

## 概日リズム研究におけるルシフェラーゼとその応用

中島芳浩<sup>1)</sup>、野口貴子<sup>1)</sup>、池田正明<sup>2,3)</sup>、近江谷克裕<sup>1,4)</sup><sup>1)</sup> 産業技術総合研究所 セルエンジニアリング研究部門<sup>2)</sup> 埼玉医科大学医学部<sup>3)</sup> 埼玉医科大学ゲノム医学研究センター<sup>4)</sup> 北海道大学大学院医学研究科連携研究センター

発光タンパク質であるルシフェラーゼは、細胞内の遺伝子発現を定量的かつ長時間に渡りモニターするレポーター遺伝子として広く用いられている。極めて複雑な転写・翻訳制御機構で構成され、さらに他のライフサイエンス分野と比較して際立って長い測定時間を要する概日リズム研究では、ルシフェラーゼは欠かすことのできない必須ツールの一つとなっている。本稿では、概日リズム研究で用いられている3種類のルシフェラーゼアッセイ系（トランジェント、リアルタイム測定、シングルセルイメージング）の背景と現状について、ルシフェラーゼの特徴と併せながら解説をする。

## 1. はじめに

ライフサイエンス研究の発展は、その測定方法や解析技術の確立に大きく依存している。例えば Sanger法を基にする遺伝子解析技術や、Millisが考案した遺伝子増幅法の確立により、ゲノム解読をはじめとする遺伝子解析が飛躍的に進展した。概日リズム研究におけるルシフェラーゼテクノロジーについてもその例外ではない。リアルタイム測定法の確立と *Kai* 遺伝子の発見、シングルセルイメージング法の確立と細胞間リズム同調の発見などは先駆的な測定系の確立がブレークスルーをもたらした良い例であろう。

発光レポーターであるルシフェラーゼは、細胞内で起こる遺伝子発現を簡便に測定するツールとして広く用いられている。概日リズム研究は、このレポーターの特徴を巧みに利用し、測定に用いている分野の一つである。ルシフェラーゼについては、近年、種々の発光生物から多数のルシフェラーゼ遺伝子が単離・同定され、遺伝子発現解析に用いられるルシフェラーゼの種類も増加している。

本稿では、哺乳類細胞系を中心に、概日リズム研究で用いられている3種の遺伝子発現解析系（トランジェントアッセイ系、リアルタイム測定系、シングルセルイメージング系）について、その原理と応

用例を紹介するとともに、論文には記載され難い、筆者らが経験した（抱えている）測定上の注意・問題点について、また遺伝子や測定装置の市販化の状況についても記載したい。

## 2. 生物発光とルシフェラーゼ

生物発光は、発光生物が発する可視光であり、その光の色（波長）も青～赤と多様である。発光生物には、細菌、キノコ、クラゲ、甲虫、魚など、多くの種がある。図1に我々の研究室で採取し、実験に

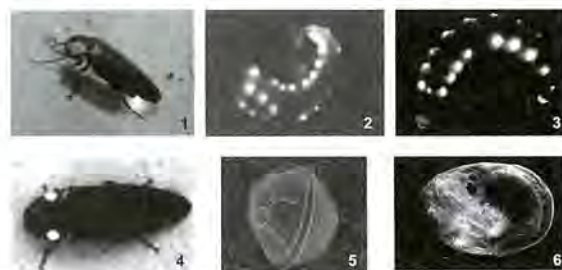
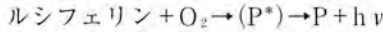


図1 様々な発光生物

1. ハイケボタル (*Luciola lateralis*)、丹羽一樹博士提供)、2. イリオモテボタル (*Rhagophthalmus ohbai*)、鈴木博文博士提供)、3. 鉄道虫 (*Phrixothrix hirtus*)、4. クリックビートル (*Pyrearinus termitilluminans*) (3, 4: Vadim Viviani博士提供)、5. 渦鞭毛藻 (*Lingulodinium polyedrum*)、6. ウミホタル (*Vargula hilgendorffii*) (5, 6: 小江克典博士提供)。

用いている発光生物を示した。

生物発光の分子機構は、発光基質（ルシフェリン：発光基質の総称）の酸化を発光酵素（ルシフェラーゼ：発光酵素の総称）が触媒する酵素反応である。一般的に、ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応は、



として表わされ、ルシフェラーゼの存在下、酸化によりルシフェリンの酸化物（P\*）が励起状態へと変化し、これが基底状態に戻る際、分子内に生じた過剰なエネルギーが光として放出される。生物発光の特徴としては、高い発光量子収率であることが挙げられ、ホタルでは88%と報告されている<sup>17)</sup>。それ故、発する光は極めて発熱の少ない冷光である。またもう一つの特徴として、基質特異性が挙げられる。例えば図1-1~4の甲虫のルシフェラーゼは、渦鞭毛藻（図1-5）やウミホタル（図1-6）のルシフェリンを触媒せず、逆に渦鞭毛藻やウミホタルのルシフェラーゼは甲虫のルシフェリンを触媒しない。このような生物発光の特徴が、後述の発光レポーターとしての利点の1つであり、またこれらの特徴を巧みに利用した多種のルシフェラーゼアッセイ系が構築されている。なお、生物発光の化学・生化学的なメカニズムについては紙面の都合上省略したが、詳細については最近の総説を参照して頂きたい<sup>18)</sup>。

さて、種々の生体現象を解析するためのツールと

して、多種のレポーター遺伝子が用いられているが、各々長所・短所があり、全ての測定・検出が出来る完璧なレポーターは存在しない。そのため、それらの長所を活かし、目的にあわせて適材適所で使用することが大事である。レポーター遺伝子の代表格である蛍光タンパク質は、励起光を照射することで蛍光を発し、その強度もルシフェラーゼと比較して格段に高い。そのため、ミリ秒オーダーの非常に速い経時変化やタンパク質の細胞内局在のイメージングには絶大な威力を発揮する。一方、ルシフェラーゼはGFPと比較して、見かけ上の発光強度は低く、長時間（数十秒~数十分）の測定が必要となるため、ごく短時間で起こる変動を検出することは難しい。しかし、バックグラウンドが非常に低く、また測定系のダイナミックレンジも広いことから、GFPや他のレポーター遺伝子と比較して、最も高い定量性を示すと考えられる。さらに、ルシフェラーゼの発光は励起光を必要としないことから、照射による細胞障害あるいは光に感受性の組織や個体への影響を無視できる利点がある。

