実験技術

ルシフェラーゼ遺伝子による 遺伝子発現のリアルタイムモニター

名古屋大学大学院 理学研究科 近藤孝男
岡崎国立共同研究機構 生理学研究所 山口 登
名古屋大学大学院 理学研究科 石浦正寛

1. はじめに

我々は生物時計の分子遺伝学的解析のため、シアノバクテリアにルシフェラーゼ遺伝子を移入し、その生物時計の動きを発光としてモニターすることに成功した¹⁾。さらにこのバクテリアの寒天培地上のコロニーから個別に発光強度を自動測定するシステムを開発し、約1万個のクローンの生物時計の同時測定を実現し²⁾、生物時計突然変異体を分離し³⁾、その遺伝子をクローニングした。一方、ルシフェラーゼ遺伝子を使って遺伝子発現を一挙に調査するプロモータートラップ法を開発し、生物時計による遺伝子発現制御が予想以上に包括的であることを示した⁴⁾。これらの一連のシアノバクテリアの生物時計の解析（米国C. H. Johnson博士およびS. S. Golden博士との共同研究）は既に概説したので^{5), 6)}、ここでは我々の研究を支えた生物発光による遺伝子発現のリアルタイムモニターの技術的な側面をまとめておく。

2. 遺伝子発現のリアルタイムモニター

ゲノムに書き込まれた情報が蛋白質として機能を持ち、様々な生命活動を生じる。したがって生命現象の理解には、遺伝子発現が如何に時間空間的に行なわれているかを調査することが不可欠である。このためNorthern blotをはじめとして多くの方法が開発されている。これらの方法では各時点で試料を固定して測定するためかなりの労力を要するし、試料は測定毎に必要であるから、測定は時間軸に添って「点」で行なわれ、その時間分解能は極めて低い。無論、適切に計画さ

れば、充分な情報が得られるし、なにより、活性測定そのものは*in vitro*で行なわれ、信頼性が高い。これに対し、多くの困難と不確実性を伴うが、その活性を*in vivo*で光としてリアルタイムで捉え、転写活性を「線」として測定すれば、これまで見過してきた遺伝子発現の変動の生理学的意味を見いだすことも可能であろう。

3. ルシフェラーゼ遺伝子の導入によるシアノバクテリアの生物時計の測定

生物時計の研究には最低5～7日の連続測定が必要である。我々は発光細菌 (*Vibrio harveyi*) のバクテリアルシフェラーゼの遺伝子をレポーターとして用い、分子遺伝学的解析の容易なシアノバクテリア (*Synechococcus* sp. PCC 7942) の生物時計の連続測定を試みた (図1)。バクテリアルシフェラーゼは次の反応を触媒し、490nmの生物発光を示す。

図1 生物発光レポーターによるシアノバクテリアの生物時計の測定

上：シアノバクテリア (*Synechococcus* sp. PCC 7942) に組み込んだルシフェラーゼレポーター遺伝子、生物時計で制御されるプロモーター (*PpsbA1*) の下流にルシフェラーゼ遺伝子を接続し、ゲノム内の安全な部位 (斜線) に組み込んだ。 *Spr* はスペクチノマイシン耐性マーカー。下：連続明条件下での生物発光強度：測定は光電子倍増管による。最大の発光で肉眼の限界の1/1000以下の発光である。

Real-time monitoring of gene expression by luciferase reporter gene

Takao KONDO, Noboru YAMAGUCHI* and Masahiro ISHIURA

Division of Biological Science, Graduate School of Science, Nagoya University

*National Institute for Physiological Sciences

基質であるFMNH₂および酸素は細胞内に存在するが、デカナルは細胞外より供給しなければならない。幸いデカナルは脂溶性であり、かつ揮発性をもつので、気相を介して直接細胞内へ浸透させることができる。次に生物時計により調節されているプロモーターとして光合成の遺伝子 (*psbAI*, 光化学系IIのD1蛋白をコードする) のプロモーターを選び、ルシフェラーゼ遺伝子のコード領域と接続した。この融合遺伝子を抗生物質耐性遺伝子と共に生育に影響を及ぼさない事が確認されているゲノムの特定の位置に組み込んだ。こうすれば本来の *psbAI* 遺伝子は全く無傷のまま、ルシフェラーゼ遺伝子をこれと並行して発現させることができる。この組換え体の発光は非常に微弱だが、光電子倍增管を用いれば測定は容易である。その結果、図1に示す様に、連続明条件下で24時間周期の発光リズムを得た。生理学的解析から、この発光リズムがサーカディアンリズムの条件を満たすこと、そしてこの生物発光を指標として生物時計の解析が可能であることを確認した¹⁾。

