

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24685027

研究課題名(和文)細胞内分子過程の超解像イメージングを実現する蛍光プローブ

研究課題名(英文)Fluorescent probes to visualize molecular processes in the cell

研究代表者

佐藤 守俊 (Moritoshi, Sato)

東京大学・総合文化研究科・准教授

研究者番号：00323501

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、超高解像度でのタンパク質間相互作用の蛍光イメージングを実現するために、タンパク質間の相互作用が生じた時に初めて光活性化特性が出現する新しいタイプの蛍光プローブの開発研究を行った。さらに、生きた細胞で長時間の超解像イメージングを実現するために、青色光受容体のプロテインエンジニアリングや新しい近赤外蛍光タンパク質の探索研究を行った。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have developed novel fluorescent probes to visualize protein-protein interactions at the super-resolution. The probes get fluorescent only when protein-protein interactions take place. We also conducted protein engineering of a blue light photoreceptor and explored a novel near-infrared fluorescent proteins for long-term, super-resolution imaging of living cells.

研究分野：生体関連化学

キーワード：蛍光 超解像 プローブ 細胞 イメージング

1. 研究開始当初の背景

細胞内の生体分子の挙動を可視化する分子イメージングには、可視化したい生体分子を捕まえて光を発生する機能性分子（プローブ）の開発が必須である。我々は現在まで、蛍光タンパク質を用いて、蛍光共鳴エネルギー移動（fluorescence resonance energy transfer: FRET）を原理とする蛍光プローブを開発してきた。可視化の対象は、タンパク質のリン酸化等の生化学反応からイノシトールリン脂質に代表される各種生体脂質、環状核酸のサイクリック GMP (cGMP) や一酸化窒素 (NO) 等の生体小分子に至るまで多岐に及ぶ。

上述の例に代表される細胞内分子過程の可視化、すなわち“activity imaging”において、FRET は極めて強力な技術基盤を提供している。このため、FRET を原理とする蛍光プローブは国内外の数十の研究室で開発され、世界中の研究室で使われるまでになっている。しかし、生命の理解のために蛍光プローブを活用する研究スタイルが定着した今、その研究スタイルを支える技術について根本から考え直してみると、当該技術の空間分解能（観察光の波長の半分程度：緑色光であれば 230 nm 程度）が、分子レベルの現象を可視化するにはあまりにも不十分であることに気づかされる。分子（タンパク質）のサイズは数 nm 程度である。これは FRET イメージングの空間分解能よりも 2 桁近く小さい。このような低い空間分解能の原因は、光の回折という物理現象に起因している。もし、光の回折による空間分解能の限界を克服し、分子のサイズ程度の超高解像度で activity imaging を実現する革新技術が開発できれば、そのインパクトは計り知れない。

2. 研究の目的

本研究では、超高解像度での activity imaging を実現するために、activity、すなわちタンパク質間の相互作用やリン酸化等が生じた時に初めて光活性化特性が出現する新しいタイプの蛍光プローブ“conditional paFP-GR”（paFP は photoactivatable fluorescent protein の略、“GR”は green から red への変色型の意味）の開発研究を行う。

なお、変色型である conditional paFP-GR は、一種類の相互作用（タンパク質 A と B）の可

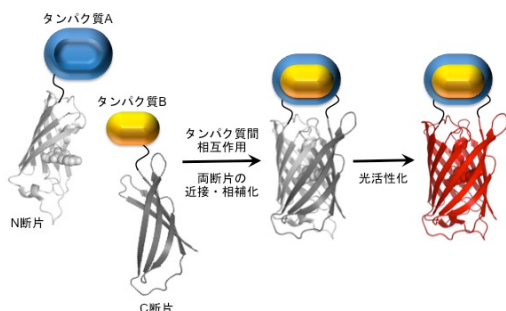


図 1. Conditional paFP-R の原理図。

視化のために、緑から赤までの幅広いスペクトル領域を用いる。もし単色型の conditional paFP を複数色開発できれば、数種類の相互作用を同時に可視化できる。従って、無蛍光型から赤色蛍光型に変化する paFP を出発物質として conditional paFP-R を開発し、単色でのタンパク質間相互作用の超解像イメージングを実現する（図 1）。

さらに、新しい蛍光タンパク質の開発に向けた探索研究を行う。既存の蛍光タンパク質はいずれも超解像イメージングのために強い励起光を要するため、長時間の超解像イメージングが極めて困難であった。本研究では、生きた細胞での長時間にわたる超解像イメージングを実現するために、シアノバクテリアより、新しい光受容体タンパク質の探索研究を行う。さらにエンバク由来の既存の青色光受容ドメインについて、その光特性を大きく変更するためのプロテインエンジニアリングを行う。

