

【目的】 発光生物の発光メカニズムに基づく、生物発光反応を利用したイメージング技術は生命科学分野でよく利用される。生物発光反応は、発光基質ルシフェリンが酵素ルシフェラーゼの触媒作用によって進行し、発光を生成する。これを利用する *in vivo* 生物発光イメージングは動物個体の非侵襲的な観察が可能である。我々は 2018 年に *in vivo* 生物発光イメージングの検出感度を飛躍的に向上させる技術 AkaBLI を開発した。AkaBLI は生体透過性の高い近赤外光を発する人工基質 AkaLumine とそれに最適化した人工酵素 Akaluc から構成される。AkaBLI システムと神経活動依存的に駆動するプロモーター *c-fos* を組み合わせ、Akaluc を発光レポーターとして利用することで、マウス海馬のわずか数十個の神経細胞が環境変化に応じて活性化した記録を同一個体で追跡することにも成功した。AkaBLI は深部組織の極少数細胞の遺伝子発現を非侵襲に定量可視化できる唯一無二の発光レポーターシステムであるが、いくつかの課題が明らかとなってきた。本研究では AkaLumine の優れた体内動態を活かし、AkaLumine 含有餌の経口投与による基質投与に伴う侵襲性からの脱却と、プロモーター活性を正確に反映する不安定化 Akaluc の開発を目的とした。

【方法】 AkaLumine 含有餌の作製と不安定化 Akaluc の開発を行った。AkaLumine 含有餌の作製にあたっては、室温においても長期間安定である AkaLumine 誘導体を利用した。マウス用の飼料 CRF-1 粉末に AkaLumine 誘導体の粉末を混合し、固形化した。Akaluc を脳線条体に発現するマウスに作製した AkaLumine 誘導体含有餌を与え、その発光強度から、含有餌の性能評価を行った。並行して、不安定化の開発を行った。Akaluc の細胞内半減期は <8 時間であることがわかっている。鋭敏に遺伝子発現の様子を捉えるため、Akaluc に対し種々の分解シグナルを付与し、細胞内半減期を短くした不安定化 Akaluc を作製した。作製した不安定化 Akaluc の性能評価のため、培養細胞レベルでの細胞内半減期を調べた。次に、この不安定化 Akaluc を神経活動依存的プロモーター下流に導入し、マウス的大脑皮質の一次視覚野へ発現、光刺激に応答し不安定化 Akaluc を発現するマウスを作製し、不安定化 Akaluc の性能評価を動物個体で行った。

【結果】 AkaLumine 誘導体含有餌の自由摂取によりマウス脳深部からの発光シグナルを確認することが出来た。発光基質粉末が経口投与によって脳深部へと到達することは驚くべき点ではあるが、しかし、発光シグナルのばらつきは大きく、AkaLumine 誘導体含有餌による持続的な安定な発光シグナルを実現には至らなかった。更に高濃度で AkaLumine 誘導体を混合した餌も試みたが、マウスが摂取しなかった。この結果を受け、餌の成形方法や、甘味料を混ぜるなど、餌の作製方法、及び、経口投与を志向した AkaLumine 誘導体の検討を進めている。不安定化 Akaluc の開発は、Akaluc と PEST 配列の融合により行った。Akaluc-PEST は細胞内半減期が <1 時間となった。Akaluc-PEST を導入したマウスを利用した実験で、プロモーター活性に伴って、発光強度が増強する様子を観察することが出来た。一方で、PEST 配列付与による発光強度の減弱 (Akaluc の分解) は遅く、刺激後 48 時間経ても発光強度は保たれていた。この結果を受け、PEST 配列よりも更に分解力の高いとされる不安定化配列を融合した不安定化 Akaluc (細胞内半減期 <3 分) を作製し、動物個体での実証実験を進めているところである。

AkaBLI による非侵襲な遺伝子発現動態の可視化

