

磁気共鳴イメージング法を使った生体内遺伝子発現プロファイルのための新手法の開発

● 朽尾 豪人

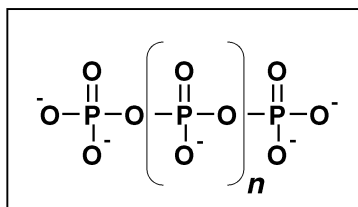
横浜市立大学大学院総合理学研究科

＜研究の目的と進め方＞

本研究では、磁気共鳴イメージング (MRI) を用いた生体内遺伝子発現のモニター法の開発を行う。MRIは、医療用MRIでよく知られるように、可視光の届かない生体内でも非破壊的に三次元画像が取得できる。この特徴を生かして、蛍光イメージングが困難な高等哺乳動物の体内深奥の組織など、光不透過な状況でも遺伝子発現のモニターが可能なる方法を目指す。本研究の目的を達成するための鍵となるのは、観察対象の遺伝子発現に伴って増減し、MRIで検出可能な「レポーター」物質の性質である。本研究では、①ポリリン酸 (PolyP) ②常磁性金属含有タンパク質をMRIのレポーターとして検討する。

①PolyPレポーター

PolyPは数十～数百の無機リン酸が直鎖状にリン酸エステル結合を介して連なったポリマーである (右図)。³¹P NMR



スペクトルにおいて、PolyP分子の³¹P核は、きわめてユニークな化学シフト値を示し (後述)、他のリン化合物と容易に区別できる。従って、PolyPの細胞内での蓄積量と観察対象の遺伝子の発現量をリンクすることができれば、PolyPの有無により、その遺伝子の発現量を知ることができる。なお、PolyPは、ほぼ全ての細胞に含まれることが知られており、無機リン酸の貯蔵に役割があると言われている。

②金属含有タンパク質レポーター

常磁性金属は水の¹H NMRシグナル、特に緩和時間に大きな影響を及ぼす。常磁性金属を含有するタンパク質の発現量を観察対象の遺伝子発現とリンクさせれば、細胞内の水のNMRシグナルの変化によって、その遺伝子の発現を検出できると期待できる。

まずは酵母細胞においてレポーターシステムが我々の予測通りに働くかどうかを検討する。レポーターシステムの検出感度、時間分解能などの情報を収集し、より高等な生物への適用を目指す。一連の研究は、横浜市立大学の古久保哲朗教授との共同研究で行なう。

＜研究開始時の研究計画＞

1) レポーター遺伝子の探索

酵母細胞は液胞内に多量 (10-100 mM) のPolyPを蓄積することが知られ、in vivo ³¹P NMRスペクトルによって容易にこれを検出することができる。酵母ではPHMと呼ばれる遺伝子群 (PHM1-5) がPolyP蓄積にかかわるという報告があるので、まずは、PHMを「レポーター遺伝子」の候補と考え、そのPolyP蓄積への影響を詳細に検証する。PHM以外の候補遺伝子を見つけるために、PolyP蓄積に

関わりそうな遺伝子をデータベースから探し出し、それら遺伝子の欠損株を作製して細胞内PolyPの蓄積量を調べる。細胞内PolyPの定量にはin vivo ³¹P NMRスペクトルを用いる。遺伝子欠損株と野生型を比較して、PolyPの量が大きく変化していれば、レポーター遺伝子の有力な候補となる。

その他、Polyphosphate kinase (PPK)をレポーター遺伝子として検討する。PPKは大腸菌のPolyP合成酵素であり、PHM群と違い、単独でPolyPを合成できる。PPK遺伝子を酵母に導入してPolyP蓄積量が增大するかどうかを調べる。

金属タンパク質レポーターとしては、フェリチン、フェレドキシン、シトクロームなどの金属含有タンパク質が候補である。これらの遺伝子をADH (Alcohol dehydrogenase) プロモーターなどの支配下に組み込んで、酵母細胞で構成的に発現させる。この細胞内の水の¹H NMRスペクトルを測定し、常磁性効果が十分に大きければレポーター遺伝子の候補とする。

