

30. 自由行動動物における生体分子動態の非侵襲・定量的可視化技術による代謝疾患研究

自治医科大学 分子病態治療研究センター 教授 口丸 高弘

概要

現在、マウスのような小動物の生体光イメージング技術においては、麻酔による身体機能の抑制や、外科手術による組織の除去など非生理的な条件下の動物を解析対象とすることに加えて、全身の深部組織における生体分子応答を定量的にイメージングする手法も確立されていない。そこで、本研究では非生理的・非定量的である現在の生体光イメージングの課題を解決し、光イメージングによる疾患モデル動物研究に新しい方法論を提案することを目指した。具体的には、生体組織透過性に優れる近赤外生物発光を生成する人工的なホタル発光系 AkaLumine-Akaluc 反応(AA 反応)に化学遺伝学的方法論を組み合わせ、細胞の代謝エネルギー状態を、非侵襲的かつ定量的にイメージングする近赤外発光分子センサを試作すると共に、マウスへのセンサ分子の実装に向けて予備的な知見を得た。これらの成果をもとに技術実装をさらに進めていくことで、運動・社交行動・睡眠といった自由行動に基づく動物生理学に新たな可能性を拓くことが期待される。

背景および目的

生体組織恒常性や疾患発症機構の理解に欠かせない実験動物の解析には、非侵襲的なイメージング技術が決定的な役割を担ってきた。光イメージングは、豊富な遺伝子コード型のタンパク質センサ分子や蛍光化合物センサが利用可能であり、動物個体レベルでの高度な生物学的解析が実践されてきた。しかしながら、これまでの光イメージングは、麻酔や拘束器具下で静止する動物を対象としており、真に生理学的な状態である自由行動動物個体の非侵襲的解析はほとんど叶っていない。

自然界のホタルの発光源である D-luciferin とホタルルシフェラーゼ(Fluc)の発光反応を利用する生物発光イメージングは、マウスなどの小動物の非侵襲的イメージングに欠かせない技術となっている¹。しかし、Fluc/D-luciferin 発光反応は、可視領域(最大発光波長 565 nm)の光を生成するため、生体組織の透過性に難があった。そのような状況を克服するために、D-luciferin と Fluc に化学的・タンパク質工学的な改変を加えることで、高輝度な近赤外光(最大発光波長 650 nm)を生成するルシフェリン(AkaLumine)とルシフェラーゼ(Akaluc)が開発された²⁻⁴。

AA 反応が生成する高輝度な近赤外発光は、自由行動するマウスの脳深部の数十個の神経細胞から生成される発光シグナルをビデオレート撮像することにも成功している。AA 反応を利用した近赤外発光分子センサが開発できれば、自由行動動物における生体分子動態を可視化する唯一無二の技術となることが期待されるが、既存のセンサ分子設計論では、自由行動動物のイメージングに資する発光分子センサの開発は困難であり実現していなかった。

例えば、ルシフェラーゼ分子を二つに分割する分割型 Fluc を使ったセンサ設計論に従えば様々な生体分子動態を発光強度の変化から読み出すことができる⁵。この設計論は、Fluc と相似の構造をとる Akaluc にも適用が可能であるが、分割化することで発光強度が元来の数十分の一に著しく低下してしまうことから⁶、時間分解能が求められる自由行動動物のイメージングに適したセンサを設計するのは難しい。一方、ルシフェラーゼをドナー分

子、蛍光タンパク質をアクセプタ分子として、生体分子動態に応答して両者が空間的に近接することで誘導される生物発光共鳴エネルギー移動(BRET)を利用した比波長型センサ設計論は、海洋系生物由来のルシフェラーゼを使った発光センサ分子に頻繁に利用されてきた^{7,8}。比波長型 BRET センサでは基本的な発光輝度が損なわれず、BRET による発光波長のシフトレベルから生体分子動態を読み出すため、自由行動する個体の姿勢に由来する発光シグナル輝度のモーションアーティファクトも回避できる。しかし、海洋系ルシフェラーゼは発光波長が可視領域に限定されることから個体のイメージングに不向きである。一方、Fluc は、蛍光タンパク質と組み合わせても BRET がほとんど発生せず^{9,10}、Fluc を使った実用的な比波長型発光分子センサの設計は事実上断念されていた。

そこで本研究では、近赤外蛍光分子と共有結合する Halotag を活用して、Akaluc と近赤外蛍光分子間で高効率に BRET を誘導する化学遺伝学的アプローチによる実用的なセンサ分子の設計を試みた。また、センサ分子をマウスの臓器に遺伝子導入した後に近赤外蛍光分子と Halotag を結合させる条件について検討した。

方法

フェルスター共鳴エネルギー移動を利用した蛍光分子センサを参考にして、アデノシン三リン酸(ATP)の細胞質濃度に応答する発光センサ分子を設計し、Akaluc と Halotag の間にバクテリア由来の ATP 結合ドメイン(ATPbd)を挿入した plasmid を構築した。この時、Akaluc の C 末端と Halotag の N 末端を数アミノ酸削り取った変異体を複数試作した。これらを遺伝子コードする plasmid をヒト培養細胞 HEK293T に一過性に導入後、Halotag ligand を修飾したシリコンロードミン類の近赤外蛍光色素(SiR NIRF)を培地に添加することで、Halotag に SiR NIRF を結合させた。この細胞に AkaLumine を添加すると近赤外生物発光が生成される。その時に、細胞内の ATP 産生を阻害する化合物を作用させ、定常状態からの BRET 効率の変化から発光センサの応答性を評価した。

マウス生体組織への近赤外発光センサ分子の導入にはアデノ随伴ウイルス血清型 9(AAV9)を用いた。センサ分子が肝臓・心臓といった臓器の実質組織に遺伝子導入されたマウスに、SiR NIRF を静脈投与した後、各臓器由来の発光スペクトルの変化を測定することで組織において発現した発光センサ分子に近赤外蛍光色素が結合する速度を考察した。

結果および考察

HEK293T 細胞に発現させた様々なセンサ分子を SiR NIRF 標識して、ATP 産生の阻害に伴う発光スペクトルの変化を測定したところ、Halotag の N 末端を削ったセンサ分子が最も高い BRET 変化率を示した(図 1a)。一方で、ATP 結合性のないドメインを持つセンサ分子は、細胞内 ATP 濃度の変化に BRET を変化させないことから(図 1b)、センサ分子が ATP 濃度の変化を捉えていることが示唆された。

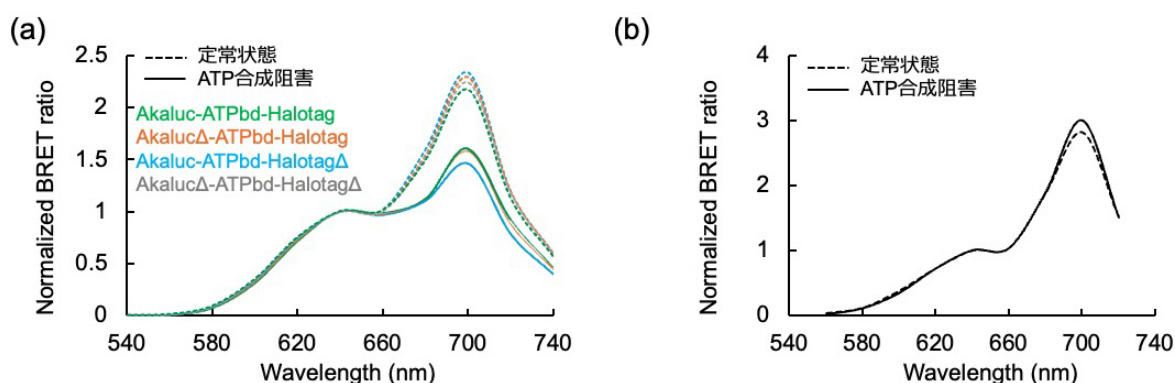


図 1. (a) ATP 結合ドメインを組み込んだ発光分子を培養細胞に発現させた時の発光スペクトル. (b) ATP 非感受性ドメインを組み込んだ発光分子を培養細胞に発現させた時の発光スペクトル.

