

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月11日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22750067

研究課題名（和文） 生体内のタンパク質3分子間相互作用をリアルタイム検出する発光プローブ分子の開発

研究課題名（英文） Development of Bioluminescent Probe for Real-Time Imaging of Ternary Complex Formation in Living Cells

研究代表者

菅野 憲 (KANNO AKIRA)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：60466795

研究成果の概要（和文）：生きた細胞内において、さまざまな化学的プロセスや情報伝達は、主にタンパク質間相互作用を介して行われている。よって、生体内でのタンパク質間相互作用を非破壊的に観察することは、生命科学研究の上で重要なテーマのひとつである。本研究では、これまで見るのが困難であった、生きた動物細胞内のタンパク質3分子間相互作用を高感度にリアルタイム検出する機能的発光タンパク質分子の開発を行った。

研究成果の概要（英文）：Various chemical processes and signal transductions are mainly executed by protein-protein interaction. Therefore, it is important to monitor protein-protein interactions in living cells non-invasively. In this study, I developed a bioluminescent probe for highly sensitive real-time sensing of the formation of protein ternary complexes in living mammalian cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：分析化学，生体分子

1. 研究開始当初の背景

線虫・シロイヌナズナ・マウスなどのモデル生物に続き、ヒトのDNA情報も解明され、ポストゲノム時代を迎え、生命科学の研究対象は、遺伝子からタンパク質へと移り変わっている。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間相互作用を介して実行されている。タンパク質間相互作用が、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。

生体内のタンパク質動態を分析する際、生体組織の切片や破碎した数千万個の細胞を用いてサンプルを調製し、顕微鏡や質量分析装置にて解析する手法が広く行われている。これらの手法は「破壊分析」であるため、結果、サンプル調製時にタンパク質の局在、リン酸化や糖鎖修飾などの情報、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の一部が損なわれてしまう。したがって、生体内における「生きた」タンパク質動態をリアルタイム解析するためには、非破壊的かつ高感度に標的分子を検出する手法が必須である。近年では、蛍光・発光タンパク質を利用し、生体内でのタンパク質間相互作用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。それらの手法は、タンパク質2分子間の相互作用を非破壊的に観察する上では有用である。しかしながら、実際には、生体内でのタンパク質間相互作用に3分子以上のタンパク質が関わっていることが多い。したがって、今後の生命科学研究においては、3分子以上のタンパク質が関わるタンパク質間相互作用をリアルタイムで高感度に検出する手法の確立が重要である。

2. 研究の目的

本研究では、生きた動物体内のタンパク質3分子の相互作用を高感度にリアルタイム検出する発光タンパク質分子の開発を行う。具体的には、ウミシイタケ由来ルシフェラーゼ (*Renilla reniformis* luciferase; Rluc) を利用し、3分子のタンパク質が相互作用して初めて発光活性を回復するキメラタンパク質分子を作製する。作製した発光タンパク質分子を用い、臨床で用いられている薬物の約半数が標的としている G タンパク質共役型受容体 (GPCR) に関連する G タンパク質サブユニット α , β , および γ (それぞれ G_{α} , G_{β} , および G_{γ}) の複合体形成を非破壊的に可視化検出する。

3. 研究の方法

Rluc の立体構造、およびタンパク質2分子間相互作用検出のための分割 Rluc に関する既報に基づき、タンパク質3分子間相互作用を検出する機能的発光タンパク質分子の設計を行う。作製したキメラタンパク質分子を利用し、生きた動物細胞内での G タンパク質サブユニットの3量体形成をリアルタイム検出する手法を確立する。

分割 Rluc の設計

Rluc のアミノ末端から数えて 91/92 番目または 229/230 番目のアミノ酸で分割した Rluc にタンパク質 X および Y を連結したキメラタンパク質が、X と Y の相互作用にもとづき近接すると、分割 Rluc は相補的に再構成し、本来の発光活性を回復することが報告されている。まず、Rluc をアミノ末端から数えて残基数 1~91 (Rluc- α), 92~229 (Rluc- μ), 230~311 (Rluc- ω) の3断片に分割する。分割した Rluc の3断片に、相互作用して複合体を形成する3つのタンパク質を連結したキメラタンパク質を設計する。

3断片 Rluc を用いた G タンパク質サブユニットの3量体形成のリアルタイム検出

臨床で用いられているさまざまな薬剤の標的受容体である GPCR にリガンドが結合すると、G タンパク質サブユニットが3量体を形成する、もしくは3量体が解離することが知られている。Rluc の3断片に G_{α} , G_{β} , および G_{γ} を連結したプローブ分子を作製し、動物細胞に発現させる。この動物細胞を GPCR のリガンドで刺激することで G タンパク質サブユニットが3量体が形成され、Rluc が再構成されることを、Rluc 発光基質セレンテラジンの添加後に発光強度を測定することで検証する。

