



Title	マルチカラー高光度発光タンパク質の開発と生命科学研究への応用
Author(s)	鈴木, 和志
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61783
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士学位論文

マルチカラー高光度発光タンパク質の開発と
生命科学研究への応用

鈴木和志

2017年1月

大阪大学大学院工学研究科

目次

序論：蛍光イメージング技術の問題点

一章：高光度化学発光タンパク質波長変異体の開発

1.1 背景.....	4
1.1.1 生物発光（化学発光）	4
1.1.2 生物発光共鳴エネルギー移動	5
1.1.3 化学発光タンパク質の高輝度・多色化のこころみ	7
1.1.4 ルシフェラーゼの試験管内分子進化法	7
1.1.5 蛍光タンパク質と化学発光タンパク質のハイブリッド	9
1.2 目的・意義.....	12
1.3 方法と材料.....	17
1.4 実験結果と考察.....	23
1.4.1 ドナーとアクセプターの順列が FRET 効率に与える影響の検討.....	23
1.4.2 ドナーとアクセプターの間の欠失変異が FRET 効率に与える影響の検討	24
1.4.3 ドナーとアクセプターの間のランダムアミノ酸変異導入が FRET 効率に与える影響の検討	26
1.4.4 ルシフェラーゼ内部への蛍光タンパク質挿入変異の試み	32
1.4.4.1 発光基質結合サイトに近接するループ領域の探索	33
1.4.4.2 橙色蛍光タンパク質の挿入変異.....	34
1.5 展望.....	36

二章：高光度化学発光タンパク質波長変異体の特性評価

2.1 背景	37
2.2 目的・意義.....	37
2.3 方法と材料.....	37
2.4 実験結果と考察.....	44
2.4.1 高光度化学発光タンパク質の発光特性の評価	44
2.4.2 FRET による発光増強メカニズムの探求	45
2.4.3 単分子からの化学発光観察.....	48
2.4.4 各種細胞内構造物への局在能の評価	50
2.4.5 マルチカラー発光画像取得.....	57
2.5 展望.....	61

三章：ルシフェラーゼ再構成法による機能性指示薬の開発

3.1 背景.....	62
3.1.1 単一タンパク質に基づく化学発光性機能性指示薬	62
3.1.2 FRETに基づく発光性機能性指示薬	63
3.2 目的・意義.....	65
3.3 方法と材料.....	67
3.4 実験結果と考察.....	72
3.4.1 ルシフェラーゼ再構成法のための最適な分割サイトの探索.....	72
3.4.2 化学発光性 Ca^{2+} 指示薬 GeNL(Ca^{2+})の試験管内分子進化	75
3.4.3 Ca^{2+} 親和性変異体の作成	77
3.5 展望.....	77

四章：化学発光性カルシウムイオン指示薬の物性評価

4.1 背景.....	78
4.2 目的・意義.....	78
4.3 方法と材料.....	78
4.4 実験結果と考察.....	84
4.4.1 Ca^{2+} 指示薬の <i>in vitro</i> 評価.....	84
4.4.2 哺乳類細胞の高速 Ca^{2+} イメージング	86
4.4.3 蛍光性 Ca^{2+} 指示薬との比較実験.....	87
4.4.4 iPS 細胞由来心筋細胞の高速 Ca^{2+} イメージング	90
4.5 展望.....	92

五章：結論

謝辞

参考文献

略語集

AAV	Adeno Associated Virus
ATP	Adenosine TriPhosphate
cAMP	3',5'-cyclic Adenosine MonoPhosphate
CaM	Calmodulin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
EGTA	Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
EM-CCD	Electron Multiplying-Charge Coupled Device
EPAC	Exchange Protein directly Activated by cAMP
EtOH	Ethanol
FAD	Flavin Adenine Dinucleotide
FBS	Fetal Bovine Serum
FRET	Förster Resonance Energy Transfer
GFP	Green Fluorescent Protein
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEPES	4-(2-HydroxyEthyl)-1-PiperazineEthaneSulfonic acid
hERG	human Ether-a-go-go Related Gene
HS	Horse Serum
iPS	induced Pluripotent Stem
LB	Luria Bertani
MOPS	3-Morpholinopropanesulfonic acid
NADP	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
Ni-NTA	Nickel-NitriloTriacetic Acid
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
QY	Quantum Yield
RFP	Red Fluorescent Protein

序論：蛍光イメージング技術の問題点

分子イメージングとは、試料の生化学的特徴を観察対象が生きている状態で非侵襲的に可視化する手法である。様々な分子イメージング技術の中でも、光を出力とする光学イメージングは空間分解能が高く、複数の対象を同時計測するマルチチャンネル計測が可能であるため、生命科学研究には欠かすことのできないツールになっている。生命科学研究に用いられている光学イメージングは、主に蛍光法と生物発光法である¹。それぞれの特徴を表に示した。

表 蛍光と生物発光イメージングの特徴

手法	入力	出力	解像度		深度	マルチ チャンネル	プローブ	光遺伝学 との併用
			空間	時間				
蛍光	励起光	発光	~ 1 μm	< 1秒	< 400-800 μm	Yes	蛍光タンパク質 低分子蛍光色素 半導体ナノ粒子 金属錯体	No
生物発光	発光基質	発光	~ 1 μm*	分	cm	Yes	ルシフェラーゼ	Yes

*xy 平面の空間解像度

蛍光イメージング

蛍光イメージングでは、光（励起光）を照射することでプローブが励起され、励起光より長波長の発光（蛍光）が生じることを活用し、試料を可視化する。蛍光法は、非常に高い時・空間分解能で観察可能であり、また蛍光波長の異なるプローブを用いることでマルチチャンネル計測が可能である。これまで、蛍光タンパク質、低分子蛍光色素、半導体ナノ粒子、金属錯体などをプラットフォームとして、様々な生体分子に対する蛍光プローブが報告され、生命科学研究に応用されてきた²。

しかしながら、蛍光を観察するために必要な励起光が、生体試料を観察するに当たり、様々な問題を引き起こす。一つ目の問題点は、自家蛍光および散乱による計測バックグラウンドの増加である。どんな生体試料にも NADP や FAD などの蛍光性生体分子が存在し、これらが青や緑の蛍光を発するため、観察したい蛍光シグナルが弱いときは、そのシグナルを覆い隠

してしまい観察が困難になる。植物ではクロロフィルをはじめとする多くの色素が細胞内に存在し、強いバックグラウンド蛍光を発してしまうため、波長によっては外来から導入した蛍光の観察が出来ない。哺乳類の培養細胞を 480nm の光で励起したときに発せられる自家蛍光強度は、細胞内で GFP が 1 μM の濃度で発現した時に発する蛍光に匹敵するという報告がある³。これを細胞の面積あたりの分子の個数に換算に変換すると、1μm²あたり 1800 個の GFP 分子に相当する自家蛍光成分が細胞には存在することになる⁴。従って、1μm²あたり 1800 個より著しく少ない個数しか発現していないタンパク質を GFP でラベルし蛍光観察することは難しい。一般的に強力なプロモーターでタンパク質を発現させると数十μM の濃度で発現するので、外来性 GFP 融合タンパク質の観察することに問題はない。しかしながら、内在性のタンパク質でここまで強力に発現しているものは少なく、大腸菌ではおよそ半数の遺伝子が 10 個／細胞以下の発現レベル (2 nM 以下) であると報告されている⁵。また、経験的に組織中の自家蛍光成分は培養細胞の自家蛍光成分より強く、GFP 蛍光観察時のシグナルとノイズの比率(S/N)は 10 倍低くなると言われている⁶。

二つ目の問題点は、励起光が観察対象の状態に摂動を与えることである。例えば、植物に光を照射すると光合成が起こるように、光に対して感受性がある細胞が存在し、そのような細胞では蛍光観察における励起光照射は細胞内環境を変化させてしまう恐れがある。また、光に対して特に感受性の無い細胞でも、強い光を照射すると細胞内の色素分子による光増感反応で活性酸素が産生され細胞毒性を示す。また、近年光によって活性化されるタンパク分子を遺伝学的手法を用いて特定の細胞に発現させ、その機能を光で操作する光遺伝学（オプトジェネティクス）が開発され広く汎用されている⁷。しかしながら、光遺伝学で細胞活動に摂動を与えるながら、蛍光イメージングを行う際には、蛍光励起光により光遺伝学ツールが恒常的に活性化されてしまうことが問題になっている。

生物発光イメージング

生物発光イメージングでは、ルシフェラーゼと呼ばれる生物発光タンパク質が発光基質を

代謝する際に生じる化学エネルギーでプローブ分子が励起され、発光（生物発光）が生じることを活用し、試料を可視化する。生物発光法は、蛍光法と同様に高い空間分解能、マルチチャンネル計測可能という特長を有している。加えて、外部からの光照射を必要としないため、自家蛍光による計測バックグラウンドの影響を受けず生体深部からのシグナルが検出可能、光遺伝学ツールとの併用が可能という利点がある。しかしながら、得られるシグナルが弱く時間分解能が低いという欠点があった。従って、これまで生物発光の応用は、麻酔された動物個体中・臓器の癌増殖・転移の研究などに限定され、高速な生命現象の観察には用いられてこなかった。

本研究の位置付け

これまで細胞および組織レベルの生命科学研究には蛍光が広く用いられてきたが、上述したように蛍光イメージングは光毒性、自家蛍光による計測バックグラウンドの問題を潜在的に抱えている。対して、生物発光イメージングでは本質的に光毒性、自家蛍光による計測バックグラウンドの問題を回避することができる。そのため、生物発光タンパク質の明るさを向上させ、時間分解能を高めることができれば、細胞および組織レベルにおいても生物発光が蛍光に代わる手法になることが期待される。また、シグナルの増強は動物個体中・臓器レベルの研究にとっても有用であり、生物発光を細胞レベルから動物個体レベルまで幅広く有用なマルチモーダルな手法に押し上げることが期待される。

これを実現するために私は、酵素活性の高いルシフェラーゼと5種類の異なる蛍光タンパク質をハイブリッド化することにより、シグナルの増強およびマルチチャンネル計測を促進する高光度生物発光タンパク質波長変異体の開発を行った。

一章：高光度化学発光タンパク質波長変異体の開発

1.1 背景

1.1.1 生物発光（化学発光）

生物発光とは、生物が光を生成し放射する現象である。化学的エネルギーを光エネルギーに変換する化学反応の結果として発生する化学発光のうち生物によるものを指す。

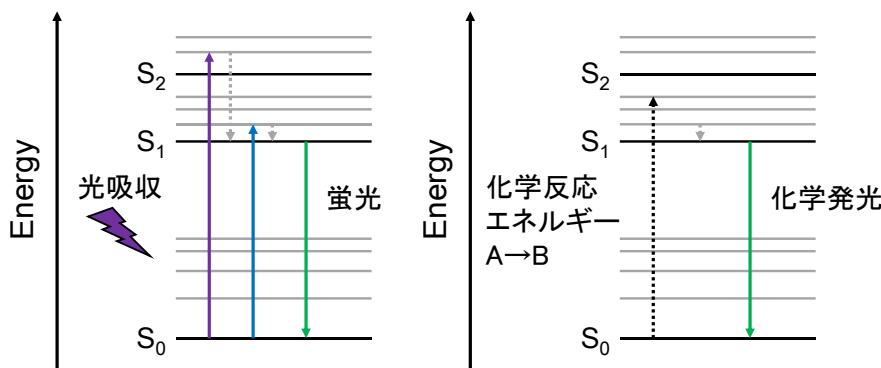


図 1-1 蛍光、化学発光過程のジャブロンスキーダイアグラム

生物（化学）発光タンパク質の説明に入る前に、蛍光と比較しながら生物（化学）発光の光化学的な考え方を概説する。蛍光とは、励起一重項状態にある分子からの光の放射現象のことである。このプロセスは、ジャブロンスキーダイアグラムで示される（図 1-1 左）。光の吸収により、分子は基底状態 S_0 から第一または第二電子励起状態 (S_1 or S_2) の高位の振動準位に遷移する。その後、即座に S_1 の最も低い振動準位に緩和する。続いて、分子は光子を放出することで基底状態に戻るか、もしくは熱としてエネルギーを散逸させることで基底状態に戻る。それぞれ、放射失活過程、無放射失活過程と呼ばれる。対して、生物（化学）発光では、化学反応のエネルギーによって分子は S_0 から S_1 の高位の振動準位に遷移する（図 1-1 右）。その後の過程は蛍光と同一の過程を経て、分子は光子を放出することで基底状態に戻るか、もしくは熱としてエネルギーを散逸させることで基底状態に戻る。このとき放出される発光を生物（化学）発光と呼ばれている。蛍光、化学発光いずれにおいても、励起された分子の内、どれくらいの割合で放射失活過程を起こすかを量子効率(Quantum yield. QY)と呼ぶ。この QY と酵素の基質代謝速度 k_{cat} (s^{-1})の積が、単位時間当たりに一つの酵素が放出することができる光子の数となり、化学発光タンパク質の明るさを規定する。

これまでに多くの発光生物が研究され、化学的な発光機構が明らかになってきた⁸。現在までに同定されている生物発光反応のすべては酸化反応であり、この反応を触媒する酵素がルシフェラーゼ、反応基質がルシフェリンと呼ばれている。ルシフェリンはすべての発光生物で共通ではなく、生物グループごとに構造はまったく異なっている。一方、ルシフェラーゼも多くの発光生物でクローニングされている⁹。ルシフェラーゼによるルシフェリンの基質認識は厳密であり、本来の基質ではないルシフェリンを反応させること（クロスリアクション）はできない。海洋性の発光生物は分類学的に広い範囲でセレンテラジン(coelenterazine)を発光基質とするものが多い。セレンテラジンを発光基質とする生物発光反応式を図1-2に示した¹⁰。セレンテラジンは、分子酸素により酸化反応を受け分解し、励起状態の基質酸化物セレンテラミド(coelenteramide)が生じる。そして、このセレンテラミドが基底状態に戻る際に発光を伴うのである。したがって、実際に S₁ から放射失活しているのはセレンテラジンではなく、セレンテラミドである。

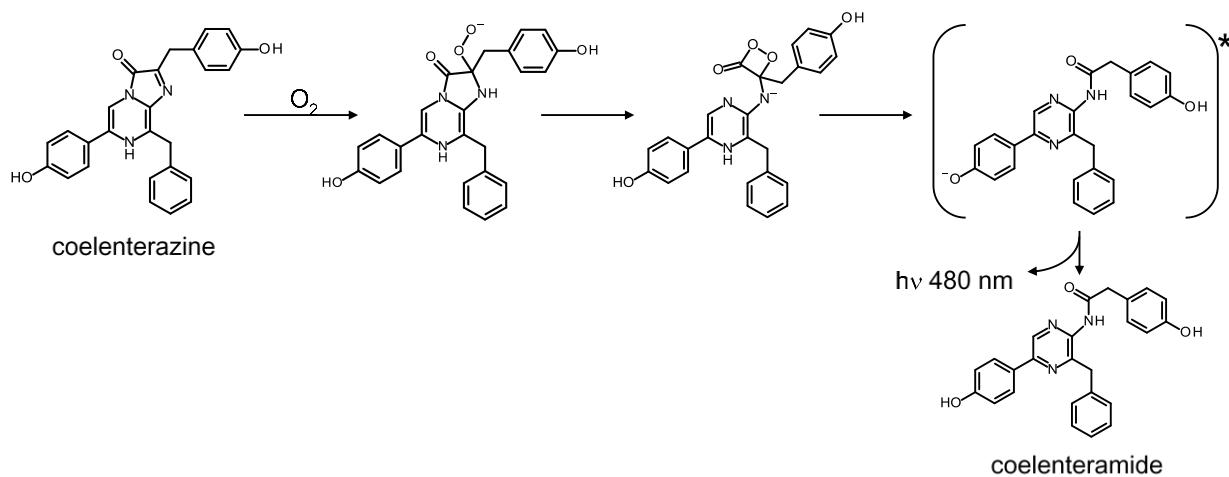


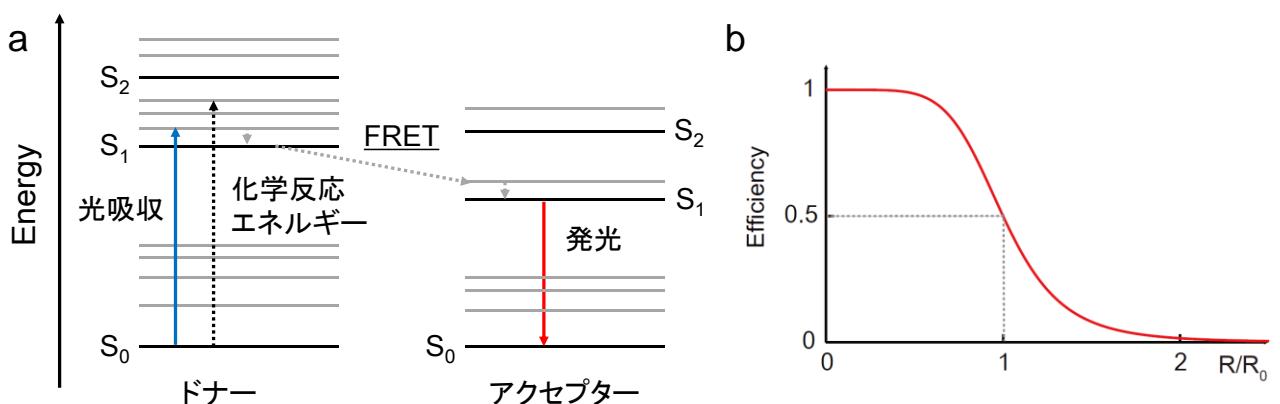
図 1-2 セレンテラジン発光基質の生物発光反応過程

1.1.2 生物発光共鳴エネルギー移動

ホタル、ウミホタルなどではルシフェリン＝ルシフェラーゼ反応 (L-L 反応)のみで光子が発生する。すなわち、基質酸化物が発光性のクロモフォアを有しているため、L-L 反応のみで放射失活すなわち光子の放出まで完了する。しかし、L-L 反応のみで発光が完結しない生

物も少なくない。その代表例がウミシイタケの一種である *Renilla Reinforms* である。ウミシイタケの生物発光反応では、基質酸化物はシアン色発光色を持つ。しかし、生きた *Renilla Reinforms* の発光色は黄緑色であり発光色が異なる。この波長シフトは、フェルスター共鳴エネルギー移動 (Förster resonance energy transfer, FRET)に基づいている。以下に FRET および *Renilla Reinforms* 内で起きている現象を説明する

FRET は近接した二つの発色団の間でエネルギーが、電子の共鳴により無放射的に移動する現象である (図 1-3a)¹¹。このため、一方の分子 (ドナー) で励起された光のエネルギーによって他方の分子 (アクセプター) が励起され、アクセプターが発光性の場合は発光が放出される。生物発光タンパク質から蛍光タンパク質へ FRET を起こすことを特に Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) と呼ぶ。



FRET 効率 E は、ドナーとアクセプターの距離 r の 6 乗に反比例する(図 1-3b)。

$$E = \frac{1}{1 + (r/R_0)^6}$$

ここで R_0 はフェルスター距離と呼ばれ、エネルギー移動効率が 50% となるドナーとアクセプターの距離である。これが遠ければ遠いほど、FRET を起こしやすいペアという事になる。

$$R_0 = 0.2108[\kappa^2\Phi_0 n^{-4}J]^{1/6}$$

フェルスター距離は上記の式から計算され、 Φ_0 はアクセプターが無い場合のドナーの量子収率、 κ^2 は配向因子、 n は媒体の屈折率、 J はドナーの発光スペクトルとアクセプターの吸

収スペクトルの重なり積分である。

Renilla Reinforms 中では、発光タンパク質と緑色蛍光発色団を持つ GFP が二量体を形成し近接するため、基質酸化物から GFP へ FRET が起こり、励起状態の GFP からの放射失活によって生物発光が起こっている。この時のエネルギー移動効率はほぼ 100% であるため、発光波長が長波長シフトし緑色の生物発光が観測される。また、生物発光タンパク質 (QY 0.053) よりも蛍光タンパク質 (QY 0.30) の方が量子効率が高いために、発光強度が 5.7 倍に増強されることが報告されている¹²。

本論文では、化学エネルギーを利用した発光現象であることを強調するために、狭義の意味で生物発光であっても、化学発光と記載することとする。

1.1.3 化学発光タンパク質の高輝度・多色化のこころみ

10 年前までは化学発光の応用は、麻酔された動物個体中の癌増殖・転移の研究などに限定されていた。しかしながら、ここ 10 年で化学発光タンパク質の研究は大きく飛躍し、天然から発見されたルシフェラーゼの高輝度化や多色化が図られ、蛍光タンパク質に代わる有望なイメージングツールとして見なされるようになってきた。以下でその試みを紹介する。

1.1.4 ルシフェラーゼの試験管内分子進化法

ウミシイタケルシフェラーゼ *Renilla Luciferase* (RLuc) は、ウミシイタケの一種 *Renilla reinforms* から同定された 36kDa の単量体タンパク質である。その酵素活性には翻訳後修飾を必要せず、細胞内の Mg²⁺ や ATP に発光反応が依存しないという望ましい特性を有している。RLuc および安定性を高めた変異体 RLuc8 (文献¹³) は、特にホタルルシフェラーゼと組み合わせたデュアルレポーター アッセイに汎用されている。しかし、RLuc の発光極大波長は 481nm であり、生体透過性が低く小動物個体のイメージングは制限されていた。そこで、Andreas Markus Loening らは、RLuc の活性ポケット内のアミノ酸に対してランダム変異を導入することで、547nm に発光極大波長を有する変異体 RLuc8.6_547、RLuc8 に対して 6 倍の酵素活性を有し 535nm に発光極大波長を有する RLuc8.6_535 を開発した (図 1-4)¹⁴。

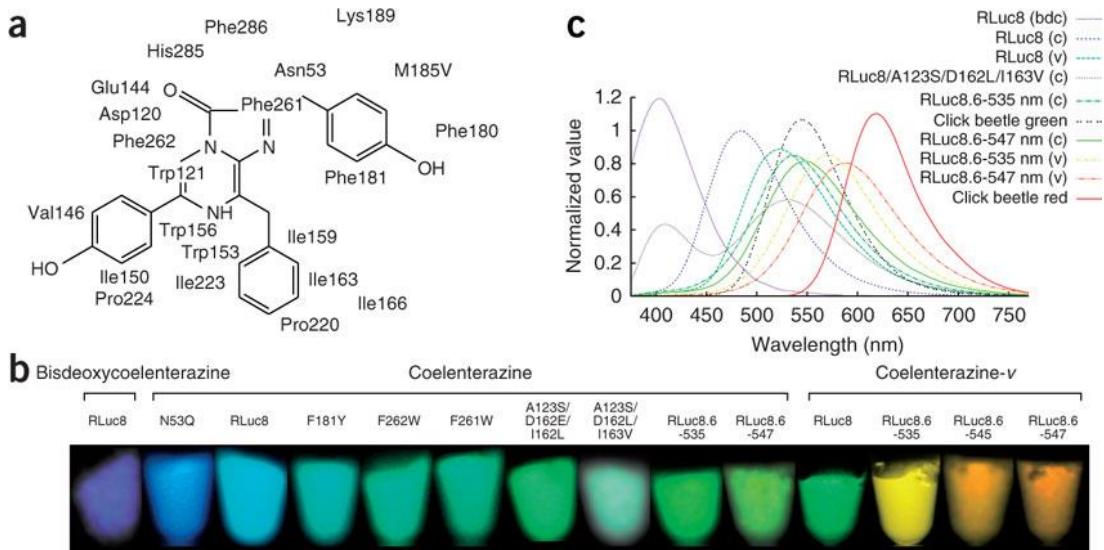


図 1-4 RLuc8 長波長変異体

(a) 活性ポケット内のセレンテラジンおよび周辺のアミノ酸残基、(b)RLuc8 波長変異体の化学発光、(c) RLuc8 長波長変異体の発光スペクトル [文献¹⁴から引用]

この長波長シフトは、励起状態の発光基質の化学構造の違いにより説明される（図 1-5）。オリジナル RLuc8においては、セレンテラジンが酸化反応を受け分解されたセレンテラミドは、左の化学種(Phenolate Anion)の励起状態となる、そして基底状態に戻る際に480-490nm の発光を生じる。対して、RLuc8.6_547、RLuc8.6_535 では活性ポケット内の化学環境が変化し、励起状態のセレンテラミドは右の化学種（Pyrazine Anion）の励起状態をとる。Pyrazine Anion 体は、Phenolate Anion よりもπ共役系が拡張されており、基底状態に戻る際に長波長に発光すると考察されている。

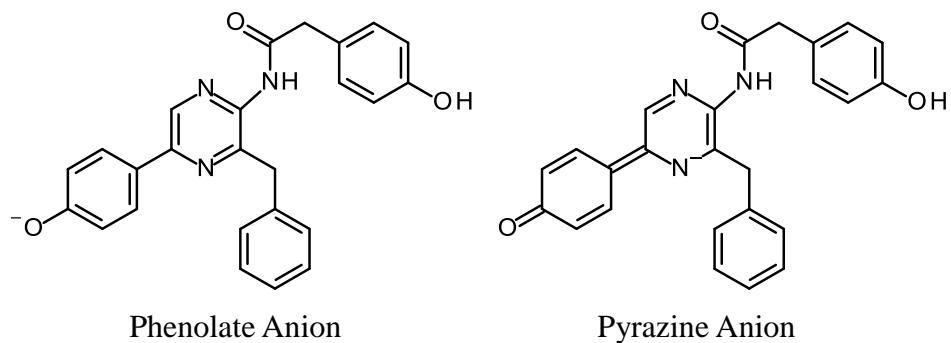


図 1-5 発光基質酸化物セレンテラミドの励起状態

また、トゲオキヒオドシエビ (*Oplophorus gracilirostris*) 由来のルンフェラーゼ OLuc を試験管内分子進化法を用いて改変し、分子量の小さな(19 kDa)発光タンパク質 NanoLuc (NLuc) が開発された¹⁵。NLuc は RLuc の半分の分子量でありながら約 150 倍明るく、pH や熱、変性などへの安定性が非常に高い (図 1-6)。NLuc は、発光基質として人工的に合成されたフリマジン(Furimazine)を用いることで、最適な性能を発揮する。

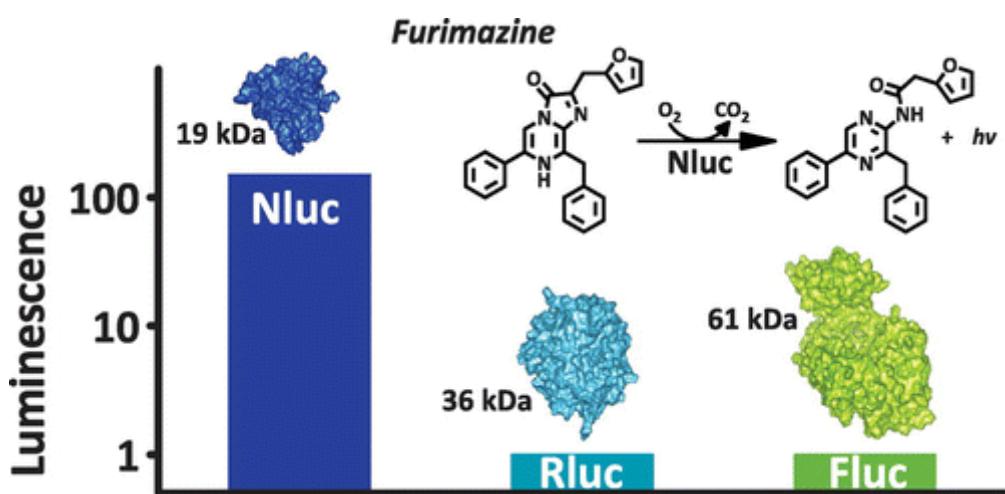


図 1-6 NLuc、RLuc、FLuc の発光強度比較 [文献¹⁵から引用]

非常に明るい NLuc は、これまで不可能であった細胞小器官レベルのイメージングを可能にした一方で、発光波長は 460nm であり RLuc8 と同様に、小動物個体でのイメージングは制限されている。その望ましくない波長特性のため、分子レベルでの明るさはホタルルシフェラーゼの 150 倍であるにも関わらず、小動物の深部からのイメージングにおいては、シグナル強度が劣ることが示されている¹⁶。そこで、NLuc の高い酵素活性を維持しつつ発光波長が長波長シフトした変異体の開発が求められている。

1.1.5 蛍光タンパク質と化学発光タンパク質のハイブリッド

RLuc の QY (0.053) は、ホタルルシフェラーゼ (QY 0.41) などと比較すると低い。K. Saito らは、RLuc8 の QY を増加させることができが高輝度化に寄与すると仮説を立てた。1.1.2 で述べ

た *Renilla reniformis* 内で起こっている FRET による発光増強効果を人工的に再現し、RLuc 類縁体と蛍光タンパク質を融合した超高輝度化学発光タンパク質 Yellow-Nano-lantern (YNL) を開発した¹⁷。YNL は、525 nm にピーク発光波長がシフトした上、RLuc よりも 10 倍以上の明るさを示した（図 1-7）。YNL を用いることで、単一細胞レベルで細胞内小器官を可視化し、また自由行動下における有毛マウス体内の癌組織の実時間検出が可能になった。

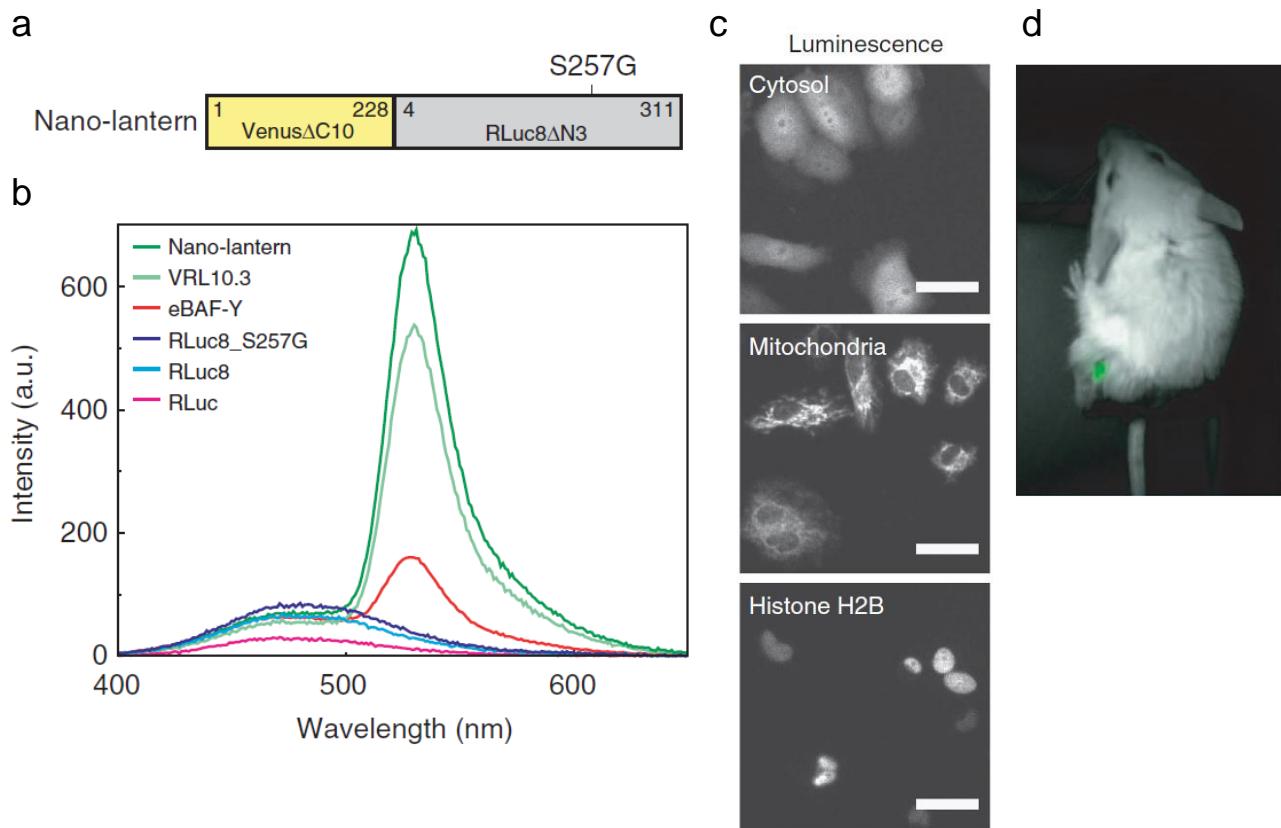


図 1-7 Yellow-Nano-lantern (YNL)

(a)YNL のドメイン構造、右上の数字は各ドメインのアミノ酸番号、(b)YNL と他の化学発光タンパク質 (RLuc、RLuc8、RLuc8_S257G、eBAF-Y、VRL10.3) の発光スペクトルの比較、(c)YNL の発光シグナルによる細胞および細胞小器官の観察、(d)自由行動している小動物の個体内の癌の検出 [文献¹⁷から引用]

さらに、融合する蛍光タンパク質を変えることで、シアン色、オレンジ色の変異体を作ることにも成功した（図 1-8a、b）¹⁸。3 色の変異体を用いることで、細胞内の微細な構造の動態や遺伝子の発現を複数同時に計測することが可能となり、ES 細胞の万能性維持に重要な

