

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23651230

研究課題名（和文） 生体内プロテアーゼ活性の複数同時観測を可能とする新規タンパク質プローブ分子の創成

研究課題名（英文） Creation of A Multi-Color Sensing System for Protease Activities.

研究代表者

坂本 清志 (SAKAMOTO SEIJI)

東北大学・多元物質科学研究所・助教

研究者番号：30335228

研究成果の概要（和文）：本申請課題では、生細胞ならびに生体内に存在する様々なプロテアーゼ活性の複数同時リアルタイム観測を可能とする新規蛍光および発光タンパク質型プローブ分子の開発を行った。具体的には、人工的に切断した分割型タンパク質の自発的再構成反応を利用し、任意のプロテアーゼ存在下においてのみ特異的に蛍光あるいは発光機能を示すことが可能な新規タンパク質型バイオプローブの開発に成功した。また、新規に構築したタンパク質型バイオプローブを用いて、複数のプロテアーゼ活性の多色同時蛍光検出に成功した。

研究成果の概要（英文）：We designed a dual-protease biosensor for two different protease activities using doubly inhibited split-GFP, which was fully activated only when two proteases were present at the same time. In the system, N- and C-terminal fragments of split-GFP of split-luciferase were cyclized via the distinct protease substrate sequences, respectively. The simultaneous addition of two proteases resulted in cleavage of both substrate linkers, leading to the functional recovery of split-GFP and split-luciferase. These results clearly demonstrate the successful construction of the dual-protease biosensor for two different caspase activities by using split-GFP and split-luciferase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：プロテアーゼ、蛍光タンパク質、発光タンパク質、バイオプローブ、バイオセンサー

1. 研究開始当初の背景

プロテアーゼは、ペプチド結合加水分解反応を触媒的に進行させる酵素の総称である。生体内には多様なプロテアーゼ群が存在し、生物の発生、細胞分化、細胞周期、癌化、老化など様々な生命現象や疾患に関与していることが判明している。例えば、細胞内プロテアーゼによる配列特異的なアミド結合の切断によって、特定タンパク質の限定分解や酵素の活性化を介した細胞周期制御や、アポトーシスにおけるプログラム細胞死シグナルの開始・伝達等が厳密に実行されている。従って、細胞内に存在する種々のプロテアーゼの活性、種類ならびにその経時的発現分布変化をタンパク質レベルで可視化し、

モニタリングすることは、複雑に分化した各細胞機能を分子レベルで解析・理解する上で非常に重要かつ緊急性を有する研究課題と考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、生細胞ならびに生体内に存在する様々なプロテアーゼ活性の複数同時リアルタイム観測を可能とする新規蛍光および発光タンパク質型プローブ分子を開発することを目的とする。

具体的には、人工的に切断した分割型タンパク質の自発的再構成反応を利用し、任意のプロテアーゼ存在下においてのみ特異的に

蛍光あるいは発光機能を示すことが可能な新規タンパク質型バイオプローブの開発を行う。

3. 研究の方法

タンパク質型プローブ分子構築における基本的な方法論として、人工的に切断した分割型タンパク質の自発的再構成反応を利用する。具体的には、分割型緑色蛍光タンパク質類縁体や分割型ルシフェラーゼ等をタンパク質側の基体として用いる。今回提案する研究では、二分割されたタンパク質断片の一方あるいは両方に対し、測定対象となるプロテアーゼ基質配列を付加する。さらに、各ペプチド断片の N- および C- 末端を分子内架橋することで、環状タンパク質フラグメントを構築する。設計上、各フラグメントの環状化によって、ターゲットとなるプロテアーゼ非存在下、あるいは不活性化状態の場合は、タンパク質フラグメント間の再構成反応は抑制されることが予想される。一方、観測対象となるプロテアーゼ存在下では、環状化フラグメント上の基質配列部位が特異的に切断を受け、分割型タンパク質の再結合反応の進行とプロテアーゼ活性依存的な蛍光・発光機能の回復が期待できる。以上の設計原理に基づき、研究期間内に、任意のプロテアーゼ活性を蛍光および発光タンパク質由来のシグナル強度を指標として特異的に検出・定量するシステムの構築を行う (Figure 1)。さらに、異なる分光学的特性を持つ蛍光および発光タンパク質を同時に利用することで、細胞内に存在する複数のプロテアーゼの活性をリアルタイムかつ同時にマルチカラーで検出可能な新規プロテアーゼセンシングシステムや、複数の活性型プロテアーゼが存在する場合にのみシグナルを与えるデュアルプロテアーゼセンサーの構築を試みる (Figure 2 and 3)。

