

『新蛍光寿命型バイオセンサーによる時空間定量イメージング』

Spatiotemporal quantitative imaging using fluorescence lifetime-based biosensors

金沢大学ナノ生命科学研究所 准教授 新井 敏

はじめに

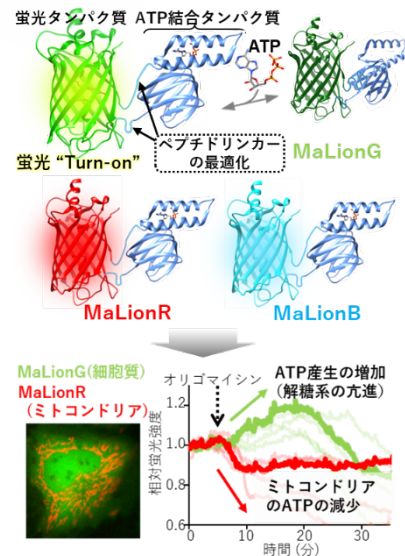
細胞内外の代謝産物やシグナル分子の時空間動態を、細胞小器官レベルの解像度で見たい、というリクエストは、生命科学の謎解きを主眼におくアカデミアの研究者から留まらない。医療機器開発や創薬のステージの何処かで、しばしば直面する課題でもある。近年、生命科学の研究施設には欠かせない光学顕微鏡、特に蛍光顕微鏡の普及によって、この望みは随分と叶えられてきた。この背景に、顕微鏡の開発と併行して、世界中で進められてきた蛍光センサー（分子スパイとも呼ばれる）の開発がある。センサーの作動原理は、概ね共通していて、標的とする生体分子の濃度に変化が生じた際、それに応答して蛍光の明るさ（輝度）が変化する輝度変化型が主である。例えば、図1に示したのが、筆者らが開発した赤・緑・青（RGB）の輝度変化型ATPセンサーである¹⁾。使える色のバリエーションが増えたことにより、同じ細胞内の異なる場所（ミトコンドリアと細胞質）のATPの定性的な変化を同時に観察したり、他のシグナル分子（cAMPなど）の動態と一緒に可視化したりすることが可能になった。

真に生命科学の要望に応えることができる蛍光センサーを創出できれば、センサー開発者の冥利に尽きるし、当該領域の研究手法全体に資するものでもある。現に、細胞内のカルシウムイオンの濃度変化を捉える蛍光センサーが現れて以降、電気信号の読取りが主であった神経科学研究の手法を一変させた²⁾。

輝度変化型バイオセンサーの問題点

輝度変化型蛍光センサーの開発は成熟期に達しており、Addgeneなどのサイトから、安価に誰もが購入できるようになった（Addgene→Biosensorsのタブをご覧ください、おびただしい数のセンサーが登録されていることが分かる）。しかしながら、幾分、主観的ではあるけれども、一度でも蛍光センサーを使ったことがある方ならば、賛同頂けると思われる課題がある。それは「定量性」の問題である。ある生体分子を検出する蛍光センサーを細胞に導入したとして、蛍光顕微鏡で写真を1枚撮っても、或いは、タイムラプス実験で経時変化を記録しても、輝度値から直接、即座に標的分子の絶対濃度を知ることはできない。横軸に標的分子の濃度、縦軸に蛍光強度をプロットした検量線を作成しても、そもそも、細胞ごとのベースの蛍光輝度の初期値も異なるため、これが標的分子の濃度を反映しているのか、

輝度変化型RGBカラー蛍光ATPセンサー



細胞内の異なる場所のATP動態を同時に観察

図1 輝度変化型蛍光ATPセンサー

(文献1から改変して転載)

センサー分子の数が異なるのか、まず判別できない。仮に、異なる2種類の波長の蛍光を計測し、その比率を計算して、励起光の強弱、蛍光センサーの分子数（濃度）、Z軸方向の焦点ズレなどから生じる強度のバラつきを解消するアプローチ（レシオ測定）をとっても、異なる顕微鏡・場所・人によって行われた実験で得られた蛍光の輝度値について、研究者間でデータを比較して議論することは絶望的に困難である（同じラボ内でも、既に難しい）。

定量性も担保できる蛍光寿命型（FLIM）バイオセンサーへの転換

それに対して、私達は、細胞内の生体分子の濃度を蛍光寿命の値に変換できる、蛍光センサーの原理を提案し、これに基づいてセンサーを開発してきた。蛍光寿命は、励起光の強さ、蛍光フィルターの種類、細胞

