

細胞内及び膜界面の分子を可視化する新手法の創案と展開
New Analytical Methods for Molecular Imaging
in Single Live Cells and Interfacial Molecular Assemblies

梅澤 喜夫 (Umezawa Yoshio)
武蔵野大学・薬学研究所・客員教授



研究の概要

生きた細胞内や、膜界面での特定の分子や官能基の位置、濃度を、時間・空間分解して観察する新手法の創案と展開を目的とした。ジアシルグリセロールや mRNA, キナーゼやカスパーゼ等の酵素活性、蛋白質の細胞内動態を可視化する新たな原理に基づく蛍光・発光プローブを開発した。また、DNA や糖鎖を1分子レベルで測定する方法を確立した。開発した方法は、分子イメージングの新たな端緒を開拓し、基礎生命科学や医学研究など広範な分野領域に貢献することが期待される。

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：化学分析，生物学的分析，表面分析，状態分析，生体分析

1. 研究開始当初の背景・動機

DNA やその産物である RNA, さらにタンパク質の構造と機能を明らかにする方法、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方法は、現在の分析化学研究において最も重要な課題である。

2. 研究の目的

生きた細胞内及び膜界面の分子を可視化する新手法の創案と開発を目的とする。ここで分子を可視化 (molecular imaging) することは、今まで見る事ができなかった、生きた細胞内や、膜界面での特定の分子や官能基の位置・濃度を、時間・空間分解して観察できるようにすることである
／”Seeing what was unseen”。

次の I, II, III の研究目的を達成する。

- I. 細胞内・細胞間複数種の情報分子の時空間同時可視化解析
- II. 細胞内オルガネラ局在蛋白質の可視化検出法
- III. DNA 及び糖鎖配列の可視化決定法

3. 研究の方法

I. 細胞内情報伝達を可視化する多数の蛍光蛋白質センサーを開発する。検出目的の生体分子がリセプター部位に結合するとリセプターに構造変化が起こり、これをドナー・アクセプター蛍光団間の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) に基づき検出する。また蛍光センサーの拡散による生体分子の

空間情報の喪失を避けるため、蛍光蛋白質センサーに細胞内局在化配列を付加する。

II. 本研究者独自の技術である蛋白質再構成法を利用して、蛋白質の核内外移行、ミトコンドリアからの蛋白質の放出など細胞内の蛋白質動態を、生きたマウス個体内で可視化するプローブの開発と検出技術を開発する。また、蛋白質が細胞内オルガネラに移行した時に発光する蛍光プローブを開発し、cDNA ライブラリーから網羅的にオルガネラ局在蛋白質を同定する方法を開発する。

III. DNA 及び糖鎖を選択的に可視化するための分子探針を開発する。各試料分子に特有の官能基と選択的に化学的相互作用を形成できる探針を用いることにより、その相互作用に伴ってトンネル電流が促進され選択的分子イメージングが可能となる。

4. 研究の主な成果

I. タンパク質のリン酸化は細胞内シグナル伝達の ON/OFF 調節に関わる最も主要なメカニズムの一つである。本研究では独自の技術を展開し、生命機能と疾患の理解に重要なキナーゼ (ERK および Src) によるタンパク質リン酸化を可視化する蛍光プローブを開発し、当該キナーゼの細胞内での時空間動態を可視化計測した。結果 (1) 細胞増殖など多くの生命機能を制御する ERK の活性化は細胞質では一過性であること、(2) 一方核内では、ERK の活性化は持続的であること、が明らかとなった。

Src については (1) Src を活性化するリガンド刺激の種類によって Src が活性化する膜系が異なること、およびその分子メカニズム、

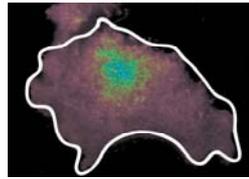


図 細胞膜上局所で活性化した Src のイメージング

(2) Src は生体膜において一様に活性しているのではなく、生体膜上に存在する数十ナノメートルサイズの微小ドメイン (lipid raft; リピッドラフト) においてのみ活性していることを明らかにした。また (3) リピッドラフトにおける Src の活性化が、乳ガン細胞の細胞接着および細胞周期の亢進を制御することを明らかにした。

