

平成22年 6月 7日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18350045
 研究課題名 (和文) 生体内情報伝達分子の可視化検出法に関する研究
 研究課題名 (英文) Study of the methods for visualizing intracellular signaling molecules
 研究代表者
 小澤 岳昌 (OZAWA TAKEAKI)
 東京大学・大学院理学系研究科・教授
 研究者番号：40302806

研究成果の概要 (和文)：本研究では、蛍光タンパク質 GFP とその誘導体、および発光タンパク質の一つであるルシフェラーゼを情報変換分子として、我々がこれまで開発した「タンパク質再構成法」を展開・応用し情報伝達分子の可視化法に関する研究を行った。ルシフェラーゼをプロテインスプライシングにより環状化した新たなプローブ設計の原理や、タンパク質間相互作用を時空間解析する分割ルシフェラーゼの開発など、新規なプローブ開発の概念を創出した。本成果は、生理機能の解明に大きく貢献することが期待できる。

研究成果の概要 (英文)：In the present study, we studied the development of optical probes for visualizing bio molecules using luciferases, GFP and its spectral variants based on protein reconstitution methods. Moreover, we generated new concepts for molecular imaging such as luciferase cyclization by protein splicing and spatiotemporal analysis of protein-protein interactions based on split luciferase complementation. These results are expected to contribute to resolving biological function in live cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2007年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2008年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	8,300,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：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, バイオテクノロジー, 分析化学, 生体分子

1. 研究開始当初の背景

遺伝子産物である RNA やタンパク質の構造と機能を網羅的に明らかにすること、さらに個々の生体分子の細胞内や動物個体内での動態を詳細に解明することは、現在の生命科学研究において最も重要な課題となってい

る。この課題を解決し生命をより深く理解するためには、電気泳動や質量分析法など多種多様な分析の基盤技術の更なる開発と発展が必要である。特に近年台頭した、物質と電磁波との相互作用を巧みに利用し生物が生きた状態で特定の生体分子を時空間解析す

る、いわゆる“分子イメージング (molecular imaging)”は、生命科学の研究手法に新たな光を投げている。これまでの生化学的研究法では、特定時間における状態の記述しかできず、生体内で起こる現象の時間変化を追跡することは困難であった。分子イメージングは、生体分子のダイナミックな動きを視覚化するための極めて有力な基盤技術として大きな期待が持たれている。分子イメージングの今後の発展には、生体分子の時間・空間的解析を目的として、標的分子を特異的に認識し電磁波に情報変換する“プローブ”の開発が必要不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、我々独自に開発したタンパク質再構成法を基に、生きた細胞や動植物個体内の生体分子の機能や動態を、蛍光あるいは生物発光により可視化する新たな機能性分子と検出方法の創案・開発を目的とした。本研究期間中に達成する研究内容として、次の1～4の研究項目を掲げた。

1. RNA 検出プローブの開発とオルガネラタンパク質網羅解析法の確立

2. ペプチド切断酵素活性化検出プローブの開発

3. ステロイドホルモン検出プローブの開発

4. 三分子間タンパク質相互作用検出法の開発

開発するプローブ分子を用いて、マウスと植物個体内で機能する生体分子の低侵襲的イメージング法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

タンパク質の立体構造に関する情報を下にプローブ分子の分子設計を行った。目的のタンパク質をコードする遺伝子を作製し、大腸菌発現ベクターあるいは動物細胞発現ベクターに挿入した。目的の細胞にプローブ分子を発現させ、独自に改良を加えた蛍光顕微鏡、発光顕微鏡、および生物個体イメージング装置などにより、プローブの機能評価を行った。また、タンパク質の発現や機能評価のために、western blot や免疫染色などの生化学実験を遂行した。

4. 研究成果

1. RNA 検出プローブの開発とオルガネラタンパク質網羅解析法の確立

(a) 蛍光タンパク質 GFP フラグメントの再構成に基づく、細胞内在性の mRNA を可視化する蛍光プローブを開発した。RNA 結合タンパク質 Pumilio (PUM) を RNA 分子認識素子とし、PUM の 2 分子に分割 GFP フラグメントを連結した。ミトコンドリアに局在する ND6 mRNA を標的とし、GFP 再構成法により特異的に標識することに成功した。ND6 mRNA のミトコン

