

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成26年 5月23日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(S)

研究期間：2009～2013

課題番号：21675001

研究課題名（和文） タンパク質化学に立脚した革新的生細胞内分子分析法の創製

研究課題名（英文） Development of Innovative Methods for Analyzing Biological Molecules in Living Cells Based on Protein Chemistry

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）82,100,000円、（間接経費）24,630,000円

研究成果の概要（和文）：生命の素過程を化学的視点から理解する試みは、科学全体の発展の為に極めて重要な課題である。本研究では、タンパク質再構成法をさらに発展させ、生細胞中の分子素過程を解明する新たな基盤技術の開発を目的とした。具体的には、1) 生きた細胞内の生体分子の機能を可視化する分子プローブ、2) 細胞内シグナル伝達に關与する新規分子種同定法、3) 生体分子の機能を時空間制御する機能性分子材料、を開発した。開発したプローブやイメージング技術は、基礎生命科学や創薬研究などにおいて、革新的な生体光分析法となる。

研究成果の概要（英文）：Chemical understanding of biological process in living cells is an extremely important for the progress of science. This research project aimed to develop novel analytical methods for resolving complicate networks and function of biological molecules in living cells. We developed 1) molecular probes to visualize biological function in living cells, 2) methods to identify specific molecules in intracellular signaling, and 3) molecular probes to control a biological function with external light. The probes and imaging technologies will be useful for the analysis of biomolecules in the fields of basic biology and pharmacological science.

研究分野：理工系・化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：可視化・ナノバイオ・光スイッチ・バイオテクノロジー・酵素反応

1. 研究開始当初の背景

生命の素過程を化学的視点から理解する試みは、科学全体の発展の為に極めて重要な課題である。この課題に挑むため、生命現象に学習した新しい化学的基盤技術の創出が強く求められている。我々は独自に初めて見出した現象-プロテインスプライシング反応による緑色蛍光タンパク質（GFP）の再構成-の発見に端緒をなし、生細胞内で分子の素過程を可視化するプローブ開発を展開している。

2. 研究の目的

本研究では、タンパク質再構成法をさらに発展させ、生細胞中の分子素過程を解明する新たな基盤技術の開発を目的とする。具体的には、

(1) 生きた細胞内の生体分子の機能を可視化する分子プローブ

(2) 細胞内シグナル伝達に關与する新規分子種同定法

(3) 生体分子の機能を時空間制御する機能性分子材料

の開発を目指す。タンパク質化学に関する知見を元に、分子科学と遺伝子工学の最先端技術を利用して、革新的機能性分子を創出する。

3. 研究の方法

タンパク質の立体構造と機能に関する情報に基づき合理的な設計を行う。遺伝子工学手法ならびに合成化学を利用して、作製する分子の機能評価を、試験管内および細胞内で行う。さらにランダムなアミノ酸の変異導入・削除・挿入を行う「分子進化法」を取り入れ、タンパク質ライブラリーから目的の機能性分子をスクリーニングする。新規分子種同定法では、生理活性物質のスクリーニング法を開発する。遺伝子ライブラリーから、開

発する機能性分子を用いて、目的とする機能性分子を探索する。光制御分子の開発では、光受容タンパク質と機能性分子の融合タンパク質を作製し、生細胞内で酵素活性を光制御する分子プローブを創出する。

4. 研究成果

(1) 生きた細胞内の生体分子の機能を可視化する分子プローブ

コマツキムシ由来の発光タンパク質（ルシフェラーゼ）にアミノ酸変位を加え、535 nm～615 nmの発光極大波長を有するルシフェラーゼ変異体を開発した。次にこのルシフェラーゼの切断位置を決定し、各ルシフェラーゼフラグメントを利用して、ツメガエル卵の発生段階で重要な Smad1-Smad4、および Smad2-Smad4 タンパク質の競争的な相互作用をリアルタイムで可視化することに成功した。蛍光イメージングが困難な不透明な組織や動物個体を対象とした新たなイメージング技術を提唱した。

