

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 15 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24655058

研究課題名(和文) 新しいタンパク質再構成法に基づくタンパク質動態解析法の開発

研究課題名(英文) Novel protein reconstitution systems for monitoring protein dynamics in living cells

研究代表者

菅野 憲 (Kanno, Akira)

富山大学・大学院理工学研究部(工学)・助教

研究者番号：60466795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では(1)新しい相補的タンパク質再構成法の確立、および(2)プロテアーゼ活性を検出するための環状ルシフェラーゼの開発を行った。(1)において、生細胞内でのホスファチジルイノシトール3,4,5-三リン酸(PIP3)産生を高精度で可視化検出することに成功した。(2)において、生細胞内でのカスパーゼ-3およびカスパーゼ-8活性化を高感度でリアルタイム検出することに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, I developed two types of indicators to monitor the dynamics of biomolecules in living cells: luciferase fragments fused to a fluorescent protein for the highly precise detection of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP3) production in living cells; and cyclic luciferases for real-time sensing of caspase-3 and -8 in living cells with high sensitivity.

研究分野：複合化学

科研費の分科・細目：分析化学

キーワード：分析化学 生体分析

## 1. 研究開始当初の背景

生体内では、細胞内・外のさまざまな情報伝達や化学的プロセッシングのほとんどがタンパク質を介して実行されている。タンパク質の動態変化が、生体内のいつ・どこで・どれくらい起きているかを分析することは、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。近年では、タンパク質の局在変化・翻訳後修飾・タンパク質間相互作用といった生命システムの根幹をなしている動的なネットワーク情報を損なうことなく、生体内のタンパク質動態を非破壊的にリアルタイム検出するための手法が数多く開発されている。一方、研究代表者らはこれまでに、発光タンパク質ルシフェラーゼを利用した「タンパク質の再構成法」にもとづき、生きた細胞/動物個体内でのタンパク質局在変化、タンパク質間相互作用、タンパク質切断などのタンパク質動態を可視化検出する機能的発光タンパク質分子を開発してきた。「タンパク質の再構成法」とは、タンパク質を特定のアミノ酸残基で分割して本来の機能を失わせたのち、分割したタンパク質断片を近接もしくは再連結することで、そのタンパク質の機能を再び回復させる手法である。以上、タンパク質動態変化が起きて初めて光シグナルを発する機能的ルシフェラーゼは、培養細胞レベルの *in vitro* 実験から生きた動物個体レベルの *in vivo* 実験まで幅広く応用可能であることを実証している。

## 2. 研究の目的

これらの成果の発展・応用として、本研究では(1)新しい相補的タンパク質再構成法の確立、および(2)プロテアーゼ活性を検出するための環状ルシフェラーゼを開発する。(1)の開発により、「タンパク質の再構成法」に基づく

生体分子動態を高精度で解析できると期待される。(2)は、これまでに報告例がない環状ルシフェラーゼを開発し、プロテアーゼ活性を高感度および高精度で検出できることを実証する。

## 3. 研究の方法

### (1) 新しい相補的タンパク質再構成法の確立

ジャマイカ産ヒカリコメツキムシ由来の赤色発光ルシフェラーゼ(CBR)は、動物組織を効率よく透過する赤色発光を呈する。CBR を適切な位置で分割した CBR 断片は発光活性を示さないが、CBR 断片同士が近接すると、再び発光活性を回復する。

これらの CBR 断片を用い、生きた細胞内でのホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸(PIP3)産生の高感度で可視化検出するためのインジケーターを作製した。細胞膜近傍で産生される PIP3 を認識するプレクストリン相同ドメイン(PHD)に CBR 断片および赤色蛍光タンパク質 mCherry を遺伝子工学的手法で連結する。もう一方の CBR 断片に緑色蛍光タンパク質 GFP および細胞膜局在シグナルを連結する。蛍光タンパク質の蛍光強度を内部標準として再構成した CBR 発光活性を評価することで、精度および感度の高いアッセイが可能である。

### (2) 細胞外のプロテアーゼ活性を検出するための環状ルシフェラーゼ

動物組織を効率よく透過する赤色発光を呈する CBR を用い、タンパク質分解酵素プロテアーゼの1つであるカスパーゼ-3の活性を検出するインジケーターを作製した。

カスパーゼ-3 が認識・切断するアミノ酸配列でこの CBR のアミノ(N)末端およびカルボ

キシ(C)末端を連結する。両末端を連結して環状化した CBR の立体構造ははずんでおり、本来の発光活性を失っている。カスパーゼ-3 が活性化して環状 CBR 内のペプチド配列を切断すると、環状 CBR の立体構造のひずみが解消し、発光活性を回復する。この発光活性の回復を指標に、カスパーゼ-3 活性を評価することができる。

また、CBR を緑色発光ルシフェラーゼ (CBG) に、カスパーゼ-3 が認識・切断する部位をカスパーゼ-8 が認識・切断する部位に変更した環状 CBG も作製した。

#### 4 . 研究成果

##### (1) 新しい相補的タンパク質再構成法の確立

作製したインジケーター対を、ほ乳類培養細胞に発現させた。インジケーター対を発現する細胞を血小板由来増殖因子 (PDGF) で刺激したところ、細胞膜近傍での PIP3 産生に基づく発光活性の回復が観察された。

また、本研究で開発したインジケーターを用いれば、1 細胞レベルでの PIP3 産生を顕微鏡下で観察できるだけでなく、96 穴マイクロタイタープレートを用いたハイスループット様アッセイも可能であることを実証した (*Anal. Chem.*, 2013, 85, 11352–11359)。内部標準として、GFP を用いることで、生体分子動態の高精度な検出が可能となった。

##### (2) 細胞外のプロテアーゼ活性を検出するための環状ルシフェラーゼ

作製した環状 CBR をほ乳類培養細胞に発現させた。このインジケーターを発現する細胞を、アポトーシス誘導剤である抗 Fas 抗体およびシクロヘキシミド (CHX) で刺激したところ、カスパーゼ-3 活性化に基づく約 20 倍の発光

強度の増大が観察された。また、カスパーゼ-8 活性検出のために作製した CBG をほ乳類培養細胞に発現させた、上記度同様に抗 Fas 抗体および CHX で刺激したところ、カスパーゼ-8 活性化に基づく約 10 倍の発光強度の増大が観察された。

次に、環状 CBR および環状 CBG を安定的に恒常発現する培養細胞を得た。この安定恒常発現細胞のアポトーシスを誘導したところ、カスパーゼ-3 およびカスパーゼ-8 の活性化に基づく赤色発光および緑色発光の増大が観察された。発光強度の増大は、赤色・緑色とも、刺激前の約 100 倍以上に到達した。本手法により、アポトーシス過程におけるカスパーゼ-3 およびカスパーゼ-8 の活性を高感度でリアルタイム検出することに成功した。

#### 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 1 件)

1. L.Z. Yang, Y. Nasu, M. Hattori, H. Yoshimura, A. Kanno, and T. Ozawa, “Bioluminescent Probes to Analyze Ligand-induced Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate Production with Split Luciferase Complementation”, *Anal. Chem.*, 85, 11352– 11359 (2013).

〔学会発表〕(計 1 件)

口頭発表

1. 菅野憲, 竹之内修, 高倉栄男, 小澤岳昌, 「エストロゲンを高感度にリアルタイム検出する発光インジケーターの開発」, 第 72 回分析化学討論会, 鹿児島, 2012 年 5 月

〔図書〕(計1件)

1. 菅野憲, 小澤岳昌(木下修一ほか編), 「発光の事典」, 朝倉書店, *in press*

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

菅野 憲 (Akira KANNO)

富山大学・大学院理工学研究部(工学)・

助教

研究者番号: 60466795