1. 「蛍光タンパク質性の“ナノ爆弾”と生命科学研究への応用」と題して2013年10月15日にプレスリリースし、以下のメディアで取り上げられた。

- ・日経産業新聞「光当て活性酸素がん細胞を攻撃」2013年10月16日

2. 「動き回る小動物体内の組織や生理機能を高感度に検出可能な超高輝度発光タンパク質の開発に成功」と題して2012年12月10日にプレスリリースし、以下のメディアで取り上げられた。

- ・読売新聞「がん細胞光って知らせる 阪大 発光タンパク質利用」2012年12月14日
- ・毎日新聞「体傷つけずにがん観察-光るタンパク質組み合わせ-」2013年1月5日

3. 「青、緑、赤の蛍光を発する高性能蛍光性カルシウムイオンセンサータンパク質の開発に成功」と題して2011年9月6日にプレスリリースし、以下のメディアで取り上げられた。

- ・北海道新聞「蛍光タンパク質多色化に成功」2011年9月9日
- ・西日本新聞「青、緑、赤で完治の蛋白質を開発」2011年9月10日
- ・日本経済新聞「高感度なセンサータンパク質 緑青赤で細胞把握容易に」2011年9月16日
- ・朝日新聞「神経回路「ツール」で解明」2011年11月5日

4. 「世界最高の検出感度を持つカルシウムイオンセンサー“カメレオン-Nano”の開発に成功」と題して2010年8月2日にプレスリリースし、以下のメディアで取り上げられた。

- ・化学工業日報「細胞内Caイオンを高感度検出-蛋白系センサー開発」2010年8月9日
- ・読売新聞「てんかんなど関与の体内物質 濃度変化の検出力向上」2010年8月10日
- ・北海道新聞「細胞のカルシウムイオン濃度感知 高感度タンパク質作製 てんかん



発作解明に期待」2010年8月10日

・科学新聞「カルシウムイオンを超高感度で検出」2010年8月13日

・日経産業新聞「カルシウムイオン濃度 細胞内の変化 感度 10 倍 創薬研究に利用」2010年8月13日

・北海道医療新聞「カルシウム濃度変動 超高感度に検出」2010年8月27日

5. 毎日新聞より直接取材依頼があり 2009年6月23日に 連載企画「理系白書'09 挑戦のとき」において「永井健治さん(40)北海道大学電子科学研究所教授 蛍光タンパク質を追及」と題して取り上げられた。