

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K01922

研究課題名（和文）細胞内シグナルの多次元情報を獲得するマルチカラーバイオセンサー開発

研究課題名（英文）Development of genetically-encoded multi-color biosensors for intracellular signaling

研究代表者

北口 哲也 (Kitaguchi, Tetsuya)

東京工業大学・科学技術創成研究院・准教授

研究者番号：60432374

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）： 蛍光タンパク質を基盤とした遺伝子コード型単色のセンサーの開発に成功した。本研究課題により細胞内情報伝達物質であるcGMP、cAMP、代謝関連物質であるATP、グルコースの細胞内動態をリアルタイムで可視化できるようになった。これらのセンサーは緑、赤、青などの蛍光色をもち、複数の分子の同時可視化へ適用できることから、相互作用や階層的機能相関を明らかにできるようになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで単色で可視化できる遺伝子コード型センサーの種類は少なく、マルチカラーイメージングによる複数分子の同時解析は困難であった。本研究課題で開発した、cGMP、cAMP、ATP、グルコースのセンサーはマルチカラーイメージングに適用できるため、学術的意義は大きいと考えられる。また、センサー開発過程で蓄積したノウハウにより、以前よりシステムティックにセンサー開発ができるようになった。センサーは社会生活のさまざまな場面で利用できるため、センサーが自由自在に作出できることは社会的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）： I have succeeded in developing genetically-encoded intensimetric sensors based on fluorescent proteins. These sensors enable us to visualize the intracellular dynamics of signaling molecules such as cGMP and cAMP, and metabolic molecules such as ATP and glucose by real time live-cell imaging. Furthermore, since these sensors have multiple colors such as green, red, and blue, several molecules can be simultaneously visualized by multi-color imaging. Therefore, they are able to clarify interactions and hierarchical relationships between intracellular molecules.

研究分野： バイオイメージング

キーワード： 蛍光タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

蛍光タンパク質を基盤としたセンサーは FRET 型のものがメインに開発されていた。蛍光タンパク質を 2 つ用いる FRET 型に対して、1 つだけである Single-FP 型センサーはあまり開発されておらず、また開発方法も整備されていなかった。2 色の蛍光を測定する FRET 型に比較して、Single-FP 型センサーは蛍光色が 1 色であり光学顕微鏡での検出が容易であることから、2 つの分子の相互作用や階層的機能相関を解析するマルチカラーイメージングに適しており、さらに多くのセンサーが開発されていくことが望まれていた。

## 2. 研究の目的

細胞内情報伝達や代謝関連分子の Single-FP 型のセンサーを開発する。また緑色だけでなく、赤色、青色のセンサーを開発し、マルチカラー化を目指す。細胞内情報伝達物質としてセカンドメッセンジャーの cAMP と cGMP、代謝関連分子としては ATP とグルコースに着目して細胞内動態を可視化するセンサーを創出する。さらに、センサー開発過程で蓄積したノウハウを可能な限り一般化し、Single-FP センサー開発方法を構築することを目的とする。

## 3. 研究の方法

Single-FP のセンサーを構築するために、分子認識するドメインと光を発するドメインが必要である。cAMP センサーは cAMP 依存性のグアニンヌクレオチド交換因子 Epac1 より、cGMP センサーはフォスフォジエステラーゼ 5 より、ATP センサーは枯草菌の ATP 合成酵素  $\epsilon$  サブユニットより、グルコースセンサーは大腸菌のグルコーストランポーター MalB より、それぞれの結合ドメインをセンサーの分子認識ドメインとして利用する。光を発するドメインは緑色蛍光タンパク質 GFP、赤色蛍光タンパク質 mApple、青色蛍光タンパク質 BFP を利用する。まずは蛍光タンパク質の発色団近傍に分子認識ドメインを挿入しプロトタイプを作製した。そのあと蛍光タンパク質と分子認識ドメイン間のリンカーの長さのアミノ酸配列を最適化することで、変化率を増大させ、センサーを完成させた。完成したセンサーを大腸菌で発現させ、センサータンパク質を精製したあと、分光光度計および蛍光分光光度計でスペクトルを測定した。次に、センサーを動物細胞に発現させ、光学顕微鏡によりライブセルイメージングを行った。