化学遺伝学的アプローチを動物個体で実現する一つの障壁が、生体組織における Halotag の蛍光色素標識が挙げられる。そこで、ATP 応答性のないセンサ分子を AAV9 ベクターによって、B6 albino マウスの肝臓や心臓に発現させた後、過去に報告のある色素投与量 ($5\mu\text{mol/kg}$)¹⁾ で SiR NIRF の Halotag 標識反応が生体組織において十分進行するか調べた。SiR NIRF 投与後に肝臓と心臓から生成される発光シグナルをバンドパスフィルタ ($640\pm 10\text{ nm} / 700\pm 10\text{ nm}$) を介して測定したところ、色素投与後に発光ピークの明確なシフトが検出され(図 2a)、その BRET 効率の時間推移を算出した(図 2b)。その結果、SiR NIRF 投与後に 20-30 分程度で BRET 効率はピーク値に到達し、その値は培養細胞を使った測定と同等であったことから、Halotag の標識反応が生体組織においても十分飽和していることが明らかになった。さらに、BRET 効率のピーク値は 30 分以上は安定的に維持されたことから、この間に外部刺激などを加えることで、生体分子応答を測定できることが示唆された。

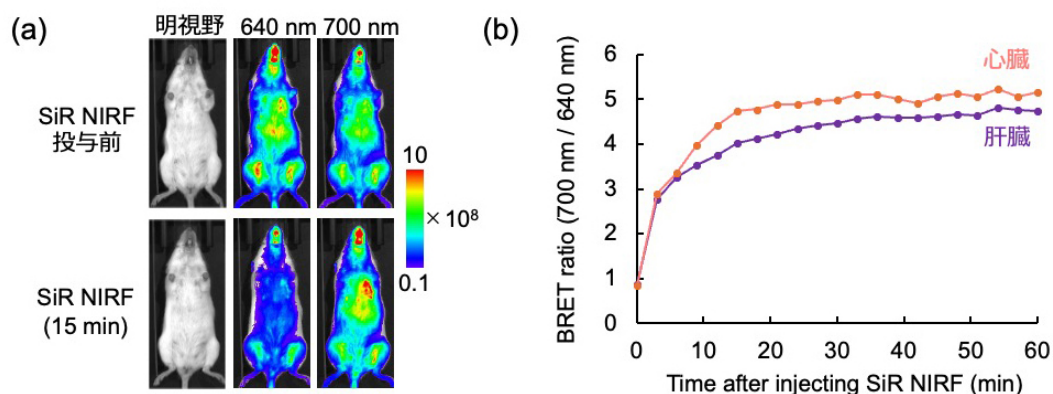


図 2. (a) ATP 非感受性発光センサ分子を発現するマウスにおける SiR NIRF 投与前と投与 15 分後に得られる代表的な発光イメージ. (b) 心臓・肝臓に由来する発光シグナルから算出した BRET 効率の時間推移.

(完)

引用文献

- 1) Mezzanotte L, et al. In vivo molecular bioluminescence imaging: new tools and applications. Trends Biotechnol. 2017, 35, 640–652.

- 2) Kuchimaru T, et al. A luciferin analogue generating near-infrared bioluminescence achieves highly sensitive deep-tissue imaging. *Nat. Commun.* 2016, 7, 11856.
- 3) Iwano S, et al. Single-cell bioluminescence imaging of deep tissue in freely moving animals. *Science.* 2018, 359, 935–939.
- 4) Kuchimaru T. Emerging Synthetic Bioluminescent Reactions for Non-Invasive Imaging of Freely Moving Animals. *Int J Mol Sci.* 2024, 25, 7338.
- 5) Hattori H and Ozakawa T. Split luciferase complementation for analysis of intracellular signaling. *Anal Sci.* 2014, 30, 539.
- 6) Fan F, et al. Novel genetically encoded biosensors using firefly luciferase. *ACS Chem Biol.* 2008, 3, 346-351.
- 7) Hoshino H, et al. Luciferase-YFP fusion tag with enhanced emission for single-cell luminescence imaging. *Nat Meth* 2007, 4, 637-639.
- 8) Suzuki K, et al. Five colour variants of bright luminescent protein for real-time multicolour bioimaging. *Nat Commun.* 2016, 7, 13718.
- 9) Arai R, et al. Detection of protein-protein interaction by bioluminescence resonance energy transfer from firefly luciferase to red fluorescent protein. *J Biosci Bioeng.* 2002, 94, 362.
- 10) Branchini BR, et al. Sequential bioluminescence resonance energy transfer-fluorescence resonance energy transfer-based ratiometric protease assays with fusion proteins of firefly luciferase and red fluorescent protein. *Anal Biochem* 2011, 414, 239-245.
- 11) Abdelfattah A, et al. Bright and photostable chemigenetic indicators for extended in vivo voltage imaging. *Science*, 365, 699-704.