ドリア内局在および動態を明らかにした。

(b) ミトコンドリアのマトリックスと膜間腔に輸送されるタンパク質を、簡便に識別する新規蛍光プローブおよびスクリーニング法を開発した。膜間腔局在タンパク質 Smac を用いて、mutation library から膜間腔局在に必要とするシグナルペプチド配列を同定した。さらに同定したシグナルペプチドは、pH プローブや Ca²⁺プローブや抗体など、様々なプローブタンパク質を膜間腔に局在させることが可能であることを実証した。

2. ペプチド切断酵素活性化検出プローブの開発

生物発光タンパク質 (ルシフェラーゼ) の N 末端と C 末端を連結し、環状構造を有する新たな発光プローブの概念を創出した。ルシフェラーゼの N 末端と C 末端をプロテインスプライシングにより連結した。この環状ルシフェラーゼは発光能が失われていることを確認した。次にペプチド切断酵素 (caspase-3) を作用させると、環状ルシフェラーゼの一部が切断され、発光能が回復することを明らかにした。この環状ルシフェラーゼは、マウス個体内で機能する caspase-3 の活性を低侵襲的に可視化する優れたプローブとなることを実証した。

3. ステロイドホルモン検出プローブの開発

男性ホルモンリセプター (AR) とそれに相互作用する Src タンパク質との相互作用を、分割ルシフェラーゼの再構成法により検出する新規発光プローブを開発した。ホタル由来のルシフェラーゼの N 末フラグメントには AR を、C 末フラグメントには Src を連結した。細胞にステロイドホルモンの一つである dihydroxytestosterone (DHT) を添加すると、AR-Src 間相互作用により、ルシフェラーゼのフラグメントが再構成し、発光強度が上昇することを立証した。様々なステロイドホルモンを試みた結果、testosterone が DHT 同様に AR-Src 間相互作用を誘起することがわかった。一方 estradiol には全く応答しないことを示した。

4. 三分子間タンパク質相互作用検出法の開発

タンパク質 A-B 間相互作用とタンパク質 A-C 間相互作用を、ルシフェラーゼの発光スペクトルにより同時検出可能なプローブを開発した。ホタル由来のルシフェラーゼの C 末側のドメインにアミノ酸変異を加え、コメツキムシ由来の緑のルシフェラーゼおよび赤のルシフェラーゼの N 末側ドメインいずれにも、再構成可能であることを実証した。開発したプローブを用いて、Bad のリン酸化を簡便にアッセイする方法を開発した。さらに Smad1

のリン酸化とそれに続く Smad4 とのタンパク質間相互作用検出プローブを開発した。mRNA を4細胞期のアフリカツメガエル胚にインジェクションしプローブを一過的に発現させ、初期発生における Smad1-Smad4 相互作用の発光イメージングを行った。神経胚の神経溝に発光が生じ、発光が尾芽胚まで持続していることを明らかにした。

今後の展望について

研究開始時に計画した4つの研究計画に対し、いずれも期待以上の成果を収めることができた。特に本研究を遂行する中で、3つの大きな研究の進展があった。第一は、mRNA の可視化プローブの開発とその応用である。本成果は Nature Methods の表紙を飾り直ぐに国外で応用研究が報告され、RNA のイメージング技法に革新をもたらした。第二は、環状ルシフェラーゼプローブの創出である。タンパク質をプロテインプライミングで環状にする発想は斬新で独創的であり、実用性においても非常に優れていることがその後の国内外の研究で立証されている。現在はプローブを臓器特異的に発現するマウスの作製が進行しており、今後医学研究への大きな貢献が期待できる。また国内特許はすでに取得しており、産業への応用も期待できる。第三は、新たなルシフェラーゼフラグメントの作製である。ツメガエル卵の中で起こる競争的タンパク質間相互作用を、独自に開発したプローブでリアルタイムイメージングに成功したことは、タンパク質間相互作用の研究に新たな道を開拓したといえる。