3つの遺伝子の発現の様子を同時に観察することに成功した(図1-8c)。

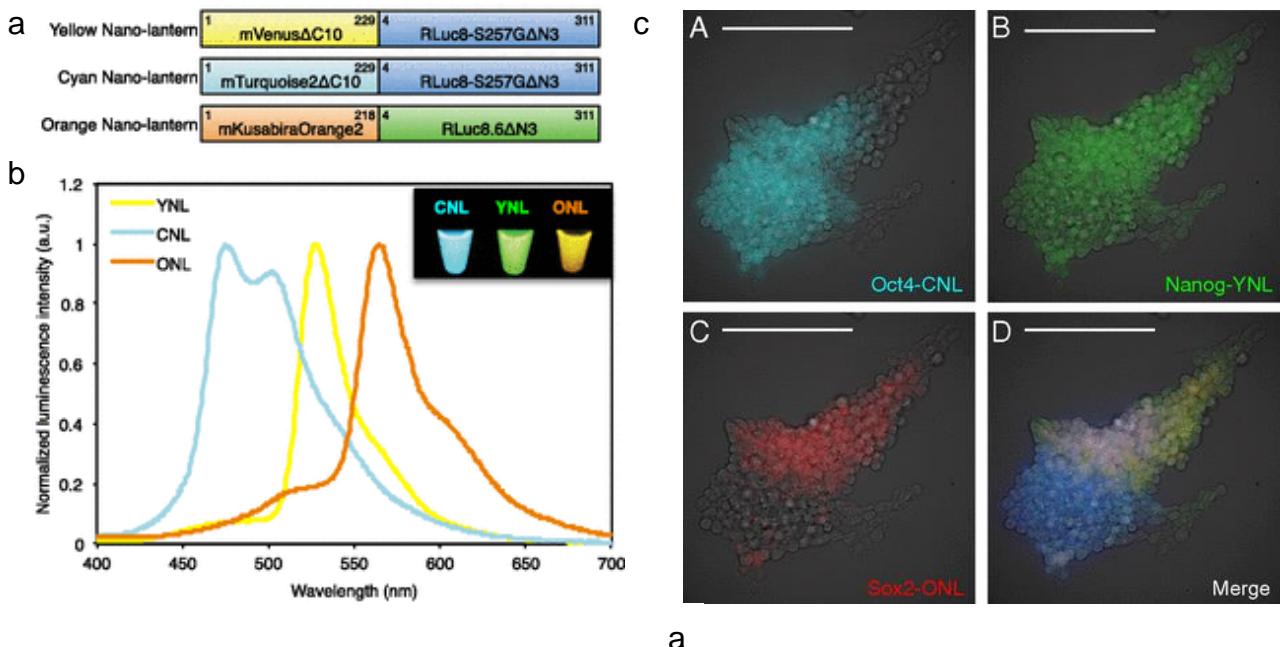


図1-8 Nano-lanternシリーズによるYellow-Nano-lantern(YNL)

(a) Nano-lanternシリーズのドメイン構造、右上の数字は各ドメインのアミノ酸番号、(b) Nano-lanternシリーズ(YNL、CNL、ONL)の発光スペクトル、(c) ES細胞中の万能性維持に重要な三つの遺伝子発現の可視化 [文献¹⁸から引用]

Nano-lanternによる一連の研究で、蛍光タンパク質とのハイブリッドがルシフェラーゼの発光波長をシフトさせ、高輝度化させる有力な手法となることが示唆された。

1.2 目的・意義

化学発光を用いたバイオイメージング技術は、蛍光タンパク質では不可避な強い励起光を一切必要としない。したがって、細胞・組織からの自家蛍光や光散乱による計測ノイズの影響が低く、バックグラウドが低くなる。また、励起光を必要しない特性は、観察対象へ与える光毒性も低くなり、特に光に対して感受性の高い生物種のイメージングに有効であると報告されている¹⁹。従って、蛍光イメージングに対して潜在的な優位性を有していると言える。近年の精力的な研究により、NLuc のような細胞小器官レベルのイメージングが可能な高光度化学発光タンパク質が開発された。しかしながら、十分な高光度と豊富な波長変異体の両方を兼ね備えた化学発光タンパク質ファミリーは未だ報告されていない。高光度化学発光タンパク質の波長変異体は、複数のタンパク質動態、生命現象を同時に可視化することを可能にするために、生命科学研究への幅広い応用は期待される。

そこで、本研究では、可視光全域におよぶ高光度化学発光タンパク質の波長変異体を創生することを目的とした。

設計指針

1.1.4 で紹介した NLuc は、以下に示したようにプローブとして望ましい特性を有している。

1. 酵素活性には翻訳後修飾を必要せず、細胞内の Mg^{2+} や ATP に発光反応が依存しない
2. pH や熱、変性などへの安定性が非常に高い
3. RLuc と比較して、約 150 倍明るい。
4. 分泌性ではなく細胞内に安定に発現できるルシフェラーゼの中で最も分子量が小さく、特にタグとして望ましい。

そこで、高光度化学発光タンパク質の波長変異体を創生するにあたり、NLuc の発光波長を長波長域に拡張する戦略が有効であると考えた。

NLuc とフリマジンの発光系を長波長シフトさせるストラテジーとして、1.1.4 に示したように NLuc の活性ポケットに変異を導入し、励起状態の基質酸化物の化学状態を変化させる

ことが考えられる。NLuc とフリマジンの発光反応において、励起状態の基質酸化物は以下のような Amide Anion 体（図 1-9）を取っていると考えられる。フリマジンの化学構造から明らかなようにフリマジンの基質酸化物は長波長発光する Pyrazine Anion 体を取ることができない。従って、NLuc の発光波長変異体の開発に、この手法は有効とは言えない。

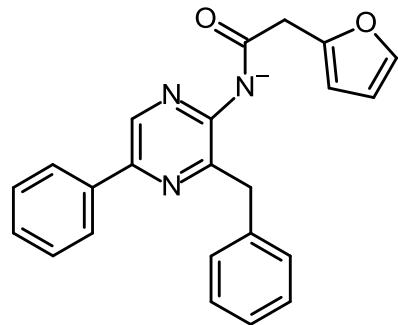


図 1-9 フリマジン酸化生成物の化学構造 Amide Anion

別のアプローチ法として、1.1.5 で示したように蛍光タンパク質との FRET を用いて、NLuc の発光波長を長波長シフトさせることが考えられる。NLuc から蛍光タンパク質へ効率よく FRET がおき、アクセプター蛍光タンパク質から発光が放出されることで、NLuc の波長変異体として働く。さらに、蛍光タンパク質の QY が NLuc の QY を上回れば、発光強度の増強も期待できる。

そこで、本研究ではアクセプターとして様々な蛍光波長を有する蛍光タンパク質、ドナーとして NLuc を結合させた融合タンパク質を設計した。その設計指針を以下に示す。

アクセプター蛍光タンパク質として、シアン色蛍光タンパク質 mTurquoise²⁰、緑色蛍光タンパク質 mNeonGreen²¹、黄色蛍光タンパク質 Venus²²、オレンジ色蛍光タンパク質 mKOr²³、赤色蛍光タンパク質 tdTomato²⁴ を選択した。発光増強を期待して、各波長域において最も蛍光量子効率の高い蛍光タンパク質という基準に基づいて選択した（表 1-1 参照）²⁵。

波長変異体を創生するには、高い FRET 効率を実現し主にアクセプターから発光を起こさせる必要がある。1.1.2 に示したように FRET 効率は、ドナーとアクセプターの距離、相対的な角度、そしてドナーの発光スペクトルとアクセプターの吸収スペクトルの重なり積分に大

きく依存する。NLuc と蛍光タンパク質の配向因子 κ を2/3と仮定して、下の表 2-1 に NLuc と蛍光タンパク質のフェルスター距離を計算したものを表 1-1 に示した。

表 1-1 NLuc と種々の蛍光タンパク質の光化学特性

ドナー	発光波長 (nm)	アクセプター 蛍光タンパク質	吸収波長 (nm)	モル吸光係数	蛍光波長 (nm)	フェルスター距離(nm)	量子収率
NLuc	460	mTurquoise2	434	31,000	473	3.9	0.92
		mNeonGreen	504	116,000	517	ND	0.80
		Venus	515	126,000	526	4.5	0.65
		mKO κ	551	105,000	565	4.0	0.61
		tdTomato	555	92,000	581	4.2	0.55

NLuc と種々の蛍光タンパク質のフェルスター距離は、最も大きい Venus-NLuc ペアでも 4.5 nm であり、その他は 4.0 nm 前後の低い値になった。効率的に FRET を起こすにはドナーとアクセプターの距離を 4.0 nm 以下に近づける必要がある。しかし、蛍光タンパク質の発色団は直径 3nm の β -バレルに囲まれており、単純に NLuc と蛍光タンパク質を融合しただけでは効率的な FRET は達成することは困難であると予想される。これを克服するには、ドナーとアクセプターの間の距離を近づけ、さらにドナーとアクセプターを FRET の起こりやすい平行な配向に配置することが必要である。しかしながら、距離を近接させるために蛍光タンパク質と NLuc の間の領域を過剰に欠失させるとタンパク質のフォールディングを損ない、蛍光特性、酵素活性を損なう可能性がある。また、タンパク質間の相対的な角度を理論的に予測し、これを任意の配置に置くことは困難である。以上をふまえ、本研究では蛍光タンパク質と NLuc の中間領域にランダム変異を導入したライブリーを作成し、これをハイスループットにスクリーニングすることで、酵素活性や光化学特性を失うことなく FRET 効率の高い変異体を同定することを試みた。

また、単純な並列な融合で十分な FRET 効率が達成できない場合は NLuc 内への蛍光タンパク質の挿入も行う。NLuc の活性ポケットの近傍に蛍光タンパク質を挿入することで、蛍光発色団と基質の距離を縮め FRET 効率を高めることを狙う。そのために、まず活性ポケッ

トに近い NLuc のループ領域の探索を行う。そして、同定されたサイトに蛍光タンパク質を挿入する。

ここで、FRET 効率の評価のために用語を定義する。発光基質添加時に得られる発光スペクトルにおいて、アクセプターに由来する発光ピーク波長(mNeonGreen: 515 nm, Venus: 525 nm, mKO_K: 565 nm, tdTomato: 585 nm)の発光強度を、 NLuc に由来する 450nm の発光強度で割った比率、FRET レシオ値を持って FRET 効率の程度を評価する。

スクリーニングは、次の工程に従って行った（図 1-10）。

- 1) 変異体ライブラリーをバクテリアに発現させコロニーを形成させる。発光基質を添加条件下でより明るく光るコロニーをピックアップすることで、発光強度の大きい変異体（100 個以内）を選択する。
- 2) 選択した変異体をマルチウェルプレートで培養し、マイクロプレートリーダーで発光基質を添加し発光スペクトルを測定、FRET レシオ値が大きい変異体をピックアップする。これにより、 NLuc からアクセプター蛍光タンパク質に効率的に FRET を起こす変異体を選択した。

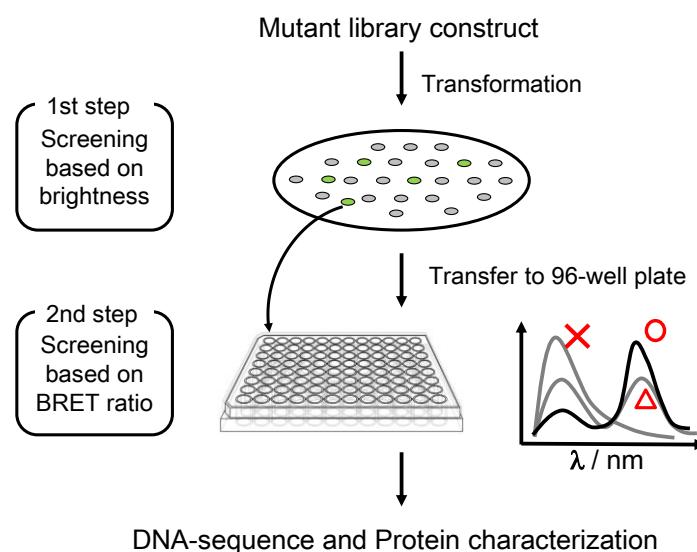


図 1-10 高光度、高 FRET 効率な変異体スクリーニングのスキーム

次に、得られた変異体ライブラリーに対して、何個のコロニーをスクリーニングすれば良いのか、について考察する。V 個の変異体を含むライブラリーを仮定し、それぞれの変異体が選ばれる確率は全て等しく、ポアソン分布に従うと仮定する²⁶。次の式は、ライブラリーのサイズ V、網羅率 P_i とスクリーニングした形質転換体の数 T の関係を表すものである。

$$T = -V \ln(1 - P_i)$$

そして、左右の項を V で割り、 T/V はオーバーサンプリング係数 Q_f と定義する。 Q_f は、 P_i を達成するために、V の何倍の形質転換体をスクリーニングする必要があるかの指標である。

$$Q_f = T/V = -\ln(1 - P_i)$$

図 1-11 に、 Q_f と P_i の関係を図示した。図から 95% の網羅率を達成するために、ライブラリー サイズの 3 倍の形質転換体をスクリーニングする必要があることを示している。

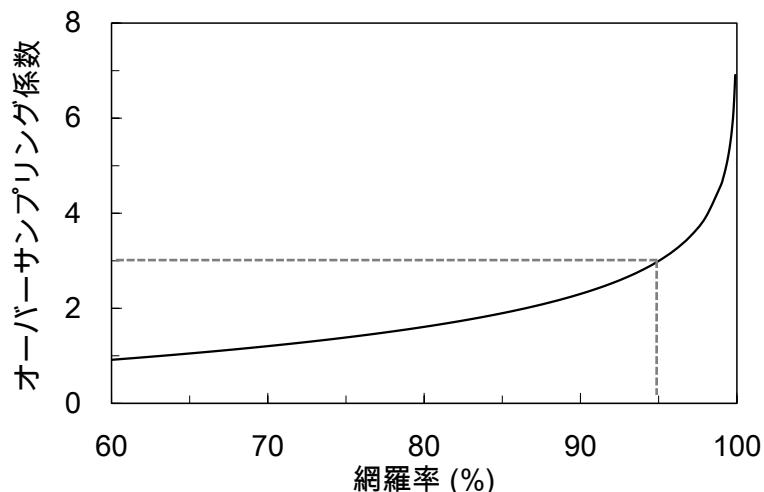


図 1-11 変異体ライブラリーの網羅率とオーバーサンプリング係数の関係

以上の考察を踏まえて、本研究ではライブラリーの 95% の変異体を網羅するために、生じるライブラリーサイズの 3 倍以上の形質転換体すなわちコロニーをスクリーニングすることとした。

1.3 方法と材料

本研究で用いたオリゴヌクレオチド DNA は、全て北海道システムサイエンスから購入されたものである。制限酵素は、New England Biolabs もしくは Takara-bio から購入し、添付のプロトコールに従って、使用した。すべての DNA 配列は、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit (Life Technologies)を用いて決定した。発光基質セレンテラジン-h は、和光純薬から購入した。発光基質フリマジンは、報告されているプロトコールに従って合成した¹⁵。全てのオリゴヌクレオチド DNA の配列を、ページ 98 付録表に示した。

変異導入を伴わない PCR、サブクローニング

変異の導入を伴わない PCR による DNA 増幅、制限酵素処理、プラスミドベクターとのライゲーションは以下の手順に従って行った。

PCR は、DNA ポリメラーゼ KOD-Plus(Toyobo Life Science)を使用し、説明書の手順に従つて行った。PCR 溶液の組成は、2 ng/μL の鑄型 DNA 2 μL、3 μM のフォワード及びリバースのプライマーを各 2.0 μL、10×KOD-plus buffer を 4 μL、2 mM dNTP mixture 4 μL、25 mM MgSO₄ 1.6 μL、超純水 24 μL を混合し、1 U/ μL の KOD-plus を 0.4 μL 加えた(合計 40 μL)。PCR サイクルは、94°C/2 分を 1 回行い、次に 94°C/30 秒→(二つのプライマーの Tm 値の低い方-5°C)/30 秒、68°C/(増幅 DNA 断片の総塩基数/1000) 分を 30 サイクル、最後に 68°C/5 分を 1 回行った。

得られた PCR 産物から、フェノール/クロロホルム抽出によりタンパク質を除去した。抽出液 40 μL に 3 M 酢酸ナトリウム(pH 5.2) 4 μL と 100%エタノール 100 μL を加え、氷上で 5 分間静置した。混合液を遠心分離 (15,000 rpm, 5 分間, 4°C) し上清を取り除いた後、70%エタノール 200 μL を加えた後、同様に遠心し上清を取り除き、沈殿を乾燥させた。乾燥した DNA 沈殿物に対して、制限酵素溶液を加え 1 時間 37°C の恒温槽で静置することで制限酵素処理を行った。制限酵素溶液の組成は、至適バッファー溶液 2 μL、制限酵素 0.4 μL、超純水 17.6 μL からなる。二つの異なる制限酵素で処理する際に、それぞれの酵素で至適バッファーが異なる場合は、タカラ株式会社の主要制限酵素 Double Digestion 用推奨

Universal Buffer 一覧 (http://catalog.takara-bio.co.jp/PDFS/double_digestion.pdf) に従って、バッファーを選択した。制限酵素処理後の DNA 溶液を 1%アガロースゲルで 30 分間電気泳動し、増幅された DNA のサイズを確認した後、QIAEX II Gel Extraction Kit を用いて DNA 産物の抽出及び精製を、以下の操作により行った。切り出したゲルに QX1 液 600 μL と、レジンである QIAEX II 12 μL を加え、50°Cの恒温槽に 5 分間静置した。溶解したゲルを遠心分離 (12,000 rpm, 30 秒間) し、上清を取り除いた後、再び QX1 液 600 μL を加え、ボルテックスし、遠心分離 (12,000 rpm, 30 秒間) した。上清を取り除いた後、レジンに PE 液 600 μL を加え、ボルテックスした後、再び遠心分離 (12,000 rpm, 30 秒) し、上清を取り除いた。この操作を繰り返し、上清を取り除いた沈殿を 10 分間風乾させた後、TE 液 35 μL に溶解させ、50°Cの恒温槽に 5 分間静置した。遠心分離 (12,000 rpm, 30 秒)を行い、上清の DNA 液 30 μL を回収した。増幅 DNA 断片 1 μL と、あらかじめ対応する制限酵素による処理・精製を行ったプラスミドベクター 1 μL、2xRapid Ligation Buffer (Promega) 4.0 μL、超純水 1.5 μL、T4 DNA Ligase 0.5 μL を加え、室温で 15 分間ライゲーションを行った。コンピテントセルを氷上で融解し、先ほどのライゲーション液を加え、氷上で 30 分間インキュベートした。次に 42°Cの恒温槽で 45 秒間ヒートショックを行い、氷上で 5 分間静置した。コンピテントセルを、カルベニシリソ 100 μg/mL 含有の 1×LB (Lysogeny Broth) 寒天培地上で一晩培養 (37°C) した。

モデリング

NLuc の予測三次元構造は、NLuc の一次構造を I-TASSER 構造予測サーバー²⁷に入力することで得られた。得られた三次元構造の描画は、モデリングソフト UCSF chimera²⁸を用いて行った。

mNeonGreen-NLuc、Venus-NLuc の間のアミノ酸欠失変異体ライブラリーの作成

mNeonGreen の cDNA 配列は Allele Biotechnology に提供していただいた。mNeonGreen-NLuc

および Venus-NLuc 融合タンパク質の欠失変異体の作成は、先行研究に従って行った²⁹。C 末端を欠失させた mNeonGreen 変異体(mNGΔC0-10)、Venus 変異体(VenusΔC0-12)の DNA 断片を、制限酵素サイト *BamHI* を含むセンスプライマー（使用したオリゴヌクレオチド：F-BH1-G-gfp_1）と、制限酵素サイト *KpnI* を含むアンチセンスプライマー（使用したオリゴヌクレオチド：R-Kpn1-mNG_235, R-Kpn1-mNG_234, R-Kpn1-mNG_233, R-Kpn1-mNG_232, R-Kpn1-mNG_231, R-Kpn1-mNG_230, R-Kpn1-mNG_229, R-Kpn1-mNG_228, R-Kpn1-mNG_227, R-Kpn1-mNG_226）を用いて PCR 法によりそれぞれ増幅し、*BamHI/KpnI* 制限酵素で処理した。N 末端を欠失させた NLuc 変異体(NLucΔN0-4)を、制限酵素サイト *KpnI* を含むセンスプライマー（使用したオリゴヌクレオチド：F-Kpn1-Nluc_2, F-Kpn1-Nluc_3, F-Kpn1-Nluc_4, F-Kpn1-Nluc_5, F-Kpn1-Nluc_6）と、制限酵素サイト *EcoRI* を含むアンチセンスプライマー（使用したオリゴヌクレオチド：R-ER1-x-Nluc_171）を用いて PCR 法によりそれぞれ増幅し、*KpnI/EcoRI* 制限酵素で処理した。これらの DNA 断片を互いに混ぜ合わせ、*BamHI/EcoRI* 制限酵素処理した pRSERb (Invitrogen)とライゲーションを行った。

蛍光タンパク質と NLuc の間のランダムアミノ酸置換変異体ライブラリーの作成

蛍光タンパク質と NLuc の間のアミノ酸残基へのランダムアミノ酸置換変異の導入は、ランダム化されたオリゴヌクレオチドを用いた inverse PCR 法によって行った³⁰。Inverse PCR 法では、プラスミドを鋳型として、逆方向に設定した 2 種類のプライマーを用いて PCR を行いプラスミド全周を増幅し、Self-ligation し環状化する。その際、蛍光タンパク質と NLuc の間の制限酵素サイト *KpnI* に由来する GGTACC 配列を NNKNNK (N: A, T, G or C; K: G or T) に置換したオリゴヌクレオチドを用いることで、ランダムアミノ酸置換変異を導入した。以下にその具体的な手順を示す。

まず、オリゴヌクレオチドの 5'-末端のリン酸化を T4 Polynucleotide Kinase(Takara-bio)を用いて行った。リン酸化溶液の組成は、100 μM オリゴヌクオレチド 2.5 μL、10×T4 PNK buffer 2.5 μL、100 mM ATP solution 2.5 μL (pH 7.0)、超純水 17.0 μL を混合し、10 U/μL T4

Polynucleotide Kinase を $0.5 \mu\text{L}$ 加えた(合計 $25 \mu\text{L}$)。リン酸化反応は、 37°C の恒温槽に 30 分間静置することで行った。5'-末端がリン酸化されたオリゴヌクレオチドを用いて、変異導入を伴わない PCR、サブクローニングで記述した方法に従って、PCR を行った。PCR 終了した反応液に、 $10 \text{ U}/\mu\text{L} Dpn\text{I}$ $2 \mu\text{L}$ を加え、 37°C の恒温槽に 30 分間静置した。反応液からゲル電気泳動、ゲル抽出を上述したように行うことで、プラスミド全周に相当する DNA 断片を精製した。DNA 断片 $1 \mu\text{L}$ 、 $2\times$ Rapid Ligation Buffer $4.0 \mu\text{L}$ 、超純水 $2.5 \mu\text{L}$ 、T4 DNA Ligase $0.5 \mu\text{L}$ を加え、室温で 15 分間ライゲーションを行った。コンピテントセル (XL10-Gold)を氷上で融解しライゲーション溶液を加え、氷上で 30 分間インキュベートした。次に 42°C の恒温槽で 45 秒間ヒートショックを行い、氷上で 5 分間静置した。形質転換されたコンピテントセルを、カルベニシリソ $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 含有の $1\times$ LB (Lysogeny Broth) 寒天培地上で一晩培養 (37°C) した。

mNG Δ C10-GT-NLuc Δ N5 、 Venus Δ C12-GT-NLuc Δ N4 、 mTQ2 Δ C10-GT- Δ N4NLuc と tdTomato Δ C8-GT- Δ N4NLuc の *Kpn*I 配列に由来する Gly-Thr 残基に対して、以下のランダムオリゴヌクレオチドを用いてランダムアミノ酸置換変異を導入した。

mNG Δ C10-GT-NLuc Δ N5: F-XX-Nluc_5, R-mNG_226

Venus Δ C12-GT-NLuc Δ N4: F-XX-Nluc_4, R-gfp_226

mTQ2 Δ C10-GT- Δ N4NLuc: F-XX-Nluc_5, F-XX-Nluc_4, F-XX-Nluc_3, R-gfp_229,

tdTomato Δ C8-GT- Δ N4NLuc: F-Nluc, R-Nluc_6-XX-tdTA_467, R-Nluc_6-XX-tdTA_466, R-Nluc_6-XX-tdTA_465

NLuc 内部への蛍光タンパク質挿入変異体ライブラリーの構築

様々な長さの柔軟なリンカーが付加された mKO κ を NLuc の 50/51th の残基の間に挿入した。まず、様々な柔軟なリンカー配列を有する mKO κ の DNA 断片を、制限酵素サイト *Xho*I を含むセンスプライマー (使用したオリゴヌクレオチド : F-XhoI-mKO_2, F-XhoI-G-mKO_2,

F-XhoI-GG-mKO_2, F-XhoI-GGS-mKO_2, F-XhoI-GGSG-mKO_2, F-XhoI-GGSGG-mKO-2, F-XhoI-GGSIGS-mKO-2, F-XhoI-GGSIGSG-mKO-2, F-XhoI-GGSIGSGG-mKO-2, F-XhoI-GGSIGSGGS-mKO-2) と、制限酵素サイト *SacI* を含むアンチセンスプライマー (使用したオリゴヌクレオチド : R-Sac1-mKO_218, R-Sac1-T-mKO_218, R-Sac1-TL-mKO_218, R-Sac1-TLG-mKO_218, R-Sac1-TLGM-mKO_218, R-Sac1-TLGMD-mKO_218, R-Sac1-TLGMDE-mKO_218, R-Sac1-TLGMDEL-mKO_218, R-Sac1-TLGMDELY-mKO_218, R-Sac1-TLGMDELYK-mKO_218) を組み合わせて、PCR 法によりそれぞれ増幅し、*XhoI/SacI* 制限酵素で処理した。NLuc の 50/51 番目に対応するサイトに *XhoI/SacI* 制限酵素サイトを導入された DNA 断片を、inverse PCR 法により調整した³⁰。NLuc-pRSETb を鋳型として、制限酵素サイト *XhoI* を含むセンスプライマーと制限酵素サイト *SacI* を含むアンチセンスプライマーを用いて PCR 法によりプラスミド全長を増幅し、*XhoI/SacI* 制限酵素で処理した。mKO κ の DNA 断片を互いに混ぜ合わせ、*XhoI/SacI* 制限酵素処理した線状 NLuc-pRSETb とライゲーションを行った。

NLuc のエオシンラベル化

エオシン-5-マレイミドは、Molecular probes(no. E-118)から購入した。ターゲットのループに特異的にラベル化するために、NLuc の内在性 Cys 残基 (166 番目) を Ala に置換した (NLuc_C166A)。そして、その変異体 NLuc_C166A の 4箇所の Gly 残基(50th、66th、97th、136 番目)をそれぞれ Cys に置換した変異体を作成した (NLuc_G50C_C166A、NLuc_G66C_C166A、NLuc_G97C_C166A、NLuc_G136C_C166A)。変異の導入は、すべてを inverse PCR 法を用いて行った。(使用したオリゴヌクレオチド : Nluc_C166A, F-Nluc_G50C, R-Nluc_49, F-Nluc_G66C, R-Nluc_65, F-Nluc_G97C, R-Nluc_96, F-Nluc_G136C, R-Nluc_135) 20 mM HEPES buffer (pH=7.4) 中で、組換え NLuc タンパク質 50 μM と 5 mM ジチオスレイトール(DTT)を 30 分間、室温で反応させた。溶液をゲルろ過カラム NAP-5 を用いて、新しい 20 mM HEPES buffer (pH=7.4) に交換した。そして、組換えタンパク質と 100 μM エオシン-5-マ

レイミドを 1 時間、室温で反応させた。未反応のエオシン-5-マレイミドを除くために、溶液をゲルろ過カラム NAP-5 を用いて、新しい 20 mM HEPES buffer (pH=7.4)に交換した。発光スペクトルの測定は、化学発光タンパク質の発光特性評価に従って行った。

明るく高いFRET効率を示す変異体のスクリーニング

変異体ライブラリーで JM109(DE3)を形質転換し LB 寒天培地に播種した。37°C で 12 時間培養した後、蛍光タンパク質を完全に成熟させるために室温にて 2 日間培養した。明るく FRET 効率が高い変異体を次の二段階でスクリーニングした。はじめに、5 μM セレンテラジン-h を含む PBS を添加しゲルイメージヤー(LAS-1000、GE Healthcare)を用いて、発光画像を取得した。明るいコロニー（100 個以内）をピックアップし、液体 LB 培地を含む 96 穴ガラス底プレートに移し、23°C で 3 日間培養した。発光スペクトルは、マイクロプレートリーダー(SH-9000、コロナ電気)を用いて測定した。発光基質として、最終濃度 5 μM セレンテラジン-h を用いた。得られた発光スペクトルを、NLuc からの発光に由来する 450nm の強度で規格化した。

1.4 実験結果と考察

1.4.1 ドナーとアクセプターの順列が FRET 効率に与える影響の検討

NLuc と種々の蛍光タンパク質との融合タンパク質を構築するにあたり、はじめに NLuc と蛍光タンパク質の順列が FRET 効率に与える影響の検討を行った。検討には蛍光タンパク質 mNeonGreen(mNG)を用いた。PCR 法で、全長の mNeonGreen および NLuc の DNA 断片を増幅した。それらの DNA 断片を混ぜ合わせ、適切な制限酵素で処理されたプラスミドベクター pRSET_B とライゲーションし、mNG-NLuc および NLuc-mNG の融合タンパク質を構築した。クローニング際に付加された制限酵素サイト *Kpn*I に由来する Gly-Thr の 2 残基がリinkerとして働くと考えられる。それぞれの融合タンパク質を大腸菌に発現させてタンパク質を精製し、発光基質添加下で測定した発光スペクトルを図 1-12 に示す。

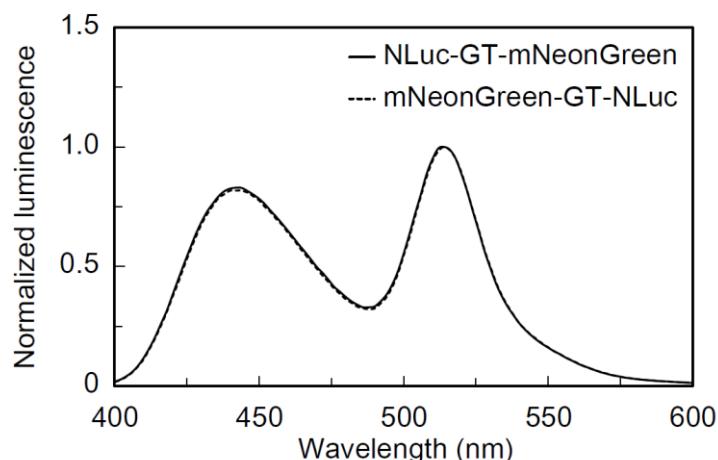


図 1-12 mNG-NLuc および NLuc-mNG の発光スペクトル、
mNG に由来する発光ピーク波長による発光強度で規格化したグラフ、
発光基質濃度 25 μM、タンパク質濃度 5 nM

mNG-NLuc および NLuc-mNG の発光スペクトルは、ほぼ同一な波形、FRET レシオ値(1.2)を示した。すなわち、NLuc と蛍光タンパク質の順列は、FRET 効率には大きな影響を与えないことが示唆された。

順列による FRET 効率の影響は小さかったが、今後は蛍光タンパク質-NLuc の順列の融合タンパク質を次章以降の最適化に用いることにする。その理由を以下に記す。一般的に蛍光タンパク質の C 末端には柔軟で構造化されていない領域が存在する。対して、N 末端は剛直

で構造化されており、欠失させると蛍光特性などに影響を与える恐れがある。従って、蛍光タンパク質-NLuc の順列の方が、中間領域を欠失させて距離を近づけることで、FRET 効率を高める余地が多くあると判断した。

1.4.2 ドナーとアクセプターの間の欠失変異が FRET 効率に与える影響の検討

次に、蛍光タンパク質のフォールディングを損なうことのなく、かつ蛍光タンパク質と NLuc の間の最小化した変異体を探査した。まず、蛍光タンパク質の C 末端側および NLuc の N 末端側領域を段階的に欠失させた変異体ライブラリーを作製した。その中から、FRET の効率が高い変異体をスクリーニングした。