これまでの実験結果から多くの知見を有している分割型 GFP (Split-GFP) を主なレポータータンパク質として用い、新規タンパク質型プロテアーゼ活性インディケーターの設計と構造・機能最適化を行う。今回の研究では、Waldo らによって見いだされた 214 位分割型 GFP 変異体 (GFP OPT) [S. Cabantous, *Nature Methods*, **3**, 845 (2006)] を第一候補として利用した。この変異体は溶解性に優れる他、両断片を混合することでタンパク質リフォールディングと蛍光シグナルの回復が進行する等、他の分割型蛍光タンパク質変異体には無い特徴を持つ。蛍光プローブの設計においては、二分割されたタンパク質断片の一方に、測定対象となるプロテアーゼ基質配列を付加した。さらに、基質配列を付加したペプチド断片の N- および C- 末端を分子内架橋することで、環状化ペプチドフラグメントを構築した。環状化フラグメントの形成には、*Synechocystis* sp. DnaE や DnaB 由来の分割型インテインを利用した。これらの分割型インテインの C- および N-末端フラグメント間に目的とするポリペプチド配列を挿入することで、効

率的に環状ペプチドや環状タンパク質を得た。プローブ設計上、フラグメントの環状化によって、ターゲットプロテアーゼが不活性化状態では分割型タンパク質の再構成反応は抑制される。一方、測定対象となる任意のプロテアーゼ存在下においては、環状化ポリペプチド上の基質配列部位が特異的に切断を受け、分割型タンパク質の再結合反応の進行とプロテアーゼ活性依存的な蛍光機能が回復することを期待した。

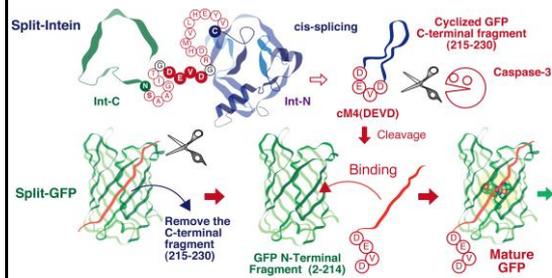


Figure 1 カスパーゼ活性センシングシステムの構築原理

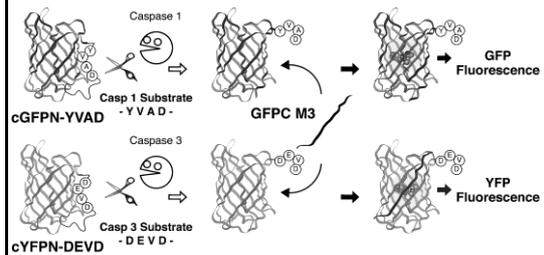


Figure 2 複数のプロテアーゼ活性を同時かつマルチカラーで検出可能な新規プロテアーゼセンシングシステム

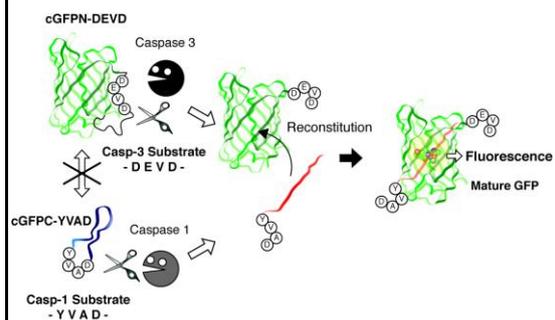


Figure 3 複数の活性型プロテアーゼが存在する場合にのみシグナルを与えるデュアルプロテアーゼセンサー

4. 研究成果

上記の方法論によって、ターゲットとなるプ

ロテアーゼ活性を特異的に検出可能なセンシングシステムの構築に成功した。また、Split-GFPに加えて、異なる蛍光極大波長を持つ Split-YFP を合わせて使用し、それぞれに異なるプロテアーゼ基質配列を複合化することによって、複数のプロテアーゼ活性の同時検出を可能とするセンシングシステムの構築を達成した。さらに、分割型タンパク質の環状化 N-末端側フラグメントと環状化 C-末端側フラグメントに挿入する各基質配列を異なるプロテアーゼに対して特異的な配列にすることで、複数のプロテアーゼ同時存在下においてのみ蛍光を発するデュアルプロテアーゼバイオセンサーの構築に成功した。以上の成果は、多くの国内外学会にて発表した。

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. Seiji Sakamoto, Mika Terauchi, Anna Hugo, Yasuyuki Araki, Takehiko Wada, "Design and Preparation of A Dual-Protease Biosensor for Two Different Caspase Activities Using Split-GFP", *Peptide Science* 2012, 283-284 (2013). (査読有り)
2. Seiji Sakamoto, Mika Terauchi, Shunsaku Taki, Kim, Ian Tanner, Yasuyuki Araki, Takehiko Wada, "Design of a Dual-Color Detection System for Caspase Activities Using a Combination of Split-Fluorescent Proteins and Split-Intein", *Peptide Science* 2011, 325-326 (2012). (査読有り)
3. Seiji Sakamoto, Mika Terauchi, Yasuyuki Araki, Takehiko Wada, "Design of a Sensing System for Caspase-3 Activities Using a Combination of Split-GFP and Split-Intein", *Peptide Science* 2010, 224-225 (2011). (査読有り)

