

67. 自由行動動物の非侵襲的近赤外光イメージング

口丸 高弘

自治医科大学 医学研究科

Key words : 近赤外発光, 自由行動動物, 非侵襲的イメージング, 生物発光共鳴エネルギー移動

緒言

イメージング技術は、細胞から個体まで様々なスケールにおける生命活動や疾患機構の非侵襲的な解析に貢献してきた。数あるイメージングモダリティの中でも、光イメージングは、この 30 年の中で開発されてきた数多くの遺伝子コード型の蛍光・発光タンパク質分子や化合物色素が多彩な生体分子イベントの観察を可能にしている。さらに近年の光学顕微鏡やセンサ分子開発の進展は、マウスのような小動物の生体組織を高い時空間分解能を持って観察できる。しかし、運動、睡眠、社交行動といった多目的に自由に行動する動物個体の深部組織にて進行する生体分子応答の可視化は、光イメージングに限らずどのようなイメージングモダリティを用いてもほとんど叶っていない。本来、自由行動を伴うべき状態の動物のイメージング解析は、拘束器具によって動物の行動を制限することで実施されている [1]。拘束器具は動物にストレスを与え、たとえ短時間であっても、脳神経ストレス応答やそれらを介して遠隔臓器に炎症などを惹起する [2]。そもそも拘束することで、動物個体レベルでの自然な振る舞いは失われており、正しい生理応答を観察できているのか判断が非常に難しい。このような動物を拘束器具から解放するために、組織埋め込み型のイメージングデバイスの開発も近年盛んである [3]。しかし、埋め込み時に組織に炎症が誘導されることは避けられず、場合によっては組織の一部を除去しなければならないこともある [1]。このように自由に行動する動物をイメージングする方法論は提案されているものの、イメージング行為が観察対象に大きく介入しており、それが与える影響、すなわち“観察者効果”を最小にできているとは言い難い。

筆者らは、長年、ホタルの発光反応を人工的に改変することで、発光波長を生体組織透過性に優れる近赤外領域へと伸長するツールを開発してきた [4, 5]。その中で見出された、AkaLumine-Akaluc 反応 (AA 反応) は、高輝度な近赤外生物発光反応であり、マウスの生体深部からの光を非常に短いカメラ露光時間で捉えることができる [5]。実際に、自由に行動するマウスの脳や肺からの発光シグナルをビデオレートで撮像できる。この AA 反応に、生体分子のセンサ機能を埋め込むことができれば、自由に行動するマウスの生体組織における生体分子イベントの非侵襲的な解析を実現できると考えた。過去に、ホタル由来の生物発光反応に生体分子のセンシング機能を埋め込んだ報告は多数ある。そのアプローチとしては、特定の生体分子反応によって、発光基質のケーシングが外れるといった化学的アプローチと、ルシフェラーゼを二つに分割し、タンパク質相互作用やタンパク質構造変化によって、分割したルシフェラーゼが会合することで発光を生成するといった遺伝学的アプローチがある [6, 7]。しかし、これらのアプローチにおいては発光シグナル強度の変化を鋭敏に検出する必要があるが、自由行動する動物の姿勢によって検出される発光シグナルのベースが変動し、そもそも発光基質や酵素を改変することで発光反応効率が低下し、長時間のカメラ露光が必要になるなど自由行動動物のイメージングに最適とは言い難い。そこで、定量性と発光輝度を両立するセンサ分子の設計アプローチにおいて有力となるのが生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET : bioluminescence resonance energy transfer) による、生体分子イベントの検出である [8]。ドナー分子となる生物発光分子に、アクセプタ分子が空間的に近接すると、BRET を介して生物発光エネルギーによって蛍光分子が励起され、二峰性の波長スペクトルを持つ発光シグナルが生成される。この時、ドナー・アクセプタの近接を、タンパク質相互作用やタンパク質構造変化によって制御することで、二つの波長ピークの比が、分子間相互作用やタンパク質構造変化を伴う生体分子イベントの活性化レベルを示すと解釈できる。BRET に基づいた分子センサは、生物発光分子の発光強度を損なわないことに加えて、波長のピーク比を検出指標とす

るために、自由行動による発光シグナルのベース変動に影響されない。しかし、大きな課題として、ホタルルシフェラーゼやその類縁体・変異体と蛍光分子を組み合わせ、高効率に BRET を誘導することは非常に困難であり、実際に実用的な分子センサは過去に報告がない。センサ分子の開発には、ドナー分子とアクセプタ分子の組合せを新たに見出す必要がある。