PCR 法で、C 末端領域のアミノ酸を段階的に欠失させた mNeonGreen (mNG Δ C0- Δ C10) を、制限酵素サイト *KpnI* を付加したプライマーを用いてそれぞれ増幅した。同様に、N 末端領域のアミノ酸を段階的に欠失させた NLuc (NLuc Δ N1- Δ N5) を、制限酵素サイト *KpnI* を付加したプライマーを用いてそれぞれ増幅した。異なる欠失変異を持つ DNA 断片を混ぜ合わせ、適切な制限酵素で処理されたプラスミドベクター pRSET_B とライゲーションした。mNG の欠失変異体 11 種類と NLuc の欠失変異体 5 種類の組み合わせで、合計 55 種類の融合タンパク質を含むライブラリーを得た(図 1-13a)。ライブラリーサイズ 55 個の 10 倍に相当する 500 個程度のコロニーをスクリーニングした。スクリーニングの結果、レシオが 0.5-5.5 まで幅広い値を示す変異体群が得られた(図 1-13b)。その中で、FRET レシオ値が最も高かった mNG Δ C10-GT-NLuc Δ N5 を次の段階の実験に用いた。同様の実験を Venus (Venus Δ C0- Δ C12) でも行い、FRET レシオ値が最も高い変異体として Venus Δ C12-GT-NLuc Δ N4 が得られた(図 1-13c and d)。

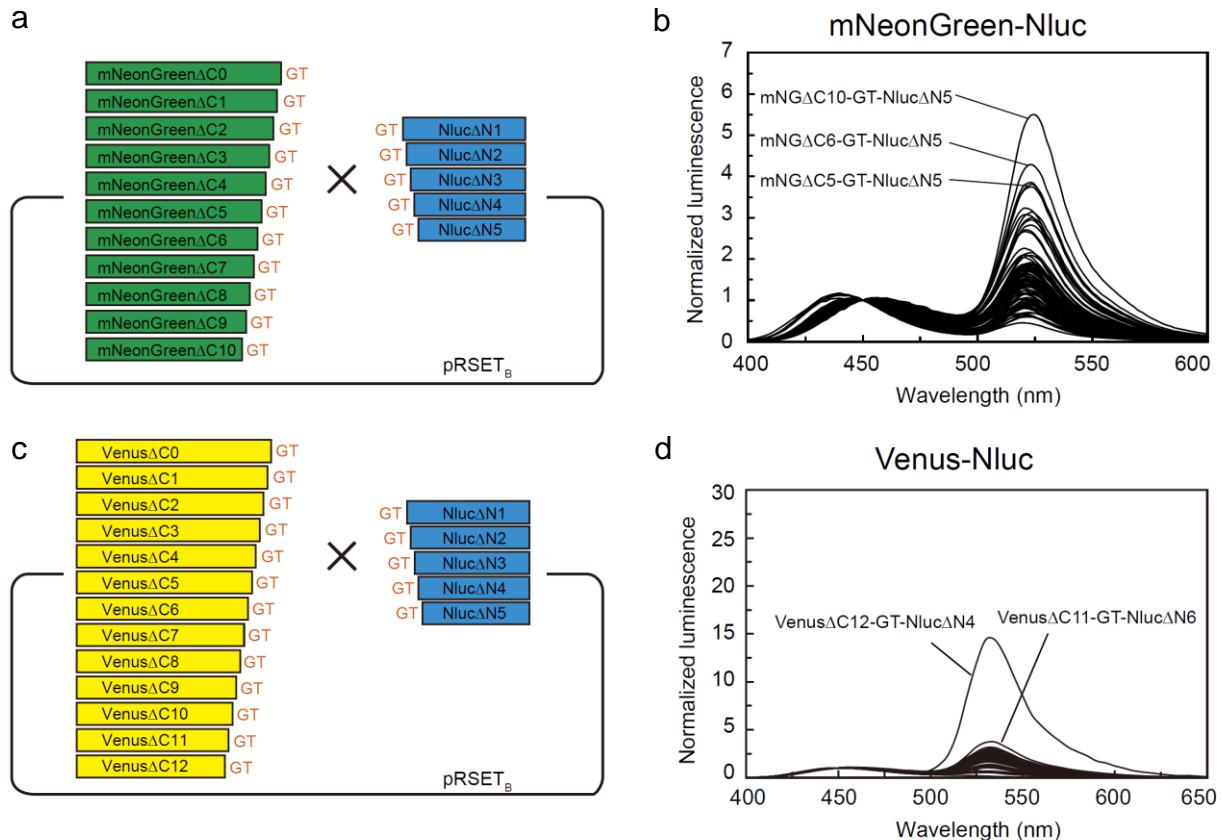


図 1-13 mNeonGreen、Venus へ高効率で FRET を起こす変異体の探索

- (a) mNeonGreen(Δ C0- Δ C10)と NLuc(Δ N1- Δ N5)を組み合わせたリンカーライブラリーの構築、(b) 変異体の発光スペクトル、(c) Venus(Δ C0- Δ C12)と NLuc(Δ N1- Δ N5)を組み合わせたリンカーライブラリーの構築、(b) 変異体の発光スペクトル

ここで観察された FRET レシオ値を考察するにあたり、上述した距離の変化に伴う FRET 効率の変化以外に考慮しなければならない可能性がある。それは、未成熟な蛍光タンパク質による見かけ上の FRET 効率の低下である。蛍光タンパク質は、翻訳された後三つの化学反応を自己触媒的に起こすことで成熟した発色団を持つ蛍光タンパク質となる。先行研究では、蛍光タンパク質の過剰に C 末端領域を欠失させると、発色団を持たない未成熟な蛍光タンパク質の割合が増えることが報告されている³¹。未成熟な蛍光タンパク質と NLuc の融合タンパク質は、FRET を起こさず NLuc からの発光が観測される。従って、蛍光タンパク質の C 末端領域の欠失変異の導入は、未成熟な蛍光タンパク質の割合を増加させ、見かけ上の FRET レシオ値の低下を引き起こす可能性がある。しかし、今回得られた結果は、mNeonGreen、

Venus とともに C 末端を最も多く欠失させた変異体と NLuc の融合タンパク質が最も高い FRET レシオ値を示した。すなわち、両タンパク質は C 末端領域を欠失させてもタンパク質の成熟度は低下せず、ほぼ距離依存的に FRET 効率が高まることが示唆された。また、NLucにおいても、N 末端側の 5 残基程度欠失させても酵素活性に大きな影響を与えないという知見を得た。

1.4.3 ドナーとアクセプターの間のランダムアミノ酸変異導入が FRET 効率に与える影響の検討

FRET 効率の向上という観点においては、距離だけでなくドナーとアクセプターを平行に近い配向に配置することが必要である。しかし、タンパク質間の相対的な角度を理論的に予測し、これを任意の配置に置くことは困難である。そこで、タンパク質間にランダムアミノ酸変異を導入し様々な相対角度を有する融合タンパク質ライブラリーを作製し、その中から効率的な FRET を起こす変異体をスクリーニングすることとした。

1.4.2 で最適化された変異体に対して、ランダムオリゴヌクレオチドと inverse PCR 法を用いて、*KpnI* サイトに由来する 2 残基-Gly-Thr-にランダムなアミノ酸変異を導入した（図 1-14a and c）。*KpnI* サイトに由来する GGTACC 部位を NNKNNK (N: A, T, G or C; K: G or T) に置換するオリゴヌクレオチドを使用した。NNK は、32 種類のコドンで 20 種類すべてのアミノ酸残基をコードすることが出来る。従って、生じる変異体ライブリーのサイズは、 $32 \times 32 = 1024$ 通りとなり、ライブルリーのサイズの 5 倍に相当する 5,000 個のコロニーをスクリーニングした。その中で、mNGΔC10-GF-NLucΔN5 が FRET レシオ値 6.4、VenusΔC12-AM-NLucΔN4 が FRET レシオ値 25 を示し、ほぼアクセプターからの発光のみが観測される変異体を得ることが出来た（図 1-14 b and d）。これ以後、mNGΔC10-GF-NLucΔN5 を Green enhanced Nano-lantern (GeNL)、VenusΔC12-AM-NLucΔN4 を Yellow enhanced Nano-lantern (YeNL) と呼ぶ。

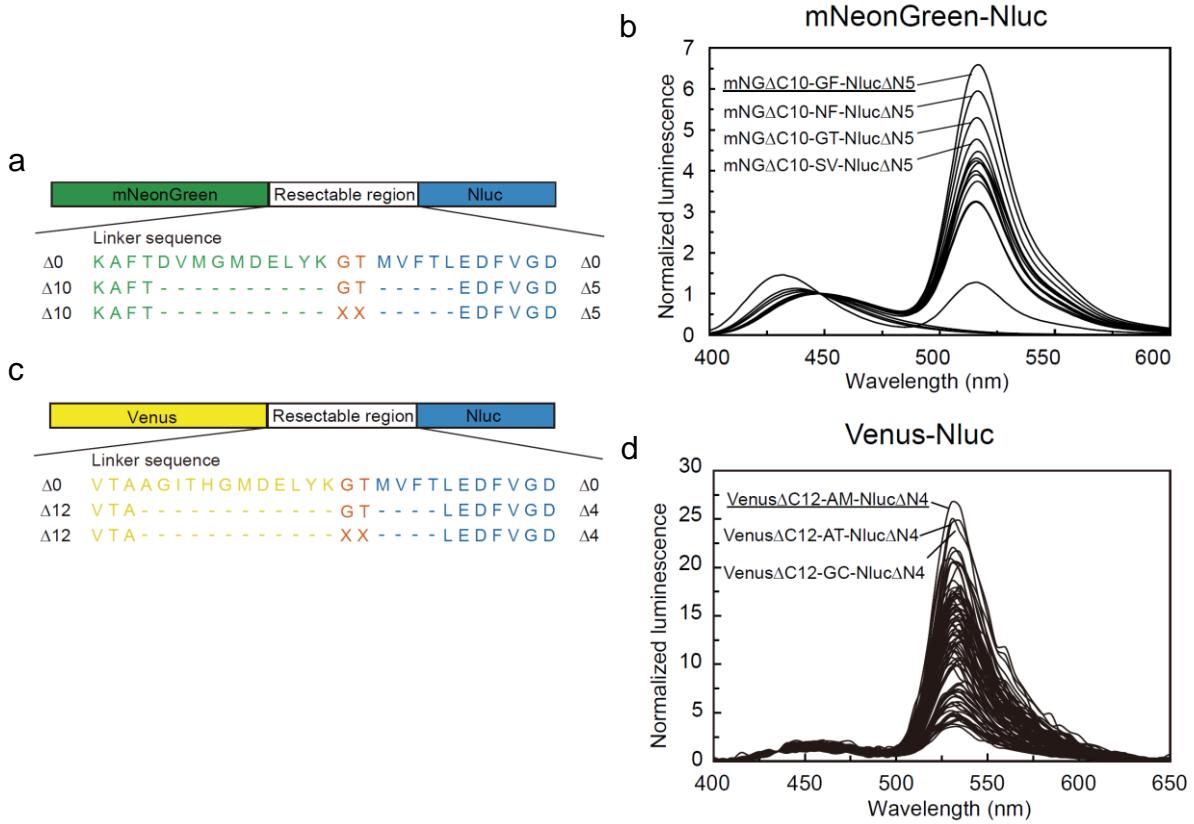


図 1-14 mNeonGreen、Venus へ高効率で FRET を起こす変異体の探索

(a) mNGΔC10-GT-NLucΔN5のリンカー領域に対するランダム変異導入 (b) 変異体の発光スペクトル、(c) VenusΔC12-GT-NLucΔN4のリンカー領域に対するランダム変異導入 (b) 変異体の発光スペクトル

次に、mTurquoise2-NLuc、tdTomato-NLucペアにおいて、高効率に FRET を起こすリンカーの探索を行った。これら二つについては、リンカー長の最適化とランダム変異を同時に行った（図 1-15）。これは、先行研究から mTurquoise2 と tdTomato については機能に影響なく欠失できる C 末端残基の数が明らかになっていたためである^{31, 32}。さらに、1.4.2 の結果から NLuc の N 末端領域は 5 残基程度までは欠失させても機能に大きな影響は無い、という知見を得ている。

mTurquoise2 (mTQ2)については、C 末端領域 10 残基を欠失変異させ³¹、NLuc の N 末端を 5 残基から 3 残基段階的に欠失させ ($mTQ2\Delta C10-GT-NLuc\Delta N3-5$)、かつ *KpnI* サイトに由来する 2 残基-Gly-Thr-にランダムアミノ酸変異を導入した（図 1-15a）。複数のランダムオリゴスクレオチドと inverse PCR 法を用いて、*KpnI* サイトに由来する GGTACC 部位を NNKNNK (N: A, T, G or C; K: G or T)に置換する変異を導入した。従って、生じる変異体ライブリーのサイズは、 $32 \times 32 \times 3 = 3,072$ 通りとなり、ライブラリーサイズの 9 倍に相当する 9,000 個のコロニーをスクリーニングした。mTurquoise2-NLuc、tdTomato-NLuc ペアについては、mTQ2 と NLuc の発光ピーク波長が近接していたため、発光スペクトル測定に基づくスクリーニングは行っていない。大腸菌プレート上で明るいコロニーを培養しタンパク質を精製し、物性評価を行った。その結果、 $mTQ2\Delta C10-LH-NLuc\Delta N3$ が最も高輝度な変異体であったため、これ以後 Cyan enhanced Nano-lantern (CeNL) と呼ぶ。

tdTomato については C 末端領域 8 残基まで欠失可能であることが報告されている³²。tdTomato の C 末端領域を 8 から 9 残基、NLuc の N 末端を 5 残基欠失させ ($tdTomato\Delta C8-9-GT-NLuc\Delta N5$)、かつ *KpnI* サイトに由来する 2 残基-Gly-Thr-にランダムアミノ酸変異を導入した（図 1-15b）。複数のランダムオリゴスクレオチドと inverse PCR 法を用いて、*KpnI* サイトに由来する GGTACC 部位を NNKNNK (N: A, T, G or C; K: G or T)に置換する変異を導入した。従って、生じる変異体ライブルーのサイズは、 $32 \times 32 \times 2 = 2,048$ 通りとなり、ライブラリーサイズの 3 倍に相当する 6,000 個のコロニーをスクリーニングした。二段階目のスクリー-

ニングを行った 96 個の変異体のうち 94 値が FRET レシオ値 0.3 以下を示したが、
tdTomato Δ C8-PI-NLuc Δ N5 が FRET レシオ値 0.46、tdTomato Δ C9-RL-NLuc Δ N5 が FRET レシ
オ値 0.80 の値を示した（図 1-15c）。これ以後、tdTomato Δ C9-RL-NLuc Δ N5 を Red enhanced
Nano-lantern (ReNL)と呼ぶ。

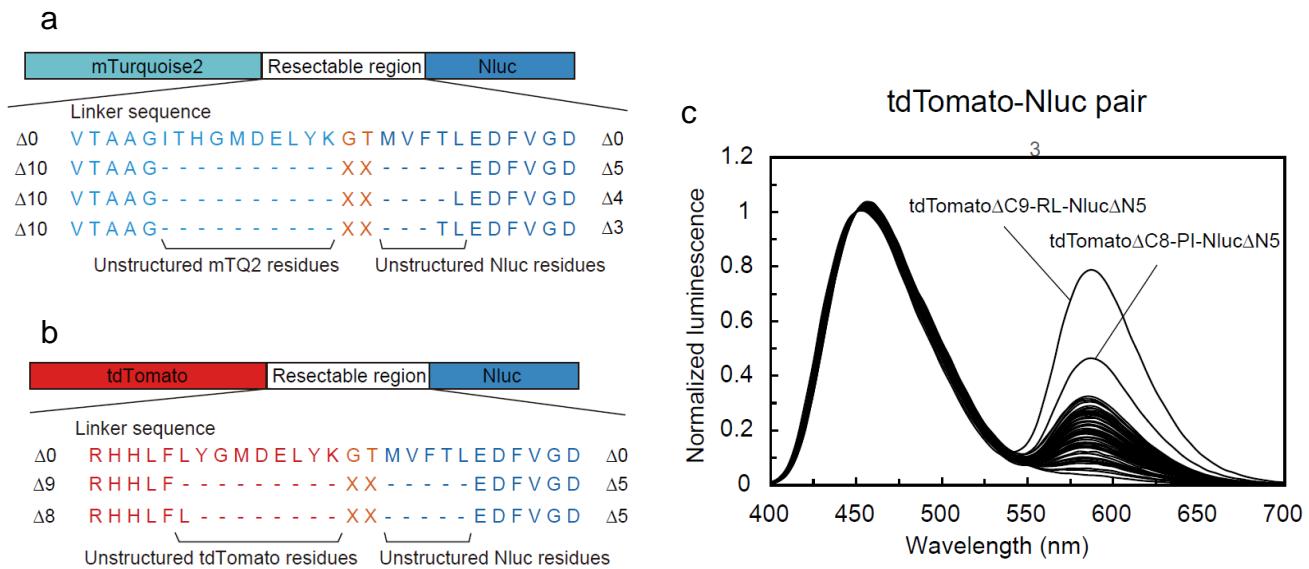


図 1-15 mTurquoise2、tdTomato へ高効率で FRET を起こす変異体の探索

(a) mTQ2 Δ C10-GT-NLuc Δ N3-5 のリンカー領域に対するランダム変異導入、(b)
tdTomato Δ C8-9-GT-NLuc Δ N5 のリンカー領域に対するランダム変異導入 (c) 変異体の発光ス
ペクトル

次に、mKO κ -NLuc ペアにおいて、高効率に FRET を起こすリンカーの探索を行った。mKO κ
は X 線結晶構造解析の結果から、1 残基を除き C 末端は構造化され β バレルに組み込まれて
いる³³。従って、mKO κ の全長および C 末端領域を 1 残基欠失、NLuc の N 末端を 5 残基欠
失させ (mKO κ Δ C0-1-GT-NLuc Δ N5)、かつ *KpnI* サイトに由来する 2 残基-Gly-Thr-にランダ
ムアミノ酸変異を導入した(図 1-16a)。複数のランダムオリゴヌクレオチドと inverse PCR 法
を用いて、*KpnI* サイトに由来する GGTACC 部位を NNKNNK (N: A, T, G or C; K: G or T)に置
換する変異を導入した。従って、生じる変異体ライブリーのサイズは、 $32 \times 32 \times 2 = 2,048$ 通り

となり、ライブラリーサイズの3倍に相当する6,000個のコロニーをスクリーニングした。二段階目のスクリーニングを行った結果、FRET レシオ値0.55を示す変異体を得ることが出来たが、突出したFRET レシオ値を示す変異体を得ることはできなかった(図1-16b)。

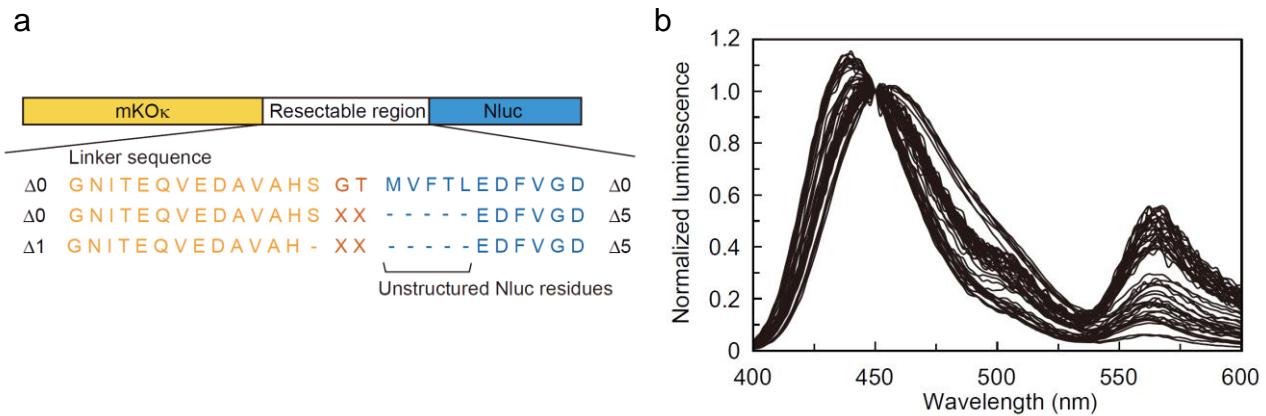


図 1-16 mKO κ へ高効率で FRET を起こす変異体の探索

(a) mKO κ ΔC0-1-GT-NLucΔN5 のリンカー領域に対するランダム変異導入、(b) 変異体の発光スペクトル

本項目のスクリーニングより、mNeonGreen-NLucペアではFRET レシオ比が6.5に向上し、Venus-NLucペアでは27まで向上した変異体を得ることが出来た。また、tdTomato-NLucペアでは、二段階目のスクリーニングを行った96個のうち94個の変異体がFRET レシオ値0.3以下を示すなかで、たった一つ変異体tdTomatoΔC9-RL-NLucΔN5がFRET レシオ値0.80を示した。これらの結果は、FRET 効率を高めるのに、ドナーとアクセプターの中間領域にランダムアミノ酸変異導入することが有効であることを示している。対して、mKO κ -NLucペアにおいては、FRET レシオ値は他の波長変異体と比較して最も低かった。

mNeonGreen-NLuc、Venus-NLuc、tdTomato-NLucペアにおいて、高いFRET レシオ値が得られた要因について、考察する。mTurquoise2-NLucペアについては、FRET レシオ値によるスクリーニングを行っていないため以降の検討からは除外した。mNeonGreen-NLuc、Venus-NLuc、tdTomato-NLucペアにおいて、高いレシオ値を示した変異体には、1番目の残基にGly、Ala、Ser、Argが選ばれる傾向があり、2番目の残基にはPhe、Val、Ileなどのア

ミノ酸が選ばれる傾向にあった。どのような構造モチーフが FRET 効率の向上に働いているかは不明であるが、Gly、Ser や Pro はターン構造を取りやすいことが知られており、このモチーフが蛍光タンパク質の発色団と NLuc に結合した基質の相対角度を平行に近づけるのに寄与しているのかもしれない。

1.4.4 ルシフェラーゼ内部への蛍光タンパク質挿入変異の試み

並列に蛍光タンパク質と NLuc を融合するだけでなく、蛍光タンパク質を NLuc の内部に挿入することで、より FRET 効率を高めることを目指した。NLuc の基質結合部位の付近に蛍光タンパク質を挿入することで物理的に発色団同士の距離を近づけ FRET 効率を高める期待した。

まず、NLuc の構造をもとに蛍光タンパク質の挿入するサイトの候補を検討した。NLuc の X 線結晶構造は解かれていないので、まず NLuc の 3 次元構造を I-TASSER プログラムを用いて予測した²⁷。I-TASSER はタンパク質の一次構造より *ab initio* にて三次構造を予測できるツールであり、critical assessment of protein structure prediction (CASP) 10 にて最も優れた構造予測能を示している。予測された三次元構造を図 1-17 に示す。

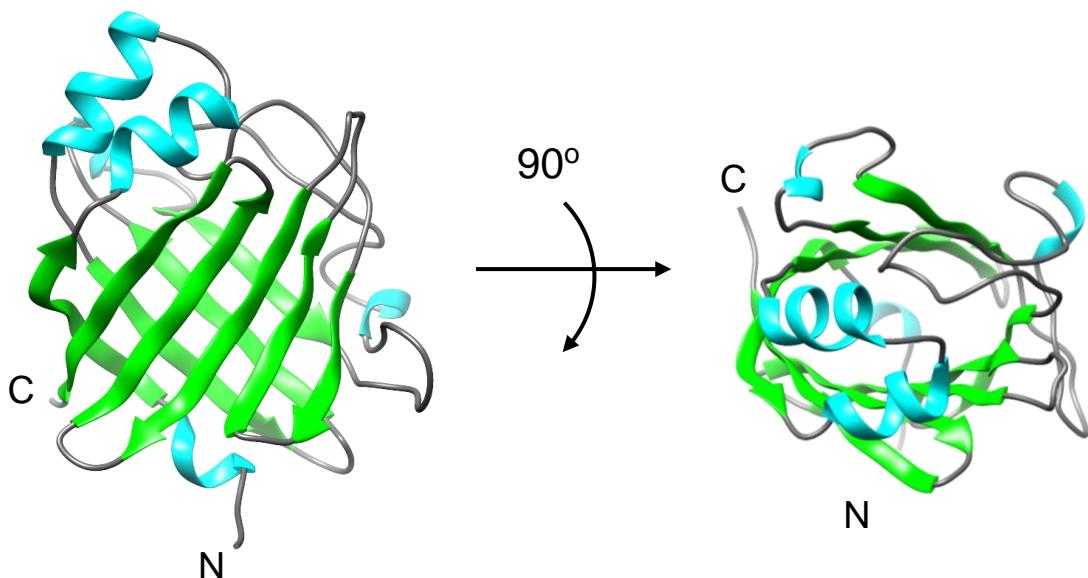


図 1-17 NanoLuc の予測 3 次元構造のリボン表示

α -ヘリックスをシアン色、 β -ストランドを緑色でハイライトされている。右の 3 次元構造は、水平軸に対して 90° 回転させたものである。NLuc の一次構造をもとに I-TASSER プログラムを用いて 3 次元構造を予測した。

NanoLuc の 3 次元構造は、4 つの α -ヘリックスと 11 つの逆平行な β -ストランドいわゆる β -

バレル構造から成っていた。分子の中心部位には、 β -バレルと 3 つの α -ヘリックスに囲まれた空洞が存在していた。この空洞は発光基質が結合するのに十分な大きく、内側には比較的疎水性のアミノ酸が豊富に存在していた。従って、発光基質の結合サイトであると予測される。

蛍光タンパク質の挿入は、NLuc の酵素活性を阻害しないように構造化されていないループ領域が望ましい。得られた三次元構造からループ領域に存在する 50 番目、66 番目、97 番目、136 番目の 4箇所の Gly 残基を潜在的な挿入サイトとした。

1.4.4.1 発光基質結合サイトに近接するループ領域の探索

まず、NLuc の 50 番目、66 番目、97 番目、136 番目の Gly 残基のうち、どの残基が基質結合部位に最も近いかを探査した。NLuc 内の 4 つの Gly 残基を蛍光色素でラベル化し発光基質から蛍光色素への FRET レシオ値から近接する残基を判断することとした。ラベル化する蛍光色素として、安価なエオシン色素を選択した。特異的なラベル化のために、NLuc の 166 番目の内在性 Cys 残基を Ala 残基に置換した変異体に対して(NLuc_C166A)、4 箇所のループ領域にある Gly 残基を Cys 残基に置換した変異体をそれぞれ作成した（図 1-18a、NLuc_G50C_C166A、NLuc_G66C_C166A、NLuc_G97C_C166A、NLuc_G136C_C166A）。これらのアミノ酸置換変異の導入は、すべて inverse PCR を用いて行った。それら 4 種類の精製タンパク質の Cys 残基に、マレイミドを介してオレンジ色蛍光色素エオシンを結合させた（図 1-18a）。エオシン結合 NLuc は結合部位によって異なる発光スペクトルを示し、NLuc_G50C_C166A が最もエオシン分子からの発光の割合 (FRET レシオ値 0.7) が大きかつた（図 1-18b）。この結果から、4 つのループの内 50 番目の残基が位置するループが最も発光基質結合部位に近いため、励起状態の基質酸化物からエオシンへの FRET が効率よく起こったと考えられる。

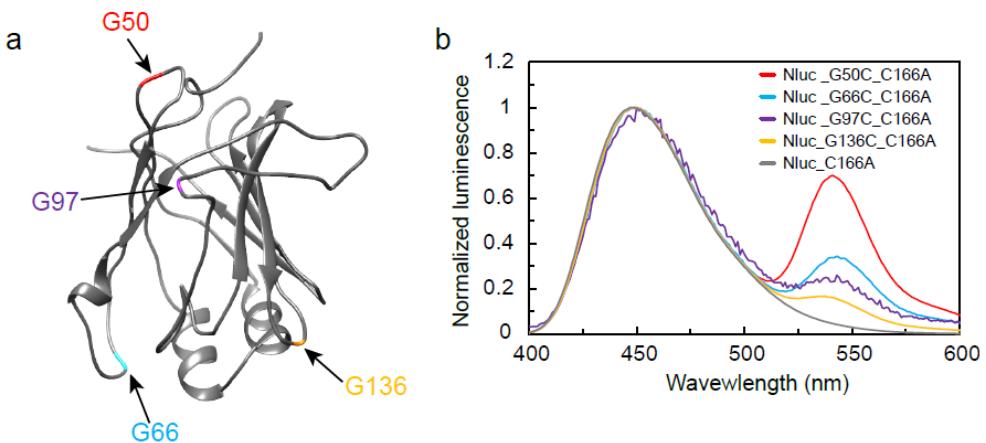


図 1-18 NLuc の活性ポケットに近いループの探索

(a) NLuc の予測 3 次元構造中における Cys 残基で置換したループの表示、(b) エオシン結合サイトに対する発光スペクトルの変化。NLuc の発光ピーク波長で規格化した。

1.4.4.2 橙色蛍光タンパク質の挿入変異

三次元構造によると(PDB ID: 3MGF)、mKO κ のN末端とC末端は β -バレルに対して同じ方向に出ているが距離は 2.4 nm 程度離れており³³、挿入された NLuc の構造を乱す恐れがある。従って、挿入する mKO κ の両末端に様々な長さのフレキシブルなリンカー配列を付加したライブラリーを作成した。PCR 法で、mKO κ のN、C 末端の両方に柔軟なリンカーを付加したライブラリーを構築した。柔軟なリンカーとして N 末端に Gly リッチな配列(-Gly-, -Gly-Gly-, -Gly-Gly-Ser-, -Gly-Gly-Ser-Gly-, -Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-, -Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Ser-, -Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Ser-Gly-, -Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-, -Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Ser-)、C 末端には *Aequorea victoria* GFP (GenBank: L29345.1) の C 末端配列(230-238 番目の残基: -Thr-His-Gly-Met-, -Thr-His-Gly-Met-Asp-, -Thr-His-Gly-Met-Asp-Glu-, -Thr-His-Gly-Met-Asp-Glu-Leu-, -Thr-His-Gly-Met-Asp-Glu-Leu-Tyr-, -Thr-His-Gly-Met-Asp-Glu-Leu-Tyr-Lys-)を採用した (図 1-19a)。N 末端と C 末端で異なるリンカー配列を用いたのは、リンカ一配列をコードするセンスプライマーとアンチセンスプライマー同士で二量体を形成し PCR 反応が阻害されるのを防ぐためである。mKO κ のリンカーライブラリ-DNA 配列をお互いに混ぜ合わせ、NLuc-pRSET_B の 50 番目と 51 番目の間に *Xba*I/*Sac*I 制限酵素サイトを付

加した線状 DNA とライゲーションを行った。リンカーの種類は 100 種類であり、ライブラリーサイズの 10 倍に相当する 1000 個のコロニーをスクリーニングした。

スクリーニングの結果を図 1-19b に示す。FRET レシオ値 0.95 という最も高い値を示した変異体は、mKO κ の N 末端に GGS GGS に加えて偶発的に 22 残基のアミノ酸 (VSVIKPEMKKVEDAVAHSTLEG) が挿入され、C 末端にはリンカーが挿入されていないものであった。この変異体を Orange enhanced Nano-lantern (OeNL) と呼ぶ。

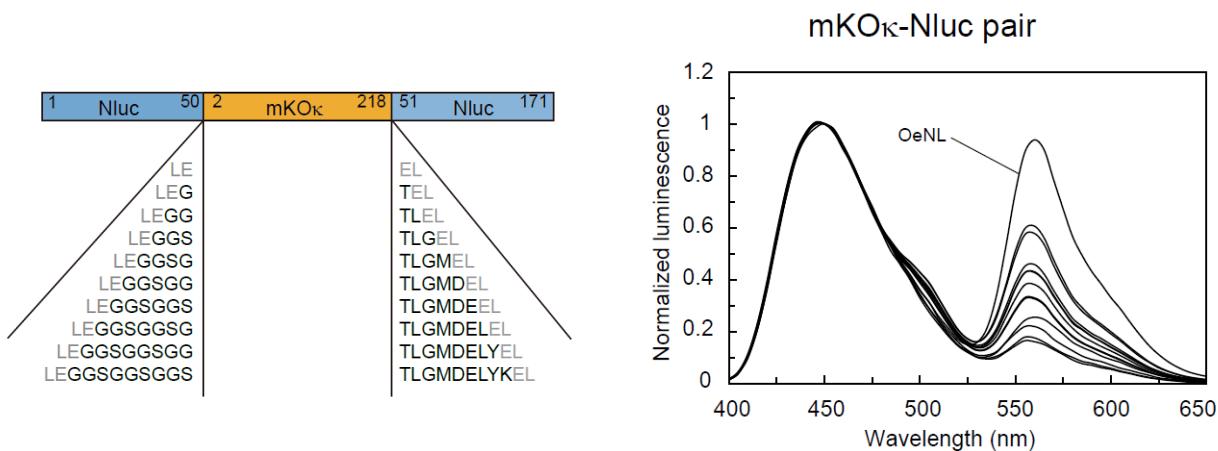


図 1-19 Nluc 49/50 番目の残基への mKO κ の挿入変異体

(a) 様々なリンカー長を有する mKO κ 挿入 Nluc 変異体のドメイン構造、右上の数字は各ドメインのアミノ酸番号、(b) 変異体の発光スペクトル

本項目で偶発的に生じた N 末端に長いリンカーが挿入され、C 末端にはリンカーが挿入されていない変異体が高い FRET レシオ値を有している理由について、考察する。1.4.2 で述べたように、見かけ上の FRET 効率を高めるには成熟な蛍光タンパク質の割合を増加させることが必要である。その上で、蛍光タンパク質の発色団と Nluc の基質結合部位を近接させる必要がある。それを踏まえると、N 末端の長い鎖のリンカーが mKO κ の成熟にとって都合がよく、かつ C 末端にはリンカーが挿入されず mKO κ を基質結合部位の近傍に繋ぎとめることが出来たため、高い FRET レシオ値に繋がったと考えられる。なお、なぜこうした偶発的な挿入が起こったのかは不明である。挿入された 22 残基のアミノ酸は、mKO κ の N 末端

