

平成30年 5月29日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14016

研究課題名(和文)単一生細胞内の酵素分子数を絶対定量する革新的光分析法の開発

研究課題名(英文)Development of an innovative optical method for absolute quantification of the number of enzyme molecules in single living cells

研究代表者

小澤 岳昌(Ozawa, Takeaki)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・教授

研究者番号：40302806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：特定の一細胞内酵素活性を絶対定量する技術開発を目的として、培養細胞内で遺伝子発現する発光タンパク質(ルシフェラーゼ)に焦点をあて、刺激を加えた時のルシフェラーゼの絶対定量法の確立を目指した。まず、細胞内ミトコンドリアに局在するBakタンパク質に蛍光タンパク質(mEos3)を連結し、細胞外刺激に伴うBakクラスター形成を確認した。このクラスターに含まれるBak分子数を、mEos3の超解像蛍光イメージング技術を改良することにより計測可能にした。本計測は固定細胞のみならず、生細胞でも可能であることを立証した。mEos3の分子数から、ルシフェラーゼ1分子の活性を評価することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：We aimed at developing an optical method to absolutely quantify enzymatic activities in living cell. For this purpose, we first focused on a bioluminescent protein, luciferase. First, fluorescent protein (mEos3) was ligated to the Bak protein localized in the intracellular mitochondria. We confirmed formation of Bak cluster due to extracellular stimulation. We have made it possible to measure the number of Bak proteins contained in single cluster by improving the super resolution fluorescence imaging technique with mEos3. It was proved that this measurement is possible not only in fixed cells but also in living cells. By counting the number of mEos3, it will be possible to evaluate the activity of single luciferase in living cells.

研究分野：分析化学

キーワード：イメージング 蛍光

### 1. 研究開始当初の背景

生体組織や臓器に代表される多細胞生物は、細胞同士のコミュニケーションが細胞内シグナルを惹起し、細胞固有の機能を発揮する。培養細胞を用いた研究では、特定のリガンドを細胞外に添加し、細胞内シグナル変動を経時的に解析することで、1細胞の機能理解を深化させてきた。しかし、不均一（ヘテロ）な細胞集団から構成される生体組織や臓器は、細胞間の情報伝達が時空間的に多様な様式でコントロールされているため、隣り合う1細胞レベルでその生理機能を解析する必要がある。細胞内シグナルの担い手の代表はキナーゼなどの酵素であるが、組織はおろか培養細胞でさえも、生きた状態でその酵素分子数を絶対定量する技術は存在せず、新たな定量分析技術が熱望されている。

### 2. 研究の目的

ヘテロな細胞集団から構成される特定の一細胞内酵素活性を絶対定量する革新的な技術開発を目的とする。本研究期間では、その基盤技術の確立を目的として培養細胞内で遺伝子発現する発光タンパク質（ルシフェラーゼ）に焦点をあて、刺激を加えた時のルシフェラーゼの絶対定量法を確立する。

### 3. 研究の方法

光照射によりルシフェラーゼ発光反応が初めておこる光活性化型ルシフェラーゼ（Photoactivatable Luciferase: PA-Luc）を開発する。PA-Lucを大腸菌発現系により大量培養し、精製したPA-Lucのキャラクタリゼーションを行う。PA-Lucと蛍光タンパク質を連結し、蛍光タンパク質の分子数計測からPA-Lucの細胞内量を評価する。次に細胞にPA-Lucを発現させ、光依存的にPA-Lucが活性化することを検証する。最終的には、細胞に発現しているルシフェラーゼの分子数を計測するために、PA-Lucを定量的に光で活性化し、その時の発光値を蛍光イメージングによりモニターする。得られた発光画像を定量解析して、PA-Lucの活性化分子数と発光量の相関から、内在するルシフェラーゼの絶対分子数が求められることを実証する。

### 4. 研究成果

外部光によりルシフェラーゼ活性を制御する技術は、すでに当研究室において、ホタル由来のルシフェラーゼを用いて開発済みである。この技術からPA-Lucを開発することは容易である。最もボトルネックとなる技術開発は、細胞内の蛍光分子数計測である。この計測を実現するため、はじめに、蛍光標識された特定タンパク質を全反射蛍光顕微鏡により輝点観測するための顕微鏡システムの立ち上げ、位置精度の検証、ならびに輝点の実計測を行った。具体的には、全反射蛍光顕微鏡のステージを超解像顕微鏡仕様に改良した。またEM-CCDカメラにより取得さ

