

2024年10月15日

報道機関 各位

国立大学法人東北大学

受容体1分子の動きを4色の蛍光色素で同時に観察 薬効評価を加速する蛍光・発光マルチモード標識法の開発

【発表のポイント】

- これまで困難とされていた4色同時細胞内1分子イメージングを世界最高水準で実現しました。
- 決め手となったのは細胞表面の受容体を蛍光・発光の両方で検出できる蛍光化ペプチド (FiBiT) 標識法の開発です。
- これにより1分子・1細胞・細胞集団の多様な階層で薬効の評価が可能になり、創薬への貢献が期待されます。

【概要】

薬の多くは細胞表面の受容体 (Gタンパク質共役型受容体、GPCR) に結合し、多様なシグナル伝達分子を介して情報を細胞内へと伝達します。生きた細胞で GPCR 分子とシグナル伝達分子が相互作用する様子を観察する技術は、薬の作用機序を分子レベルで理解する上で重要です。

東北大学大学院薬学研究科の依田叡樹大学院生、柳川正隆准教授、井上飛鳥教授らの研究グループは、蛍光化ペプチド (FiBiT) を用いた GPCR の蛍光標識手法と、最大4色同時に細胞内の蛍光色素1分子を観察できる顕微鏡システム「多色1分子計測システム」を開発しました。本技術を組み合わせることで、薬が結合した GPCR 分子がシグナル伝達分子と「いつ、どこで、どのように相互作用するか」についての情報を得ることができます。また、FiBiT 標識した GPCR は蛍光・生物発光の両方で検出できるため、蛍光1分子計測だけでなく、フローサイトメーター・発光プレートリーダーによる1細胞・細胞集団レベルの幅広い階層の薬効評価に応用できます (図1)。

本研究成果は、2024年10月12日に科学誌 Biophysics and Physicobiology に掲載されました。

【詳細な説明】

研究の背景

細胞表面には多様な膜受容体が存在し、細胞外からの刺激（薬・内因性ホルモン・神経伝達物質・味・匂い・光など）を細胞内へと伝える役割を果たしています。GPCR は薬の標的の 30% を占める膜受容体ファミリーであり、GPCR を起点とした細胞内シグナル伝達機構の理解は多くの薬の作用機序の解明につながる重要な課題です。細胞外からの刺激を受けた GPCR は、多様なシグナル伝達分子と相互作用することで細胞内へと情報を伝達しますが、その空間的な制御メカニズムは明らかではありません。

これまでに全反射照明蛍光顕微鏡^(注1)を用いて蛍光標識したタンパク質を 1 分子レベルで観察する手法（1 分子イメージング）が開発され、細胞表面で薬を受けた GPCR とシグナル伝達分子のふるまいの変化が明らかになってきました。異なる色で蛍光標識した GPCR とシグナル伝達分子を生細胞で同時に 1 分子イメージングすることで、薬刺激前後で GPCR とシグナル伝達分子が「いつ・どこで・どのように」相互作用するかを定量することが可能です。

多様な分子が関わる GPCR のシグナル伝達メカニズムを解明するためには、より多くの種類の分子を同時に 1 分子レベルで観察することが求められます。1 分子イメージングには、明るく光安定性の高い蛍光色素による観察対象の標識が必要です。また、同じ色で標識した分子が密集していると個々の分子を見分けることができないため、細胞表面の輝点密度が $1 \mu\text{m}^2$ 未満になるよう、観察対象の発現量や蛍光標識率を調整する必要があります。緑色蛍光タンパク質（GFP）^(注2) やその改変体を用いた蛍光標識は 1 分子イメージングでもよく用いられますが、蛍光タンパク質の多くは低分子の蛍光色素に比べて輝度・光安定性に劣ることや、標識率の調整ができないという欠点があります。そのため、HaloTag^(注3)、SNAP-tag^(注4) を用いた低分子蛍光色素による標識法も広く利用されてきました。このような蛍光標識手法を組み合わせ、複数の分子をそれぞれ異なる色で標識することで多色の 1 分子イメージングが行われています。しかしながら、市販されている高性能な蛍光色素と蛍光標識手法の組み合わせは限られており、これまで 4 色同時 1 分子イメージングは困難でした。