の配列の一部と相同性があり、何らかの理由で mKOK の一部が複製され、NLuc との間に挿入されたと考えられる。

1.5 展望

今後の高光度化学発光タンパク質波長変異体の開発は、600 nm 以上の近赤外領域に発光する変異体の開発に向かうと考えられる。ヘモグロビンの吸収の少ない 600 nm 以上の波長の光は、”生体の窓”と呼ばれ生体透過性が高い。したがって、600 nm 以上の波長に強く化学発光するタンパク質は、これまで不可能であったマウス個体の深部領域からの超高感度化学発光イメージングを可能にするであろう。

本章で示したように、蛍光タンパク質と NLuc の間の領域に欠失・ランダム置換変異を導入し、2step のスクリーニングを行うことで高い FRET 効率の変異体を得ることできた。しかししながら、赤色・橙色波長変異体はアクセプター蛍光タンパク質からの発光だけでなく、ドナーである NLuc からの発光も優位に観測された。これは、NLuc とアクセプターの tdTomato の吸収スペクトルの重なりが小さいため、FRET 効率が緑色、黄緑色波長変異体と比較して、それほど高くならなかったことが示唆される。従って、より吸収スペクトルが長波長にシフトした近赤外蛍光タンパク質をアクセプターとして用いると、更なる困難が予測される。そこで、GeNL と近赤外蛍光タンパク質を融合することで、NLuc から 2 段階の FRET を介して近赤外蛍光タンパク質へ効率よくエネルギーが移動すると期待される。

二章：高光度化学発光タンパク質波長変異体の特性評価

2.1 背景

一章で述べたように、近年開発された高光度化学発光タンパク質 NLuc を用いることで細胞小器官レベルのイメージングが可能となった。また、NLuc の増強されたシグナル強度は、細胞体に豊富に存在するタンパク質だけでなく、細胞内に少数しか存在しない、もしくは少数の分子で複合体を形成している構造体を可視化するのにも有効に働くと考えられる。

NLuc の波長変異体が開発されれば、上記の応用を複数のタンパク質動態、生命現象へ拡張することが可能になる。蛍光タンパク質は、最初の緑色から、青緑色、続いて赤色と 3 色揃うことで急速に応用が拡大した。したがって、NLuc と比肩しうる超高光度発光タンパク質波長変異体は、発光イメージング技術の利活用を大きく進展させると期待される。

2.2 目的・意義

本章では、まず 1 章で開発した NLuc 波長変異体 eNL の発光スペクトルおよび発光光度を測定し、NLuc の波長変異体として働くかどうかを検討する。そして、eNL を用いて、細胞内の少数のタンパク質から複合体、および *in vitro* において単一分子からの化学発光の検出を試みる。最後に eNL の波長変異体の有用性を示すため、哺乳類細胞の複数の細胞内構造体の可視化を試みる。

2.3 方法と材料

化学発光タンパク質精製

各種化学発光タンパク質の大腸菌発現ベクターをが遺伝子導入された大腸菌 JM109(DE3)を、0.の抗生物質カルベニシンを含む LB 培地で 23 °C、65 時間振盪培養した。各発光蛋白質を発現した JM109(DE3)を、4°C、6000 rpm、10 分の条件で遠心し回収し、PBS(-)で懸濁した。懸濁した Rosetta2 を、フレンチプレス(Thermo Fisher Scientific)を用いて破碎した。破碎した溶液を、4°C、8000 rpm、20 分の条件で遠心し、上澄みをフィルタに通した。発光蛋白質の精製には、Ni-NTA アガロースアフィニティカラム (Qiagen) を用いて行った。精製後、ゲルろ過カラム (PD-10 column, GE Healthcare) を用いて化学発光タンパク質溶液の緩衝溶液を

50 mM HEPES (pH 7.5)へ交換した。一連の操作は、化学発光タンパク質の失活を防ぐために、全て氷上で行った。

化学発光タンパク質の発光特性評価

化学発光タンパク質溶液、および発光基質溶液は、20 mM HEPES (pH 7.4)緩衝液を用いて希釈した。化学発光スペクトルは、マルチチャンネル分光器 PMA-12 (浜松ホトニクス)を用いて、室温で行った。発光タンパク質溶液、および発光基質溶液の最終濃度は、それぞれ 100 nM、25 μM に調整した。発光基質として、NLuc および eNL に対してはフリマジンを用い、そのほかのタンパク質に対してはセレンテラジン-h を用いた。測定は 3 回ずつを行い、その平均した値を解析には用いた。

発光量子効率と速度論パラメーター算出

発光量子効率は、0.05 ピコモルのフリマジンを完全に消費した際に生じる総光子数から計算した。発光量子効率の測定は、マイクロプレートリーダーを用いて行った。検出器の装置関数はルミノールの化学発光を標準として、補正を行った。化学発光タンパク質およびフリマジンの最終濃度は、それぞれ 1 nM、500 pM に調整した。一連の溶液の調整には、0.1% のカゼインを含む 50 mM HEPES (pH 7.4) 緩衝液を用いた。これは、化学発光タンパク質の反応容器への非特異的吸着を防ぐためである。

速度論パラメーター算出は、化学発光タンパク質の最終濃度は 10 pM に固定し、フリマジンの濃度を 0.025、0.051、0.10、0.20、0.41、0.81、1.6、3.3、6.5、13 μM に調整して測定を行った。反応初速度は、化学発光タンパク質とフリマジンを混合してから 12 秒間の発光強度の総和から求めた。ミカエリスマンテン定数 K_m と最大反応速度 V_{max} は、Origin7 ソフトウェアを(OriginLab)用いたミカエリスマンテン式への非線形フィッティングを行い得た。

Ni-NTA 修飾アガロースカバースリップの作製

ガラス表面へ GeNL タンパク質を固定化するために、先行研究に従って Ni-NTA アガロースカバースリップを調製した³⁴。20 mL アガロースビーズ(Sepharose 4B, Sigma)を超純水で激しく洗浄し、180 mL の超純水に懸濁した。懸濁液に、1 M NaOH と 26 mM NaBH₄ を含む溶液 100 mL の溶液、20 mL のグリシドールを加え、室温で 18 時間インキュベートした。ビーズを超純水と 1 M NaCl で交互に洗浄し、グリシドールビーズを作製した。次に、このグリシドールビーズを過ヨウ素酸塩で酸化することで、アルデヒドで活性化されたビーズを調整した。グリシドールビーズを 250 mL の超純水に懸濁し、70 ml の 0.16 M NaIO₄ を加え室温で 1 時間インキュベートした。ビーズを超純水で洗浄し、アルデヒド活性化ビーズを作製した。最終ステップとして、ガラス表面をアガロースでコーティングし、AB-NTA (Dojindo) と反応させることで、Ni-NTA 修飾アガロースカバースリップを作製した。アルデヒド活性化アガロースビーズを超純水に懸濁し、100°C で 10 分間加熱した。融解したアルデヒド活性化アガロースをカバースリップの上に 3,000 r.p.s.、20 秒の条件でスピノコートした。コーティングされたカバースリップを、26 mg ml⁻¹ の AB-NTA と 12 mg ml⁻¹ の NaCNBH₃ を含む 1 M ポロン酸-NaOH バッファー(pH 10.5)に室温で 16 時間漬けた。NTA 修飾アガロースカバースリップを超純水で洗浄し、1 mM NiSO₄ 溶液に一日漬け Ni-NTA 修飾アガロースカバースリップを作製した。。

1分子の GeNL からの発光検出

ガラス表面への焦点の調整は、蛍光ビーズを用いて行った。まず、MOPS/KCl 溶液(10 mM MOPS, 100 mM KCl, pH=7.2)に懸濁された蛍光ビーズ(FluoSpheres® sulfate microspheres、直径 0.2 μm、F8848、Invitrogen)を Ni-NTA アガロースカバースリップ上に滴下し 5 分静置した後、懸濁液を除いた。次には、10 ピコモルの GeNL タンパク質を含む MOPS/KCl 溶液を Ni-NTA アガロースカバースリップの上に滴下し 5 分静置した後、MOPS/KCl 溶液で 3 回洗った。観察の直前には、フリマジンを最終濃度が 50 μM になるように添加した。单分子 GeNL からの発光検

出には、100倍の対物レンズ(NA 1.4、UPlanSApo、オリンパス)、EM-CCDカメラ (ImagEM, 浜松ホトニクス) を備えた化学発光用倒立顕微鏡(LV-200、オリンパス)を使用した。カメラの設定は、ビニングは1x1、露光時間180秒で撮影を行った。

得られた画像は画像解析ソフトウェアFijiにて解析した。輝点が存在しない部分の強度をバックグラウンドとして差し引いた後、画像のビット深度を32-bitに変換し、ピクセルの値を光子数に変換した（生画像と呼ぶ）。ノイズを除去するために、半径1ピクセルのメディアンフィルターをかけた。輝点の検出、分節化（ROIの設定）は、imageJのプラグインParticle Track Analysis (PTA ver1.2) (<https://github.com/arayoshipta/projectPTAj>)を用いて行い、ピクセル値が0.9以上、サイズは5ピクセル四方の以上ものを輝点と定義した。検出された輝点からの総光子数を生画像から計算し、Origin7ソフトウェア(OriginLab)用いてヒストグラムにプロットした。

哺乳類発現ベクターの構築

哺乳細胞での安定した発現を確保するために、Life Technologies (GeneArt® Strings™ DNA Fragments)からコドンをヒトに最適化した mNeonGreen の DNA 断片を購入し、GeNL の mNeonGreen と置換した。eNL シリーズの DNA を、制限酵素サイト *BamHI* を含むセンスプライマー (F-BH1-koz-hmNG for GeNL, F- BH1-koz-gfp_1 for CeNL, YeNL and ReNL, F-BH1-Nluc_1 for OeNL) と制限酵素サイト *EcoRI*を含むアンチセンスプライマー (R-ER1-x-Nluc_171) PCR で増幅し、*NcoI/SacI* 制限酵素で処理した。この DNA 断片を、*BamHI/EcoRI* 制限酵素処理された pcDNA3 とライゲーションすることで、eNL-pcDNA3を得た。ペルオキシソームに局在させるために、制限酵素サイト *BamHI* を含むセンスプライマーと、制限酵素サイト *EcoRI* と Ser-Lyn-Leu (ペルオキシソーム局在配列) をコードする DNA を含むアンチセンスプライマー(R- Nluc_171-SKL-x-ERI)を用いて PCR 法を行い、pcDNA3 にサブクローニングした。eNL をミトコンドリア、細胞膜、核へ局在させるために、Nano-lantern のミトコンドリア発現ベクターpcDNA3-CoxVIIIx2-Nano-lantern (ヒトシトクロム c オキシダーゼのサブユ

ニット VIII に由来する局在シグナル)、細胞膜発現ベクターpcDNA3-lyn-Nano-lantern (Lyn キナーゼ由来のパルミトイ化配列、ミリストイル化配列)、核局在発現ベクターcDNA3-Nano-lantern-H2B(ヒストン 2B)の Nano-lantern 配列を eNL に置換した¹⁷。核小体、小胞体へ局在させるために、Phamret の核小体発現ベクターpcDNA3-Phamret-fibrillarin、小胞体発現ベクター pcDNA3-Phamret-ER (カルレティキュリン由来のシグナル配列、小胞体保持シグナル配列)、の Phamret 配列を eNL に置換した³⁵。eNL と ER 保持シグナル配列の間には、5 アミノ酸からなるリンカー(GGSGGT)が含まれている。パキシリン、ジキシン、ビメンチン、β-アクチンに局在させるために、pcDNA3-paxillin-Kohinoor、pcDNA3-zyxin-Kohinoor、pcDNA3-vimentin-Kohinoor、pcDNA3-Kohinoor-β-actin の Kohinoor 配列を eNL に置換した³⁶。eNL と パキシリン、ビメンチン、ジキシンの間には 17 アミノ酸からなるリンカー(GTGSGGGGGGGGGSGGS)、eNL と β-アクチンの間には 20 アミノ酸からなるリンカー(GGSGGSGGSGGSQEFQIST)が含まれている。クラスリンに局在させるために、pEGFP-N1-Kohinoor-clathrin の Kohinoor 配列を eNL に置換した³⁶。eNL とクラスリンの間には 12 アミノ酸からなるリンカー(RSRAQASNSAVD)が含まれている。GeNL を β-チューブリンに局在させるために、pEGFP-N1-β-tubulin-Kohinoor の Kohinoor 配列を eNL に置換した³⁶。eNL と β-チューブリンの間には 21 アミノ酸からなるリンカー(QSTGSGGGGSGGSTVPRARDP)が含まれている。CeNL、YeNL、OeNL、ReNL を β-チューブリンに局在させるために、PCR で増幅された β-チューブリン配列を pcDNA3-CeNL、pcDNA3-YeNL、pcDNA3-OeNL、pcDNA3-ReNL の eNL の上流にサブクローニングした。eNL と β-チューブリンの間には 23 アミノ酸からなるリンカー(QSTVPRARDPGSGGGSGGGSGEF)が含まれている。GeNL を ビンキュリンに局在させるために、PCR で増幅されたビンキュリン配列を、pcDNA3-GeNL の GeNL の下流にサブクローニングした。GeNL をリソソームに局在させるために、PCR で増幅された LAMP 配列 (リソソーム局在膜タンパク質) を、pcDNA3-eNL の eNL の上流にサブクローニングした。eNL と LAMP の間には 17 アミノ酸からなるリンカー(GTGGGGSGGGSGGS)が含まれている。LAMP とビンキュリンの cDNA 配列は、mRuby2-Lysosomes-20 と pEGFP

Vinculin のプラスミドをテンプレートとして PCR により増幅された。これらのプラスミドは、Michael Davidson と Kenneth Yamada 博士に分与していただいた。(Addgene plasmid # 55902, 50513)

HeLa 細胞の調製と発光画像の取得

HeLa 細胞を 37°C、5%CO₂条件下で、10% ウシ胎児血清(Fetal bovine serum, FBS, Sigma-Aldrich)を含む DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium、Sigma-Aldrich) 培地で培養した。トリプシン処理を行い細胞をはがし、コラーゲン I でコートされた 35 mm ガラスボトムディッシュに 24 時間後に 70~80% のコンフルエンシーになるように撒いた。ディッシュ 1 枚につき、500 μl OPTI-MEM(Gibco)に遺伝子導入試薬である Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Life Technologies) 10 μl とプラスミドベクター 4 μg を混合した溶液を加えた。5 種類野のプラスミドベクターを同時に導入する際は、それぞれのプラスミドが 0.8 μg ずつ混合し同様に溶液を調整した。溶液を加えて 6 時間後、新鮮な培地に交換し、さらに 16 時間培養を行った。フェノールレッドおよび FBS の入っていない DMEM 培地に交換し、観察の直前にフリマジン溶液を最終濃度 20 μM になるようにイメージング用培地に添加した。発光画像の撮影には、100 倍の対物レンズ(NA 1.4、UPlanSApo、オリンパス)、EM-CCD カメラ (ImagEM, 浜松ホトニクス) を備えた化学発光用倒立顕微鏡(LV-200、オリンパス)を使用した。クラスリン軽鎖と CeNL の融合タンパク質の化学発光画像の撮影は、100 倍の対物レンズ(NA 1.4、UPlanSApo、オリンパス)、EM-CCD カメラ (Evolve 512, Photometrics) を備えた蛍光倒立顕微鏡(IX83、オリンパス)を使用した。

リニアアンミキシング法を用いたマルチカラー発光イメージング

マルチカラー発光画像を取得するために、5 種類の融合タンパク質 (miti-NLuc、ER-CeNL、GeNL-fibrillarin、Lyn-OeNL、ReNL-H2B) が共発現する HeLa 細胞の発光画像を以下の 5 つのフィルターを介して取得した。Semrock FF01-447/60 filter、Olympus BA460-510CFP、Semrock

FF01-525/35、Semrock FF01-562/40、Semrock FF01-593/40 次に、それぞれの融合タンパク質を発現する 5 種類の HeLa 細胞を同一のフィルター、カメラのセッティングで画像取得した。このデータから、スペクトラムアンミキシングの係数のを決定した。この係数を用いて、共発現した画像から NLuc、CeNL、GeNL、OeNL、ReNL のシグナルを分離した。シグナルの分離、アンミキシング係数の算出には PrizMage ソフトウェア (Molecular devices)を使用した。

2.4 実験結果と考察

2.4.1 高光度化学発光タンパク質の発光特性の評価

開発したeNLシリーズの精製タンパク質の発光スペクトルを測定した。その結果、CeNL、GeNL、YeNL、OeNL、ReNLの発光スペクトルは、それぞれ475 nm、520 nm、530 nm、565 nm、585 nmに主要なピーク波長を示した（図2-1）。CeNL、GeNL、YeNLに関しては、ほぼアクセプター蛍光タンパク質からの発光のみが観測された。また、OeNL、ReNLについてもアクセプターからの発光強度がNLucからの発光強度の4倍、2倍であった。

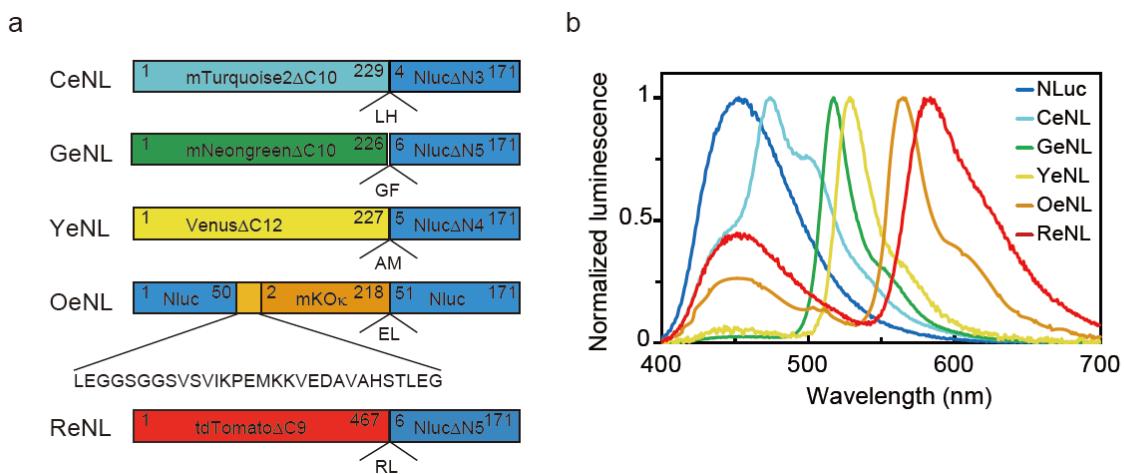


図2-1 高光度化学発光タンパク質eNLのドメイン構造と発光特性 (a) 各色eNLの構造、右上数字は各ドメインのアミノ酸番号、(b) フリマジン添加条件下 (20 μM) における発光スペクトル、各タンパク質の最大発光ピークで規格化

今回開発したeNLsの光度を既存の化学発光タンパク質と比較した。発光スペクトルの350 nm - 800 nmにおける全発光強度を縦軸に、横軸に主要な発光ピーク波長をプロットした（図2-2）。NLucに対するeNLシリーズの発光強度について議論するために、縦軸はNLucの全発光強度で規格化している。CeNLとGeNLについてはドナーであるNLucの2倍、1.8倍の輝度を示し、発光強度が増強された。しかしながら、YeNL、OeNL、ReNLについてはNLucの0.5倍、0.7倍、0.7倍の輝度を示し、発光輝度の増強は見られず減衰を示した。eNLシリーズの光度は、Nano-lanternシリーズの対応する色変異体と比較して、2倍~8倍になった。この結果は、NLucの基質代謝速度がNano-lanternシリーズのドナー、すなわちRLuc8_S257G、RLuc8.6のそれを上回ったためであると考えられる。

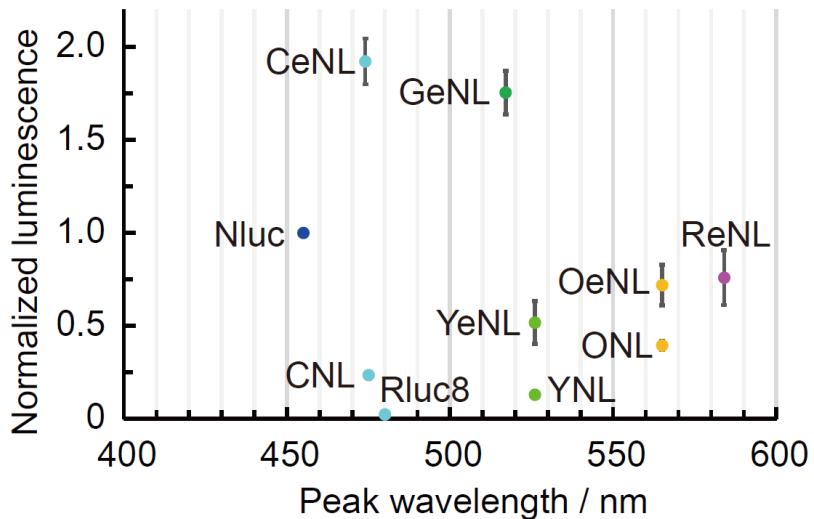


図 2-2 種々の化学発光タンパク質の全発光強度と発光ピーク波長の相関、NLuc の全発光強度を用いて規格化。エラーバーは標準偏差を表す。

2.4.2 FRET による発光増強メカニズムの探求

CeNL と GeNL で見られた発光増強効果の要因を調査するために、eNL シリーズおよび NLuc の量子効率 QY と基質代謝速度 k_{cat} の測定を行った。精製 eNL タンパク質に発光基質を規定量添加した後、発光基質が完全に消費されるまで連続的に発光強度を測定した。添加直後から発光消失するまでの間の総発光強度からフォトン数を計算し、添加した発光基質の分子数で除することで、QY を算出した(図 2-3a)。また、様々な基質濃度条件下における eNL の基質代謝速度の初速度を測定しプロットすると、初速度がミカエリス・メンテンの式に従って、上昇することが観測された(図 2-3b)。このプロットと QY から算出されたミカエリス・メンテン定数 K_m 、 V_{\max} 、 k_{cat} を表 2-1 に示した。

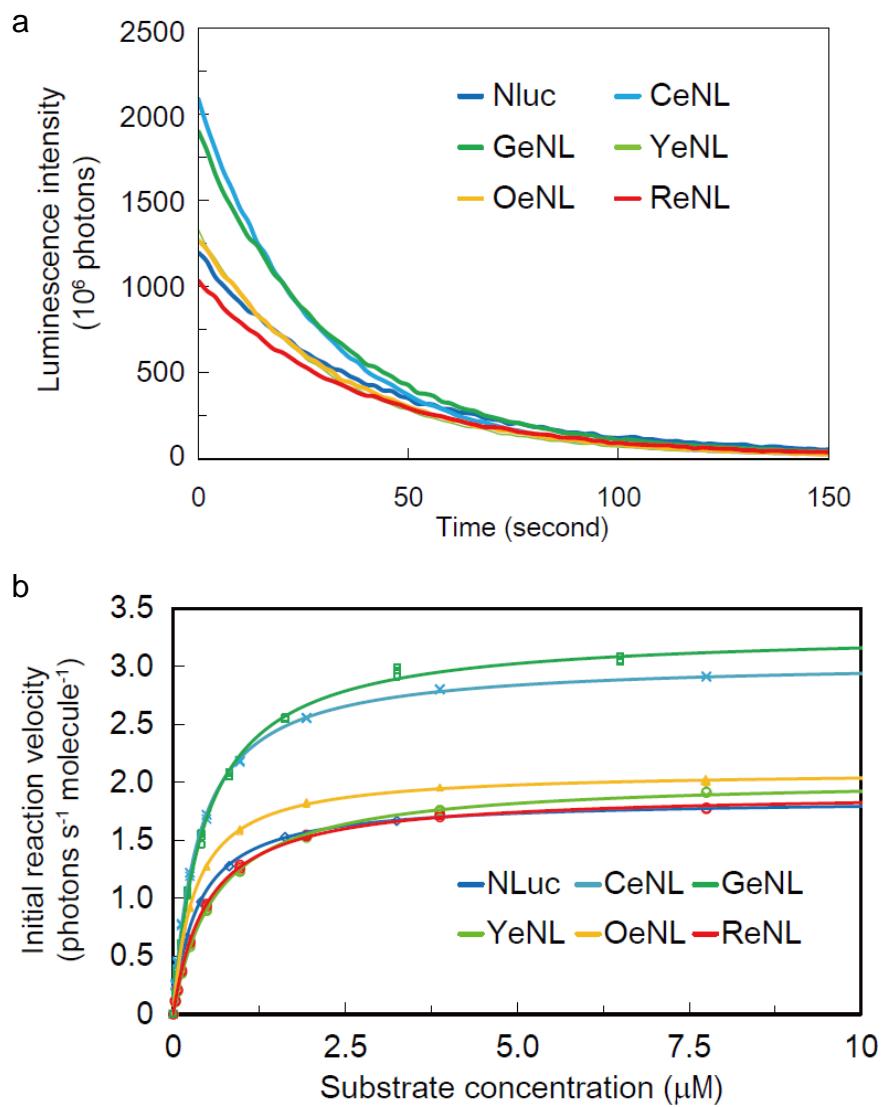


図 2-3 eNLs および NLuc の量子効率 QY、速度論パラメーターの測定

(a) フリマジン添加後の発光減衰曲線、(b) 発光反応初速度のフリマジン濃度依存性

表 2-1 NLuc および eNL の量子効率 QY と速度論パラメーター

	QY (%)	K_m (μM)	V_{\max} ($\text{photon s}^{-1} \text{molecule}^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})
NLuc	28 ± 3.0	0.36 ± 0.0038	1.9 ± 0.006	6.6 ± 0.73
CeNL	42 ± 1.1	0.37 ± 0.0042	3.0 ± 0.010	7.1 ± 0.19
GeNL	45 ± 1.8	0.47 ± 0.010	3.3 ± 0.021	7.3 ± 0.30
YeNL	33 ± 1.1	0.61 ± 0.0088	2.0 ± 0.088	6.1 ± 0.34
OeNL	30 ± 0.48	0.31 ± 0.0025	2.1 ± 0.043	7.0 ± 0.18
ReNL	26 ± 1.0	0.49 ± 0.0064	1.9 ± 0.069	7.3 ± 0.20
Rluc8 ^a	5.8 ± 0.63	2.0 ± 0.057	0.22 ± 0.0018	3.8 ± 0.12

a) 0.1% BSA 添加のもとで測定

eNL シリーズの基質代謝速度 k_{cat} は 6.1-7.3 の値を取り顕著な違いは見られず、また NLuc 単体の k_{cat} (6.6 s^{-1}) とも大きな違いはなかった。また、 K_m についてもほぼ同様の値を示した。すなわち、蛍光タンパク質の融合または挿入による NLuc 部位の酵素活性への影響は非常に少ないことが示唆された。対して、GeNL と CeNL の QY (それぞれ 45%、42%) は NLuc(28%)よりも大きく、YeNL、OeNL、ReNL の QY は NLuc とほぼ同等の値を示した。すなわち、GeNL と CeNL の発光増強の要因は、QY の高いアクセプター蛍光タンパク質へ効率的なエネルギー移動が起き、高い QY で発光したことによることが強く示唆された。しかしながら、YeNL、OeNL、ReNL では QY の高い蛍光タンパク質(Venus 0.65, mKO 0.61, tdTomato 0.55)にエネルギー移動が起きているにも関わらず、QY の増強が観測されなかった。また、GeNL では蛍光量子収率 0.80 の mNeonGreen に高い FRET 効率でエネルギー移動が起きているにも関わらず、QY が 0.8 に漸近せずに半分程度の 0.45 になった。これらの結果は、NLuc からの放射失活、蛍光タンパク質へのエネルギー移動以外の過程でエネルギーが散逸していることを示唆するものである。このエネルギー散逸の分子機構は今のところ不明である。

2.4.3 単分子からの化学発光観察

増強された GeNL、CeNL の強い発光シグナルは、非常に少ないターゲット分子を検出する際に有用となる。究極的な課題として、化学発光タンパク質の 1 分子からの発光を検出できるかどうかを調査した。Ni-NTA で修飾されたガラス表面にヒスチジンタグでラベル化された GeNL タンパク質 (his-GeNL) を固定化した。フリマジンを添加し高感度カメラを用いて撮影することによって、1 分子からの化学発光が検出された (図 2-4a)。単一輝点からは 75 ± 30 個の光子が観測され (図 2-4b)、この値は 2.4 で測定されたパラメーターから算出される値と (89 ± 0.57 個) 良く一致した。または、単一輝点を経時的に観察すると、バックグラウンドに近い状態と 75 ± 30 個の光子を放出する状態の間を二值的に遷移することが判明した (図 2-4c)。これは Ni-NTA とヘキサヒスチジンの間の解離 ($\tau_{\text{fast}}=110$ s and $\tau_{\text{slow}}=386$ s) が観察の間に起こり³⁷、his-GeNL とガラス表面の Ni-NTA の間の結合・解離を観察していると考えられる。これらのデータは、今回検出された輝点が单一 GeNL 分子からの発光であることを強く示唆するものである。また、化学発光を用いて單一分子レベルの結合解離を可視化した始めての例である。

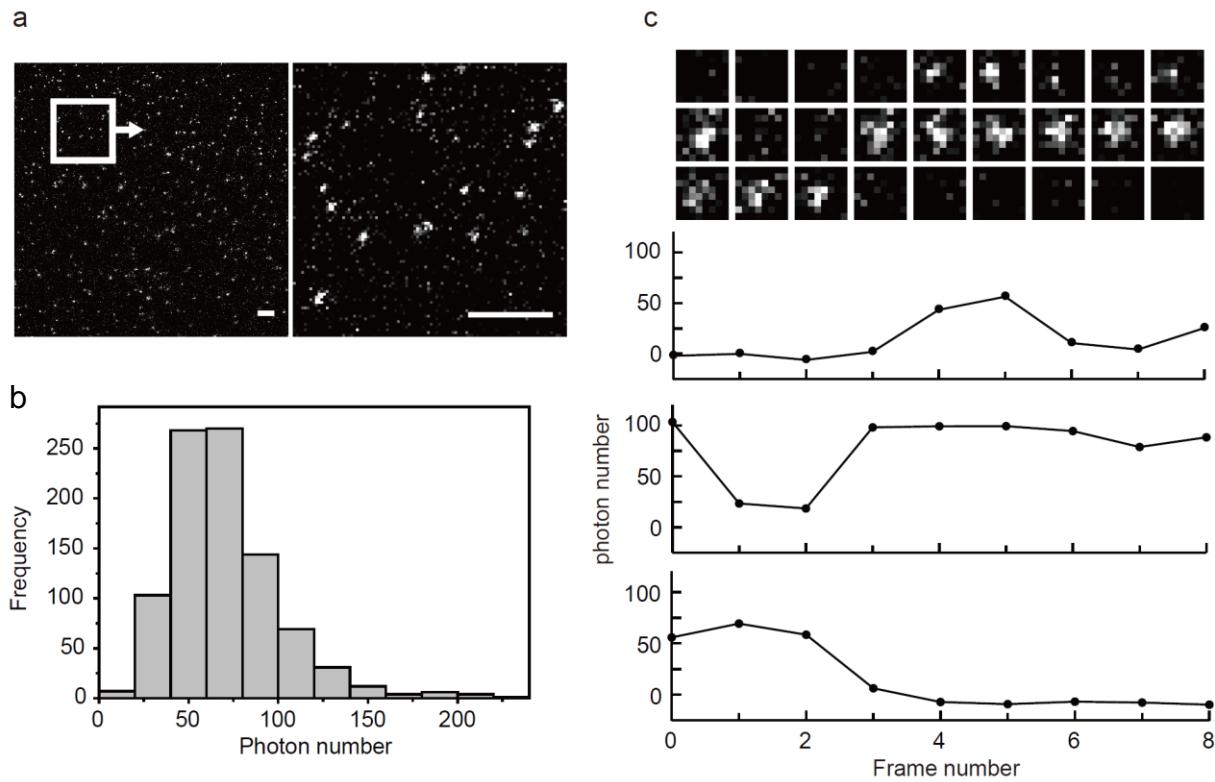


図 2-4 単分子 GeNL からの発光検出

(a) ガラス表面に固定化された GeNL に対して、 $50 \mu\text{M}$ フリマジンを添加し 180 秒の露光時間で撮影した画像。右の画像は、左の白い四角の中の拡大画像、スケールバーは $10 \mu\text{m}$ を示す。(b) 単一の輝点から露光時間内に検出された光子の数のヒストグラム、(c) 代表的な三つの単一輝点画像の時間変化。さらに単一輝点からの検出された光子数の時間変化。

