

みにれびゅう

ビデオレート生物発光イメージング法によるタンパク質分泌動態の可視化

鈴木 崇弘¹, 井上 敏²

1. はじめに

真核細胞において、分泌シグナルペプチド配列を有するタンパク質は、小胞体で合成されて小胞輸送によりトランス-ゴルジネットワークを経て、開口分泌(エキソサイトーシス)により細胞外に放出される。また受容体などの膜タンパク質も、開口分泌によって細胞表面に運ばれる。我々は、分泌型ルシフェラーゼをレポーターとして、動物培養細胞のタンパク質分泌動態を発光により可視化する“生物発光イメージング法”を独自に開発してきた。本手法の原理は、生細胞から開口分泌によりルシフェラーゼ(発光酵素)が分泌された瞬間、細胞培養液に添加してあるルシフェリン(発光基質)と反応して生ずる微弱な発光(図1A)を、高感度カメラを備えた顕微鏡システムで検出するものである。この可視化法は、単一生細胞における全細胞表面の解析が可能であり(図1B)、また発光量の解析により分泌タンパク質の定量化が可能である。分泌型ガウシアルシフェラーゼ(*Gussia luciferase*: GLase, 海洋性動物プランクトンの一種 *Gussia princeps* 由来のルシフェラーゼ)を解析対象のタンパク質との融合タンパク質として発現させ、EM-CCD (Electron Multiplying Charge-Coupled Device) カメラで発光を検出することにより、個々の開口分泌によるタンパク質分泌動態について、30分間以上連続的にビデオ画像を取得する、すなわち最速0.03秒ごとのビデオレートイメージングが可能となった。時空間分解能の向上により、細胞外分泌後に細胞表面に結合したタンパク質と、拡散動態を示す開口分泌中のタンパク質を同時に可視化して区別することもできる。本稿では、レポータータンパク質 GLase を用いた分泌タンパク質のビデオレ

ト生物発光イメージング法を紹介し、本手法で可視化されたインスリンの周期性分泌と、細胞外基質分解酵素マトリックスメタロプロテアーゼの一つ matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) の極性分泌について述べる。

2. 分泌タンパク質を可視化する生物発光イメージング法の開発

1992年、Inouyeらは分泌型ウミホタルルシフェラーゼ遺伝子を用いて、生細胞からのルシフェラーゼタンパク質分泌過程の可視化に初めて成功した¹⁾。その後、1995年にRenardらのグループ²⁾、1998年にRothmanらのグループ³⁾によってもウミホタルルシフェラーゼを用いた可視化が報告された。しかし、ウミホタルルシフェラーゼ発光反応系は、GLaseと同等の高い比活性を示すが、減衰発光でなく連続発光であり、培養液中に分泌したウミホタルルシフェラーゼにより発光画像が飽和するため長時間(5分以上)の可視化ができないことや、当時の記録媒体の処理能力の問題等から、これらの技術が分泌タンパク質の可視化に応用されることはなかった。

一方、1994年以降、GFP (Green Fluorescent Protein) などの蛍光タンパク質プローブの開発と蛍光顕微鏡システムの進歩があり、生細胞におけるタンパク質の分子動態は、主に蛍光イメージング法で解析されている。生細胞の細胞膜近傍におけるタンパク質動態を可視化する上では、全反射蛍光(TIRF)イメージング法が主流であり、ガラスボトムディッシュのガラス面に接着した細胞膜において、開口分泌に至る前の小胞分泌動態を観察できる⁴⁾。また、2光子励起蛍光イメージング法も開口分泌動態の可視化に応用されており、細胞間隙への蛍光物質の流入を利用して開口分泌中の小胞形態を観察できる⁵⁾。

このような蛍光イメージング法に対して、分泌型ルシフェラーゼをレポーターとして用いる生物発光イメージング法は、細胞表面に分泌されたタンパク質分子を発光で検出できることから、発光量により分泌タンパク質をより定量的に解析することが可能であり、さらに単一生細胞の細胞表面全体を解析できる利点がある。一方、ビデオレート蛍光イメージング法では連続した励起光照射による生細胞のダメージが問題となるが、生物発光イメージング法は励

¹ 愛知学院大学歯学部生化学講座 (〒464-8650 名古屋市千種区楠元町 1-100)

² JNC(株)横浜研究所 (〒236-8605 横浜市金沢区大川 5-1)