## 4. 研究成果

### ・緑色 cGMP センサー

細胞内の cGMP の動態を緑色蛍光で可視化するセンサー Green cGull を開発した。ダイナミックレンジは 7.5 倍であり、既存のセンサー (1.8 倍) より飛躍的に変化率が向上

している。HEK293 細胞に赤色のカルシウム指示薬 Rhod2 と共導入し、NO ドナーの SNAP で刺激したところ、cGMP の上昇とカルシウムオシレーションを同時に単一細胞で可視化することに成功した。

#### ・赤色 cAMP センサー

細胞内の cAMP の動態を赤色蛍光で可視化するセンサー Pink Flamindo を開発した。これまで cAMP を単色蛍光で検出するセンサーとしては我々の開発した Flamindo があつたが、検出が緑色蛍光のみであつたため、多色観察やオプトジェネティクスとの併用が困難であつた。Pink Flamindo を用いて、緑カルシウムセンサーとのデュアルカラーイメージング、光活性化型アデニル酸シクラーゼとの併用、マウス個体における *in vivo* イメージングに成功した。

#### ・緑、赤、青色 ATP センサー

ATP に特異的に結合するタンパク質と、蛍光タンパク質をペプチドリンカーで繋ぎ結び、長さや構成するアミノ酸の種類を独自の手法で最適化することで、青・緑・赤色の蛍光 ATP センサーを開発した。そして、この蛍光 ATP センサーを自在に組み合わせることで、従来の技術では原理的に極めて困難であつた「同じ細胞内の異なる場所の ATP の動態の同時観察」や、「ATP 以外の他のシグナルやタンパク質の動態との同時観察」に成功した。