開発したコマツキムシ由来の分割ルシフェラーゼを用いて、GPCRとβアレスチンとの相互作用を発光検出するプローブを開発した。ルシフェラーゼ断片を連結した GPCR およびβ-アレスチンを安定に発現する細胞株を樹立した。この細胞株を用いて、マイクロタイタープレート上で、GPCRを標的とする化学物質のスクリーニングが可能であることを実証した。また、独自に開発した生物発光顕微鏡を用いて、生きた細胞内の GPCR-βアレスチン間相互作用を高い空間分解能で検出することに成功した。次に、鉄道虫

(*Phrixothrix hirtus*) 由来のルシフェラーゼを内部標準に用いて、GPCR 活性化の検出系の精度を大幅に向上させた。ルシフェラーゼ断片を連結した GPCR およびβ-アレスチンと共に鉄道虫ルシフェラーゼを安定的に発現する細胞株を樹立し、GPCR-βアレスチン間のタンパク質間相互作用を定量検出した。4種のGPCR(β2-アドレナリン受容体、α2-アドレナリン受容体、エンドセリン受容体タイプA、μ-オピオイド受容体)に対して、リガンド濃度依存的な活性化を高精度で発光検出することに成功した。鉄道虫ルシフェラーゼの発光値を用いて規格化することにより、測定誤差による変動を大幅に減少させた。本研究により開発した発光検出系は、GPCR 情報伝達系に関わる薬剤候補物質の細胞ベース高速スクリーニングへの応用展開が期待される。

三分子間のルシフェラーゼ再構成技術を用いて、二波長の発光測定により、細胞内 cyclic AMP (cAMP)濃度を定量検出できる新規発光プローブを開発し、生細胞内および動物個体内において解析を行った。二波長測光型 cAMP 検出發光プローブは、ブラジル産ヒ

カリコマツキムシルシフェラーゼ ELuc (極大波長 538 nm) の N 末端側断片 (ELucN)、プロテインキナーゼ A の制御サブユニット由来の cAMP 結合ドメイン (PKA-BD)、ジャマイカ産ヒカリコマツキムシルシフェラーゼ CBR の変異型 C 末端側断片 (McLuc1)、CBR (極大波長 613 nm) の N 末端側断片 (CBRN) からなる融合タンパク質の構造を持つ (図 1)。McLuc1 は ELucN および CBRN と再構成可能な C 末端側断片である。cAMP 非存在下では、CBRN が McLuc1 と再構成し、613 nm の発光のみが検出される。一方、cAMP 存在下では、cAMP が PKA-BD に結合し、プローブの立体構造が変化し、ELucN が McLuc1 と近接し、ELucN-McLuc1 が再構成され、538 nm の発光が検出される。同時に、CBRN-McLuc1 は解離し、613 nm の発光は消失する。プローブ発現細胞の破碎物を用いた解析から、本プローブは、538 nm の発光では cAMP 濃度に依存した発光強度上昇を示すのに対して、613 nm の発光では cAMP 濃度に依らず、ほぼ一定の発光強度を示すことが明らかとなった。また、この時の二波長の発光強度比 (538 nm/613 nm) は、cAMP に対する高い選択性と濃度依存性を示した。また、ある一定濃度の cAMP を検出する際の発光強度比 (538 nm/613 nm) は、反応基質 D-ルシフェリンや補助因子 ATP の濃度に依らず、ほぼ一定であった。また、プローブを発現させた生細胞および動物個体を用いた解析において、本プローブは、高い定量性を持ち、生細胞内でリアルタイムに起こる cAMP 濃度変化を非侵襲的に可視化検出できることが実証された。