Visualization of protein secretion by video-rate bioluminescence imaging

Takahiro Suzuki¹ and Satoshi Inouye² (¹Department of Biochemistry, School of Dentistry, Aichi-Gakuin University, 1-100, Kusumoto-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8650, Japan, ²Yokohama Research Center, JNC Corporation, 5-1, Okawa, Kanazawa-ku, Yokohama, 236-8605, Japan)

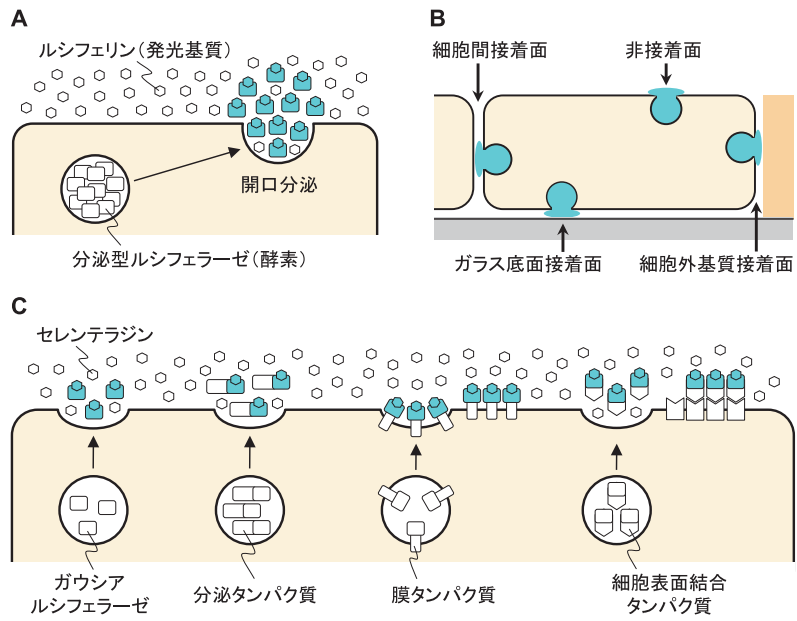


図 1

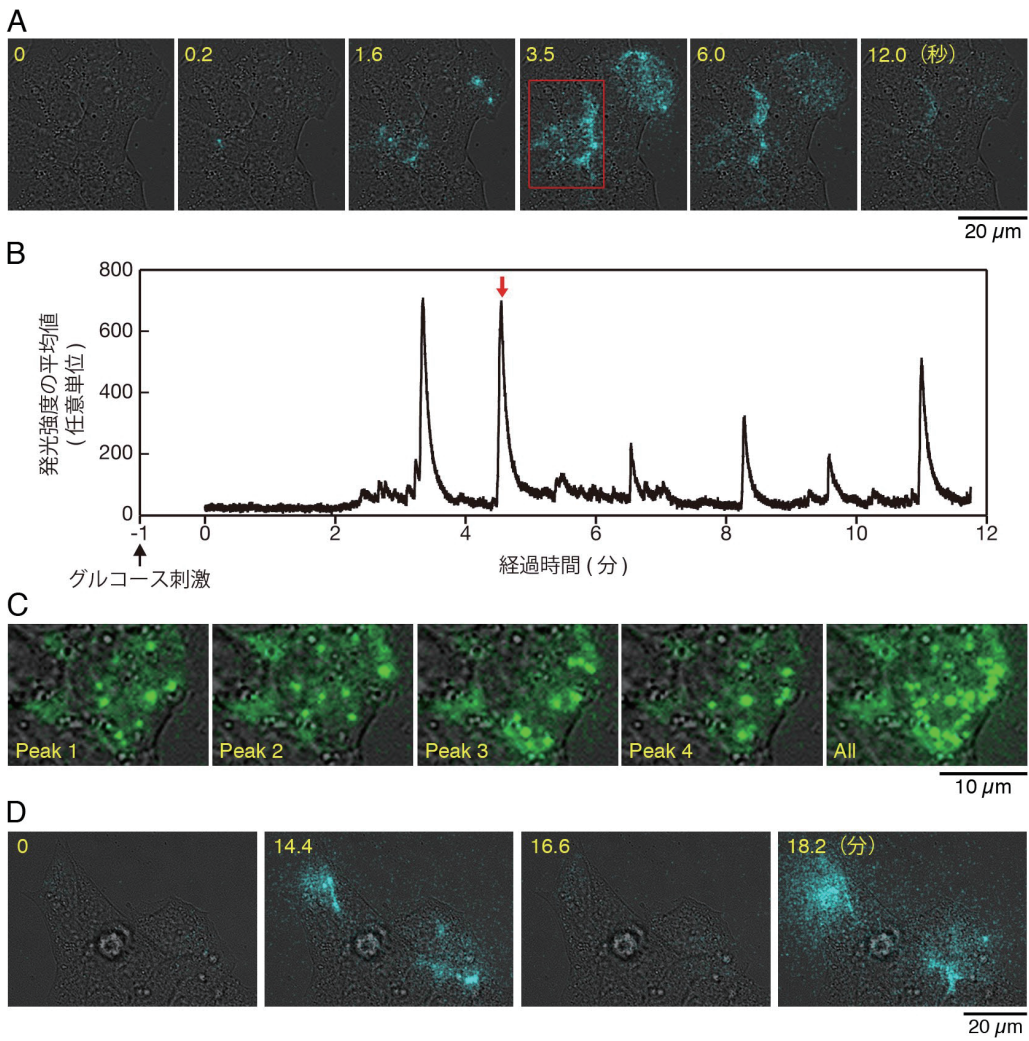


図 2

起光が不要であり、長時間の連続的なビデオ画像の取得が可能という大きな利点がある。そこで我々は、生物発光イメージング法によるタンパク質分泌動態を可視化する上での最大の課題となっていた、生物発光画像取得における時空間分解能の向上に取り組んだ。いくつかのルシフェラーゼや発光タンパク質をイメージングプローブとして検討した結果、GLaseが高い比活性を示し、レポーターとして最も有用であると考えられた。分泌シグナルペプチド配列を有するGLaseを発現させたCHO-K1細胞を高感度CCDカメラで観察し、単一生細胞におけるタンパク質分泌量の経時的変動を可視化することに成功した⁶⁾。また、ドーパミンβ水酸化酵素の細胞表在型シグナルペプチド配列とGLaseの融合タンパク質を発現させ、神経様に分化させたPC12D細胞を、フォトンカウンティングカメラで観察し、細胞体や神経突起先端の細胞表面における脱分極刺激依存的なGLaseタンパク質量の増加を可視化した⁶⁾。さらに実験系の改良を進め、高感度、高速画像取得、高解像度を兼ね備えたEM-CCDカメラを用いることにより、時空間分解能の改善を行った。すなわち、水冷の背面照射型EM-CCDカメラでGLaseの発光ビデオ画像を取得することで、40~100倍対物レンズを用いて1フレームあたり30~500msの露光時間で、個々の開口分泌によるタンパク質の分泌動態を可視化することに成功した^{7,8)}。