れる蛍光画像から高速に輝点を同定し、画像処理を行うプログラムを作成した。

蛍光分子標識する特定タンパク質は、Bakタンパク質とした。Bakタンパク質にmEos3を連結したプローブをBak欠損細胞に発現させ、細胞固定後にmEos3の分子数を計測することとした。Bakの生理的機能がmEos3標識によって阻害されないことを、活性型Bak特異的抗体を用いた免疫染色法で確認した（図1）。

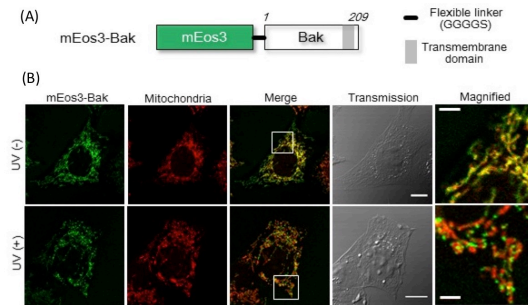


図1. (A) 作成したコンストラクト。(B) mEos3-Bakを発現した細胞のUV刺激による局在変化。

次に、プローブ発現細胞にアポトーシス刺激として紫外線を照射し、一定時間後に細胞をパラホルムアルデヒドで固定し、細胞内に局在するmEos3の蛍光輝点を観察した。コントロールとして、紫外線非照射の細胞も同様の条件で固定化を行い、蛍光観察を行った。その結果、いずれの細胞においてもミトコンドリア上に局在するBak凝集体の蛍光画像が得られた（図2）。また、mEos3の単一の蛍光輝点から中心位置の算出を行い、超解像画像の作成を行った。平行して輝点数をカウントすることにより、観察領域に存在するBak分子数を計測した。約300個の凝集体のサイズ評価を行ったところ、直径が100-1000nm、一凝集体あたりのBak分子数が50-1700存在することがわかった（図3）。以上より、固定細胞において、mEos3を用いた蛍光輝点の分子数計測技術を開発することに成功した。

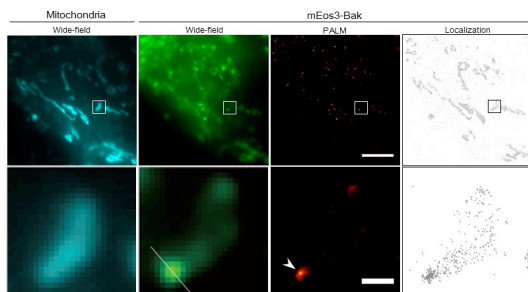
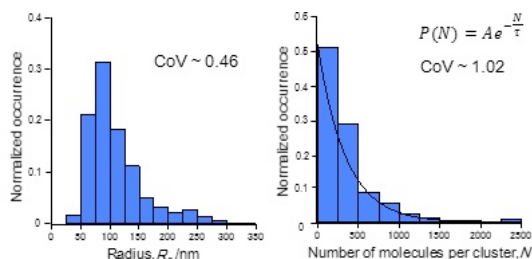


図2. ミトコンドリア膜上のBak凝集体の蛍光イメージング画像。一番右側のカラムは、蛍光輝点の空間分布を点で示している。この輝点数が、蛍光タンパク質の分子数に相当する。

図3. ミトコンドリア膜上の Bak クラスターの size distribution (左) と, 1 クラスターあたりの Bak 分子数 (右).