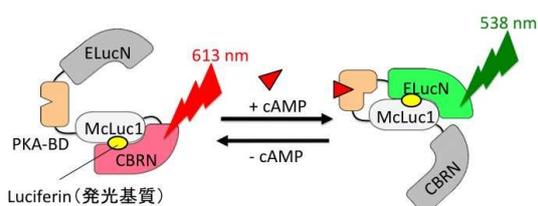


図 1. 二波長測光型 cAMP 検出プローブの原理。

二分割蛍光タンパク質の再構成法を応用して、細胞内の 1 分子βアクチン mRNA の可視化を実現する技術革新を行った。本プローブは、緑色蛍光タンパク質 (EGFP) の N 末端断片および C 末端断片をそれぞれ異なる *Pumilio* 相同ドメイン (Pum-HD) 変異体に結合した、2つの融合タンパク質からなる。Pum-HD は特定の 8 塩基 RNA 配列を認識する RNA 結合タンパク質である。プローブ中の 2つの Pum-HD 変異体は、βアクチン mRNA 中の配列に結合するように設計する。プローブが

β アクチン mRNA に結合すると、2つの EGFP 断片が近接し、再構成することで蛍光が回復する。まず本プローブの β -アクチン mRNA への結合性と選択性を確認した。プローブを発現している細胞からプローブを回収し、結合している RNA を逆転写 PCR により増幅したところ、 β -アクチン mRNA 由来のバンドが強く増幅された。また、プローブを発現した培養細胞を固定し、細胞内の β -アクチン mRNA を蛍光標識した上でプローブと同時観察したところ、多くのプローブが β -アクチン mRNA 上で蛍光を示した。以上の結果から、本プローブの β -アクチン mRNA に対する結合性、選択性が確認された。次に、 β -アクチン mRNA の蛍光ライブイメージングを行った。飢餓状態の細胞では、プローブ由来の蛍光が輝点として、細胞全体に観察された。これらの輝点は1段階で退色し、輝度分布が単一のガウス関数でフィッティングできた。すなわち、個々の輝点はプローブ1分子に由来することがわかった。この細胞を血清で刺激すると、細胞は伸長し、その伸長している領域にプローブが強く分布する様子が観察された。さらに一部の輝点について微小管上を輸送される直線運動が観測された。これは、細胞が伸長する領域に β -アクチン mRNA が局在する既知の動態結果と一致する。すなわち、本プローブは生細胞内の β -アクチン mRNA 動態の可視化に成功したことを示している。類似の原理に基づき、内在性 β -アクチン mRNA の細胞内局在変化 (図2) やテロメア RNA 動態の可視解析法を開発し、RNA 一分子イメージングを飛躍的に進展させることに成功した。

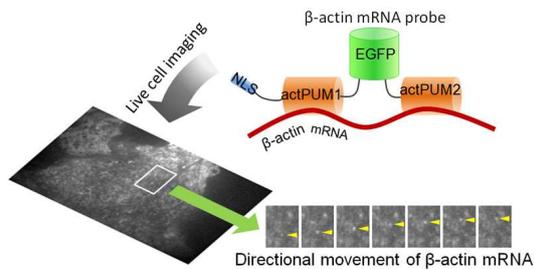


図2. 生細胞内 β アクチン1分子観察法。

(2) 細胞内シグナル伝達に関与する新規分子種同定法

Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) タンパク質をターゲットとして、その修飾を受けるタンパク質の網羅解析法を創案した。SUMO化を生きた細胞中で捉えるため、二分割した蛍光タンパク質による再構成法を用いた。二分割した蛍光タンパク質 (YFP 変異体) の断片のそれぞれに対し SUMO と、マウス遺伝子ライブラリーにコードされた未知タンパク質を融合したレトロウィルスベクター