本手法ではGLase融合タンパク質をレポーターとして、さまざまな分泌タンパク質や膜タンパク質の開口分泌動態、タンパク質分泌量や開口分泌頻度の変動、分泌部位と細胞膜結合部位の局在を解析できる(図1C)。顕微鏡にEM-CCDカメラを接続して簡易暗箱の中に設置することで、比較的容易にイメージングシステムを構築できる。実験手技の詳細は、最近発行された論文を参考にしたい⁹⁾。

3. ガウシアルシフェラーゼ GLase

GLaseは、17アミノ酸残基の分泌シグナルペプチド配

列と168アミノ酸残基よりなる最小分子量のルシフェラーゼである¹⁰⁾。GLaseは、熱に安定な分泌タンパク質であり、発光反応には補欠因子を必要とせず、発光基質セレンテラジンの添加のみで最大発光波長488nmの青い光を発する^{11,12)}。GLaseの一次構造は71個のアミノ酸の繰り返し配列を持ち、10個のCys残基を有する。それぞれの繰り返し配列のみでも発光触媒活性を示すが、高触媒発光活性には、両方の繰り返し配列を必要とする¹³⁾。動物培養細胞でGLaseを細胞質に発現させると、その発光活性は培養液分泌GLase活性の1/500~1/1000以下であり^{6,11)}、また還元剤処理した精製GLaseの発光活性は消失する¹³⁾。すなわち、GLaseが高発光活性を示すためには、分泌過程でCys残基間のS-S結合形成が必須であると考えられる。一方、セレンテラジンを発光基質とするレニラ(*Renilla*, ウミシイタケ)ルシフェラーゼや分泌型オプロフォーラス(*Oplophorus*, ヒオドシエビ)ルシフェラーゼは、セレンテラジン類縁体に対して、比較的幅広い基質特異性を示すが^{12,14,15)}、GLaseはセレンテラジンに高い特異性を示す^{12,13)}。セレンテラジンが細胞膜を透過して細胞内に取り込まれる時間は比較的遅く、セレンテラジン添加後から1時間程度は分泌動態の可視化が可能である。これまでに解析対象としたタンパク質については、GLase融合タンパク質が内在のタンパク質と同じ経路で分泌されることが示されている。このような性質から、GLaseはセレンテラジンと組み合わせることで分泌タンパク質の生物発光イメージング法における最適なレポーターであると考えられる。