ここ2~3年でメーカーから購入可能なルシフェラーゼ、ルシフェリンが飛躍的に増え、これに伴い新たな測定方法の開発も精力的に行われている。表1に、市販されているルシフェラーゼとルシフェリンのリストを示す。最初に市販化された北米産ホタル（*Photinus pyralis*）ルシフェラーゼとウミシイタケ（*Renilla reniformis*）ルシフェラーゼは、現在発

表1 市販されているルシフェラーゼおよびルシフェリン

由来	遺伝子名	ルシフェリン	分子量 (kDa)	最大発光波長 (nm)	購入先
<b>非分泌型</b>					
ホタル	Luc(+), Luc2	ホタルルシフェリン	61	562	プロメガなど
レニーラ	RLuc	セレンテラジン	36	480	プロメガなど
クリックビートル (ジャマイカ産)	CBGluc	ホタルルシフェリン	60	537	プロメガ
クリックビートル (ジャマイカ産)	CBRLuc	ホタルルシフェリン	60	613	プロメガ
クリックビートル (ブラジル産)	ELuc	ホタルルシフェリン	61	540	東洋紡績
鉄道虫	SLR	ホタルルシフェリン	61	630	東洋紡績など
イリオモテボタル	SLO	ホタルルシフェリン	60	550	東洋紡績など
イリオモテボタル	SLG	ホタルルシフェリン	60	580	東洋紡績など
ビブリオ		FMNH2	80	490	-
<b>分泌型</b>					
コペポータ	Gluc	セレンテラジン	20	480	NEB
コペポータ	MetLuc	セレンテラジン	24	480	Clontech
ウミホタル	CLuc	ウミホタルルシフェリン	61	465	ATTO



光レポーター遺伝子として最も頻繁に用いられている。発光基質の違いを利用し、両者を併用するデュアルルシフェラーゼアッセイが、最も標準的なルシフェラーゼアッセイ法とされている。我々のグループで単離・改良したイリオモテボタル (*Rhagophthalmus ohbai*, 図1-2) ルシフェラーゼ、鉄道虫 (*Phrixothrix hirtus*, 図1-3) ルシフェラーゼは、発光色の違いを利用した新しいレポーターアッセイ系に用いられている。また同様のコンセプトに基づいたジャマイカ産クリックビートル (*Pyrophorus plagiophthalmus*) ルシフェラーゼも近年プロメガ社より発売された。我々が改良したブラジル産クリックビートル (*Pyrearinus termitilluminans*, 図1-4) ルシフェラーゼは、他のホタル系ルシフェラーゼよりも高い発光強度を示し、発光イメージング用ルシフェラーゼとして製品化された。また、市販化はされていないが、発光細菌 (*Vibrio harveyi*) ルシフェラーゼは多種の細菌における遺伝子発現検出に広く用いる。コベポータ (*Gaussia princeps*, *Matridia lpnga*) およびウミホタル (*Cipridina noctiluca*, 図1-6) ルシフェラーゼは、前述のルシフェラーゼとは異なり、分泌シグナルを有する分泌型ルシフェラーゼであり、細胞の培養液中のルシフェラーゼ活性を測定するアッセイ系に用いられている。

### 3. ルシフェラーゼを用いた遺伝子発現の原理

ルシフェラーゼを用いた遺伝子発現解析法の原理について簡単に述べる。解析したい転写調節領域 (プロモーター、エンハンサー、サイレンサーなど) をルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入する。転写活

性を持たないシス配列やイントロンの影響を解析する場合は、ルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入されているTKやSV40などの恒常的プロモーターの上流に組み込む。これらのレポーターベクターを細胞に導入し、転写に伴って発現するルシフェラーゼの発光を大過剰のルシフェリンを添加することで測定する。微生物、魚類、植物、哺乳類、いずれの生物種における発光レポーターアッセイも、以上の原理に基づいている。

### 4. トランジェントアッセイ系

トランジェントアッセイ系は、測定の簡便さとハイスループットアッセイが可能である点から、一般にルシフェラーゼを用いた遺伝子発現解析系で最も汎用されている。この系では、レポーターベクターを細胞に導入し、一定時間経過後細胞を破砕し、遺伝子発現に伴うルシフェラーゼ活性を測定する。従来は、レポーターを一過的 (トランジェント) に細胞に導入するという意味でトランジェントアッセイと呼ばれたが、近年は後述のリアルタイム測定でも一過的な遺伝子導入が行われるため、本稿では細胞や組織を破砕し、ルシフェラーゼ活性を測定する細胞破砕系をトランジェントアッセイ系と定義する。以下に、2つのレポーターを併用するデュアルアッセイ系と、最近我々が開発した発光色の違いを利用したマルチカラーアッセイについて紹介する。