今回の取り組み

本研究では、既存の全反射蛍光顕微鏡を多色化し、最大 4 色同時に細胞内 1 分子イメージングができる「多色 1 分子計測システム」を開発しました（図 2）。レーザーの角度を電動制御できる自作の照明光学系や 4 色同時 1 分子イメージングに適した光学フィルタセットなど、顕微鏡システムの構成部品の詳細を論文中に公開しています。また、生物発光を用いたタンパク質検出手法 HiBiT システムに着想を得て、細胞表面に局在するタンパク質を特異的に蛍光標識する手法を新たに開発しました。HiBiT システムは、11 アミノ酸のペプチ

ドタグ (HiBiT) と、それに高い親和性で結合する分子量約 19,000 の NanoLuc ルシフェラーゼ^(注5)断片 (LgBiT) を用いて、生物発光により標的のタンパク質間相互作用を検出する技術です。LgBiT と HiBiT が結合したときに NanoLuc ルシフェラーゼが再構成され、発光基質ルシフェリンの存在下で発光します。

今回の研究では、蛍光修飾・親水化配列を付加した HiBiT ペプチド (Fluorescent-Flag-HiBiT: FiBiT) を合成し、LgBiT をつないだ GPCR (LgBiT-GPCR) を発現した細胞の培養液に添加することで、生細胞表面の LgBiT-GPCR を蛍光標識できるか試みました。この時、異なる4種類の蛍光色素で修飾した FiBiT を同時に添加し、多色1分子計測システムで観察しました。その結果、4色の FiBiT で標識された LgBiT-GPCR が形質膜中を側方拡散し、互いに結合・解離を繰り返す様子を観察することができました (図3)。また、FiBiT 標識法が既存の HaloTag・SNAP-tag 標識法と同時に使えることも確認し、将来的に4種類の異なる分子の同時計測にも利用できることを示しました。FiBiT によって標識された LgBiT-GPCR は、これまでの研究で示されてきた HaloTag 融合 GPCR と同様に、活性化後に形質膜中の動きが遅くなり、シグナル伝達分子との相互作用が変化することを確認しました。膜受容体分子の動きやシグナル伝達分子との結合・解離の頻度は他の手法では定量が難しいため、これらの分子動態を指標とした薬効評価は1分子イメージングならではと言えます。

FiBiT により標識された LgBiT 融合 GPCR は NanoLuc ルシフェラーゼとしての機能も持つため、蛍光・生物発光の両方で生細胞表面の GPCR の観察を可能にします。この有用性を調べるために、プレートリーダーを用いた、バルク計測^(注6)を行いました。GPCR 作動薬処理を行ったところ、GPCR の細胞内へのエンドサイトーシス^(注7)を蛍光・発光の両方で検出できることを確認しました。これらから、FiBiT 標識法は検出方法に応じてタグを交換することなく、1分子イメージング・フローサイトメトリー・発光プレートリーダーアッセイなどの多用途で薬効評価に応用できることが示されました (図1)。

今後の展開

生細胞における4色同時1分子イメージングは世界的にも成功例がわずかです。本研究で、「多色1分子計測システム」の構成部品の詳細を公開することで、本技術の普及と企業による社会実装につながることを期待されます。また、本研究で開発した FiBiT と従来の蛍光標識手法を組み合わせることで、GPCR を含めて4種類の分子を同時に1分子イメージングすることが可能になりました。今後は、本技術を用いて GPCR のシグナル伝達機構を空間的に解析することで、GPCR 標的薬の作用機序の解明を目指します。また、「多色1分子計測システム」を自動化・高速化することで、一度の計測で GPCR 下流の複数のシグナル伝達経路について薬効評価をする「1分子イメージングベースの化合物スクリーニング」への応用を目指します。

多色1分子計測システム 細胞内の分子の個性

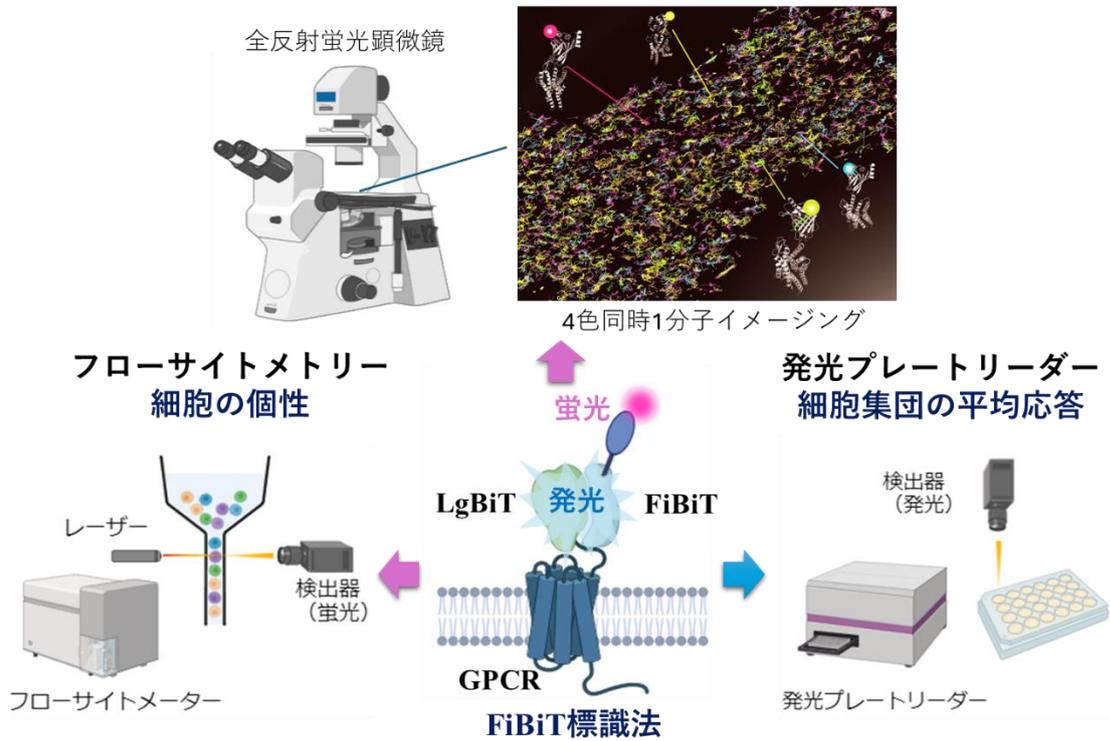


図 1 : FiBiT 標識法が実現する GPCR 標的化合物の階層横断的な薬効評価
右上図は 4 色の FiBiT で標識した GPCR の 1 細胞内の軌跡例

