

# 学位請求論文

Akaluc/AkaLumine 生物発光を用いた  
ショウジョウバエでの高感度、非侵襲的および  
経時的な遺伝子発現解析

Akaluc/AkaLumine bioluminescence for  
highly sensitive, non-invasive, and temporal  
gene expression analysis in *Drosophila*

統合生命科学研究科

生命医科学プログラム

伊藤 聖

## 主論文

Akaluc/AkaLumine 生物発光を用いたショウジョウバエでの高感度、非侵襲的  
および経時的な遺伝子発現解析

## 公表論文

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

# 目次

|   |    |
|---|----|
| I. 序論   | 5  |
| 1. 生物発光を用いた遺伝子発現解析  | 5  |
| 2. 従来の生物発光レポーターシステムの問題点   | 5  |
| 3. Akaluc/AkaLumine による生物発光 <i>in vivo</i> 解析の改善                                    | 6  |
| 4. ショウジョウバエでの生物発光を用いた研究の現状  | 6  |
| 5. 本研究の目的   | 7  |
| II. 材料と方法   | 8  |
| 1. 使用したショウジョウバエ系統および飼育条件  | 8  |
| 2. 遺伝子コンストラクトの調製とショウジョウバエ系統の作製  | 9  |
| 3. AkaLumine および D-luciferin の保管方法  | 12 |
| 4. 発光測定   | 12 |
| 5. Real-time PCR を用いた遺伝子発現解析  | 13 |
| 6. AkaLumine 投与がショウジョウバエの発生に与える影響の調査  | 14 |
| 7. 生物発光イメージング   | 15 |
| 8. 細菌を感染させたハエを用いた発光測定   | 15 |
| 9. ハエの睡眠阻害  | 16 |
| 10. ウェスタンブロッティング  | 16 |
| 11. ヒートショック   | 17 |
| 12. 統計解析  | 17 |
| III. 結果   | 18 |
| 1. Akaluc 発現ショウジョウバエに AkaLumine を経口投与することで、高い S/N 比で発光シグナルの <i>in vivo</i> 解析が可能である | 18 |
| 2. AkaLumine の経口投与はショウジョウバエに毒性を示さない   | 19 |
| 3. Akaluc/AkaLumine は Luc/D-luciferin よりも少数のニューロンから強い生物発光シグナルを発する                   | 20 |
| 4. Akaluc/AkaLumine はショウジョウバエの脳における生物発光イメージングを改善する                                  | 21 |
| 5. Akaluc/AkaLumine を用いることで高感度に経時的な遺伝子発現解析を行うことが可能である                               | 22 |
| 6. 内在性タンパク質への Akaluc の融合はタンパク質の機能に影響を与える可能性がある                                      | 23 |
| 7. Akaluc/AkaLumine を用いて ER ストレスレベルの経時的な測定が可能である                                    | 24 |
| IV. 考察  | 26 |
| 1. Akaluc 系統に投与する最適 AkaLumine 濃度  | 26 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 2.    | ショウジョウバエへの AkaLumine 投与方法.....   | 27 |
| 3.    | <i>Akaluc-PEST</i> を用いた経時的な遺伝子発現解析.....  | 27 |
| 4.    | <i>Xbp1-Akaluc</i> を用いた小胞体ストレスモニタリング .....   | 28 |
| 5.    | 他の Akaluc/AkaLumine を用いた研究と本研究の比較 .....  | 28 |
| 6.    | AkaLumine-HCl 投与の問題点.....  | 29 |
| 7.    | Akaluc の内在タンパク質への融合による影響 .....   | 30 |
| 8.    | NanoLuc と Akaluc.....  | 30 |
| V.    | 総括 .....   | 32 |
| VI.   | 図表.....  | 33 |
|       | Fig. 1: ショウジョウバエ体色素による光子の吸収と散乱 .....   | 33 |
|       | Fig. 2: ショウジョウバエへの AkaLumine 経口投与による Akaluc/AkaLumine 生物発光<br>の検出 .....                | 35 |
|       | Fig. 3: AkaLumine 投与によるショウジョウバエのストレス応答と発生に対する影響 ...                                    | 37 |
|       | Fig. 4: 深部組織および細胞における Akaluc/AkaLumine および Luc/D-luciferin によっ<br>て生成される生物発光シグナル ..... | 38 |
|       | Fig. 5: ショウジョウバエでの Akaluc/AkaLumine を用いた生物発光イメージング .....                               | 40 |
|       | Fig. 6: Akaluc/AkaLumine を用いた自然免疫関連遺伝子 <i>IBIN</i> の経時的な遺伝子発現解析<br>.....               | 42 |
|       | Fig. 7: <i>brp<sup>Akaluc-KI</sup></i> 系統を用いた内在 Brp タンパク質レベルのモニタリング .....              | 43 |
|       | Fig. 8: <i>Xbp1-Akaluc</i> を用いたヒートショックによる小胞体ストレス変化の経時的なモニ<br>タリング .....                | 45 |
| VII.  | 謝辞.....  | 47 |
| VIII. | 引用文献.....  | 48 |

## I. 序論

### 1. 生物発光を用いた遺伝子発現解析

日本の夏の風物詩であるホタルは尾部を光らせることで同種とのコミュニケーションを行うことが知られている。この発光は酵素である Luciferase と基質である Luciferin の反応によって生じており、このような発光は「生物発光」と呼ばれる。今日において生物発光は幅広い生物学的調査に利用されており、例えば特定の遺伝子プロモーター依存的に Luciferase を発現させることで、遺伝子の発現量を解析することなどにも生物発光は用いられている<sup>1</sup>。遺伝子発現解析では他にも定量的 Real-time PCR (qPCR) なども用いられるが、この手法では細胞や動物などの生体試料から核酸を抽出する過程が必要であり、経時的な解析には複数のサンプルを準備する必要がある。一方、生物発光を利用した方法は、Luciferase と Luciferin の反応によって生じる発光を元に解析を行うため、非侵襲的にサンプルの遺伝子発現を解析することが可能であり、同一サンプル中の経時的な遺伝子発現変化を比較的容易に解析することができる<sup>2</sup>。このような利点から、生物発光を利用した遺伝子発現解析は、概日リズム遺伝子の経時的発現変化のモニタリングや<sup>3</sup>、特定の遺伝子の発現に影響を与える薬剤のスクリーニングなどに利用されている<sup>4</sup>。

### 2. 従来の生物発光レポーターシステムの問題点

一般的に、生物発光を利用した方法では、Firefly luciferase (Luc) や D-luciferin などの昆虫由来の Luciferase や Luciferin、あるいは Renilla luciferase (Rluc) や Coelenterazine などの海洋生物由来の Luciferase や Luciferin が用いられる<sup>5</sup>。しかし、これらの Luciferase や Luciferin は、*in vivo*での解析においていくつかの欠点を示すことが知られている。第一に、上記の Luciferase と Luciferin の反応によって生じる光の波長が、動物組織の透過性が低い波長であるという問題点である。Luc/D-luciferin の

最大発光波長は約 578 nm であり、Rluc/Coelenterazine の最大発光波長は約 482 nm であるが<sup>5</sup>、これらの波長はヘモグロビンやメラニンなどの色素に容易に吸収される<sup>6</sup>。その結果、体内深部組織から検出できるシグナルの減衰が生じる。第二に、基質である D-luciferin の組織透過性が低いために、生体内で基質が不均一に分布してしまうといった問題点である。特に脳への D-luciferin 透過性は著しく低いことが報告されており<sup>7</sup>、この点も *in vivo* での解析において欠点となる。これらの欠点から、従来の生物発光システムでは生体内深部組織からの発光検出が困難であるといった問題が指摘されていた。

### 3. Akaluc/AkaLumine による生物発光 *in vivo* 解析の改善

上記の Luciferase や Luciferin の問題を解決するために、Akaluc と AkaLumine を用いる手法が開発された<sup>8</sup>。AkaLumine は、D-luciferin をもとにして合成された人工基質であり<sup>9</sup>、水溶性を向上させた AkaLumine-HCl も開発されている<sup>10</sup>。この AkaLumine-HCl と Luc の反応によって生じる最大発光波長は近赤外領域の 677 nm であり、動物組織の透過性が高い高波長側へと発光ピークがシフトしている<sup>10</sup>。Akaluc は Luc に変異導入を繰り返し、AkaLumine との反応でより明るい発光を生じるように指向性を持たせて開発された人工酵素である<sup>8</sup>。Akaluc と AkaLumine-HCl を用いることで、マウスやマーモセットの深部組織、特に脳からの発光シグナルの検出が飛躍的に向上することが報告された<sup>8</sup>。

### 4. ショウジョウバエでの生物発光を用いた研究の現状

ショウジョウバエの研究では、Firefly luciferase や D-luciferin が頻繁に用いられている。ショウジョウバエの頭部の厚さは約 1 mm 程度であり、哺乳類の脳と比較するとショウジョウバエの神経系の厚みは小さいが、ショウジョウバエにおいても眼や体表の色素によって光子が吸収、散乱することで検出できる発光や蛍光が減衰することが知られ

ている<sup>11</sup> (Fig. 1)。したがって、Luc/D-luciferin よりも組織透過性に優れたシグナルを放出する Akaluc/AkaLumine をショウジョウバエに導入することで、ショウジョウバエでの生物発光を用いた解析をより向上、発展させることができると考えられた。

## 5. 本研究の目的

本研究は、Akaluc/AkaLumine による生物発光システムをキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) に導入し、高感度、非侵襲的そして経時的な遺伝子発現解析を確立することを目的として行った。まず、ショウジョウバエ研究で広く用いられている手法である GAL4/UAS システムによって Akaluc を発現するトランスジェニック系統、および任意の遺伝子プロモーター依存的に Akaluc を発現する系統を作製した。これらの系統を用いて、ショウジョウバエにおいても Akaluc/AkaLumine がショウジョウバエ研究で一般的に用いられる Luc/D-luciferin よりも優れているかどうか、また、このシステムを用いてショウジョウバエの非侵襲的および経時的な遺伝子発現解析が可能かどうか検討を行った。初めに、Akaluc の基質である AkaLumine のショウジョウバエへの経口投与条件と毒性の検討を行った。次に、Akaluc/AkaLumine と Luc/D-luciferin の発光量を比較し、神経系で検出されるシグナル量は Akaluc/AkaLumine の方が Luc/D-luciferin よりも有意に高いことを確認した。さらに、Akaluc/AkaLumine システムが *in vivo* での目的の遺伝子の経時的な変動をモニタリングするのに有用であることを証明した。本研究では、高感度生物発光システムである Akaluc/AkaLumine をショウジョウバエに適用した初めての研究であり、ショウジョウバエにおいて Akaluc/AkaLumine を用いることで、従来の Luc/D-luciferin システムよりも高い感度で遺伝子の経時的な発現解析を行うことが可能になることを示している。

## II. 材料と方法

### 1. 使用したショウジョウバエ系統および飼育条件

本研究で使用したキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) 系統を以下に記す。

- ・野生型
  - *white*<sup>1118</sup>
  
- ・ GAL4/UAS 系統
  - *tubP-Gal4*
  - *elav-Gal4*
  - *OK107-Gal4*
  - *Or42b-Gal4*
  - *Or85a-Gal4*
  - *mex1-Gal4*
  - *UAS-Luc*

上記の系統は、Bloomington Stock Center (Indiana University, USA) から提供していただいた系統を使用した。

- ・ Akaluc 系統
  - *UAS-Venus-Akaluc*
  - *IBIN*<sup>Akaluc-KI</sup>
  - *IBINp-Venus-Akaluc*
  - *IBINp-Venus-Akaluc-PEST*
  - *brp*<sup>Akaluc-KI</sup>
  - *UAS-Xbp1-Venus-Akaluc*

上記の系統は本研究で作製した。



Figure 1 では *strip-myc* 系統<sup>12</sup>を使用した。

実験に使用したショウジョウバエは下記に記す組成の Fly food を与え、25°C、湿度 60%、12 時間明期/12 時間暗期条件のインキュベーター内で飼育した。特に明記が無い限り、実験と測定には、成虫の雌（3-5 日齢）を用いた。

| Fly food 組成 (10 L あたり)                  |        |
|---|--------|
| Water                                   | 10 L   |
| Glucose                                 | 1000 g |
| Agar                                    | 70 g   |
| Dry yeast                               | 400 g  |
| Corn flour                              | 500 g  |
| Rice bran                               | 300 g  |
| Propionic acid                          | 40 ml  |
| 10% Butyl p-hydroxybenzoate in 70% EtOH | 40 ml  |

## 2. 遺伝子コンストラクトの調製とショウジョウバエ系統の作製

### • *UAS-Venus-Akaluc*

*UAS-Venus-Akaluc* 遺伝子コンストラクトの調製では、まず *Venus-Akaluc* 塩基配列を *pcDNA3 Venus-Akaluc* ベクター (RIKEN DNA BANK, RDB\_15781) を鋳型として PCR で増幅し、Ligation high Ver.2 (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いて *EcoRI* と *XhoI* で制限酵素処理を行った *pUAST-attB* ベクターに挿入した。

### • *IBIN<sup>Akaluc-KI</sup>*

*IBIN<sup>Akaluc-KI</sup>* 系統の作製では、まず flyCRISPR を用いてセンスおよびアンチセン

スオリゴを設計し、アニーリングしたオリゴセットを *Bbs*I で制限酵素処理した U6b プラスミドに Ligation high Ver.2 を用いて挿入することで gRNA 発現ベクターを作製した。使用したオリゴセットを以下に記す。

gRNA ターゲット-1

センス：CTTCGGTATCCTCCAGTCCTCG

アンチセンス：AAACCGAGGACTGGGGAGGATAACC

gRNA ターゲット-2

センス：CTTCGATCACGAAACTCAACCCAC

アンチセンス：AAACGTGGTTGAGTTTCGTGATC

次に *IBIN<sup>Akaluc-KI</sup>* 作製用のドナープラスミドを 2-step で構築した。まず、5' UTR を含む *IBIN* の 1 kbp 上流配列をショウジョウバエ genome DNA から PCR で増幅 (5' homology arm (HA))、*Venus-Akaluc-SV40 late terminator* 配列を *UAS-Venus-Akaluc* ベクターから PCR で増幅した。これら 2 つの断片を NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) を用いて *Not*I で制限酵素処理した *pHD-DsRed-attP* プラスミドに挿入した (5' *HA-Venus-Akaluc-DsRed*)。次に、*IBIN* の 3' UTR の下流 1 kbp をショウジョウバエ genome DNA から PCR で増幅し、この断片を NEBuilder を用いて *Spe*I で制限酵素処理した 5'*HA-Venus-Akaluc-DsRed* に挿入した。

