

機関番号：12601

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2008～2010

課題番号：20685012

研究課題名（和文） 分解制御プローブの創案と展開

研究課題名（英文） Development of degradable probes

研究代表者

佐藤 守俊 (MORITOSHI SATO)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号：00323501

研究成果の概要（和文）：

分子イメージングにおいては、特定の生体イオンや生体分子を捕まえて光を発生する、いわゆるプローブと呼ばれる新しい分子の開発が必要となる。本研究では、様々な生命機能や疾患において極めて重要な分子過程であるタンパク質のリン酸化について、その生体内 (*in vivo*) での動態を可視化計測する新しい原理のプローブ（“分解制御型プローブ”と名付ける）の開発研究を行った。

研究成果の概要（英文）：

Molecular imaging could be the most powerful technique for observing spatial and temporal dynamics of molecular processes in living cells and organisms, if probes for the relevant molecular processes become available. In the present study, we have developed degradable probes based on a new principle that allows imaging protein phosphorylation in living organisms.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
2009年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2010年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
年度			
年度			
総計	19,700,000	5,910,000	25,610,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：プローブ、可視化、キナーゼ、ユビキチン、タンパク質分解

1. 研究開始当初の背景

細胞の中の生体分子の挙動を可視化する分子イメージング研究においては、興味ある生体分子もしくは生体イオンを捕まえて光を発生する、いわゆるプローブ (probe) と呼ばれる機能性分子の開発が必須である。例えば、カルシウムイオンの動態を可視化する Fura-2 は 1985 年に米国の Tsien 博士により開発された合成有機蛍光プローブである。Fura-2 は、カルシウム濃度振動やカルシウム波など、それまで未知であったカルシウムイオンの細胞内動態を見事に可視化し、我々の

生命に対する理解を一変させた。それと同時に、数十万個ないしは数百万個の細胞をすりつぶして生体イオンや脂質、タンパク質などの構成成分を抽出し、それを電気泳動、あるいはラジオアイソトープを用いた方法等で分析する、いわゆる従来の破壊分析法だけでは“生命”を理解できない、ということを実感させた。我々は近年、タンパク質のリン酸化や生体脂質、生体小分子など生命機能と疾患の理解に重要な細胞内の分子過程を可視化する蛍光プローブを数多く開発し、それらが生きた細胞内の分子イメージングの強力

なツールになることを実証してきた。さらに、開発した蛍光プローブを駆使して、既存の研究手法では知り得なかった細胞内分子過程の時空間動態を次々と明らかにしてきた。

蛍光プローブに基づく分子イメージングは、単一細胞のような透明なサンプルにおいて飛躍的な発展を遂げているが、上述の蛍光プローブをマウスなど透明でない動物での分子イメージングに用いることは困難である。さらに蛍光プローブでは、サブマイクロメートルの空間分解能で可視化するのがせいぜいで、電子顕微鏡で達成されるようなナノメートル分解能で細胞内の微小局所における分子過程を可視化することも不可能である。前者は生体組織による励起光の透過不良や自家蛍光等が原因であり、後者は光の回折限界が原因である。しかし、この蛍光プローブでは困難な生体深部ならびに細胞内の微小ナノ局所における分子過程の可視化計測は、いずれも極めて魅力ある新しい研究開発領域であり、これを実現する新しいアイデアが必要である

2. 研究の目的

本申請研究では、従来には全く新しい原理の分子プローブ（“分解制御型プローブ”と呼ぶ）を開発し、生体内（*in vivo*）ならびに細胞内の微小ナノ局所におけるタンパク質のリン酸化の可視化計測を共に実現することを目的とする。

タンパク質のセリン・スレオニン・チロシン残基のリン酸化は、細胞内シグナル伝達のON/OFF調節に関わる最も主要な分子過程である。我々ヒトは約500種類のタンパク質リン酸化酵素（キナーゼ）を有することが明らかになっている。これらキナーゼはそれぞれの基質となるタンパク質のリン酸化を介して多様な生命機能の調節を担うと共に、リン酸化に基づくシグナル伝達の破綻は、ガンをはじめとする多くの疾患の原因にもなっている。もし生体でのタンパク質リン酸化の可視化計測が可能になれば、受精卵・胚の形成時はもちろんのこと、マウスなど哺乳類動物が生まれて死を迎えるまで、生体のどこで・いつ・どの程度、特定のキナーゼによるタンパク質リン酸化が生起しているのか、その時空間動態を明らかにすることができる。また、キナーゼが関与する数多くの疾患について、その治癒を目的として設計・合成された薬物候補物質の有効性や安全性を生体（マウスなど動物個体）で迅速に評価することが可能になる。従って、本研究で開発する分子プローブは、生命機能や疾患の分子基盤の解明を目的とする基礎生命科学・医学研究と共に創薬研究にも大いに役立てることが出来る。またタンパク質リン酸化は、生体物質の細胞外への放出や細胞内での輸送を担う膜ベシクル、

リピッドラフトと呼ばれる脂質とタンパク質からなる生体膜上のドメイン構造、タイトジャンクションと呼ばれる細胞間の密着結合構造、神経細胞の連結部分であるシナプス、染色体のヌクレオソーム構造など、細胞内の数十ナノメートル程度の微小構造において多様な細胞機能の調節に関わっている。このような細胞内の微小ナノ局所で生起するタンパク質のリン酸化を、ナノメートル分解能で可視化できるようになれば、その基礎生命科学ならびに医学研究におけるインパクトは計り知れない。

本申請の分解制御型プローブのアプローチは、いかなるキナーゼにも適用できる高い一般性を有している。本研究では特に、細胞死（アポトーシス）や糖代謝など重要な細胞機能を制御すると共に、様々なガンおよび糖尿病に深く関与するキナーゼ（Akt）によるタンパク質リン酸化を可視化する分解制御型プローブを設計・開発し、生体ならびに細胞内の微小ナノ局所における当該キナーゼのタンパク質リン酸化の可視化計測を行う。

3. 研究の方法

ユビキチンと呼ばれる76個のアミノ酸のタンパク質が、細胞内でのタンパク質の分解制御において重要な役割を果たしている（2004年ノーベル化学賞）。ユビキチン連結酵素（ユビキチンリガーゼ）がその基質となるタンパク質を認識してユビキチンを連結すると、タンパク質分解酵素複合体（プロテアソーム）が速やかにこれを分解する。しかしユビキチンリガーゼに認識されなければ、タンパク質は分解されず細胞内で生き延びることになる。もし、非リン酸化時にはユビキチンリガーゼに認識され、リン酸化時には同酵素に認識されなくなる新しい分子（タンパク質）を開発できれば、その分子の存在量を指標として細胞内で生起するタンパク質リン酸化を計測できるのではと考え、本研究の分子プローブを開発する。

分解制御型プローブの原理 本プローブはユビキチンリガーゼが認識するアミノ酸配列（分解シグナル配列）(1)、キナーゼがリン酸化する基質配列(2)、リン酸化認識ドメイン(3)、レポータードメイン(4)からなる融合タンパク質として開発する。プローブの基質配列がリン酸化されていない時、露出した分解シグナル配列がユビキチンリガーゼに認識され、プローブに多数のユビキチン(Ub)が連結される。ユビキチン化されたプローブはプロテアソームに速やかに分解され、結果として細胞内のプローブ濃度は低く保たれるので、レポータードメインからの物理的信号も低く保たれる。一方、細胞内でキナーゼが活性化し、プローブの基質配列がリン酸化されると、リン酸化認識ドメインが

基質配列と結合する。この時、リン酸化認識ドメインとレポータードメインが立体障害となり、分解シグナル配列にユビキチンリガーゼがアクセスできなくなる。このためリン酸化されたプローブはユビキチン化とプロテアソームによる分解を免れる。従ってプローブ濃度は減少せず、レポータードメインからの強い物理的信号が観察されることになるので、これを指標としてキナーゼの活性化に基づくタンパク質リン酸化を可視化計測する。

分解制御型プローブの設計 プローブに導入する基質配列は、プローブのキナーゼ選択性を決める部位である。このアミノ酸配列を変更することにより、様々なキナーゼによるタンパク質リン酸化をそれぞれ特異的に可視化するプローブを開発できる。本研究ではまず、受容体型チロシンキナーゼであるインスリン受容体 (IR) によるタンパク質リン酸化を可視化するために、アミノ酸配列 **ETGTEEYMKMDLG** (下線はリン酸化されるチロシン) を基質配列として用いた。さらに、細胞死や糖代謝を制御するセリン・スレオニンキナーゼであるAktによるタンパク質リン酸化の可視化を目的として、アミノ酸配列 **RKRDRGLTGI** (下線はリン酸化されるスレオニン) を基質配列として用いた。前者の場合、リン酸化認識ドメインとしては、リン酸化チロシンを含むアミノ酸配列の結合ドメインであるSrc homology 2 (SH2) ドメインを用い、後者の場合、リン酸化スレオニンを含むアミノ酸配列に結合する forkhead associated domainを用いた。