4. 生細胞における周期的なインスリン分泌の可視化と定量解析

GLaseを融合させた分泌インスリン(Insulin-GLase)発現ベクターを構築し、膵β細胞株MIN6に一過性に遺伝子導入してグルコース刺激による分泌を解析した⁹⁾。グルコース添加により、培養上清のGLase発光活性は数倍上昇した。さらに、Insulin-GLaseの発現と分泌について、抗

図1 分泌型タンパク質の生物発光イメージング法

(A) 分泌型ルシフェラーゼと培養液中のルシフェリンの発光反応を利用して、開口分泌を可視化する原理。(B) 単一生細胞表面において開口分泌を可視化できる領域。(C) 解析対象のタンパク質とガウシアルシフェラーゼの融合タンパク質による開口分泌と細胞表面局在の可視化法。

図2 ビデオレート生物発光イメージング法によるインスリン分泌の解析

Insulin-GLase遺伝子を一過性導入した膵β細胞株MIN6を用いて、グルコース添加1分後から60倍油浸対物レンズ(開口数1.49)を使用して発光ビデオ画像を取得した。発光画像は疑似カラー化し、明視野画像に重ねた。(A) 二つの細胞が同調した一過性の連続的な開口分泌によるInsulin-GLase分泌動態。露光時間100ms/frame。最初の画像からの経過時間を各画像の左上に示す。開口分泌されたInsulin-GLaseタンパク質の拡散により発光シグナル(シアン)が消失する。(B) 単一細胞における周期性インスリン分泌量の変動。(A)の赤枠内の発光量が赤矢印のピークに対応する。(C) 開口分泌部位の局在。露光時間100ms/frameで撮影したビデオ画像について、4回起こったオシレーションのピーク(Peak1~4,それぞれ10秒間)とすべてのフレーム(All,10分19秒間)の発光最大値合成画像(緑)を明視野画像に重ねた。(D) 細胞集団の中で離れた細胞の長時間同調した周期性Insulin-GLase分泌。露光時間500ms/frameで40分間ビデオ画像を取得する間、同調が続いた。画像取得からの経過時間を各画像の左上に示す。

GLase 抗体を用いた蛍光抗体染色とウェスタンブロット解析を行い、Insulin-GLase は、内因性インスリン分泌経路により分泌されていることが示された。次に、Insulin-GLase を発現させた細胞をグルコースで刺激し、セレンテラジンを添加した培養液中でインスリン分泌の可視化を行った。その結果、100~500 ms/frame の露光時間による発光ビデオ画像を取得し、単一小胞レベルの開口分泌による Insulin-GLase の分泌動態を可視化することができた (図 2A, 動画 1)。その際、一部の細胞において、周期性のある一過性の連続的な開口分泌に伴う、インスリン分泌のオシレーション (周期的変動) が観察された。発光ビデオ画像における発光強度の経時変化から、単一細胞におけるインスリン分泌のオシレーションを定量解析できた (図 2B)。また、一定時間あたりの発光ビデオ画像の発光強度最大値を重ねた合成画像から、開口分泌部位の局在が示された (図 2C)。また、細胞集団の中の離れた細胞どうしが同調した周期性のインスリン分泌を示すビデオ画像を 30 分以上連続的に取得することが可能であった (図 2D)。

一方、細胞底面 (ガラス接着面) から Z 軸方向へ上方に焦点面を移動しながら分泌動態を解析した結果、細胞間の接触面において強い発光シグナルを示す拡散性の開口分泌が観察された。周期性インスリン分泌は主として細胞間隙に拡散する分泌動態を示したことから、インスリン分泌における細胞間接着の重要性が示唆された。