#### ・ *IBINp-Venus-Akaluc*

*IBINp-Venus-Akaluc* コンストラクトの調製では、*IBIN* と 5' 上流の遺伝子 (*CG30109*) の間の 319 bp 領域を *IBIN* のプロモーターとしてハエの genome DNA から増幅した。*Hind*III と *Eco*RI を用いて *UAS-Venus-Akaluc* ベクターから UAS 配列を除去し、NEBuilder を用いて *IBIN* プロモーター断片を上記のカットベクターに挿入した。

• *IBINp-Venus-Akaluc-PEST*

*IBINp-Venus-Akaluc-PEST* コンストラクトを調製では、*UAS-Venus-Akaluc* ベクターから *Akaluc* 3'末端の停止コドンを除く *Venus-Akaluc* の塩基配列を PCR で増幅した。次に、*IBINp-Venus-Akaluc* ベクターの *Venus-Akaluc* 配列を *EcoRI* と *NotI* で除去し、PCR で増幅した *Venus-Akaluc* 配列と人工的に合成した *PEST* 配列を NEBuilder を用いて導入した。

• *brp<sup>Akaluc-KI</sup>*

*brp<sup>Akaluc-KI</sup>* 系統を作製するため、まず flyCRISPR を用いてセンスおよびアンチセンスオリゴを設計し、アニーリングしたオリゴセットを *BbsI* で制限酵素処理した U6b プラスミドに Ligation high Ver.2 を用いて挿入することで gRNA 発現ベクターを作製した。使用したオリゴセットを以下に記す。

gRNA ターゲット-1

センス： CTTCGCAATTGGTACAAATGTCGC

アンチセンス： AAACGCGACATTTGTACCAATTG

gRNA ターゲット-2

センス： CTTCGACAGAAGGACTCTCGAGTT

アンチセンス： AAACAACCTCGAGTCCTTCTGTC

次に、*brp<sup>Akaluc-KI</sup>* 系統を作製するためのドナーベクターの構築を行った。まず、約 2.8 kbp の *Brp* 配列の一部 (2R:9536078..9538942) をショウジョウバエ genome DNA から PCR で増幅し、*EcoRI* で制限酵素処理した pUC19 ベクターに挿入した。Cas9 による切断を防ぐため、この *Brp* 配列の 2 つの gRNA の標的配列の PAM に変異を導入した。次に、*UAS-Venus-Akaluc* ベクターから PCR 増幅した *Akaluc* 断片を、*AarI* 制限酵素処理した *pHD-ScarlessDsRed* ベクターに導入した。このプ

ラスミドから *Akaluc-DsRed* 断片を PCR 増幅し、NEBuilder を用いて、*Brp* の停止コドンを除いて PCR 増幅した直鎖 *pUC19-Brp* とクローニングした。

• *UAS-Xbp1-Venus-Akaluc*

*UAS-Xbp1-Venus-Akaluc* コンストラクトを作製では、5' UTR-*Xbp1*、*Venus-Akaluc* および 3' UTR(*Xbp1*)の断片を *pUAST-attB* ベクターに挿入した。5' UTR-*Xbp1* 断片は、*UAS-Xbp1-EGFP* (HG indicator) 系統<sup>13</sup> の genome DNA から PCR 増幅した *UAS-Xbp1-EGFP* 断片を鋳型として PCR 増幅した。*Venus-Akaluc* 断片は *UAS-Venus-Akaluc* ベクターから PCR で増幅した。*Xbp1* の 3' UTR 断片は *pUAST-Xbp1-EGFP* (HG indicator) ベクターから増幅した。これら 3 つの断片を NEBuilder を用いて *EcoRI* で制限酵素処理した *pUAST-attB* ベクターに挿入した。

作製した上記の遺伝子コンストラクトのキイロショウジョウバエ胚への導入および系統の樹立は BestGene Inc. (Chino Hills, CA, USA) および GenetiVision Corporation (Houston, TX, USA) に委託して行った。

### 3. AkaLumine および D-luciferin の保管方法

AkaLumine-HCl (FUJI FILM) は PBS で 60 mM に希釈し、遮光して -80°C で保存した。D-luciferin (FUJI FILM) は PBS で 100 mM に希釈し、-80°C で遮光して保存した。

### 4. 発光測定

発光測定のための基質である AkaLumine または D-luciferin のハエへの投与には、Fly food を加熱溶解し、AkaLumine または D-luciferin のストック溶液を目的濃度になるように添加し、経口投与でハエに与えた。24 ウェルプレート (PerkinElmer,

Waltham, MA, USA)の各ウェルにメスを1匹ずつ入れ、ガス透過性シール(NIPPON Genetics, Tokyo, Japan)で蓋をした。測定中にハエが基質を摂取できるように、基質を含む Fly food をウェルの壁面に貼り付けた。高感度生物発光測定装置(CHURITSU, Japan, CL-24W)を用いて、目的の時間発光の測定を行った。この装置による発光測定では、検出可能なすべての波長をカウントした。基質投与を停止する際には、ハエを氷上で5分間低温麻酔した後、通常の Fly food を入れたプレートに移した。Figure 5を除くすべての発光測定において、測光時間は1秒で、上下の検出器を用いて光子のカウントを行った。

## 5. Real-time PCR を用いた遺伝子発現解析

Fig. 3a および 3b では、AkaLumine (1.0 mM) を24時間投与した10匹のハエ (*white<sup>1118</sup>*) から total RNA を抽出した。Fig. 6d では、*IBINp-Venus-Akaluc* 系統の未交配メスハエの背胸部に大腸菌(DH5 $\alpha$ )を先端につけたガラス針を刺し、刺した直後および、刺してから1、2、8、12、18そして24時間後のハエから total RNA の抽出を行った。非感染群には大腸菌をつけていないガラス針を刺し、同様のタイムポイントでサンプルを採取した。ガラス針を刺していないグループはガラス針を刺す0.5時間前にハエを回収し、total RNA の抽出を行った。各グループおよび各タイムポイントで、5匹のハエから total RNA を抽出した。

各サンプルを液体窒素で凍結した後、TRIzol™ Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を用いて、BioMasher™ II (Nippi, Japan)でホモジナイズすることにより、total RNA を抽出した。その後、PrimeScript™ RT reagent kit with gDNA Eraser (TaKaRa Bio, Kusatsu, Shiga, Japan)を用いて genome DNA を除去し、total RNA (500 ng)から cDNA を合成した。Real-time PCR には、Luna Universal qPCR Master Mix (New England BioLabs) と CFX Connect (BIORAD, Hercules, CA, USA) を用いた。各遺伝子の相対発現量を算出するために、*Gapdh2*(Fig. 3a)、*Actin 5C*(Fig.

3b)、*RpL32* (Fig. 6d) をインターナルコントロールとして用いた。Real-time PCR には以下のプライマーを用いた。

*Gapdh2*: 5'-CCCATAGAAAGCGCTCAAAA-3'  
5'-CCAATCTTCGACATGGTAACTT-3'

*Actin 5C*: 5'-TCCAGTCATTCCTTTCAAACC-3'  
5'-CAGCAACTTCTTCGTCACACA-3'

*GstD1*: 5'-GAGTTCCTGAACACCTTCCTG-3'  
5'-ATTGGCGTACTTGCTGATCTC-3'

*Bip*: 5'-GCTATTGCCTACGGTCTGGA-3'  
5'-CATCACACGCTGATCGAAGT-3'

*Atg8a*: 5'-TTCATTGCAATCATGAAGTTCC-3'  
5'-GGGAGCCTTCTCGACGAT-3'

*Hid*: 5'-TCGACCTCCACGCCGTTATC-3'  
5'-CCTCATGATCGCTCTGGTACTC-3'

*RpL32*: 5'-GGTTACGGATCGAACAAGCG-3'  
5'-TTCTGCATGAGCAGGACCTC-3'

*IBIN*: 5'-CAACTGCTGCCAATCCTCG-3'  
5'-GCCTGGGATCGTAGTCACTT-3'

## 6. AkaLumine 投与がシヨウジヨウバエの発生に与える影響の調査

*white<sup>1118</sup>* のメス 80 匹とオス 20 匹を、Grape juice plate で蓋をした空のボトルに入れた。Grape juice plate が底面になるようにボトルを倒立させ、25°C のインキュベーター内でハエに 2 時間産卵させた。Grape juice plate は、グレープジュース (45 ml)、DW (27 ml)、Glucose (4.3 g)、Sucrose (2.1 g)、Agar (1.6 g)、5N NaOH (600  $\mu$ l) を混合してオートクレーブ滅菌した後に、Phosphoric acid (32  $\mu$ l) と Propionic acid

(320  $\mu$ l) を加え、35 mm ペトリ皿に分注して作製した。白金製のループを用いてハエの卵を優しく取り、20 個の卵を AkaLumine (1.0 mM) を含む Fly food とコントロールの Fly food に置いた。コントロールの Fly food には、AkaLumine の代わりに等量の PBS を加えた。25°C、湿度 60%、12 時間明期・12 時間暗期のインキュベーター内でハエ卵を発生させ、最終的に蛹および成虫になったハエの数を測定した。

## 7. 生物発光イメージング

生物発光イメージングを行う前に Akaluc 系統には AkaLumine (1.0 mM) を、Luc 系統には D-luciferin (5.0 mM) を 24 時間投与した。コントロール群には基質を含まない Fly food を与えた。これらのハエを直径 40 mm のプラスチックシャーレに接着剤で貼り付け、イメージングを行った。生物発光イメージングと画像処理には NightOWL II LB983 (BERTHOLD, Bad Wildbad, Germany) と IndiGo2 ソフトウェアを用いた。発光測定は、露光時間 20 秒、測定波長 650 nm (Akaluc 系統) および 570 nm (Luc 系統) の条件下で行った。*tubP-Gal4>UAS-Venus-Akaluc* および *tubP-Gal4>UAS-Luc* の画像処理、ならびに *elav-Gal4>UAS-Venus-Akaluc* および *elav-Gal4>UAS-Luc* の画像処理には、同じピクセル範囲を用いて光子のカウントを行った。

## 8. 細菌を感染させたハエを用いた発光測定

交尾による細菌感染を防ぐため、実験にはヴァージンのメスのハエを用いた。*IBIN<sup>Akaluc-KI</sup>*、*IBINp-Venus-Akaluc* および *IBINp-Venus-Akaluc-PEST* 系統に発光測定開始 24 時間前から AkaLumine (1.0 mM) を投与し、AkaLumine を投与しながら 24 時間発光測定を行った。その後、低温麻酔下でプレートからハエを回収し、CO<sub>2</sub> 麻酔下で大腸菌 (DH5  $\alpha$ ) を先端につけたガラス針で背胸部を刺した。非感染群は大腸菌を含まないガラス針で同様に刺した。解析には測定終了後も生存していたハエ

のデータのみを用いた。

## 9. ハエの睡眠障害

*brp<sup>Akaluc-KI</sup>* 系統に AkaLumine (1.0 mM) を含む Fly food を与え、睡眠障害群はボルテックスミキサーを用いてバイアルを 5 秒/分の頻度でランダムに振動させ、24 時間睡眠を障害した。コントロール群は睡眠障害を行わずに 24 時間 AkaLumine Fly food で飼育した。これらのハエを 24 ウェルプレートに移し、AkaLumine (1.0 mM) を投与しながら 6 時間発光測定を行った。

## 10. ウェスタンブロッティング

ハエ成虫の脳を PBS 中で解剖した。7-10 個の解剖した脳を 50  $\mu$ l の PBS でホモジナイズし、50  $\mu$ l の 2x Sample buffer (2% SDS、80 mM Tris-HCl pH6.8、15% glycerol、0.0025% Brilliant Blue FCF) を加えた後、超音波処理し、遠心分離した (12000 $\times$ g、10 分間、4 $^{\circ}$ C)。遠心後の上清を最終濃度 40 mM になるように DTT を添加した。3 分間煮沸し、5% SDS-PAGE にロードした後、イムノブロットを行った。イムノブロットには以下の一次抗体を用いた。

nc82 (mouse anti-BRP, Developmental Studies Hybridoma Bank, 1:1000)

DM1A (mouse anti-alpha-tubulin, Cedarlane Laboratories Ltd, CLT9002, 1:1000)

二次抗体には Peroxidase AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, 715-035-151, 1:5000) を用いた。シグナル検出には Pierce<sup>TM</sup> ECL Plus Western Blotting Substrate (thermos scientific, 32132) を用いた。バンド強度は ImageLab を用いて定量した。



## 11. ヒートショック

AkaLumine (1.0 mM) を 24 時間投与したハエを 37°C のインキュベーターに入れ、1 時間ヒートショックを行った。ヒートショック中はハエは AkaLumine (1.0 mM) を含む Fly food を摂取することができる状態にした。発光測定はヒートショック直後に開始した。測定は AkaLumine (1.0 mM) をハエに投与しながら 5 時間行った。

## 12. 統計解析

データ解析には Prism9 ソフトウェア (GraphPad) を使用した。データは平均値  $\pm$  s.e.m (エラーバー) で示した。統計検定、統計的有意性、試行回数は各グラフの凡例に記載している。統計的有意性は  $p < 0.05$  とした。