II. 細胞内小胞 (ER) に移行するタンパク質を同定するプローブ分子を開発した。cDNA ライブラリーにプローブを連結し、ER 移行タンパク質を網羅解析する手法を開発した。1,100 クローンの遺伝子解析を行い、109 種の ER 移行タンパク質の同定に成功した。また、生きたマウス個体内におけるタンパク質の核内移行検出プローブを開発した。split した RLuc の再構成技術を確認し、androgen receptor (AR) のサイトゾルから核内への移行を検出するプローブを作製した。このプローブをマウス脳内に移植して、マウス個体内の DHT 検出法を開発した。procymidone や PCB をマウスの腹腔に投与すると、脳内の AR の働きが抑制されることを明らかにした。この基本技術を展開し、glucocorticoid receptor (GR) の核内移行検出法や、Smac タンパク質のミトコンドリアからサイトゾルへの放出を、生きたマウス個体で低侵襲的に時空間解析できることを実証した。

III. 4 種の核酸塩基 (アデニン, グアニン, シトシン, ウラシル; それぞれ A, G, C, U) 誘導体をそれぞれ探針として用い、A, G, C, U の単成分または混合自己組織化単分子膜 (SAM) を走査型トンネル顕微鏡 (STM) により観察した。その結果、用いた核酸塩基探針に対して相補的な試料核酸塩基が選択的に可視化できることを明らかにした。これは、相補塩基対間のみ形成される特異的な多点水素結合を通じて、トンネル電流が促進されたためであると考えられる。さらに、DNA の類縁体であるペプチド核酸を上記核酸塩基探針を用いて観察し、特定の核酸塩基のみを選択的に可視化できることを実証した。核酸塩基の識別は、DNA の配列決定や、現在注目を集めている一塩基多型 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) の検出に利用できると期待される。

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

従来の研究手法ではアプローチすることが出来なかった、タンパク質リン酸化や RNA やグリセロールの動態など、細胞内分子過程の可視化に成功した一連の成果は、世界を先導する成果である。その検出原理は、我々独自に創案・開発した技術であり、大きく研究を展開できた意義は極めて大きい。開発した一連のプローブは分子イメージングの新たな端緒を開拓し、生命機能と疾患の理解を目指す基礎生命科学・医学研究のみならず、細胞内分子過程を制御する薬物の評価やスクリーニングなどの創薬研究にも多に貢献することが期待される。

6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

1. 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).
2. Genetically Encoded Cyclic Luciferase for Rapid Sensing and Real-Time Imaging of Protease Activities in Living Subjects. A. Kanno, **Y. Umezawa** and T. Ozawa, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 7595-7599 (2007).
3. Imaging diacylglycerol dynamics at organelle membranes. M. Sato, Y. Ueda and **Y. Umezawa**, *Nature Methods*, **3**, 797-799 (2006).
4. A Fluorescent Indicator to Visualize Activities of the Androgen Receptor Ligands in Single Living Cells. M. Awais, M. Sato, X. Lee and Y. Umezawa, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 2707-2712 (2006).
5. A Fullerene Molecular Tip Can Detect Localized and Rectified Electron Tunneling within a Single Fullerene-Porphyrin Pair. T. Nishino, T. Ito and **Y. Umezawa**, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **102**, 5659-5662 (2005).
6. Production of PtdInsP₃ at endomembranes is triggered by receptor endocytosis. M. Sato, Y. Ueda, T. Takagi and **Y. Umezawa**, *Nature Cell Biology*, **5**, 1016-1022 (2003).
7. A Genetic Approach to Identifying Mitochondrial Proteins. T. Ozawa, Y. Sako, M. Sato, T. Kitamura and **Y. Umezawa**, *Nature Biotechnology*, **21**, 287-293 (2003).