次に, 生きた細胞内の mEos3 の分子数をカウントするために, 独自に開発した全反射蛍光顕微鏡システムを更に改良して, 細胞内オルガネラ膜上に局在させた mEos3 の分子計測技術を開発した. ミトコンドリア膜上タンパク質の一つである Bak に mEos3 を連結し, 内在性 Bak をノックアウトした MEF 細胞を, 前記細胞作成と同様に作成した. この細胞をステージインキュベータの存在下, 顕微鏡下で微弱な緑色光を細胞に連続照射し, mEos3 の光変換を誘導しつつ, 全反射蛍光顕微鏡により mEos3 輝点の高速イメージングを行った. 結果, mEos3 が完全に褪色するまでの時間, 輝点の数から mEos3 の分子数が計測できることを明らかにした. 次に mEos3 をアクチンに連結した遺伝子を作成し, 細胞に発現させた. 生きた培養細胞を用いて上記と同様の 1 分子イメージングを行ったところ, アクチンの超解像イメージング画像が取得できるとともに, mEos3 の分子数をカウントできることがわかった. さらに, ルシフェラーゼと mEos3-アクチンを P2A ペプチドで連結した遺伝子を作成した. この遺伝子からタンパク質を発現すると, P2A ペプチドで自己切断されるため, ルシフェラーゼと mEos3-アクチンタンパク質は 1 : 1 の化学量論比で細胞内に発現する. 現在, ルシフェラーゼの発光量と mEos3 との相関情報を取得しており, mEos3 の分子数からルシフェラーゼの絶対量を計測すれば, 1 分子のルシフェラーゼの酵素活性が評価可能となる予定である.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① In Situ Characterization of Bak Clusters Responsible for Cell Death Using Single Molecule Localization Microscopy. Y. Nasu, A. Benke, S. Arakawa, G. J. Yoshida, G. Kawamura, S. Manley, S. Shimizu, and T. Ozawa, *Sci. Rep.*, **6**, 27505 (2016). 査読有  
doi: 10.1038/srep27505

[学会発表] (計 11 件)

- ① Development of the methods for imaging and optical control of biomolecules based on protein chemistry. T. Ozawa, The 98<sup>th</sup> CSJ Annual Meeting (Nihon University, Funabashi, Chiba), March 22 (2018).
- ② Opto-bioanalysis: Imaging and controlling protein activities in living cells. T. Ozawa, 3<sup>rd</sup> STEPS Symposium (Moscow, Russia), March 11 (2018).
- ③ 光で操作し観察する新たな細胞解析技術-OPTO-BIOANALYSIS-. 小澤岳昌, 第 2 回 Molecular Devices Seminar (浅草橋, 東京), 11 月 8 日 (2017).
- ④ Luminescent sensors and optical switches for single cell analysis. T. Ozawa, Asia and Oceania Conference of Photobiology (Seoul, Korea), November 15 (2017).
- ⑤ Luminescent Sensors and Imaging Technologies for Drug Discovery. T. Ozawa, PITCON2017 (Chicago, Conference Center), March 7 (2017).
- ⑥ Opto-bioanalysis of receptor activation and signaling using genetically-encoded probes. T. Ozawa, Innovation Mixers (London, Imperial College London), January 25 (2017).
- ⑦ Protein-based luminescent sensors for single cell analysis, T. Ozawa, Asianalysis XIII Chiang-Mai (Thailand), December 10 (2016).
- ⑧ Opto-bioanalysis of receptor activation and signaling using genetically-encoded probes, T. Ozawa, Japan-Taiwan Medical Spectroscopy International Symposium (JTMSIS), Awaji-Yumebutai International Conference Center (Awaji, Hyogo), December 12 (2016).
- ⑨ Luminescent sensors and optical switches for single cell analysis, T. Ozawa, Third Biennial FB3 Conference, Tianjin University (Tianjin, China), July 9 (2016).
- ⑩ 「生体分子の可視化と光操作法から展望する未来の光分析技術」小澤岳昌, 第 76 回分析化学討論会 (岐阜薬科大学, 岐阜市・岐阜), 5 月 29 日 (2016).
- ⑪ 「生体分子を観る・操作する光分析科学」小澤岳昌, 分子研シンポジウム (岡崎コンファレンスセンター, 岡崎市・愛知), 5 月 27 日 (2016).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.chem.s.u-tokyo.ac.jp/users/analyt/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小澤 岳昌 (OZAWA, Takeaki)  
東京大学・大学院理学系研究科・教授  
研究者番号：40302806

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

吉村 英哲 (YOSHIMURA, Hideaki)  
東京大学・大学院理学系研究科・助教  
研究者番号：90464205

### (4) 研究協力者

なし