2.4.4 各種細胞内構造物への局在能の評価

GeNL と種々のタンパク質を融合、または GeNL に細胞小器官への局在シグナルを付加することで、(b) 核、(c) ミトコンドリア、(d) 小胞体、(e) 細胞膜、(f) ペルオキシソーム、(g) リソソーム、(h) 核小体、(i) アクチン、(j) チューブリン、(k) ビメンチン、(l) ピンキュリシン、(m) ジキシン、(n) パキシリンに局在化可能であることを確かめた(図 2-5)。他の eNL についても、少なくとも細胞質、核、ミトコンドリア、小胞体、細胞膜、リソソーム、アクチンに問題なく局在化した(図 2-6、7、8、9)。全ての eNL は、単量体である特性が求められるチューブリンにも問題なく局在をしたため、eNL は細胞内では単量体として働いていることが示唆された。これらの結果は、eNL がタンパク質の局在を観察するためのタグとして十分な性能を有していることを示すものである。

(o) クラスリン軽鎖と CeNL の融合タンパク質は、斑点状の局在と核周辺部への局在を示した(図 2-10)。これは、先行研究で蛍光タンパク質を用いて Wide-field 顕微鏡で観察された局在と一致した³⁸。この斑点構造はクラスリンコーティッドピットと呼ばれ、180 個のクラスリン軽鎖と重鎖が会合したサッカーボール状の超分子複合体である³⁹。言い換えると、eNL の増強された発光シグナルは、180 個程度のタンパク質から成る超分子複合体を可視化したことを意味する。

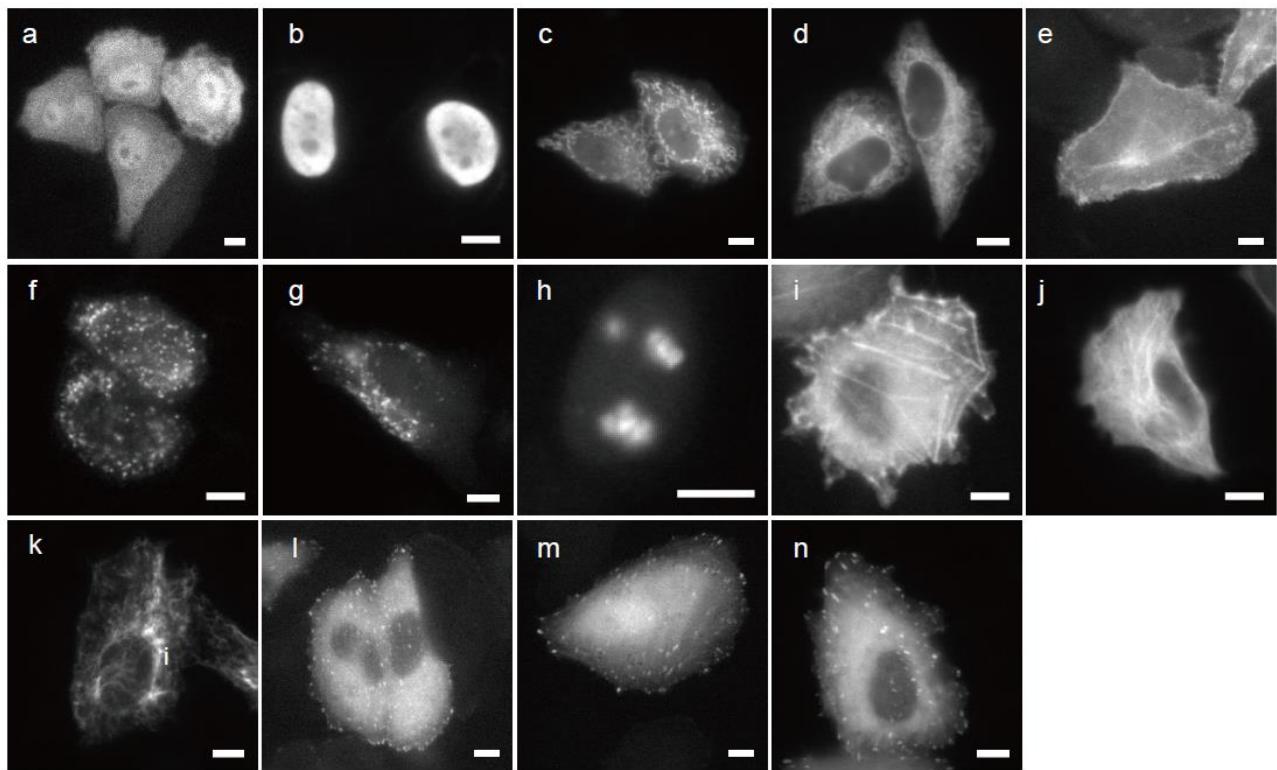


図 2-5 細胞小器官、細胞内構造体への局在シグナルを付加した GeNL タンパク質の発光画像 (a) 細胞質、(b) 核、(c) ミトコンドリア、(d) 小胞体、(e) 細胞膜、(f) ペルオキシソーム、(g) リソソーム、(h) 核小体、(i) アクチン、(j) チューブリン、(k) ビメンチン、(l) ビンキュリン、(m) ジキシン、(n) パキシリソーム、(o) クラスリン軽鎖と CeNL の融合タンパク質の発光画像、スケールバーは 10 μm を示す。

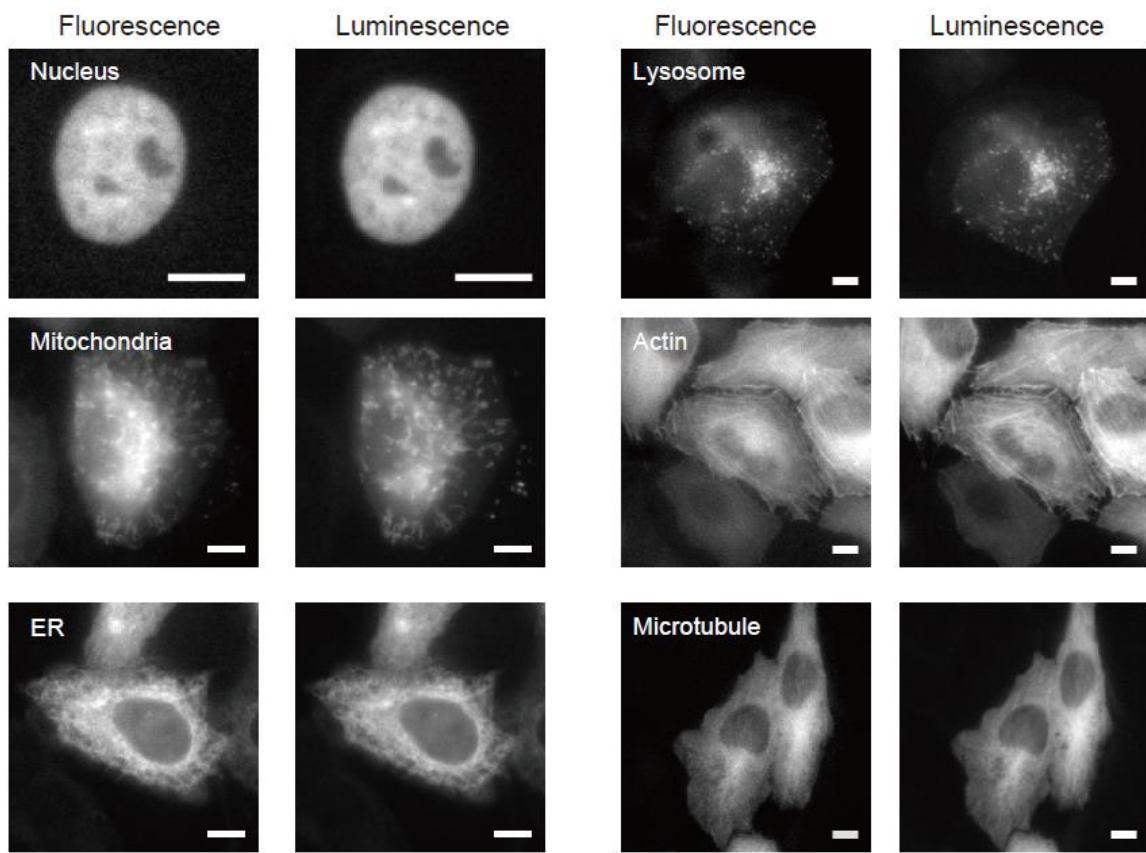


図 2-6 細胞小器官、細胞内構造体への局在シグナルを付加した CeNL タンパク質の発光および蛍光画像、核、ミトコンドリア、小胞体、リソソーム、アクチン、チューブリン、スールバーは 10 μm を示す。

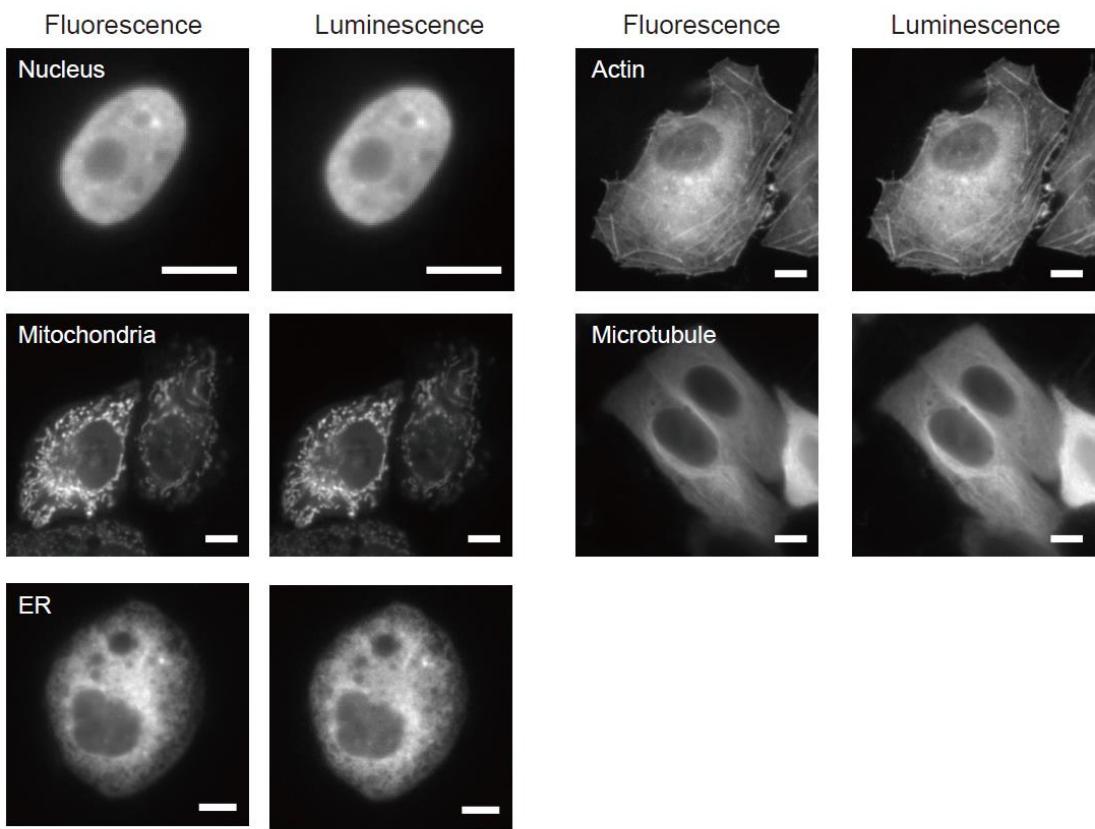


図 2-7 細胞小器官、細胞内構造体への局在シグナルを付加した YeNL タンパク質の発光および蛍光画像、核、ミトコンドリア、小胞体、アクチン、チューブリン、スケールバーは 10 μm を示す。

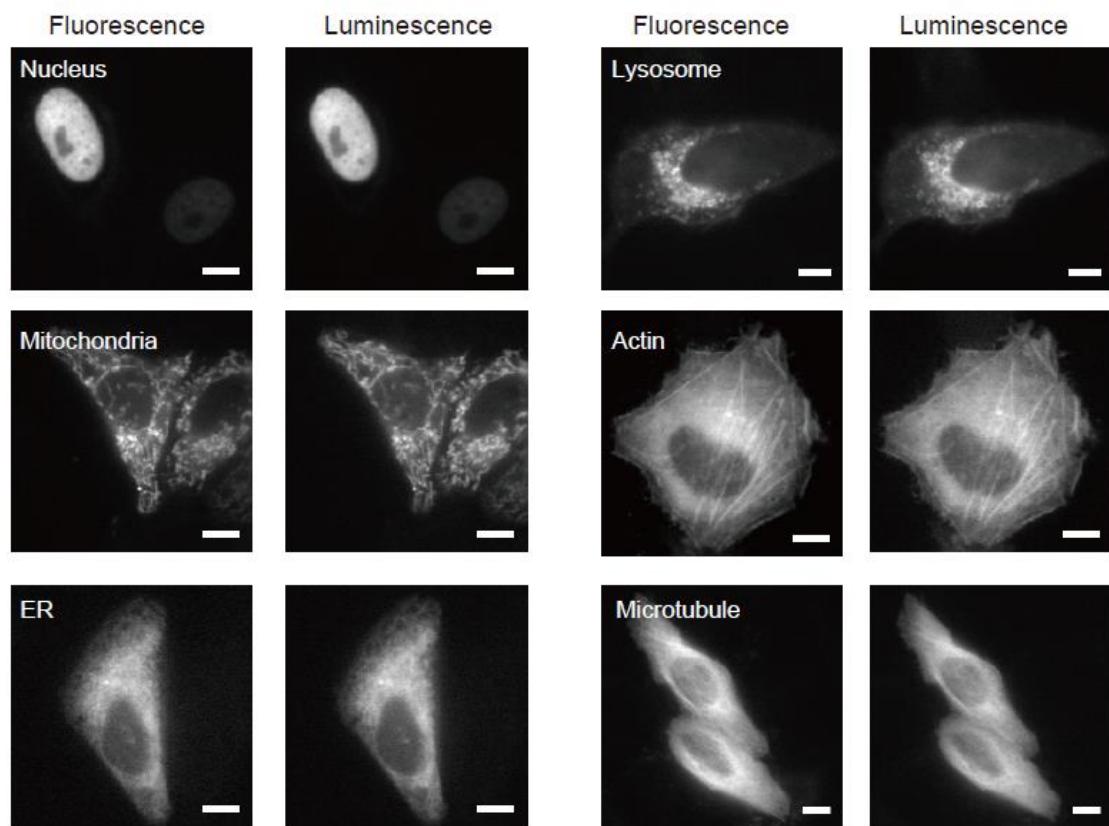


図 2-8 細胞小器官、細胞内構造体への局在シグナルを付加した OeNL タンパク質の発光および蛍光画像、核、ミトコンドリア、小胞体、リソゾーム、アクチン、チューブリン、スケールバーは 10 μm を示す。

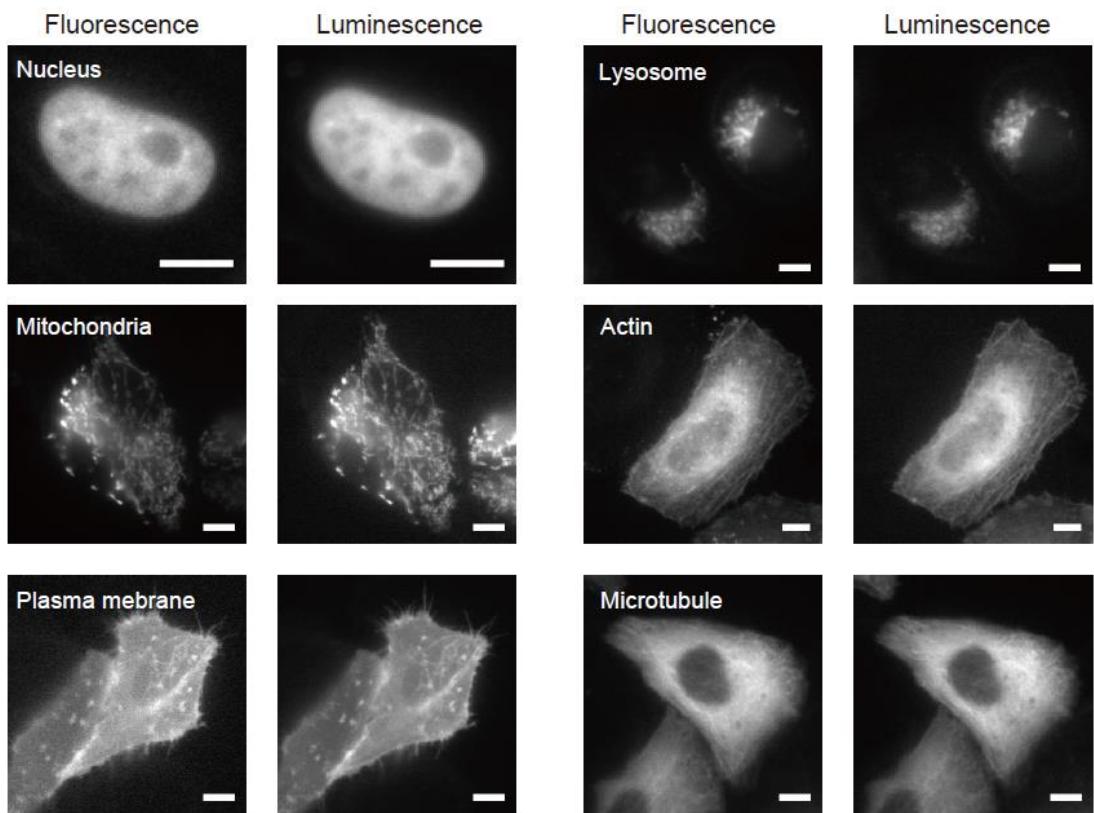


図 2-9 細胞小器官、細胞内構造体への局在シグナルを付加した ReNL タンパク質の発光および蛍光画像、核、ミトコンドリア、細胞膜、リソソーム、アクチン、チューブリン、スケールバーは 10 μm を示す。

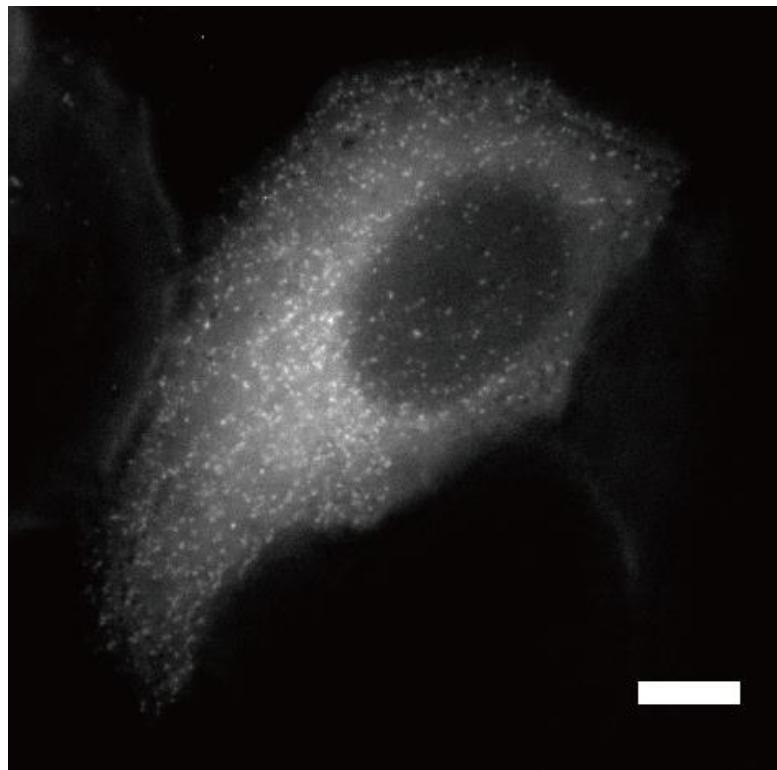


図 2-10 クラスリン軽鎖と CeNL の融合タンパク質の発光画像、スケールバーは $10 \text{ } \mu\text{m}$ を示す。

2.4.5 マルチカラー発光画像取得

eNL を用いることで、細胞内の複数の構造体を同時に可視化することができるかを検証した。NLuc、CeNL、GeNL、YeNL、OeNL、ReNL は、それぞれ特徴的な発光スペクトルを有しているため、発光ピーク波長を含む適当な干渉フィルターを用いることで各色の発光画像を連続的に取得可能である。しかしながら、NLuc および eNL の発光スペクトルがあまりにもブロードであるため、無視できない量のシグナルが隣接するチャネルに紛れ込んでしまう。そこで、互いのチャネルへ発光シグナル混入割合を計算して真のシグナルを算出する linear unmixing 法により行い、多色発光画像の分離を行った⁴⁰。以下のその理論を説明する。

$$\begin{pmatrix} 1 & C_1 & G_1 & O_1 & R_1 \\ N_2 & 1 & G_2 & O_2 & R_2 \\ N_3 & C_3 & 1 & O_3 & R_3 \\ N_4 & C_4 & G_4 & 1 & R_4 \\ N_5 & C_5 & G_5 & O_5 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_N \\ I_C \\ I_G \\ I_O \\ I_R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} CH1 \\ CH2 \\ CH3 \\ CH4 \\ CH5 \end{pmatrix}$$

ここで、CH1、CH2、CH3、CH4、CH5 は NLuc、CeNL、GeNL、OeNL、ReNL の各発光取得用チャネルで検出した発光強度を表す。NLuc、CeNL、GeNL、OeNL、ReNL の各チャネルへの寄与を、各発光シグナルを本来取得すべきチャネル（例えば NLuc であれば CH1）の光度値で規格化した N_n 、 C_n 、 G_n 、 O_n 、 R_n （下付の n はチャネルの番号を表す）とする。そして、最終的に求めたいのは、NLuc、CeNL、GeNL、OeNL、ReNL それぞれの CH1、CH2、CH3、CH4、CH5 における正味の蛍光輝度値であり、それを I_N 、 I_C 、 I_G 、 I_O 、 I_R と表している。

$$\begin{pmatrix} I_N \\ I_C \\ I_G \\ I_O \\ I_R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & C_1 & G_1 & O_1 & R_1 \\ N_2 & 1 & G_2 & O_2 & R_2 \\ N_3 & C_3 & 1 & O_3 & R_3 \\ N_4 & C_4 & G_4 & 1 & R_4 \\ N_5 & C_5 & G_5 & O_5 & 1 \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} CH1 \\ CH2 \\ CH3 \\ CH4 \\ CH5 \end{pmatrix}$$

I_N 、 I_C 、 I_G 、 I_O 、 I_R は、 N_n 、 C_n 、 G_n 、 O_n 、 R_n 行列の逆行列を計算し、左からかけることで解析的に得ることが出来る。実際の画像処理ではこの操作をピクセルごとに行い、正味の発光画像を取得する。

NLuc および eNL タンパク質を単独に発現する細胞に用意し、全てのチャンネルで発光画像を取得し(図 2-11a、b)、各タンパク質の各チャンネルへのシグナル混入割合、すなわち N_n 、 C_n 、 G_n 、 O_n 、 R_n の行列を得た。 N_n 、 C_n 、 G_n 、 O_n 、 R_n の行列から逆行列を計算した。次に NLuc、ER-CeNL、GeNL-fibrillarin、Lyn-OeNL、ReNL-H2B の各化学発光タンパク質を共発現させた細胞を用意し、同じ干渉フィルターのセットで各チャンネルでの発光画像を撮影した。これは、CH1、CH2、CH3、CH4、CH5 の行列に対応するものである。それらチャネルの画像に対してさきの逆行列を作用させることで、多色発光画像の分離を行うことに成功した(図 2-12)。

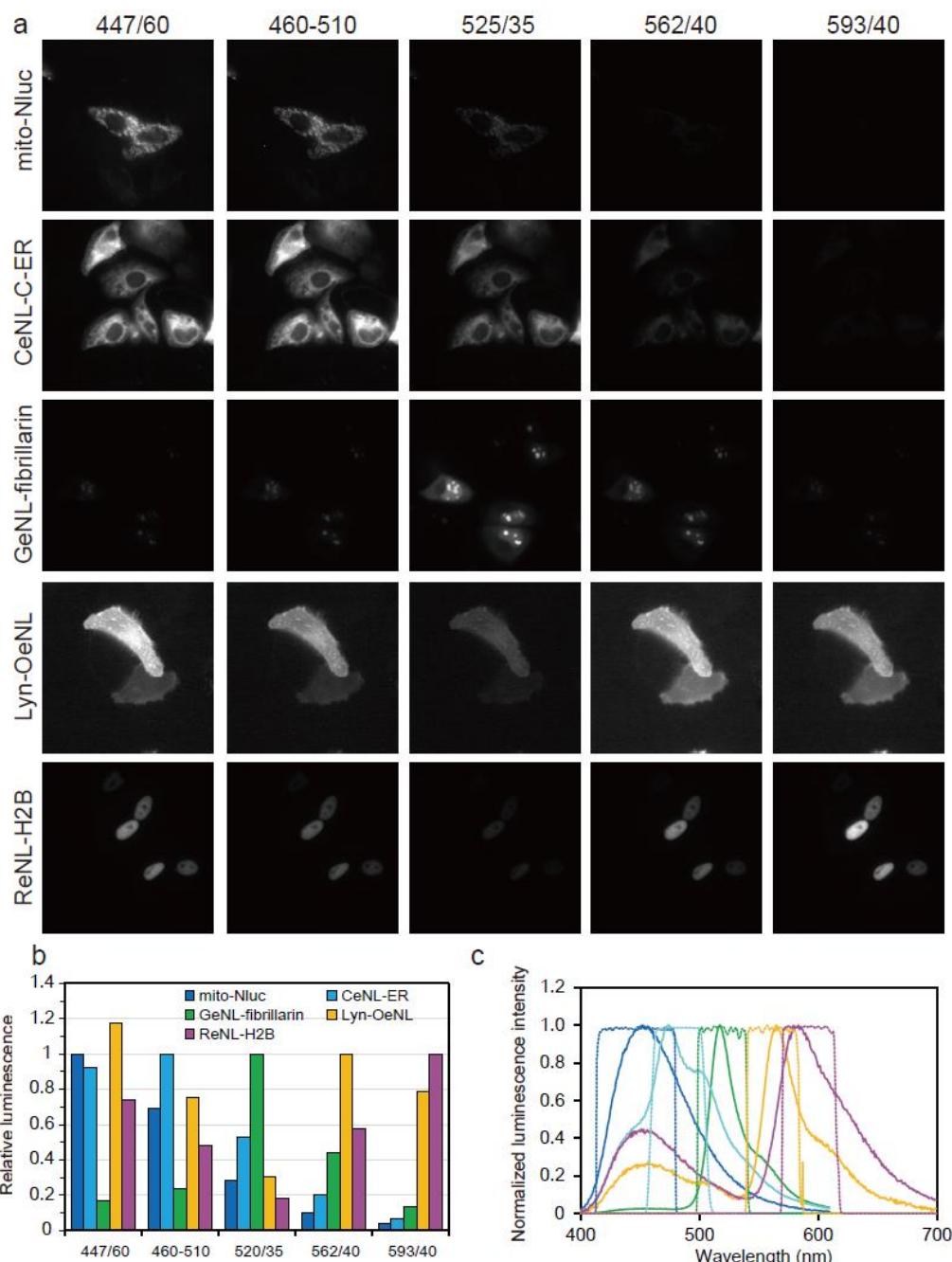


図 2-11 NLuc および eNLs シグナルの各チャネルへの混入割合の計算

(a) NLuc および eNL タンパク質を単独に発現する細胞を異なる 5 つの干渉フィルターを介して発光を観察した画像、(b) 各タンパク質の各チャンネルへのシグナル混入割合、(c) NLuc と eNLs の発光スペクトルと 5 種類の干渉フィルターの波長特性。

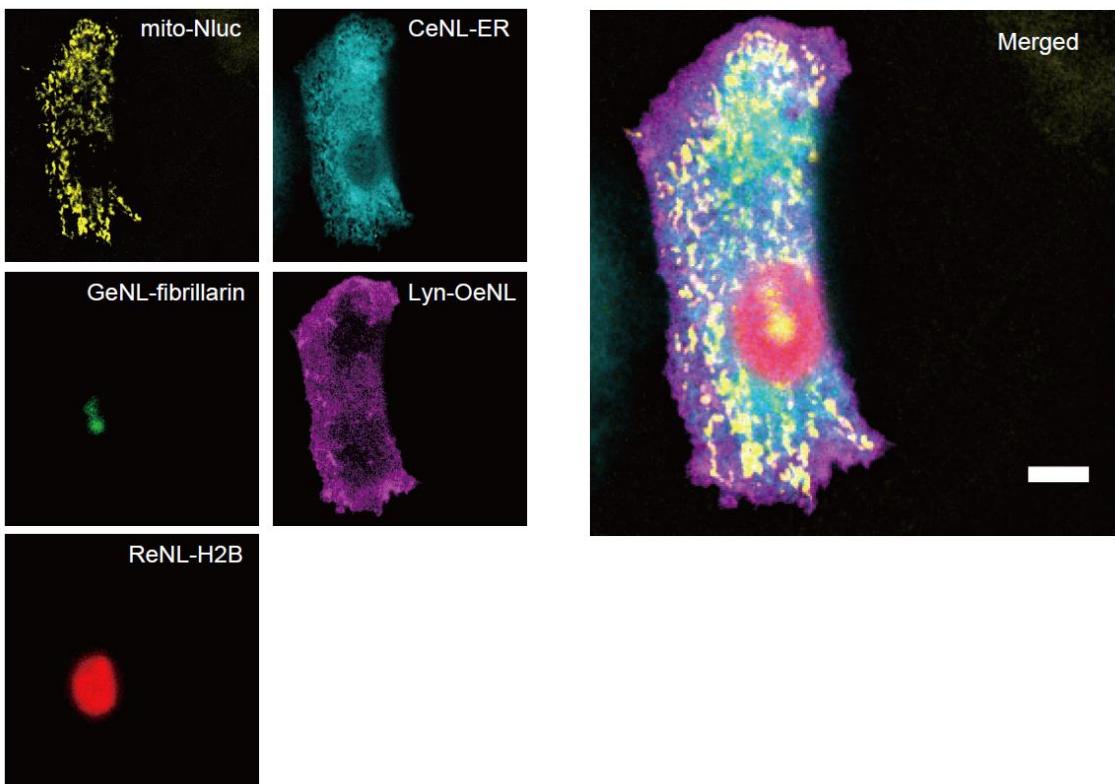


図 2-12 細胞内構造体のマルチカラー発光画像

HeLa 細胞に対して、mito-NLuc、CeNL-ER、GeNL-fibrillarin、Lyn-OeNL、ReNL-H2B を共発現させて発光画像を取得。(左) linear unmixing 法により、各色のシグナルを分離した。(右) 分離後の画像の重ね合わせ像、スケールバーは 10 μm を示す。

図 2-11b に示したように、OeNL を除く eNL シリーズはアクセプターの発光ピーク波長を含む干渉フィルターのチャンネルで最も強い発光強度を示している。これは、eNL シリーズは哺乳類細胞中においても NLuc から蛍光タンパク質へ効率よく FRET が起こり、アクセプターから発光が起こっていることを示唆している。対して、OeNL は精製タンパク質では蛍光タンパク質由来の発光ピーク強度が、NLuc の発光ピーク強度の 4 倍以上であるのに反して、NLuc の発光ピーク波長を含む干渉フィルターのチャンネルの方が強い発光強度を示した。これは、OeNL は哺乳類細胞中において効率よく FRET が起こっていないことを示唆している。正確な要因は不明であるが、NLuc の内部に mKO κ を挿入したことが一因であると考えられる。

NLuc および eNL の波長変異体を組み合わせることで、5 種類の細胞内構造体を同時に可

視化することに成功した。同様の 5 色イメージングを蛍光タンパク質を用いて行うとすると、細胞にとって有害な紫外光や青色光励起を必要とする青色蛍光タンパク質(BFP)、またはシアン色蛍光タンパク質(CFP)を使わざるを得ず、細胞へ与える光毒性が懸念される⁴¹。対して、これらの発光画像は、励起光照射を全く行わずに撮影されたものであり、発光イメージングならびに多彩な波長変異体の有用性を示すものであると言える。

2.5 展望

eNL は既存の化学発光タンパク質と比較すると 10~100 倍の発光輝度を有しているが、蛍光タンパク質よりは未だ劣っている。今後も継続した化学発光タンパク質の高輝度化の試みが必要である。本研究で示したように、化学発光タンパク質の量子効率 QY は蛍光タンパク質とのハイブリッドにより向上させることが出来るが、QY は 1 を超えることはない。従つて、化学発光タンパク質の更なる高輝度化にはルシフェラーゼの基質代謝速度 k_{cat} の劇的な向上が不可欠であろう。

本研究で示したようにeNLの増強されたシグナルは、少数の分子を可視化するときに有效地に働くと考えている。近年、CRISPR-Cas9を用いたゲノム編集記述が隆盛をむかえ、容易に内在性のタンパク質をラベル化することが可能になった。しかしながら、内在性のタンパク質の中には発現量が低く蛍光を用いて観察することが困難なものがある。特にサンプルが強い自家蛍光を有する場合は、蛍光観察は不可能である。eNLを用いて、これまで蛍光では観察されてこなかった細胞内に少数しか存在しないタンパク質の動態を可視化することが期待される。