薬物評価法としての可能性を検討するために、インスリン分泌促進剤であるスルホニル尿素剤グリベンクラミドの作用を生物発光イメージング法で解析した。低グルコース濃度で一過性の開口分泌が観察されたが、単独ではインスリン分泌のオシレーションは起こらなかった。グリベンクラミド刺激後に高グルコース刺激を行うと、速やかにインスリン分泌のオシレーションが観察された。しかしながら、Insulin-GLase を一過性導入した MIN6 細胞では、個々の細胞によって周期性を示さないものやほかの細胞と分泌が同調しないものもあり、安定した評価系として使用するには、改善が必要と思われた。現在、ラット膵島やほかの β 細胞株を用いても、生物発光イメージング法により周期的なインスリン分泌動態が観察できている。特に、膵島様スフェロイド培養において大部分の細胞が同調したインスリン分泌のオシレーションを示す発光 β 細胞株を樹立しており、解析を進めている。

5. 遊走がん細胞における MMP-2 分泌動態

細胞外基質分解酵素である MMP-2 は、がんの浸潤と転移において重要な役割を果たすことが知られている。MMP-2 は、プロ型酵素として分泌され、細胞表面に結合して活性化される。遊走細胞における MMP-2 の極性分布

は蛍光抗体染色法を中心に研究されているが、生細胞における開口分泌と細胞表面結合部位の分布については報告がなかった。そこで我々は、MMP-2 を内因性に発現する HeLa 細胞に GLase 融合 MMP-2 (MMP2-GLase) を発現させて、生物発光イメージング解析を行った⁶⁾。

最初に、MMP2-GLase の生化学的な解析を行った。MMP2-GLase の発光パターン解析では、GLase 単体と同様に、セレンテラジン (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 添加直後に高い発光活性を示し、徐々に発光活性が低下した。また、蛍光抗体染色とウェスタンブロット解析の結果から、MMP2-GLase は、内因性 MMP-2 と同様に、プロ型で分泌され、プロセシングされた活性化型として細胞表面に結合していることが示唆された。これにより、MMP2-GLase は MMP-2 分泌の適切なレポータータンパク質であると考えられた。

次に、HeLa 細胞に発現させた MMP2-GLase のビデオレート生物発光イメージング法による解析を行った。40 倍油浸対物レンズを使用し、セレンテラジンを培養液に加えて 20 秒後から露光時間 500 ms/frame の発光ビデオ画像を取得したところ、画像取得直後から定常的に存在して徐々に消光する発光スポットと、一過性に出現し数秒以内に拡散する発光スポットという、2 種類の発光スポットが観察された (動画 2)。定常的な発光スポットの経時的な発光量の低下は、ルミノメーターで測定した MMP2-GLase の発光低下パターンに一致することから、細胞表面に結合した MMP2-GLase が集積する微小領域 (直径約 3 μm) の発光シグナルと考えられた。一方、一過性の発光スポットは開口分泌している MMP2-GLase の発光シグナルと考えられた。このように、細胞表面に結合した MMP-2 と分泌された MMP-2 という二つの異なるタイプの MMP-2 分子をリアルタイムに可視化することができた。

細胞表面に結合した MMP2-GLase が消光した後の発光ビデオ画像を用いて、MMP2-GLase の開口分泌シグナルを解析した。遊走 HeLa 細胞は、先端ラッフル膜からの積極的な開口分泌を示した。特に、先端に沿って一過性の連続的な開口分泌を頻繁に示したことから、脱分極刺激に依存しない MMP-2 の構成性分泌における、一過性の連続的な開口分泌を引き起こす分子機構の存在が考えられた。また、遊走細胞の先端と退縮端における特定の領域 (直径約 2.5 μm) から繰り返し開口分泌が観察され、特に先端端では、そのような MMP-2 開口分泌のホットスポットが多数形成されることが示唆された。また、細胞の底面から上方まで焦点面を移動しながら解析した結果、MMP-2 が繰り返し分泌される部位と、分泌された MMP-2 が細胞表面に結合する部位は、ともに基底側に形成され、両者の分布は異なることが示唆された。

6. おわりに

分泌タンパク質のビデオレート生物発光イメージング法は、単一細胞の頂端 (apical) 側や、スフェロイド、細胞シート、組織スライスといった細胞集団において、対物レンズの倍率を限定することなく、タンパク質分泌動態を可視化することが可能である。細胞にとっては、細胞外マトリックスや細胞間の接着面がより生理的な条件の開口分泌の場といえる。本手法は、極性細胞の全細胞表面におけるタンパク質分泌動態を解析する上できわめて有用と考えられ、今後の応用範囲の拡大が期待できる。また、本手法では、発光基質を生細胞に添加してからの一定時間、細胞表面に結合したタンパク質も同時に可視化することができることから、さまざまな膜タンパク質や細胞表面結合タンパク質の細胞表面局在と開口分泌部位の解析への応用も考えられる。