### III. 結果

1. Akaluc 発現ショウジョウバエに AkaLumine を経口投与することで、高い S/N 比で発光シグナルの *in vivo* 解析が可能である

過去のマウスを用いた実験では基質である AkaLumine の静脈内投与、腹腔内投与、経口投与が調査されている<sup>8</sup>。本研究では、ショウジョウバエへの基質送達を簡便かつ無傷で行うために経口での AkaLumine 投与手法を用いた。本研究のすべての実験において AkaLumine-HCl を用いており、以降は単に AkaLumine と記載する。ハエへの基質投与および発光測定の方法として、24 ウェルプレートの各ウェルにハエ 1 匹と AkaLumine を含む餌を加え、発光の測定を行った (Fig. 2a)。この方法により、自由行動下のハエに AkaLumine を与えながら連続的に発光を測定することが可能である。Akaluc を全身に発現している系統 (*tubP-Gal4>UAS-Venus-Akaluc*) に AkaLumine を経口投与すると、AkaLumine を投与していない群よりも顕著に高い発光シグナルを示した (Fig. 2b)。また、Luciferase 遺伝子を持たない野生型系統 (*w<sup>1118</sup>*) に AkaLumine を投与した場合、バックグラウンドノイズと同等レベルのシグナルしか検出されなかったことから、AkaLumine はショウジョウバエに存在する内因性酵素を介した酸化によって発光を生じる可能性が低いことが示された。以上の結果から、AkaLumine を Akaluc ショウジョウバエに経口投与することにより、高い S/N 比で発光を検出できることが示された。

次に、ショウジョウバエの発光測定において適切な AkaLumine 濃度の検討を行った。Akaluc を全身に発現する系統 (*tubP-Gal4>UAS-Venus-Akaluc*) に複数の濃度の AkaLumine を投与したところ、発光シグナルは AkaLumine 濃度の増加とともに増加していき、発光は約 1.0 mM の AkaLumine でピークに達した (Fig. 2c)。加えて、AkaLumine 投与後または AkaLumine 投与中止後の発光シグナルの経時的な変化についても調査を行った。0.5、1.0、2.0 mM の濃度では、発光シグナルは速やかに

増加し、AkaLumine 投与後約 5 時間でピークに達した (Fig. 2d)。また、投与した AkaLumine の濃度が高いほど、投与中止後の発光シグナルの減少速度が緩やかであることが分かった (AkaLumine 投与中止後に平均 counts per second (cps) が 6,000 以下になるまでに要した時間、0.1 mM : 2.6 時間、0.5 mM : 6.2 時間、1.0 mM : 8.8 時間、2.0 mM : 22.8 時間)。さらに、1.0 mM AkaLumine を与えてから 48 時間後までの発光レベルの変化を個体ごとに比較した。その結果、個体ごとに大きな差は認められず、シグナルはすべての個体で安定していた (Fig. 2e)。

これらの結果から、Akaluc を発現するショウジョウバエに AkaLumine を適切な濃度で経口投与することにより、*in vivo* で高感度に発光を検出できることが示された。

## 2. AkaLumine の経口投与はショウジョウバエに毒性を示さない

次に AkaLumine 経口投与がショウジョウバエの生存に有害か調査を行った。AkaLumine (1.0 mM) をハエに 24 時間投与し、いくつかのストレス応答遺伝子の発現レベルを測定した。ここでは、*GstD1*, *Bip*, *Atg8a*, *Hid* の発現量変化を調査した。*Glutathione S transferase D1* (*GstD1*) の発現は酸化ストレスや加齢によって上昇する<sup>14</sup>。小胞体シャペロンである *Bip* の発現は小胞体ストレスによって誘導される<sup>15</sup>。オートファジーの重要な構成要素である *Atg8a* は、飢餓ストレス下で発現が上昇する<sup>16</sup>。アポトーシス活性化因子 *head involution defective* (*Hid*) の発現は、細胞死シグナルによって誘導される<sup>17</sup>。これらの遺伝子の発現レベルは、AkaLumine 経口投与によって影響を受けなかった (Fig. 3a, *gapdh2* 遺伝子で正規化)。遺伝子発現を *actin 5c* で正規化した場合も同様の結果が得られた (Fig. 3b)。これらの結果は、AkaLumine の経口投与がハエに有害なストレスを与えないことを示している。

加えて、AkaLumine を長期投与した場合の影響についても調査を行った。ハエの受精卵を AkaLumine (1.0 mM) を含む Fly food に置き、成虫になるまで飼育した。その結果、AkaLumine Fly food 飼育による蛹化率および羽化率に有意な影響は見ら

れなかった (Fig. 2c, d)。これらの結果は、AkaLumine の長期投与はハエの発生に影響を与えないことを示している。以上の結果をまとめると、AkaLumine の経口投与はショウジョウバエに対してほとんど毒性を示さないことが示唆された。

### 3. Akaluc/AkaLumine を用いることで Luc/D-luciferin よりも少数のニューロンから強い生物発光シグナルを検出できる

哺乳類では、Akaluc/AkaLumine を用いることで、従来の Luc/D-luciferin に比べ、生体内深部組織から得られるシグナル強度が劇的に向上する<sup>8</sup>。同様にショウジョウバエにおいても Akaluc/AkaLumine の使用により生体内から得られるシグナルが増強されるか調べるために、Akaluc/AkaLumine と Luc/D-luciferin の発光シグナルを比較した。Luc を全身に発現している系統 (*tubP-Gal4>UAS-Luc*) を用いて発光量を測定したところ、D-luciferin の濃度が高くなるにつれて発光量の増加が見られた (Fig. 4a)。基質が低濃度のときには、Akaluc/AkaLumine シグナルは Luc/D-luciferin のシグナルよりも強い傾向があった (Fig. 1c および 3a, Akaluc + 0.5 mM AkaLumine mean cps :  $4.4 \times 10^5$  cps, Luc + 0.5 mM D-luciferin mean cps :  $2.7 \times 10^5$  cps)。一方、基質高濃度では、Luc/D-luciferin のシグナルは Akaluc/AkaLumine のシグナルよりも強かった (Akaluc + 5.0 mM AkaLumine mean cps :  $5.3 \times 10^5$  cps, Luc + 5.0 mM D-luciferin mean cps :  $1.0 \times 10^6$  cps)。これらの結果から、Akaluc と AkaLumine の反応は、AkaLumine 濃度が低い場合でも反応効率が高く、低濃度の時には Luc/D-luciferin より高い発光を示すことが示唆された。一方で、Luciferase を全身で発現させた場合には、Luc/D-luciferin の最大発光量は Akaluc/AkaLumine のものよりも強いことが示された。

次に、特定の組織において Akaluc/AkaLumine と Luc/D-luciferin の発光シグナルの比較を行った。pan-neuronal driver である *elav-Gal4* を用いて Akaluc または Luc を発現させた場合、基質低濃度および基質高濃度の両方において Akaluc/AkaLumine

シグナルは Luc/D-luciferin よりも有意に高かった (Fig. 4b)。OK107-Gal4 は約 2,500 個の Kenyon cell から構成される脳の構造体の 1 つであるキノコ体に主に発現する GAL4 driver である<sup>18</sup>。OK107-Gal4 を用いて Akaluc または Luc を発現させた場合においても、Akaluc/AkaLumine シグナルは Luc/D-luciferin のシグナルよりも有意に高かった (Fig. 4c)。Or42b は嗅覚受容体 (Or) の一つであり、約 50 から 90 個の嗅覚受容体神経 (ORN) に発現している<sup>19</sup>。Or42b ORN から検出された発光シグナルを比較したところ、Akaluc/AkaLumine は Luc/D-luciferin よりも強いシグナルを示した (Fig. 4d)。これらの結果は、Akaluc/AkaLumine がショウジョウバエの神経系のような深部組織や、Or42b を発現する ORN のような少数の細胞からの発光シグナルの検出に有用であることを示している。

Or42b と同様に Or85a も Or の一つであり、Or85a を発現する ORN の数は約 20 から 50 個存在する<sup>19</sup>。Or42b (*Or42b-Gal4>UAS-Venus-Akaluc*) および Or85a (*Or85a-Gal4>UAS-Venus-Akaluc*) の ORN で発光シグナルを比較したところ、Or85a よりも Or42b に Akaluc を発現した系統の方がより強いシグナルを示した。

(Fig. 4e)。しかしながら、Luc/D-luciferin を用いた場合には、Or42b と Or85a の細胞数の違いは発光では検出できなかった。これらの結果は、Akaluc/AkaLumine を用いることで、わずかな細胞数の差を発光シグナルの差から検出できることを示している。

#### 4. Akaluc/AkaLumine はショウジョウバエの脳における生物発光イメージングを改善する

マウスやマーマモセットでは、Akaluc/AkaLumine の使用により、特に深部組織における発光シグナルに基づくイメージングが劇的に改善される<sup>8</sup>。そこで、Akaluc/AkaLumine がショウジョウバエの生物発光イメージングを改善できるか調査を行った。Akaluc または Luc を全身に発現させた場合、Akaluc/AkaLumine は

Luc/D-luciferin よりも低濃度で十分にイメージングが可能であった (Fig. 5a-c)。興味深いことに、神経系で Akaluc を発現させた場合には脳と腹側神経索でイメージング可能であったのに対して、Luc を発現させた場合にはシグナルはほとんど検出されなかった (Fig. 5d-f)。これらの結果は、*tubP-Gal4* によって Luc を発現させたハエで検出されたシグナルは、神経系ではなく体表組織に由来する可能性が高いことを示唆している。

さらに、腸特異的に発現する Gal4 ドライバー (*mex1-Gal4>UAS-Venus-Akaluc*) を用いて、Akaluc/AkaLumine のシグナルから腸の形状をイメージング可能か調査を行った。その結果、ショウジョウバエの腹部のみからシグナルをイメージングすることは可能であったが、シグナルから腸の形状を識別することはできなかった (Fig. 5g)。これらの結果から、Akaluc/AkaLumine はショウジョウバエの深部組織における生物発光イメージングに適しており、頭部や腹部といった体の部位レベルでの空間分解能を持つことが示唆された。

## 5. Akaluc/AkaLumine を用いることで高感度に経時的な遺伝子発現解析を行うことが可能である

生物発光を用いた遺伝子発現解析は非侵襲的な方法であるため、同一個体による連続測定が比較的容易である<sup>2</sup>。そこで次に、Akaluc/AkaLumine を用いてショウジョウバエの遺伝子発現を非侵襲的かつ経時的に測定可能か調査を行った。この目的のため、自然免疫関連遺伝子である *Induced by Infection (IBIN)* の発現依存的に Akaluc を発現するショウジョウバエ系統の作製を行った。この系統は、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により、*IBIN* 遺伝子座に Akaluc 遺伝子がノックインされている (*IBIN<sup>Akaluc-KI</sup>*) (Fig. 6a)。*IBIN* はグラム陰性細菌およびグラム陽性細菌のどちらの感染によっても発現が大きく増加し、細菌抵抗性の促進に関与する免疫関連遺伝子である<sup>20</sup>。そのため、*IBIN<sup>Akaluc-KI</sup>* 系統が細菌に感染すると、*IBIN* 発現の増加とともに

発光シグナルを発することが予想された。予想通り、大腸菌 (DH5  $\alpha$ ) 感染群では、DH5  $\alpha$  非感染群と比較して発光シグナルの大きな増加を観察することができた (Fig. 6b)。この自然免疫モニタリングシステムの有用性をさらに拡張するために、*IBIN* のプロモーターと推定される領域 (*CG30109* と *IBIN* の間の 319 bp、Fig. 6a) の制御下で Akaluc を発現するトランスジェニック *IBIN<sub>p</sub>-Venus-Akaluc* 系統を作製した。*IBIN<sub>p</sub>-Venus-Akaluc* 系統に DH5  $\alpha$  を感染させると、*IBIN<sup>Akaluc-KI</sup>* 系統と同様のパターンで発光シグナルの増加が観察された (Fig. 6c)。次に、*IBIN<sup>Akaluc-KI</sup>* 系統と *IBIN<sub>p</sub>-Venus-Akaluc* 系統の発光シグナルの経時的な変化を qPCR で測定した実際の *IBIN* 発現量と比較した。qPCR の結果では、*IBIN* 発現量は細菌感染後 24 時間で減少したのに対し (Fig. 6d)、*IBIN<sup>Akaluc-KI</sup>* または *IBIN<sub>p</sub>-Venus-Akaluc* を用いた結果では感染 24 時間後も高い発光レベルを示した (Fig. 6b, c)。これは Akaluc の分解速度が遅いことが原因であると考えた。そこで、PEST 配列を Akaluc 配列に連結した系統 (*IBIN<sub>p</sub>-Venus-Akaluc-PEST*) を作製した。PEST 配列はプロリン (P)、グルタミン酸 (E)、セリン (S)、スレオニン (T) に富んだ配列であり、寿命の短いタンパク質などに存在する<sup>21,22</sup>。この PEST 配列を Luciferase に付加することで、Luciferase タンパク質の細胞内寿命が短くなり、時間分解能を向上させたモニタリングが可能になる<sup>23</sup>。*IBIN<sub>p</sub>-Venus-Akaluc-PEST* 系統を用いた結果では、発光シグナルは細菌感染とともに増加し、感染 24 時間後には qPCR の結果と同様に減少することが分かった (Fig. 6e)。これらの結果は、Akaluc/AkaLumine を用いてショウジョウバエの同一個体で経時的な遺伝子発現解析が可能であること、また Akaluc に PEST 配列を加えることで時間分解能を向上させた解析が可能であることを示している。

6. 内在性タンパク質への Akaluc の融合はタンパク質の機能に影響を与える可能性がある

次に目的の内在タンパク質のレベルを Akaluc で解析可能か調査するために、内在



の *Bruchpilot* (*Brp*) 遺伝子に Akaluc を融合した系統を作製した。Brp タンパク質はシナプス前部の活性領域に局在し、Brp タンパク質レベルは睡眠不足によって有意に増加することが報告されている<sup>24,25</sup>。この *Brp* 遺伝子の 3'末端に Akaluc を挿入し、Brp-Akaluc 融合タンパク質を産生する *Brp-Akaluc* 系統 (*brp<sup>Akaluc-KI</sup>*) を作製した (Fig. 7a)。この *brp<sup>Akaluc-KI</sup>* 系統を用いて、睡眠不足による Brp の増加をモニターできるか調査した。予期せぬことに、発光シグナルの解析およびウェスタンブロッティングの両方の解析において、*brp<sup>Akaluc-KI</sup>* 系統では 24 時間の睡眠阻害による Brp タンパク質レベルの増加が観察されなかった (Fig. 7b-e)。一方で、野生型ハエを用いた場合には、過去の報告と一致して睡眠阻害による Brp タンパク質レベルの増加が観察され、本研究で用いた睡眠阻害の手法に問題がないことが確認された (Fig. 7f)。これらの結果は、Akaluc の融合が Brp の輸送や局在といった機能に影響を与えた可能性を示唆しており、Akaluc を目的のタンパク質に融合させる際には、この点を注意深く考慮する必要がある。

