

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710259

研究課題名(和文) 生きた細胞内でのオートファジー発光定量法の開発

研究課題名(英文) Development of bioluminescence methods for monitoring autophagy in living cells

研究代表者

服部 満 (HATTORI, Mitsuru)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：20589858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：細胞中のオートファジーを、生きた細胞で検出するための発光検出系を開発した。発光タンパク質ルシフェラーゼを2断片に分割し、ルシフェラーゼ再構成を利用して、オートファジーの際に形成される小胞「オートファゴソーム」の構成成分にルシフェラーゼ断片を融合させる形でプローブを作製した。プローブをヒト培養細胞に導入したのち、血清およびアミノ酸を除いた培地に置き換えてオートファジーを誘導した。結果、種々のプローブペアは発光を生じた。さらには異なるルシフェラーゼペアを導入する事で、より発光強度の強いオートファジー検出プローブの作製に成功した。

研究成果の概要(英文)：We developed a new bioluminescence monitoring system for detecting autophagy in living cells. We have an optical technique for monitoring protein-protein interactions in living cells based on complementation of split fragments of luciferase. By connecting proteins that composed autophagosome membrane with the luciferase fragments, we were able to develop the system to detect the conformation of autophagosome as a model of autophagy. These probes were induced to human cultured cells and measured the luminescence with serum starvation. Each pairs showed significant increasing of luminescence counts. We also arranged the probes for improving the luminescence intensity. By exchanging the luciferase to other type, the luminescence intensity was increased about 100 times than old types. Consequently, the method enables rapid and reliable approach for the monitoring of autophagy in cells and living subjects.

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：ルシフェラーゼ オートファジー

1. 研究開始当初の背景

細胞の「分解」の経路にはいくつか種類があるが、そのひとつ、オートファジーは膜組織が分解予定成分を包み込み、オートファゴソームと呼ばれる小胞として分解経路へと運ぶ現象である。

オートファジーに関して、その分解作業のメカニズムや、どのように分解する成分を識別しているのか、といった基本的なシステムについては未知の部分が多い。さらにオートファジー解析が困難な理由として、その解析技術が発展していないことも挙げられる。既存の手法では細胞を破壊して定時点での各成分量を確認するだけであり、経時的にオートファジー反応を定量する技術は皆無である。

これまでに申請者は、細胞内タンパク質の動態変化および相互作用を、生きた細胞下で発光反応として検出する手法を開発している。発光検出は定量性に優れており、さらに申請者が用いている手法は従来法と比較して、より定量的な現象に対しても有効である。この技術をオートファジー解析に応用する事によって、これまで困難であったオートファジー反応の定量的検出を実現できる。

2. 研究の目的

細胞中のオートファジーを、細胞が生きた状態で検出するためのプローブおよび検出系を開発する。オートファジー反応において変動する様々なタンパク質の挙動を複数同時に検出できるシステムを開発し、それぞれを数値として置き換えることでオートファジーを定量化する。

3. 研究の方法

発光タンパク質ルシフェラーゼを用いて、オートファジー検出用のプローブを作製する。2断片に分割したルシフェラーゼが接近すると再構成を起し発光が回復する現象を利用する。オートファジーの際に形成される小胞「オートファゴソーム」においてその構成成分にルシフェラーゼ断片を融合させる形でプローブを作製する。オートファゴソームの形成時にプローブ同士が接近することで、オートファジーの進行を発光検出する。

4. 研究成果

(1)ヒカリコメツキムシ由来ルシフェラーゼを用いたプローブの開発

はじめに、ホタルルシフェリン系のルシフェラーゼ種のなかでも最も発光値が高いヒカリコメツキムシ由来緑ルシフェラーゼ (Emerald Luc) を選択し、プローブ開発を行った。Emerald Lucの再構成系での切断位置は既に決定されているため、オートファジー関連遺伝子とPCRおよびライゲーション法を用いてベクター上で融合した。オートファジー関連遺伝子として、当初は、オートファゴソームの形成時の膜成分である「LC3」および、オートファゴソームがリソソームと融合するタイミングを捉えるためリソソーム膜上の「LAMP-1」をターゲットと定めプローブの作製を行った。しかしながら、オートファジーの後期ステップのみの検出では、オートファジーの全容を捉えるには不十分であるとの理由から、オートファジー初期における膜タンパク質DFCP-1や、シグナルタンパク質ATG14などもターゲットとして導入する事とした。

