

## 特集「顕微鏡で測る」(2)

## ルシフェラーゼを用いた細胞レベルの遺伝子発現動態解析

今井 章裕<sup>1\*</sup>、村田 隆<sup>1,2</sup>、長谷部 光泰<sup>1,2</sup><sup>1</sup>自然科学研究機構・基礎生物学研究所・生物進化研究部門、<sup>2</sup>総合研究大学院大学・生命科学研究科

\*E-mail: aimai@nibb.ac.jp

## 要旨

多細胞生物の発生や環境応答の過程では、遺伝子発現が細胞ごとに異なる動態を示すことがある。遺伝子発現の動態を詳細に知るためには、生体内でレポータータンパク質を発現させ、そのシグナルの時空間変化を調べる必要がある。これまでの遺伝子発現の動態解析では、シグナルが強く、かつ多色イメージングが可能である蛍光タンパク質が、レポータータンパク質として主に用いられてきた。しかしながら、蛍光の検出には励起光の照射が必須であるため、それが引き起こす細胞へのダメージや自家蛍光の発生といった問題に常に注意しなくてはならない。一方で、ルシフェラーゼを用いた発光イメージングは、励起光を使用しないためこれらの問題を回避できる反面、シグナルが微弱で検出が困難であるという問題があった。近年、発光検出器の感度の向上に伴い、このルシフェラーゼの短所は克服されてきている。本稿では、発光イメージングの近年の進歩を概説し、筆者らが開発した細胞レベル発光イメージング系を紹介する。

## はじめに

ホタルなどの発光生物は、自ら光を生成するしくみを持ち、生存戦略のひとつとして「発光」を利用している。この「発光」は、ルシフェリンを基質としたルシフェラーゼによる酵素反応の結果、化学エネルギーが光エネルギーへと変換することで生ずる[1]。ルシフェラーゼ遺伝子は、細菌・昆虫・海産無脊椎動物といった様々な生物からこれまでに単離・同定されており、注目する遺伝子のプロモーター配列と融合させ、生体内に導入することで、遺伝子発現の変動を推測するレポーターとして用いられてきた。発光は、ルミノメーターによって検出されることが多いが、ルミノメーターは溶液試料中の発光量を測定する機器であるため、「どこで発光しているか」という空間情報を得ることができない。空間情報を得るためには、ルシフェラーゼは発光が微弱であるため検出が困難であった。しかし、近年の検出カメラの感度の向上によって、発光シグナルを画像として取得することが可能になり、これによってルシフェラーゼは遺伝子発現の時空間変化を解析するツールとして、さまざまな分野において選択されるようになってきている。

本稿ではルシフェラーゼをレポータータンパク質として用いた発光イメージング系の概要と、蛍光イメージング

と比較した際の利点について述べる。また、筆者らが行っている細胞レベル発光イメージング系を用いた遺伝子発現解析の例を紹介する。

## ルシフェラーゼによる発光反応

ルシフェラーゼは発光反応を触媒する酵素の総称であり、その立体構造や、反応基質、反応様式は生物種によって大きく異なることが多い[1]。これまで同定されたルシフェラーゼの中で最もその反応機構がよく調べられているのはホタル (*Photinus pyralis*) ルシフェラーゼであり、レポータータンパク質として多くの研究で使用されている。ホタルルシフェラーゼは、ATP およびマグネシウムイオンの存在下で、ホタルルシフェリンの酸化を触媒し、その結果生じる励起状態のオキシルルシフェリンが基底状態へ戻る際に、黄緑色 (最大発光波長 562 nm) の光を生じる (図1)。ウミシイタケ (*Renilla reniformis*) ルシフェラーゼは、カルシウムイオンの結合によって活性化され、基質であるセレンテラジン (ウミシイタケルシフェリン) の酸化を触媒する。放出される光は青緑色 (最大発光波長 480 nm) である。発光細菌 (*Vibrio harveyi*) ルシフェラーゼは、細菌における遺伝子発現の検出に用いられ、還元型フラビンモノヌクレオチドの酸化反応を触媒し、結果とし