3. 研究の方法

本研究では、paFP の分割不活性化体（N 断片、C 断片）を作製する。両断片にタンパク質（A と B）を連結すれば、その相互作用に伴って N、C 断片が近接・相補化する。光活性化光（405 nm）と励起光を照射すれば、相補化した両断片からのみ蛍光シグナルが観察されるので、タンパク質間相互作用を選択的に可視化できる。この N、C 断片が conditional paFP である。最も重要なことは、以下の観察条件を設定することにより、当該プローブの本当の威力が引き出されることである。まず、conditional paFP の活性化光として微弱光を用いることにより、同時に活性化する蛍光分子の数を著しく低下させる。一方、励起光は大幅に強くして、上述のように活性化したごく少数の蛍光分子から強い蛍光シグナルを生起させ、かつこれをすぐに退色させる。次に、conditional paFP から得られた各輝点（プローブ 1 分子の蛍光）の中心点を、点拡がり関数に基づいてナノメートル程度の精度で算出する（この操作を“localization”と呼ぶ）。「光活性化・励起・退色・localization」のサイクルを繰り返し行い、各輝点の中心を集めて描画すれば、タンパク質 A と B の相互作用の超解像イメージング画像を構築できる。

本研究では、活性化光により緑色から赤色に変色する conditional paFP-GR、および活性化光により無蛍光から赤色蛍光を生起する conditional paFP-R を開発し、細胞膜の接着斑（focal adhesion）で生起するタンパク質間相互作用を例に、超解像イメージングが実現できることを示す。

4. 研究成果

Conditional paFP-GR および-R を開発するために、paFP の最適な分割位置を探索した。出発物質の paFP は、いずれも 11 本の β シー

トからなる鳥かご様構造を有する（発色団は“鳥かご”の中で形成）. 分割による発現量の減少を最小限に抑えるため、 β シート同士を繋ぐループ構造を切断し、分割体を作製した（ β シート内部で paFP を分割すると、高い確率で発現量が激減することを先行研究で経験済）. 分割体の評価には、上述のラパマイシン依存的に二量体化するタンパク質（FKBP, FRB）を用いた. 以下の2つの基準を設けて、両方を満たす最適な分割体を取得した. (i) ラパマイシン非添加時には光活性化しない（無蛍光）. (ii) ラパマイシンを添加すると光活性化特性が出現し蛍光を発する. この基準を満たす分割体のうち、蛍光強度が最も高いものを *conditional paFP-GR* および *conditional paFP-R* として開発した.

まず *conditional paFP-GR* について、当該蛍光プローブを細胞に発現させ、ラパマイシンで処理して緑色蛍光を生起させた後、活性化光を照射した. このとき、*conditional paFP-GR* が緑色から赤色に変色することを示した.

次に細胞内で機能する様々なタンパク質に *conditional paFP-GR* を連結し、細胞に発現させた. この蛍光観察により、*conditional paFP-GR* が細胞内でのタンパク質の動態に悪影響を与えないことが分かった.

続いて、細胞接着斑で機能するアクチンとアクチニンに *conditional paFP-GR* を連結し、上述のように、微弱光を用いて光活性化を行った. 次に強い励起光を照射し、活性化したごく少数の蛍光分子から強い蛍光シグナルを生起させ、かつこれをすぐに退色させた. *Conditional paFP-GR* から得られた各輝点の中心点を、点拡がり関数に基づいてナノメートル程度の精度で算出した. このような「光活性化・励起・退色・localization」のサイクルを繰り返し行い、各輝点の中心を集めて描画したところ、アクチンとアクチニンの相互作用に関する超解像イメージング画像を取得することができた.

Conditional paFP-R についても、*conditional paFP-GR* と同様の方法で開発を行った. 開発した *conditional paFP-R*、タンパク質間相互作用が無いときには活性化光を照射しても全く蛍光を示さず、タンパク質間相互作用がある時には活性化光照射により明るい赤色蛍光を示した. *Conditional paFP-GR* と同様に、*conditional paFP-R* は細胞内のタンパク質に連結してもその局在に悪影響を与えず、タンパク質相互作用の超解像イメージングを実現することを示した. さらに、*conditional paFP-R* の赤のスペクトル領域をタンパク質間相互作用のイメージングに利用し、緑のスペクトル領域をその他のタンパク質の細胞内局在のイメージングに利用して、マルチカラーでの超解像イメージングが実現できることを示した.