三章：ルシフェラーゼ再構成法による機能性指示薬の開発

3.1 背景

化学発光タンパク質は、様々な細胞内環境の変化を検出する指示薬としても用いられている。その多くは、化学発光タンパク質と環境変化に伴い変化する因子により構造変化するセンシングドメインの組み合わせにより構築されている。本項目では、それらの中で代表的な指示薬を紹介する。

3.1.1 単一タンパク質に基づく化学発光性機能性指示薬

单一タンパク質に基づく化学発光性機能性指示薬の動作原理はルシフェラーゼ再構成法に基づいている。ルシフェラーゼ再構成法とは、ルシフェラーゼを2つに分割し、その間にセンシングドメインを挿入する。センシングドメインの構造変化により分割されたルシフェラーゼが再構成され、活性が回復することを利用する。Nano-lantern(Ca^{2+})は、YNL の RLuc8 の部位に Ca^{2+} 結合タンパク質カルモジュリン (CaM) とその結合ターゲット配列である M13 ペプチドが挿入された構造を持つ¹⁷ (図 3-1a)。 Ca^{2+} の結合に伴う CaM-M13 複合体形成により分子全体がコンパクトな構造をとり、分割されたルシフェラーゼが再構成される。RLuc8 の挿入部位をいくつか検討した結果、 Ca^{2+} により発光強度が 300% 変化した¹⁷ (図 3-1b)。Nano-lantern(Ca^{2+})を、青色光照射により神経活動を興奮させることができるチャンネルロードシン ChR2 と共にラット海馬由来の神経細胞に発現させ、光照射に伴う Ca^{2+} 変動を捉えることに成功した。このほかにも同様の原理で cAMP 結合ドメイン EPAC、F₀F₁-ATPase の ε-subunit をセンシングドメインとして用いることで、化学発光性 cAMP 指示薬 Nano-lantern(cAMP)、化学発光性 ATP 指示薬 Nano-lantern(ATP)が開発された¹⁷。Nano-lantern(cAMP) は、光感受性の高い細胞性粘菌の走化性応答過程における cAMP によるシグナル伝播の様子を可視化し、Nano-lantern(ATP)は光合成による緑葉体中の ATP 産生と ATP 消費の動態を明らかにした。

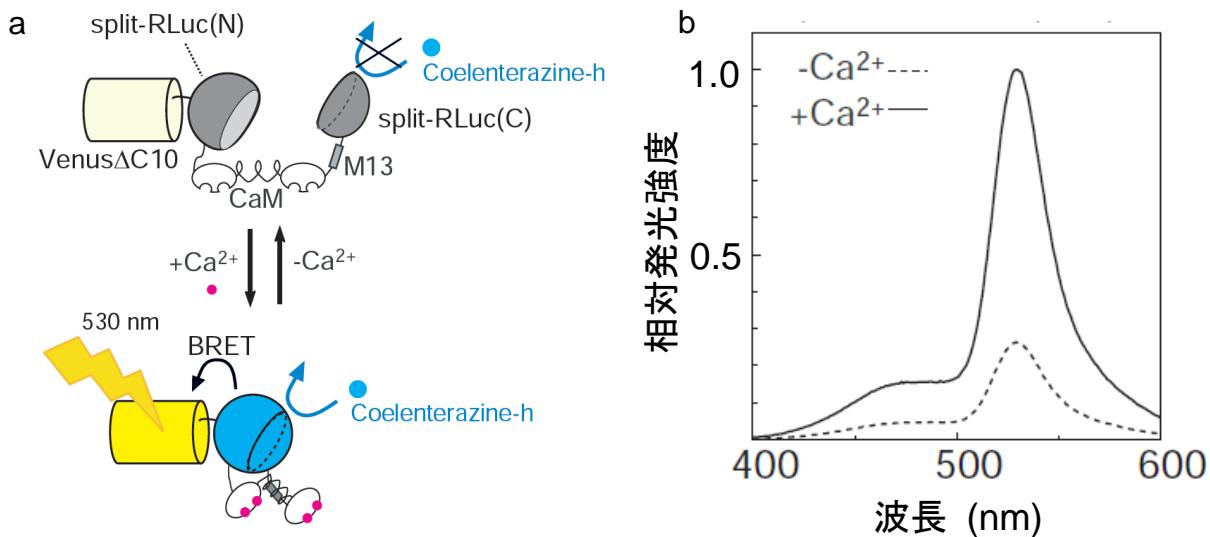


図 3-1 単一タンパク質に基づく化学発光性機能性指示薬 Nano-lantern(Ca^{2+}) [文献¹⁷から引用] (a) Nano-lantern(Ca^{2+})の動作原理、CaM-M13 の構造変化により RLuc 部位が再構成し FRET が起きて蛍光タンパク質が発光する (b) Ca^{2+} による発光スペクトル変化

いずれのイメージングも、励起光を必要とする蛍光イメージングでは観察が難しい生命現象を可視化しており、化学発光性機能性指示薬が蛍光性指示薬ではなし得なかった生命現象にアプローチできる可能性を大いに示したと言える。

3.1.2 FRETに基づく発光性機能性指示薬

BRET-based Auto-luminescent Ca^{2+} -indicator (BRAC)は CaM と M13 ペプチドを、蛍光タンパク質 Venus および化学発光タンパク質 RLuc8 でサンドイッチした構造をもつ⁴²。 Ca^{2+} の結合に伴う CaM-M13 複合体形成により分子全体がコンパクトな構造をとり、RLuc8-Venus 間の距離が縮まり FRET が起こる。多数の分子を観測した場合、FRET の大きさは Ca^{2+} 濃度に応じることになるので Ca^{2+} 濃度を、Venus の発光強度と RLuc8 の発光強度の比率（レシオ）の変化として計測可能である（図 3-2）。BRAC は Ca^{2+} により レシオが 60% 変化し、培養細胞と植物シロイヌナズナにおいて、ライブイメージングが可能であることを報告した。

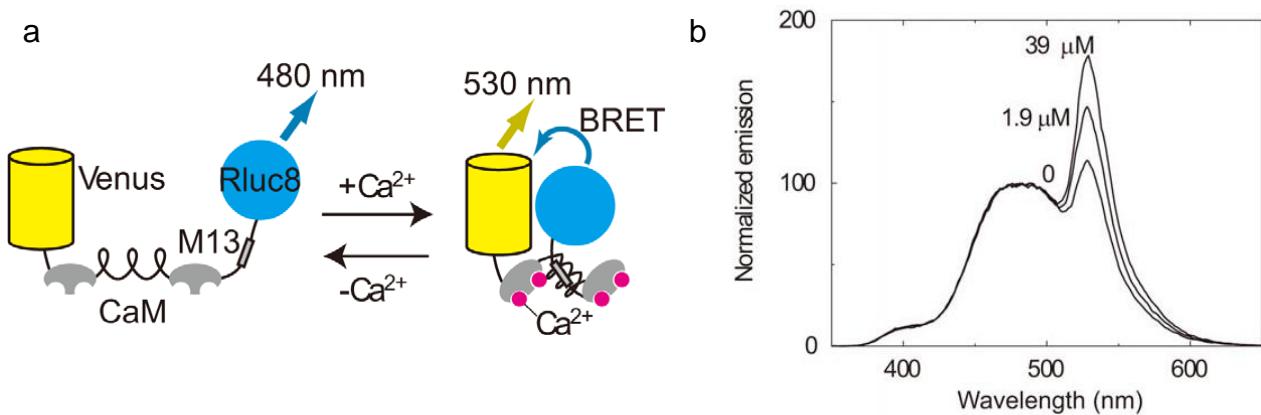


図 3-2 BRAC の動作原理と Ca²⁺応答性

(a) BRAC の動作原理の模式図、Ca²⁺により CaM-M13 融合タンパク質がコンパクトな構造をとり、RLuc8 と Venus が近接するため FRET が起きる。(b) 各 Ca²⁺濃度における BRAC の発光スペクトル [文献^{17, 42}から引用]

BRAC は、二つのチャンネルの比率を常に測定するレシオメトリックタイプの指示薬であるため、発光基質消費による発光強度の減衰やサンプルのモーションアーティファクトの影響を受けることなく、安定したイメージングが可能である。しかしながら、シグナル強度が弱く一枚の発光画像の撮像に 1 秒を要していることから、より高輝度な発光指示薬が求められる。

3.2 目的・意義

細胞の生理状態に関わる生理活性物質のイメージングは、これまで蛍光タンパク質、有機蛍光色素に基づく機能性指示薬を用いて、励起光照射下で行われてきた。特に細胞内セカンドメッセンジャーである Ca^{2+} の濃度は、筋肉細胞や神経細胞では高速かつダイナミックに変化しているために、その動態を可視化するために細胞を強烈な励起光に曝しながら高速で画像を取得してきた。こうした強烈な光照射に伴う光毒性を避けるために、3.1.1、3.1.2 で紹介したように化学発光で駆動する Ca^{2+} 指示薬の開発が行われてきた。しかしながら、これまでの化学発光性 Ca^{2+} 指示薬は、RLuc を活用したものに限定されていた。したがって、NLuc を活用した化学発光性 Ca^{2+} 指示薬は、より高光度で高速なイメージングを可能にすると期待される。

本章は、二章で開発した高輝度化学発光タンパク質 GeNL を基盤として高性能な発光性 Ca^{2+} 指示薬を開発し、細胞内の高速な Ca^{2+} 動態を光毒性無しで観察できることを証明する。

設計指針

Ca^{2+} 検出手法として、3.1.1 で紹介した Nano-lantern(Ca^{2+}) と同様にルシフェラーゼ再構成法を用いることとした。この方法は、一般的にシグナル変化量が FRET 効率の変化に基づくものと比較して高く、またルシフェラーゼ内でセンシング機構が完全に閉じているので、GeNL だけでなく容易に他の色変異体に拡張可能である。発光性 Ca^{2+} 指示薬の Ca^{2+} -センシングドメインとして Nano-lantern(Ca^{2+}) と同じく CaM-M13 を選択した。

ルシフェラーゼ再構成法の先行研究から、構造化されていないループの領域にセンシングドメインを挿入することで、ルシフェラーゼの機能を損なうことなく指示薬として働くことが報告されている⁴³。図 1-17 の NLuc の予測三次元構造からループ領域を予測することが可能であり、構造情報に基づく合理的な設計が可能である。対して、GFP の円順列変異体 (cpGFP)に基づく発光性 Ca^{2+} 指示薬である GCaMP は、センシングドメインを β ストランドの内部に配置させることで、 Ca^{2+} 結合に伴うセンシングドメインの構造変化を大きな蛍光シグ

ナル変化量に繋げている。従って、NLuc 内の構造化された領域内にも、潜在的に有用な挿入サイトがあると考えた。そこで、本研究ではループ領域および構造化された領域に存在する挿入サイトを網羅的に探索するために、構造情報に基づかず挿入サイトを探索することにした。

CaM-M13 は、 Ca^{2+} 結合時は N 末端と C 末端の距離が近く、 Ca^{2+} 解離時は離れると考えられている。そこで、短いペプチドを NLuc の内部に挿入した変異体ライブラリーを構築し、これを Ca^{2+} 結合時の CaM-M13 の擬似モデルとした。この状態で明るく光る変異体をスクリーニングすることで、 Ca^{2+} 結合時に酵素活性を保ち明るい変異体を濃縮できると期待した。そして得られた挿入サイトの候補に対して、実際に CaM-M13 を挿入した変異体を構築することとした。

短いペプチドを NLuc の内部に挿入した変異体ライブラリーの構築は、トランスポゾンを用いたランダム挿入変異法を採用した⁴⁴。NLuc のランダムの位置に 5 アミノ酸から成るペプチドを挿入された変異体ライブラリーを作成し、その中から明るく化学発光する変異体をスクリーニングした(図 3-3)。

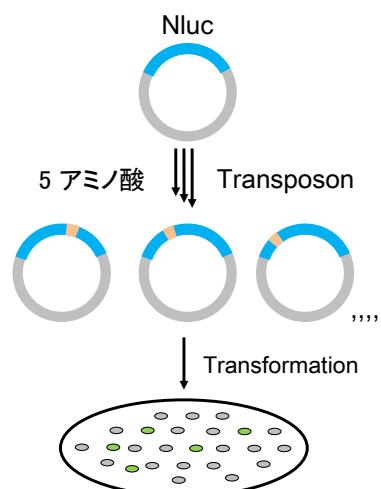


図 3-3 5 アミノ酸からなるペプチドの挿入を許容する NLuc のマッピング

3.3 方法と材料

NLuc の CaM-M13挿入サイトの探索

NLuc の挿入変異ライブラリーの構築は、Mutation Generation System™ Kit (Thermo Scieitific) を用いて行われた。図 3-4 に全体の概略図を示す。まず、カナマイシン遺伝子を有するエントラントスボゾンを、*in vitro* トランスポゾン反応を用いて NLuc 発現プラスミドベクターのランダムな箇所に挿入する。そして、NLuc の両端の位置する制限酵素サイトで処理を行い、NLuc とエントラントスボゾンの合計の長さの DNA 断片を抽出し、新たに調整した線状プラスミドベクターにサブクローニングする。これにより、プラスミドベクターのバックボーン領域にエントラントスボゾンが挿入されたプラスミドを除去できる。最後に、エントラントスボゾン領域の両端に位置する二箇所の同一の制限酵素サイトで切断、エントラントスボゾンを除去した後、プラスミドベクターを自己環化させる。これにより、NLuc のランダムな箇所に 5 コドンからなる DNA 配列が挿入された変異体ライブラリーを得ることができる。

in vitro トランスポゾン反応は、280 ng の pRSET_B-NLuc とカナマイシン耐性遺伝子を含む M1-Kan^R エントラントスボゾンを用いて行った。反応混合物で大腸菌 XL-10Gold を形質転換し、カルベニシンとカナマイシン(25 μg mL⁻¹)を含む 2 枚の 10 cm LB 寒天培地上に植菌した。37°C で 12 時間培養した後、すべてのプレートからコロニーをかきとり、プラスミドを精製した。プラスミドを制限酵素 *BamHI/EcoRI* で処理し、アガロースゲル電気泳動でサイズごとに分画した。1.6-kb のサイズのバンドを(0.5 kb NLuc + Entranceposon)を回収、DNA を抽出し、*BamHI/EcoRI* 制限酵素処理された pRSET_B とライゲーションした。反応産物で XL-10Gold を形質転換し、カルベニシンを含む LB 培地で一晩振とう培養した。プラスミドを抽出し、カナマイシン耐性遺伝子を除去するために制限酵素 *NotI* で処理しアガロースゲル電気泳動でサイズごとに分画した。3.4-kb のサイズのバンドを (NLuc + pRSET_B)を回収、DNA を抽出した。抽出された DNA 自己環化させることで、ランダムな位置に 15 塩基対が挿入されたライブラリーを得た。

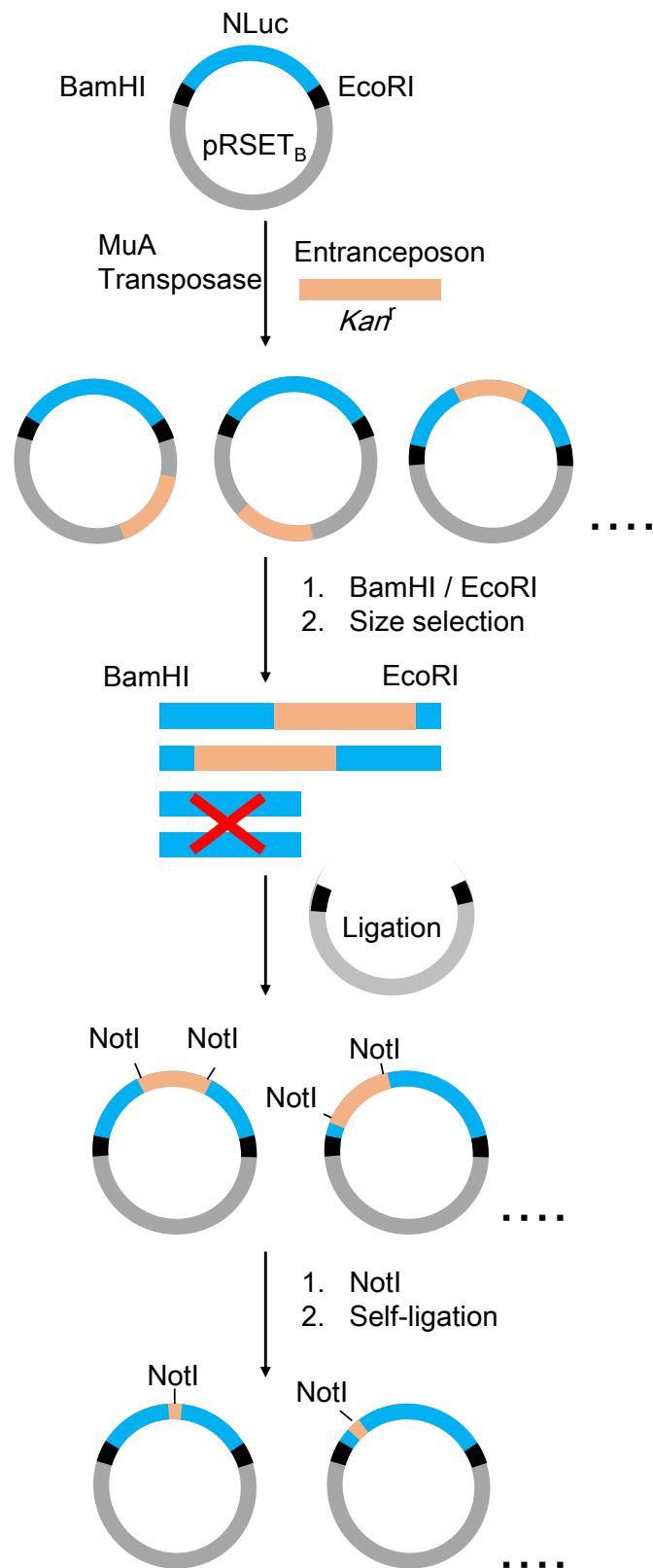


図 3-4 *N*luc 插入変異体ライブラリー構築の概念図

“*Kan^r*”はカナマイシン耐性遺伝子、“*Bam*HI”、“*Eco*RI”、“*Not*I”は制限酵素サイト認識配列、もしくは制限酵素を表す。

この変異体ライブラリーを用いて、JM109(DE3)を形質転換しLB寒天培地に植菌した。37°Cで12時間、23°Cで20時間培養後、5 μMセレンテラジン-hを含むPBSを添加しゲルイメージヤー(LAS-1000、GE Healthcare)を用いて、発光画像を取得した。明るいコロニー30個をピックアップし、液体LB培地で12時間培養しプラスミドを精製、DNA配列を決定した。

Ca^{2+} により大きな発光シグナル変化を与える NLuc の挿入サイトを効率よく決定するためには、TorA protein export plasmid (pTorPE)を使用した。これにより、タンパク質は大腸菌のペリプラズムの領域に輸送され Ca^{2+} が結合された状態になる。また、ペリプラズム領域に発現するタンパク質は、浸透圧ショックにより容易に抽出することができる⁴⁵。 NLuc の遺伝子を、*SalI*、*HindIII* 制限酵素サイトを介して、pTorPE ベクターにサブクローニングした。CaM-M13 タンパク質をコードする DNA 断片を、pRSET_B-Nano-lantern(Ca^{2+})_600 のプラスミドを *NcoI/SacI* 制限酵素で処理することで調製した。pTorPE-NLuc の挿入候補サイトに、inverse PCR 法を用いて、*NcoI/SacI* 制限酵素サイトを導入した。pTorPE-NLuc を鋳型として、制限酵素サイト *SacI* を含むセンスプライマー (F-Sac1-Nluc_38, F-Sac1-Nluc_64, F-Sac1-Nluc_70, F-Sac1-Nluc_98, F-Sac1-Nluc_104, F-Sac1-Nluc_108, F-Sac1-Nluc_122, F-Sac1-Nluc_149) と制限酵素サイト *NcoI* を含むアンチセンスプライマー (R-Nco1-Nluc_37, R-Nco1-Nluc_63, R-Nco1-Nluc_66, R-Nco1-Nluc_69, R-Nco1-Nluc_97, R-Nco1-Nluc_103, R-Nco1-Nluc_107, R-Nco1-Nluc_121, R-Nco1-Nluc_148) を用いて PCR 法によりプラスミド全長を増幅し、*NcoI/SacI* 制限酵素で処理した。この DNA 断片を、*NcoI/SacI* 制限酵素処理された CaM-M13 断片とライゲーションすることで、NLu の挿入候補サイトに CaM-M13 が挿入された変異体を得た。これら変異体をすべて混ぜ合わせ、大腸菌 DH10 に形質転換し 0.02% L-アラビノースを含む LB 寒天培地に播種した。37°C で 12 時間培養後、5 μM セレンテラジン-h を含む PBS を添加しゲルイメージヤー(LAS-1000、GE Healthcare)を用いて、発光画像を取得した。明るいコロニーをピックアップし、液体 LB 培地で 12 時間培養しプラスミドを精製した。大腸菌懸濁液の一部は、2段階目のスクリーニングに用いられた。大腸菌のペリプラズム領域から浸透圧ショック法でタンパク質を抽出し、 Ca^{2+} 依存的な発光強度変化を調べた。

Ca^{2+} 依存的な発光強度変化は、“GeNL(Ca^{2+})の *in vitro* 特性評価”で行ったのと同様の方法で調べた。

GeNL(Ca^{2+})の構築

pRSETb-GeNLのNLuc部位の66/67、69/70番目に対応するサイトに*NcoI/SacI*制限酵素サイトを導入されたDNA断片を、inverse PCR法により調整した。pRSETb-GeNLを鋳型として、制限酵素サイト*SacI*を含むセンスプライマー (F-Sac1-Nluc_67, F-Sac1-Nluc_70) と制限酵素サイト*SacI*を含むアンチセンスプライマー (R-Nco1-Nluc_66, R-Nco1-Nluc_69) を用いてPCR法によりプラスミド全長を増幅し、*NcoI/SacI*制限酵素で処理した。このDNA断片を、*NcoI/SacI*制限酵素処理されたCaM-M13断片とライゲーションすることで、GeNLのNLuc部位の66/67部位にCaM-M13が挿入されたGeNL(Ca^{2+})@67およびGeNLのNLuc部位の69/70部位にCaM-M13が挿入されたGeNL(Ca^{2+})@70を得た。

GeNL(Ca^{2+})の変異体の作製

GeNL(Ca^{2+})@67の Ca^{2+} 状態の明るさを改良するため、CaM-M13とNLucのC末端断片に対して、エラー誘発PCR法を用いてランダムに変異を導入した。制限酵素サイト*NcoI*を含むと、制限酵素サイト*EcoRI*を含むアンチセンスプライマーを用いてエラー誘発PCR法を行い、CaM-M13とNLucのC末端断片を増幅した。鋳型DNAであるpRSETB-GeNL(Ca^{2+})@67 (200 ng/ μL) 0.5 μL 、10 μM センスプライマー (F-Sac1-Nluc_67) 及びアンチセンスプライマー(R-ER1-x-Nluc_171)を各1.5 μL 、10×dNTP溶液 (dATP 2.5 mM、dGTP 2.5 mM、dCTP 9 mM、dTTP 9 mM) 5 μL 、10×PCR buffer溶液 5 μL 、8 mM MnCl₂ 2.5 μL 、5 mM MgSO₄ 2 μL を混ぜ、超純水により合計49.5 μL になるように調整した。Takara Taq (rTaq polymerase, R001A) 0.5 μL を添加し、エラー誘発PCRを行った。PCRサイクルは、94°C/3分を1回行い、次に94°C/30秒→60°C/30秒→72°C/1分を30サイクル行い、最後に72°C/5分を1回行った。

変異 DNA 断片を、変異導入を伴わない PCR、サブクローニングと同様の方法で、

GeNL(Ca²⁺)@67 の CaM-M13 と NLuc の C 末端断片と置換することで、変異体ライブラリーを得た。この変異体ライブラリーを用いて、JM109(DE3)を形質転換し LB 寒天培地に播種した。37°C で 12 時間培養後、5 μM セレンテラジン-h を含む PBS を添加しゲルイメージヤー (LAS-1000、GE Healthcare)を用いて、発光画像を取得した。明るいコロニーをピックアップし、液体 LB 培地で 12 時間培養しプラスミドを精製した。最も明るく、ダイナミックレンジが大きい変異体を GeNL(Ca²⁺)と名づけた。

異なる親和性を持つGeNL(Ca²⁺)変異体を、inverse PCR法を用いてCaMとM13間に様々な長さのリンカーおよびCaMの102番目の残基に変異を導入することで作成した。PCR 法で、GeNL(Ca²⁺)-pRSET_Bプラスミドを鋳型として、逆方向に設定した2種類のプライマーを用いてPCRを行いプラスミド全周を増幅し、Self-ligationし環状化した。102番目のコドンをグルタミン酸をコードするコドン(GAA)に置換したオリゴヌクレオチドを用いることで、アミノ酸置換変異を導入した（使用したオリゴヌクレオチド：F-CaM_102Q, R-CaM_102）。また、-Gly-Gly-Ser-、-Gly-Gly-Gly-Ser-、-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-をコードするDNA配列を挿入したオリゴヌクレオチドを用いることで、CaMとM13の間のリンカーにアミノ酸挿入変異を導入した（使用したオリゴヌクレオチド：R-4GS-CaM, R-3GS-CaM, R-2GS-CaM, F-C-M13_1）。

3.4 実験結果と考察

3.4.1 ルシフェラーゼ再構成法のための最適な分割サイトの探索

トランスポゼースという酵素は、一対の逆向き反復配列を認識し間の塩基配列をゲノムのランダムな位置に転座させる性能を有している。このトランスポゼース反応を用いて、NLuc をコードするプラスミドに対して *in vitro* で転座を起こさせて、5 アミノ酸からなるペプチドが NLuc のランダムな位置に挿入された変異体ライブラリーを作成した（図 3-4）⁴⁴。このライブラリーを用いて、大腸菌を形質転換し、寒天プレート上にコロニーを作成した。セレンテラジン-h を添加した時に相対的に明るく光る大腸菌コロニーをピックアップした。

DNA-シーケンスの結果、以下の 10箇所にペプチドが挿入された変異体が強く発光したことが分かった。37/38、49/50、63/64、69/70、85/86、97/98、103/104、107/108、121/122、148/149（図 3-4a、赤／黄色でハイライト）10箇所全てについて、CaM-M13 を挿入したコンストラクトを作製し、精製タンパク質による Ca^{2+} 応答性を評価した結果を示す（図 3-5b）。10箇所の内、37/38、49/50、69/70、85/86 が有意な化学発光を示し、そのほかの変異体は酵素活性を完全に失った。49/50、69/70、85/86 が Ca^{2+} 依存的な発光強度（ダイナミックレンジ 22%、66%、53%）の変化を示した（図 3-5b）。最も Ca^{2+} 依存的なシグナル変化量が大きかった 69/70 を暫定的な CaM-M13 挿入サイトの候補とした ($\text{NLuc}(\text{Ca}^{2+})@70$ と呼ぶ)。蛍光タンパク質への FRET による発光増強効果も併せて利用するために、GeNL の NLuc 部位の対応する 69/70 残基に CaM-M13 を挿入したコンストラクトを作成した (GeNL(Ca^{2+})@70)。予測したとおり、GeNL(Ca^{2+})@70 は発光波長が長波長シフトし、 Ca^{2+} によるシグナル変化量は $\text{NLuc}(\text{Ca}^{2+})@70$ とほぼ同じ 60% であった（図 3-5c）。すなわち、ルシフェラーゼ再構成に基づく Ca^{2+} センシングは NLuc の内で完全に閉じており、アクセプターの mNeonGreen の役割は FRET アクセプターとして発光波長をシフトさせ発光強度を増強させるだけで、 Ca^{2+} センシングには関与しなかった。

NLuc の 69/70 番目の残基は、図 3-5b 示したように βストランドとループ領域の境界領域に位置していた。また、他の Ca^{2+} 応答性を示した 49/50、85/86 番目の残基も全てループ領域

に位置しており、ループ領域へ CaM-M13 の挿入が Ca^{2+} 応答性にとって、重要であることを示唆された。そこで、より大きなシグナル変化量を与える挿入サイト探索するため、69/70 番目の残基が位置するループ内の 66/67 番目を新たな挿入サイトとして着目し、GeNL の NLuc 部位の 66/67 番目に CaM-M13 を挿入したコンストラクトも作成した(GeNL(Ca^{2+})@67)。その結果、GeNL(Ca^{2+})@67 は 180% という GeNL(Ca^{2+})@70 よりも大きなダイナミックレンジを示した。

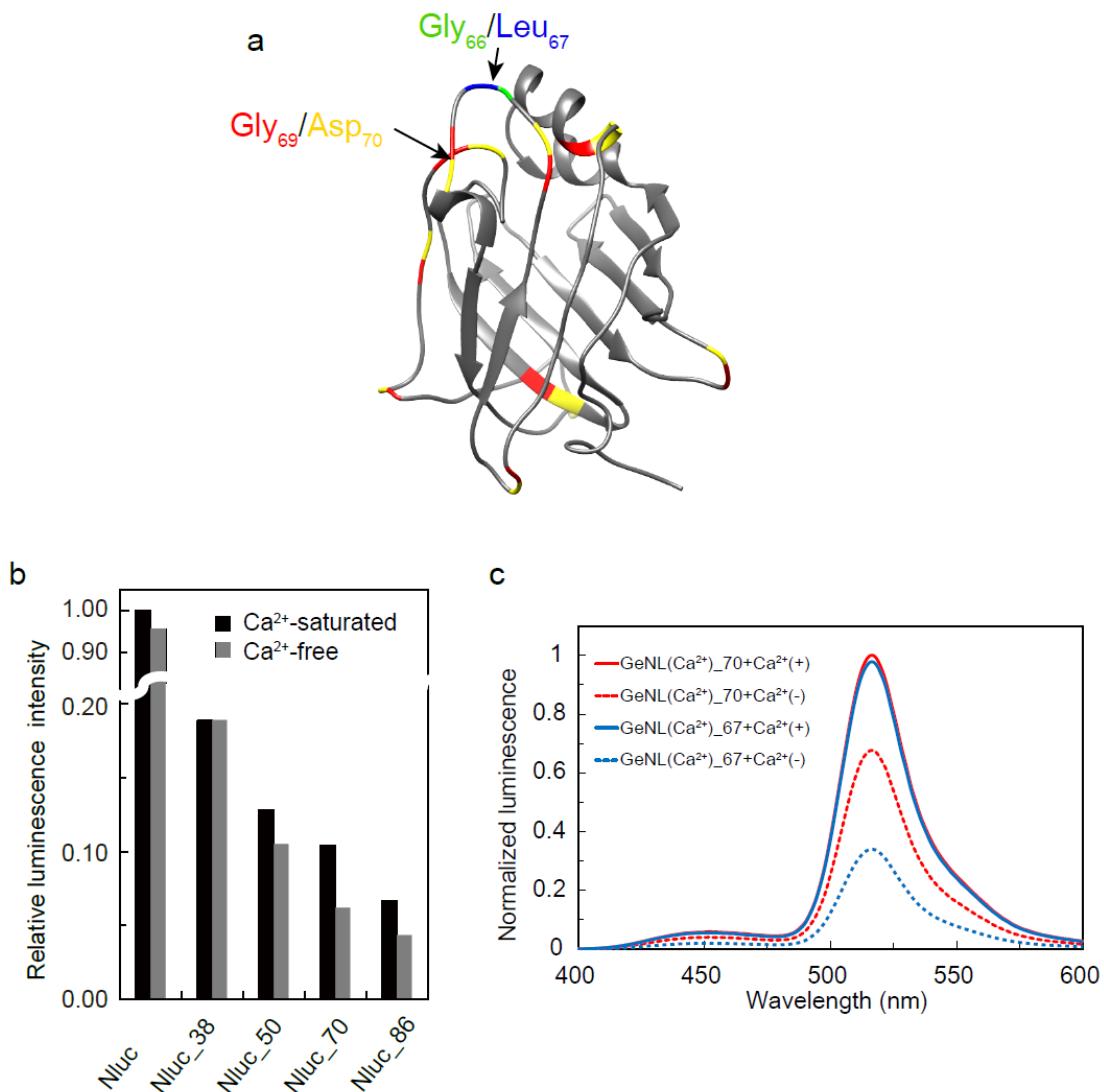


図 3-5 NLuc への CaM-M13 挿入サイトの探索

- (a) NLuc の予測 3 次元構造中における 5 アミノ酸からなるペプチドの挿入を許容するサイト（赤／黄色でハイライト）最終版 GeNL(Ca^{2+})の挿入サイト 66/67 を緑／青でハイライト、
- (b) CaM-M13 挿入 NLuc 変異体の Ca^{2+} フリー・飽和条件下での発光強度。 Ca^{2+} 飽和条件下的 NLuc の発光強度で規格化した。(c) CaM-M13 挿入 GeNL 変異体の Ca^{2+} フリー・飽和条

件下での発光スペクトル変化、赤線:GeNL(Ca^{2+})@70、青線:GeNL(Ca^{2+})@67、実線: Ca^{2+} 飽和条件、点線: Ca^{2+} フリー