精製したほ乳類細胞発現ベクターをヒト培養細胞に導入したのち、その発光値を確認した。オートファジーは培地の栄養条件が劣悪になった場合に誘導されることから、血清およびアミノ酸を除いた培地に置き換えて培養を行った。作製した発光プローブは、LC3とLAMP-1のペアも、その他の各種組み合わせも、細胞に導入した結果発光を生じた。さらにはオートファジーを誘導する各種刺激に対しても明確に反応を示した。従い当初の予定通り、プロトタイプとなる発光プローブの開発を実現した。ただし、貧栄養下では細胞自体の活性も低下しているため、内在コントロールとして、ウミシイタケ由来ルシフェラーゼの全長を同時に導入することにした。ウミシイタケ由来ルシフェラーゼの発光値でプローブの発光値を補正した結果、やはり貧栄養下でプローブの発光値が上昇していることが確認された。従って、ルシフェラーゼの発光値を補正するため、Emerald Lucの波長とは異なる別のルシフェラーゼを同時に細胞に導入する必要がある。

(2) NanoLucを用いたプローブの開発

現時点でのプローブの発光強度は最低限の感度を満たしているが、細胞イメージングなどの用途には向いていない。また、細胞内環境の変化に発光強度が影響を受け易い。そこで、発光強度が強く且つ安定しているNanoLucルシフェラーゼを導入した。NanoLucは再構成法上での最適な切断位置が決定されていないため、まず、NanoLucの再構成法上での最適な切断位置を決定した。切断位置の予測に関しては、先行論文を参

照し、アミノ酸配列の特徴、極性から候補位置を選出して随時確認した。最終的に決定した切断位置でNanoLucを分断し、オートファジー関連遺伝子と融合させて細胞用発現ベクターを作製した。精製した発現ベクターをヒト培養細胞に導入したのち、その発光値を確認した。その結果、オートファジーの誘導により、Emerald Lucプローブと比較して、100倍以上の発光値が観測された。

(3) pH変化の検出をベースにしたオートファジー検出プローブの開発

ルシフェラーゼ再構成法を、オートファゴソーム形成時のタンパク質間相互作用ではなく、膜環境変化を捉える目的で新規にプローブを開発した。植物の光応答性タンパク質Phototropin1内のLOV-J α タンパク質領域は、青色光刺激によって構造が変化したのち再び元に回復する性質がある。この回復速度はpH値に依存している。そこで、2断片に分割したルシフェラーゼタンパク質をそれぞれLOV-J α のN末端、C末端へ連結する。暗所では両断片が接近し、ルシフェラーゼ再構成の原理により発光する。青色光照射によってLOV-J α の構造変化が起こると、再構成が解除され発光値は減少するが、構造の回復と共に発光値も回復する。この発光値の回復時間を計測する事で、pH変化を検出する。オートファゴソーム膜内のpHは外部に比べて酸性に保たれているため、同プローブを局在させた場合、回復時間の変化によって、オートファゴソーム形成の度合い、すなわちオートファジーの進行程度を見積もることが可能となる。

作製したプローブを培養細胞へ導入して、顕微鏡下で観察しながら、光刺激を行い発光回復現象を誘導した。さらにこの回復時間から、細胞内pHを計算するプログラムを開発し、新規なpHイメージング法を確立した。オートファジーの誘導によって、このpHイメージが酸性に傾くことが確認された。したがって、オートファジー進行がpH変化を介して検出できることを証明した。

また、同プローブを生きたマウス皮下に導入して、オートファジーが起きる要因の一つである、低酸素環境を作り出し、その際のpH変化も観察した。導入したマウス脚の血管をクリップで虚血して、低酸素環境を作り出した結果、pHの低下がやはり観察され、さらには虚血解除によるpHの回復も確認できた。従って、オートファジーにおけるオートファゴソームの形成を介して、個体下においてもオートファジー環境の変化を捉える事が可能であると期待された。

この成果は、発表論文 を中心に公表した。

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5件)

Yang, L. Z., Nasu, Y., Hattori, M., Yoshimura, H., Kanno, A. and Ozawa, T.
Bioluminescent Probes to Analyze Ligand-induced Phosphatidylinositol 3,4,5- trisphosphate Production with Split Luciferase Complementation
Anal. Chem., **85**, 11352-11359 (2013)
DOI: 10.1021/ ac402278f, 査読有り

