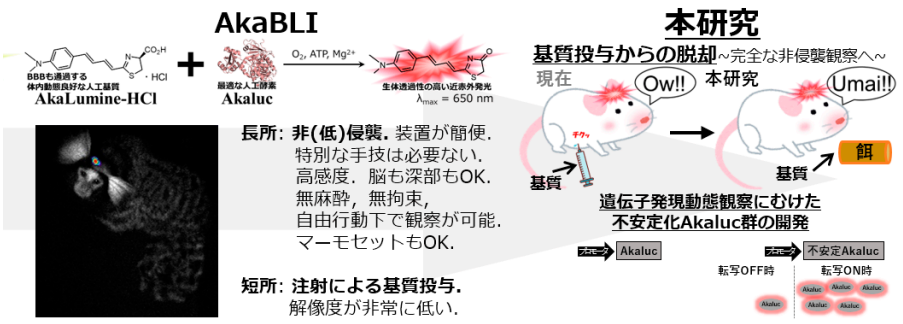
189　遺伝子発現を非侵襲可視化する人工生物発光技術の開発	岩野　智

【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 は深部組織の極小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、マウスの大脳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



189. 遺伝子発現を非侵襲可視化する人工生物発光技術の開発

岩野　智

理化学研究所 脳神経科学研究センター 細胞機能探索技術研究チーム

Key words：生物発光，イメージング，動物個体，非侵襲

緒　言

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。腹腔や静脈などから全身性投与された発光基質が酵素を発現する細胞に到達・浸入し、発光反応の結果、放出される光が動物組織を通過、体表において高感度カメラによって画像化されるという仕組みである。同一個体で繰り返し観察できることから、がん細胞の増殖や転移を調べる研究や、概日リズム研究などで盛んに利用されている［1，2］。蛍光イメージングとは違い、励起光を必要としないことから深部組織観察に強みを持つ。*In vivo* 生物発光イメージングでは数ある発光システムの中でも天然ホタル由来の発光基質 D-luciferin／酵素 Fluc の組合せが世界標準であった。

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［3］。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 は深部組織の極小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。本研究では大きく 2 つの課題解決を目指し研究を進めた。

一つ目の課題は、*in vivo* BLI が抱える共通の課題『基質投与』である。先述のように、*in vivo* BLI では発光基質の注射による全身性投与が不可欠である。このため、観察ごとにマウスを保定、注射という侵襲的な処置が必要になる。もう一つは、Akaluc の発現がプロモーターの転写活性を正確に反映していないことである。上述の c-fos 実験では、転写開始から Akaluc 発現を経て、発光シグナルが上昇まで 7 時間を要する。また、発光シグナルが下がりきるには 4 日間と非常に長い時間を要する。これでは、時々刻々と変化する生命現象を捉えることは出来ない。

そこで本研究では、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

1.　AkaLumine 誘導体含有餌の作製

AkaLumine 含有餌にあたっては、室温においても長期間安定である AkaLumine 誘導体（新規物質のため、化学構造は非開示）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 0.1%、0.5%の重量比で混合し、乳鉢ですりつぶし均一にした。その後、混合餌 30 g に対し、15 ml の超純水を混合し、成形した後に、48 時間、室温で乾燥し、マウスに与えた。12 時間おきに、与えた餌の量を計量し、食餌量を測定した。

2.　マウス個体内の AkaLumine 量の定量（発光イメージング）

マウスは ICR マウス（オス、10 週齢、日本クレア）を利用した。蛍光タンパク質 Venus と Akaluc の融合タンパク質をコードしたアデノ随伴ウイルスを局所注入し、脳線条体に Venus-Akaluc を発現するマウスを作製した。

ウイルス注入から 2 週間以降のマウスに AkaLumine 誘導体含有餌を与えた。一定時間ごとに発光イメージング装置（Lumazone）により発光観察を行い、その発光の強度、安定性の評価を行った。

3. 分解シグナル配列の付与による不安定化 Akaluc の作製と評価

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（PEST 配列）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。

まず、培養細胞レベルでの細胞内半減期を調べるために、不安定化 Akaluc 群をそれぞれ発現ベクターに導入し、HeLa 細胞へのトランスフェクションを行った。トランスフェクションから 24 時間後に、トリプシン消化、DMEM/F12 により懸濁し、タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミド添加群と非添加群の 2 つに分け、37℃で静置した。任意の時間おきに 10,000 細胞を取り出し、ルミノメーター（AB-2280、ATTO）により発光強度を測定し、不安定化 Akaluc 群の細胞内半減期を評価した。

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たアデノ随伴ウイルスを作製した。作製したウイルスを B6 Albino マウス（メス、10 週齢、チャールズリバー）の大脳皮質の一次視覚野へ局所投与し、光刺激に応答してプロモーター活性が上昇し、不安定化 Akaluc を発現するマウスを作製した。発光観察には、発光イメージング装置（Lumazone）を利用した。基質は AkaLumine-HCl を 75 nmol/g BW で静脈内投与し、直ちに発光観察（露光時間 60 秒、ビニング＝4）を開始し、30 分間連続してタイムラプス撮影を行った。

結果および考察

1. AkaLumine 誘導体含有餌の開発

AkaLumine は体内動態良好な発光基質である。このため、経口投与においても良く動物体内に吸収され、血行性に全身に広がることを期待した。Akaluc を脳（線条体）に発現させたマウスに対して、AkaLumine 誘導体含有餌を与え、得られる発光強度から、AkaLumine 誘導体含有餌による持続的な安定発光を実現できるかどうかを検証した（図 1a）。使用したマウスは Akaluc を脳（線条体）に発現することから、AkaLumine が到達し発光するためには、血液脳関門を通過する必要がある。このため、脳への発光基質送達は最も困難であると考えられ、AkaLumine 誘導体含有餌によって持続的な安定発光が示された場合には、極めて汎用性の高い基質投与法となることも期待した。マウスの食餌量は暗期、明期によって変動する［4］。食餌量に依存せず、安定な発光シグナルを取得するために、マウスの AkaLumine 血中濃度が常に Akaluc の基質飽和濃度を上回る必要がある。

重量比 0.5%で AkaLumine 誘導体を混合した餌においては、0.1%よりも優位に発光強度が強く、またその発光が安定する（即ち血中の AkaLumine 濃度が安定）ことがわかった（図 1b）。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、安定な発光シグナルを実現できていない。更に高濃度で AkaLumine 誘導体を混合した 1%含有餌も試みたが、マウスが食べなくなったために、発光シグナルは取得できなかった。この結果を受け、現在、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。

2. 不安定化 Akaluc の開発

Akaluc を遺伝子発現動態を正確に反映する発光レポータータンパク質へと改変するため、タンパク質分解シグナル配列との融合を行った。分解シグナル配列としては、PEST 配列がよく利用されてきた［5］。Akaluc と PEST 配列を融合し、細胞内半減期を<1 時間と短くすることができた。これにより、プロモーターの活性化に伴い、Akaluc-PEST が発現、その後、速やかに分解されることを期待した。

Akaluc-PEST を神経活動依存的プロモーターの下流に導入し、アデノ随伴ウイルスを作製、マウス大脳皮質一次視覚野へ局所投与したマウスを作製した。光刺激に応答して、一次視覚野の神経細胞が一斉に発火し、Akaluc-PEST の発現が誘導され、発光強度が増強する様子を観察した。光刺激に応答して、その発光強度は増強したが、一方で、PEST 配列付与による発光強度の減弱は遅く、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 を作製した。この不安定化 Akaluc は細胞内半減期が<30 分と極めて短く、動物個体でプロモーター活性を正確に反映する