を作製した。双方のタンパク質を細胞内に発現させることで、SUMO が未知タンパク質に結合した場合にのみ、蛍光タンパク質断片の近接・再構成が起こり蛍光が生じる。蛍光性の細胞を FACS を用いて単離した。単離・回収した蛍光性の細胞からライブラリーの DNA を抽出し解読した結果、33種の SUMO 化タンパク質候補を同定した。そのうち3種のタンパク質に関しては、既に SUMO 化の報告があることから、本スクリーニング法を用いて SUMO 化タンパク質を検出することが可能であることが示唆された。残りの30種については新規 SUMO 化タンパク質の可能性が示唆された。そこで、特定のタンパク質1種 (Atac2 タンパク質) を選抜し、そのタンパク質について SUMO 化が起こるかどうかを生化学的に解析した。その結果、Atac2 が *in vitro* で SUMO 化されること、またその修飾アミノ酸位置を同定することに成功した (図3)。開発した方法は、SUMO 化やユビキチン化など、タンパク質の翻訳後修飾を受ける新規タンパク質同定法としての一般性を有しており、新たな翻訳後修飾タンパク質の探索に優れた技術となる。

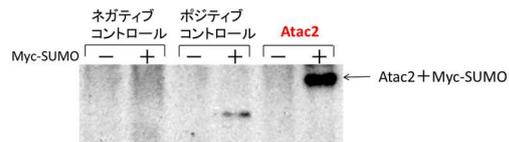


図3. Atac2 の SUMO 化検証実験。Atac2 を免疫沈降した後、SUMO タンパク質を Myc タグ抗体で染色した。

(3) 生体分子の機能を時空間制御する機能性分子材料

植物 *Avena sativa* 由来の光応答性タンパク質 Phototropin 内の LOV2 領域が動物細胞で機能するかを検証するために、分割ルシフェラーゼを用いた pH プローブを作製した。LOV2 領域は、外部からの青色光刺激によって領域中の α ヘリックス、 $J\alpha$ が構造変化を起こす。また暗所に戻すと元の構造に回復する特徴をもつ。そこで、LOV2 領域の両端に、ホタルルシフェラーゼを2分割した断片をそれぞれ繋げた (図4A)。この融合タンパク質プローブは、暗所では分割したルシフェラーゼ断片が近接し、再構成現象が起こることで発光する。青色光を照射すると、 $J\alpha$ が構造変化を起こすためルシフェラーゼ断片が離れ発光を失う。この光応答現象を確認するため、DNA コンストラクトをヒト培養細胞へ導入しタンパク質を発現させて、細胞への光照射に対する発光反応の変化を計測した。生きた細胞に対して青色光を照射したところ、一時的に発光が減少し、数

分以内に元の発光値まで回復した。またこの反応は、複数回の光刺激においても同様の回復軌跡を示した。この光応答性ルシフェラーゼ（以下 PI-Luc）に含まれる LOV2 領域の光応答反応は、周辺の pH によってその回復時間が変化する。そこで、PI-Luc を安定的に発現する細胞株を用いて、細胞内部の pH を調整しそれぞれの値での発光回復反応を観察した。その結果、pH 値が酸性になるほど、発光の回復時間が遅くなることが解った。この結果は、光照射後にルシフェラーゼ発光の回復速度を測定すれば、pH の変化が測定できることを示す。この PI-Luc の回復時間は、発光基質濃度や ATP 濃度を変えた条件において安定した値を示すことがわかった。即ち、発光の回復時間は、ルシフェラーゼタンパク質の発光定量の弱点を補う全く新しい指標となる。次に、生きた個体における pH イメージングを、PI-Luc による発光回復時間イメージングによって試みた。まず、PI-Luc をマウス脚先へ発現させ、生きたマウス組織内で光刺激によって PI-Luc の発光活性が変化するかどうかを確認した。結果、発光値は光照射後に一時的に減少し、数分以内に回復した。虚血状態を作ると、発光回復時間が遅くなることから、pH が酸性となっていることが解った(図 4B)。以上より、マウス組織での pH の変化を可逆的にイメージングすることに成功した。開発した PI-Luc は、細胞や組織の pH 変化を長時間連続観察するための新たなコンセプトに基づく発光プローブである。