## 7. Akaluc/AkaLumine を用いて ER ストレスレベルの経時的な測定が可能である

Akaluc/AkaLumine を用いた生体内のタンパク質レベルの時間的変化をモニタリングすることについてさらに検証を行うため、Unfolded protein response (UPR) シグナル伝達経路の *Inositol-requiring enzyme 1* (*Ire1*) の下流で機能する転写因子である *X-box binding protein 1* (*Xbp1*) を用いた。XBP1 は通常状態では転写因子活性を示さないが、小胞体ストレス下では、XBP1 は IRE1 によって誘導される非従来型スプライシングによって活性型転写因子となり、UPR 標的遺伝子の発現につながる<sup>26</sup>。*Xbp1* のこの性質を利用して、小胞体ストレス下のみで発現する GFP 融合型の活性化 XBP1 レポーターが開発されている<sup>13,27</sup>。同様の仕組みで、Akaluc/AkaLumine を用いた小胞体ストレスレポーターの作製を試みた。この目的のため、非従来型スプ



ライシングによって生じた活性化 XBP1 タンパク質に Akaluc をインフレームで連結した、*Xbp1-Akaluc* 系統 (*UAS-Xbp1-Venus-Akaluc*) を作製した (Fig. 8a)。ヒートショックはタンパク質のミスフォールディングとアンフォールディングを引き起こし、*Xbp1* の非従来型スプライシングを誘導する<sup>28,29</sup>。*Xbp1-Akaluc* を全身に発現する系統 (*tubP-Gal4>UAS-Xbp1-Venus-Akaluc*) では、ヒートショックによって生物発光シグナルの有意な増加が観察された (Fig. 8b)。また、経時的に発光シグナルを測定することで、ヒートショック停止後の活性化 Xbp1 レベルの急激な減少をモニターすることができた (Fig. 8c)。*Xbp1* の非従来型スプライシングを深部組織でも検出可能か調べるために、神経系で *Xbp1-Akaluc* を発現させた (*elav-Gal4>UAS-Xbp1-Venus-Akaluc*)。その結果、ヒートショックによる発光シグナルの著しい増加や、ヒートショック後から定常状態への回復過程をモニタリングすることも可能であった (Fig. 8d, e)。以上のことから、*Xbp1-Akaluc* を用いることで、1 匹のショウジョウバエの特定の組織における小胞体ストレスレベルの時間的変化をモニターすることが可能である。

## IV. 考察

本研究では、Akaluc/AkaLumine をショウジョウバエに導入し、遺伝子やタンパク質の発現解析に有用であることを示した。Akaluc 発現系統に AkaLumine を経口投与することで、高い S/N 比での発光検出が可能であった (Fig. 2)。また、ショウジョウバエに AkaLumine を短期間または長期間投与しても、ハエに有害な影響は見られなかった (Fig. 3)。神経系のような深部組織や嗅覚受容体神経のような少数の細胞からのシグナル検出においては、Akaluc/AkaLumine の方が Luc/D-luciferin よりもシグナル強度が有意に高いことが分かった (Fig. 4)。加えて、ショウジョウバエ深部組織での生物発光イメージングにおいても、Akaluc/AkaLumine は Luc/D-luciferin よりも優れていた (Fig. 5)。Akaluc/AkaLumine を用いることで、細菌感染で著しく増加する *IBIN* の発現量変化を高感度かつ経時的にモニターすることにも成功した (Fig. 6)。さらに、Akaluc と融合した XBP1 を発現するショウジョウバエを用いることで、熱ストレス条件下での小胞体ストレスの変化をモニターすることも可能であった (Fig. 8)。これらの結果は、Akaluc/AkaLumine がショウジョウバエの遺伝子およびタンパク質発現解析、特に深部組織や少数の細胞における経時的かつ非侵襲的な解析において強力なツールとなり得ることを示唆している。

### 1. Akaluc 系統に投与する最適 AkaLumine 濃度

Akaluc を *tubP-Gal4* で発現させた場合、シグナルは 1.0 mM AkaLumine でピークを示した (Fig. 2c)。一方、Luc を *tubP-Gal4* で発現させた場合には、シグナルは 5.0 mM D-luciferin でピークを示した (Fig. 4a)。このシグナルがピークに達するまでに要する基質濃度の違いは、酵素と基質との親和性が Luc/D-luciferin よりも Akaluc/AkaLumine の方が高いことに起因すると考えられる。実際に、AkaLumine の Luc に対する親和性は、Luciferin よりも有意に高いことが報告されている<sup>10</sup>。したがって、Akaluc/AkaLumine は Luc/D-luciferin よりも低い基質濃度でシグナルがピーク

クに達すると予想される。しかし、特定の組織や細胞に限定して Akaluc が発現している場合には、必要な AkaLumine 濃度が 1.0 mM よりも高くなる可能性がある。また、Luc/D-luciferin の反応においては、過剰な濃度の基質を投与することで、反応を阻害する副産物が生成してしまう<sup>30</sup>。Akaluc/AkaLumine の反応においても同様の現象が起こるかに関しては、現時点で不明である。したがって、ショウジョウバエに投与する AkaLumine の濃度は、Akaluc が発現している組織などに応じて慎重に検討する必要がある。

## 2. ショウジョウバエへの AkaLumine 投与方法

発光シグナルを簡便かつ非侵襲的に測定するため、本研究では AkaLumine を Fly food に混ぜてショウジョウバエに経口投与する手法を用いた。この手法には AkaLumine の摂取量がハエの摂食行動に依存してしまうという欠点がある。従って、摂食行動を行わない蛹のステージや絶食が必要な実験などには、本研究の方法を適用するのは難しいと考えられる。マウスを用いた研究では、AkaLumine を経口投与した場合よりも腹腔内投与した場合の方が発光量が多いという報告がある<sup>8</sup>。そのため、経口投与が実験的に困難であったり、経口投与では十分なシグナルが得られない場合には、腹腔内投与を用いることでこれらの問題が解決する可能性がある。しかしながら、今回の結果から経口投与でも十分なシグナルを経時的に検出できることが示されており、多くの場合において経口投与で問題なく解析が可能であると考えられる。

## 3. Akaluc-PESTを用いた経時的な遺伝子発現解析

*IBIN*プロモーター制御下で Akaluc を発現する系統を用いて、細菌感染による *IBIN* 発現量の時間的変化を計測した実験において、qPCR の結果では *IBIN* 発現量は大腸菌感染から 24 時間後に減少したのに対し、*IBIN-Akaluc* の結果では感染 24 時間後も発光シグナルが維持されていた (Fig. 6b-d)。実際の遺伝子発現と発光シグナルの

この時間的な差は、Akaluc タンパク質の分解速度が遅いことに起因すると考えられる。実際に、ヒト培養細胞における Akaluc タンパク質の半減期は約 9 時間と報告されている<sup>8</sup>。経時的な遺伝子発現解析の時間分解能を向上させるため、Akaluc タンパク質に PEST 配列を付加し、分解速度を速めることを試みた。*IBINp-Akaluc-PEST* を用いた解析では、より時間分解能が向上した *IBIN* 発現量変化をモニターすることができ、qPCR で得られた結果とより類似した結果を得ることができた (Fig. 6e)。したがって、*Akaluc-PEST* は、発現が急速に変動する遺伝子のモニタリングに特に有用であると考えられる。

#### 4. *Xbp1-Akaluc* を用いた小胞体ストレスモニタリング

HeLa 細胞では、ヒートショックによってアンフォールドタンパク質が増加し、ヒートショックを止めると急速に減少することが報告されている<sup>28</sup>。同様の現象が *Xbp1-Akaluc* 系統を用いた場合にも観察された。ヒートショックは *Xbp1-Akaluc* のシグナルを著しく増加させ、ヒートショック停止後に発光レベルは速やかに基底レベルまで低下した (シグナル半減期は約 20-30 分、Fig. 8c)。Akaluc タンパク質の半減期は約 9 時間<sup>8</sup>であるのに対し、XBP1 の半減期はるかに短く、30 分未満である<sup>31,32</sup>。ヒートショック後に *Xbp1-Akaluc* 系統の発光シグナルが急速に減少したことから、*Xbp1-Akaluc* 融合タンパク質は XBP1 の内因性分解速度を反映していると考えられる。加えて、神経系においてもヒートショックによる活性化 XBP1 の発現誘導をモニターすることができた (Fig. 8d, e)。これらの結果から、*Xbp1-Akaluc* はショウジョウバエにおける小胞体ストレスの経時的なモニタリングにおいて有用なツールであると考えられる。

#### 5. 他の Akaluc/AkaLumine を用いた研究と本研究の比較

本研究から、Akaluc/AkaLumine は神経系などの深部組織や少数の細胞での解析に特に有用であり、ショウジョウバエ研究で一般的に使用されている Luc/D-luciferin

と比較して、最大で約 5 倍のシグナルが得られることが示された (Fig. 4b; Akaluc + 1.0 mM AkaLumine vs. Luc + 1.0 mM D-luciferin)。マウスやマーマモセットを用いた研究においても、同様の結果が報告されている<sup>8,33</sup>。一方で、Luc/D-luciferin の反応では投与する基質濃度を上げることで、Akaluc/AkaLumine よりも強いシグナルが得られることが報告されている<sup>34</sup>。この報告と一致して、ショウジョウバエでも *tubP-Gal4* を用いた場合には、基質高濃度条件下で Luc/D-luciferin の方が Akaluc/AkaLumine よりも強いシグナルを示した (Fig. 2c, 4a)。しかしながら、ショウジョウバエの深部組織からの発光検出においては、Akaluc/AkaLumine は Luc/D-luciferin よりも有意に強いシグナルを示した (Fig. 4b, c)。 *Or42b-Gal4* を用いたときには、10 mM の高濃度基質条件下においても Akaluc/AkaLumine シグナルは Luc/D-luciferin シグナルより優れていたが、Luc/D-luciferin シグナルは 10 mM の D-luciferin でもピークに達していないように思われた (Fig. 4d)。

## 6. AkaLumine-HCl 投与の問題点

AkaLumine-HCl の投与に関していくつか問題が報告されている。第一の問題点は、AkaLumine-HCl を投与すると非特異的シグナルが発生することである。Luciferase 遺伝子を持たないナイーブマウスに AkaLumine-HCl を投与すると、D-luciferin を投与した場合よりも有意に高い非特異的シグナルが検出される<sup>34</sup>。一方で、野生型ショウジョウバエに AkaLumine-HCl を投与した場合には、非特異的シグナルは検出されなかった (Fig. 2b)。第二の問題は、AkaLumine-HCl の毒性である。AkaLumine-HCl の投与は皮膚や心臓に毒性を示すことが報告されており、これは AkaLumine-HCl 溶液が酸性であることに起因すると考えられている<sup>34,35</sup>。我々は AkaLumine-HCl をショウジョウバエに経口投与する際に、Fly food に混ぜる方法を用いたが、短期・長期投与ともにハエに対して目立った毒性は認められなかった (Fig. 3)。しかしながら、さらなる長期投与がハエに悪影響を及ぼす可能性を本研究では完全に除去できていないことに留意する必要がある。実際に、ハエに与える餌の pH がハエの寿命などに

影響与えることが報告されている<sup>36</sup>。まとめると、哺乳類の研究で示された Akaluc/AkaLumine の問題は、ショウジョウバエでは測定において大きな問題にならないと考えられ、ショウジョウバエ研究における Akaluc/AkaLumine の有用性がさらに強調された。

## 7. Akaluc の内在タンパク質への融合による影響

本研究の結果から、Akaluc の内在タンパク質への融合はショウジョウバエでの Akaluc/AkaLumine 活用したタンパク質レベルのモニタリングにおいて、重大な問題を引き起こす場合があることが示された。*brp<sup>Akaluc-KI</sup>* 系統を用いた実験では、以前の研究で報告されている睡眠阻害による Brp レベルの増加は見られなかった<sup>25</sup> (Fig. 7b-e)。Brp レベルが増加しなかった原因は、Akaluc を Brp に融合したことが関与している可能性が高く、Akaluc の融合は Brp の翻訳、輸送、局在化、分解等に影響を与えることが考えられる。Akaluc の塩基配列は GFP の 2 倍以上 (Akaluc: 1,653 bp) であり、この比較的大きな分子の融合によって上記のような悪影響が生じた可能性がある。従って、*Xbp1-Akaluc* を用いた実験では、これまでの報告と同様の結果が得られたが、Akaluc の融合が *xbp1* のスプライシングや翻訳などに及ぼす影響は完全には排除できないことに留意する必要がある。

## 8. NanoLuc と Akaluc

NanoLuc は深海エビ由来の Luciferase で、Firefly luciferase よりも分子量が小さく、NanoLuc/furimazine は Fluc/D-luciferin の 100 倍の発光を放出する<sup>37</sup>。この分子量が小さいという特徴から、NanoLuc は上記で示したタンパク質への Akaluc 融合の問題を解決できる可能性がある。本研究では NanoLuc を用いた発光系と Akaluc/AkaLumine との比較は行っていないが、NanoLuc/furimazine は青色波長の発光を放出するため、Akaluc/AkaLumine の方が深部組織からのシグナルの検出にお

いては優れている可能性がある。しかし、近年、NanoLuc ベースの生物発光システムにおいても発光波長を赤色にシフトさせたシステムの開発や、水溶性が向上した新しい furimazine アナログが多数開発されており、これらの furimazine アナログと NanoLuc を用いたシステムのマウスでの評価が精力的に行われている<sup>38-40</sup>。ショウジョウバエにおいても Akaluc/AkaLumine および NanoLuc ベースのシステムの比較・評価をより進めることで、ショウジョウバエにおける生物発光ベースの解析がより向上することが期待される。

## V. 総括

本研究をまとめると、Akaluc/AkaLumine は、ショウジョウバエの深部組織や少数の細胞における遺伝子やタンパク質の発現解析において、従来の方法である Luc/D-luciferin よりもはるかに強力なツールであると言える。また、Akaluc/AkaLumine は非侵襲的にショウジョウバエをモニターすることができる。そのため、自由行動下かつ同一個体のショウジョウバエを用いた連続解析を行うことが可能である。このような利点から、Akaluc/AkaLumine をショウジョウバエ研究に用いることで、従来の方法では困難であった *in vivo* での現象の解析が可能になると考えられる。



## VI. 図表

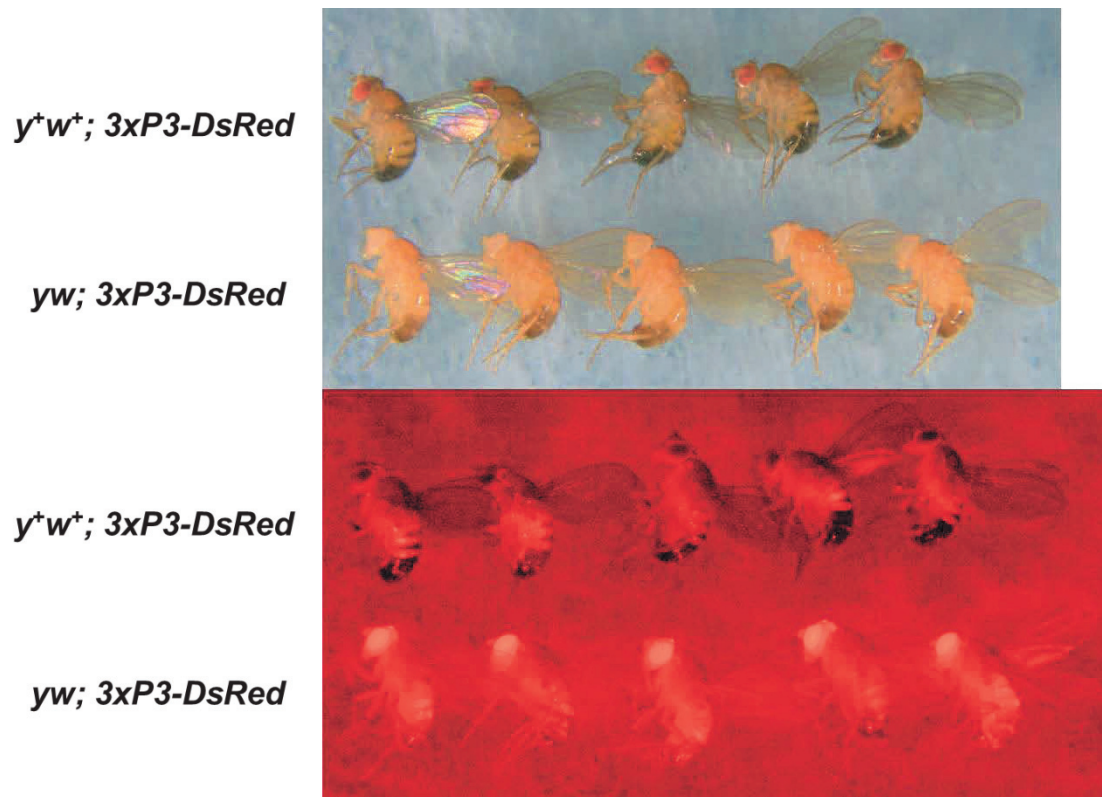
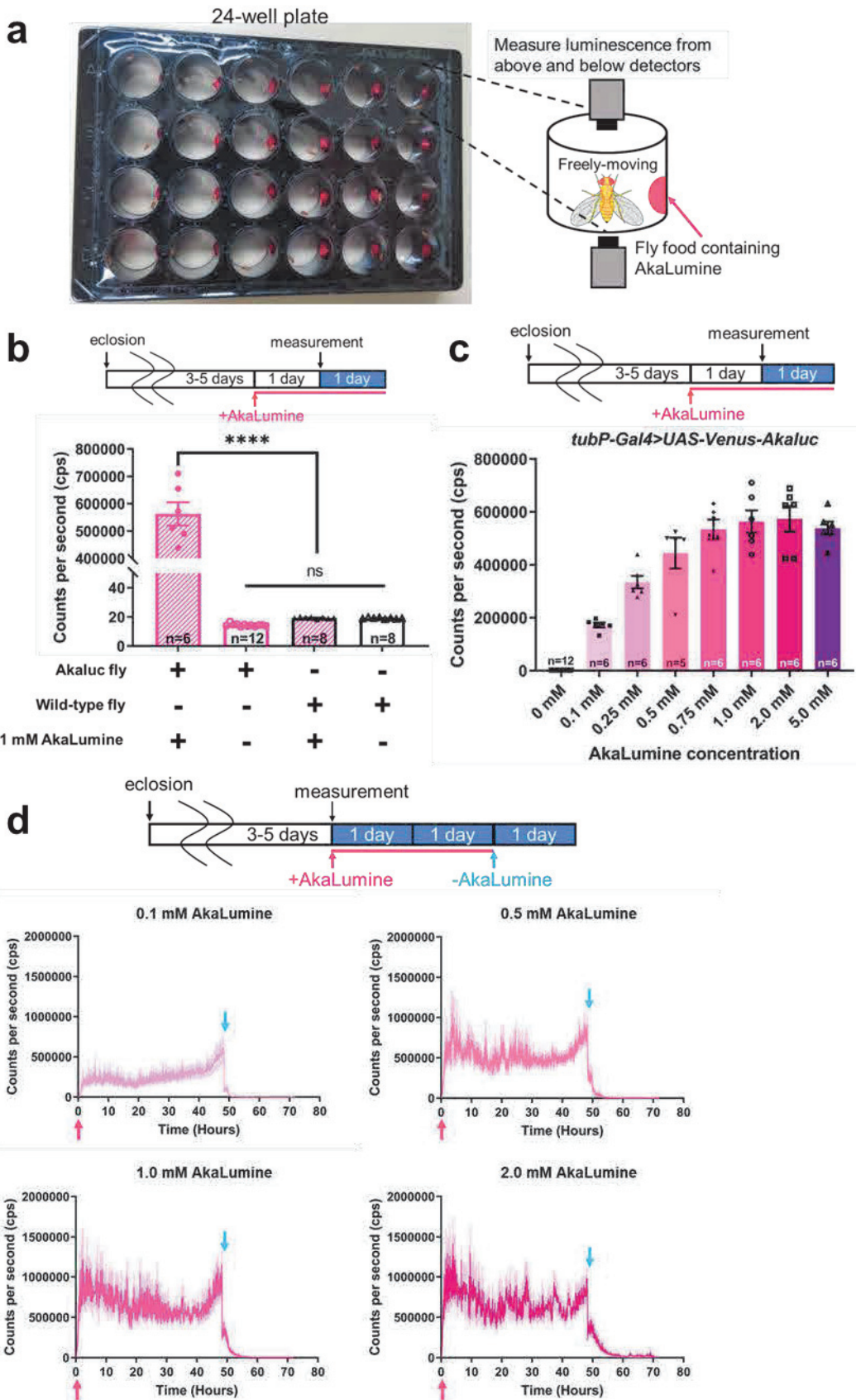


Fig. 1: ショウジョウバエ体色素による光子の吸収と散乱

色素合成に関与する *white* (*w*) および *yellow* (*y*) 遺伝子の有無により、DsRed シグナルが有意に変化する。写真は蛍光実顕微鏡 (Leica M165 FC) とデジタルカメラ (Leica MC170 HD) を用いて明視野 (上図) と ET DSR フィルターセット (励起: 545/40、バリア: 620/60) で撮影した (下図)。各写真において、上段のハエは野生型の体色素を持つ系統 ( $y^+w^+$ )、下段のハエは眼と体表の色素を欠く系統 ( $yw$ ) である。どちらの系統も 3xP3 プロモーターによって同じコピー数の DsRed 遺伝子を発現している。



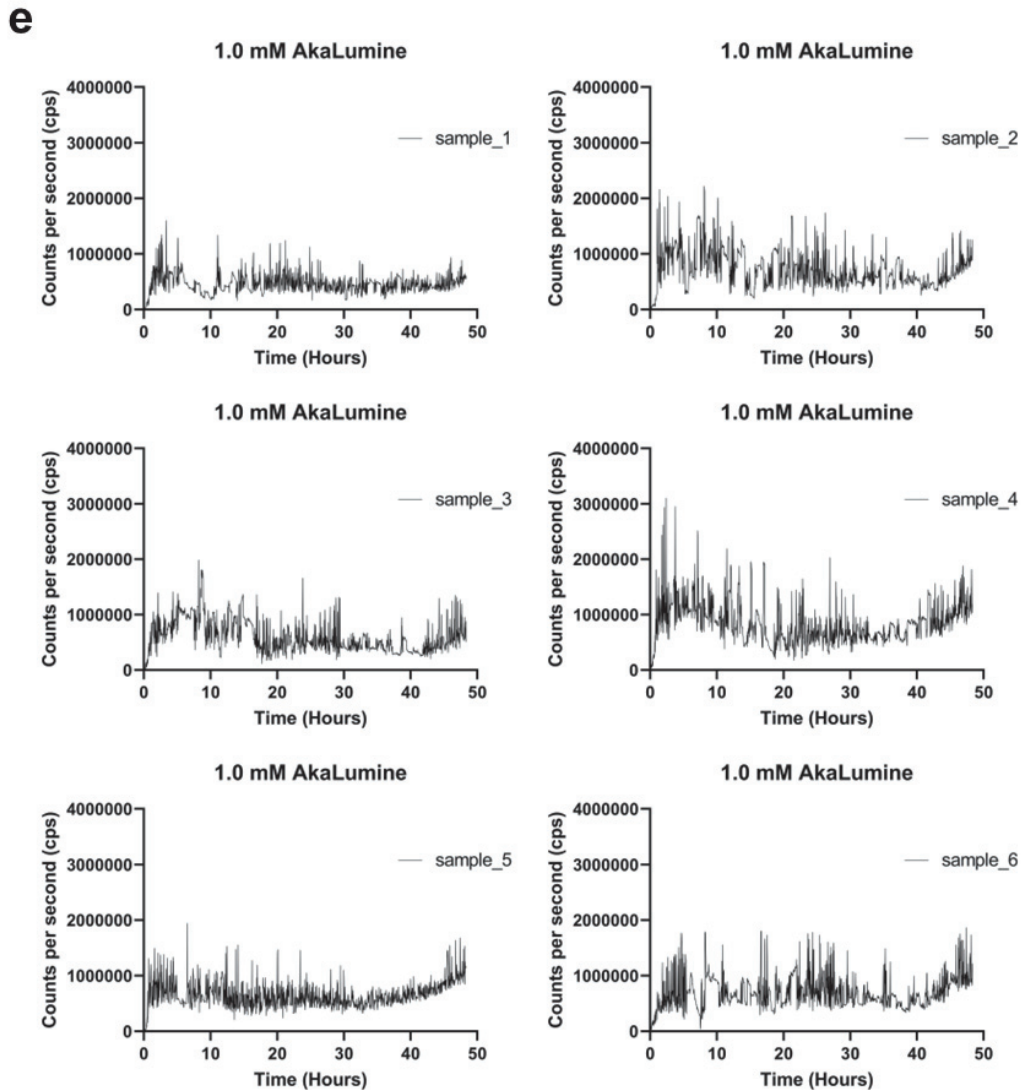


Fig. 2: ショウジョウバエへの AkaLumine 経口投与による Akaluc/AkaLumine 生物発光の検出

(a) 発光測定の概略図。24 ウェルプレート内の各ウェルに 1 匹のハエと AkaLumine を含む Fly food を入れた。ウェル内を自由に移動するハエから放出される発光を上下の生物発光検出器で測定した。

(b) Akaluc を発現するハエに AkaLumine を投与して発光を検出した。Akaluc 系統 (*tubP-Gal4>UAS-Venus-Akaluc*) または野生型系統 (*w<sup>118</sup>*) を用いた。AkaLumine 投与群では、発光測定開始 24 時間前からハエに AkaLumine (1.0 mM) を添加した Fly food を与え、24 時間連続測定を行った。AkaLumine を投与しない群では、通常の Fly food を与えて測定を行った。グラフは各試験で 24 時間連続測定した発光の平均値を示す。各データセットの試

行回数はグラフに示す。統計検定には Tukey-Kramer 検定による One-way ANOVA を用いた。\*\*\*\*  $p < 0.0001$ , ns: 有意差なし。エラーバーは s.e.m.を示す。

(c) Akaluc/AkaLumine 生物発光の *in vivo* モニタリングにおける適切な AkaLumine 濃度の検討。発光測定開始 24 時間前に Akaluc 系統 (*tubP-Gal4>UAS-Venus-Akaluc*) に各濃度の AkaLumine を経口投与し、24 時間連続測定を行った。グラフは各試験で 24 時間連続測定した発光の平均値を示す。各データセットの試行回数をグラフに示す。エラーバーは s.e.m.を示す。

(d) AkaLumine 餌の投与または中止後の生物発光の経時的变化。発光測定を Akaluc 発現系統に AkaLumine を投与してすぐに開始した (赤矢印)。測定開始から 48 時間後、ハエを低温麻酔下で AkaLumine を含まない通常の Fly food を入れたウェルに移し (青矢印)、さらに 24 時間生物発光測定を行った。各グラフの濃色の線は平均値を、薄色の線はエラーバー (s.e.m) を示す。各グラフの試行数は  $n = 6$ 。

(e) *tubP-Gal4>UAS-Venus-Akaluc* 系統に AkaLumine を投与した後の発光変化に個体レベルでの有意差は見られなかった。この図は、Fig. 2d の 1.0 mM の AkaLumine を投与した結果を、各個体ごとにグラフ化したものである。発光測定は Akaluc 発現ハエに AkaLumine を投与すると同時に開始し、本図は 48 時間までの各測定結果を示す。

