

2021年12月21日

自然科学研究機構 基礎生物学研究所
自然科学研究機構 生命創成探究センター

光合成色素を使って近赤外蛍光タンパク質を明るくすることに成功

細胞内でタンパク質がどのように働いているのかを調べる方法として、目的のタンパク質に蛍光タンパク質を融合させてその蛍光を観察する手法が広く用いられています。これまでに様々な色の蛍光タンパク質が開発されてきました。その中でも最も長波長で働くものが近赤外蛍光タンパク質 iRFP です。長波長帯の蛍光タンパク質は他の波長の蛍光タンパク質との同時多色イメージングに利用できる上、長波長帯の励起光や蛍光は生体深部透過性に優れているなどの利点があります。しかし、iRFP は他の蛍光タンパク質と違い、蛍光を発するためにビリベルジンという色素を必要とします。したがって、代謝によりビリベルジンを合成できない細胞種では iRFP を用いた蛍光イメージングが利用できないという問題がありました。

今回、基礎生物学研究所 定量生物学研究部門／生命創成探究センター 定量生物学研究グループの酒井啓一郎大学院生、後藤祐平助教、近藤洋平助教、青木一洋教授らは、東京大学の神谷真子准教授のグループとの共同研究により、iRFP の発色団として、今まで知られていたビリベルジンだけではなく、光合成色素として知られるフィコシアノビルンが使用できることを新たに発見しました。また、ビリベルジンよりもフィコシアノビルンを用いた方が、iRFP の蛍光が明るくなることがわかりました。さらに、ビリベルジンやフィコシアノビルンを代謝により合成することができない分裂酵母細胞においても、それらの色素の合成酵素を発現させることで iRFP の蛍光強度を増強させることに成功しました。

本成果は、英国の学術誌「Journal of Cell Science」に 2021 年 12 月 16 日付けで発表されました。

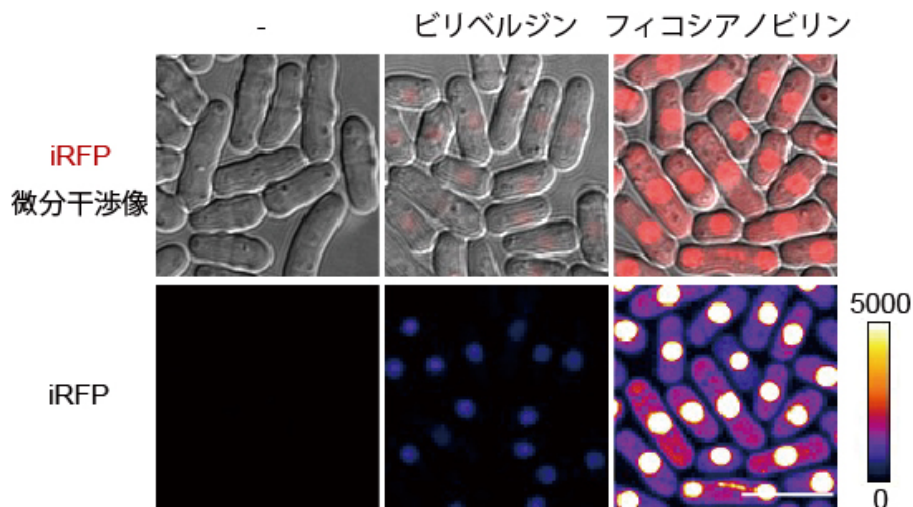


図. 分裂酵母において、フィコシアノビルンはビリベルジンよりも iRFP の蛍光輝度を上昇させることができる。

【研究の背景】

細胞内で働いているタンパク質を可視化する技術は今日の生命科学には欠かせないものとなっています。2008年にノーベル賞を受賞した下村脩先生がオワンクラゲから発見した緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescence Protein, GFP) を始めとして、様々な蛍光タンパク質がこれまでに開発されています。蛍光タンパク質を目的のタンパク質へと融合することで、そのタンパク質が細胞内でどのように働くのかを蛍光で観察することができます。異なる蛍光波長特性をもつ複数の蛍光タンパク質を組み合わせることで、複数のタンパク質を同時に可視化する多重蛍光イメージングも近年重要な技術となってきています。蛍光タンパク質のうち最も長波長の蛍光特性を持つ近赤外蛍光タンパク質 iRFP は、他の色の蛍光タンパク質と組み合わせた多重蛍光イメージングや近赤外光の生体深部透過性を活かした生体内 (*in vivo*) イメージングなどに必須の蛍光タンパク質です。