新しい蛍光タンパク質の開発に向けた探索研究を行った. まず、エンバク由来の青色光受容ドメイン（AsLOV2）について、その

光特性を大きく改変するためのプロテインエンジニアリングを行った. 我々は、蛍光イメージングによってAsLOV2が有する光反応サイクルを簡便に検出可能であることを明らかにすると共に、蛍光イメージング技術と大腸菌クローニング技術を組み合わせることで、光反応サイクルが変化した変異体ライブラリーの中から、光反応サイクルの遅い変異体を効率的に単離可能な新規スクリーニング系を構築した. このスクリーニング系を用いることにより、非常に遅い光反応サイクルを有するAsLOV2の開発を行った. AsLOV2の光反応サイクルに影響する補因子周辺のアミノ酸残基7カ所にランダム変異を導入し、形質転換された大腸菌コロニーのスクリーニングを実行したところ、光反応サイクルが劇的に遅速化した変異体を数多く取得できた. 最も遅速化した変異体は、野生型のAsLOV2 ($\tau = 55$ s) より、78倍遅い光反応サイクル ($\tau = 4.3 \times 10^3$ s) を示すことが明らかとなった. この変異体は、蛍光タンパク質であり、AsLOV2と同様に非常に弱い光照射で不活性化することができる. さらに、変異導入により活性する速度が著しく遅くなったため、1分子イメージングに基づく超解像イメージングに極めて有利と考えており、現在その検討を進めている.

東京大学の池内教授、静岡大学の成川講師と共同で、クロロフィル *d* を有する特殊なシアノバクテリア (*Acaryochloris marina*) から、世界で最も小さな近赤外の光受容ドメインを発見した. この光受容ドメインの特徴は、哺乳類を含めた様々な生物が広く有するテトラピロールのビリベルジン (biliverdin) を補因子とすることである. この発見により、既存の蛍光タンパク質とは全く異なる波長域で、かつ極めて弱い励起光で、超解像イメージングを行う道が開かれたと考えている. これについても、現在検討を進めている.

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 2件)

- ① Kawano F, Aono Y, Suzuki H, Sato M. Fluorescence imaging-based high-throughput screening of fast- and slow-cycling LOV proteins. *PLoS One*. 2013 Dec 18;8(12):e82693. doi: 10.1371/journal.pone.0082693. eCollection 2013. PubMed PMID: 24367542; PubMed Central PMCID: PMC3867380.
- ② Narikawa R, Nakajima T, Aono Y, Fushimi K, Enomoto G, Ni-Ni-Win, Itoh S, Sato M, Ikeuchi M. A biliverdin-binding cyanobacteriochrome from the chlorophyll *d*-bearing cyanobacterium *Acaryochloris marina*. *Sci Rep*. 2015 Jan 22;5:7950. doi:

10.1038/srep07950. PubMed PMID:
25609645; PubMed Central PMCID:
PMC4302295.

〔学会発表〕(計 7件)

- ① M. Sato, New Prospect for Bioanalytical Chemistry, *Asian Symposium on Analytical Sciences*, 広島大学東広島キャンパス (広島県・東広島市) (2014.9.17)
- ② 佐藤守俊, バイオ分析の最前線, JAIMA セミナー, 幕張メッセ国際会議場 (千葉県・千葉市) (2014.9.5)
- ③ 佐藤守俊, 生命現象を見る技術・操作する技術, 第65回日本細胞生物学会大会, 愛知県産業労働センター (愛知県・名古屋市) (2013.6.19)
- ④ 佐藤守俊, 生命現象を見る技術・操作する技術, フロンティアサロン, 京王プラザホテル (東京都・新宿区) (2012.11.16)
- ⑤ 佐藤守俊, 細胞内の分子過程を探索する遺伝子コード型の分子プローブ, 日本分析化学会第61年会, 金沢大学角間キャンパス (石川県・金沢市) (2012.9.19)
- ⑥ M. Sato, Methods to visualize molecular processes in living cells, *JASIS meeting*, 幕張メッセ国際会議場 (千葉県・千葉市) (2012.9.7)
- ⑦ 佐藤守俊, 細胞内シグナル伝達を可視化する技術・操作する技術, 日本膜学会第34年会 生体膜シンポジウム, 早稲田大学戸山キャンパス (東京都・新宿区) (2012.5.9)

〔図書〕(計 1件)

- ① Sato M. Genetically encoded fluorescent biosensors for live cell imaging of lipid dynamics. *Methods Mol Biol.* 2014;1071:73-81. doi: 10.1007/978-1-62703-622-1_6. PubMed PMID: 24052381.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1件)

名称: 蛍光特性を有する複合体
発明者: 成川礼, 池内昌彦, 佐藤守俊
権利者: 国立大学法人静岡大学
種類: 発明
番号: 特願 2014-202984
出願年月日: 2014年10月1日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ:
<http://system.c.u-tokyo.ac.jp/common/professor/sato.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 守俊 (MORITOSHI SATO)
東京大学・大学院総合文化研究科・准教授
研究者番号: 00323501

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: