

平成22年 6月 4日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20750056
 研究課題名（和文） 細胞膜近傍に局在するタンパク質を同定するための可視化プローブ分子の開発
 研究課題名（英文） Development of Optical Probe to Identify Proteins Localizing in the Intracellular Juxtamembrane Region
 研究代表者
 菅野 憲（KANNO AKIRA）
 東京大学・大学院理学系研究科・助教
 研究者番号：60466795

研究成果の概要（和文）：細胞膜近傍には「細胞の動き」に関連する重要なタンパク質が数多く存在すると考えられる。従来の分析法により、細胞膜界面に近接するタンパク質を同定することは難しい。そこで本研究では、細胞の内膜上および界面に存在するタンパク質を非破壊的に同定できる可視化プローブ開発を行った。

研究成果の概要（英文）： It is likely that proteins related to cell movement are localized in the intracellular juxtamembrane region. By using existing methods, it is difficult to identify such proteins localized in proximity to the plasma membrane. In this study, I developed a general method applicable to noninvasive identification of proteins localized on the plasma membrane or in the juxtamembrane space.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：膜局在タンパク質，網羅的解析，タンパク質再構成法

1. 研究開始当初の背景

高等生物のDNA情報が次々と解明され、ポストゲノム時代を迎えた。生命科学の研究対象は、遺伝子からタンパク質へと移り変わっている。生きた細胞内での様々な化学的プロセスや情報伝達は、タンパク質を介して実行されている。そのため、タンパク質機能・動態の分析、すなわち、プロテオーム解析は、

生命科学のみならず化学研究においても重要なテーマのひとつである。プロテオーム解析は主に、細胞内のタンパク質を2次元電気泳動により等電点・分子量に応じて分離されたタンパク質のスポットを質量分析することで行われる。異なる組織間のタンパク質発現およびその発現量の違いや、同一組織におけるタンパク質発現の変化を解析する上で

は有用である。しかし、その分析は細胞をすりつぶしてサンプルを調製する「破壊分析」であるため、細胞膜界面付近に存在するタンパク質の同定は難しい。タンパク質の細胞内局在を非破壊的に調べるためには、緑色蛍光タンパク質 (GFP) を融合させた標的タンパク質を発現する細胞を顕微鏡でひとつひとつ観察する手法も考えられるが、大量のタンパク質について局在を検討するには膨大な時間と労力を要する。細胞膜近傍には細胞の遊走やガン細胞の転移などの「細胞の動き」に関係のある重要なタンパク質が数多く存在すると考えられる。したがって、今後の生命科学研究においては、細胞膜界面に必要な応じて近接するタンパク質を非破壊的かつ網羅的に同定する化学分析法の確立が極めて重要である。

2. 研究の目的

細胞膜近傍には「細胞そのものの動き」に関係のある重要なタンパク質が数多く存在すると考えられる。しかし、従来の分析法により、細胞膜界面に近接するタンパク質を同定することは難しい。そこで本研究ではこれまでの研究成果をもとに、細胞の内膜上および界面に存在するタンパク質を非破壊的に同定できる可視化プローブを開発を目指した。

3. 研究の方法

プロテインプライミング反応を起こすタンパク質インテインと GFP を利用し、細胞膜界面に分析対象のタンパク質が近接すると全長 GFP を形成する蛍光可視化プローブを設計し、作製する。作製したプローブを培養細胞に発現させ、蛍光を指標に、転移に関わるタンパク質の同定を行う。

プローブの cDNA の設計および作製: GFP とインテインを用い、標的タンパク質が細胞膜近傍に局在してはじめて蛍光が回復する新規蛍光プローブを開発する。特定のアミノ酸残基で分割した GFP のアミノ末 (N 末) 側断片に、インテインの N 末側断片と細胞膜局在シグナルペプチド (MLS) を連結した遺伝子を作製する (N 末プローブ)。GFP のカルボキシ末 (C 末) 側断片にインテインの C 末側断片と MLS を連結した遺伝子を作製する (C 末プローブ)。

プローブを用いたタンパク質の同定法の確立: 作製した 2 つの遺伝子を細胞に導入して GFP が形成されることを、蛍光顕微鏡を用いて観察する。次に C 末プローブの MLS を、細胞膜近傍・細胞質・核のいずれかに局在するタンパク質で置き換えたプローブ遺伝子を作製する。おのおののプローブを、N 末プローブと同時に細胞内で発現させる。細胞膜近傍に局在するタンパク質を含む C 末プロー

