

【本件リリース先】

文部科学記者会、科学記者会、
広島大学関係報道機関



広島大学

NEWS RELEASE

広島大学広報室
〒739-8511 東広島市鏡山 1-3-2
TEL : 082-424-6762 FAX : 082-424-6040
E-mail : koho@office.hiroshima-u.ac.jp

令和5年12月19日



改良型生物発光システム「Akaluc/AkaLumine」を用いた ショウジョウバエでの高感度、経時的、非侵襲的な 遺伝子発現解析手法の確立

論文掲載

【本研究成果のポイント】

- 従来の手法よりも高感度に生体内からの生物発光を検出可能な「Akaluc/AkaLumine」を、幅広い分野の研究で使用されるモデル生物であるキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) に導入。
- Akaluc/AkaLumine を用いることで、ショウジョウバエに有害な影響なしに、高いシグナル/ノイズ比で発光を検出できる手法を確立した。
- ショウジョウバエを殺さずに、その個体内における時間に応じて変化する遺伝子発現を解析することが可能になった。

【概要】

Akaluc/AkaLumine 生物発光システムをショウジョウバエに導入することで、従来の手法よりも高感度に生体内の遺伝子発現を経時的に解析することが可能になりました。これまでのショウジョウバエの研究では、一般的にホタルルシフェラーゼ(Fluc)とその基質である D-luciferin が用いられていました。しかし、Fluc/D-luciferin には生体内での解析に用いる上でいくつかの欠点が報告されていました。これらの欠点を克服する目的で開発された Akaluc/AkaLumine をショウジョウバエに導入し、Akaluc/AkaLumine を用いた解析が可能か調査を行いました。その結果、Akaluc/AkaLumine を用いることでショウジョウバエに有害な影響無く、Fluc/D-luciferin よりも高感度に経時的な遺伝子発現解析が可能であることが分かりました。

本研究は、広島大学大学院統合生命科学研究科の博士課程後期の伊藤聖さん、千原崇裕教授らの研究グループによる成果で、2023年12月15日、「Communications Biology」にオンライン掲載されました。

論文タイトル：

Akaluc/AkaLumine bioluminescence system enables highly sensitive, non-invasive and temporal monitoring of gene expression in *Drosophila*

著者：伊藤聖¹，松田凧紗¹，浮田有美子¹，奥村美紗子^{1,2}，千原崇裕^{1,2,*}

1：広島大学大学院統合生命科学研究科 生命医科学プログラム

2：広島大学大学院統合生命科学研究科 基礎生物学プログラム

*：責任著者

掲載雑誌：Communications Biology

<https://doi.org/10.1038/s42003-023-05628-x>

【背景】

ホタルは酵素であるルシフェラーゼを用いて基質のルシフェリンを酸化させることで、光を生み出します。この生物発光は基質が十分に存在するとき、酵素の量に依存して発光量が増えるといった特徴があります。この生物発光の特徴を利用して、目的遺伝子の発現に同調してルシフェラーゼを発現するような遺伝子組み換え生物を作製し、発光量の変化から目的遺伝子の発現変化の調査が行われてきました。これらの研究解析には一般的にホタルルシフェラーゼ (Fluc) と D-luciferin の反応や、ウミシイタケルシフェラーゼと Coelenterazine の反応によって生じる発光が用いられてきました。しかし、これらのルシフェラーゼとルシフェリンの反応によって生じる発光は、生物の体に存在する色素によって吸収され、発光量が減少するといった欠点や、ルシフェリンが生体内に均一に分布しないといった課題が知られています。これらの問題点を解決するため、2018年に改良型酵素と基質である Akaluc と AkaLumine を用いた手法が開発され、マウスやマーモセット生体内からの発光検出が飛躍的に向上しました^{*1}。

今回は、マウスと同じくモデル生物であり、遺伝学をはじめとして様々な生物学の研究にも用いられる、キョウジョウバエにおける Akaluc/AkaLumine を用いた解析が可能か調査を行いました。ショウジョウバエの研究においても一般的に Fluc/D-luciferin が用いられていますが、この Akaluc/AkaLumine を導入することで、ショウジョウバエでの生物発光を用いた解析をより改善できることが推測されました。今回、Akaluc/AkaLumine をショウジョウバエでも導入するために、様々な条件検討を行いました。