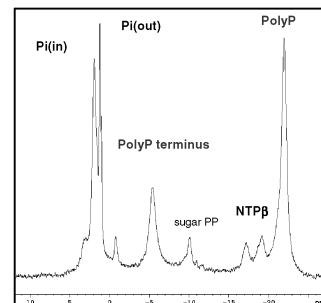
2) レポーター遺伝子の評価

有力なレポーター遺伝子の候補が見つければ、これをGalなど誘導性のプロモーター下流につなぎ、酵母細胞に遺伝子導入する。発現誘導の有無によってPolyPの量が変動することを確認する。また、発現誘導がPolyP量へ反映される時間差、レポーター遺伝子の転写量とPolyPの蓄積量の相関も調べる。金属タンパク質レポーターの場合は、¹H NMR/MRIで同様に評価を行なう。

3) MRI画像化の検討

PolyPの³¹P核はユニークな化学シフトを持つため、他のリン化合物とは容易に区別できる (下図)。このPolyPのNMRシグナルのみを選択的に用いて、MRI画像を取得する測定法を確立する。これを実現するために、周波数選択的³¹Pパルスを用いたパルス系列をデザインする。確立した測定法を用いて、酵母細胞中のPolyP量が検出できるか、また、検出限界はどの程度かを調べる。

金属タンパク質レポーターの場合は水の¹Hを観測するので、通常の¹H MRIで画像化を行なう。



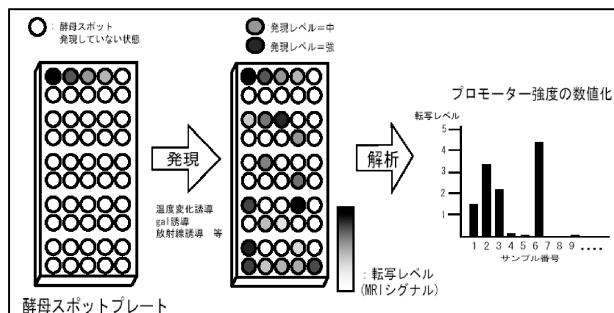
4) 高等な生物への適用

酵母を用いてレポーターシステムを十分に評価した後、より高等なモデル生物での検討を開始する。第一段階として、ヒト胎児腎臓細胞 (HEK293) やサル腎臓細胞 (COS7) などの培養細胞系で我々の考案したレポータ

ーシステムが働くかどうかを調べる。これが、可能であれば、トランスジェニックマウスを作製してマウス個体でのMRIによる遺伝子発現の検出を開始する。

5) 酵母コロニーを使った網羅的遺伝子発現解析への応用

酵母は変異体の作製が比較的容易であり、一つ一つの変異株のコロニーをマイクロアレイとして培養することが可能である。そこで、様々な変異酵母を集めて「酵母スポットプレート」を作製すれば(下図)、本研究課題で開発する遺伝子発現レポーターシステムと合わせて、網羅的な遺伝子発現解析などが可能となる。これを実現するため、酵母スポットプレートでのPolyP観測を試みる。



＜研究期間の成果＞

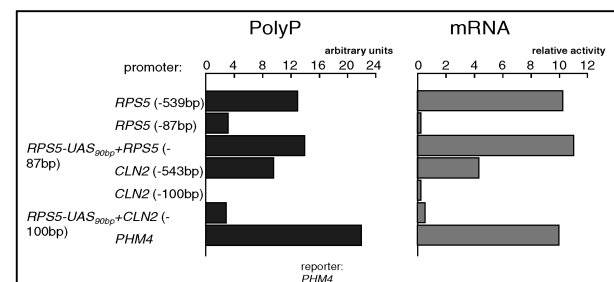
1) レポーター遺伝子の探索

ポリリン酸合成に関与するPHM遺伝子群の一つであるPHM4遺伝子を欠損させた酵母変異体では、ポリリン酸の³¹P NMRシグナルが完全に消失するが、PHM4遺伝子を持つプラスミドを変異体に導入し発現させるとポリリン酸シグナルが回復することを確認した。PHM群以外のPolyPレポーター遺伝子の候補として酵母の液胞形成に関与するVMA2遺伝子を見いだした。