#### ・緑グルコースセンサー

グルコースを検出するセンサー Green Glifon を開発した。EC50 の異なる 3 種類のセンサーの構築に成功し、広範囲の濃度を検出できる。このセンサーは培養細胞だけでなく線虫個体のグルコース濃度変化を可視化でき、また 2 色イメージングにも適用可能であつた。また血漿中のグルコース濃度の定量もできることから、臨床検査への応用も期待できた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Arai Satoshi, Kriszt Rokus, Harada Kazuki, Looi Liang-Sheng, Matsuda Shogo, Wongso Devina, Suo Satoshi, Ishiura Shoichi, Tseng Yu-Hua, Raghunath Michael, Ito Toshiro, Tsuboi Takashi, Kitaguchi Tetsuya	4. 巻 57
2. 論文標題 RGB-Color Intensiometric Indicators to Visualize Spatiotemporal Dynamics of ATP in Single Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 10873~10878
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201804304	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Wongso Devina, Dong Jinhua, Ueda Hiroshi, Kitaguchi Tetsuya	4. 巻 89
2. 論文標題 Flashbody: A Next Generation Fluobody with Fluorescence Intensity Enhanced by Antigen Binding	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 6719-6725
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.7b00959	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Harada Kazuki, Ito Motoki, Wang Xiaowen, Tanaka Mika, Wongso Devina, Konno Ayumu, Hirai Hirokazu, Hirase Hajime, Tsuboi Takashi, Kitaguchi Tetsuya	4. 巻 7
2. 論文標題 Red fluorescent protein-based cAMP indicator applicable to optogenetics and in vivo imaging	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-07820-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 北口哲也	4. 巻 7月24日号
2. 論文標題 蛍光蛋白質センサーをテララーメード化	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日経バイオテク	6. 最初と最後の頁 42-45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shogo Matuda, Kazuki Harada, Motoki Ito, Mai Takizawa, Devina Wongso, Takashi Tsuboi and Tetsuya Kitaguchi.	4. 巻 2
2. 論文標題 Generation of a cGMP indicator with an expanded dynamic range by optimization of amino acid Linkers between a fluorescent protein and PDE5 .	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ACS Sensors	6. 最初と最後の頁 46-51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssensors.6b00582	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 北口哲也	4. 巻 27
2. 論文標題 蛍光・発光プローブ	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 光アライアンス	6. 最初と最後の頁 15-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Marie Mita, Motoki Ito, Kazuki Harada, Izumi Sugawara, Hiroshi Ueda, Takashi Tsuboi and Tetsuya Kitaguchi.	4. 巻 91
2. 論文標題 Green fluorescent protein-based glucose indicators report glucose dynamics in living cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 4821-4830
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.9b00447	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Marie Mita, Motoki Ito, Kazuki Harada, Izumi Sugawara, Hiroshi Ueda, Takashi Tsuboi and Tetsuya Kitaguchi.
2. 発表標題 Single fluorescent protein-based sensors visualize dynamics of glucose by live cell imaging.
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石田りか、三田真理恵、原田一貴、上田宏、北口哲也、坪井貴司
2. 発表標題 赤色蛍光タンパク質を用いたcGMP蛍光センサーの生細胞イメージングへの応用
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菅原和、伊藤幹、三田真理恵、上田宏、坪井貴司、北口哲也
2. 発表標題 赤色蛍光グルコースセンサーによる細胞内グルコース動態の可視化
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 早坂優希、上田宏、北口哲也、坪井貴司
2. 発表標題 緑色蛍光タンパク質を用いたピルビン酸センサーの開発
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 相木彩希、上田宏、北口哲也、坪井貴司
2. 発表標題 Turn-on型の高輝度変化率を有する緑色cAMPセンサーの開発
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 相原寛史、Devina Wongso、董金華、上田宏、北口哲也
2. 発表標題 抗体を分子認識ドメインとする遺伝子コード型蛍光タンパク質プローブの開発
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Devina Wongso, Jinhua Dong, Hiroshi Ueda and Tetsuya Kitaguchi.
2. 発表標題 Flashbody: genetically-encoded antibody-based fluorescent probe with antigen dependent fluorescence intensity.
3. 学会等名 第17回蛋白質科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hideki Itoh, Satoshi Arai, Thankiah Sudhaharan, Tetsuya Kitaguchi and E. Birgitte Lane.
2. 発表標題 Hideki Itoh, Satoshi Arai, Thankiah Sudhaharan, Tetsuya Kitaguchi and E. Birgitte Lane. Single-cell quantitative analysis of ATP concentration by fluorescence lifetime imaging microscopy.
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三田真理恵、伊藤幹、原田一貴、上田宏、坪井貴司、北口哲也
2. 発表標題 蛍光タンパク質を用いた単色型グルコース可視化センサーの開発
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 石田りか、三田真理恵、原田一貴、上田宏、北口哲也、坪井貴司
2. 発表標題 赤色蛍光タンパク質を用いたcGMP蛍光センサーの開発
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊藤幹、原田一貴、Devina Wongso、坪井貴司、北口哲也
2. 発表標題 赤色蛍光タンパク質を用いた生体内cAMP可視化プローブの開発
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 松田翔吾、原田一貴、伊藤幹、滝澤舞、Devina Wongso、坪井貴司、北口哲也
2. 発表標題 蛍光タンパク質を用いた単色型cGMP可視化プローブの開発
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Kazuki Harada, Motoki Ito, Xiaowen Wang, Mika Tanaka, Devina Wongso, Hajime Hirase, Takashi Tsuboi and Tetsuya Kitaguchi.
2. 発表標題 A red fluorescent protein-based cAMP indicator for dual color imaging, optogenetic manipulations and in vivo imaging.
3. 学会等名 第94回日本生理学会大会
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 三田真理恵、伊藤幹、原田一貴、菅原和、上田宏、坪井貴司、北口哲也
2. 発表標題 生細胞内のグルコース動態を検出する遺伝子コード型緑色蛍光センサーの創出
3. 学会等名 2019年度日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三田真理恵、伊藤幹、原田一貴、菅原和、永田怜、芦田翼、上田宏、坪井貴司、北口哲也
2. 発表標題 緑色蛍光グルコースセンサーが検出する人工甘味料による膵 細胞のグルコース恒常性攪乱
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 千原貴美、三田真理恵、菅原和、相木彩希、早坂優希、原田一貴、上田宏、北口哲也、坪井貴司
2. 発表標題 蛍光タンパク質を用いた緑色蛍光輝度変化型乳酸センサーの開発
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相原寛史、Yanyan Hou、上田宏、伊藤寿朗、北口哲也
2. 発表標題 生細胞イメージングを目指した遺伝子コード型ジベレリンプローブの開発
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	坪井 貴司  (Tsuboi Takashi)  (80415231)	東京大学・大学院総合文化研究科・教授   (12601)	
研究 分担者	上田 宏  (Ueda Hiroshi)  (60232758)	東京工業大学・科学技術創成研究院・教授   (12608)	