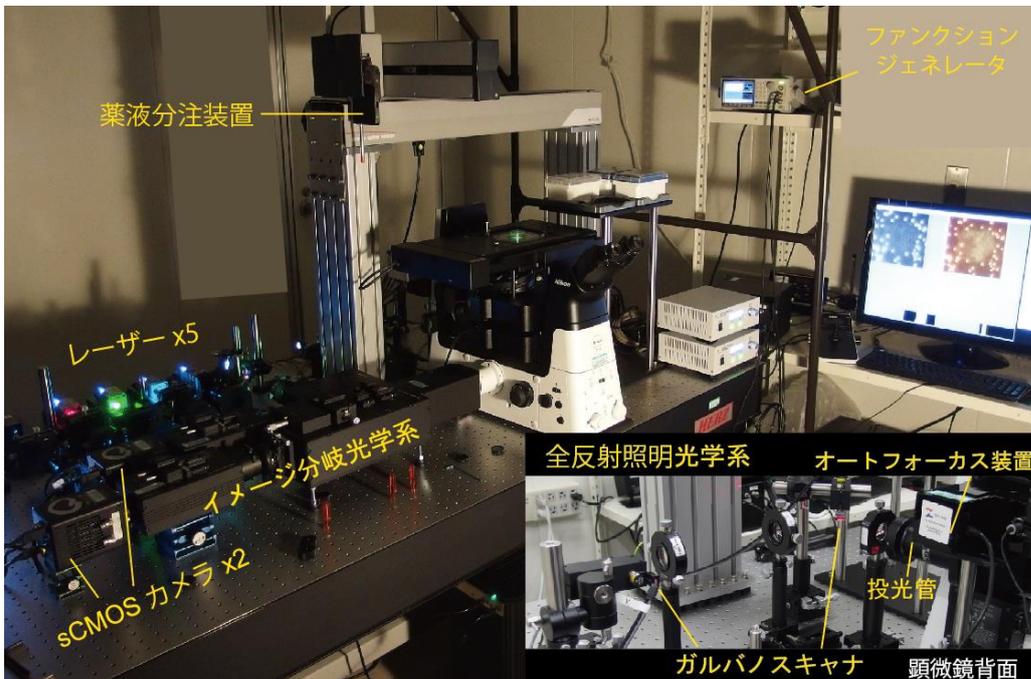


図 2 : 本研究で開発した多色 1 分子計測システム

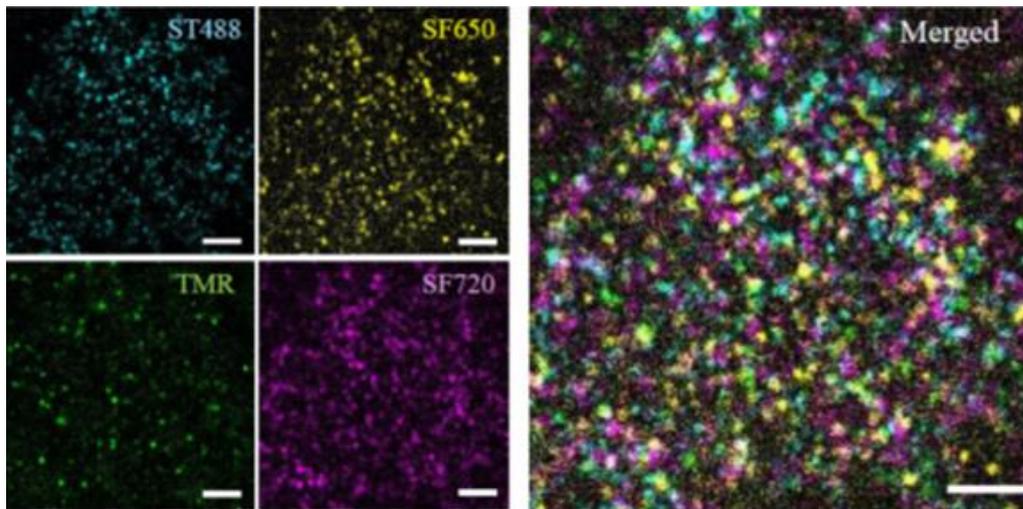


図3：4色同時イメージングの画像

LgBiT-GPCR を発現させた細胞を4種類の蛍光色素で標識したFiBiTで標識し、多色1分子計測システムを用いて4色同時に観察した。それぞれの波長で観察される輝点1つ1つがGPCR分子を示す。最も暗い輝点が1分子、より明るい輝点は数分子が50-300 nm程度の膜領域に集積した状態と推定される（スケールバー：5 μ m）