3.4.2 化学発光性 Ca^{2+} 指示薬 GeNL(Ca^{2+})の試験管内分子進化

GeNL(Ca^{2+})@67 のダイナミックレンジを分子進化法で更に高めることを目指した。

GeNL(Ca^{2+})@67 の発光強度は Ca^{2+} 結合状態であっても、GeNL の発光強度の 20%程度であった。そこで、 Ca^{2+} 結合状態で発光強度が大きい GeNL(Ca^{2+})@67 変異体をスクリーニングすることで、ダイナミックレンジの向上に寄与すると仮説を立てた。

しかしながら、従来のバクテリアを用いたスクリーニングには問題点がある。バクテリアの細胞内の Ca^{2+} 濃度は 100 nM 程度と低く、変異体ライブリーは Ca^{2+} 結合状態になつていな。そこで、変異体をバクテリアのペリプラズム領域に発現させることを考えた⁴⁵。ペリプラズム領域は細胞外環境と糖鎖で隔てられているが、 Ca^{2+} などのイオンは容易に透過し細胞外と同じイオン環境に置かれることになる。そして、LB 培地の Ca^{2+} 濃度は μM レンジであるので、変異体の CaM-M13 に Ca^{2+} を結合した状態にさせると期待した。

GeNL(Ca^{2+})@67 と TorA タンパク質を融合することで、GeNL(Ca^{2+})@67 をバクテリアのペリプラズム領域に発現させた。この状態で明るく発光する変異体をピックアップすることで、 Ca^{2+} 結合状態で高輝度な変異体が得られ、 Ca^{2+} フリー状態の発光強度が小さければダイナミックレンジの向上も期待した。

TorA-GeNL(Ca^{2+})@67 の NLuc-CaM-M13-NLuc 部位にエラー誘発 PCR を用いてランダムに変異を導入し様々な変異体を作成した。この TorA-GeNL(Ca^{2+})@67 変異ライブラリーをバクテリアに発現させて、コロニーを形成させてより明るく光るものを見つけてピックアップした。このようにして大腸菌内でシグナル変化量が上昇した変異体(CaM 内に 3 つの変異 K30R、E114V、V142E) を同定することができた。このコンストラクトを今後は GeNL(Ca^{2+})と呼ぶ。

今回変異が導入された CaM の 30、114、142 番目が、 Ca^{2+} 結合時の CaM-M13 複合体の三次元構造のどこに位置するのかを図 3-6 に示した。CaM-M13 複合体は、 α -ヘリックスである M13 が、CaM の内部を貫通したような構造を取っている。30、142 番目の残基は、外側を向き外部の環境に露出していた。対して、114 番目の残基は内側の M13 へ向けて側鎖を伸ばしていた。114 番目の残基がグルタミン酸(E)からバリン(V)に置換され CaM と M13 の相互作

用が強くなり分割 NLuc の再構成を促すことで、 Ca^{2+} 結合時の GeNL(Ca^{2+})の発光強度を改善させたと推察される。

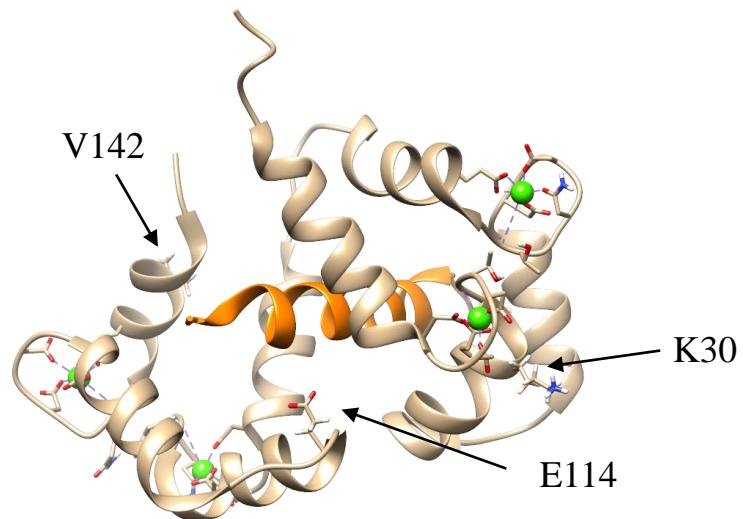


図 3-6 CaM-M13 複合体の 3 次元構造のリボン表示 (PDB: 2BBM)

CaM を肌色、M13 を橙色でハイライトされている。緑色の球は Ca^{2+} を表す。 Ca^{2+} をキレートしている残基、および今回変異が導入された 30、114、142 番目の残基のみ側鎖を表示。

3.4.3 Ca^{2+} 親和性変異体の作成

さらに、GeNL(Ca^{2+})の特定の箇所に変異を導入することで、 Ca^{2+} に対して様々な親和性を有する GeNL(Ca^{2+})を作製した。先行研究から、CaM の Ca^{2+} 結合サイトにあたる 104 番目の残基をグルタミンからアスパラギン酸にすることで、 Ca^{2+} に対する親和性が向上することが知られている⁴⁶。また、CaM と M13 の間のリンカーを長くすることでも Ca^{2+} への親和性が向上する。GeNL(Ca^{2+})の CaM-M13 に対して、これらの変異を導入した下の 4 つのコンストラクトを作製した（図 3-7）。

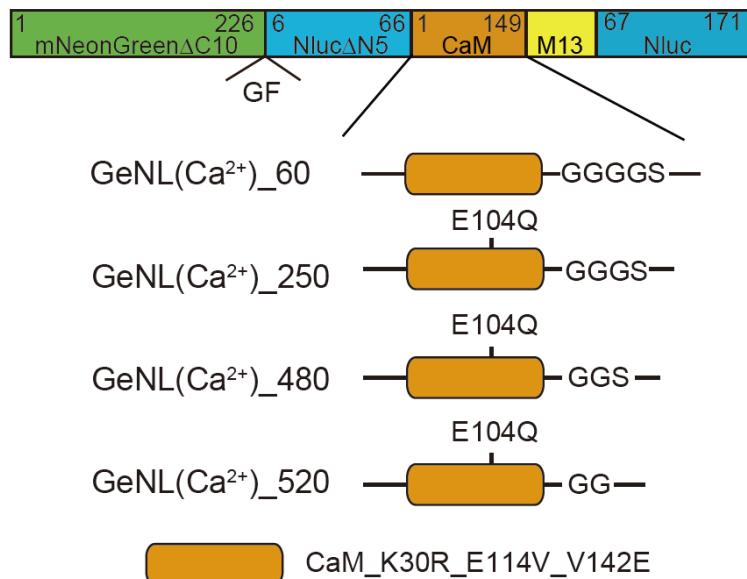


図 3-7 Ca^{2+} 指示薬 GeNL(Ca^{2+})のドメイン構造、右上数字は各ドメインのアミノ酸番号

3.5 展望

今後の化学発光性 Ca^{2+} 指示薬開発は、長波長化とセンサーの高性能化という二つの方向に向かっていくと予想される。今回開発した GeNL(Ca^{2+})の Ca^{2+} 検出機構が、NLuc の中で完全に閉じていることを示した。従って、1 章で証明したのと同様の方法で、赤色、橙色蛍光タンパク質とハイブリッド化することで、生体透過性の高い化学発光性 Ca^{2+} 指示薬開発が得られると期待される。また、今回開発した GeNL(Ca^{2+})は Ca^{2+} 結合時においても、CaM-M13 の挿入されていない GeNL と比較して 30%程度の明るさしか有していないかった。従って、3.4.2 で示した Ca^{2+} 結合時に明るい変異体をスクリーニングする分子進化実験を繰り返し更なるセンサーの高性能化を試みる必要がある。

四章：化学発光性カルシウムイオン指示薬の物性評価

4.1 背景

細胞の生理状態に関わる生理活性物質のイメージングは、これまで蛍光タンパク質、有機蛍光色素に基づく機能性指示薬を用いて、励起光照射下で行われてきた。特に細胞内セカンドメッセンジャーである Ca^{2+} の濃度は、筋肉細胞や神経細胞では高速かつダイナミックに変化しているために、その動態を可視化するために細胞を強烈な励起光に曝しながら高速で画像を取得してきた。その光毒性のため、蛍光プローブを用いて高速な Ca^{2+} 動態を長時間観察ことは困難であった。

4.2 目的・意義

本章では、まず 3 章で開発した発光性 Ca^{2+} 指示薬 GeNL(Ca^{2+})の *in vitro* における特性を評価する。次に、 Ca^{2+} 濃度の上昇を引き起こす薬剤を添加し、GeNL(Ca^{2+})が哺乳細胞において働くことを確かめる。ついで、これまで汎用されてきた蛍光タンパク質、有機蛍光色素 Ca^{2+} 指示薬と GeNL(Ca^{2+})の性能を比較する。最後に、GeNL(Ca^{2+})の高速長時間イメージングへの有用性を示すため、iPS 細胞由来の心筋細胞における周期的な Ca^{2+} 振動を可視化することを確かめる。

4.3 方法と材料

GeNL(Ca^{2+})の哺乳類ベクターの構築

GeNL(Ca^{2+})の哺乳類一過的発現ベクターを構築するために、GeNL(Ca^{2+})-pRSETb を *BamHI/EcoRI* 制限酵素で処理し、GeNL(Ca^{2+})のDNA断片をpcDNA3にクローニングした。アデノ随伴ウィルス作成に必要なパッケージングプラスミドpHelper、pAAV-DJは、*Cell Biolabs, Inc*⁴⁷から購入した。GeNL(Ca^{2+})_520のDNA断片を、制限酵素サイト*BamHI*、コザック配列を含むセンスプライマー(使用したオリゴヌクレオチド:F-BH1-koz-hmNG)と、制限酵素サイト*EcoRI*を含むアンチセンスプライマー(使用したオリゴヌクレオチド:R-ER1-x-Nluc_171)を用いてPCR 法によりそれぞれ增幅し、*BamHI/EcoRI* 制限酵素で処理した。得ら

れたDNA断片を、pAAV-CAG-ArchT-GFPベクターのArchT-GFP配列と置換することで、pAAV-CAG- GeNL(Ca²⁺)_520ベクターを作成した。 pAAV-CAG-ArchT-GFPプラスミドは、Edward Boyden博士から分与していただいた。(Addgene plasmid # 29777).

GeNL(Ca²⁺)の *in vitro* 特性評価

Ca²⁺滴定は、マイクロプレートリーダーを用いて行った。発光基質として、最終濃度 5 μM のセレンテラジン-h を用いた。発光強度の測定は、各 Ca²⁺濃度について最低 3 回行い、平均値を解離定数の解析に用いた。種々の濃度の Ca²⁺溶液は、Ca²⁺飽和溶液 (10 mM MOPS、100 mM KCl、10 mM EGTA、10 mM CaCO₃ at pH 7.2) と Ca²⁺フリー溶液 (10 mM MOPS、100 mM KCl、10 mM EGTA at pH 7.2) を一定の割合で混ぜ調製した。フリーCa²⁺濃度[Ca²⁺]_{free} は、EGTA の解離定数 K_d の値 0.15 μM を使って以下の式から計算した。

$$[Ca^{2+}]_{free} = \frac{[-D + (4 \times K_d \times [Ca^{2+}]_{total} + D^2)^{\frac{1}{2}}]}{2}$$

$$D = [EGTA]_{total} - [Ca^{2+}]_{total} - K_d$$

各 Ca²⁺濃度における発光強度の平均値を Origin7 ソフトウェア(OriginLab)を用いて、一成分 Hill の式でカーブフィッティングすることで、解離定数 K_d を得た。

$$\Delta R = \frac{[Ca^{2+}]^n}{[Ca^{2+}]^n + K_d^n}$$

ここで、シグナル変化量ΔR は、各種 Ca²⁺濃度における発光強度を I 、Ca²⁺飽和条件の発光強度 I_{max} 、Ca²⁺フリー条件の発光強度 I_{min} を用いて以下のように表され、0 から 1 の値をとる。

$$\Delta R = \frac{I - I_{min}}{I_{max} - I_{min}}$$

GH3 細胞の調製および Ca²⁺イメージング

ラット下垂体細胞 GH3 (ATCC CCL-82.1) を 37°C、5%CO₂条件下で、2.5% FBS と 15% HS (horse serum)を含む DMEM/F12(Sigma-Aldrich)培地で培養した。トリプシン処理により細胞をはがし、ポリ-D-リジンでコートされたガラスボトムディッシュに 24 時間後に 70~80%

のコンフルエンシーになるようまいだ。GCaMP3 と GeNL(Ca²⁺)の遺伝子導入は以下のように行った。ディッシュ 1 枚につき、500 μl OPTI-MEM(Gibco)に遺伝子導入試薬である Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Life Technologies) 10 μl と一過性発現用ベクター4 μg を混合した溶液を加えた。溶液を加えて 6 時間後、新鮮な培地に交換し、さらに 16 時間培養を行った。Fura-2 の細胞への導入は、培地を除き、1x PowerLoad (Invitrogen)、5.0 μM Fura-2-AM (同人化学, F016)を含む Hanks' Balanced Salt solution (HBSS, Sigma)に置換し、37°C、5%CO₂条件下で 1 時間培養した。

そして、フェノールレッドの含まれていない DMEM/F12 で置換した。GeNL(Ca²⁺)観察のために、イメージングの直前にフリマジンを最終濃度 20 μM になるように添加した。画像撮影は、EM-CCD カメラ (Evolve 512, Photometrics) を備えた蛍光倒立顕微鏡(IX83、オリンパス)を使用した。Fura-2 のイメージングには、励起フィルターSemrock FF01-340/26、FF01-387/11、ダイクロイックミラーFF409-DiO2、蛍光フィルターFF01-510/84 を用いた。対物レンズは、紫外励起光を効率よく透過する 40 倍の対物レンズ(NA=1.35、UAp0/340、オリンパス)を用いた。Fura-2 のレシオ蛍光画像取得は、二つの励起フィルターを交互に切り替え撮影し、それぞれのチャンネルの露光時間は 100 ミリ秒に設定した。露光時間以外は励起光シャッターを閉じて、細胞が光に曝されないようにした。GeNL(Ca²⁺)のイメージングは、すべてのフィルターを外し、励起光を当てずに行った。画像取得は、カメラビニングの設定が X2、1.3Hz フレームレイトで撮影を行った。

GCaMP3 のイメージングには、励起フィルターOmega 475AF20、ダイクロイックミラーOmega 475AF20、蛍光フィルターFF01-525/45 を用いた。対物レンズは、60 倍の対物レンズ(、オリンパス)を用いた。画像取得は、カメラビニングの設定が X2、30Hz のフレームレイトで撮影を行った。イメージング中のサンプルは、ステージトップ培養器内(Tokai Hit, Fujinomiya, Japan)に置き、37 °C に保った。

アデノ随伴ウイルスの調製

HEK293T 細胞 (RIKEN BRC Cell Bank RCB2202)を 37°C、5%CO₂条件下で、10%ウシ胎児血清(Fetal bovine serum, FBS, Sigma-Aldrich)を含む DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Sigma-Aldrich)培地で培養した。10 cm ディッシュ 1 枚につき、600 μl OPTI-MEM(Gibco)に遺伝子導入試薬である FuGENE_{HD} transfection reagent (Roche)18 μl と pHelper、pAAV-DJ、pAAV_CAG_GeNL(Ca²⁺)_520 の 3 種類のプラスミドをそれぞれ 2 μg ずつを混合した溶液を加えた。3 日後、ウィルスを產生している HEK293T 細胞を、4°C、1,000 rpm、5 分の条件で遠心し上清を除いた後、200 μL PBS(-)で懸濁した。懸濁した HEK293T 細胞を、液体窒素中に 8 分間置き凍結、37°C の恒温槽で 2 分間インキュベート、ボルテックスを用いて 1 分間激しく混合した。このプロセスを 4 回繰り返すことで細胞を破碎した。細胞破碎液に 1 μL benzonase nuclease (Sigma-Aldrich, E1014)を加え、42°C の恒温槽で 15 分間インキュベートした。4°C、15,000 rpm、10 分の条件で遠心し、上清を新しいチューブに移し、再び遠心分離を行った。上清を回収、分注し-80 °C の冷凍庫に保存した。

iPS 細胞由来の心筋細胞の Ca²⁺イメージング

人由来 iPS 細胞 (hiPS, 201B7, RIKEN BRC)は、37°C、5%CO₂条件下で 4 ng/mL 線維芽細胞成長因子(Fetal bovine serum, FBS, Sigma-Aldrich)を含む靈長類 ES/iPS 細胞用培地(primate ES medium, Reprocell Inc.)中でマウスフィーダーSNL 細胞(CBA-316, Cell Biolabs, Inc.)の上で培養した。hiPS 細胞由来の心筋(hiPS-CM)の胚様体は、先行研究のプロトコールに従って作成された³⁵。CTK 溶液(Reprocell Inc.)を用いてマウスフィーダーSNL 細胞だけを取り除き、6 cm ディッシュから、80-90% コンフルエンシーの hiPS 細胞コロニーを 15mL 遠心管に回収した。室温で 1,000 rpm、30 秒で遠心分離し、上清を取り除き 1 mL 心筋分化用培地(RPMI+PVA)に懸濁し、1 mL のチップ(WATSON, BIO LAB)で 20 回ピペッティングすることで直径 150 μm 程度の胚様体を得た。RPMI+PVA 培地は、RPMI Media 1640 (with L-Glutamine) (Sigma-Aldrich)に以下のサプリメントが添加された培地である(表 4-1)。

表 4-1 RPMI+PVA 培地のサプリメント

試薬名	メーカー	型番	濃度
polyvinyl alcohol	Sigma-Aldrich	P8136	4 mg mL ⁻¹
1-thioglycerol	Sigma-Aldrich	M6145	400 μM
chemically defined lipid concentrate	Thermo Fisher Scientific	11905-031	1%
recombinant human insulin	Sigma-Aldrich	I9278	10 μg mL ⁻¹
human BMP4	R&D systems		25 ng mL ⁻¹
human FGF2	R&D systems		5 ng mL ⁻¹
Y-27632	Wako Chemical	253-00513	10 μM

懸濁した hiPS 細胞を、35 mm ディッシュ(Ultra Low Attachment Culture Dish, Corning)に播種し、37°C、5%CO₂、5%O₂ 条件下で培養した。二日後、培地を RPMI+FBS 培地に交換し 37°C、5%CO₂ 条件下で培養した。RPMI+FBS 培地は、RPMI Media 1640 (with L-Glutamine) (Sigma-Aldrich)に以下のサプリメントが添加された培地である(表 4-2)。

表 4-2 RPMI+FBS 培地のサプリメント

試薬名	メーカー	型番	濃度
Fetal bovine serum	Biowest	S1820	20%
1-thioglycerol	Sigma-Aldrich	M6145	400 μM

二日後、8 から 10 個の胚様体を 0.1% のゼラチンでコートされたグラスボトムディッシュに播種し、37°C、5%CO₂ 条件下でそのまま 5 日間静置し接着させた。そして、10 μL AAV を添加し感染させ、4 日後にイメージングを行った。

培地を Tyrode solution (Sigma)に交換し、観察の直前にフリマジン溶液を最終濃度 40 μM になるようにイメージング用培地に添加した。発光画像の撮影には、100 倍の対物レンズ(NA 1.4、UPlanSApo、オリンパス)、EM-CCD カメラ (ImagEM, 浜松ホトニクス) を備えた化学発光用倒立顕微鏡(LV-200、オリンパス)を使用した。イメージング中のサンプルは、ステージトップ培養器内(Tokai Hit, Fujinomiya, Japan)に置き 37 °C に保った。

4.4 実験結果と考察

4.4.1 Ca^{2+} 指示薬の *in vitro* 評価

精製した GeNL(Ca^{2+})タンパク質について物理化学的特性評価を行った(図 4-1)。すべての GeNL(Ca^{2+})は、 Ca^{2+} 依存的に発光強度が上昇した。滴定実験から、 Ca^{2+} に対する解離定数 K_d が 60 nM から 520 nM であることがわかった(図 4-1b、表 4-1)。4 つの GeNL(Ca^{2+})親和性変異体を呼び分けるため、名前の後ろに解離定数の値を付けて呼ぶ。GeNL(Ca^{2+})_480 は、親和性変異体の中で最も大きい 490% のダイナミックレンジを示した。しかしながら、 Ca^{2+} 結合状態における GeNL(Ca^{2+})_480 の相対輝度は、GeNL の 30% ほどであった。CaM-M13 がコンパクトな構造を取っているにも関わらず、NLuc が再構成されていないと考えられる。

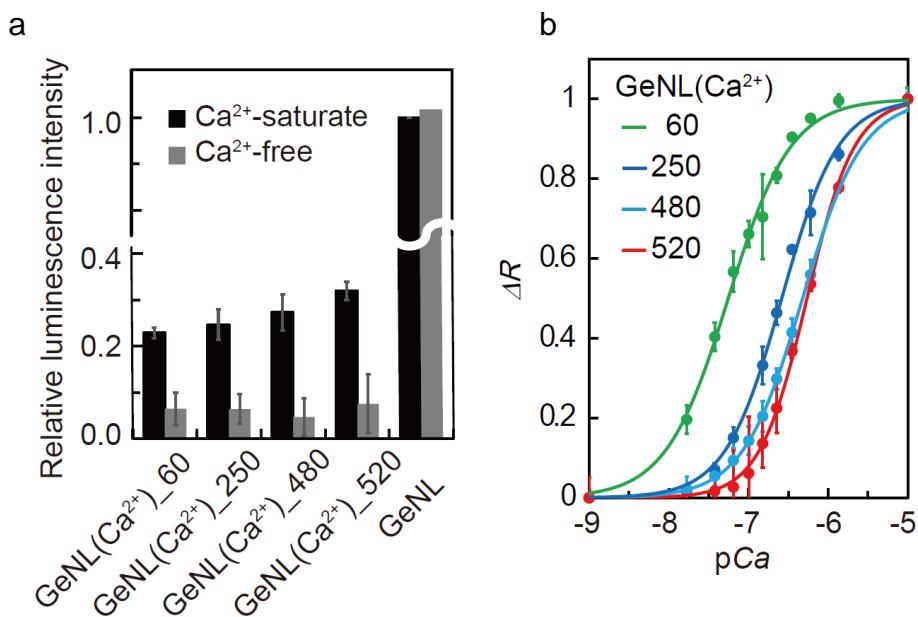


図 4-1 Ca^{2+} 指示薬 GeNL(Ca^{2+})の特性評価

(a) 各 GeNL(Ca^{2+})親和性変異体の Ca^{2+} フリー・飽和条件下での発光強度、GeNL の Ca^{2+} 飽和条件下の発光強度で規格化した。(b) Ca^{2+} 滴定曲線、横軸 $\text{pCa} = -\log_{10}[\text{Ca}^{2+}]$ 、縦軸 規格化された発光シグナル変化量、エラーバーは、標準偏差を表す。

表 4-1 GeNL(Ca²⁺)の親和性変異体の特性評価

		Dynamic range / %	Relative luminescence	K_d / nM	Hill coefficient
eNL(Ca ²⁺)_520	104Q-2G	280	1	540	1.5
eNL(Ca ²⁺)_480	104Q-2GS	490	0.87	480	1.2
eNL(Ca ²⁺)_250	104Q-3GS	190	0.79	260	1.2
eNL(Ca ²⁺)_60	104E-4GS	270	0.76	56	1.1

4.4.2 哺乳類細胞の高速 Ca^{2+} イメージング

GeNL(Ca^{2+})がライブセルイメージングに供するかを調べるために、HeLa 細胞において Histamine 刺激に伴う Ca^{2+} 動態の観察を試みた。Histamine は細胞表面の受容体に結合し、細胞内のシグナルカスケードを活性化し Endoplasmic Reticulum (ER)からの Ca^{2+} の流出を促進、細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させることができている⁴⁸。

GeNL(Ca^{2+})_480 を HeLa 細胞に一過的に発現させて、フリマジンを添加したのち撮影を開始し、30 秒後に Histamine 10 μM を添加した。GeNL(Ca^{2+})_480 を発現する HeLa 細胞は、フリマジン添加で発光を示し、Histamine 添加によって大きな振幅のスパイク（シグナル変化率：200%）とそれに続く小さな振幅の連続的なスパイク（50%）を示した（図 4-2b, a の白い ROI 内のシグナル）。更に、細胞内で発光強度が細胞の一端から徐々に上昇し細胞全体へ広がる現象が見られた（図 4-2a and c）。この Ca^{2+} ウェーブの伝播は、蛍光性 Ca^{2+} 指示薬を用いても観察されており⁴⁹、GeNL(Ca^{2+})でも同様の現象を可視化できることがわかった。

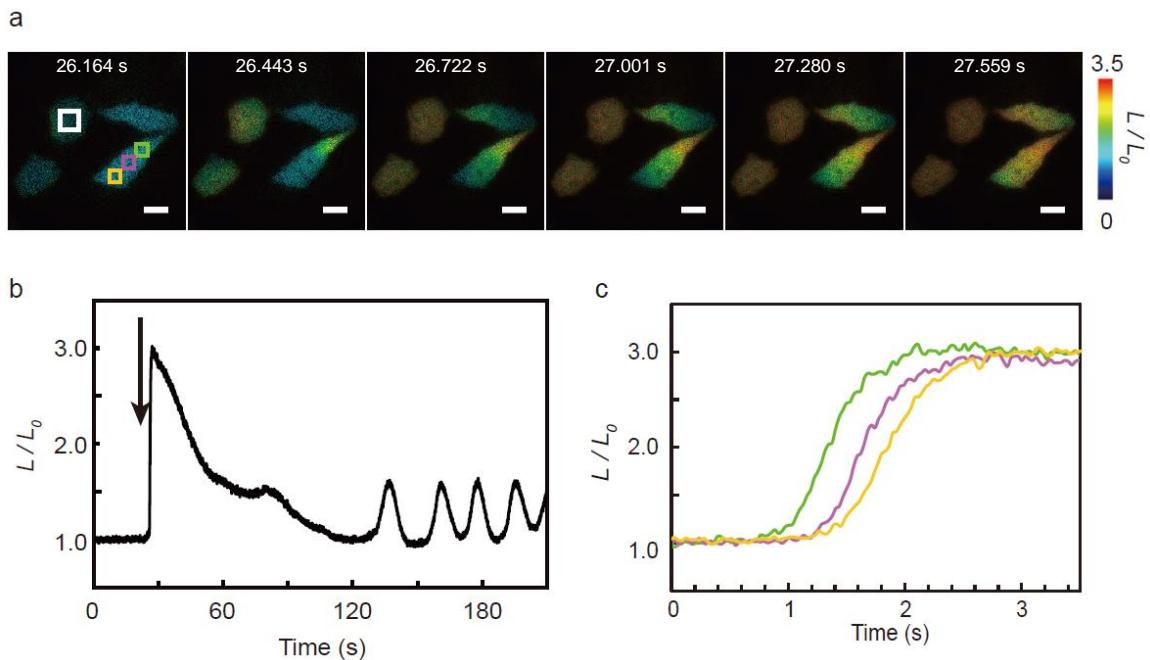


図4-2 GeNL(Ca^{2+})_480を用いたHistamine刺激に伴う Ca^{2+} 動態の観察

(a)GeNL(Ca^{2+})_480を発現するHeLa 細胞にフリマジン 20 μM 添加し発光画像を撮影した結果。発光強度 L は、初期の刺激前の強度 L_0 で規格化されている。画像はIMD (intensity modulated display)モードにて表示している。各画像ごとの時間間隔 Δt は279 ms。スケールバーは10 μm .である。細胞内を Ca^{2+} ウェーブが伝播する様子が発光強度の変化として可視化されている。(b)白い四角の中の発光強度変化、矢印の時点でのHistamine 10 μM を添加した。(c)aの四角の色がグラフの線に対応する。緑→ピンク→オレンジの順番に発光強度が上昇し、その方向に Ca^{2+} ウェーブが伝播していることがわかる。

4.4.3 蛍光性 Ca^{2+} 指示薬との比較実験

これまで、細胞内の Ca^{2+} 動態は主に蛍光性 Ca^{2+} 指示薬を用いて研究してきた。蛍光性 Ca^{2+} 指示薬は、大きく二つに分類される。一つは、蛍光タンパク質から成る遺伝子にコードされた蛍光性 Ca^{2+} 指示薬である。特に、GCaMP シリーズは Ca^{2+} の結合によって非常に大きなシグナル変化を示すことから、神経や筋肉の活動を蛍光で可視化する標準的なツールとなっている⁵⁰。二つ目は、人工的に有機合成された有機低分子 Ca^{2+} 指示薬であり、代表的なものが Fura-2 である⁵¹。Fura-2 は Ca^{2+} の結合によって蛍光励起スペクトルを大きく変化させる。したがって、二つの異なる波長で (340 nm と 380 nm) 励起しそれぞれの蛍光強度の比率を計算することで、細胞内の Ca^{2+} 濃度の変化を検出することができる。

GeNL(Ca^{2+})が標準的な蛍光性 Ca^{2+} 指示薬と比較して、どの程度の性能を有しているかを評

価した。タンパク質ベースの蛍光性 Ca^{2+} 指示薬から GCaMP3 を、有機低分子蛍光性 Ca^{2+} 指示薬からは Fura-2 を標準的な比較対象として選択した。

ラットの下垂体腫瘍細胞から樹立された GH3 細胞に GeNL(Ca^{2+})_480、GCaMP3 を同一のプロトコールでそれぞれ遺伝子導入した。GeNL(Ca^{2+})_480 または GCaMP3 を発現する GH3 細胞を同一のカメラビニング、対物レンズ、フレームレート (30 Hz) で観察した。両プローブとともに GH3 細胞の示す自発的な Ca^{2+} スパイクを検出することに成功した (図 4-3 左)。しかし、シグナルとノイズの比率 (S/N、スパイク時の発光強度／休止状態の発光強度) は、GeNL(Ca^{2+})_480 (74±3.0、6 つの細胞からのデータ) の方が GCaMP3 (590±25、平均値±標準偏差、6 つの細胞からのデータ) よりも劣っていた。

次に、GH3 細胞に Fura-2 を標準的なプロトコールを用いて導入した。レシオメトリックな指示薬である Fura-2 の画像を得るために、2 つの励起波長を交互に切り替えながら蛍光画像を撮影する必要がある。そのため、我々のイメージングのセットアップで最速の 1.3Hz フレームレートで撮影を行った。そして、それと全く同じ撮影条件で GeNL(Ca^{2+})_480 の撮影を行った。両プローブとともに GH3 細胞の示す自発的な Ca^{2+} スパイクを検出することに成功した (図 4-3 右)。GeNL(Ca^{2+})_480 の S/N (120±12、平均値±標準偏差、6 つの細胞からのデータ) は Fura-2 の S/N (9.6±0.71、6 つの細胞からのデータ) を大きく上回っていた。さらに、Fura-2 を導入した細胞では、10 分経過後は光毒性もしくは光褪色のために Ca^{2+} スパイクを検出することが困難になった。対して、GeNL(Ca^{2+})_480 では 20 分以上のイメージングが可能であった。

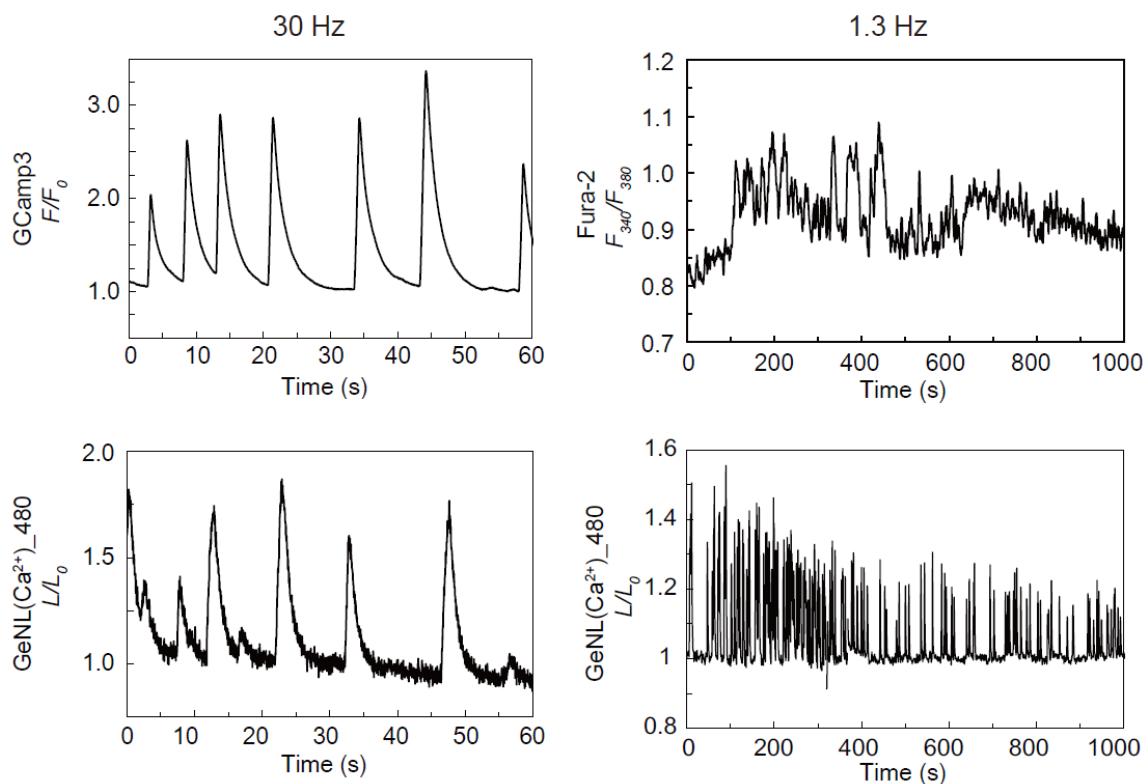


図4-3 種々のCa²⁺指示薬を用いたGH3細胞の自発Ca²⁺スパイクの観察

(左) GeNL(Ca²⁺)_480 または GCaMP3 を発現する GH3 細胞を 30Hz で撮影した結果。シグナル強度は、休止状態のシグナル強度で規格化されている。GeNL(Ca²⁺)_480 を発現する GH3 細胞に対してはフリマジン 20 μM 添加、GCaMP3 を発現する GH3 細胞に対しては 130 mW cm⁻² の 472nm 光を照射しつつ画像を取得した。 (右) GeNL(Ca²⁺)_480 または Fura-2 を導入した GH3 細胞を 1.3Hz で撮影した結果。Fura-2 の縦軸は、340nm 光照射時の蛍光強度を 380nm 光照射時の蛍光強度で割ったレシオの値 (F_{340}/F_{380}) である。GeNL(Ca²⁺)_480 を発現する GH3 細胞に対してはフリマジン 20 μM 添加、Fura-2 を導入した GH3 細胞に対しては 100 mW cm⁻² の 384 nm 光および 34 mW cm⁻² の 340 nm 光を交互に照射しつつ画像を取得した。