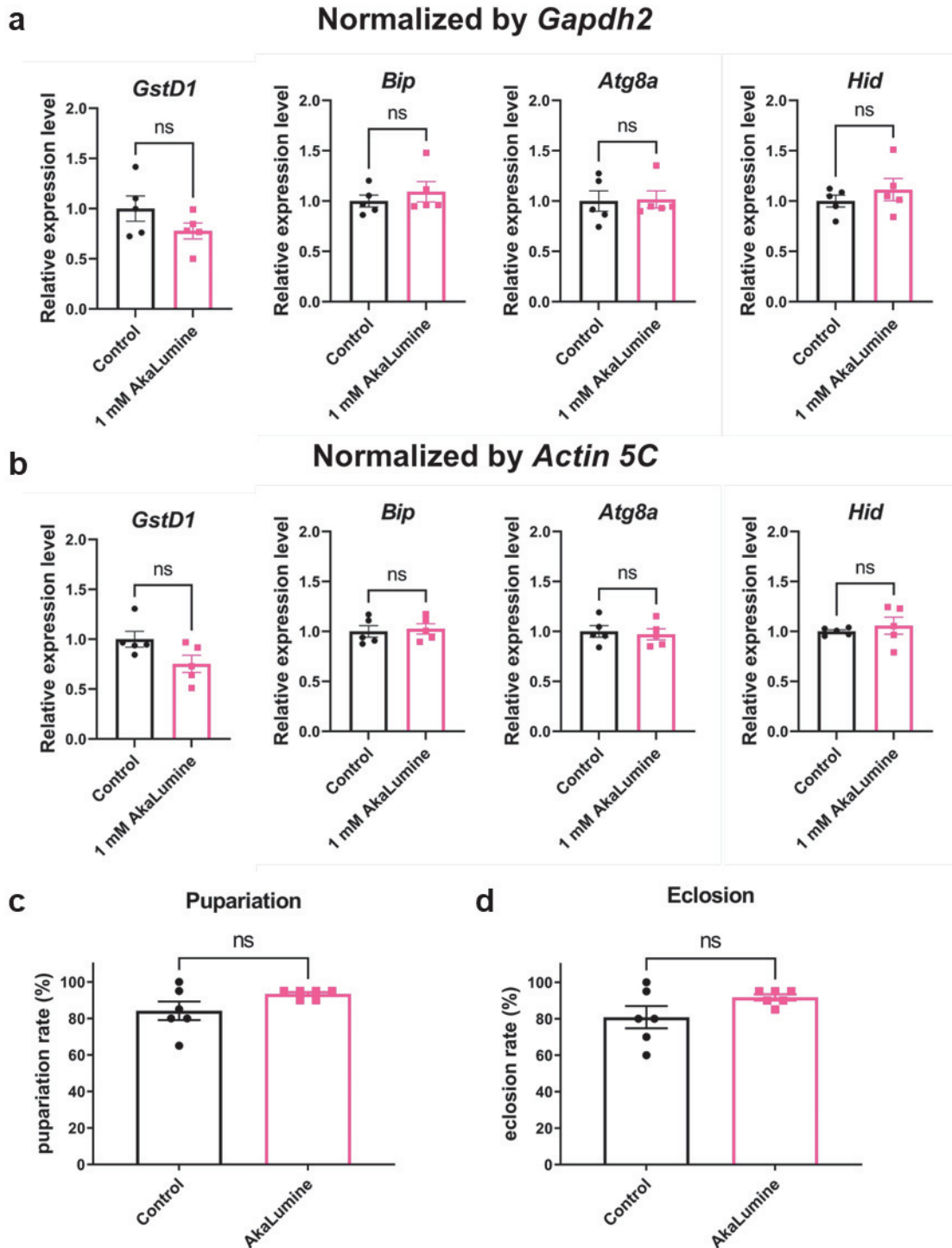


Fig. 3: AkaLumine 投与によるショウジョウバエのストレス応答と発生に対する影響

(a, b) AkaLumine をハエに短期経口投与しても、酸化ストレス、小胞体ストレス、飢餓ス



トレス、細胞死応答は誘導されなかった。AkaLumine (1.0mM) を含む Fly food を 24 時間与えた野生型系統 ( $w^{1118}$ ) の遺伝子発現を qPCR で測定した。コントロールの群には AkaLumine を含まない Fly food を与えた。各遺伝子の発現量は *gapdh2* (a) および *actin 5C* (b) をインターナルコントロール遺伝子として用いて正規化した。統計解析には unpaired t-test を用いた。エラーバーは s.e.m. を示す。

(c, d) AkaLumine の長期投与はハエの発生に影響を与えなかった。野生型系統 ( $w^{1118}$ ) を受精卵から成虫まで AkaLumine 添加または無添加の Fly food で飼育し、蛹化率 (c) および羽化率 (d) を調査した。統計解析には unpaired t-test を用いた。エラーバーは s.e.m. を示す。

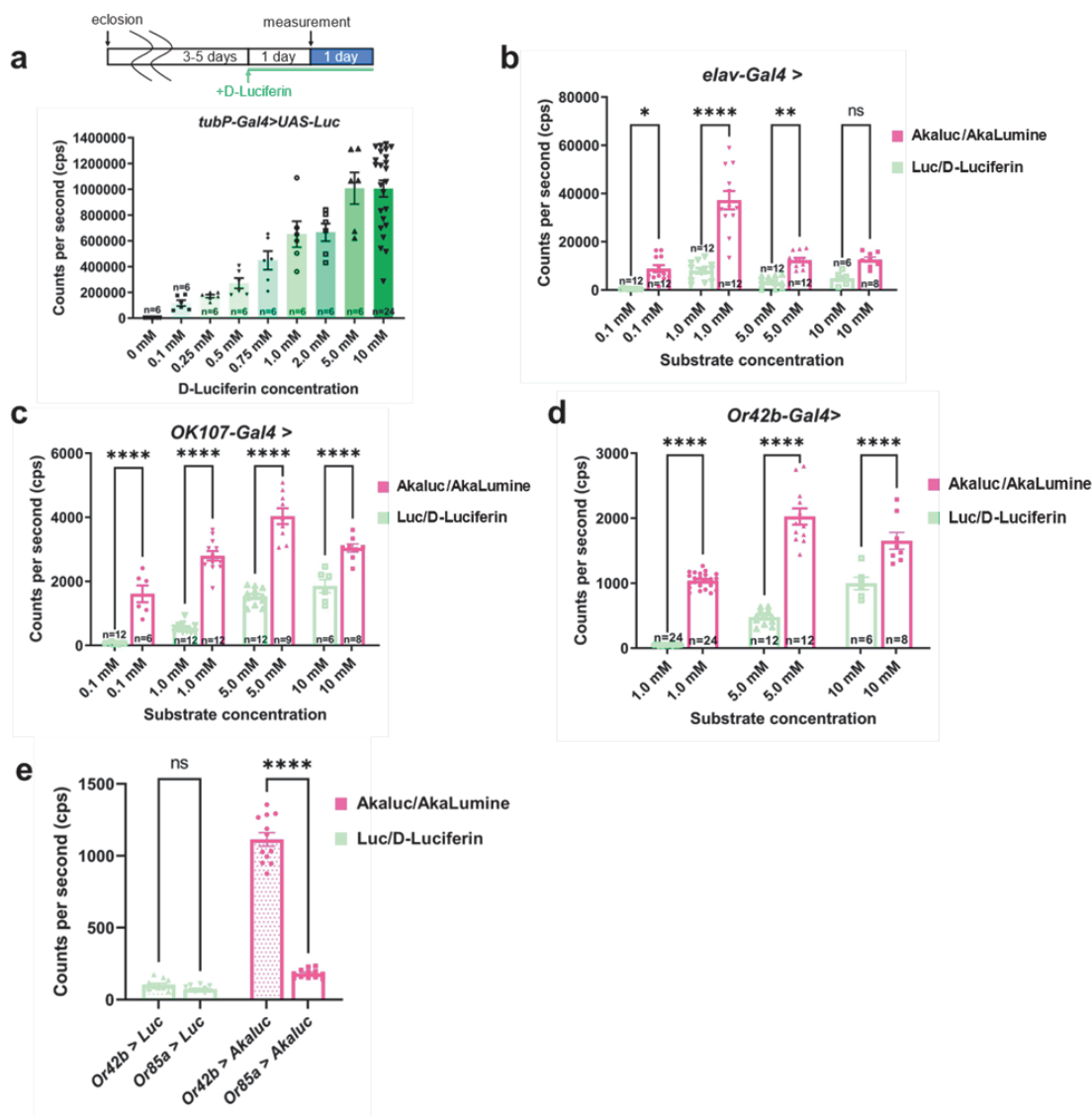


Fig. 4: 深部組織および細胞における Akaluc/AkaLumine および Luc/D-luciferin に

よって生成される生物発光シグナル

(a) Luc を全身に発現する系統 (*tubP-Gal4>UAS-Luc*) に、生物発光測定開始 24 時間前から各濃度の D-luciferin を経口投与した。Fig. 4 の全ての実験において、基質 (AkaLumine または D-luciferin) 投与と発光測定を同じ方法で行った。D-luciferin 投与が 0 mM の群には通常の Fly food を与えた。グラフは各試験で 24 時間連続測定した発光の平均値を示す。各データセットの試行回数をグラフに示す。エラーバーは s.e.m.を示す。

(b, c) 神経系で検出された Akaluc/AkaLumine の生物発光は、Luc/D-luciferin のシグナルよりも強かった。*elav-Gal4*(b: *elav-Gal4>UAS-Venus-Akaluc* および *elav-Gal4>UAS-Luc*) および *OK107-Gal4* (c: *OK107-Gal4>UAS-Venus-Akaluc* および *OK107-Gal4>UAS-Luc*) により Akaluc または Luc を発現させた系統に、それぞれ各濃度の AkaLumine または D-luciferin を投与した。統計解析には Tukey-Kramer 検定による One-way ANOVA を用いた。 $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $****p < 0.0001$ , ns: 有意差なし。各データセットの試行回数をグラフに示す。エラーバーは s.e.m.を示す。

(d) Or42b ORN で検出された Akaluc/AkaLumine の生物発光シグナルは、Luc/D-Luciferin のシグナルよりも高かった。*Or42b-Gal4* によって Akaluc または Luc を発現する系統 (*Or42b-Gal4>UAS-Venus-Akaluc* および *Or42b-Gal4>UAS-Luc*) に、それぞれ AkaLumine (1.0, 5.0, 10 mM) または D-luciferin (1.0, 5.0, 10 mM) を与えた。統計解析には Tukey-Kramer 検定による One-way ANOVA を用いた、 $****p < 0.0001$ 。各データセットの試行回数をグラフに示す。エラーバーは s.e.m.を示す。

(e) *Or42b-Gal4>UAS-Venus-Akaluc* 系統および *Or85a-Gal4>UAS-Venus-Akaluc* 系統に AkaLumine(1.0 mM)を投与し、発光量を比較した。また、*Or42b-Gal4>UAS-Luc* 系統および *Or85a-Gal4>UAS-Luc* 系統に D-luciferin (5.0 mM) を投与し、発光量を比較した。統計解析には Tukey-Kramer 検定による One-way ANOVA を用いた、 $****p < 0.0001$ , ns: 有意差なし, n = 12. エラーバーは s.e.m.を示す。

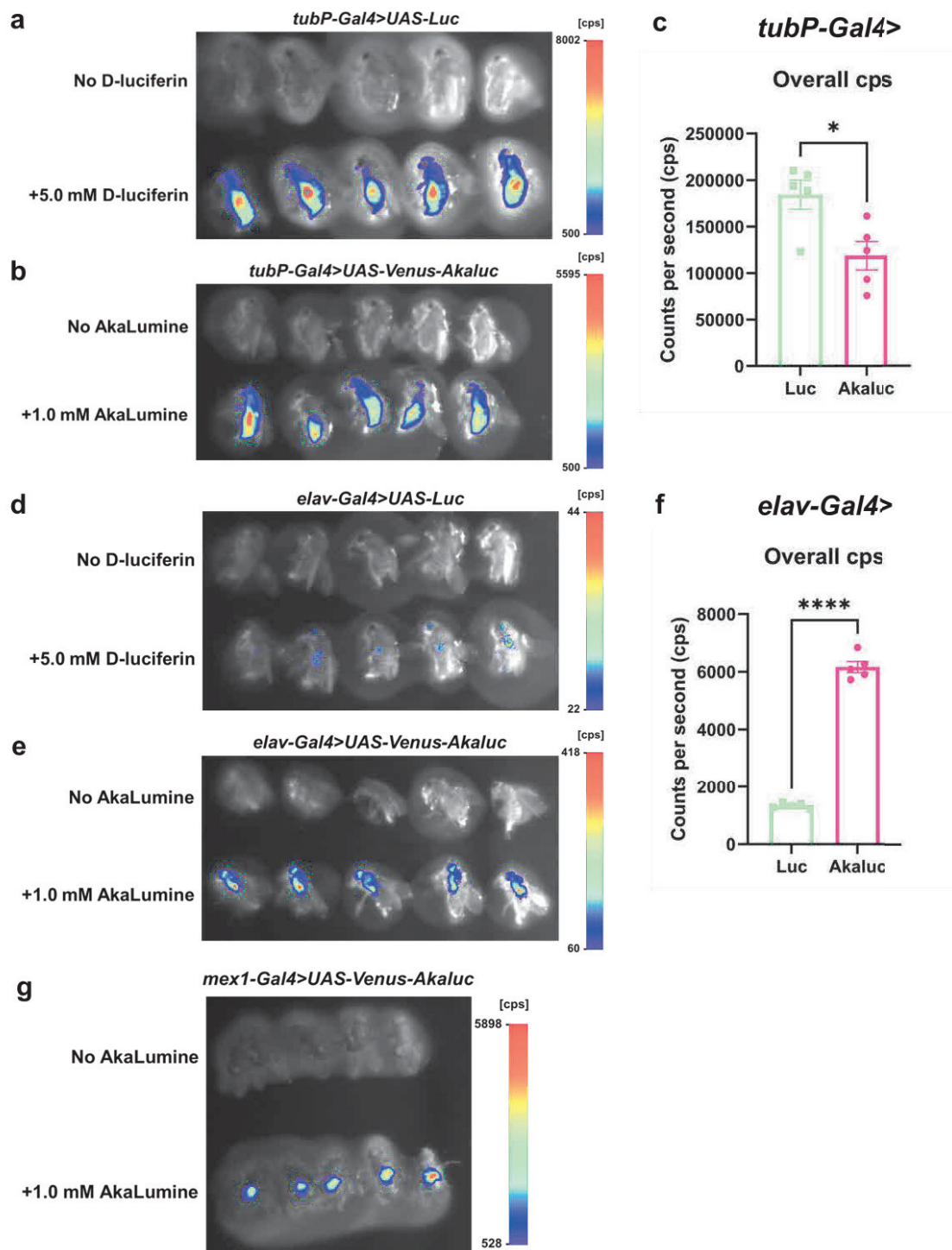


Fig. 5: ショウジョウバエでの Akaluc/AkaLumine を用いた生物発光イメージング

(a, b) *tubP-Gal4>UAS-Luc* (a) と *tubP-Gal4>UAS-Venus-Akaluc* (b) の系統それぞれの発



光イメージング。D-luciferin (5.0 mM) Luc 系統に、AkaLumine (1.0 mM) を Akaluc 系統にそれぞれ 24 時間投与してイメージングを行った (下段のハエ)。コントロール群には通常の Fly food を与えた (上段のハエ)。