今後の展望として、開発したプローブは、基礎研究や薬物のスクリーニングなど様々な用途に利用可能である。中でも物質の探索、バリデーション、前臨床試験における分子イメージング技術を活用した新規アッセイ系は、創薬研究の効率化に大きく寄与するため、特に注目が集まっている。今後は、基礎医学や薬学におけるニーズに応じたプローブ試薬やアッセイ系のデザインを行い、実用的なステージにまで開発する予定である。またプローブ発現トランスジェニック動物は、様々な分野で応用展開が期待できるため、共同研究を通じて今後作製していく予定である。またアカデミックユーザーにも多く利用して頂き、プローブの実績が蓄積されればプローブの問題点も具現化され、更なるプローブ開発につながることを期待できる。また新たな生命現象の発見につながれば、その発見を基に新規な可視化ターゲットが現れるため、基盤技術から生命科学研究への技術的フィードバックに加え、基礎生命科学研究と可視化技術開発との相乗効果が期待できる。

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 16 件)

- (1) High-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). (査読有り)
- (2) Cyclic Luciferase for Real-Time Sensing of Caspase-3 Activities in Living Mammals. A. Kanno, Y. Yamanaka, H. Hirano, Y. Umezawa and T. Ozawa, *Angew. Chem. Int. Ed.* 46, 7595-7599 (2007). (査読有り)
- (3) Nongenomic Activity of Ligands in the Association of Androgen Receptor with Src. S.B. Kim, A. Kanno, T. Ozawa, H. Tao and Y. Umezawa, *ACS Chem. Biol.*, 2, 484-492 (2007). (査読有り)
- (4) Imaging Dynamics of Endogenous Mitochondrial RNA in Single Living Cells. T. Ozawa, Y. Natori, M. Sato and Y. Umezawa, *Nature Methods*, 4, 413-419 (2007). (査読有り)
- (5) A Minimal Peptide Sequence That Targets Fluorescent and Functional Proteins into the Mitochondrial Intermembrane Space. T. Ozawa, Y. Natori, Y. Sako, H. Kuroiwa, T. Kuroiwa and Y. Umezawa, *ACS Chem. Biol.*, 2, 176-186 (2007). (査読有り)
- (6) A Proinflammatory Cytokine Sensor Cell for Assaying Inflammatory Activities of Nanoparticles. S.B. Kim, T. Ozawa, H. Tao and Y. Umezawa, *Anal. Biochem.*, 362, 148-150 (2007). (査読有り)
- (7) Methods for Imaging and Analyses of Intracellular Organelles Using Fluorescent and Luminescent Proteins. M. Takeuchi and T. Ozawa, *Anal. Sci.*, 23, 25-29 (2007). (査読有り)
- (8) Genetically Encoded Optical Probe for Detecting Release of Proteins from Mitochondria toward Cytosol in Living Cells and Animals. A. Kanno, T. Ozawa and Y. Umezawa, *Anal. Chem.*, 78, 8076-8081 (2006). (査読有り)
- (9) A Method for Determining the Activities of Cytokines based on the Nuclear Transport of Nuclear Factor- κ B. S.B. Kim, Y. Natori, T. Ozawa, H. Tao, Y. Umezawa, *Anal. Biochem.*, 359, 147-149 (2006). (査読有り)

(10) Intein-Mediated Reporter Gene Assay for Detecting Protein-Protein Interactions in Living Mammalian Cells. A. Kanno, T. Ozawa, Y. Umezawa, *Anal. Chem.*, 78, 556-560 (2006). (査読有り)

(11) Designing Split Reporter Proteins for Analytical Tools. T. Ozawa, *Anal. Chim. Acta*, 556, 58-68 (2006). (査読有り)

他, 査読付き論文 5 編

[学会発表] (計 37 件)

国際学会 (依頼・招待)

(1) Fluorescence and bioluminescence biomolecular imaging: From single cells to living subjects. T. Ozawa, 11th International Symposium of Spectroscopical Society of Japan, Sendai, November (2008).

(2) Optical Imaging of Biomolecules in Living Cells and Animals Using Split-Reporter Reconstitution Analysis. T. Ozawa, 1st Workshop in the Advanced Light Microscopy (DKFZ), Heidelberg, October (2008).