Fura-2 の計測から得られたシグナルの波形が、GeNL(Ca²⁺)_480 または GCaMP3 から得られたものと異なる理由は、Fura-2 のレシオメトリックな測定モードに起因すると考えられる。Fura-2 では、二つの異なる波長で交互に励起しそれぞれの蛍光強度の比率を測定するために、二つの励起波長の測定には時間的なずれが生じる。細胞内 Ca²⁺濃度が、この時間的なずれの間に変化すると、実際の Ca²⁺変化とは異なるシグナル波形を出力する可能性がある。従って、GH3 細胞の自発的な Ca²⁺振動のような急峻な Ca²⁺変化においては、GeNL(Ca²⁺)_480 または GCaMP3 から得られたシグナルの方が実際の Ca²⁺動態を反映していると考えられる。今後は、電気生理学的な計測を同時にを行い、心筋細胞の活動電位と同期したシグナル変化が得られていることを確認する必要がある。

これらの結果より、GeNL(Ca²⁺)_480 の Ca²⁺指示薬としての性能は標準的な有機低分子蛍光性 Ca²⁺指示薬である Fura-2 よりも優っていることがわかった。しかしながら、蛍光性 Ca²⁺指示薬 GCaMP3 よりは劣り、ダイナミックレンジ、明るさの向上の必要があることがわかった。GCaMP は、円順列変異体を活用することで、EGFP の発色団近傍のβバレルの途中に新たな N、C 末端を作成し、CaM と M13 で挟み込んだ蛍光性 Ca²⁺指示薬である。Ca²⁺濃度に応じて CaM と M13 が複合体を形成することで、βバレルが再構成され蛍光強度が増強する機構である⁵²。Ca²⁺解離時はβバレルに穴が空いている状況になるため蛍光強度は非常に低く、Ca²⁺結合時は EGFP に匹敵する蛍光強度を示すことが、大きなシグナル変化量の要因であると報告されている。GeNL(Ca²⁺)では、Ca²⁺解離時は GeNL の 5%程度のシグナル強度と十分低いが、Ca²⁺結合時は GeNL の 30%程度の明るさしか示さない。このため、GCaMP よりもシグナル変化量が小さくなつたのだと考えられる。従って、本項目で行った Ca²⁺結合時に発光強度の大きい変異体のスクリーニングを繰り返すことで、よりシグナル変化量の大きな変異体の開発が期待される。

4.4.4 iPS 細胞由来心筋細胞の高速 Ca²⁺イメージング

最後に、GeNL(Ca²⁺)を用いて iPS 細胞由来心筋細胞の Ca²⁺動態を高速観察することを試みた。iPS 細胞から分化誘導された心筋組織に GeNL(Ca²⁺)_480 を、アデノ随伴ウィルスを介し

て発現させた。3~4日後、フリマジンを添加して発光画像を長時間撮影することを試みた。GeNL(Ca²⁺)_480 の発光強度が心筋の拍動に同期して周期的に上昇した。この周期的な Ca²⁺振動を、35 分間以上、観測することが出来た。Ca²⁺振動を起こす心筋に対して、hERG チャネルを阻害し不整脈を引き起こすアステミゾールを添加したところ、Ca²⁺振動の周期は不定期に速くなり不整脈様な現象が観測された。

これらの結果から、これまで蛍光 Ca²⁺指示薬で強烈な励起光照射下で行われてきた心筋細胞の Ca²⁺イメージングを、GeNL(Ca²⁺)を用いることで励起光を全く照射せずに行うことができたことを意味している。

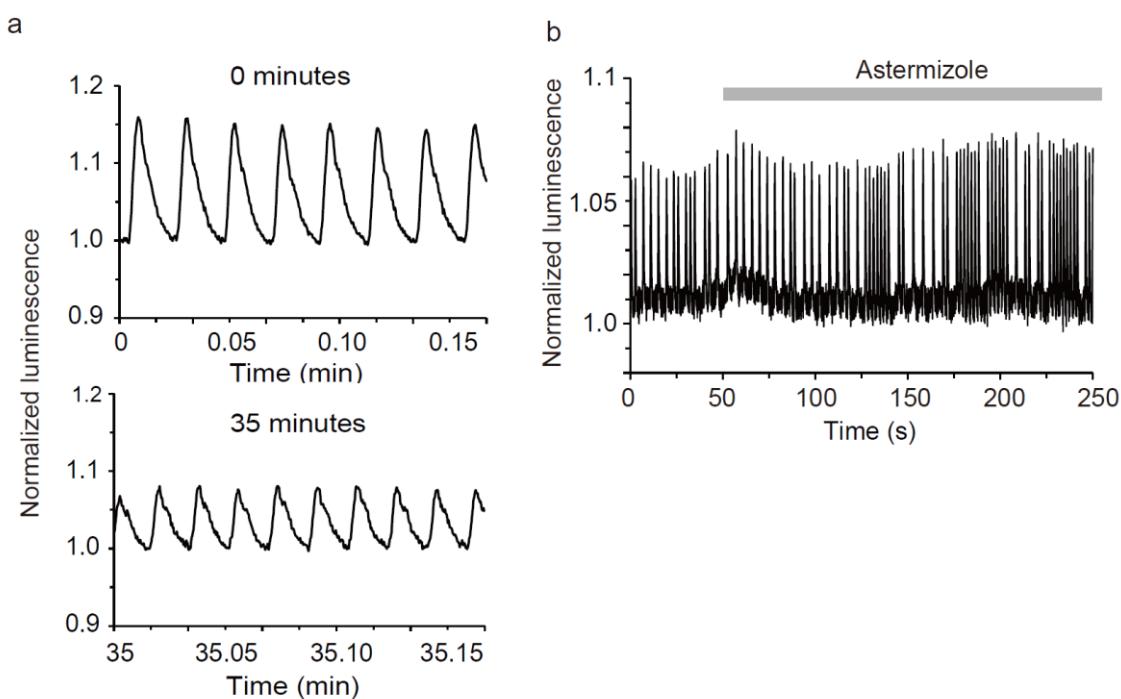


図4-4 iPS由来の心筋組織における発光Ca²⁺-イメージング

(a) GeNL(Ca²⁺)_480 を発現する心筋細胞の Ca²⁺動態を 60Hz で撮影した結果の Ca²⁺動態。上：イメージング開始直後、下：開始 35 分後、シグナル強度は、休止状態のシグナル強度で規格化されている。フリマジン濃度: 40 μM (b) 開始 50 秒後に 1 μM アステミゾール添加。

4.5 展望

化学発光性 Ca^{2+} 指示薬の応用は、今後は動物個体中における Ca^{2+} イメージングと光遺伝学との併用という二つの方向に向かっていくと予想される。Nano-lantern は自由行動するマウスのガン細胞からのリアルタイム化学発光イメージング(30 Hz)を報告している。本研究で開発した化学発光性 Ca^{2+} 指示薬 GeNL(Ca^{2+})は Nano-lantern の 4 倍明るいため (Ca^{2+} 結合時)、自由行動下のマウスからの Ca^{2+} イメージングが可能になると期待される。例えば、自由行動下のマウスの骨格筋や脳神経細胞からのシグナルをリアルタイムに取得可能になるかもしれない。こうした実験は、マウスの行動と細胞レベルの Ca^{2+} 動態を直接関連付けることが出来るため、生命科学研究に大きく貢献できると期待される。

また、励起光の要らない化学発光性 Ca^{2+} 指示薬は、光遺伝学ツールとの併用を可能である。Nano-lantern が放出する化学発光のパワー密度は、 $1 \mu\text{W cm}^{-2}$ 程度であると見積もられていることから¹⁷、GeNL(Ca^{2+})のパワー密度は $4 \mu\text{W cm}^{-2}$ 程度であると考えられる。対して、代表的な光遺伝学ツール、チャネルロドプシン 2 の半量を活性化するのに必要なパワー密度 IC_{50} は 19 mW cm^{-2} であると見積もられ⁵³、両者の間には 5000 倍近くの違いがある。従って、GeNL(Ca^{2+})の化学発光がチャネルロドプシン 2 を活性化することはないと考えられる。化学発光性 Ca^{2+} 指示薬と光遺伝学を組み合わせることで、神経ネットワークのコントロールと神経活動のモニタリングを同時に行うことができ、高次神経活動（行動、思考、記憶）のメカニズムに迫ることができるかもしれない。

五章：結論

本研究において、得られた成果を下に記す。

- ✓ 高い酵素活性を持つルシフェラーゼNLucをFRETドナーとして用いることで、可視光全域に発光する高光度化学発光タンパク質波長変異体eNLを創生した。
- ✓ 緑色（GeNL）、シアン色変異体（CeNL）は、ドナーであるNLucを上回る輝度を示し、これまで報告されている中で最も明るい化学発光タンパク質であった。また、赤色変異体ReNLは600nm以上の波長で最も明るい化学発光タンパク質であった。
- ✓ eNLは、種々の細胞小器官、構造体を可視化するのに有用なタグであり、その明るさにより180個のタンパク質から成る超分子複合体を可視化した。
- ✓ eNL色変異体を用いることで、少なくとも5種類の細胞構造体を同時に観察することが可能となった。
- ✓ 単一分子からの発光を初めて観察することに成功した。
- ✓ 量子効率と速度論パラメーターを詳細に測定・解析することで、蛍光タンパク質とルシフェラーゼのハイブリッドにより発光強度が増強されるメカニズムを詳細に記述した。
- ✓ トランスポゾン挿入変異導入法を活用することで、GeNLをベースにしたCa²⁺指示薬GeNL(Ca²⁺)を創生した。
- ✓ GeNL(Ca²⁺)は、標準的な有機小分子Ca²⁺指示薬Fura-2を超える性能を有していた。
- ✓ GeNL(Ca²⁺)を用いて、iPS細胞由来の心筋細胞の自発的Ca²⁺振動を長時間観察することが可能となった。

謝辞

終始熱心なご指導を頂いた生体分子機能科学研究分野の永井健治教授、中野雅裕助教、新井由之助教に感謝の意を表します。

大変お忙しい中、審査委員会の副査を快く引き受けてくださいました紀ノ岡正博教授、渡邊肇教授に感謝申し上げます。

発光基質フリマジンの有機合成にあたり、丁寧なご指導をいただいた東京大学大学院医学系研究科生体情報学の浦野泰照教授、神谷真子講師に心より感謝いたします。

Fura-2 を用いた Ca^{2+} イメージングのためのフィルターセットを快くお貸しいただいた京都大学生命科学研究科高次生体統御学の今村博臣准教授に感謝いたします。

アデノ随伴ウィルスの調製方法に関するプロトコールをご提供いただいた名古屋大学環境医学研究所神経系分野 2 の中山章弘教授に感謝いたします。

最後に、5 年間の研究において、異なる研究テーマを持ちながらも深く議論し合い、アドバイスをいただいた研究室の皆さんに深く感謝いたします。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Kazushi Suzuki, Taichi Kimura, Hajime Shinoda, Guirong Bai, Matthew J. Daniels, Yoshiyuki Arai, Masahiro Nakano and Takeharu Nagai

Five color variants of bright luminescent protein for real-time multicolor bioimaging

Nat. Commun. **7**, 13718 doi: 10.1038/ncomms13718 (2016).

参考文献

1. Weissleder, R. & Pittet, M.J. Imaging in the era of molecular oncology. *Nature* **452**, 580-589 (2008).
2. Fernández-Suárez, M. & Ting, A.Y. Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 929-943 (2008).
3. Niswender, K.D., Blackman, S.M., Rohde, L., Magnuson, M.A. & Piston, D.W. Quantitative imaging of green fluorescent protein in cultured cells: comparison of microscopic techniques, use in fusion proteins and detection limits. *J Microsc* **180**, 109-116 (1995).
4. Sjulson, L. & Miesenböck, G. Optical recording of action potentials and other discrete physiological events: a perspective from signal detection theory. *Physiology (Bethesda)* **22**, 47-55 (2007).
5. Taniguchi, Y. et al. Quantifying *E. coli* proteome and transcriptome with single-molecule sensitivity in single cells. *Science* **329**, 533-538 (2010).
6. Zou, P. et al. Bright and fast multicoloured voltage reporters via electrochromic FRET. *Nat Commun* **5**, 4625 (2014).
7. Deisseroth, K. Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience. *Nat Neurosci* **18**, 1213-1225 (2015).
8. Shimomura, O. Bioluminescence : chemical principles and methods, Edn. Rev. (World Scientific, New Jersey; 2012).
9. Saito, K. & Nagai, T. Recent progress in luminescent proteins development. *Curr Opin Chem Biol* **27**, 46-51 (2015).
10. Shimomura, O., Masugi, T., Johnson, F.H. & Haneda, Y. Properties and reaction mechanism of the bioluminescence system of the deep-sea shrimp *Oplophorus gracilorostris*. *Biochemistry* **17**, 994-998 (1978).
11. Hochreiter, B., Garcia, A.P. & Schmid, J.A. Fluorescent proteins as genetically encoded FRET biosensors in life sciences. *Sensors (Basel)* **15**, 26281-26314 (2015).
12. Ward, W.W. & Cormier, M.J. An energy transfer protein in coelenterate bioluminescence. Characterization of the Renilla green-fluorescent protein. *J Biol Chem* **254**, 781-788 (1979).
13. Loening, A.M., Fenn, T.D., Wu, A.M. & Gambhir, S.S. Consensus guided mutagenesis of Renilla luciferase yields enhanced stability and light output. *Protein Eng Des Sel* **19**, 391-400 (2006).
14. Loening, A.M., Wu, A.M. & Gambhir, S.S. Red-shifted *Renilla reniformis* luciferase variants for imaging in living subjects. *Nat Methods* **4**, 641-643 (2007).
15. Hall, M.P. et al. Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. *ACS Chem Biol* **7**, 1848-1857 (2012).
16. Stacer, A.C. et al. NanoLuc reporter for dual luciferase imaging in living animals. *Mol Imaging* **12**, 1-13 (2013).
17. Saito, K. et al. Luminescent proteins for high-speed single-cell and whole-body imaging. *Nat Commun* **3**, 1262 (2012).
18. Takai, A. et al. Expanded palette of Nano-lanterns for real-time multicolor luminescence imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 4352-4356 (2015).

19. Welsh, D.K. & Kay, S.A. Bioluminescence imaging in living organisms. *Curr Opin Biotechnol* **16**, 73-78 (2005).
20. Goedhart, J. et al. Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%. *Nat Commun* **3**, 751 (2012).
21. Shaner, N.C. et al. A bright monomeric green fluorescent protein derived from *Branchiostoma lanceolatum*. *Nat Methods* **10**, 407-409 (2013).
22. Nagai, T. et al. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol* **20**, 87-90 (2002).
23. Tsutsui, H., Karasawa, S., Okamura, Y. & Miyawaki, A. Improving membrane voltage measurements using FRET with new fluorescent proteins. *Nat Methods* **5**, 683-685 (2008).
24. Shaner, N.C. et al. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **22**, 1567-1572 (2004).
25. Cranfill, P.J. et al. Quantitative assessment of fluorescent proteins. *Nat Methods* **13**, 557-562 (2016).
26. Reetz, M.T., Kahakeaw, D. & Lohmer, R. Addressing the numbers problem in directed evolution. *Chembiochem* **9**, 1797-1804 (2008).
27. Roy, A., Kucukural, A. & Zhang, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* **5**, 725-738 (2010).
28. Pettersen, E.F. et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**, 1605-1612 (2004).
29. Nagai, T. & Miyawaki, A. A high-throughput method for development of FRET-based indicators for proteolysis. *Biochem Biophys Res Commun* **319**, 72-77 (2004).
30. Dominy, C.N. & Andrews, D.W. Site-directed mutagenesis by inverse PCR. *Methods Mol Biol* **235**, 209-223 (2003).
31. Shimozono, S. et al. Concatenation of cyan and yellow fluorescent proteins for efficient resonance energy transfer. *Biochemistry* **45**, 6267-6271 (2006).
32. Bakayan, A., Domingo, B., Miyawaki, A. & Llopis, J. Imaging Ca(2+) activity in mammalian cells and zebrafish with a novel red-emitting aequorin variant. *Pflugers Arch* **467**, 2031-2042 (2015).
33. Kikuchi, A. et al. Structural characterization of a thiazoline-containing chromophore in an orange fluorescent protein, monomeric Kusabira Orange. *Biochemistry* **47**, 11573-11580 (2008).
34. Watanabe, R. et al. Biased Brownian stepping rotation of FoF1-ATP synthase driven by proton motive force. *Nat Commun* **4**, 1631 (2013).
35. Matsuda, T., Miyawaki, A. & Nagai, T. Direct measurement of protein dynamics inside cells using a rationally designed photoconvertible protein. *Nat Methods* **5**, 339-345 (2008).
36. Tiwari, D.K. et al. A fast- and positively photoswitchable fluorescent protein for ultralow-laser-power RESOLFT nanoscopy. *Nat Methods* **12**, 515-518 (2015).
37. Khan, F., He, M.Y. & Taussig, M.J. Double-hexahistidine tag with high-affinity binding for protein immobilization, purification, and detection on Ni-nitrilotriacetic acid surfaces. *Analytical*

- Chemistry* **78**, 3072-3079 (2006).
- 38. Doyon, J.B. et al. Rapid and efficient clathrin-mediated endocytosis revealed in genome-edited mammalian cells. *Nat Cell Biol* **13**, 331-337 (2011).
 - 39. Fotin, A. et al. Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy. *Nature* **432**, 573-579 (2004).
 - 40. Zimmermann, T. Spectral imaging and linear unmixing in light microscopy. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **95**, 245-265 (2005).
 - 41. Kogure, T. et al. A fluorescent variant of a protein from the stony coral Montipora facilitates dual-color single-laser fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Nat Biotechnol* **24**, 577-581 (2006).
 - 42. Saito, K. et al. Auto-luminescent genetically-encoded ratiometric indicator for real-time Ca²⁺ imaging at the single cell level. *PLoS One* **5**, e9935 (2010).
 - 43. Kaihara, A., Umezawa, Y. & Furukawa, T. Bioluminescent indicators for Ca²⁺ based on split Renilla luciferase complementation in living cells. *Anal Sci* **24**, 1405-1408 (2008).
 - 44. Li, Y., Sierra, A.M., Ai, H.W. & Campbell, R.E. Identification of sites within a monomeric red fluorescent protein that tolerate peptide insertion and testing of corresponding circular permutations. *Photochem Photobiol* **84**, 111-119 (2008).
 - 45. Zhao, Y. et al. An expanded palette of genetically encoded Ca²⁺ indicators. *Science* **333**, 1888-1891 (2011).
 - 46. Horikawa, K. et al. Spontaneous network activity visualized by ultrasensitive Ca(2+) indicators, yellow Cameleon-Nano. *Nat Methods* **7**, 729-732 (2010).
 - 47. Grimm, D. et al. In vitro and in vivo gene therapy vector evolution via multispecies interbreeding and retargeting of adeno-associated viruses. *J Virol* **82**, 5887-5911 (2008).
 - 48. Bootman, M.D., Cheek, T.R., Moreton, R.B., Bennett, D.L. & Berridge, M.J. Smoothly graded Ca²⁺ release from inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca²⁺ stores. *J Biol Chem* **269**, 24783-24791 (1994).
 - 49. Nagai, T., Yamada, S., Tominaga, T., Ichikawa, M. & Miyawaki, A. Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca(2+) by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 10554-10559 (2004).
 - 50. Tian, L. et al. Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nat Methods* **6**, 875-881 (2009).
 - 51. Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R.Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**, 3440-3450 (1985).
 - 52. Lin, M.Z. & Schnitzer, M.J. Genetically encoded indicators of neuronal activity. *Nat Neurosci* **19**, 1142-1153 (2016).
 - 53. Berglund, K., Birkner, E., Augustine, G.J. & Hochgeschwender, U. Light-emitting channelrhodopsins for combined optogenetic and chemical-genetic control of neurons. *PLoS One* **8**, e59759 (2013).

付録表1 オリゴヌクレオチドDNAのリスト

	Name of primer	Oligonucleotide sequence (5' to 3')
1	F-BH1-G-gfp_1	TTGGATCCGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
2	R-ER1-Nluc_171	ATGAATTCCGCCAGAATGCGTCGCACAG
3	F-Kpn1-Nluc_2	GCCGGTACCGTCTCACACTCGAAGAGTTCG
4	F-Kpn1-Nluc_3	GCCGGTACCTCACACTCGAAGAGTTCGTTG
5	F-Kpn1-Nluc_4	GCCGGTACCACACTCGAAGAGATTCTGGGG
6	F-Kpn1-Nluc_5	GCCGGTACCTCGAAGAGATTCTGGGGACTGG
7	F-Kpn1-Nluc_6	GCCGGTACCGAAGAGATTCTGGGGACTGGC
8	R-Kpn1-mNG_235	GCCGGTACCGTACAGCTCGTCCATGCCCATC
9	R-Kpn1-mNG_234	GCCGGTACCCAGCTCGTCCATGCCCATC
10	R-Kpn1-mNG_233	GCCGGTACCCCTCGTCCATGCCCATCACATCG
11	R-Kpn1-mNG_232	GCCGGTACCGTCCATGCCCATCACATCGG
12	R-Kpn1-mNG_231	GCCGGTACCCATGCCCATCACATCGGTAAAG
13	R-Kpn1-mNG_230	GCCGGTACCGCCCCATCACATCGGTAAAGGCC
14	R-Kpn1-mNG_229	GCCGGTACCCATCACATCGGTAAAGGCC
15	R-Kpn1-mNG_228	GCCGGTACCCACATCGGTAAAGGCC
16	R-Kpn1-mNG_227	GCCGGTACCATCGGTAAAGGCC
17	R-Kpn1-mNG_226	GCCGGTACCGTAAAGGCC
18	F-XX-Nluc_6	NNKNNKGAAAGAGATTCTGGGGACTGG
19	R-mNG_226	GGTAAAGGCC
20	R-Kpn1-gfp_229	ATGGTACCCCGGCGGCGGTACGAAC
21	F-XX-Nluc_5	NNKNNKGAAAGAGATTCTGGGGACTG
22	F-XX-Nluc_4	NNKNNKCTCGAAGAGATTCTGGGG
23	F-XX-Nluc_3	NNKNNKACACTCGAAGAGATTCTGG
24	R-gfp_229	CCCGCGCGGCGGTACGAAC
25	F-Xhol-mKO_2	ATTCTCGAGGTGAGCGTGATCAA
26	F-Xhol-G-mKO_2	ATTCTCGAGGGCGTGAGCGTGATCAAGC
27	F-Xhol-GG-mKO_2	ATTCTCGAGGGCGGTGAGCGTGATCAAGC
28	F-Xhol-GGS-mKO_2	ATTCTCGAGGGCGGTAGCGTGAGCGTGATCAAGC
29	F-Xhol-GGSG-mKO_2	ATTCTCGAGGGCGGTAGCGGTGAGCGTGATCAAGC
30	F-Xhol-GGSGG-mKO-2	ATTCTCGAGGGCGGTAGCGGTGGCGTGAGCGTGATCAAGCCGA
31	F-Xhol-GGSGGS-mKO-2	ATTCTCGAGGGCGGTAGCGGTGGCAGCGTGAGCGTGATCAAGCCGA
32	F-Xhol-GGSGGSG-mKO-2	ATTCTCGAGGGCGGTAGCGGTGGCAGCGGAGTGAGCGTGATCAAGCCGA
33	F-Xhol-GGSGGSGG-mKO-2	ATTCTCGAGGGCGGTAGCGGTGGCAGCGGAGGTGAGCGTGATCAAGCCGA
34	F-Xhol-GGSGGSGGS-mKO-2	ATTCTCGAGGGCGGTAGCGGTGGCAGCGGAGGTAGCGTGAGCGTGATCAAGCCGA
35	R-Sac1-mKO_218	ATTGAGCTCGGAGTGGGCCACGGCG
36	R-Sac1-T-mKO_218	ATTGAGCTCAGTGGAGTGGGCCACGGCG
37	R-Sac1-TL-mKO_218	ATTGAGCTCGAGAGTGGAGTGGGCCACGGCG
38	R-Sac1-TLG-mKO_218	ATTGAGCTCGCCGAGAGTGGAGTGGGCCACGGCG
39	R-Sac1-TLGM-mKO_218	ATTGAGCTCCATGCCGAGAGTGGAGTGGGCCACGGCG
40	R-Sac1-TLGMD-mKO_218	ATTGAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGGAGTGGGCCACGGCG
41	R-Sac1-TLGMDE-mKO_218	ATTGAGCTCCTCGTCCATGCCGAGAGTGGAGTGGGCCACGGCG
42	R-Sac1-TLGMDEL-mKO_218	ATTGAGCTCCAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGGAGTGGGCCACGGCG
43	R-Sac1-TLGMDELY-mKO_218	ATTGAGCTCGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGGAGTGGGCCACGGCG
44	R-Sac1-TLGMDELYK-mKO_218	ATTGAGCTCCTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGGAGTGGGCCACGGCG
45	R-Kpn1-tdTA_467	GCCGGTACCCAGGAACAGGTGGCG
46	F-Nluc	GGGACTGGCGACAGACAGCG
47	R-Nluc_6-XX-tdTA_467	CAACGAAATCTCMNNMNNCAGGAACAGGTGGTG
48	R-Nluc_6-XX-tdTA_466	CAACGAAATCTCMNNMNNGAACAGGTGGTG
49	R-Nluc_6-XX-tdTA_465	CAACGAAATCTCMNNMNNCAGGTGGTGCG
50	F-Sac1-Nluc_38	GCCGAGCTCGTGTCCGTACTCCGATCCAAG
51	R-Nco1-Nluc_37	GAACCATGGCCCGAGATTCTGAAACAAACTG
52	F-Sac1-Nluc_64	GCCGAGCTCTATGAAGGTCTGAGCGCGAC
53	R-Nco1-Nluc_63	GAACCATGGCGGGATGATGACATGGATGTC
54	F-Sac1-Nluc_67	GCCGAGCTCCTGAGCGCGACCAAATGGGC
55	R-Nco1-Nluc_66	GAACCATGGACCTTCATACGGGATGATGAC

56	F-Sac1-Nluc_70	GCCGAGCTCGACCAAATGGGCCAGATC
57	R-Nco1-Nluc_69	GAACCATGGGCCGCTCAGACCTTCATACGG
58	F-Sac1-Nluc_98	GCCGAGCTCACACTGGTAATGCACGGGG
59	R-Nco1-Nluc_97	GAACCATGGGCCATAGTCAGGATCACCC
60	F-Sac1-Nluc_104	GCCGAGCTCGTTACGCCAACATGATC
61	R-Nco1-Nluc_103	GAACCATGGCCCGTCGATTACCAGTGTG
62	F-Sac1-Nluc_108	GCCGAGCTCATGATCAGACTATTCGGACGG
63	R-Nco1-Nluc_107	GAACCATGGGTTCGCGTAACCCCGTC
64	F-Sac1-Nluc_122	GCCGAGCTCTCGACGGCAAAAGATCACTG
65	R-Nco1-Nluc_121	GAACCATGGCACGGCGATGCCTTCATAC
66	F-Sac1-Nluc_149	GCCGAGCTGGCTCCCTGCTTCCGAG
67	R-Nco1-Nluc_148	GAACCATGGGTCGGGTTGATCAGGCGCTC
68	F-BH1-koz-hmNG	ATGGATCCCACCCATGGTGTCCAAGGGCGAAGAG
69	F-BH1-G-hmNG	ATGGATCCGATGGTGTCCAAGGGCGAAG
70	F-BH1-hmNG	ATGGATCCATGGTGTCCAAGGGCGAAGAG
71	F-Kpn1-hmNG_2	ATGGTACCGTGTCCAAGGGCGAAGAG
72	F-Hind3-koz-hmNG_1	ATAAGCTTCGCCACCATGGTGTCCAAGGGCGAAGAG
73	F-Sal1-link-hmNG_1	ATGTCGACGGTACCGCGGGCCGGATCCAATGGTGTCCAAGGGCGAAGAG
74	F-Nhe1-koz-hmNG_1	ATGCTAGCCGCCACCATGGTGTCCAAGGGCGAAGAGG
75	R-Xho1-x-Nluc_171	ATCTCGAGTTACGCCAGAACATGCCTCGCACAG
76	R-ER1-x-Nluc_171	ATGAATTCTTACGCCAGAACATGCCTCGCACAG
77	R-Nluc_171-ER1	ATGAATTCCGCCAGAACATGCCTCGCACAG
78	R-Kpn1-Nluc_171	TATGGTACCCGCCAGAACATGCCTCGCACAG
79	R-Kpn1-GGSG-Nluc_171	ATGGTACCGCCTGATCCACCCGCCAGAACATGCCTCGCACAG
80	R-Not1-x-NLuc_171	ATGCGGCCGCTTACGCCAGAACATGCCTCGC
81	R-Bgl2-Nluc_171	ATTAGATCTCGCCAGAACATGCCTCGCACAG
82	F-Sal1-GS10 linker	TCGACCGGATCTGGCGGGAGGAAGCCGGAGGG
83	R-Sal1-GS10 linker	TCGACCCCTCGCTTCCCTCGCCAGATCCGG
84	F- BH1-koz-gfp_1	ATGGATCCCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
85	F-Hind3-koz-gfp_1	ATAAGCTTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
86	F- BH1-gfp_1	TTGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
87	F-GS-VCL_2	GGAGGCAGGAGGATCAGCGGATCTGGGCCGTCTTACACGCCAC
88	F-Kpn1-GS	ATGGTACCGCGGGAGGAAGCGGAGGCCAGAACATGCCTCGCACAG
89	R- Nluc_171-SKL-x-ERI	ATGAATTCTTACACTCGAAGATTCGTTGGGACTGG
90	R-ER1-x-VCL_1066	ATGAATTCTTACTGATACCATGGGTCTTTC
91	F-Hind3-koz-LAMP_1	ATAAGCTTCGCCACCATGGCGGGGGGGCGCCCG
92	R-Kpn1-LAMP_407	ATGGTACCGATGGTGTAGCCCGCGTGC
93	F-BH1-Nluc_1	A GGATCC G ATGGTCTTACACTCGAAGATTCGTTGGGACTGG
94	F-BH1-NLUC_1	ATGGATCCATGGTCTTACACTCGAAG
95	F-Hind3-koz-Nluc_1	ATAAGCTTCGCCACCATGGTCTTACACTCGAAG
96	F-ER1-Nluc_1	AGAATTCTGGTCTTACACTCGAAGATTCGTTGGGACTGG
97	Nluc_C166A	GGCTGGCGCTGGCGAACGCATTCTG
98	F-Nluc_G50C	TGCGAAAATGGGCTGAAGATC
99	R-Nluc_49	GCTCAGGACAATCCTTG
100	F-Nluc_G66C	TGCCCTGAGCGGGGACCAAATG
101	R-Nluc_65	TTC ATACGGGATGATGAC
102	F-Nluc_G97C	TGCACACTGGTAAATCGACGGG
103	R-Nluc_96	ATAGTCAGGATCACCC
104	F-Nluc_G136C	TGCAACAAAATTATCGACGAGC
105	R-Nluc_135	GTTCCACAGGGTCCCTG
106	R-4GS-Cam	GGAGCCACCTCCCCCTTGCTGTACATCATTGTT
107	R-3GS-Cam	GGAGCCACCTCCCTTGCTGTACATCATTGTT
108	R-2GS-Cam	GGAGCCACCCCTTGCTGTACATCATTGTT
109	F-C-M13_1	AAGAGGGCGCTGGAAGAAAAACTTC
110	F-CaM_102Q	GAATTACGTACGTACGAAACC
111	R-CaM_102Q	AGCAGCGCTGATGTAGCCG