本研究では、自由行動動物において、真に非侵襲的で定量的な光イメージングの方法論を開発する。そのために、生体分子活性に応答した BRET によって、近赤外波長スペクトルが変化する発光分子センサを、近赤外ホタルルシフェラーゼにドナー分子に、近赤外蛍光色素をアクセプタ分子に用いる化学遺伝学的アプローチを検討した。

結果

生体イメージングに優れる近赤外波長領域での BRET を利用して、自由行動動物における生体分子イベントを非侵襲的かつ定量的に測定する発光分子センサの開発に取り組んだ。Akaluc をドナー分子として高効率に BRET を誘導可能なアクセプタ分子として、シリコンローダミン系の近赤外蛍光色素 (SiR) に着目した。SiR は、2010 年代に入ってから開発が進んだ蛍光色素群であり、これまで主流であったシアニン系近赤外蛍光色素に比べて高輝度であることから、様々な励起/蛍光波長特性を持つ分子が開発されている。Akaluc は結晶構造解析がまだ報告されておらず、タンパク質構造情報がないために、類似した構造をとると考えられるホタルルシフェラーゼ (Fluc) と、SiR が結合するタグタンパク質 (Halotag) を融合したタンパク質を哺乳類細胞に発現させた。そして、SiR650 Halotag ligand を細胞に添加することで、生細胞内での Fluc と SiR650 の間に誘導される BRET を発光スペクトルの測定から評価した。この測定から、Fluc の C 末端に Halotag を結合することで、非常に高効率に BRET を誘導できることが明らかになった (図 1a)。一方、Halotag と類似した機能を持つタグタンパク質である SNAP-tag や SiR650 に類似した蛍光スペクトルを持つ近赤外蛍光タンパク質群についても BRET の誘導効率を調べたところ、Halotag と SiR650 の組み合わせには及ばなかったため (図 1b、c)、以後 Halotag を使った検討を進めた。

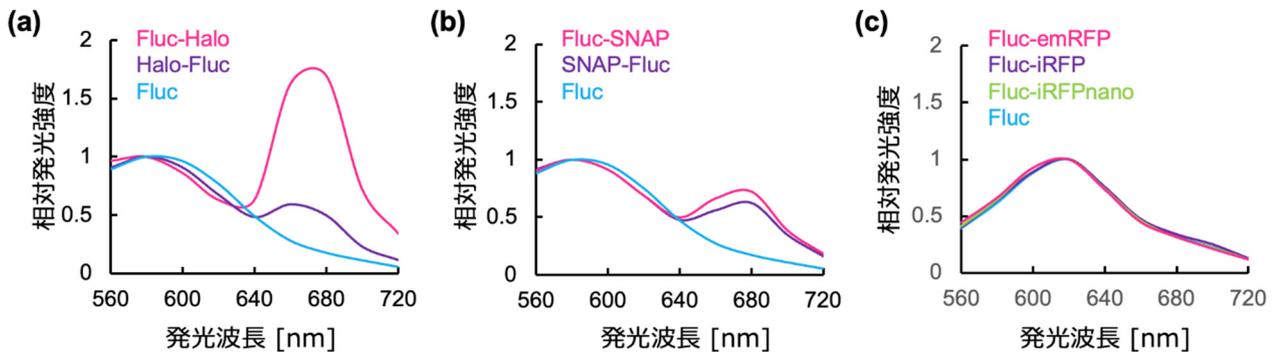


図 1. 近赤外蛍光アクセプタ分子とホタルルシフェラーゼ間の BRET 効率

- Fluc の N 末端 (Halo-Fluc) もしくは C 末端 (Fluc-Halo) に Halotag を結合した分子を発現する HEK293T 細胞に SiR650 を添加した時と、Fluc 単体 (Fluc) 発現細胞から得られた発光スペクトルを示した。
- Fluc の N 末端 (SNAP-Fluc) もしくは C 末端 (Fluc-SNAP) に SNAP-tag を結合した分子を発現する HEK293T 細胞に SiR650 を添加した時と、Fluc 単体 (Fluc) 発現細胞から得られた発光スペクトルを示した。
- Fluc の C 末端に emRFP (Fluc-emRFP) / iRFP (Fluc-iRFP) / iRFPnano (Fluc-iRFP) をそれぞれ結合した分子を発現する HEK293T 細胞と、Fluc 単体 (Fluc) 発現細胞から得られた発光スペクトルを示した。

細胞ストレスに幅広く応答する p53 と murine double minute 2 (MDM2) 間のタンパク質相互作用をモデルにして、Fluc と Halotag を用いて、細胞内の機能的なタンパク質相互作用を BRET によって検出可能か検討した。p53 と MDM2 の相互作用ドメインをそれぞれ Fluc と Halotag と融合し、細胞に共発現させたところ、非常に効率的に BRET が誘導され、その相互作用を阻害する阻害剤を添加したところ、BRET 効率が低下したことから、タンパク質相互作用を BRET 効率からモニタリングできる可能性が示された (図 2a)。さらに、多量体形成ペプチドを使って、タンパク質相互作用に伴う液液層分離 (LLPS) を介した分子凝縮体形成を誘導する幾つかの系がこれまでに確立されている。そこで、p53-Fluc と MDM2-Halotag の相互作用時に LLPS を誘導したところ、単一分子間の相互作用時に比べて、BRET 効率の向上が確認された (図 2a, b)。一方、Akaluc と Halotag-SiR650 を組み合わせると、BRET は高効率に誘導されるが、Akaluc の発光スペクトル ($\lambda_{\max}=650$ nm) と SiR650 の蛍光スペクトルの分離が困難であり、波長ピーク比の解析に難がある。そこで、より長波長の蛍光シグナルを生成する SiR680 をアクセプタ分子として検討したところ、Akaluc と Halotag-SiR680 の間においても BRET が高効率に誘導された (図 3)。

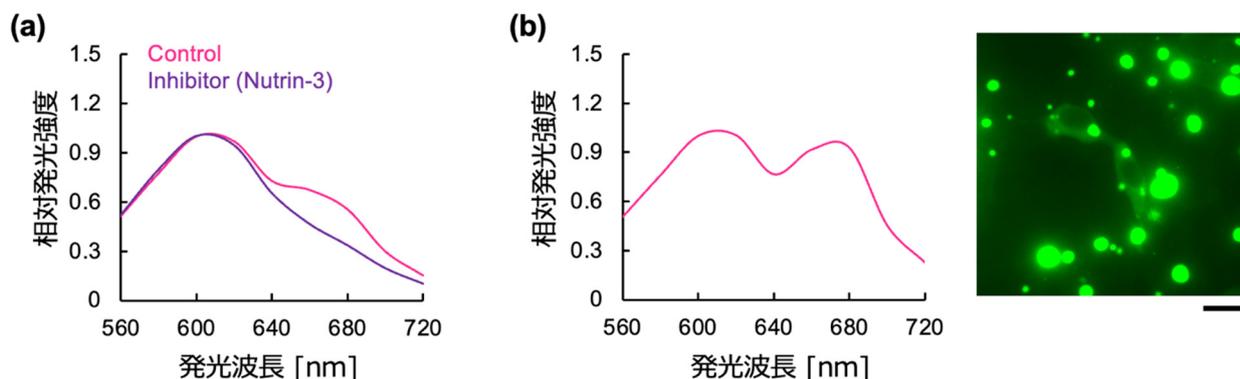


図 2. 近赤外 BRET センサ分子によるタンパク質相互作用の検出

- HEK293T 細胞に p53-Fluc と MDM2-Halotag を共発現し、SiR650 添加後に、阻害剤処理の有無で測定した発光スペクトルを示した。
- p53-Fluc と MDM2-Halotag に LLPS 誘導性ペプチドを付加した分子を HEK293T 細胞に共発現し、SiR650 を添加した時の発光スペクトル (左) と LLPS 誘導された細胞を蛍光観察した様子 (右) を示した。スケールバーは 20 μ m を示す。

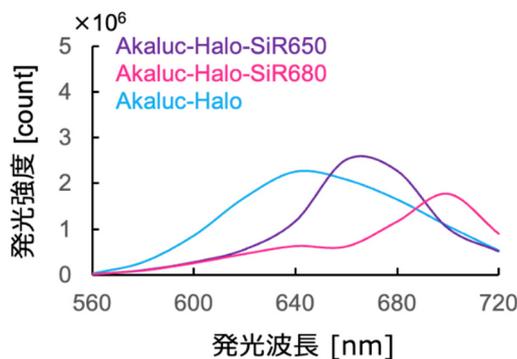


図 3. Akaluc-Halotag システムにおける BRET の誘導

HEK293T 細胞に Akaluc-Halotag を発現させて、SiR650 (Akaluc-Halo-SiR650) もしくは SiR680 (Akaluc-Halo-SiR680) 添加後または、Akaluc-Halotag (Akaluc-Halo) を単独で発現する細胞から得られた発光スペクトルを示した。