4. コロニーからの測定

分子遺伝学的アプローチは実体の不明な生命現象の解明に不可欠な方法である。この方法では多数のクローンから目的の遺伝子を持ったものを選び出す過程(スクリーニング)が不可欠である。我々も寒天培地上のコロニーからリズムを能率良く測定する必要にせまられ、コロニー生物発光測定装置を開発した。この装置は、光検出器(冷却CCDカメラ)、試料交換装置および制御コンピュータからなっている(図2)。冷却CCDカメラは、Princeton Instrument製の512×512画素のもので(TE-CCD512TKB)、バクテリアルシフェラーゼの発光スペクトル領域で感度の高いBack-illuminatedタイプのものである。冷却(約-50℃)によって熱ノイズは極めて低減しており、長時間露光が可能な試料に

対しては理想的な検出器である。24時間サイクルの生物時計の解析には30分~1時間程度の測定間隔で充分なため、試料交換装置により12枚のシャーレを順次測定することにした。試料交換装置の回転テーブルの大きさは直径750mmで、熱伝導性をよくするためアルミニウム(25mm厚)で製作した。この回転テーブルをガタのないハーモニックギヤー付きの5相ステッピングモーター(オリエンタルUPD599HG2)で駆動した。回転テーブルの運転、検出器の制御およびデータの取り込みはCCDカメラコントローラを介して制御用コンピュータ(マッキントッシュLCII)で行った。このために独自のソフトウェアを開発した。

通常各試料を3分づつ露光し、暗バックグラウンドの測定も含め、サイクル時間は45分である。ソフトウェアは最初のサイクルで発光画像を解析し、境界線追跡法²⁾でコロニーを認識する。コロニーの位置は記憶され、次回からは各コロニー毎に発光強度が測定され記憶される。実験終了と共にデータは解析ルーチンにより処理され、リズムの周期、位相が計算される。図3に代表的な結果を示すが、1000コロニーの周期が30分内に収束し、高精度な解析を示している。適当なコロニ

図2 コロニー生物発光測定装置

図3 寒天培地上のコロニーの発光リズムの周期分布

寒天培地上の各コロニーの発光変動を120時間にわたり連続明下で測定し、夫々の周期を算出した。この実験では一枚の寒天培地上の1039個のコロニーを測定し、周期の1分毎の度数分布を示す。周期は概ね正規分布を示し、標準偏差は0.24時間である。

一密度の寒天平板培養から800～1200個のコロニーの測定が可能で、全体で約1万クロンの生物時計を同時に検定できる。この方法で変異源処理をした細胞のスクリーニングを繰り返し、既に100種以上の様々な表現形（短周期、長周期、無周期、波形異常）の突然変異体を得た。そのいくつかについては野生型ゲノムライブラリーによる遺伝的相補を利用して、既に変異遺伝子をクローニングしたが、この過程でも本装置による相補クロンのスクリーニングが不可欠であった。

5. 生物発光によるプロモータートラップ

生物時計は様々な遺伝子発現を制御している。これまで個別の遺伝子についてのNorthern解析が行われていたが、我々はコロニー生物発光測定装置とシアノバクテリアの高い相補的組み換え能を利用し、このバクテリアの遺伝子発現を包括的に調査することを計画した。この方法ではゲノムのランダムな小断片とルシフェラーゼ遺伝子を融合させたものをゲノムに組み込む。この小断片がプロモーター領域を含んでいれば、これを持ったクロンはそのプロモーターの活性に対応する発光を示す。発光クロンは容易に回収しその発光の変動を測定できるので、ゲノム中の全プロモーター数を充分上回る発光クロンを調査すれば全ゲノムの遺伝子発現を見渡すことができる。その結果、シアノバクテリアでは、あたかも指揮者がオーケストラを指揮するように、ほとんどすべての遺伝子発現が生物時計により統合され、様々な時刻で発現する様に調節されていることを見いだした⁴⁾。一方、集められたクロンの集合、即ちプロモーターの発光ライブラリーは遺伝子発現の様々な解析にきわめて有用である。例えば、特定の条件に反応するクロンをコロニー生物発光測定装置で選び、小断片を回収してクローニングして同定すれば、その条件によって誘導される遺伝子を容易に特定することができる。

6. 他の生物への応用

以上、シアノバクテリアでの遺伝子発現のリアルタイムモニターを紹介した。このほかに生物時計での応用ではKayらがアラビドプシス⁸⁾やショウジョウバエ⁹⁾で成功している。しかし、この方法は未だ汎用性を持っているわけではない。ここでは他の生物細胞内で遺伝子発現に応じた発光反応を実現するために考慮しなければならない要因を検討してみる。なお発光系を構築した場合、Northern blotやWestern blotで発光が目的とする遺伝子発現と対応していることを確認することを忘れてはならない¹⁰⁾。

1) ルシフェラーゼ遺伝子の選択

生物発光をとまなう生化学反応を触媒する酵素をルシフェラーゼというが、その実体は生物種によって様々である。最も良く知られたルシフェラーゼはホタルのものであろうが、発光細菌のルシフェラーゼとは全く異なった生化学反応を触媒する。したがって基質も異なっており、遺伝暗号の使用頻度や遺伝子の構成を考慮して遺伝子の発現効率が良いものを選ばなければならない。必要なら目的の生物にふさわしいように遺伝子を改変する必要がある。

2) 基質の供給

生物発光反応は酸化される基質（デカナール、ルシフェリンなど）、酸素、反応を駆動する高エネルギー物質（ATPやFMNH₂など）を必要とする。酸化される基質は通常細胞内にはないので、細胞外からの供給するが、その膜透過性が問題となる。化学修飾によって透過性を増すことも試みられているが、これが困難な場合は基質合成系遺伝子をも導入しなければならない。一方、高エネルギー物質は多くの細胞に存在するが、ルシフェラーゼが合成される場所（通常細胞質）において充分供給されなければならない。細胞内でしかるべき場所（たとえばミトコンドリア）へ移動させるためのシグナルをルシフェラーゼ遺伝子に付与することが必要な場合もある。

3) ルシフェラーゼの細胞内での安定性

レポーター遺伝子の役目は転写の活性を反映することであり、ルシフェラーゼは測定したい遺伝子のmRNAもしくは蛋白質と並行して分解される必要がある。ルシフェラーゼはホストの細胞にとって異物であるからその安定性は予測できない。ホストの蛋白質分解能が弱すぎれば発光量は時間分解能の低いものになるし、強すぎれば発光シグナルが弱くなる。最近クラゲから得られた蛍光蛋白（GFP）がレポーター遺伝子として多用されている¹¹⁾。この蛍光は効率がよく、基質も必要ないので好都合であるが、多くの場合GFPは細胞内で大変安定でリアルタイムレポーターとして利用するのは難しい。こういった場合は、遺伝子工学により適度な速度で分解されるよう改変する必要がある。

4) 発光反応の安定性、応答性

生物発光系の活性自体も当然細胞の代謝に依存する。したがって遺伝子発現を反映するためには測定条件下で発光反応自体が影響をうけないことが必要である。特に温度は多くの場合発光反応自体に直接影響を及ぼす。したがって環境条件を変えて測定する場合は、標準となる他のプロモーターを使った形質転換体も作成し、相対値を調べなければならない。なお生物発光は遺伝子発現が誘導さ

れルシフェラーゼ蛋白質が合成されてはじめて生じる。
この所要時間はホストにより様々であるが、データの解釈
にあたってはいつも考慮する必要があるだろう。

5) その他の生物発光によるリアルタイムモニター

クラゲの発光蛋白質エクオリンは Ca^{++} により生物発
光する。したがって細胞内 Ca^{++} 量のリアルタイムモニ
ターとして利用されてきた。以前はエクオリンを微小
注射して細胞内へ導入していたが、現在ではその遺伝
子がクローニングされ、形質転換生物で細胞内 Ca^{++} 量
のモニターが行なわれている。最近 Johnson らはタバ
コアラビドプシスに遺伝子移入し、細胞内 Ca^{++} 量が
生物時計により変動していることを示した¹²⁾。

なお、最後に発光波長の異なるシステムを利用して、
複数の遺伝子発現を同時にモニターにしようとする試
みも始まっている。

文 献

- 1) Kondo, T., *et al.*, (1993) *Proc. Natl Acad. Sci.*, **90**, 5672-5676.
- 2) Kondo, T., *et al.*, (1994) *J. Bacteriol.*, **176**, 1881-1885.
- 3) Kondo, T., *et al.* (1994) *Science*, **266** 1233-1236.
- 4) Liu, Y., *et al.* (1995) *Genes and Development*, **9**, 1469-1478.
- 5) 近藤孝男, 石浦正寛 (1994) 蛋白質核酸酵素 39 巻 2792-2802.
- 6) 近藤孝男, 石浦正寛 (1995), バリティ 10 巻 6 号 37-40.
- 7) 安居院猛, 中嶋正之 (1982) 「コンピュータ画像処理」産報出版
- 8) Millar, A. J. *et al.* (1995) *Science*, **267**, 1161-1163
- 9) Brandes, C. *et al.* (1996) *Neuron* **16**, 687-692.
- 10) Liu, Y., *et al.* *J. Bacteriol.* **177**: 2080-2086 (1996) .
- 11) Prasher, D. C. (1995) *Trends in Genetics*, **11**, 320-323.
- 12) Johnson, C. H., *et al.* (1995) *Science* **269**, 1883-1887.

第 34 回年会風景 —その3—

懇親会

受け付け

わたしたちもがんばりました。