分解制御を原理とする本プローブは、計測の目的に応じてタンパク質もしくはペプチド性の様々なレポーターを活用できる特長を有する。本研究では、マウス生体でのタンパク質リン酸化の可視化を目的とするため、自家蛍光の問題がない生物発光タンパク質 (Luciferase) をレポーターとして用いることとした。

タンパク質分解シグナル配列については、対応するユビキチンリガーゼが強いユビキチン連結活性を持ち、かつそれが幅広い組織分布を有する (ubiquitous である) こと等を選定条件として、アルギニンタンパク質のアミノ末端のアミノ酸とする N 末端則配列を用いる。

4. 研究成果

分解制御型プローブのキャラクタリゼーション プローブ (IR-Lucus) をコードする cDNA を遺伝子工学的的手法に基づいて作製し、培養細胞に導入・発現させた。まず、リン酸化を受けていないプローブが細胞でポリユビキチン化され、プロテアソームにより加水分解を受けていることをウェスタンブロッ

ティングで確認した。続いて、プローブを発現する培養細胞をインスリンで刺激した。この細胞を可溶化し、抗-リン酸化チロシン抗体でウェスタンブロッティングを行うことにより、インスリン依存的に活性化したIRによりプローブの基質配列のチロシン残基がリン酸化を受けることを確認した。また、このIRによるチロシン残基のリン酸化の結果、プローブのポリユビキチン化が抑制されることをウェスタンブロッティングで示した。

次にプローブの生物発光の検討を行った。プローブを発現する培養細胞をインスリンで刺激し、プローブのルシフェラーゼドメインの基質であるルシフェリンを加えてルミノメーターで測定したところ、インスリン濃度に依存して、生物発光が上昇していることを示した。ネガティブコントロールとして、プローブの基質配列のチロシン残基をアラニンに改変した IR-Lucus-Ala を作製し、これを発現する培養細胞をインスリン刺激したところ、IR-Lucus の場合に見られた生物発光の上昇は見られなかった。以上の基礎的検討より、本研究での分解制御型プローブは、リン酸化依存的にユビキチン-プロテアソーム経路から逃れ、リン酸化依存的に生物発光を生起することが分かった。

マウス生体でのタンパク質リン酸化の可視化計測 マウス生体内でプローブの検討を行った。プローブを発現する培養細胞 (5×10^6 個) をマウス右背面皮下に導入して一晩放置した後、インスリンを当該マウスの腹腔に導入した。イメージングの直前にルシフェリンを当該マウスの腹腔に注射して、超高感度カメラを設置した暗箱でプローブからの生物発光を可視化計測した。その結果、インスリン依存的にプローブからの生物発光シグナルが観察された。一方、ネガティブコントロールの IR-Lucus-Ala を発現する培養細胞 (5×10^6 個) をマウス左背面皮下に導入、インスリン刺激を加えても、生物発光は増加しなかった。この結果は、本研究での分解制御型プローブが、マウス生体でのタンパク質リン酸化の可視化計測に利用できることを示している。

分解制御型プローブのキナーゼ選択性 分解制御型プローブがどのキナーゼによるタンパク質リン酸化を検出するのか、そのキナーゼ選択性は、プローブに導入する基質アミノ酸配列が決めている。上述のように、セリン・スレオニンキナーゼであるAktによるタンパク質リン酸化の可視化を目的として、プローブに Akt の基質アミノ酸配列を導入して Akt-Lucus を設計した。本研究では更に、Akt-Lucus に細胞内の各種部位への局在化配列を連結し、Aktによるタンパク質リン酸化が細胞内のどこで・どの程度起こっているのか、その動態計測もあわせて検討した。細胞