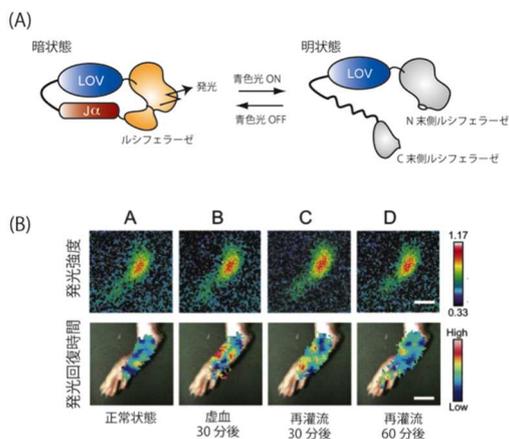


図 4. (A) PI-Luc 光応答の原理。(B) マウス組織を用いた pH イメージング。

セリン/トレオニンキナーゼ Akt/PKB のキナーゼ活性を、光照射により制御する技術を開発した。生体内において Akt の活性は、その細胞質から細胞膜への局在変化によって制御されている。そこで、Akt の局在変化を光制御する目的で、光感受によってヘテロ二量体を形成するタンパク質 CRY2 および CIBN を利用した。CRY2 は光照射によって構造変化

し、膜局在化シグナル(Myrr)を付した CIBN と相互作用する。その結果、CRY2 に融合した Akt は細胞膜に局在し、Akt の基質タンパク質をリン酸化することで下流にシグナルを伝達する。CRY2 と CIBN のヘテロ二量体形成は数分オーダーの可逆的反応であるため、高い時空間分解能で Akt 活性を制御できる。まず、ウェスタンブロット法によって、光照射パルスの回数に応じた段階的な CRY2-Akt の活性化を確認した(図 5)。活性化した CRY2-Akt は Akt の基質タンパク質の一つである GSK3 をリン酸化修飾した。また、CRY2-Akt の活性化は可逆的であり、光照射とその停止によって CRY2-Akt を任意時間にのみ活性化できることを確認した。光照射の強度、パルス幅、インターバルを調節することによって、CRY2-Akt 活性の時間パターンを自在に制御可能であることを示した。次に、Akt の下流で制御されている細胞機能を、光照射によって制御可能かどうかを検証した。FoxO1 を蛍光タンパク質で標識した融合タンパク質の動態を Akt の光活性化前後でリアルタイム観察したところ、光照射に伴い FoxO1 が核から細胞質に局在変化することが確認された。さらに、FoxO1 によってその発現が制御される遺伝子 *Atrogin-1* の発現量が光照射に伴い減少した。また、光活性型 Akt を発現する細胞の局所領域を光照射すると、照射した方向への細胞遊走が生じることを確認した。一細胞内で Akt 活性の空間的勾配が生じた結果と考えられる。以上の結果は、開発した手法によって、時間のみならず空間的にも Akt 活性とその下流の細胞機能を制御可能であることを示す。以上より、生体内タンパク質リン酸化酵素 Akt の活性を光照射によって制御する手法を確立した。開発した方法は、生体内においてリン酸化酵素活性を時空間的に光制御する全く新たな方法の創出である。

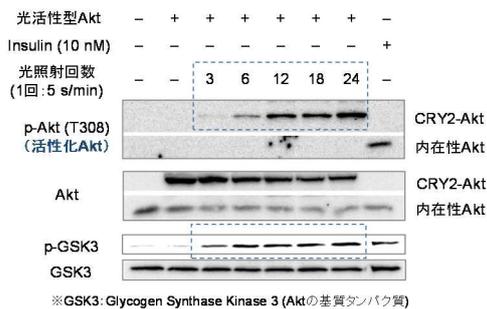


図 5. 光照射による Akt の活性化。

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 38 件)