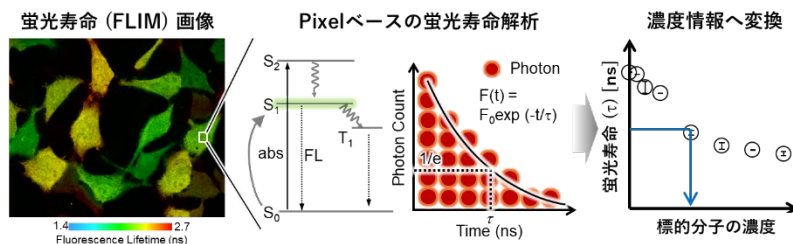


図2 蛍光寿命型蛍光センサーの解析方法

内に導入した蛍光センサーの数など、輝度変化型の測定で問題になる複数の要因に影響を受けない頑強な物理量である。つまり、蛍光寿命値と細胞内の標的分子の濃度情報と1対1で紐付けられる（図2：例えば、 $X [\text{ns}] = Y [\mu\text{M}]$ ）。ところが、この明確な利点にも関わらず、蛍光寿命を用いた定量イメージングはあまり普及していない。蛍光寿命を測定する顕微鏡（FLIM）が高価であることも一因ではあるが、それ以前に、標的の分子の濃度情報を蛍光寿命に変換できる、感度の高い蛍光センサー（以降、FLIM型蛍光センサー）の設計原理が未成熟で、使えるセンサーがほとんどない³⁾。近年、私達は、比較的、普遍性の高いFLIM型蛍光センサー作りのプラットフォームを作ることに成功しつつある。また、蛍光タンパク質型の蛍光センサーだけではなく、有機色素を用いたケミカルセンサーも開発の対象として、研究を進めてきた。本講演では、その幾つかを紹介したい。

細胞内のエネルギーのフローを可視化する

細胞は、系の外から得たエネルギーを直接使うことはできないため、一旦、アデノシン3リン酸（ATP）に変換して、時・場所に依じて、生物学的な仕事に消費していく。一方、あまり注目されることはないが、総エネルギーの多くを熱として散逸させ、これが細胞空間の温度を保障している。細胞世界のミクロな空間の背後には、この熱とATPのエネルギーのフロー（収支）が常にある。この適切なバランスが崩れると、疾患に繋がるのは想像に易いかも。私達は、エネルギーフローの中で重要な因子である細胞内のATPと温度（熱）を計測するためのFLIM型蛍光センサーの開発に取り組んできた。

まず、細胞内のATP濃度を定量できるFLIM-ATPセンサーの開発に着手した。ATPに特異的に結合するタンパク質を、適切なペプチドリンカーを介して蛍光タンパク質に挿入した。これは、ATPの結合前後で蛍光強度が大きく変化する前述の輝度変化型の蛍光ATPセンサーの開発と同様の分子デザインである。この開発過程で、2つのタンパク質を繋ぐペプチドのリンカーを様々に変えた複数の変異体を作製、その中で、蛍光寿命も併せて変化する稀な変異体を偶発的に見出した。ここから生まれたFLIM-ATPセンサーを用いて、異なる細胞

種のATP濃度の比較（酸化的リン酸化と解糖系の依存度などの議論）、また、多細胞系のスフェロイダル状のがん細胞やショウジョウバエの脳のATPマッピングに成功している⁴⁾。更に、この蛍光センサーの作動原理の背後にある光励起状態の速度論の解析を実施中で、今後、汎用性の高いFLIM型蛍光センサーを生み出していくプラットフォームを構築したい（幾つかのシグナル分子については、既にプロトタイプの実験に成功しているため、本講演でも紹介する）⁴⁾。

もう1つの因子の熱については、蛍光タンパク質を用いたセンサーではなく、低分子の有機色素（BODIPY）を用いて、FLIM型温度センサーの開発を進めている。

生理的な温度範囲で、温度上昇に伴い、蛍光寿命が短くなるタイプのセンサーで、様々な小器官にターゲットできるのが特徴である（小胞、ミトコンドリア、核、形質膜、ゴルジ体、油滴、リソソームなどの標的化に成功している）⁵⁾。細胞内で発生する熱は、すぐに散逸してしまうため、熱源に限りなく近いところで計測することが肝要である。生理学の教科書に記載されている熱産生細胞には、褐色脂肪や骨格筋と言った細胞種があり、それぞれ、熱産生の源は、ミトコンドリアや小胞であると言われている。そこで、ミトコンドリアに標的できる蛍光温度センサー（MTG）を用いて、褐色脂肪細胞が熱産生を惹起する際のミトコンドリアの温度を測定した。興味深いことに、ミトコンドリアで発生した熱は、他の小器官には、ほとんど伝わっておらず、あたかも、ナノサイズの熱源として細胞内で振舞っていることが明らかになってきた。また、FLIM型センサーの優れた点として、蛍光寿命値を直接、温度の値と紐づけることが可能であるため、定常状態の温度の議論が可能である。最近の測定結果から、培地の温度を37℃に保っていても、ある種の細胞の小器官の温度は若干、高い温度に保たれていることがあることを示唆するデータが得られている。これらの最新の結果と共に、本講演では細胞内の温度測定の結果を紹介したい。

