

【目的】 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解析に貢献してきた。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、どのようなイメージング技術を用いてもほとんど叶っていない。真に生理的な状態にある自由行動動物において、生体分子応答を非侵襲的かつ定量的に可視化できれば、我々の身体機能や疾患予防の概念を変容する知見が導出されるであろう。そこで本研究では、化学遺伝学アプローチと生物発光の波長制御論に基づき、自由行動動物の深部臓器における細胞代謝応答を非侵襲的かつ定量的に可視化する発光センサ分子を開発する(図)。そして、その応用の一例として、非拘束下にて運動するマウスの心臓や脳・筋肉といった組織の代謝応答の臓器連関解析を実現する。

【方法】 自由行動動物のイメージングに求められる時間分解能と定量性を実現するために、生体分子活性に応答した生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET : Bioluminescence Resonance Energy Transfer) 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、高輝度近赤外発光酵素 Akaluc を使って設計する。高感度なセンサを開発するために、BRET を高効率に誘導する必要がある。その実現のため、近赤外蛍光色素を Akaluc の発光エネルギーのアクセプタとして用いる化学遺伝学的アプローチを検討する。細胞内の生体分子活性に応答するタンパク質相互作用によって、近赤外蛍光色素と共有結合したタグタンパク質が Akaluc と空間的に近接した結果、BRET が誘導されて発光波長が変化する。さらにこの時、センサ分子が細胞内で可逆的に高密度集合する相転移体形成機構を組み合わせ、BRET 効率を最大化する。センサ分子は、ウィルスベクターによってマウスの心臓、脳、筋肉に遺伝子導入し、生体内でタグタンパク質標識が飽和する、十分な量の近赤外蛍光色素を投与する。

【結果】 化学遺伝学的アプローチに基づいた近赤外 BRET センサの設計を、Akaluc と類似したタンパク質構造をもつホタルルシフェラーゼ (Fluc)、タグタンパク質、シリコンローダミン系近赤外蛍光色素 (SiR) を組み合わせることで検討した。その結果、Fluc の C 末端に融合した Halotag と SiR650 を組み合わせることで、非常に高効率に BRET を誘導可能であることが明らかになった。一方で、SNAP tag を用いると Halotag ほどの BRET 効率は得られず、近赤外蛍光タンパク質を用いた時には、BRET はほぼ誘導されなかった。さらに、Halotag を用いた BRET システムをタンパク質相互作用型のセンサ分子に適用可能か検討したところ、p53 と MDM2 のタンパク質相互作用を高感度に検出可能であった。この p53-MDM2 のタンパク質相互作用系に、液液相分離を介した分子凝縮体形成機構を組み合わせることで、BRET 効率はさらに向上することが明らかになった。そして、Fluc より長波超な発光スペクトルを生成する Akaluc-Halotag システムには SiR680 がアクセプタ分子として適していることを見出した。

化学遺伝学的手法による自由行動動物の深部臓器における生体分子イベントの近赤外生物発光イメージング