#### 4-1. デュアルアッセイ

デュアルアッセイは、基質特異性など、レポーターの酵素特性の違いを利用し、2種のレポーターベクターを用いて転写活性を測定する系である。そ

(1) ホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼを用いたデュアルルシフェラーゼアッセイ



(2) 赤・橙・緑ルシフェラーゼを用いたマルチカラールシフェラーゼアッセイ



図2 デュアルおよびマルチカラールシフェラーゼアッセイによるトランジェントアッセイのスキーム

の組合せは多様で、一方をルシフェラーゼ、他方をβ-ガラクトシダーゼなどのレポーター酵素を用いる場合もある。現在最も多く用いられている、ホタルとウミシイタケルシフェラーゼを併用するデュアルアッセイでは、解析したいプロモーター領域やシス配列をホタルルシフェラーゼに連結、テストレポーターベクターとし、一方で恒常的プロモーターをウミシイタケルシフェラーゼに連結し、内部コントロールベクターとしている。内部コントロールは、継代時の細胞数、トランスフェクション効率、細胞溶解効率など種々の実験操作で生じる誤差を修正するために非常に重要である。これら2つのベクターを細胞に同時に導入し、最初にホタルルシフェリンによりホタルルシフェラーゼ活性を測定、続いてセレンテラジンによりウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定する(図2-1)。プロモーター活性は、ウミシイタケルシフェラーゼ活性に対するホタルルシフェラーゼ活性の相対値として評価される。発光測定には、光電子増倍管が配置されたルミノメーターが用いられる。この系の利点は、1チューブ(あるいは1ウェル)内で2つのルシフェラーゼ活性が測

定できる点である。これは酸性のセレンテラジン溶液の添加により、発光しているホタルルシフェラーゼを消光させる原理に基づいている。

蛇足ではあるが、以前発光のキネティックを測定した際、測定中に突然発光強度が10~15%低下する現象が観察された。装置の電気ノイズなど慎重に原因を探ったところ、結局基質の添加時に生じる泡が鏡の役割をして、見かけ上の強度をかき上げしており、泡が破裂することで強度が低下することに気が付いた。測定結果を数値だけを見ていた時には気が付かなかったことである。細かいことであるが、精度低下の原因となるので操作上の注意点として参考までに記した。

#### 4-2. マルチカラーアッセイ

前述のデュアルアッセイ系は、2つのルシフェラーゼのうち、一方を内部コントロールとして用いるため、1つの遺伝子の転写活性を相対的に評価するだけで、2つ以上の転写を同時にモニターすることは不可能である。細胞内で起こる複雑な転写調節機構を理解するには、複数の遺伝子発現を同時に解

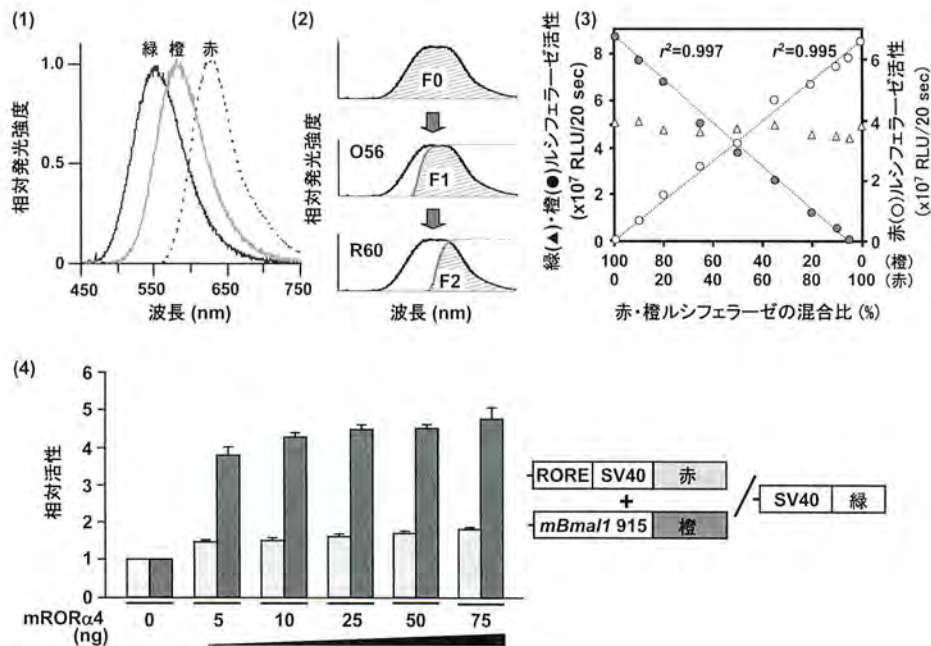


図3 緑、橙および赤ルシフェラーゼの色分離による同時定量

(1) NIH3T3細胞に発現させた緑、橙、赤ルシフェラーゼの発光スペクトル。(2) ロングパスフィルターを用いた発光測定スキーム。各図は緑、橙、赤ルシフェラーゼを等量混合した場合の発光スペクトルおよびロングパスフィルターの透過スペクトルを示す。上図：フィルター無しでの全光の測定。中図：O56フィルターによるF1値の測定。下図：R60フィルターを用いたF2値の測定。斜線部は各値の波長領域を示す。(3) 緑、橙、赤ルシフェラーゼを用いたアッセイ系の定量性。各々のルシフェラーゼの混合比を変えて、緑(▲)、橙(●)、赤(○)を同時に定量した(RLU: Relative Light Unit)。(4) マルチカラーアッセイを用いたRORα4によるmBmal1プロモーターおよびRevErb/ROR応答配列(RORE)の転写活性化の同時測定

析することが重要であるが、そのためには、さらにもう1つのルシフェラーゼをシステムに追加し、同時に3つのルシフェラーゼの発光活性を測定しなければならない。近年我々は、いずれもホタルルシフェリンを基質として発光するイリオモテボタル由来の緑ルシフェラーゼ (SLG)<sup>14)</sup>、その部位特異的変異体の橙ルシフェラーゼ (SLO)<sup>23)</sup>、および鉄道虫由来の赤ルシフェラーゼ (SLR)<sup>24)</sup> をレポーターとして用い、各々の発光スペクトルを光学フィルターで分離・定量することにより、2つもしくは3つの転写活性を同時に測定する方法を開発した<sup>14,25)</sup>。