GFP などの一般的な蛍光タンパク質は、発色団と呼ばれる、光を受容し蛍光を発するための構造をタンパク質内部に自発的に作ることができるため、細胞に GFP を発現させるだけで蛍光を発します (図 1A)。しかし、iRFP は GFP などの蛍光タンパク質とは異なり、ビリベルジンと呼ばれる化合物を取り入れて発色団とします (図 1B)。ビリベルジンは多くの生物種で代謝によって合成されますが、その保有量が iRFP の蛍光に十分であるかは生物種や細胞種によって異なります。また代謝によりビリベルジンを合成できない生物や細胞では、原理的には iRFP を蛍光タンパク質として利用することができません。研究グループは、分裂酵母というシンプルな単細胞真核モデル生物の生命現象を可視化するために iRFP を使おうとしたところ、偶然にも iRFP の蛍光が観察できなかったことを発見し、何故分裂酵母の細胞内では iRFP が光らないのか、どうやったら光るようになるのかを知るためにこの研究をスタートしました。

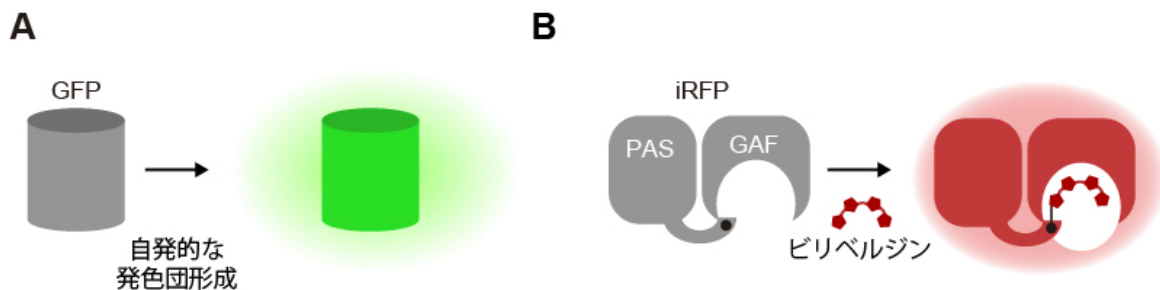


図 1. 蛍光タンパク質の発色のしくみ。(A) GFP は自発的に発色団を形成し蛍光を発する。(B) iRFP はビリベルジンを取り込み発色団を形成し、蛍光を発する。

【研究の成果】

本研究グループは、単細胞真核モデル生物の一つである分裂酵母において、iRFP が全く蛍光を発しないことを偶然にも発見しました (図 2A左)。この分裂酵母細胞に外からビリベルジンを添加したところ、iRFP の蛍光が観察されました。このことから分裂酵母の細胞内ではビリベルジンが合成されていないために iRFP が蛍光を発しなかったことが分かりました (図 2A右)。分裂酵母がビリベルジンを合成するための遺伝子を持っていないのではないかと考え、ゲノム情報を検索し、ビリベルジンの合成に必要なヘムオキシゲナーゼ (Heme Oxygenase, HO) 遺伝子の有無を調べました。その結果、予想通り分裂酵母ではこの遺伝子は見つかりませんでした (図 2B)。面白いことに、HO 遺伝子は分裂酵母が属する菌類において、散発的に失われていることが分かりました。

フィコシアノビルリンを用いた iRFP の蛍光イメージングをより利用しやすくするために、細胞内でフィコシアノビルリンを人工的に合成できるシステムを導入しました。研究グループは以前にフィトクロームを用いた光遺伝学技術のために遺伝子導入により哺乳類細胞でフィコシアノビルリンを合成するシステム「SynPCB」を開発していました(Uda, ACS Chem Biol, 2020)。そこで、試しに SynPCB を分裂酵母に導入してみたところ、期待通り分裂酵母内でフィコシアノビルリンが合成され、その結果として高輝度の iRFP 蛍光が安定して観察されることが分かりました(図 4)。