膜, ミトコンドリア外膜, 細胞内膜 (小胞体膜・ゴルジ体膜), 核, 細胞質への局在化配列をAkt-Luciferaseにそれぞれ連結し, 培養細胞にそれぞれ発現させたところ, 当該細胞内部に狙い通りに局在化していることが分かった. このように細胞内での局在を制御したプローブをそれぞれ発現する細胞を上皮成長因子 (EGF) で刺激してその細胞内のAktを活性化させ, それぞれの細胞の生物発光を測定した. その結果, 細胞内膜 (小胞体膜・ゴルジ体膜) に Akt-Luciferaseを局在化させた細胞と細胞膜に Akt-Luciferaseを局在化させた細胞において, 特に強い生物発光シグナルが計測されるが, ミトコンドリア外膜や細胞質, 核内にAkt-Luciferaseを局在化させた細胞においては, 生物発光シグナルは微弱であった. この結果は, Akt は特に細胞内膜 (小胞体膜・ゴルジ体膜) と細胞膜で強く活性化しているが, ミトコンドリア外膜や細胞質, 核内での活性は弱いことを示している. この検討は, 分解制御型プローブが様々なキナーゼの可視化計測に応用できることを示すと共に, 細胞内の特定部位への局在化配列を連結することにより, 細胞内での空間情報をも取得できることを示している.

ナノ局所におけるタンパク質リン酸化の可視化 細胞内のナノ局所におけるタンパク質リン酸化の可視化については, 上述のように開発した分解制御型プローブのルシフェラーゼを光活性型蛍光タンパク質で置き換えることにより目的を実現できると考えている. このプローブをコードするcDNAを既に開発し, 現在, 細胞内ナノ局所で生起するキナーゼ型受容体によるタンパク質リン酸化のイメージング実験を行っているところである.

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5件)

S. B. Kim, M. Sato and H. Tao, “A Split Gaussia Luciferase-Based Bioluminescence Template for Tracing Protein Dynamics in Living Cells” *Anal. Chem.*, 81, 67-74 (2009).

S. B. Kim, M. Sato and H. Tao, “Genetically Encoded Bioluminescent Indicators for Stress Hormones” *Anal. Chem.*, 81, 3760-3768 (2009).

S. B. Kim, M. Sato and H. Tao, “Molecular Tension-Indexed Bioluminescent Probes for

Determining Protein—Protein interactions” *Bioconjugate Chem.*, 20, 2324-2330 (2009).

佐藤守俊「分子プローブと細胞生命科学；見えなかったものを見えるようにする技術の開発」*化学と工業*, 2009年, 10月号, p1073-1075.

H. Suzuki and M. Sato, “Genetically Encoded Fluorescent Indicators to Visualize Protein Phosphorylation by c-Jun NH₂-Terminal Kinase (JNK) in Living Cells” *Supramol. Chem.*, 22, 434-439 (2010).

[学会発表] (計7件)

Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Single Cell Techniques, Fluorescent Indicators to Visualize Molecular Processes in Living Cells, New York, USA (2009年7月17日)

2nd Swiss-Japanese Symposium on Bionanotechnology BioNano 2009, Imaging Molecular Processes in Living Cells, Aigle Castle, Switzerland (2009年9月11日)

日本分析化学会第58年会化学センサー懇談会, 細胞内のシグナル伝達を可視化する分子プローブ, 北海道 (2009年9月24日)

Janelia Farm Conference on Fluorescent Proteins and Biological Sensors II, Imaging Molecular Processes in Living Cells, Virginia, USA (2009年11月3日)

日本薬学会第130年会シンポジウム「薬学における生命志向型化学 (分子設計を基盤とした生命現象解明)」, 細胞内のシグナル伝達を可視化する分子プローブ, 岡山 (2010年3月29日)

新学術領域「システム分子行動学」イメージングワークショップ, 細胞内のシグナル伝達を可視化する分子プローブ, 博多

(2010年8月18日)

第4回学際融合ビジュアルライゼーションシンポジウム, 分子イメージング, 東京 (2011年1月11日)

[図書] (計 1件)

[産業財産権] (計 2件)

○出願状況 (計 2件)

名称: 超高輝度で安定な人工生物発光酵素
発明者: 金 誠培, 佐藤守俊, 田尾博明
権利者: 独立行政法人技術総合研究所, 国立大学法人東京大学
種類: 特許
番号: 特願 2009-101025
出願年月日: 2009年4月16日
国内外の別: 国内

名称: タンパク質の翻訳後修飾の検出・定量用プローブ
発明者: 佐藤守俊, 高橋浩治
権利者: 国立大学法人東京大学
種類: 特許
番号: 特願 2009-247098
出願年月日: 2009年10月27日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ:

<http://system.c.u-tokyo.ac.jp/common/professor/sato.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 守俊 (MORITOSHI SATO)
東京大学大学院総合文化研究科・准教授
研究者番号: 00323501

(2) 研究分担者

特記事項なし

(3) 連携研究者

特記事項なし