このアッセイ系では、緑・橙・赤ルシフェラーゼのうち2つをテストレポーターに、1つを内部コントロールに用い、2つのテストレポーターの活性を内部コントロールレポーターで補正することにより、2つの転写活性を同時に測定することを想定した (図2-2)。図3-1に各ルシフェラーゼの発光スペクトルを示す。ホタルをはじめとする甲虫由来のルシフェラーゼは、測定溶液のpHに連動して、色を変えるものと、変えないものがある。前者は前節のデュアルアッセイ系で記載したホタルルシフェラーゼである。これに対し、イリオモテボタル、鉄道虫由来ルシフェラーゼは後者のタイプであり、発光色を分離・定量化するアッセイ系に適している。図3-2は光学フィルターを用い、3色の発光を測定するスキームを示す。光学フィルターには、ルシフェラーゼから発する光を効率良く捉えるため、特定波長以上の光を透過するロングパスフィルターを採用した。スペクトルは、3色のルシフェラーゼの発光強度が等しくなるように混合した時の図である。測定は、最初にフィルターの無い状態で全体の発光値 (F0) を、続いて短波長側のフィルター (O56) を透過する発光値 (F1)、最後に長波長側のフィルター (R60) を透過する発光値 (F2) を測定し、各々の値を次の連立式に導入することで各ルシフェラーゼの活性を算出する。ここでは各ルシフェラーゼに対するフィルターの透過率 ( $\kappa$ ) は装置固有の固定値であるので、F0、F1、F2を測定するだけでそれぞれの活性 (G: 緑、O: 橙、R: 赤) が算出できる。

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \\ F2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 \\ \kappa G_{O56} & \kappa O_{O56} & \kappa R_{O56} \\ \kappa G_{R60} & \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} G \\ O \\ R \end{pmatrix}$$

この方法で実際に各ルシフェラーゼの活性が評価できるかを、ルシフェラーゼを単独に発現させた各々の細胞破碎液の混合比を変えて測定した。この

際、緑ルシフェラーゼ量は固定し、赤と橙ルシフェラーゼ量を変えた混合液における発光活性を、前述のロングパスフィルターが装備されているルミノメーター (ATTO社製) により測定した。その結果、図3-3に示すようにルシフェラーゼ量に応じた発光活性を算出できることが確認され、3つのルシフェラーゼ活性を1チューブ内で同時に測定可能であることが明らかとなった<sup>25)</sup>。

続いて実際にプロモーターを用いたレポーターアッセイでの検証を行った。核内オーファン受容体 RevErb/ROR  $\alpha$  4が、概日時計遺伝子 *Bmal1* の転写開始点近傍のROR応答配列 (RORE) を介して、その転写を活性化することは良く知られている<sup>1,14,16)</sup>。この転写活性化の機構を詳細に解析するため、ROR  $\alpha$  4によるROREとコアプロモーターの活性化を直接比較した (図4-4)。SV40プロモーター上流に挿入したROREは赤ルシフェラーゼで、*Bmal1* コアプロモーターは橙ルシフェラーゼでモニターし、それぞれの活性は内部コントロールレポーターの緑ルシフェラーゼより補正した。その結果、ROR  $\alpha$  4はRORE、*Bmal1* プロモーターの両方の転写を濃度依存的に活性化したが、ROR  $\alpha$  による*Bmal1* プロモーターの活性化はROREのそれよりも有意に高いことが明らかとなった。この結果、*Bmal1* コアプロモーター内には転写開始点近傍のRORE以外にもROR  $\alpha$  に直接あるいは間接的に応答するシス配列が存在する可能性が示唆された。

このように、マルチカラーアッセイ系は、2つないし3つの転写の変動を直接比較できることから、これまで個別に測定・比較していた実験結果をより高い精度で、また簡便に得られるといえる。また、測定対象の組み合わせも任意であるので、例えばシグナル伝達系の上流と下流、時計遺伝子と細胞周期遺伝子など、細胞内で起こるダイナミックな転写のイベントを同時に解析することも興味深い利用方法の一つだろう。

## 5. リアルタイム測定系

概日リズムの研究では、ルシフェラーゼを用いた時計遺伝子発現のリアルタイム測定が日常的に行われている。他のライフサイエンスの分野ではまだ普及していない測定方法である。概日リズムの研究で広範に用いられている理由は、他の分野に比べて際立って長い測定を要することである。冒頭に述べたように、ルシフェラーゼの長所として、長時間の遺伝子発現モニタリングに適している点が挙げられる。



この特性を利用し、1993年近藤らはピプリオルシフェラーゼを用い、シアノバクテリアにおける画期的なリアルタイム測定系を開発した<sup>7)</sup>。現在使われているリアルタイム測定装置は、これがベースになっているといっても過言ではないだろう。その後ショウジョウバエ<sup>2)</sup>、シロイヌナズナ<sup>6)</sup>、さらに哺乳類の細胞、組織<sup>28)</sup>でも測定がはじめられた。以前はレポーターベクターをゲノムに挿入したトランスジェニック体（あるいはそれから単離した組織・細胞）や安定細胞株が測定に用いられてきた。近年、上田らはレポーターベクターを一過的に株化繊維芽細胞に導入、リアルタイム測定することに成功し<sup>21)</sup>、遺伝子導入が可能な哺乳類細胞では、より簡便にリアルタイム測定が行えるようになった。

先駆的な実験では、ハンドメイドの装置が使われていたが、現在では浜松フォトンクス、ニューロサイエンス、ATTOなどのメーカーからリアルタイム測定用の装置が発売されている。本節では、哺乳類の株化培養細胞におけるリアルタイム測定の背景と幾つかの注意点、さらに我々のグループで最近開発したマルチカラーのリアルタイム測定方法について述べたい。