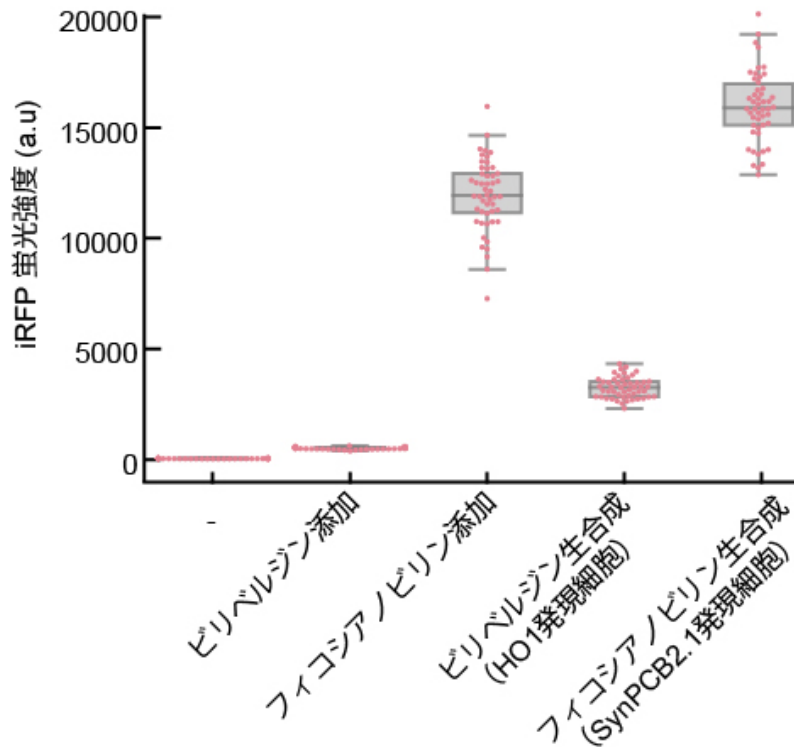


図 4. SynPCB システムは外からの発色団の添加無しに、iRFP の蛍光輝度を上昇させることができる。

SynPCB システムによるフィコシアノビルリン細胞内合成を利用し、iRFP と他の 4 種の蛍光タンパク質を用いて、生きた分裂酵母細胞で 5 種類のタンパク質の局在を同時に可視化しました(図 5)。これまで分裂酵母では多重蛍光イメージングは 3~4 色が限界でしたが、今回 iRFP の高輝度化に成功したことで、多重蛍光イメージングの選択肢が広がりました。

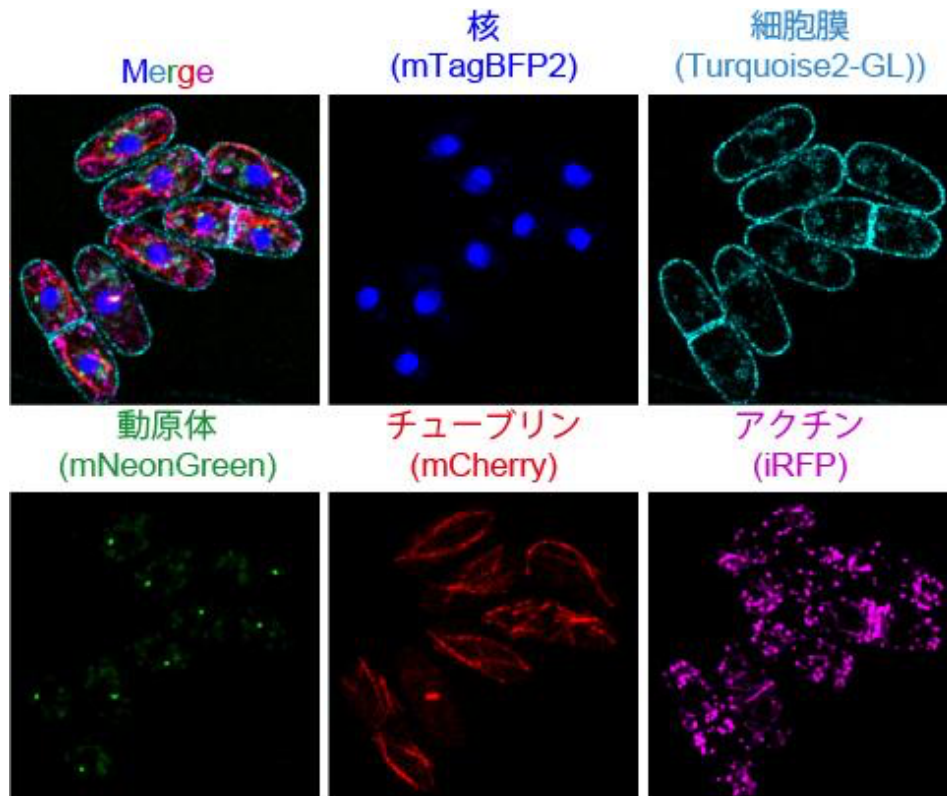


図 5. iRFP を利用した分裂酵母での 5 色多重蛍光生細胞イメージング

最後に、分裂酵母と同じくシンプルな真核モデル生物としてよく使われている出芽酵母においてもフィコシアノビルンによる iRFP 蛍光の増強が可能かどうかを検証しました。出芽酵母は分裂酵母とは異なりビリベルジンを合成する HO 遺伝子を持っているため、iRFP を発現させるだけで iRFP の蛍光が観察されました。しかし、フィコシアノビルンを添加したところ、iRFP 蛍光強度は 10 倍程度明るくなりました(図 6)。これは、出芽酵母細胞内のビリベルジン生産量が十分でないことと、フィコシアノビルンによる iRFP 蛍光強度増加で説明できます。これまで発現量の低さにより明るさが不十分で観察することのできなかつたタンパク質も、フィコシアノビルン添加によって出芽酵母で近赤外光イメージングに適応できる可能性を示しました。