(3) Visualization of Biomolecules Using Split Reporter Reconstitution; From a Single Cell to Living Animals. T. Ozawa, International Symposium of Institute for Innovative Cancer Research, Seoul, October (2008).

(4) Optical Imaging of Biomolecules in Living Cells and Animals Using Split-Reporter Reconstitution Analyses. T. Ozawa, 3rd International Workshop on Approaches to Single Cell Analysis, Zurich, September (2008).

(5) Visualization of Biomolecules in Living Cells Using Split-reporter Reconstitution Analysis. T. Ozawa, NIPS-JST International Workshop [Advanced Nonlinear Imaging & Fluorescence-based Biosensors], Aichi, April (2008).

(6) Protein Engineering for Biomolecular Imaging. T. Ozawa, Tateshina Conference 2007, Nagano, Nov (2007).

(7) Visualization of organelle-localized proteins in living cells using split-reporter reconstitution analysis. T. Ozawa, VII European Symposium of the Protein Society, Stockholm, Sweden, May (2007).

(8) Imaging Biomolecules in Living Cells and Animals Using Split-Reporter Reconstitution Analysis. T. Ozawa, 1st International Symposium on Nanomedicine, Aichi, April (2007).

(9) Genetic approaches to identifying mitochondrial proteins and their localization. T. Ozawa, Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine, Seoul, Korea, February (2007).

(10) Design of split reporter proteins for biomolecular imaging. T. Ozawa, Korean Society

of Medical Biochemistry and Molecular Biology, Seoul, Korea, October (2006).

他, 国内 (招待・依頼) 講演 27 件

[図書] (計 5 件)

(1) 「クラゲから生まれた GFP 革命」小澤岳昌, 宮脇敦史, 現代化学 (12 月号), p25-28, 東京化学同人 (2008).

(2) 「可視化プローブによる時空間情報を損なわないミトコンドリア RNA の動態観察」小澤岳昌, ナノイメージング, 第 4 編 1-1, p199-206, エヌ・ティー・エス (2008).

(3) 「生理機能を可視化する新たな分子プローブ」小澤岳昌, ナノメディシン, 宇理須恒雄編, p13-24, オーム社 (2008).

(4) 「細胞の構造と機能: 細胞内」小澤岳昌, ナノテクのためのバイオ入門, 荻野俊郎, 宇理須恒雄編, 第 1 章, 共立出版 (2007).

(5) 「バイオテクノロジーにおける生物発光」小澤岳昌, バイオ・ケミルミネセンスハンドブック, 今井一洋, 近江谷克裕編, 第 1 章 1.4.2, 丸善株式会社 (2006).

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 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: 特願

番号: 2008-164927

出願年月日: 平成 20 年 6 月 24 日 (国内)

国内外の別: 国外 PCT 平成 21 年 6 月 23 日 (PCT/JP2009/61423)

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: 特願

番号: 2008-000789

出願年月日: 平成 20 年 1 月 7 日 (国内)

国内外の別: 国外 PCT 平成 21 年 1 月 7 日 (PCT/JP2009/000033)

名称: 活性化プロテアーゼインジケーター

発明者: 梅澤喜夫, 小澤岳昌, 菅野憲

権利者: 東京大学

種類: 特願

番号: 2007-124924

出願年月日: 平成 19 年 5 月 9 日 (国内)

国内外の別: 国外 PCT 平成 20 年 5 月 9 日 (PCT/JP2008/058669)

○取得状況 (計 1 件)

名称: 活性化プロテアーゼインジケーター

発明者：梅澤喜夫，小澤岳昌，管野憲
権利者：東京大学
番号：4491516号
取得年月日：平成22年4月16日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.chem.s.u-tokyo.ac.jp/users/analyt/index.html>

日経産業新聞 2009年11月19日12面
細胞常時観察タンパク質「発光の強さ2倍に」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小澤 岳昌 (OZAWA TAKEAKI)
東京大学・大学院理学系研究科・教授
研究者番号：40302806

(2) 研究分担者

竹内 雅宜 (TAKEUCHI MASAKI)
東京大学・大学院理学系研究科・助教
研究者番号：00332271