

## 細胞内代謝産物を定量する生物発光センサーの開発

研究代表者： 服部 満（医学部医学科生命情報医科学講座・助教）

概 要	
	発生において幹細胞が個々の細胞へ分化する際には、細胞内代謝産物の量変動が分化運命に大きく関与していることが明らかとなっている。本研究では、代謝産物の中でも免疫細胞の分化の方向性に関与しているヘムに注目し、生きた細胞中のヘム量を検出するセンサープローブの開発を目的とした。開発したプローブは蛍光タンパク質及びヘム結合タンパク質を基盤とし、ヘムによる蛍光の吸光反応を検出することで細胞中のヘム量の変化を測定する。実際に細胞内でプローブを発現させた結果、ヘム量に応じて蛍光強度が変化した。さらに同プローブに発光タンパク質ルシフェラーゼを繋げることで、外部から励起光を照射しなくても自発的に発光及び吸光反応が生じるシステムへと発展させた。
関連キーワード	代謝産物、ヘム、生体プローブ、蛍光、ルシフェラーゼ

### 研究の背景および目的

生体組織の発生は、全ての種類の細胞に分化する能力のある「幹細胞」から具体的な特徴、機能を持つ個々の細胞へと分化することで進行する。この分化の全容を解明し、さらに人為的な制御を可能にすることは、将来的な再生医療や免疫治療の実現において不可欠である。未分化の細胞から各種細胞へと分化が進行する過程では、iPS細胞などの研究で解明されている通り、細胞ごとでの特定の遺伝子発現の有無が重要である。加えて近年注目されている要素では、ミトコンドリアなどの細胞内小器官の活性、さらには活性に反映された代謝産物の量が大きな意味を持つことも示唆されている。具体的な例としては、細胞内での鉄である「ヘム」の存在量によって免疫細胞の分化の方向性が変化することが明らかとなっている。しかしながら、現状では代謝産物を測る効率的な手段が確立されておらず、経時的な変化や組織中の局在など、生きた細胞情報を含む詳細な解析は未だ不十分である。

研究代表者はこれまで、生きた細胞内での現象を捉える方法として、定量性の面で大きく利点がある発光タンパク質ルシフェラーゼを用いた検出法を開発してきた。さらに蛍光イメージングとの

組み合わせを行うことで、これまで細胞膜タンパク質レセプターの薬剤活性や、シグナルタンパク質のリン酸化について発光検出を実現してきた。

本研究では、代謝産物の中でヘムに注目し、生きた細胞中のヘム量を検出するセンサープローブを開発する。既存のヘム計測方法は細胞溶解液を用いる手法がほとんどであり、生体上での変化のダイナミクスを追跡することは困難である。その問題を解決するため、本研究で開発するセンサープローブはタンパク質をベースとして遺伝的に細胞に導入する。具体的には、蛍光タンパク質及び発光タンパク質ルシフェラーゼを使用する。この生物発光を利用した原理によって、細胞が生きたまま直接ヘム量を測定することが可能となり、定量性を伴うシグナル検出が実行できる。さらに、従来のルシフェラーゼと比較して数十倍の明るさを生じる輝度の高いものを使用することで、フローサイトメトリーや1細胞イメージングを含む広範囲な研究対象に適用可能となる。

開発の結果は、ヘムのみならず各種代謝産物の経時的な定量化へと繋がり、細胞分化における将来的な人為制御にも大きく貢献できる。

### 研究の内容および成果

細胞内ヘムを検出するプローブとして、ヘムがもつ吸収スペクトルを利用する方法を導入した。ヘムは特定の波長の光を吸収する特性があり、蛍光色素がヘムに近接した場合、励起光により発生する蛍光がヘムに吸収されることが明らかとなっている。本研究では細胞内で恒常的に発現するタ

ンパク質プローブを開発するために蛍光タンパク質を利用した。最初に、接近したヘムによって蛍光タンパク質から発する蛍光の一部が吸収されるか検証した。細胞中の遊離ヘムを結合するタンパク質（ヘム結合タンパク質）に蛍光タンパク質が連結した形のプローブを発現させる DNA プラスミ

ドを作製し、培養細胞に導入して発現させた。ヘム結合タンパク質には、ヘムとの結合定数が異なる複数の変異体を作製して比較し、細胞活動に影響の少ないものを選択した。また複数の蛍光タンパク質をそれぞれ用いて蛍光吸光の程度を比較した。外部から光を照射することで蛍光タンパク質から発した蛍光は、ヘム結合タンパク質を融合した場合には蛍光強度が減少した。この減少の割合は、緑色蛍光タンパク質を使用した場合が最も大きかったため、以降は同蛍光タンパク質を使用することにした。また、細胞中のヘム量を薬剤の投与により変動させた結果、ヘム量を促進させる薬剤では蛍光強度が減少し、抑制させる薬剤では蛍光強度が増加したため、作製したプローブは細胞中のヘム量の変動を検出できることが示された(図1)。

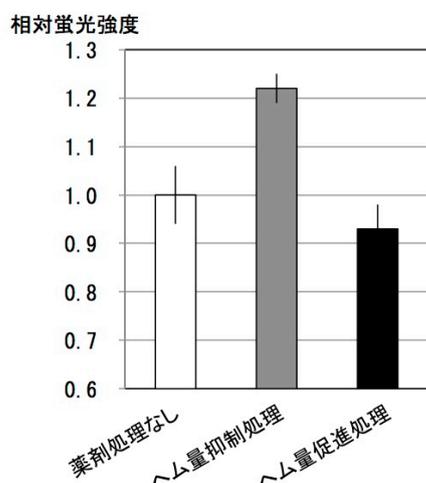


図1. 細胞内ヘム量を変化させた場合の蛍光プローブの蛍光強度変化

外部からの励起光はそれ自身がヘムに吸光される場合や、生体サンプルからの自家蛍光の原因となるなど検出において様々な問題がある。そこで、発光タンパク質ルシフェラーゼを蛍光タンパク質に繋げることで、外部から光を照射する必要なく蛍光タンパク質から自発的に蛍光を発生させる原理を考案した。ルシフェラーゼによる発光エネルギーの一部を外部へ放出させることなく近傍の蛍光タンパク質の励起エネルギーに変換することで、

蛍光が発せられる。同原理を、開発したヘム検出プローブと組み合わせることで、発生した蛍光がヘムにより吸収され、最終的に波長分光による相対値計算からヘム量の変化が検出可能となる。同原理の有効性を実証するため、ルシフェラーゼと蛍光タンパク質を繋げてエネルギー移行の効率を確認した。ルシフェラーゼには、研究用に確立されているものの中でも輝度が高いとされている種を使用した。ルシフェラーゼのアミノ酸鎖 N 末側もしくは C 末側に蛍光タンパク質を繋げる形で融合タンパク質を設計し、タンパク質発現 DNA プラスミドを培養細胞に導入した。培養細胞にルシフェラーゼ発光基質を添加して発光させ、スペクトルを測定した。ルシフェラーゼの N 末側に蛍光タンパク質を繋げた場合と C 末側に繋げた場合では、どちらもスペクトルに2つのピーク (440, 510 nm) が見られ、それぞれルシフェラーゼ由来の発光とエネルギー移行による蛍光タンパク質からの発光と推察された。よりエネルギー移行が顕著であった C 末側に繋げた設計を採用し、さらにヘム結合タンパク質をルシフェラーゼ融合タンパク質の C 末側に繋げたプローブを設計した。同プローブを細胞内に発現させて発光スペクトルを測定した結果、ヘム結合タンパク質を繋げていない場合と比較して蛍光タンパク質由来の発光ピーク (510 nm) が減少していた(図2)。したがって、プローブ自発的な発光、さらにはヘムによる吸光といった検出原理が確認された。

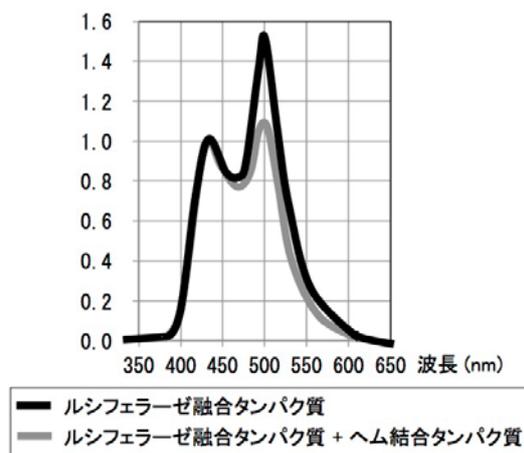


図2. 細胞中におけるルシフェラーゼ融合プローブの発光スペクトル

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表論文等」

プローブの開発後は、細胞実験及び生物個体実験により様々な条件でのヘム量を測定したのち、研究成果を投稿論文により発表する予定である。

### 「特記事項」

なし

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

日本学術振興会・科学研究費補助金・基盤研究(B)・平成29年度～31年度・細胞分化運命を決定するミトコンドリア活性を検出、制御する光学システムの開発・代表・申請中