て青緑色の光（最大発光波長 490 nm）が生じる。

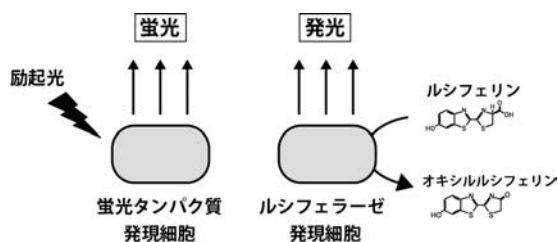


図1 蛍光タンパク質発現細胞とルシフェラーゼ発現細胞の発光様式の違い。ここではホタルルシフェラーゼの触媒反応例を示す。

### 発光イメージングに用いる検出装置

発光イメージングでは、シグナルを検出する機器として電子増倍型 CCD（Electron Multiplying -CCD: EM-CCD）カメラが用いられる。EM-CCD カメラは、通常の CCD カメラと異なり、受光部で発生した電荷をデジタル信号に変換する前に、高電圧をかけて電荷を増幅させることができる[2]。EM-CCD カメラの登場により、発光シグナルを検出する感度が飛躍的に上昇し、解析できる対象が広がった。

発光検出装置は、「暗箱一体型」と、「顕微鏡-カメラ独立型」に分けられる。「暗箱一体型」は、カメラ、レンズが遮光性の高い暗箱に内蔵されており、暗箱内部の生きたままの小動物、植物、寒天培地上の微生物などからの発光を検出することができる。「顕微鏡-カメラ独立型」は、EM-CCD カメラを顕微鏡に接続する形式で構成される。その場合には、顕微鏡本体を暗幕で覆い、入念に遮光する必要がある。蛍光顕微鏡の使用に求められる暗条件とは異なり、わずかな光の漏れがノイズとして映り込んでしまうため、可能であるならば暗室内に顕微鏡システム一式を設置するのが望ましい。「顕微鏡-カメラ独立型」は、「暗箱一体型」と異なり、顕微鏡システムの構成や解析ソフトウェアが自由に選べることに加え、照明や温度制御など観察時における試料の培養条件に柔軟に対応できるというメリットがある。

### 発光イメージングの利点

遺伝子の発現動態を調べる目的で生体イメージングを行う場合には、レポータータンパク質の選択肢として、蛍光タンパク質とルシフェラーゼが挙げられる。どちらも観察目的によって得手/不得手な側面がある。この項では、蛍光イメージングと比べた際の、発光イメージングの利点

について述べる。

蛍光タンパク質の検出には、生体試料に励起光を照射する必要がある。励起光は蛍光タンパク質以外の生体物質にも吸収され、自家蛍光が発生する。蛍光タンパク質のシグナル値が低い場合には、この自家蛍光は不規則な背景光として無視できない割合となり、シグナル値の信頼性が低下する。一方、励起光を必要としない発光イメージングでは、自家蛍光が発生しないことから、背景光を極めて低いレベルに抑えることができる。したがって、蛍光イメージングに比べ、シグナル値の信頼度が高く、定量性に優れると期待される。

また、励起光は、熱や活性酸素の発生、DNA 損傷などを引き起こし、生体にダメージを与える。発光イメージングでは、励起光によるダメージがないため、生体試料の長期的な経時観察をより低い侵襲性で行うことができる。

レポーターシグナルを安定に検出できることも発光イメージングの利点と考えられる。励起光照射は蛍光タンパク質特有の退色現象を引き起こすが、発光イメージングにおいては、この問題を回避し、長時間かつ安定的なシグナルの検出が可能である。ただし、基質の減少によるシグナルの低下には注意が必要であり、この点については後の項で詳しく述べる。

ルシフェラーゼによる発光シグナルは、プロモーター活性の経時変動に対し、より高い時間的正確度で応答すると期待される。蛍光タンパク質は、翻訳後すぐにはレポータータンパク質として機能せず、アミノ酸残基間の環化・酸化反応によって起きる発色団の形成が必要である。蛍光タンパク質種によるが、シグナルとプロモーター活性の間に、長ければ数時間の時間的ずれが生じることもある [3]。ルシフェラーゼの機能に発色団の形成は必要なく、翻訳後すぐに機能することができる分、シグナル検出開始に至る時間が短くなると期待される。また、ルシフェラーゼの方が、概してタンパク質寿命が短い傾向にある。たとえば、野生型ホタルルシフェラーゼの半減期が約 2 時間であるのに対し、野生型 GFP は約 26 時間である[4][5]。このため、野生型ホタルルシフェラーゼの方が野生型 GFP に比べ、プロモーター活性の減衰に対してより時間的なずれが少なく応答できると考えられる。ただし、発色団形成時間およびタンパク質寿命に関しては、近年多数の改良型蛍光タンパク質が開発されており、蛍光タンパク質の時間的正確度

に関する短所は補われつつある[6]。

### ルシフェラーゼの改良

前項で、蛍光イメージングに対する発光イメージングの利点を述べたが、発光イメージングにもいくつかの改善すべき点がある。

遺伝子の発現解析を行う際、複数遺伝子の発現変動パターンを同時に比較する実験や、遺伝子発現量の標準化が必要な場合がある。生体イメージングにおいてこれらを行うには、複数種のレポーターを用いた多色アッセイを用いる必要がある。これは、異なる蛍光波長を発する蛍光タンパク質あるいは蛍光色素を用いて、波長フィルタによって各々のシグナルを分離し、異なるレポーターのシグナルを独立に検出する手法である。かつてのルシフェラーゼを用いた研究では、いずれのルシフェラーゼ種でも最大発光波長が青緑色付近に近接していたため多色アッセイが難しかった。しかし、現在では赤色や橙色発光型のルシフェラーゼが単離および開発されており、同一の試料において複数種のルシフェラーゼの発光シグナルを独立に測定することが可能になってきた。

発光イメージングのもう一つの問題点はシグナルが微弱なことである。短時間に変動する遺伝子発現を観察する場合には、露光時間を長くすることができない。そこで、シグナル強度の乏しさを、ルシフェラーゼと蛍光タンパク質の融合タンパク質を作ることによって改善する方法が考案された[7][8]。これは生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) の原理に基づいており、発光基質が光を放出するエネルギーを、近傍の蛍光タンパク質に転移させる。すると、蛍光タンパク質の光エネルギー変換効率がより高い場合に、発光量が増えることになる。励起光を使わずに、

より明るいシグナルの観察を可能にする画期的な方法である。

### 発光イメージングを行う際の留意点

この項では、実際に発光イメージングを行う場合に特に注意を要する点について述べる。

第一の注意点は、基質の投与方法である。観察対象が培養細胞や植物体の場合は、基質の培地への添加や噴射投与、あるいはマウスなどの小動物の場合には、静脈/腹腔内注射による投与が一般的であるが、基質が解析対象の組織や細胞に到達しているかを、恒常的発現を示す遺伝子プロモーターを利用して確認する必要がある。

第二の注意点は、基質の安定性である。ウミシイタケルシフェラーゼを用いる場合、基質であるセレンテラジンは培地中で非常に不安定であることが多い[9]。長時間におよぶ生体イメージングでは、基質の追加投与を検討するか、保護基を付加することによって安定化させたセレンテラジンをを用いる必要がある[10]。