【謝辞】

F-FiBiT ペプチドの合成には伊藤玲子博士（理研 CBS）、1分子画像のイメージングおよび解析ソフトウェアの開発には安井真人博士（ZIDO 株式会社）、プラスミド DNA の構築には佐藤裕美氏（理研 CPR）にご協力をいただきました。ここに謝意を表します。

本研究は日本学術振興会(JP19H05647, JP21H04791, JP21H05113, JP21H05037, JP24K01982, JP24H01266)、科学技術振興機構(JPMJFR215T, JPMJMS2023)、JST さきがけ(JPMJPR20EF)などの支援を受けて実施されました。

【用語説明】

注1. 全反射蛍光顕微鏡

レーザー光がガラス面と溶液の界面で全反射した時に生じる近接場光を用いて、ガラス近傍（~200 nm）の領域に局在する蛍光分子を選択的に励起して蛍光観察する顕微鏡法。細胞内からの背景光が抑制されるため、形質膜に局在する受容体・シグナル伝達分子の観察に適している。

注2. 緑色蛍光タンパク質 (GFP)

緑色蛍光タンパク質 (GFP) はオワンクラゲから発見された蛍光タンパク質の一種で青色光を吸収し緑色光を放出する。これまでに多様な生物から蛍光タンパク質が同定・改良され、より明るく光安定性の高い改変体が開発されている。遺伝子工学を用いて細胞内のタンパク質に融合するで、細胞内のタンパク質の量や位置を可視化するために広く利用されている。

注3. HaloTag

ハロアルカンデハロゲナーゼである DhaA に由来する約 33 kDa のタンパク質タグ。HaloTag を目的タンパク質につなげて発現させ、HaloTag に共有結合的に結合する蛍光色素を添加することで、目的タンパク質を蛍光標識することができる。HaloTag に特異的に結合する様々な蛍光色素が市販されており、蛍光イメージングに広く用いられる。

注4. SNAP-tag

DNA 修復酵素 O6-アルキルグアニン-DNA アルキルトランスフェラーゼ (AGT) を改変した約 20 kDa のタンパク質タグ。HaloTag と同様に蛍光イメージングに用いられる。

注5. NanoLuc ルシフェラーゼ

トゲオキヒオドシエビ由来の生物発光タンパク質の改変体。分子量が小さく (19kDa)、比較的明るいことから、レポーターアッセイやタンパク質間相互作用の検出に広く用いられる。

注6. バルク計測

多数の分子や細胞集団の蛍光・発光をひとまとめに定量する計測手法。観察対象を 1 分子・1 細胞ごとに計測する手法と対比する形で用いられる。

注7. エンドサイトーシス

細胞が形質膜の一部を陥入させ、受容体の内在化や栄養分の取り込みを行う過程のこと。GPCR のエンドサイトーシスは細胞の重要なシグナル調節機構であり、受容体の脱感作やシグナル伝達の制御に関与する。

【論文情報】

タイトル : Four-color single-molecule imaging system for tracking GPCR dynamics with fluorescent HiBiT peptide

著者 : Toshiki Yoda, Yasushi Sako, Asuka Inoue*, Masataka Yanagawa*

*責任著者 : 東北大学大学院薬学研究科 准教授 柳川正隆、同教授 (京都大学大学院薬学研究科 教授 併任) 井上飛鳥

掲載誌 : Biophysics and Physicobiology

DOI : <https://doi.org/10.2142/biophysico.bppb-v21.0020>

URL:

https://www.jstage.jst.go.jp/article/biophysico/advpub/0/advpub_e210020/_article

【問い合わせ先】

(研究に関すること)

東北大学大学院薬学研究科

准教授 柳川 正隆

TEL: 022-795-6862

Email: yanagawa@tohoku.ac.jp

東北大学大学院薬学研究科

教授 井上 飛鳥

TEL: 022-795-6861

Email: iaska@tohoku.ac.jp

(報道に関すること)

東北大学大学院薬学研究科

総務係

TEL: 022-795-6801

Email: ph-som@grp.tohoku.ac.jp