2) レポーター遺伝子の評価

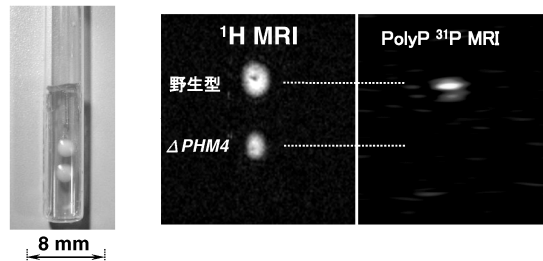
PHM4遺伝子をガラクトースによって転写が誘導されるGal1プロモーター下流に繋げば、発現誘導によってポリリン酸蓄積のスイッチングが可能であることを確認した。

PHM、VMA2の遺伝子について、転写の活性とPolyPの蓄積量の間に高い相関があることを確認した。下図はPHM4遺伝子のプロモーター領域を強度の異なる種々のプロモーターに置換した際の、酵母細胞内のPHM4遺伝子の発現量(mRNA)とPolyP量(³¹P NMRにより定量)を現わしている。PolyPの量と転写活性の間に高い相関が見られた。



3) MRI画像化の検討

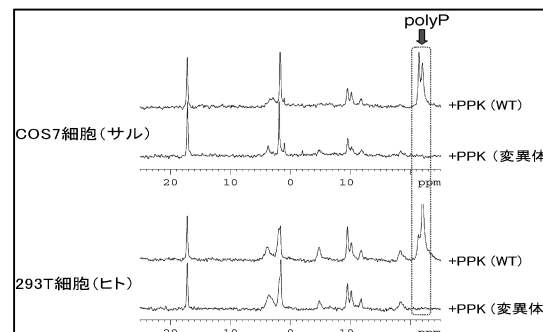
¹H MRIの一手法であるCHESS (Chemical Shift Selective Imaging) 法を応用し、PolyP選択的³¹P MRIを撮像する方法を確立した。下図は、寒天培地上に生育させた、野生型及びPHM4破壊株(Δ PHM4)のコロニーの写真(左)、¹H MRI像(中)、PolyP選択的³¹P MRI像(右)である。PolyPを持たない Δ PHM4のコロニーはPolyP選択画像では像が得られず、野生型と明確に区別できる。



4) 高等な生物への適用

PHM1-5の遺伝子は、遺伝子群としてPolyPの合成・蓄積に関与している。また、ヒトやマウスはPHMを持っていない。このため、例えばPHM4遺伝子単独を動物細胞に導入しただけではPolyPが合成されないと考えられる。従って、培養細胞の系では、単独でPolyP合成の活性を持つタンパク質のほうがよい。そこで、大腸菌由来Polyphosphate kinase (PPK)をレポーター遺伝子の候補として検討した。

PPK遺伝子を293T、及びCOS7培養細胞に導入・強制発現させたところ、細胞内にPolyPが大量に蓄積し、これをin vivo ³¹P NMRによって検出できることを見いだした。不活性な変異体PPKでは、PolyPのシグナルは蓄積されなかった(下図)。



これらのことから、PolyPモニターシステムが高等真核生物でも働くことが期待できると考え、マウスでの試みを開始した。PPKを特定の組織で発現する遺伝子改変マウス系列を作製し、実際にマウスの体内でPolyPが蓄積されるかどうかの検証を行なった。

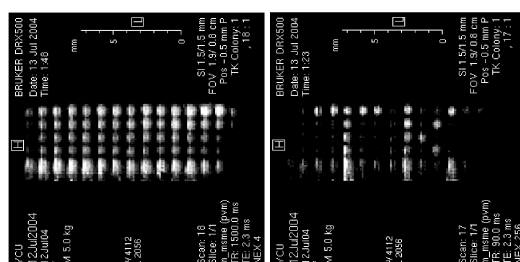
具体的には、マウスの小脳特異的に発現するL7プロモーター支配下に大腸菌由来PPKの遺伝子を導入したマウスを作製した。³¹P MRIの検出器はマウスの測定に適当なものが市販されていないので、表面コイル型のものを自作した。

5) 酵母コロニーを使った網羅的遺伝子発現解析への応用

網羅的な解析のためには、十分なスループットを確保するために1 mm程度の酵母コロニーからなるマイクロアレイが現実的である(我々の保有するMRI装置の検出部の形状に依存する)。しかし、このサイズでは含まれるPolyPの絶対量が少なく、³¹P NMRでの検出が困難であ

