

ルシフェラーゼ 蛍光タンパク質融合遺伝子を用いた、メダカ胚における長期的な *in vivo* 転写活性モニタリング法の開発

2007年3月修了 学生証番号：47-56547 動物生殖システム分野 三上 幸

指導教官：三谷啓志教授、尾田正二講師

キーワード：ルシフェラーゼ、Venus、胚発生、hsp70

【 序論 】

生物の胚発生時の遺伝子発現は、時間的、空間的にダイナミックに制御されている。遺伝子発現を可視化する技術には、免疫染色、*in situ* ハイブリダイゼーションなどがあるが、生体を固定したり、切片化する必要があり、発生の進行に伴う一連の遺伝子発現を、同一個体において継続的にリアルタイムモニタリングすることは不可能である。そのため、個体レベルで、非侵襲的かつ長期的に遺伝子発現を解析できる手法として、バイオイメージング技術が注目されている。バイオイメージングに用いられるタンパク質には、GFPなどの蛍光タンパク質と、ルシフェラーゼなどの発光タンパク質があり、それぞれに利点、欠点がある。本研究では、メダカの発生時における遺伝子発現が「いつ」「どこで」起こるかを解析

する手法として、ウミシイタケルシフェラーゼと蛍光タンパク質の融合遺伝子をレポーターとして用い、ルシフェラーゼの「生きた個体で長期的にプロモーター活性のモニタリングが可能」という利点と、蛍光タンパク質の「組織レベルの高解像度で、部特異的なプロモーター転写活性イメージングが可能」という利点を両方生かしたプロモーター活性解析系を確立することを目的とした。熱ショックにより活性が誘導され、胚発生時に水晶体特異的に活性が上昇するとされる hsp70 プロモーターを対象とし、クローニングした。ルシフェラーゼと蛍光タンパク質の融合遺伝子の開発、生体胚においてルシフェラーゼ活性を測定する実験系の確立、メダカ熱ショックタンパク質 hsp70.1 プロモーターの探索を行い、これらの実験系を融合させ、長期にわたる hsp70.1 プロモーター活性モニタリング法を開発した。

【 結果と考察 】

レポータータンパク質 hRlucVenus の作製

プロモーター活性解析のレポータータンパク質として、脊椎動物用にコドンが改変されたウミシイタケルシフェラーゼ hRluc と、蛍光強度の高い変異型 GFP の Venus を、極性で側鎖の小さいアミノ酸リンカーで連結した hRlucVenus 遺伝子を作製した。オリジナルのウミシイタケルシフェラーゼ Rluc と GFP2 の融合タンパク質 RlucGFP2 と比較して、hRlucVenus はルシフェラーゼ活性、蛍光タンパク質蛍光強度共に大幅に上昇した。

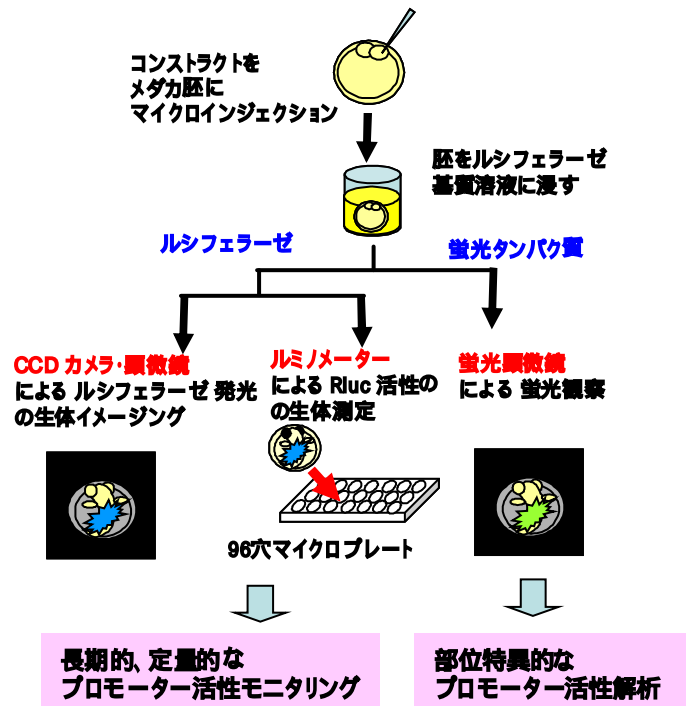


図1、研究の構想図

生体胚における hRluc 活性測定法の開発

hRluc を一過性に発現している胚を hRluc の基質 EnduRen 溶液に一定時間浸して基質を負荷した後、96 穴白色マイクロプレートの各ウェルに蒸留水と生体胚 1 個を入れ、ルミノメーターを用いて各胚における hRluc 発光値を測定した。定量性は高くないが、生体胚における hRluc 活性を簡便に、一度に大量に測定することができた。また、hRluc 発光の画像を取得することに成功した。

メダカ hsp70.1 の同定

バイオインフォマティクス的手法により、ゼブラフィッシュ hsp70.4 と相同なメダカ遺伝子 hsp70.1 を同定した。hsp70.1 プロモーター下流に hRlucVenus 遺伝子を組み込んだコンストラクト pG-phsp70.1-hRlucVenus を胚にマイクロインジェクションした後、胚に熱ショックを加えたところ、胚体全体に Venus 蛍光の発現の上昇が観察された。また、熱ショックの有無に関わらず、約 60% の胚において水晶体特異的な hRlucVenus の発現が見受けられた。hRlucVenus の Venus 蛍光を指標として、部位特異的なプロモーター活性を検出することができることが示唆された。

hRlucVenus を用いた、長期にわたる hsp70.1 プロモーター活性モニタリング

pG-phsp70.1-hRlucVenus をマイクロインジェクションした胚に熱ショックを加える前、および熱ショックの後 5 日間にわたり、hRluc 活性、Venus 蛍光強度を指標としてプロモーター活性をモニタリングした。ルミノメーターを用いた hRluc 活性測定では、熱ショック直後に hRlucVenus 発現量がわずかに上昇したことを、Venus 蛍光強度測定よりも高感度に検出することができた。また、胚を EnduRen 溶液に浸し続けても、胚発生に影響はなかった。本研究により、hRluc 活性を指標として、長期にわたり非侵襲的にプロモーター活性が ON になる時期をモニタリングできることが示唆された。しかし、水晶体特異的なプロモーター活性の上昇を hRluc 発光により検出できず、EnduRen が生体の極めて深部の細胞には浸透しにくいという可能性が考えられる。hRluc 活性測定系をさらに改善することにより、

hRlucVenus はより汎用性の高い有用なツールとなると期待される。

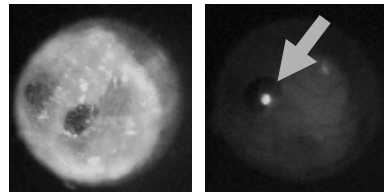


図4、pGL4.70-phsp70.1-hRlucVenusをマイクロインジェクションし、熱ショックを加えた胚(左)、加えていない胚(右)のVenus蛍光画像。矢印は、水晶体特異的なVenus蛍光。

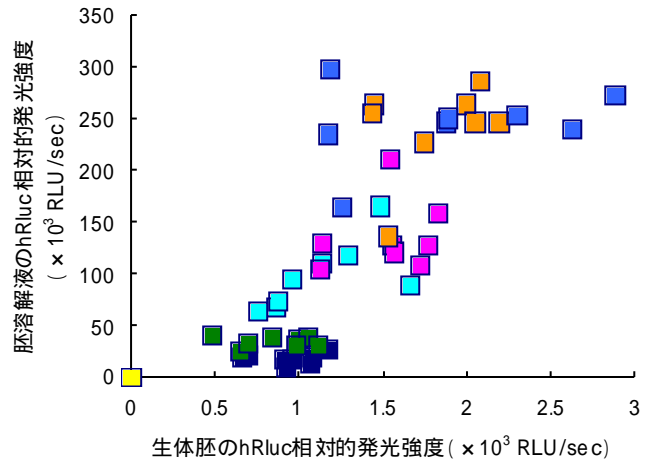


図2、生体胚のhRluc相対的発光強度と、胚溶解液のhRluc相対的発光強度の関係

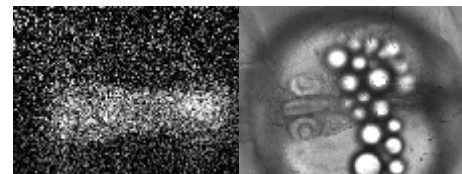


図3、hRlucの発光画像(左)と明視野画像(右)

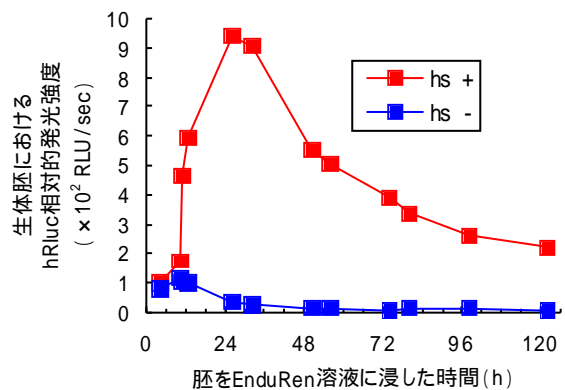


図5、hRluc発光強度を指標とした長期にわたる hsp70.1 プロモーター活性モニタリング