[学会発表] (計 1 3 件)

1. Seiji Sakamoto, Anna Hugo, Mika Terauchi, Yasuyuki Araki, and Takehiko Wada "Design of A Sensing System for Caspase Activities Using A Combination of Split-Fluorescent Proteins and Split-Intein", *6th Peptide Engineering Meeting (PEM6)*, USA, Atlanta, (2012.10.2-2012.10.5).
2. Seiji Sakamoto, Anna Hugo, Mika Terauchi, Yasuyuki Araki, and Takehiko Wada, "Creation of Simultaneous Dual-Color Sensing System for Independent Caspase

Activities using Split-Fluorescent Proteins", *The First International Symposium on Biofunctional Chemistry (ISBC2012)*, Tokyo, Japan (2012.11.28-30).

3. 坂本 清志, Anna Hugo, 寺内 美香, 荒木保幸, 和田 健彦, 「分割型GFPを用いたデュアルプロテアーゼバイオセンサーの構築」, 第49回ペプチド討論会, 鹿児島 (2012.11.7-9).
4. 坂本 清志, 和田 健彦, 「分割型ホタルシフェラーゼを用いた新規カスパーゼ活性検出システムの構築」, 化学系学協会東北大会, 秋田市 (2012.9.15-16).
5. 坂本 清志, Anna Hugo, 寺内 美香, 荒木保幸, 和田 健彦, 「分割型タンパク質を用いたカスパーゼ活性の特異的検出」, 第6回バイオ関連化学シンポジウム, 札幌市 (2012.9.6-8).
6. Seiji Sakamoto, Anna Hugo, Mika Terauchi, Yasuyuki Araki, and Takehiko Wada, "Creation of A Sensing System for Caspase Activities by Combination of Split-Fluorescent Proteins and Split-Intein", *The Second Asian Chemical Biology Conference ACBC2012*, Itoman, Japan (2012.7.4-6).
7. Anna Hugo, Seiji Sakamoto, Yasuyuki Araki, and Takehiko Wada, "Design of Novel Circularly Permuted and Fragmented Fluorescent Protein Enabling Spontaneous Reassembly and Functional Recovery", *The Second Asian Chemical Biology Conference ACBC2012*, Itoman, Japan (2012.7.4-6).
8. Seiji Sakamoto, Yasuyuki Araki, and Takehiko Wada, "Design of a Sensing System for Histone Modification Patterns Using Split-GFP", *International Symposium Innovative Nanobiodevices 2012 (ISIN2012)*, Nagoya, Japan (2012.3.21-22).
9. 坂本 清志, 寺内 美香, Hugo Anna, 瀧集作, 荒木 保幸, 和田 健彦, 「分割型タンパク質を基体とするセンシングシステムの構築」, 第22回バイオ・高分子シンポジウム, 東京 (2012.6.25-26).
10. 瀧 集作, 坂本 清志, 寺内 美香, 荒木保幸, 和田 健彦, 「環状化を鍵とする分割型GFPを中心とした蛍光タンパク質

を利用した新規プロテアーゼ活性検出システムの構築」,平成23年度 化学系学協会東北大会, 仙台 (2011.9.28-9.30).

研究者番号 :

(2)研究分担者 ()

11. 坂本 清志, 瀧 集作, 寺内 美香, Kim. Tanner, Ian, 荒木 保幸, 和田 健彦, 「分割型GFPと分割型インテインの複合化によるカスパーゼ活性の多色同時検出システムの構築」, 第48回ペプチド討論会, 札幌 (2011.9.27-29).

研究者番号 :

(3)連携研究者 ()

研究者番号 :

12. 瀧 集作, 坂本 清志, 寺内 美香, 荒木 保幸, 和田 健彦, 「環状化分割型GFPを中心とした新規プロテアーゼ活性検出システムの構築」, 第5回バイオ関連化学シンポジウム, つくば (2011.9.12-14).

13. 坂本 清志, 瀧 集作, 寺内 美香, Tanner Ian Kim, 荒木 保幸, 和田 健彦 分割型GFPと分割型 インテインの複合化によるカスパーゼ活性検出システムの構築, 第5回バイオ関連シンポジウム, つくば (2011.9.12-14).

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計0件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 清志 (SAKAMOTO SEIJI)
東北大学・多元物質科学研究所・助教
研究者番号 : 30335228