4. 研究成果

作製したプローブを用い、GTP 結合型タンパク質のサブユニット α , β , および γ (それぞれ G_{α} , G_{β} , および G_{γ}) の3量体形成の可視化検出を行った。GPCR のひとつである ADRA2A を発現する細胞に、分割 Rluc 断片

を連結した G_{α} , G_{β} , および G_{γ} を発現させた。ADRA2A のリガンドである UK14304 で細胞を刺激したところ、 G_{α} , G_{β} , および G_{γ} の解離に基づく発光強度の減少が観察された。

また、ALK5 によりリン酸化されることで 3 量体を形成する Smad2 および Smad4 の可視化検出を行った。不活性型 ALK5 (ALK5TD) もしくは常時活性型 AKL5 (ALK5KR) を発現する細胞に分割 Rluc 連結 Smad2 および Smad4 を発現させた。ALK5KR 発現細胞から高い発光値が観察され、その値は AKL5TD の約 2 倍であった。

以上のことから、開発した 3 分割 Rluc は、タンパク質の 3 量体形成の可視化に応用化のである。

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 3 件)

1. A. Kanno, T. Ozawa, Y. Umezawa, “Detection of Protein-Protein Interactions in Bacteria by GFP-Fragment Reconstitution”, *Methods Mol. Biol.*, 査読無, **705**, 251–258 (2011).
2. 菅野憲, 小澤岳昌, 「タンパク質核内移行の可視化」, *生体の科学*, 査読無, **62**, 494–495 (2011).
3. 菅野憲, 梅澤喜夫, 小澤岳昌, 「生体内のカスパーゼ活性を可視化検出する環状ルシフェラーゼの開発」, *Chemical Biology* (日本ケミカルバイオロジー学会機関誌), 査読無, **3**, 2–6 (2010).

[学会発表] (計 9 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の開発」, 第 72 回分析化学討論会, 鹿児島, 2012 年 5 月.
2. A. Kanno, T. Ozawa, “Genetically Encoded

Split Protein Fragments to Illuminate Biological Functions in Living Subjects”, 5th International Symposium on Nanomedicine, Nagoya, Mar. 2012, *invited*.

3. A. Kanno, K. Nakazono, Y. Umezawa, T. Ozawa, “Genetically Encoded Bioluminescent Indicators for Real-Time Dual Imaging of Protease Activities in Living Cells”, IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011 (ICAS2011), Kyoto, May 2011.
4. A. Kanno, K. Nakazono, Y. Umezawa, T. Ozawa, “Genetically Encoded Bioluminescent Indicators for Real-Time Dual Imaging of Protease Activities in Living Cells”, PITTCO 2011, Atlanta, GA, U. S. A., Mar. 2011.
5. A. Kanno, N. Hida, T. Ozawa, “Bioluminescent Probes to Visualize Biological Functions in Living Cells”, 分子研研究会 “Molecular Imaging for Systems Biology” (collaborative symposium with 3rd International Symposium on Nanomedicine), Okazaki, Nov. 2009.
6. A. Kanno, Y. Umezawa, T. Ozawa, “Cyclic Luciferase for Real-Time Sensing of Protease Activities in Living Mammals”, Tokyo Conference 2009, Chiba, Sep. 2009.
7. 菅野憲, 梅澤喜夫, 小澤岳昌, 「生体内のカスパーゼ-3 活性を検出する環状ルシフェラーゼの開発」, 日本分析化学会第 58 年会, 札幌, 2009 年 9 月.

ポスター発表

1. A. Kanno, K. Nakazono, T. Ozawa, Y. Umezawa, “Genetically Encoded Bioluminescent Indicators for Real-Time Dual Imaging of Protease Activities in Living Cells”, 4th International Symposium on Nanomedicine, Okazaki, Nov. 2010. (The Best Poster Award 受賞)
2. 菅野憲, 中園勝仁, 梅澤喜夫, 小澤岳昌, 「生体内のカスパーゼ活性を可視化検出する環状ルシフェラーゼの開発」, 日本ケミカルバイオロジー学会 第 5 回年会, 横

浜, 2010年5月。(ポスター賞受賞)

[図書] (計1件)

1. 菅野憲, 小澤岳昌, 「改訂六版 分析化学便覧」, 日本分析化学会編(丸善), 5. 対象試料別分析法, 5.4 生体物質, 5.4.5 細胞, pp516-522, 2011.

○取得状況 (計1件)

名称: ACTIVATED PROTEASE INDICATOR

発明者: UMEZAWA, Yoshio; OZAWA, Takeaki;

KANNO, Akira

権利者: 東京大学

種類: European Application Publication

番号: EP2154159

取得年月日: 17.02.2010

国内外の別: 国外 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LI, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅野 憲 (KANNO AKIRA)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号: 60466795