考 察

本研究では、近赤外生物発光と BRET を利用した化学遺伝学的分子センサの設計を検討した。BRET は海洋系ルシフェラーゼに蛍光タンパク質や蛍光色素をアクセプタとしたセンサ分子の設計にこれまでも利用されてきた [9, 10]。それらの中には実際に自由行動動物のイメージングに適用されたセンサ分子もある。しかしながら、海洋系ルシフェラーゼをベースにすると可視領域の発光シグナルの生体透過性が乏しく、表層組織を除去しなければ、自由行動動物の高感度な深部組織のイメージングは困難であり [9]、観察者効果の克服には至っていない。我々は、これまでに実現してこなかった近赤外発光での BRET センサ分子の新しい設計手法を確立しつつある。現在、アクセプタ分子によって BRET 効率が大きく異なる諸条件において、ドナー・アクセプタの空間近接条件の考察を進めるとともに、近赤外発光 BRET センサ分子の動物組織への導入条件や測定光学系の最適化を進めている。これらを通して、自由行動動物での非侵襲的かつ定量的なイメージング方法論を確立し、新しい生物学の開拓を目指す。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、理化学研究所脳神経科学研究センターの宮脇敦史博士、宮崎大学テニユアトラック推進室の岩野智博士、慶應義塾大学薬学研究科の花岡健二郎博士であり、研究の推進に協力頂いたことを御礼申し上げる。

文 献

- 1) Jennings JH, Kim CK, Marshel JH, Raffiee M, Ye L, Quirin S, Pak S, Ramakrishnan C, Deisseroth K. Interacting neural ensembles in orbitofrontal cortex for social and feeding behaviour. *Nature*. 2019 Jan; 565 (7741) : 645-9. PMID: 30651638 DOI: 10.1038/s41586-018-0866-8
- 2) Okere B, Eric LX, Roubos EW, Sonetti D, Kozicz T. Restraint stress alters the secretory activity of neurons co-expressing urocortin-1, cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide and nesfatin-1 in the mouse Edinger-Westphal nucleus *Brain Res*. 2010 Mar 4; 1317:92-9 doi: 10.1016/j.brainres.2009.12.053
- 3) Hamel EJO, Grewe Bm Parker JG, Schitzer MJ. Cellular level brain imaging in behaving mammals: an engineering approach. *Neuron*. 2015 Apr 8; 86 (10): 140-59. PMID 25856491 DOI 10.1016/j.neuron.2015.03.055
- 4) Kuchimaru T, Iwano S, Kiyama M, Mitsumata S, Kadonosono T, Niwa H, Maki S, Kizaka-Kondoh S. A luciferin analogue generating near-infrared bioluminescence achieves highly sensitive deep-tissue imaging. *Nat Commun*. 2016 Jun 14; 7: 11856. PMID:27297211 DOI: 10.1038/ncomms11856.
- 5) Iwano S, Sugiyama M, Hama H, Watakabe A, Hasegawa N, Kuchimaru T, Tanaka KZ, Takahashi M, Ishida Y, Hata J, Shimozono S, Namiki K, Fukano T, Kiyama M, Okano H, Kizaka-Kondoh S, McHugh TJ, Yamamori T, Hioki H, Maki S, Miyawaki A. Single-cell bioluminescence imaging of deep tissue in freely moving animals. *Science*. 2018 Dec 23; 359 (6378) : 935-9. PMID:29472486 DOI: 10.1126/science.aag1067.
- 6) de Bittner GCV, Bertozzi CR, Chang CJ. Strategy for dual-analyte luciferin imaging: in vivo bioluminescence detection of hydrogen peroxide and caspase activity in a murine model of acute inflammation. *J Am Chem Soc*. 2013 Feb 6; 135 (5) : 1783-95. PMID:23347279 DOI: 10.1021/ja309078t
- 7) Hattori M, Ozawa T. Split luciferase complementation for analysis of intracellular signaling. *Anal Sci*. 2014; 30 (5) : 539-44. PMID:24813951 DOI: 10.2116/analsci.30.539
- 8) Pflieger KDG, Eidne KA. Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET) . *Nat Methods*. 2006 Mar;3 (3) : 165-74. PMID:16489332 DOI: 10.1038/nmeth841

- 9) Inagaki S, Agetsuma M, Ohara S, Iijima T, Yokota H, Wazawa T, Arai Y, Nagai T. Imaging local brain activity of multiple freely moving mice sharing the same environment. *Sci Rep.* 2019 May 16;9 (10) :7460. PMID: 31097780 DOI: 10.1038/s41598-019-43897-x
- 10) Metes N, Busch M, Huppertz MC, Hacker CN, Wilhelm J, Gurth CM, Kuhn S, Hiblot J, Koch B, Johnsson K. Fluorescent and bioluminescence calcium indicators with tuneable colors and affinities. *J Am Chem Soc.* 2022 Apr 20;144 (15) :6928-35. PMID:35380808 DOI: 10.1021/jacs.2c01465