発光レポータータンパク質となると期待される。現在、動物個体での実証実験を進めているところである。

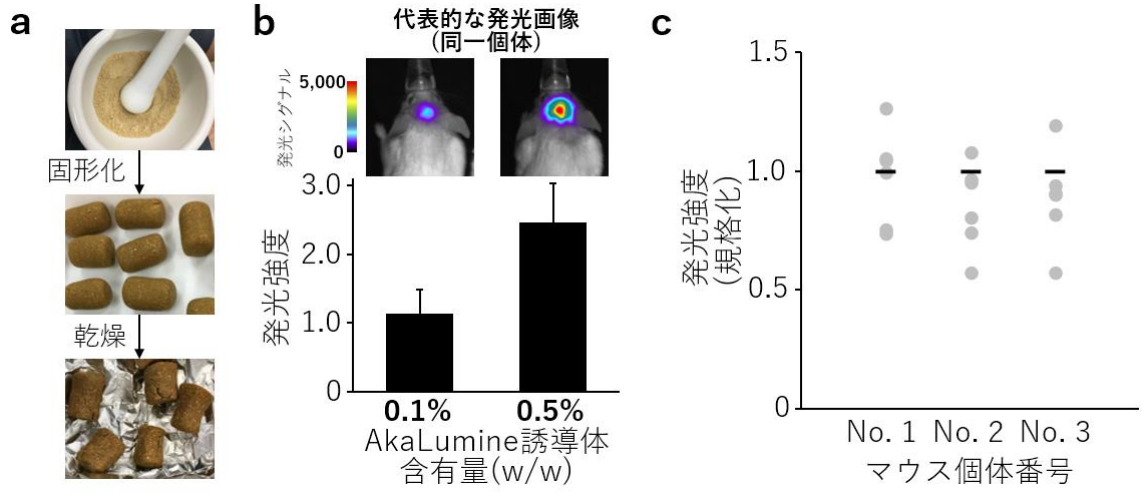


図 1. AkaLumine 誘導体含有餌の作製と発光イメージングによる定量

a) 粉末飼料と AkaLumine 誘導体粉末を混合し、乳鉢で均一化、水を加え固形化した後に、乾燥させて、AkaLumine 誘導体含有餌とした。

b) 重量比 0.1%、0.5%で作製した AkaLumine 誘導体含有餌を、脳線条体に Akaluc を発現するマウス（3 匹）に与え、6 時間毎に 30 時間、計 5 回、発光観察した。発光強度の平均値を棒グラフで示した。同一のマウス 3 匹を含有餌の投与間隔を 72 時間空けて、使用した。それぞれの代表的な発光画像を棒グラフ上部に示した。画像は Lumazone に冷却 CCD カメラ（iKon L）をマウントし、露光時間 60 秒、ビニング＝4 の設定で撮像した発光像を疑似カラー表示し、明視野像と重ね合わせたもの。

c) 0.5% AkaLumine 誘導体含有餌を 3 匹のマウスに与え、6 時間毎に 36 時間、発光観察し、各時間ごとの発光強度を灰色の点で示した。また個体ごとの 6 回の観察における平均値を黒い平行線で示した。
観察は b）と同様に行った。

文　献

1) Contag CH, Bachmann MH, Advances in in vivo bioluminescence imaging of gene expression. Annu. Rev. Biomed. Eng. 2002;4:235-60. Epub 2002 Mar 22. PMID: 12117758 DOI: 10.1146/annurev.bioeng.4.111901.093336

2) Hamda T, et al, In vivo imaging of clock gene expression in multiple tissues of freely moving mice. Nat. Commun. 2016 Jun 10;7:11705. PMID: 27285820 DOI: 10.1038/ncomms11705

3) Iwano S, et al, Single-cell bioluminescence imaging of deep tissue in freely moving animals. Science. 2018 Feb 23;359(6378):935-939. PMID: 29472486 DOI: 10.1126/science.aaq1067
Hatori M, et al, Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. Cell Metab. 2012 Jun 6;15(6):848-60. Epub 2012 May 17. PMID: 22608008 DOI: 10.1016/j.cmet.2012.04.019

4) Li X, et al, Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. J. Biol. Chem. 1998 Dec 25;273(52):34970-5. PMID: 9857028 DOI: 10.1074/jbc.273.52.34970