【研究成果の内容】

ショウジョウバエの生物発光を用いた研究では、一般的に Fluc/D-luciferin が用いられてきました。そのため、Fluc/D-luciferin よりも生体内からの発光検出に優れている Akaluc/AkaLumine をショウジョウバエに導入することで、より高感度に解析が可能になると考えられました。そこでショウジョウバエで広く用いられる GAL4/UAS システム^{*2}により Akaluc を発現する系統を作製し、ショウジョウバエでも従来の Fluc/D-luciferin よりも高感度な発光検出が可能か調査を行いました。本研究では Akaluc 発現ハエに簡易的およびダメージを与えることなく AkaLumine を投与するために、ハエの餌に AkaLumine を混ぜる経口投与による方法を用いて発光測定を行いました(図 1)。まず、経口投与で与える AkaLumine の適切な濃度やその毒性などについて検討を行なった結果、適切な濃度の AkaLumine を投与することで、ハエに有害な影響なしに高感度に Akaluc/AkaLumine による赤色の生物発光を検出することが可能になりました。次に、Fluc/D-luciferin を用いたときと、Akaluc/AkaLumine を用いたときの発光量の比較を行いました。その結果、ショウジョウバエでも神経系のような深部組織や少数の細胞からの発光検出において、Akaluc/AkaLumine を用いることで最大で 5 倍程度の発光の検出が可能になることが分かりました(図 2)。さらに、Akaluc/AkaLumine を用いることで、数十個レベルの細胞数の差を発光量の差として検出することができました。次に、この Akaluc/AkaLumine を用いた遺伝子発現解析が可能か調査を行うために、自然免疫^{*3} 関連遺伝子の発現に伴って Akaluc を発現する系統および、小胞体ストレス下^{*4} で Akaluc タンパク質が安定化されるショウジョウバエ系統をそれぞれ作製しました。これらの系統を用いることで、細菌感染時の免疫活性化やヒートショックによる小胞体ストレス応答の誘導を、経時的かつ同一個体のハエを用いて検出することが可能になりました(図 3)。以上の結果から、ショウジョウバエにおいて Akaluc/AkaLumine を用いることで、従来の Fluc/D-luciferin よりも高感度かつ経時的に遺伝子発現解析を行えることが明らかになりました。

【今後の展開】

ショウジョウバエはモデル生物として優れた生物であり、今日に至るまで様々な研究に用いられています。また、概日リズム^{*5}や自然免疫の研究などノーベル賞を獲得した研究にもショウジョウバエは大きく寄与しています。本研究によってショウジョウバエで Akaluc/AkaLumine システムを用いることで、神経系のような深部組織や少数の細胞からでも高感度、経時的、そして簡便に自由行動下のハエの遺伝子発現をモニターすることが可能になりました。また、ショウジョウバエは哺乳類と比較してはるかにライフサイクルが短いため、人類に有用な薬を探索する「ドラッグスクリーニング」において有力視されているモデル動物です。このドラッグスクリーニングにも生物発光を用いた経時的な遺伝子発現解析が行われています。Akaluc/AkaLumine システムをショウジョウバエでのドラッグスクリーニング活用することで、既存の方法では見つけることができなかった人類に有用な化合物の発見が可能になることが期待されます。

【参考資料】

<引用文献>

*1 Iwano, S. *et al.* Single-cell bioluminescence imaging of deep tissue in freely moving animals. *Science* (1979) **359**, 935–939 (2018).