- 1) Inouye, S., Ohmiya, Y., Toya, Y., & Tsuji, F.I. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 9584-9587.
- 2) Thompson, E.M., Adenot, P., Tsuji, F.I., & Renard, J.P. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 1317-1321.
- 3) Miesenböck, G. & Rothman, J.E. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 3402-3407.
- 4) Steyer, J.A. & Almer, W. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2, 268-275.
- 5) Takahashi, N. & Kasai, H. (2007) *Endocr. J.*, 54, 337-346.
- 6) Suzuki, T., Usuda, S., Ichinose, H., & Inouye, S. (2007) *FEBS Lett.*, 581, 4551-4556.

- 7) Suzuki, T., Kondo, C., Kanamori, T., & Inouye, S. (2011) *Anal. Biochem.*, 415, 182-189.
- 8) Suzuki, T., Kondo, C., Kanamori, T., & Inouye, S. (2011) *PLoS One*, 6, e25243.
- 9) Suzuki, T. & Inouye, S. (2014) *Methods Mol. Biol.*, 1098, 71-83.
- 10) Verhaegen, M. & Christopoulos, T.K. (2002) *Anal. Chem.*, 74, 4378-4385.
- 11) Tannous, B.A., Kim, D.E., Fernandez, J.L., Weissleder, R., & Breakefield, X.O. (2005) *Mol. Ther.*, 11, 435-443.
- 12) Inouye, S., Sahara-Miura, Y., Sato, J., Iimori, R., Yoshida, S., & Hosoya, T. (2013) *Protein Expr. Purif.*, 88, 150-156.
- 13) Inouye, S. & Sahara, Y. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 365, 96-101.
- 14) Inouye, S. & Shimomura, O. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 233, 349-353.
- 15) Inouye, S., Sato, J., Sahara-Miura, Y., Yoshida, S., Kurakata, H., & Hosoya, T. (2013) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 437, 23-28.

動画1 グルコース刺激による周期性 Insulin-GLase 分泌

グルコース添加1分後から露光時間 500 ms/frame で発光ビデオ画像を取得した。画像取得開始後約3分45秒から6分13秒までの発光画像 (シアン) を明視野画像に重ねた。60倍油浸対物レンズ (開口数 1.35) 使用。10倍速再生。約1時間のビデオ画像取得の間、個々の細胞は一過性に連続的な開口分泌を行う周期性のインスリン分泌動態を示した。

動画2 遊走 HeLa 細胞における MMP2-GLase 分泌

セレンテラジン添加後、20秒から露光時間 500 ms で発光ビデオ画像を取得した。画像取得開始時から1分後までの発光画像 (シアン) を明視野画像に重ねた。40倍油浸対物レンズ (開口数 1.30) 使用。5倍速再生。

著者寸描

●鈴木崇弘 (すずき たかひろ)



愛知学院大学歯学部准教授。博士 (薬学)。

■略歴 1969年岐阜県に生る。92年東京大学薬学部卒業。97年同大学院薬学系研究科博士課程修了。97~2003年藤田保健衛生大学医科学研究所助手。03~06年東京工業大学大学院生命理工学研究所助手。

06~10年愛知学院大学歯学部講師。10年より現職。

■研究テーマと抱負 タンパク質分泌動態とその分子機構について、生物発光イメージング法を応用して解明していきたい。また、細胞の生理化学研究における生物発光分析法の応用範囲を広げていきたい。

■趣味 溪流のフライフィッシング。

●井上 敏 (いのうえ さとし)

JNC株式会社横浜研究所主席研究員。博士 (農学)。

■略歴 1981年山口大学大学院農学研究科修士課程修了。同年よりチッソ株式会社/JNC株式会社 (2011年~)。在職期間中、九州大学医学部第1生化学 (82~84)、九州大学遺伝情報実験センター (85~87)、Whittier Institute (USA, 89~90)、Scripps Institution of Oceanography (USA, 91~94) へ出向。03~12年東京工業大学特任教授。

■研究テーマと抱負 生物発光を基本とした基礎と応用研究。