った。

本研究の過程で、酵母のPolyP含量が酵母内の水1HのNMRシグナル、特にその縦緩和時間 (T1) に影響を与えることを発見した。1H核は31P核よりもMRIによる検出感度が高い。そこで、1H MRIを用いたPolyP量の間接測定を行なうことにした。寒天培地プレート上に、PolyPをもつ野生株酵母を文字 (TK) 型に、持たない変異株酵母 (Δ PHM4)をその他の位置に植菌して培養し、そのプレートの1H MRIを撮像した (下図)。一つ一つのコロニーは、直径1 mm程度である。通常の1H-MRI画像 (左) では、両者の酵母コロニーの判別はできないが、T1強調画像 (右) を撮像すると両者には明確なMRIシグナルの強度差が見られ、高いコントラストで画像を得ることができた。このシステムを用いれば、一度の測定で60検体以上についてPolyPの有無を判別することができる。レポーター遺伝子と組み合わせれば、網羅的な遺伝子発現の解析が可能となる。



〈国内外での成果の位置づけ〉

近年、国内外で「分子イメージング」と呼ばれる研究領域が盛んになっている。これは、MRI、PET (Positron emission tomography)、SPECT (Single photon emission tomography)、X線トモグラフィーなどのイメージング法を用いて、生きた状態のまま生体内部の遺伝子やタンパク質分子の挙動を観察し、生体機能の解明を行なう分野である。MRIによる「遺伝子発現の生体内検出」も分子イメージングの一分野として、米国の複数のグループによって研究が進められ、これまでに、いくつかのアイデアが試されている。我々のPolyPレポーターは、これら従来法とは全く異なる視点に基づくレポーターシステムである。特に、従来法では、造影剤を外部投与する必要があるのに比べて、我々のPolyPレポーターシステムは、その必要がないため、より自然に近い条件での測定が期待できる。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

金属タンパク質レポーター

金属タンパク質レポーターの候補としてフェリチン、フェレドキシン遺伝子を酵母細胞で構成的に発現させ、in vivo NMRで水1HのNMRシグナルに対する磁気緩和効果を調べたが、野生型酵母に比べて、有意な差が見られなかった。理由としては、これらタンパク質の発現量が少なく、水の1H NMRシグナルに対する常磁性効果が不十分であったことが考えられる。

マウスでのPolyPレポーター

大腸菌PPKを小脳プルキンエ細胞特異的に発現させるべく構築したトランスジェニック・マウスを用い、一次元の31P NMRスペクトルを測定したが、PolyPのシグナルを検出することができなかった。PolyPの蓄積量が、我々のMRI装置の検出限界に比べて十分ではなかったと考えている。

〈今後の課題〉

マウスでのPolyPレポーター

PolyPの量が我々のMRI装置の検出感度を下回っていると思われる。より強力なプロモーターを使い、MRI装置の検出限界を上回る量のマウス体内PolyPを確保する。

遺伝子発現の網羅的解析

酵母スポットプレートを使った網羅的発現解析の前段階として、酵母の遺伝子欠損ライブラリーに含まれる約5000種の酵母変異株のPolyP含量を網羅的に解析する。これによってPolyPを使った網羅的解析が、個別解析に比べ、どの程度有効かを検証する。また、酵母のPolyP蓄積に関する遺伝子の情報を取得し、PolyPレポーター遺伝子の改良に役立てるという目的もある。

MRI装置の高感度化

マウスの31P MRI用のNMRシグナル検出コイルのデザインなどを工夫して、高感度化を目指す。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文/プロシーディング (査読付き)

1. 0305121608

Tochio H., Morita M., Sugihara B., Ki S., Okada A., Kasahara K., Kokubo T., Shirakawa M., In Vivo 31P MRI Monitoring of Gene Expression in Yeast Cells, Special meeting issue of Molecular Imaging(2003).

2. 0602081542

Auesukaree, C., Homma, T., Tochio, H., Shirakawa, M., Kaneko, Y., Harashima, S., Intracellular Phosphate Serves as a Signal for the Regulation of the PHO Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, Journal of Biological Chemistry, 279(17), 17289-17294 (2004)