Tamaru, T., Hattori, M., Ninomiya, Y., Kawamura, G., Vares, G., Honda, K., Mishra, D. P., Wang, B., Benjamin, I., Sassone- Corsi, P., Ozawa, T. and Takamatsu, K.
ROS stress resets circadian clocks to coordinate pro- survival signals.
PLoS ONE, **8**, e82006 (2013)
DOI: 10.1371/ journal.pone.0082006, 査読有り

Hattori, M., Haga, S., Takakura, H., Ozaki, M. and Ozawa, T.
Sustained Accurate Recording of Intracellular Acidification in Living Tissues with a Photo-controllable Bioluminescent Protein
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **110**, 9332-9337 (2013)
DOI: 10.1073/ pnas.1304056110, 査読有り

Hattori, M., Tanaka, M., Takakura, H., Aoki, K., Miura, K., Anzai, T. and Ozawa, T.
Analysis of temporal patterns of GPCR- β -arrestin interactions using split luciferase-fragment complementation
Mol. BioSyst., **9**, 957-964 (2013)
DOI: 10.1039/ C2MB25443C, 査読有り

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

[学会発表](計10件)

服部満, 田中みほ, 高倉栄男, 小澤岳昌
Bioluminescence analysis of relationship between the class of GPCR and temporal pattern of GPCR– β - arrestin interaction
日本化学会第94春季年会
2014年03月28日 名古屋大学東山キャンパス(愛知県)

田丸輝也, 服部満, 二宮康晴, 河村玄気,
小澤岳昌, 高松研
時計リセットシグナルによるROSストレス
応答系の制御
第20回日本時間生物学会学術大会
2013年11月09日 近畿大学東大阪キャンパス
(大阪府)

山田俊理・吉村英哲・服部満・小澤岳昌
生きた細胞内における内在性テロメアRNA
の一分子動態解析
日本生物物理学会第51回年会
2013年10月28日 国立京都国際会館(京都府)

服部満, 芳賀早苗, 高倉栄男, 尾崎倫孝,
小澤岳昌
光応答性ルシフェラーゼによる生きた組織
下でのpH時間変化モニタリング法の開発
日本分析化学会第62年会
2013年09月12日 近畿大学東大阪キャンパス
(大阪府)

遠藤瑞己・服部満・小澤岳昌
受容体タンパク質DCC の光制御法の開発と
その神経軸索誘導への応用
日本化学会第93回春季年会
2013年03月25日 立命館大学 びわこ・くさ
つキャンパス(滋賀県)

山田俊理・吉村英哲・服部満・小澤岳昌
緑色蛍光タンパク質を利用した生細胞内テ
ロメアRNA可視化法の開発
日本化学会第93回春季年会
2013年03月23日 立命館大学 びわこ・くさ
つキャンパス(滋賀県)

田丸輝也・服部満・小澤岳昌・高松研
概日リン酸化オシレーターによる翻訳後修飾
系の統合制御
第19回日本時間生物学会学術大会
2012年12月14日 福岡国際会議場、マリンメ
ッセ福岡 (福岡県)

田丸輝也・服部満・小澤岳昌・高松研
ヒートショック応答系による概日リズムの
リセット
第35回日本分子生物学会年会
2012年09月15日 北海道大学学術交流会館
(北海道)

遠藤瑞己・服部満・小澤岳昌

Development of light- induced protein- protein
homodimerization system to control axon
guidance with blue light
RSC Tokyo International Conference, JASIS
Conference
2012年09月06日 幕張メッセ (千葉県)

服部満・芳賀早苗・高倉栄男・尾崎倫孝・
小澤岳昌
New imaging system for monitoring an acidic
environment in living tissue by photo- reactive
luciferase
RSC Tokyo International Conference, JASIS
Conference
2012年09月06日 幕張メッセ (千葉県)

〔図書〕(計1件)

服部満, 田中みほ, 小澤岳昌
“GPCRに作用する化合物のスクリーニング”
中外医学社 Clinic Neuroscience 32 (2)
p128-129 (2014)

〔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

服部 満 (HATTORI, Mitsuru)
東京大学・大学院理学系研究科・特任研究
員
研究者番号: 20589858

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし