

【基盤研究(S)】

理工系(化学)



研究課題名 分子イメージングを基軸とする生細胞内分子計測・光操作法の開発

東京大学・大学院理学系研究科・教授

おざわ たけあき
小澤 岳昌

研究課題番号: 26220805 研究者番号: 40302806

研究分野: 化学

キーワード: バイオ分析、イメージング

【研究の背景・目的】

生細胞内の分子の素過程をネットワークとして理解するために、生体分子を可視化および操作するための新たな分析方法を確立する。次の3つの研究課題を遂行する。1) 生細胞内における小数生体分子の可視化・定量法の開発。2) 光によるリン酸化酵素活性制御法の開発。3) Gタンパク質共役受容体(GPCR)活性を制御する光操作技術の開発。マルチ蛍光イメージングおよび蛍光・ラマンハイブリッドイメージングによる多次元情報取得、および特定のタンパク質の活性を光で操作し生体分子を可視化する、新たな細胞内分子ネットワーク解析技術を創出する(図1)。開発する方法は、基礎生命化学研究の基盤技術になるとともに、創薬や阻害剤評価の革新的技術となることが期待できる。

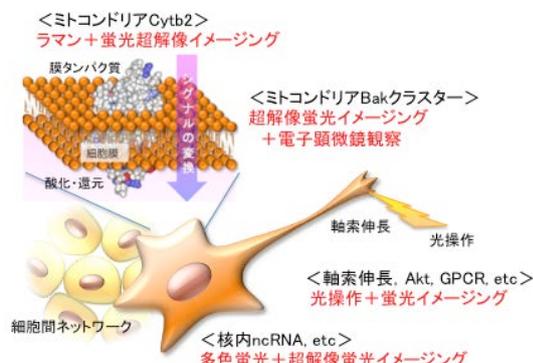


図1. 生体分子・内細胞シグナルの多次元情報解析法の開発

【研究の方法】

課題1) 生細胞内ではたらく小数分子の可視化・定量法を開発する。細胞内在性のテロメア RNA を1分子レベルで可視化し、その数を計測する新たな技術を開発する。開発する蛍光プローブを生細胞内に発現させ、全反射蛍光顕微鏡で細胞核内のテロメア RNA 局在を観察する。1細胞内のテロメア RNA の数を産出する。さらに1分子レベルでテロメア RNA とヒストンメチル化をライブイメージングする技術を確認し、テロメア RNA とエピジェネティックなシグナルを同時観測する技術を確認する。同様の原理により、ミトコンドリア膜上の凝集体 Bak タンパク質数計測技術を開発する。

課題2) 細胞内キナーゼ(Akt)活性光操作法を開発する。Aktの局在変化を光制御するために、植物由来光感受性タンパク質を利用する。光強度、照射時

間を変え、基質タンパク質の1つであるNO合成酵素(eNOS)のリン酸化や、Aktの下流で制御されているAtrogin遺伝子の発現等が、光照射により変動することを実証する。光刺激によるAktの活性化を数理モデルとして構築する。さらに、マウス個体でAktを光制御できることを実証する。同様の光活性化原理を用いて、神経軸索誘導に必要なDCCリセプターのリン酸化能を光制御する技術を開発する。課題3) GPCR活性を制御する光操作技術を開発する。GPCRの二量体形成を蛍光検出するスクリーニング系を樹立する。GPCRのC末端に、コメツキムシ由来のルシフェラーゼ(ELuc)の2分割フラグメントを連結する。プローブを安定発現するスクリーニング用細胞を樹立する。ケミカルライブラリーを用いて、GPCR阻害剤探索を実践し、新たなGPCR光制御分子を開発する。阻害剤に光応答官能基を連結して、GPCR活性を光制御できることを実証する。

【期待される成果と意義】

本申請研究は、個々の分子反応の素過程を追究する分子科学と、要素還元的に現象の解明を試みる生命科学との中核に位置し、分野横断的な研究領域を開拓する新規分析法の創案、開発である。即ち、蛍光・ラマンハイブリッドイメージングによる多次元情報取得、および特定のタンパク質の活性を光で操作し振動を加えその応答を可視化する技術は、生命の本質であるネットワークを理解する基盤技術となるため、その開発意義は極めて大きい。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Advances in fluorescence and bioluminescence imaging. T. Ozawa, H. Yoshimura and S.B. Kim, *Anal. Chem.*, **85**, 590-609 (2013).
- Methods of split-reporter reconstitution for the analysis of biomolecules. H. Yoshimura and T. Ozawa, *Chem. Record*, in press.

【研究期間と研究経費】

平成26年度-30年度
150,200千円

【ホームページ等】

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