<用語解説>

*2 GAL4/UAS システム

ショウジョウバエ研究で広く用いられる手法。GAL4 が発現する組織・細胞でのみ UAS 以下の配列が発現する。これによって、特定の組織や細胞種のように目的の遺伝子を発現させることが可能。

*3 自然免疫

生物に生まれつき備わっている免疫機能。受容体等を介して体内に侵入した病原体を認識し、素早く免疫応答を引き起こす。すべての多細胞生物に備わった機能であり、ヒトとハエも類似した免疫機構となっている。

*4 小胞体ストレス

様々な環境要因による細胞内での異常なタンパク質の蓄積によって生じるストレス。このストレスが感知されるといくつかのシグナル経路が誘導され、細胞内の異常タンパク質を減少させる応答が生じる。

*5 概日リズム

約 1 日周期で変動する体内のリズムであり、睡眠やホルモン分泌など様々な生理現象に関わる。概日リズムの制御は複数の遺伝子によるフィードバック制御によって行われており、これらの遺伝子機能解析にショウジョウバエの研究が寄与している。

24ウェルプレートの各ウェルにAkaluc発現ハエと
基質AkaLumineを混ぜた餌を加える

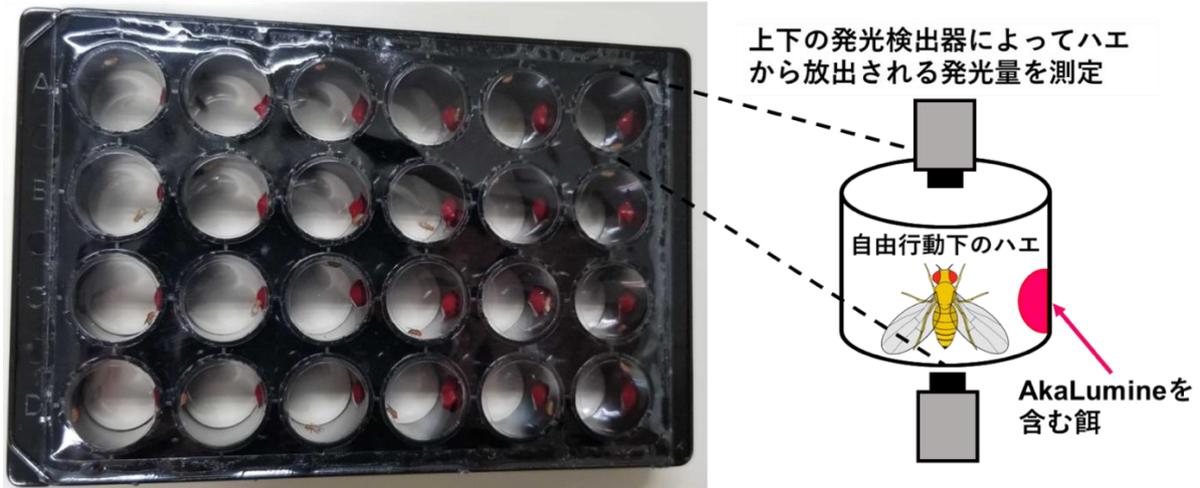


図 1: AkaLumine 経口投与による発光測定方法

プレートの各ウェルに Akaluc 発現ハエと AkaLumine を含む餌を加えて、発光測定器でハエから放出される発光量を測定する。この方法では、ウェル内で自由に行動する同一個体のハエを用いた解析が可能である。また、ウェル内に AkaLumine を含む餌を加えているため、経時的な発光測定を長時間にわたって行うことも可能である。