ブとともに発現させたときのみ、GFP の蛍光が回復することを FACS および蛍光顕微鏡を用いて観察する。

4. 研究成果

プローブの cDNA 作製: GFP とインテインを用い、標的タンパク質が細胞膜近傍に局在してはじめて蛍光が回復する新規蛍光プローブを作製した。特定のアミノ酸残基で分割した GFP の N 末に N 末インテインと細胞膜局在シグナルペプチド (MLS) を連結した「N 末プローブ」の cDNA を作製した。C 末 GFP に C 末インテインと MLS を連結した「C 末プローブ」の cDNA を作製した。また、C 末プローブの MLS を、細胞膜近傍・細胞質・核に局在することが知られているタンパク質で置き換えたプローブの cDNA を作製した。**プローブを用いたタンパク質の同定法の確立:** N 末および C 末プローブをほ乳類細胞に発現させたところ、GFP の再構成に基づく蛍光の回復が観察された。また、N 末プローブの MLS を細胞膜近傍に局在するタンパク質に置換したプローブおよび C 末プローブを細胞に発現させたところ、蛍光の回復が確認された。一方、MLS を核局在タンパク質に置換した N 末プローブおよび C 末プローブを細胞に発現させたところ、微弱な蛍光の回復が観察された。本申請研究で開発したプローブ分子は、細胞膜近傍に局在するタンパク質を同定するツールとして有用であることいえる。

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 3 件)

① Akira Kanno, Takeaki Ozawa, Yoshio Umezawa, Bioluminescent Imaging of MAPK Function with Intein-Mediated Reporter Gene Assay, *Methods Mol. Biol.*, 査読無, 574, 2009, 185-192.

② Akira Kanno, Yoshio Umezawa, Takeaki Ozawa, Detection of Apoptosis Using Cyclic Luciferase in Living Mammals, *Methods Mol. Biol.*, 査読無, 574, 2009, 105-114.

③ Sung Bae Kim, Yoshio Umezawa, Akira Kanno, Hiroaki Tao, An Integrated-Molecule-Format Multicolor Probe for Monitoring Multiple Activities of a Bioactive Small Molecule, *ACS Chem. Biol.*, 査読有, 3, 2008, 359-372.

[学会発表] (計 6 件)

① ○Akira Kanno, Naoki Hida, Takeaki Ozawa, Bioluminescent Probes to Visualize Biological Functions in Living Cells, 分子研研究会 "Molecular Imaging for Systems Biology", 2009 年 11 月 6 日, 愛知県岡崎市。

②○菅野憲, 梅澤喜夫, 小澤岳昌, 生体内のカスパーゼ-3 活性を検出する環状ルシフェラーゼの開発, 日本分析化学会第 58 年会, 2009 年 9 月 24 日, 北海道札幌市.

③○Akira Kanno, Yoshio Umezawa, Takeaki Ozawa, Cyclic Luciferase for Real-Time Sensing of Protease Activities in Living Mammals, Tokyo Conference 2009, 2009 年 9 月 2 日, 千葉県千葉市.

④○菅野憲, 梅澤喜夫, 小澤岳昌, 生体内のカスパーゼ-3 活性を検出する環状ルシフェラーゼの開発, 日本化学会第 89 春期年会, 2009 年 3 月 27 日, 千葉県船橋市.

⑤○菅野憲, 小澤岳昌, ルシフェラーゼの再構成を利用したタンパク質動態の可視化検出, ナノバイオ インテグレーション研究拠点成果発表会, 2008 年 12 月 12 日, 東京都文京区.

⑥○菅野憲, 梅澤喜夫, 小澤岳昌 生体内のカスパーゼ-3 活性を検出する環状ルシフェラーゼの開発, 第 58 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2008 年 10 月 25 日, 兵庫県神戸市.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 1 件)

名称: ACTIVATED PROTEASE INDICATOR
発明者: UMEZAWA, Yoshio; OZAWA, Takeaki;
KANNO, Akira

権利者: 東京大学

種類・番号: EP2154159

取得年月日: 17.02.2010

国内外の別: 国外 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LI, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR)

[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

菅野 憲 (KANNO AKIRA)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号: 60466795