### 5-1. リアルタイム測定におけるルシフェラーゼとルシフェリン

一般にルシフェラーゼは他のレポーター酵素に比べ、細胞内での安定性は低いとされているが、いずれのレポーターにおいても転写の変動をリアルタイム

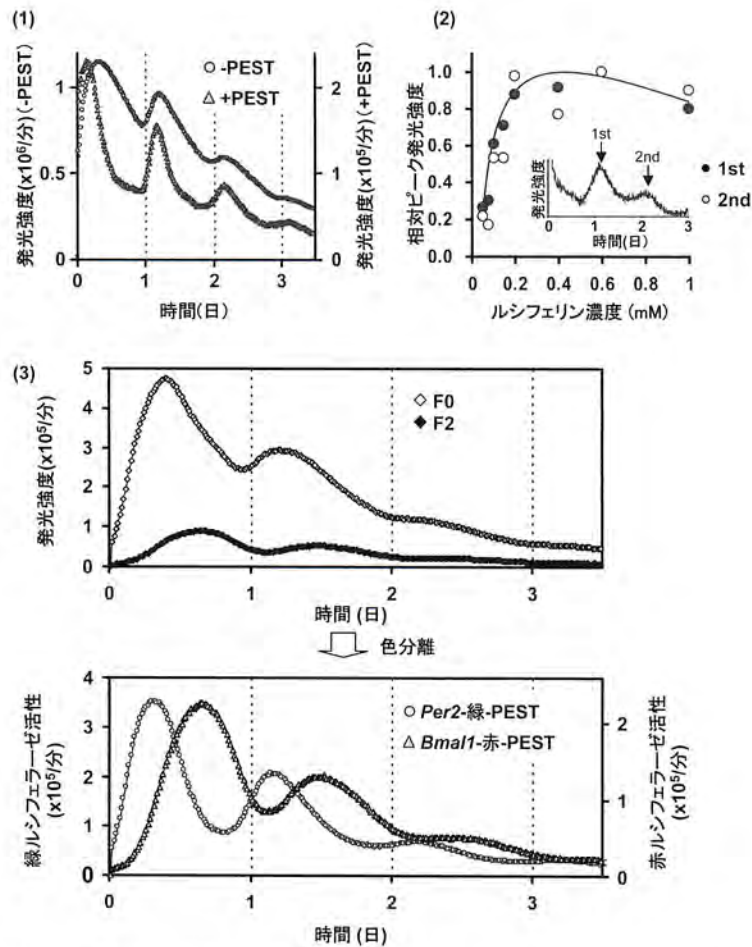


図4 株化培養細胞におけるリアルタイム測定

(1) リアルタイム測定におけるルシフェラーゼの安定性の影響。*mPer2* Ebox::TKプロモーターにPEST無し(○)またはPEST融合した(▲)ELucを連結したベクターをNIH3T3に一過的に導入し、リアルタイム測定した結果。(2) ルシフェリン濃度とピーク強度の相関性。*mPer1* Ebox-TK::Luc (+)ベクターを導入したRat1安定株を、種々のルシフェリン濃度において測定した際の1st(●)および2nd(○)ピークの発光強度を示す。インセット図はリアルタイム測定結果の一例を示す。(3) 緑および赤ルシフェラーゼを用いた*mPer2*および*mBmal1*プロモーターの同時リアルタイム測定。上図は*mPer2*-緑および*mBmal1*-赤ルシフェラーゼベクターをNIH3T3に一過的にコトランスフェクションし、光学フィルターの有(F2)無(F0)での測定結果を示す。下図はF0およびF2値から緑(○)および赤ルシフェラーゼ(▲)活性を計算した結果を示す。

ムで測定するには、細胞内でのある程度の不安定性が要求される。レポーター酵素の不安定化（短寿命化）には、以前よりオルニチンデカルボキシラーゼ（ODC）のPEST配列（タンパク質分解に関わるドメインにプロリン（P）、グルタミン酸（E）、セリン（S）、スレオニン（T）が多く存在する確率が高いことから、これらのアミノ酸を多く含むタンパク質分解ドメインの総称として呼ばれている）が用いられている<sup>8)</sup>。ルシフェラーゼを用いたリアルタイム測定においても、ルシフェラーゼのC末端にODCのPEST配列を融合させたキメラ体が使われることが多い。

図4-1は*mPer2*のE-boxに依存した発現を、クリックビートルルシフェラーゼ（ELuc）のC末端にPEST配列を融合した、あるいは融合させないもので測定した結果を示す。PEST配列と融合させることで、発光強度は20%程度に低下するものの、細胞内に残存するルシフェラーゼが少ないため、振幅の高いリズムが見られるようになる。我々の経験では、PESTを融合させたルシフェラーゼであっても、トランスフェクションするプラスミド量を上げると、周期に変化はないが、振幅の低下、見かけ上の位相後退がみられる。逆にプラスミド量を下げると振幅が増加し、見かけ上位相が前進する傾向がみられる。つまり同じルシフェラーゼを使いリアルタイム測定する場合でも、細胞内のルシフェラーゼ量により位相と振幅が変わる場合があるので、注意が必要である。

リズム研究に用いられる生物のうち、細菌を除きリアルタイム測定にはホタルルシフェラーゼが最も多く用いられている。発光基質であるホタルルシフェリンの高い細胞透過・浸透性と培養液中での安定性がその理由として挙げられる。ではどの程度のルシフェリンが適当であろうか？図4-2は*mPer1* E-boxのホタルルシフェラーゼベクターを導入したRat1安定株を、種々のルシフェリン濃度で測定した際の1stおよび2ndピークの発光強度を示す。各ピーク強度は、0.2 mMまで直線的に増加したが、それ以降プラトーに達し、1 mMでは低下した（細胞毒性によるものと考えられる）。実験系により異なるとは思いますが、細胞毒性の影響がなければ、プラトーな範囲でのルシフェリン濃度を用いた方が安定な結果が得られるだろう。我々は、培養液中でのルシフェリンの安定性について、高速液体クロマトグラフィーを用いて予備実験的に検討したところ、NIH 3T3細胞で5日間リアルタイム測定した後でも95%

のルシフェリンが残存していた（未発表データ）。このことから少なくとも数日間の測定においては、培養液中のルシフェリンの減少は実験結果に影響しないと考えてよいだろう。

## 5-2. 多色ルシフェラーゼを用いたリアルタイム測定

最近我々は、前述のマルチカラーアッセイをリアルタイム測定に応用することができたので紹介する。用いたルシフェラーゼは、前章で述べたイリオモテボタル緑ルシフェラーゼ（SLG）と鉄道虫赤ルシフェラーゼ（SLR）である。図4-3の上図は、*mPer2* プロモーターに緑ルシフェラーゼ、*mBmal1* プロモーターに赤ルシフェラーゼ（いずれもC末端にPESTを融合）を連結したレポーターベクターをNIH 3T3細胞に一過的に導入し、色分離用光学フィルターが装備されているATTO社製リアルタイム測定装置（クロノス）で測定した結果を示す。なお、PEST配列を融合した各ルシフェラーゼのNIH3T3細胞での半減期は約1時間であり、両者が同じ安定性であることは確認している。赤と緑の場合、図3-2で示したF0とF2を測定することで2色の分離・定量が可能である。図中のF0はフィルター無しで測定した全光、F2はR60フィルターを通した発光値である。なおクロノスでは、各ルシフェラーゼのフィルターに対する透過係数（予め決定しておく必要がある）を測定ソフトにセットしておけば、次式の分離色の計算をしながら各色の発光値をリアルタイムで表示してくれる。

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1.0 & 1.0 \\ \kappa G_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} G \\ R \end{pmatrix}$$

$\kappa G_{R60}$ ,  $\kappa R_{R60}$ はR60フィルターに対する緑、赤ルシフェラーゼの透過係数、G、Rは緑および赤ルシフェラーゼ活性を示す。

図4-3の下図は、上図での値から緑および赤ルシフェラーゼの活性を計算し、プロットしたものである。内因性のmRNAの変動と同様に、緑と赤ルシフェラーゼでモニターした*Per2*と*Bmal1*プロモーターのリズム変動は逆位相を示した。この結果は、単色で測定した場合の位相、振幅、周期と一致すること、さらに緑と赤のルシフェラーゼを入れ換えて同時測定しても同じ結果が得られることから、正しく色分離がされていることを確認している。なお、定量性のレンジについては、十分な発光強度がある場合、緑と赤ルシフェラーゼの活性が100倍異なっ

ていても、正確に定量できることを確認している。

マルチカラーのリアルタイム測定では、2種のプロモーターを同時に測定可能なことが最大のメリットである。ホタルルシフェラーゼを単独で使用する場合、トランジェントアッセイで用いられている内部コントロールによる補正ができないため、位相や振幅の解析はできても転写レベルの増減を定量的に評価することはできない。増減を測定する場合、我々はSV40プロモーターに繋いだ緑もしくは赤ルシフェラーゼを内部コントロールとして用いることで良好な結果を得ている。また概日発現振動におよぼすシス配列の影響を解析する場合、野生型と変異体を同時に測定する事で、1時間の位相の変化を明瞭にモニターできている。さらに、同一プロモーターで発現する緑と赤の2種の細胞を作製し、共培養により細胞(群)間での同調や相互作用の有無を検証する方法についても構築している。このように、2種のルシフェラーゼの発光を同時に測定することで、1種のルシフェラーゼでは不可能であった実験系がデザインできるようになった。

## 6. シングルセルイメージング系

前節で述べたリアルタイム測定は、組織あるいはディッシュ内の全ての発光を検出してマスのデータを解析するのに対し、シングルセルイメージングは個々の細胞から発する発光をCCDカメラでイメージングすることで、個々の細胞の遺伝子発現の変動を経時的に定量することができる。また組織においては、これまで*in situ* ハイブリダイゼーションなどにより行われてきた遺伝子発現の位置情報についてもリアルタイムに解析することができる。概日リズム研究では、時計遺伝子の発現を指標に細胞間での同調や、組織内の発現部位の定量的な解析などに用いられている。

これまでルシフェラーゼは、その発光が微弱であるため、細胞レベルでのイメージングは難しいといわれてきたが、ここ数年でシングルセルイメージングを用いたリズム解析に関する大変興味深い解析結果が報告されるようになった。2003年、山口らは*mPer1-Luc*マウスの視交叉上核切片でのシングルセルイメージングに成功し、個々の細胞が異なる位相関係を保ちながら同調して振動することを発見した<sup>27)</sup>。2004年には、Welsh<sup>25)</sup>、名越<sup>10)</sup>(この論文では蛍光イメージングを使っている)らが、血清刺激により開始される株化培養細胞のリズムが、誘導ではなく同調であることを明らかにした。Carrらはゼブラ

フィッシュの胚性繊維芽細胞の個々のリズムが光により同調することを捕らえた<sup>3)</sup>。また驚くべきことに、Mihalcescuらはシアノバクテリアでのシングルセルイメージングについて成功している<sup>9)</sup>。

さて、ルシフェラーゼを用いたセルイメージング測定での成功の鍵は、イメージング装置の感度にも依存するが、いかに明るい試料を用意できるかであろう。イメージングでは個々の細胞の発光を捕らえるために対物レンズが用いられるが、一般的に検出効率率は、レンズ倍率を上げると倍率の2乗に反比例して下がるとされている(レンズを2倍から10倍に上げると感度は1/25になる)。装置については、ここ半年間でアトーとオリンパスの2社から、光学系が工夫され、比較的発光強度の低い試料でもイメージングが可能な装置が製品化された。シングルセルレベルでの発光イメージングの歴史は浅く、発展途上の測定系であるため、測定系の改良の余地が多く残っている。装置の改良についてはメーカーの方々に期待したいが、ここではイメージングに用いるルシフェラーゼについて触れてみたい。

これまでのシングルセルイメージングの報告では、いずれもホタルルシフェラーゼがレポーターとして用いられているが、果たしてホタルルシフェラーゼはイメージングに最適であろうか?ホタルルシフェラーゼの最適pHは約8であり、この条件では黄緑色に発光しているが、酸性側では赤色にシフトし<sup>18)</sup>、発光量子収率は1/2以下に低下する<sup>17)</sup>。また最適温度は約25°Cであり、通常細胞を培養している37°Cでは活性は1/3に下がる<sup>17)</sup>。先にも述べたように、ホタルルシフェラーゼは哺乳類細胞では赤く発光している。この原因がpHであるのか温度であるのかは定かではないが、いずれにしてもホタルルシフェラーゼの細胞内での環境は最適でないことは確実であり、発光のイメージングをする条件においては、ホタルルシフェラーゼの持つポテンシャルは著しく低下していると我々は考えている。

我々は発光イメージングに特化したルシフェラーゼを構築するため、発光スペクトルがpHの影響を受けないブラジル産クリックビートルルシフェラーゼ<sup>23)</sup>のcDNAを改良し、野生型よりも200倍発現量を上げることに成功した(ELuc)。実際にNIH3T3に発現させイメージングに供したところ、同じ条件で発現させたホタルルシフェラーゼ(Luc(+))よりも10倍以上高い発光強度を示すことが明らかとなった(未発表データ)。図5-1にはその発光像の1例を示す。我々はもう一歩進んでオルガネラレベルで



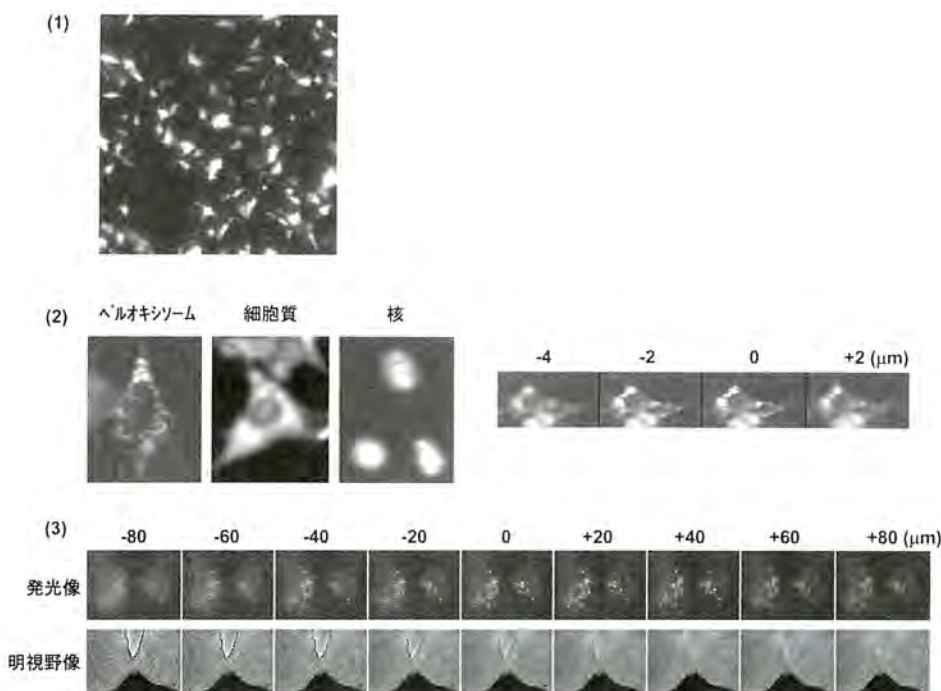


図5 1細胞レベルでの発光イメージング

(1) *mCry1::ELuc*ベクターをNIH3T3細胞に一過的に導入した際の発光イメージング (5.6倍対物レンズ、5分露光)。(2) ベルオキシソーム、細胞質および核に局在化させたELucのNIH3T3細胞における1細胞イメージング (40倍対物レンズ、3分露光)。右図はベルオキシソームに局在化させたELucの発光をZ軸方向にふって撮影した発光像を示す。(3) *mBmal1::ELuc*を導入したトランスジェニックマウスから単離した視交叉上核切片での発光イメージング (5.6倍対物レンズ、3分露光)。上段は発光像、下段は明視野像を示し、数字はZ軸方向の試料ステージの移動距離を示す。

のイメージングが可能かどうかを検討した。ホタルをはじめとする甲虫ルシフェラーゼは、いずれもC末端にベルオキシソーム移行シグナルであるSer-Lys-Leu (SKL配列)を有しており、実際、免疫染色によりホタルルシフェラーゼがベルオキシソームに局在していることが確認されている<sup>4)</sup>。ELucも同様にSKL配列を有し、免疫染色およびSKLが付加されたベルオキシソーム局在型GFPのイメージングにより、ELucがベルオキシソームに局在することを確認している。そこで、CMVプロモーターでNIH3T3細胞に発現させ、40倍の対物レンズを用いて発光イメージングに供したところ、図5-2に示すようにベルオキシソームに局在している様子が観察できた。参考までに、SKLを除き細胞質に局在化またはSV40の核移行シグナルを付加させ核に局在化させたELucのイメージング像についても図5-2に示した。プロメガから販売されているホタルルシフェラーゼLuc(+), Luc2はC末端のSKL配列が除かれているため、新たにSKLを付加してイメージングに供してみたが、我々の測定条件では全体にぼやけた発光像になってしまい、ベルオキシソームへ

の局在は観察されなかった。このように、強く光るルシフェラーゼを用いることで、時間・空間分解能が上がり、これまで見えなかったイメージング像が撮影できるようになると期待している。

最後に、綺麗な発光イメージング像を撮るためのテクニカルな点について述べたい。最も大事な点は、フォーカスをいかにあわせるかである。ATTO社製の装置は、電動の試料ステージコントローラーによりZ軸が1  $\mu\text{m}$ 単位で調製できるので、NIH3T3のベルオキシソームに局在化させたELucのイメージングをZ軸方向に2  $\mu\text{m}$ ずつふって測定した。その結果、図5-2に示すように(図中フォーカスのあった点を0とした)、40倍の対物レンズでは2  $\mu\text{m}$ ずれるとフォーカスがあわなくなり、全体にぼやけた像になることが判明した。株化細胞の厚みはおおよそ10  $\mu\text{m}$ 程度であるので、フォーカスは比較的あわせ易いが、組織の切片では最低でも100  $\mu\text{m}$ の厚みがあるため、フォーカス調整は非常に難しい。図5-3は視交叉上核の切片を5.6倍の対物レンズを用い、Z軸方向に20  $\mu\text{m}$ ずつふってイメージングした発光像(上)と明視野像(下)である。低倍率