### 細胞レベル発光イメージングの実際

この項では、ルシフェラーゼを用いた遺伝子発現動態解析の例として、筆者らが開発した細胞レベル発光イメージング系について述べる。

筆者らは、コケ植物のヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) を研究材料にして、分化体細胞の幹細胞化の分子メカニズムの解明を目指している。ヒメツリガネゴケの葉を切断し、培地中で生育させると、切断箇所面に葉細胞が幹細胞へと変化する[11]。幹細胞への運命転換が起こったことは、先端成長と細胞分裂が起こることによって判別でき、切断後24時間から36時間のあいだに観察される(図2)。

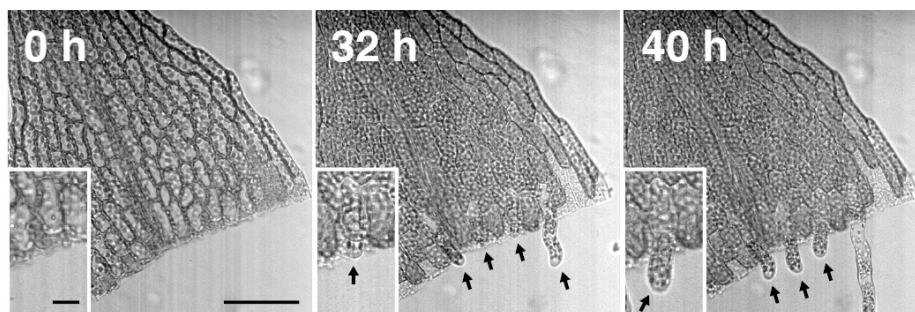


図2 ヒメツリガネゴケの幹細胞発現系。葉の切断によって、切り口の葉細胞が幹細胞化する。幹細胞は、先端成長をしながら細胞分裂を繰り返す。写真は切断後0、32、40時間目 (h) の葉。矢印は幹細胞を指す。写真中のスケールバーは100 $\mu$ m (図中枠内は20 $\mu$ m) を示す。

この幹細胞化は、光を完全に遮断した暗条件下では誘導されず、光シグナルが必要であることが分かっている。

筆者らの研究室では、これまでに複数の幹細胞化を制御する遺伝子を同定してきた。それらは幹細胞化過程において、自己フィードバック制御を含む遺伝子ネットワークを形成すると考えられている。各々の遺伝子の制御関係を明らかにするために、野生型と変異体間における遺伝子発現の比較解析を行う必要があるが、それには発現変化量を正確にモニターできる高い定量性をもった解析系が適している。また、幹細胞化までの24~36時間という比較的短時間に変動する遺伝子発現を、時間的なずれを少なくして検出する必要がある。さらに、幹細胞と非幹細胞は隣り合っているため、それらを区分して独立に遺伝子発現を測定したい。そこで筆者らは、ヒメツリガネゴケの幹細胞誘導系において、「高い定量性」かつ「高い時間的正確度」で、「細胞ごと」に遺伝子発現量を測定する系の確立を目指し、細胞レベル発光イメージング系を独自に開発した。

発光検出装置は「顕微鏡-カメラ独立型」を採用し、倒立顕微鏡やEM-CCDカメラなどから構成される顕微鏡解析システム一式を、温度制御可能な暗室内に設置した。次に、幹細胞誘導には光が必要であるが、一方で発光検出時には完全な暗条件である必要がある。この障害を乗り越えるため、「顕微鏡-カメラ独立型」システムの利点を活かし、別途LED照明装置とプログラムタイマーを導入し、明暗サイクルを作り出した(図3A)。ホタルルシフェリンは、葉に接する寒天培地にあらかじめ添加した。解析対象遺伝子のプロモーター配列とホタルルシフェラーゼ遺伝子の融合遺伝子を導入した安定形質転換体を作成し観察試料とした。

実際の例として、ルシフェラーゼを用いて行った、幹細胞化を促進するRNA結合タンパク質遺伝子のプロモーター活性の解析画像を示す(図3B)。本プロモーターレポーターラインの切断した葉の各細胞から、発光反応に由来するシグナルが検出された。このように、背景光と明確に区

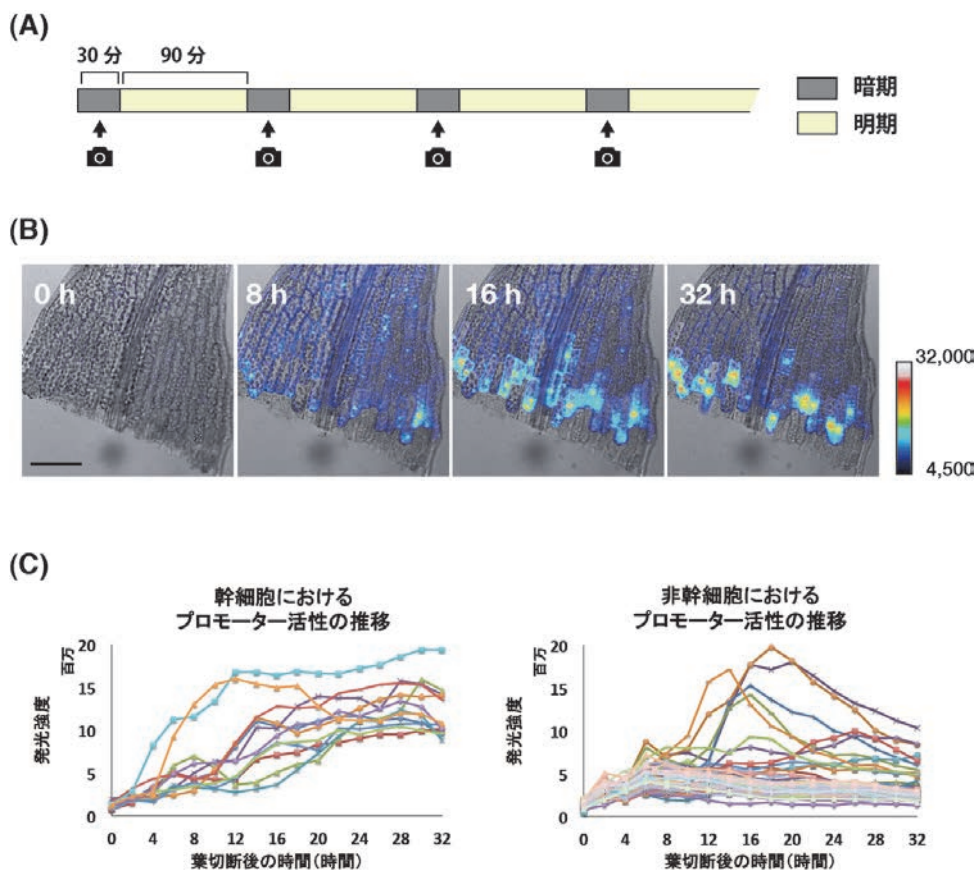


図3 幹細胞化を促進するRNA結合タンパク質遺伝子のプロモーター活性レポーターラインを用いた、幹細胞誘導時における発光強度の推移の定量解析。(A) 発光シグナルの検出スケジュール。30分間の暗期にEM-CCDカメラによる発光シグナルの検出を行う。(B) 葉切断後0、8、16、32時間目(h)のプロモーター活性(疑似カラー)と明視野の重ねあわせ画像。1回の撮影あたりの露光時間は2分間で行った。写真中のスケールバーは100 μmを示す。(C) 葉切断後32時間目までの幹細胞(左)および非幹細胞(右)の発光強度の推移。それぞれのプロットは細胞ごとの発光強度の変化を示す。

別できる発光シグナルが検出されれば、画像解析ソフトウェアを用いて、発光強度の時間推移を細胞ごとに区分化して定量解析することができる。図3Cは、画像中の全細胞を「幹細胞」と「非幹細胞」にグループ分けし、発光強度の時間推移を細胞ごとにプロットしたグラフである。これを見ると、個々の細胞における本遺伝子のプロモーター活性の動態は、特に「非幹細胞」グループ内において多様であり、それらは決して同一のアイデンティティーをもった細胞集団ではないことが分かる。