おわりに

蛍光センサーの開発が始まって、長らく経つが、開発のための開発に留まっているものも多く、自戒を込めて、生物学上の疑問に答え得るセンサーを幅広く提供していきたい。特に、細胞内の生体分子の「絶対定量」と「時空間情報」を提供するFLIM型センサーは、本領域の新しい標準方法となり、蛍光寿命顕微鏡の普及の一助にもなるものと期待している。

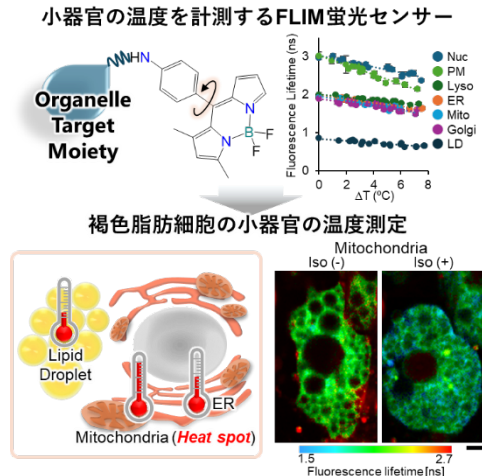


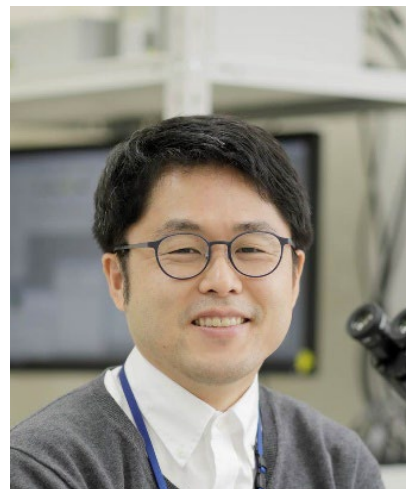
図3 FLIM蛍光温度センサーによる熱産生の可視化（文献5から改変して転載）

参考文献

- 1) Arai, S.; Kriszt, R.; Harada, K.; Looi, L. S.; Matsuda, S.; Wongso, D.; Suo, S.; Ishiura, S.; Tseng, Y. H.; Raghunath, M.; Ito, T.; Tsuboi, T.; Kitaguchi, T. RGB-Color Intensiometric Indicators to Visualize Spatiotemporal Dynamics of ATP in Single Cells. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2018**, *57* (34), 10873–10878.
- 2) Dana, H.; Sun, Y.; Mohar, B.; Hulse, B. K.; Kerlin, A. M.; Hasseman, J. P.; Tsegaye, G.; Tsang, A.; Wong, A.; Patel, R.; Macklin, J. J.; Chen, Y.; Konnerth, A.; Jayaraman, V.; Looger, L. L.; Schreiter, E. R.; Svoboda, K.; Kim, D. S. High-Performance Calcium Sensors for Imaging Activity in Neuronal Populations and Microcompartments. *Nat. Methods* **2019**, *16* (7), 649–657.
- 3) Vu, C. Q.; Arai, S. Quantitative Imaging of Genetically Encoded Fluorescence Lifetime Biosensors. *Biosensors* **2023**, *13*, 939.
- 4) Arai, S.; Itoh, H.; Vu, C. Q.; Nakayama, M.; Oshima, M.; Morita, A.; Okamoto, K.; Okuda, S.; Teranishi, A.; Osawa, M.; Tamura, Y.; Nonoyama, S.; Takuma, M.; Fujie, T.; Sarker, S. R.; Sudhakaran, T.; Kiya, T.; Lane, E. B.; Kitaguchi, T. qMaLioffG: A Single Green Fluorescent Protein FLIM Indicator Enabling Quantitative Imaging of Endogenous ATP. *bioRxiv* **2023**.
- 5) Liu, X.; Yamazaki, T.; Kwon, H. Y.; Arai, S.; Chang, Y. T. A Palette of Site-Specific Organelle Fluorescent Thermometers. *Mater. Today Bio* **2022**, *16*, 100405.

Profile

2007年 早稲田大学大学院 理工学研究科博士課程 応用化学専攻修了
(高分子化学研究室 武岡真司教授)
2007年～2009年 早稲田大学先進理工学部生命医科学科 助手
2009年～2010年 早稲田大学総合研究機構 次席研究員
2011年～2012年 シンガポール国立大学化学科 博士研究員
(Young-Tae Chang研究室)
2012年～2016年 早稲田バイオサイエンスシンガポール研究所 研究員
(Cell Signaling)
2016年～2019年 早稲田大学 理工学術院 研究院講師 (在シンガポール)
2019年7月～ 金沢大学WPIナノ生命科学研究所 独立准教授
(テニユアトラック)
2015年～2019年 AMED-PRIME研究者
2021年～ JST創発研究者



受賞歴

2014年 MMS賞 (田中貴金属)
2014年 The Award for Encouragement of Research in IUMRS-ICA2014, IUMRS
2013年 海外ポスドクTravel Award、日本分子生物学会
2007年 水野賞 (早稲田大学)