のレンズを用いているので40~60  $\mu$ m程度の許容範囲があることが分かったが、実際には下図のような明視野像を見ながらZ軸を決定するため、どこで発光のフォーカスがあるかは、ほとんど勘に頼ることになる。良い解決策はまだないが、蛍光色素や蛍光タンパク質などを使い、蛍光でフォーカスをあわせるのも一つの手段かもしれない。

## 7. おわりに

本稿ではホタルをはじめとする甲虫系のルシフェラーゼを用いた測定方法を中心に解説したが、この他に分泌型ルシフェラーゼによる遺伝子発現モニターも行われているので、興味のある方は参照して頂きたい<sup>13, 20, 26)</sup>。ルシフェラーゼを発光プローブとする細胞機能解析については、発光と蛍光を組合わせたBioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) によるタンパク質-タンパク質相互作用解析<sup>15, 29)</sup>、ルシフェラーゼを半分に切断し、再構成に伴う発光を測定することで細胞内タンパク質の相互作用や局在解析<sup>5)</sup> など新たな技術が次々と開発されており、リズム研究にこれらを活用することで新たなメカニズムの解明に役立つのではないだろうか。

ルシフェラーゼアッセイ系をご存知の方には退屈な点もあったかもしれないが、これからルシフェラーゼを使い始める方々の一助になれば幸いである。

## 謝辞

共同研究者であるサンパウロ州立大学のVadim Viviani博士、北海道大学の本間研一先生、本間さと先生に感謝する。また、発光測定に関しては東京大学の秋山英文博士、ATTOの久保田英博氏、浅川篤氏、榎本敏照氏、ルシフェラーゼの改良については東洋紡績の西井重明氏、浅井友美氏の協力のもとすすめた。この場を借りて感謝する。最後に執筆の機会を与えて頂いた岡山大学の富岡憲治先生に感謝する。

## 引用文献

- 1) Akashi M, Takumi T: Nat Struct Mol Biol 12:441-448(2005)
- 2) Brandes C, Plautz JD, Stanewsky R, Jamison CF, Straume M, Wood KV, Kay SA, Hall JC: Neuron 16:687-689(1996)
- 3) Carr AJF, Whitmore D : Nature Cell Biol 7: 319-321(2005)
- 4) Gould SJ, Keller GA, Hosken N, Wilkinson J,

- Subramani S: J Cell Biol 108:1657-1664(1989)
- 5) Kim SB, Ozawa T, Watanabe S, Umezawa Y: Proc Natl Acad Sci USA 101:11542-11547(2004)
- 6) Kolar C, Fejes E, Adam E, Schafer E, Kay SA, Nagy F: Plant J 13:563-569(1998)
- 7) Kondo T, Strayer CA, Kulkarni RD, Taylor W, Ishiura M, Goldedn SS, Johnson CH: Proc Natl Acad Sci USA 90:5672-5676(1993)
- 8) Leclerc GM, Boockfor FR, Faught WJ, Frawley LS: BioTechniques 29:590-601(2000)
- 9) Mihalcescu I, Hsing, W, Leibler S: Nature 430:81-85(2004)
- 10) Nagoshi E, Saini C, Bauer C, Laroche T, Naef F, Schibler U: Cell 119:693-705(2004)
- 11) Nakajima Y, Ikeda M, Kimura T, Honma S, Ohmiya Y, Honma K : FEBS Lett 565:122-126(2004)
- 12) Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, Ohmiya Y: BioTechniques 38:891-894(2005)
- 13) Nishide SY, Honma S, Nakajima Y, Ikeda M, Baba K, Ohmiya Y, Honma K: Genes Cells 11:1173-1182(2006)
- 14) Ohmiya Y, Sumiya M, Viviani VR, Ohba N: Yokosuka City Mus 47:31-38(2000)
- 15) Pflieger KD, Eidne KA: Nat Methods 3:165-174(2006)
- 16) Sato TK, Panda S, Miraglia LJ, Reyes TM, Rudic RD, McNamara P, Naik KA, FitzGerald GA, Kay SA, Hogenesch JB: Neuron 43:527-537(2004)
- 17) Seliger HH, McElroy WD: Arch Biochem Biophys 88:136-141(1960)
- 18) Seliger HH, McElroy WD: Proc Natl Acad Sci USA 52:75-81(1964)
- 19) Shimomura O: Bioluminescence, Chemical Principle and Methods 1-454: World Scientific(2006)
- 20) Tanahashi Y, Ohmiya Y, Honma S, Katsuno Y, Ohta H, Nakamura H, Honma K: Anal Biochem 289:260-266(2001)
- 21) Ueda H, Chen W, Adachi A, Wakamatsu H, Hayashi S, Takasugi T, Nagano M, Nakahama K, Suzuki Y, Sugano S, Iino M, Shigeyoshi Y, Hashimoto S: Nature 418:534-539(2002)
- 22) Viviani VR, Bechara EJ, Ohmiya Y:



- Biochemistry 38:8271-8279 (1999)
- 23) Viviani VR, Silva AC, Perez GL, Santelli RV, Bechara EJ, Reinach FC: Photochem Photobiol 70:254-260 (1999)
- 24) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, Ohmiya Y: Biochem Biophys Res Commun 280:1286-1291 (2001)
- 25) Welsh DK, Yoo SH, Liu AC, Takahashi JS, Kay SA: Curr Biol 14:2289-2295 (2004)
- 26) Yamagishi K, Enomoto T, Ohmiya Y: Anal Biochem 354:15-21 (2006)
- 27) Yamaguchi S, Isejima H, Matsuo T, Okura R, Yagita K, Kobayashi M, Okamura H : Science 302:1408-1412 (2003)
- 28) Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block GD, Sakaki Y, Menaker M, Tei H: Science 288:682-685 (2000)
- 29) Xu Y, Piston DW, Johnson CH: Proc Natl Acad Sci USA 96:151-156 (1999)