(c) イメージング結果から、Luc/D-luciferin と Akaluc/AkaLumine の全体的な cps を比較した。統計解析には unpaired t-test を用いた。\* $p < 0.05$ 、 $n = 5$ 。エラーバーは s.e.m. を示す。

(d, e) *elav-Gal4>UAS-Luc* (d) および *elav-Gal4>UAS-Venus-Akaluc* (e) 系統それぞれの発光イメージング。D-luciferin (5.0 mM) Luc 系統に、AkaLumine (1.0 mM) を Akaluc 系統にそれぞれ 24 時間投与してイメージングを行った (下段のハエ)。コントロール群には通常の Fly food を与えた (上段のハエ)。

(f) イメージング結果から、Luc/D-luciferin と Akaluc/AkaLumine の全体的な cps を比較した。統計解析には unpaired t-test を用いた。\*\*\*\* $p < 0.0001$ 、 $n = 5$ 。エラーバーは s.e.m. を示す。

(g) 腸特異的に Akaluc を発現する系統 (*mex1-Gal4>UAS-Venus-Akaluc*) を用いて、Akaluc/AkaLumine 生物発光イメージングの空間分解能を調べた。発光から腸の形状は認識できず、腸のある腹部からのみシグナルを検出できることがわかった。AkaLumine 投与群には 1.0 mM AkaLumine を 24 時間投与し (下段のハエ)、コントロール群には通常の Fly food を与えて (上段のハエ)、発光イメージングを行った。

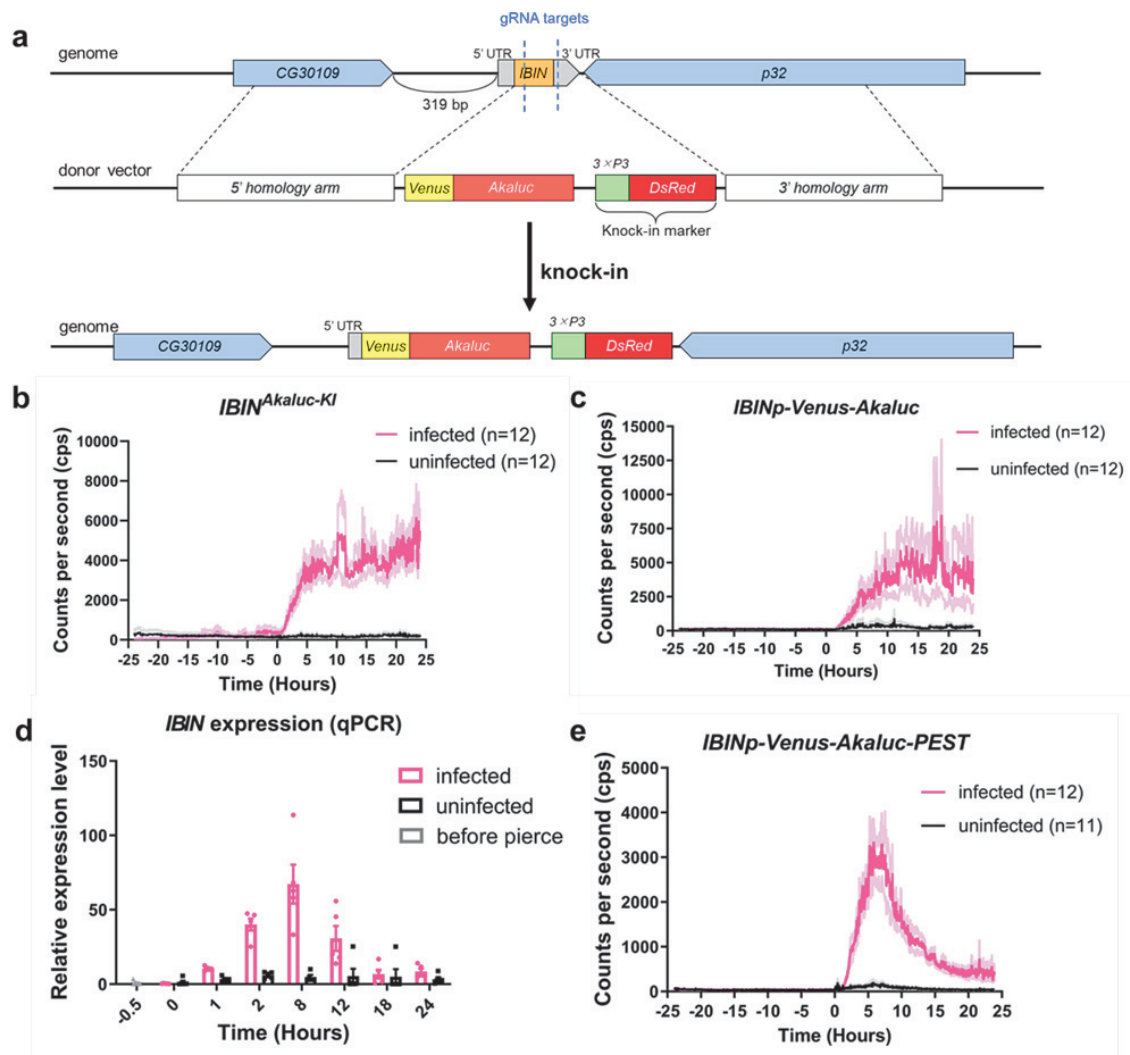


Fig. 6: Akaluc/AkaLumine を用いた自然免疫関連遺伝子 *IBIN* の経時的な遺伝子発現解析

(a) *IBIN<sup>Akaluc-KI</sup>* 系統作製の模式図。CRISPR/Cas9 システムを用いた相同組換えにより、*IBIN* のコード領域と 3' UTR を *Venus-Akaluc* 配列とノックインマーカーである *DsRed* に置換した。

(b, c, e) *IBIN<sup>Akaluc-KI</sup>* 系統 (b)、*IBINp-Venus-Akaluc* 系統 (c)、*IBINp-Venus-Akaluc-PEST* 系統 (e) をそれぞれ用いることで、細菌感染により誘導される *IBIN* 発現量の増加を経時的に観察することが可能。生物発光測定は、ハエに細菌を感染させる 24 時間前から開始した (-24 h)。大腸菌 (DH5 $\alpha$ ) をハエに感染させ (マゼンタのグラフ、0 h)、さらに 24 時間測定を行った。発光測定を開始する 24 時間前から AkaLumine (1.0 mM) をハエに投与し、測定中は常に AkaLumine を摂取可能な状態にした。濃色の線は平均値を、薄色の線はエラー

ーバー (s.e.m) を示す。試行回数はグラフに示す。

(d) qPCR を用いた *IBIN* 発現量の測定。0 h のポイントで、細菌感染群は DH5  $\alpha$  に感染させ (マゼンタ)、非感染群は細菌をつけていない針で刺した (黒)。-0.5 h のポイントでは、針を刺す前の無傷のハエを用いて Real-time PCR を行った (灰色)。n=5、エラーバーは s.e.m. を示す。

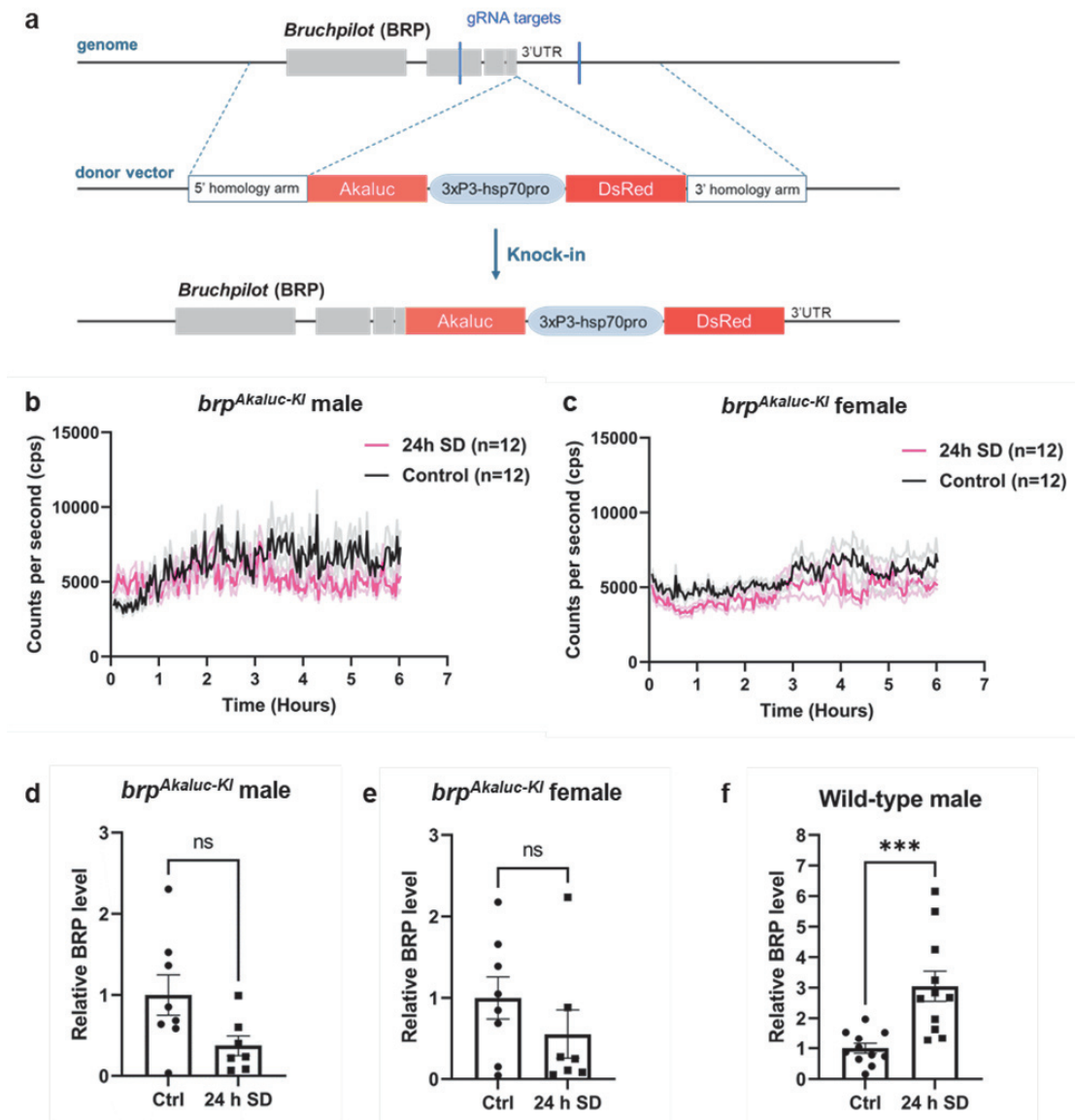


Fig. 7: *brp*<sup>Akaluc-KI</sup> 系統を用いた内在 Brp タンパク質レベルのモニタリング

(a) *brp*<sup>Akaluc-KI</sup> 系統作製の模式図。Akaluc は、CRISPR/Cas9 システムを用いた相同組換えにより、*Brp* コード領域の 3' 末端にインフレームで挿入された。Akaluc とともに、ノックインマーカーとして DsRed も導入した。

(b, c) *brp<sup>Akaluc-KI</sup>* 系統を用いた発光測定では、オス(b)、メス(c)ともに 24 時間の睡眠阻害による Brp シグナルの増加は見られなかった。*brp<sup>Akaluc-KI</sup>* 系統に AkaLumine (1.0mM) を投与し、ボルテックスミキサーを用いて 5 秒/分の頻度で振動させながら 24 時間の睡眠阻害を行った (24 h SD: マゼンタ)。コントロール群は睡眠阻害を行わなかった (Control: 黒)。発光測定は、AkaLumine (1.0 mM) をハエに投与して 6 時間連続的に行った。濃色の線は平均値を、薄色の線はエラーバー (s.e.m) を示す。

(d, e) *brp<sup>Akaluc-KI</sup>* 系統を用いたウェスタンブロッティングによる Brp タンパク質量の定量解析では、オス (d)、メス (e) ともに 24 時間睡眠不足による Brp レベルの増加は観察されなかった。発光測定実験と同様に、*brp<sup>Akaluc-KI</sup>* 系統を 24 時間睡眠阻害し、ウェスタンブロッティングを行った (24 h SD)。コントロール群は睡眠阻害を行わなかった (Ctrl)。統計解析には Unpaired t-test を用いた。ns: 有意差なし、n = 8 (Ctrl)、n = 7 (24 h SD)。エラーバーは s.e.m. を示す。