① Sustained accurate recording of

intracellular acidification in living tissues with a photo-controllable bioluminescent protein. M. Hattori, S. Haga, H. Takakura, M. Ozaki and T. Ozawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 9332-9337 (2013). doi:10.1073/pnas.1304056110. (査読有)

②Visualization and Quantitative Analysis of G Protein-Coupled Receptor- β -Arrestin Interaction in Single Cells and Specific Organs of Living Mice Using Split Luciferase Complementation. H. Takakura, M. Hattori, M. Takeuchi and T. Ozawa, *ACS Chem. Biol.*, 7, 901-910 (2012). doi: 10.1021/cb200360z. (査読有)

③Visualization of non-engineered single mRNAs in living cells using genetically encoded fluorescent probes. T. Yamada, H. Yoshimura, A. Inaguma and T. Ozawa, *Anal. Chem.*, 83, 5708-5714 (2011). doi: 10.1021/ac2009405. (査読有)

④ Ratiometric Bioluminescence Indicators for Monitoring Cyclic AMP in Live Cells Based on Luciferase-Fragment Complementation. M. Takeuchi, Y. Nagaoka, T. Yamada, H. Takakura and T. Ozawa, *Anal. Chem.*, 82, 9306-9313 (2010). doi: 10.1021/ac102692u. (査読有)

⑤Rapid and high-sensitivity cell-based assays of protein-protein interactions using split click beetle luciferase complementation: An approach to the study of G protein-coupled receptors. N. Misawa, A. K. M. Kafi, M. Hattori, K. Miura, K. Masuda and T. Ozawa, *Anal. Chem.*, 82, 2552-2560 (2010). doi: 10.1021/ac100104q. (査読有)

⑥High-Sensitivity Real-Time Imaging of Dual Protein-Protein Interactions in Living Subjects Using Multicolor Luciferases. N. Hida, M. Awais, M. Takeuchi, N. Ueno, M. Tashiro, T. Singh, M. Hayashi, K. Ohmiya and T. Ozawa, *PLoS ONE*, 4, e5868 (2009). doi: 10.1371/journal.pone.0005868. (査読有)

[学会発表] (計 75 件)

Imaging and Control of Biological functions Using Split-Reporter Reconstitution Analyses, T. Ozawa, Korean Society of Molecular and Cellular Biology, Seoul (Korea), 2011 年 10 月 6 日.

[図書] (計 16 件)

「プローブタンパク質」小澤岳昌、蛍光イメージング/MRI プローブの開発、シーエムシー出版 p22-34 (2011).

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: cyclicGMP 検出方法

発明者: 小澤岳昌、竹内雅宜、三浦研二

権利者: 東京大学

種類: 特許

番号: 特願 2008-164927

出願年月日: 2008 年 6 月 24 日

(PCT 出願 2009 年 6 月 23 日)

国内外の別: 国内・国外

○取得状況 (計 2 件)

名称: タンパク質間相互作用の検出法

発明者: 小澤岳昌、ムハンマド アワイス、

三浦研二

権利者: 東京大学

種類: 特許

番号: 5258084

取得年月日: 2013 年 5 月 2 日

国内外の別: 国内

名称: タンパク質間相互作用の高感度検出法

発明者: 小澤岳昌、三澤直美、三浦研二、

岡本将、西井重明

権利者: 東京大学

種類: 特許

番号: 4849698

取得年月日: 2011 年 10 月 28 日

国内外の別: 国内・国外

[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・理学系研究科・教授

研究者番号: 40302806

(3) 連携研究者

竹内 雅宜 (TAKEUCHI, MASAKI)

東京大学・理学系研究科・助教

研究者番号: 00332271

吉村 英哲 (YOSHIMURA, HIDEAKI)

東京大学・理学系研究科・特任助教

研究者番号: 90464205