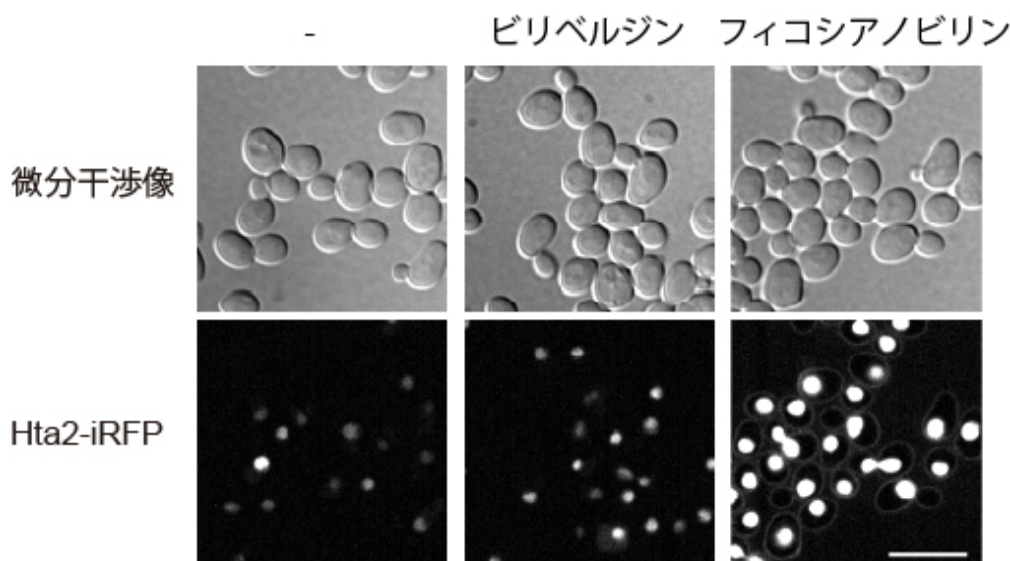


図 6. 出芽酵母でもフィコシアノビルリンは iRFP を明るくすることができる。

【本研究の課題と今後の展望】

本研究では、シンプルな真核モデル生物である分裂酵母、出芽酵母においてフィコシアノビルリンにより iRFP の蛍光輝度が増強されることを示しました。しかし、哺乳類培養細胞を用いた実験ではフィコシアノビルリンによる iRFP の蛍光増強は僅かでした。これは、哺乳類細胞内ではビリベルジンやフィコシアノビルリンが代謝されること、また培地の血清の中に含まれるビリベルジンやその類縁体による影響などが考えられます。将来的に、動物個体等で本研究の手法を適用する際には、組織や細胞種におけるビリベルジンやフィコシアノビルリンの代謝を注意深く考慮する必要があることを示唆しています。

近赤外光は生体深部透過性が高く、動物個体内の深場での蛍光イメージングを可能とします。本研究でのフィコシアノビルリンによる iRFP 蛍光の増強は、生体深部イメージングの S/N 比を向上させ、医療やバイオテクノロジーへの応用も期待されます。

【発表雑誌】

雑誌名 Journal of Cell Science

掲載日 2021 年 12 月 16 日

論文タイトル: Near-infrared imaging in fission yeast using a genetically encoded phycocyanobilin biosynthesis system

著者: Keiichiro Sakai, Yohei Kondo, Hiroyoshi Fujioka, Mako Kamiya, Kazuhiro Aoki, and Yuhei Goto

DOI: <https://doi.org/10.1242/jcs.259315>

【研究グループ】

本研究は、基礎生物学研究所／生命創成探究センターの青木 一洋教授ら、東京大学薬学部神谷真子准教授らによる共同研究グループの成果です。

情報解禁日時の設定はありません。

情報はすぐにご利用いただけます。

配信先：岡崎市政記者会、文部科学省記者会、科学記者会

【研究サポート】

本研究は、科学技術振興機構 CREST(JPMJCR1654)、および文部科学省日本学術振興会科学研究費助成事業(18H02444、19H05798、19K16050)の支援のもと行われました。

【本研究に関するお問い合わせ先】

基礎生物学研究所 定量生物学研究部門

生命創成探究センター 定量生物学研究グループ

教授 青木 一洋 (アオキ カズヒロ)

TEL: 0564-59-5235

E-mail: k-aoki@nibb.ac.jp

【報道担当】

基礎生物学研究所 広報室

TEL: 0564-55-7628

FAX: 0564-55-7597

E-mail: press@nibb.ac.jp

自然科学研究機構 生命創成探究センター 研究連携推進室

TEL: 0564-59-5201

FAX: 0564-59-5202

E-mail: press@excells.orion.ac.jp