同一の培養条件で生育させ、外見上は同じ状態にある細胞の集団であっても、細胞ごとのばらつきや遺伝子発現のゆらぎが観察される [12]。それらを計測するには、遺伝子発現の変化を“同一の細胞”で追跡する必要があり、それはシングルセルトランスクリプトームのような一点のみの解析系では困難である。細胞レベル発光イメージング系は、幹細胞化過程における遺伝子発現の微細なゆらぎや細胞間のばらつきを検出し、細胞ごとの発現動態を比較するのに適した解析系である。

#### おわりに

本稿で述べたように、発光イメージングには多くの利点があり、これまで見えなかった生命現象を発見し、新たな研究展開を導く可能性を含むツールである。今後、新しい技術開発とともに、より幅広い解析対象において活用が進むことが期待できる。

#### 謝辞

原稿に有益なコメントをいただいた森下美生、越水静両氏に感謝する。本稿で述べた研究結果は、日本学術振興会「頭脳循環を加速する若手研究者戦略的海外派遣プログラム」における、Philip N. Benfey 教授（デューク大学、米国）との共同研究による成果を含む。

#### 引用文献

1. 今井一洋, 近江谷克裕 (2006) バイオ・ケミルミネセンス ハンドブック 丸善株式会社
2. 最上秀夫 (2006) 染色・バイオイメーjing実験ハンドブック第8章, 高感度 CCD カメラとイメージングテンシファイアー 羊土社
3. Evdokimov AG, Pokross ME, Egorov NS, Zaraisky AG,

Yampolsky IV, Merzlyak EM, Shkoporov AN, Sander I, Lukyanov KA, Chudakov DM (2006) Structural basis for the fast maturation of Arthropoda green fluorescent protein. *EMBO Rep.* 7: 1006-1012.

4. Ignowski JM, Schaffer DV (2004) Kinetic analysis and modeling of firefly luciferase as a quantitative reporter gene in live mammalian cells. *Biotechnol. Bioeng.* 86: 827-834.
5. Corish P, Tyler-Smith C (1999) Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells. *Protein Eng.* 12: 1035-1040.
6. 永井健治 (2007) 生細胞蛍光イメージング第8章 変型蛍光タンパク質の利用 共立出版
7. Hoshino H, Nakajima Y, Ohmiya Y (2007) Luciferase-YFP fusion tag with enhanced emission for single-cell luminescence imaging. *Nat. Methods* 4: 637-639.
8. Saito K, Chang YF, Horikawa K, Hatsugai N, Higuchi Y, Hashida M, Yoshida Y, Matsuda T, Arai Y, Nagai T (2012) Luminescent proteins for high-speed single-cell and whole-body imaging. *Nat. Commun.* 3: 1262.
9. Close DM, Xu T, Saylor GS, Ripp S (2011) In vivo bioluminescent imaging (BLI): Noninvasive visualization and interrogation of biological processes in living animals. *Sensors* 11: 180-206.
10. Hawkins E, Unch J, Murphy N, Vidugiriene J, Scurria M, Klaubert DH, Wood KV (2005) Measuring *Renilla* luciferase luminescence in living cells. *Promega Notes* 90: 10-14.
11. Ishikawa M, Murata T, Sato Y, Nishiyama T, Hiwatashi Y, Imai A, Kimura M, Sugimoto N, Akita A, Oguri Y, Friedman WE, Hasebe M, Kubo M (2011) Physcomitrella cyclin-dependent kinase A links cell cycle reactivation to other cellular changes during reprogramming of leaf cells. *Plant Cell* 23: 2924-2938.
12. Elowitz MB, Levine AJ, Siggia ED, Swain PS (2002) Stochastic gene expression in a single cell. *Science* 297: 1183-1186.

(2014年7月19日受付; 2014年7月25日受理)