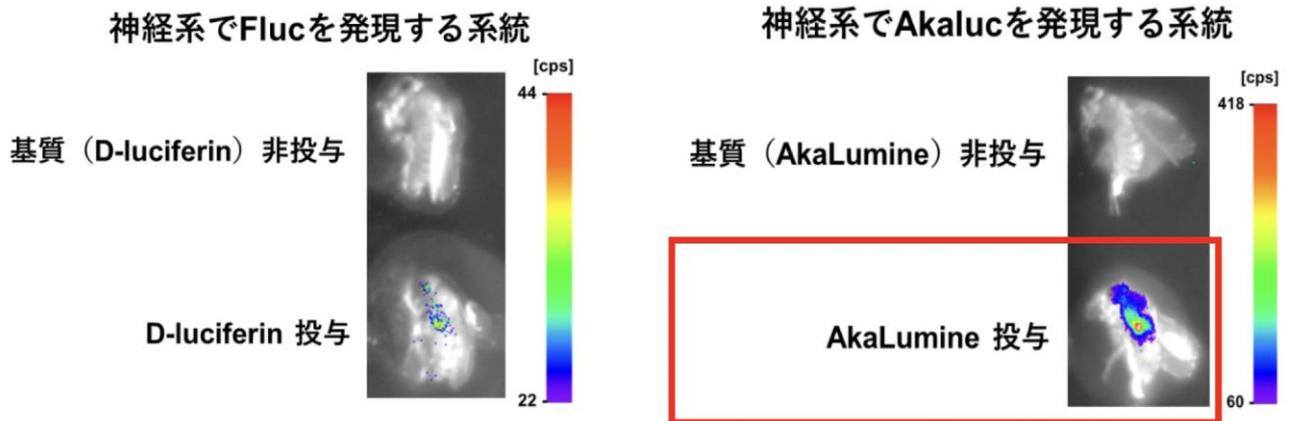


図 2: Akaluc/AkaLumine と Fluc/D-luciferin の発光量比較

神経系で Fluc を発現する系統に D-luciferin を投与した結果（左図）と、神経系で Akaluc を発現する系統に AkaLumine を投与した結果（右図）。Fluc/D-luciferin を用いたときにはほとんど神経からの発光が検出できていないのに対して、Akaluc/AkaLumine を用いたときには主要な神経系の組織である脳や胸部神経節が存在する頭部や胸部からの発光を検出することが可能であった（赤枠内）。

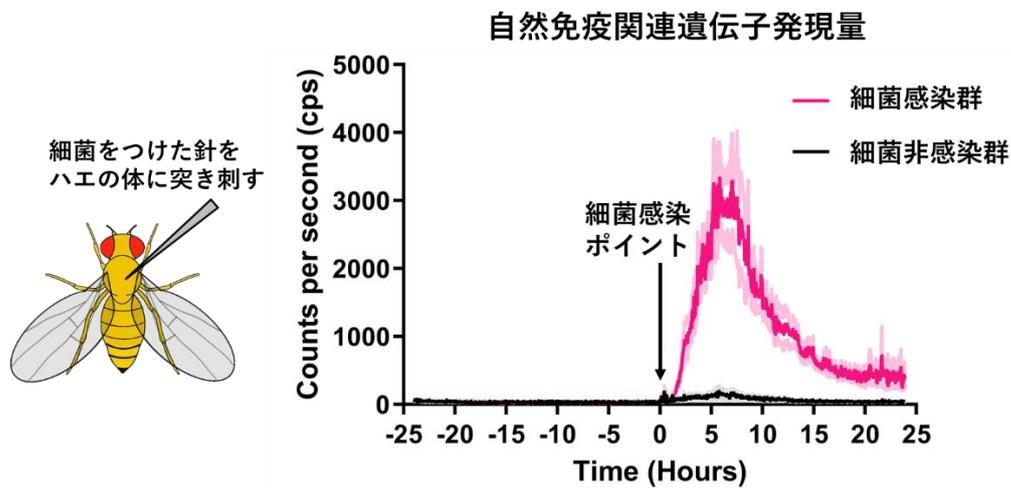


図 3: Akaluc/AkaLumine を用いた細菌感染による自然免疫関連遺伝子発現変化の経時的測定

自然免疫関連遺伝子依存的に Akaluc を発現するハエに、細菌をつけた針を突き刺して細菌を感染させ、Akaluc/AkaLumine による発光レベル変化を経時的に測定した。細菌を感染させたグループでは顕著に発光量の増加が観察され、経時的な遺伝子発現解析に Akaluc/AkaLumine が有用であることが確認された。

【お問い合わせ先】

大学院統合生命科学研究科 生命医科学プログラム 千原 崇裕
 Tel : 082-424-7443
 E-mail : tchihara@hiroshima-u.ac.jp
 発信枚数 : A 4 版 5 枚 (本票含む)