(f) 睡眠阻害による Brp レベルの増加は野生型系統を用いた場合には観察され、睡眠阻害の手法に問題がないことが示された。オスの野生型系統 (*w<sup>1118</sup>*) を 24 時間睡眠阻害した群 (24 h SD) と睡眠阻害しなかった群 (Ctrl) で、上記と同じ方法でウェスタンブロッティングにより比較した。統計解析には Unpaired t-test を用いた。\*\*\*p < 0.001、n = 11。エラーバーは s.e.m. を示す。

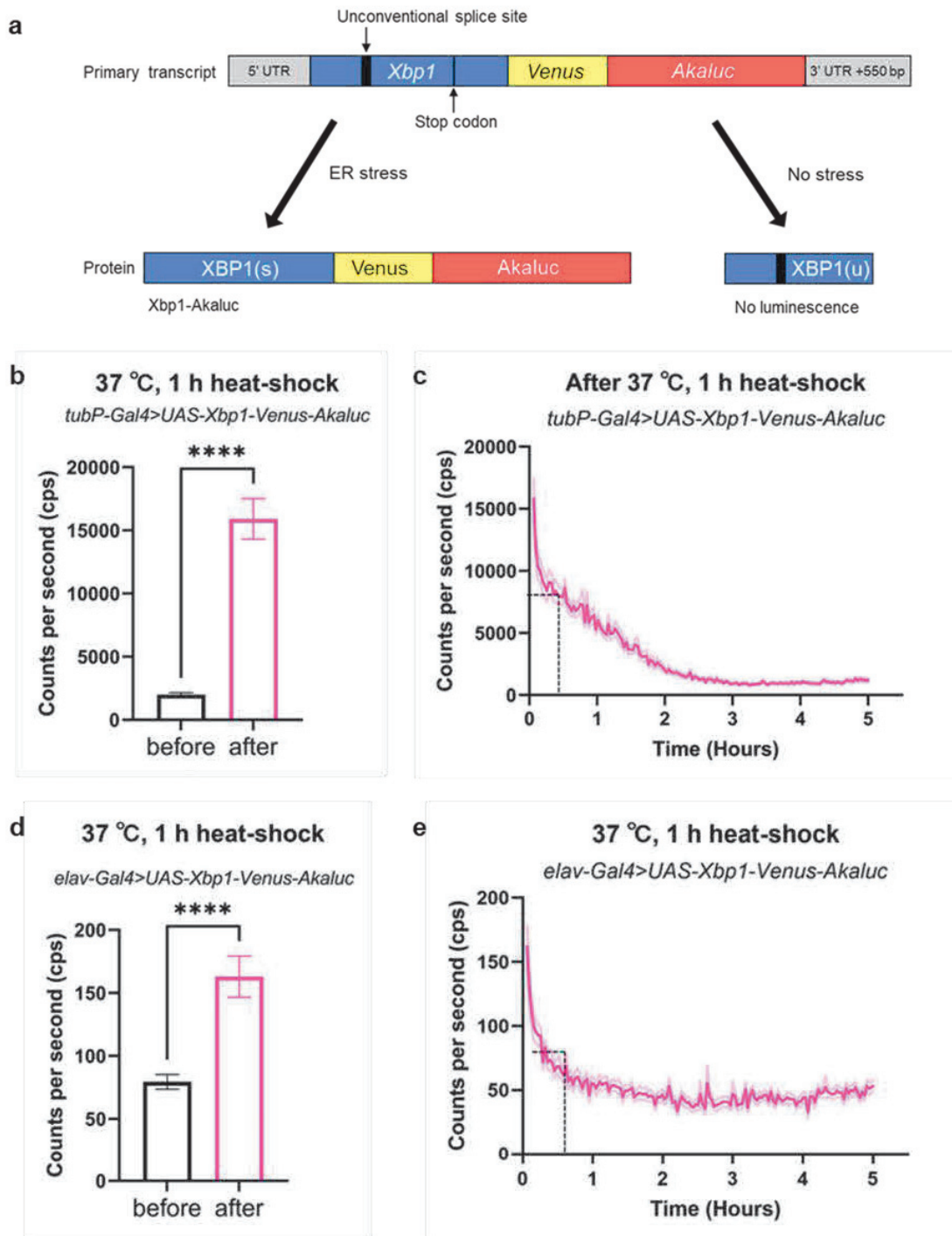


Fig. 8: *Xbp1-Akaluc*を用いたヒートショックによる小胞体ストレス変化の経時的なモニタリング

(a) *Xbp1*の非従来型スプライシングによる *Xbp1-Venus-Akaluc* 転写産物産生を表した概略図。ERストレス条件下では、非従来型スプライシングによりフレームシフトが誘導され、

停止コドンが失われる。その結果、Venus-Akaluc と融合した XBP1(s)が生成される (左)。通常条件下 (ストレスなし) では、*Xbp1* 転写産物の途中でストップコドンにより翻訳が終了する。従って、*Venus-Akaluc* を含む以下の配列は翻訳されない。これにより、転写因子としての活性を持たない XBP1(u)だけが生成される (右)。

(b-e)ヒートショックによる全身および神経系における活性化 XBP1 の発現変化を、*Xbp1-Akaluc* によってモニターすることができた。*tubP-Gal4>UAS-Xbp1-Venus-Akaluc* (b, c) および *elav-Gal4>UAS-Xbp1-Venus-Akaluc* (d, e) を 37°C で 1 時間のヒートショックにさらし、5 時間連続発光測定を行った。ハエにはヒートショック前に AkaLumine (1.0 mM) を 24 時間投与し、ヒートショックおよび発光測定中も投与を続けた。(b) と (d) におけるヒートショック前のハエ (before) とヒートショック後のハエ (after) は同じサンプルを使用して発光量の比較を行っている。(c) と (e) の点線は各シグナルの半減期 (約 20-30 分) を示す。

(c) と (e) の濃色の線は平均値を、薄色の線はエラーバー (s.e.m) を示す。統計解析には Unpaired t-test を用いた。\*\*\*\* $p < 0.0001$ ,  $n = 24$ 。

## VII.謝辞

本研究遂行にあたってプラスミドベクターやショウジョウバエ系統を提供していただいた RIKEN BRC DNA BANK、Bloomington Drosophila Stock Center、および NYU Grossman School of Medicine の Dr. Hyung Don Ryoo に多大な感謝を申し上げます。また、本研究に対して積極的な議論およびアドバイスをしていただいた広島大学大学院統合生命科学研究科の千原崇裕教授、水沼正樹教授、濱生こずえ准教授、奥村美紗子准教授にも多大な感謝を申し上げます。本研究を遂行する上で、技術的協力や建設的な議論をしていただいた広島大学大学院統合生命科学研究科細胞生物学研究室の皆様にも感謝を申し上げます。最後に、私をここまで育て上げ、様々な面で私の研究生活をサポート、応援してくださった私の両親に心より感謝申し上げます。

本研究は広島大学ゲノム編集先端人材育成プログラム、公益財団法人アステラス病態代謝研究会、公益財団法人内藤記念科学振興財団、公益財団法人武田科学振興財団、JSPS 科研費（JP21H02479, JP21K18236, JP20K15903, JP21J22346）の助成を受けたものである。



## VIII. 引用文献

1. Inouye, S. Firefly luciferase: an adenylate-forming enzyme for multicatalytic functions. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 387–404 (2010).
2. Contag, C. H. & Bachmann, M. H. Advances in in vivo bioluminescence imaging of gene expression. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **4**, 235–260 (2002).
3. Yoo, S.-H. et al. PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **101**, 5339–5346 (2004).
4. Kanno, S. et al. Luciferase assay system to monitor fibroblast growth factor signal disruption in human iPSCs. *STAR Protoc.* **3**, 101439 (2022).
5. Liu, S., Su, Y., Lin, M. Z. & Ronald, J. A. Brightening up biology: advances in luciferase systems for in vivo imaging. *ACS Chem. Biol.* **16**, 2707–2718 (2021).
6. Weissleder, R. & Ntziachristos, V. Shedding light onto live molecular targets. *Nat. Med.* **9**, 123–128 (2003).
7. Lee, K.-H. et al. Cell uptake and tissue distribution of radioiodine labelled D-luciferin: implications for luciferase based gene imaging. *Nucl. Med. Commun.* **24**, 1003–1009 (2003).
8. Iwano, S. et al. Single-cell bioluminescence imaging of deep tissue in freely moving animals. *Science (1979)* **359**, 935–939 (2018).
9. Iwano, S. et al. Development of simple firefly luciferin analogs emitting blue, green, red, and near-infrared biological window light. *Tetrahedron* **69**, 3847–3856 (2013).
10. Kuchimaru, T. et al. A luciferin analogue generating near-infrared bioluminescence achieves highly sensitive deep-tissue imaging. *Nat. Commun.* **7**, 11856 (2016).
11. Pende, M. et al. High-resolution ultramicroscopy of the developing and adult nervous system in optically cleared *Drosophila melanogaster*. *Nat. Commun.* **9**,



- 4731 (2018).
12. Sakuma, C. et al. The strip-hippo pathway regulates synaptic terminal formation by modulating actin organization at the drosophila neuromuscular synapses. *Cell Rep.* **16**, 2289–2297 (2016).
  13. Sone, M., Zeng, X., Larese, J. & Ryoo, H. D. A modified UPR stress sensing system reveals a novel tissue distribution of IRE1/XBP1 activity during normal *Drosophila* development. *Cell Stress Chaperones* **18**, 307–319 (2013).
  14. Landis, G., Shen, J. & Tower, J. Gene expression changes in response to aging compared to heat stress, oxidative stress and ionizing radiation in *Drosophila melanogaster*. *Aging* **4**, 768–789 (2012).
  15. Ham, H. et al. Unfolded protein response-regulated *Drosophila* Fic (dFic) protein reversibly AMPylates BiP chaperone during endoplasmic reticulum homeostasis. *J. Biol. Chem.* **289**, 36059–36069 (2014).
  16. Bali, A. & Shrivage, B. V. Characterization of the autophagy related gene-8a (Atg8a) promoter in *Drosophila melanogaster*. *Int. J. Dev. Biol.* **61**, 551–555 (2017).
  17. Bergmann, A., Agapite, J., McCall, K. & Steller, H. The *drosophila* gene *hid* is a direct molecular target of ras-dependent survival signaling. *Cell* **95**, 331–341 (1998).
  18. Heisenberg, M. Mushroom body memoir: from maps to models. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 266–275 (2003).
  19. Chihara, T. et al. Caspase inhibition in select olfactory neurons restores innate attraction behavior in aged *Drosophila*. *PLoS Genet.* **10**, e1004437 (2014).
  20. Valanne, S., Salminen, T. S., Järvelä-Stölting, M., Vesala, L. & Rämet, M. Immune-inducible non-coding RNA molecule lincRNA-IBIN connects immunity and metabolism in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Pathog.* **15**, PMC6345493 (2019).
  21. Rogers, S., Wells, R. & Rechsteiner, M. Amino acid sequences common to rapidly

- degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* (1979) **234**, 364–368 (1986).
22. Rechsteiner, M. & Rogers, S. W. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 267–271 (1996).
  23. Leclerc, M. et al. Development of a destabilized firefly luciferase enzyme for measurement of gene expression. *Biotechniques* **29**, 590–601 (2018).
  24. Wagh, D. A. et al. Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in *Drosophila*. *Neuron* **49**, 833–844 (2006).
  25. Gilestro, G. F., Tononi, G. & Cirelli, C. Widespread changes in synaptic markers as a function of sleep and wakefulness in *Drosophila*. *Science* (1979) **324**, 109–112 (2009).
  26. Park, S. M., Kang, T. II & So, J. S. Roles of XBP1s in transcriptional regulation of target genes. *Biomedicines* **9**, 791 (2021).
  27. Ryoo, H. D., Domingos, P. M., Kang, M. J. & Steller, H. Unfolded protein response in a *Drosophila* model for retinal degeneration. *EMBO J.* **26**, 242–252 (2007).
  28. Chen, M. Z. et al. A thiol probe for measuring unfolded protein load and proteostasis in cells. *Nat. Commun.* **8**, 474 (2017).
  29. Park, S. et al. Modulation of protein synthesis by eIF2 $\alpha$  phosphorylation protects cell from heat stress-mediated apoptosis. *Cells* **7**, 254 (2018).
  30. Ribeiro, C. & Esteves Da Silva, J. C. G. Kinetics of inhibition of firefly luciferase by oxyluciferin and dehydroluciferyl-adenylate. *Photochem. Photobiol. Sci.* **7**, 1085–1090 (2008).
  31. Lee, J. et al. P38 MAPK-mediated regulation of Xbp1s is crucial for glucose homeostasis. *Nat. Med.* **17**, 1251–1260 (2011).
  32. Sun, H. et al. Inhibition of XBP1s ubiquitination enhances its protein stability and improves glucose homeostasis. *Metabolism* **105**, 154046 (2020).

33. Bozec, D. et al. Akaluc bioluminescence offers superior sensitivity to track in vivo glioma expansion. *Neurooncol. Adv.* **2**, vdaa134 (2020).
34. Amadeo, F. et al. Firefly luciferase offers superior performance to AkaLuc for tracking the fate of administered cell therapies. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **49**, 796–808 (2022).
35. Nakayama, J. et al. High sensitivity in vivo imaging of cancer metastasis using a near-infrared luciferin analogue seMpai. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–8 (2020).
36. Deshpande, S. A. et al. Acidic food pH increases palatability and consumption and extends *Drosophila* lifespan. *J. Nutr.* **145**, 2789–2796 (2015).
37. Hall, M. P. et al. Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. *ACS Chem. Biol.* **7**, 1848–1857 (2012).
38. Shakhmin, A. et al. Coelenterazine analogues emit red-shifted bioluminescence with NanoLuc. *Org. Biomol. Chem.* **15**, 8559–8567 (2017).
39. Su, Y. et al. An optimized bioluminescent substrate for non-invasive imaging in the brain. *Nat. Chem. Biol.* **19**, 731–739 (2023).
40. Gaspar, N. et al. Evaluation of NanoLuc substrates for bioluminescence imaging of transferred cells in mice. *J. Photochem. Photobiol. B* **216**, 112128 (2021).