

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成29年度研究進捗評価用〕

平成26年度採択分
平成29年3月8日現在

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

Methods for the analysis and control of biomolecules
in living cells based on molecular imaging

課題番号：26220805

小澤 岳昌 (OZAWA TAKEAKI)

東京大学・大学院理学系研究科・教授



研究の概要

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。具体的には、1) 少数生体分子の可視化・定量法、2) 光による酵素活性制御法、3) Gタンパク質共役受容体活性を制御する光操作法を開発する。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、創薬等の革新的技術となる。

研究分野：化学

キーワード：バイオ分析・イメージング

1. 研究開始当初の背景

生命の分子化学的理解は、生命現象に対する我々の知的欲求を満たすと同時に、医療・診断技術の開発や疾患の原因解明に直結する、現代社会における極めて重要な課題である。これまでの分析技術の多くは、細胞を破壊して目的生体物質を検出する“破壊分析”法に依存してきた。生体分子の“真の生理機能”を理解するためには、生物個体が生きた状態で“非破壊的”に、かつ“定量的に”生体分子を時空間解析する新たな分析方法が必要である。同時に、標的とする生体分子を特定の時間に特定の場所で制御する技術が強く求められている。すなわち化学的視点から生命の素過程を理解するために、革新的な「観る技術」と「操作する技術」が新たな分析化学として必要とされている。

2. 研究の目的

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) 生細胞内における少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。

3. 研究の方法

タンパク質の3次元構造と機能に関する情報をもとにタンパク質をデザインし、遺伝子工学的手法を駆使して機能性分子を開発する。そして培養細胞およびマウスなど動物個体に開発する分子を発現させ、スペクトル解析、蛍光イメージングおよび生化学実験により、開発する分子の機能評価を行う。生細胞内で機能する生体分子の素過程を分子レベルで理解するための革新的技術を確立する。

4. これまでの成果

課題1。少数生体分子の可視化・定量法
(1A) ncRNA 分子数計測技術の開発—染色体の末端テロメア領域から転写されるタンパク質をコードしない ncRNA(non-coding RNA)、TERRA を検出するプローブを開発した。細胞内の TERRA 上でプローブが蛍光を発することを蛍光顕微鏡により実証した。次に開発した TERRA 検出プローブを用いて、生細胞の核内における TERRA の動態を解析した(図1)。

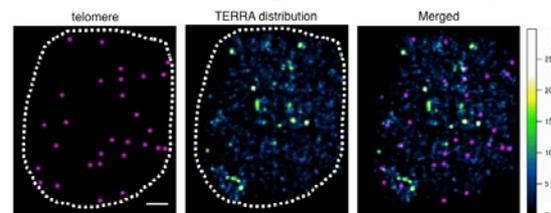


図1. TERRA の1分子検出。紫:テロメアDNA、点線:核膜を示す。動径分布関数および拡散係数を用いて、TERRAの核内分布や運動を定量的に解析し、

TERRA がテロメア近傍に局在することを発見した。開発したプローブは、リピート配列を有する RNA 一般に応用可能である。

(1B)ミトコンドリア膜上の凝集体 Bak タンパク質数計測技術の開発—顕微鏡の光学限界を超えた分解能(超解像)で Bak 凝集体を可視化し、Bak 分子数を見積もる方法を開発した。Bak 凝集体を超解像可視化検出するために、Bak に mEos3 を標識した遺伝子を凝集体プローブとして内在性 Bak 欠損細胞に導入した。次にプローブ発現細胞にアポトーシス刺激として紫外線を照射し、超解像イメージングにより蛍光観察を行った。約 300 個以上の凝集体のサイズを評価したところ、直径が 100-1000 nm、一凝集体あたりの Bak 分子数が 50-1700 と広い分布を示すことが解った。開発した計測法は細胞膜上に凝集するタンパク質一般に応用展開が可能であり、大きな波及効果が期待できる。

研究課題 2: 光による酵素活性の制御法

(2A)細胞内キナーゼ(Akt)活性光操作法の開発—Akt 活性を時空間的に制御するために、植物由来の光受容タンパク質と Akt の酵素活性部位を融合した人工タンパク質を開発した。この融合タンパク質を発現した細胞では、光照射により Akt 活性が可逆的に上昇し、さらに細胞遊走や遺伝子発現といった Akt により制御される生理機能の光操作が可能であることを実証した。さらに、開発した光制御可能な Akt の活性の時間的変動パターンを、予測にもとづき定量的に操作可能とする技術を開発した。細胞に与える Akt 活性の総量が同じであってもその時間的な変動パターンによって、細胞からの出力強度が異なることを実証した。本結果は、Akt 活性の時間的変動パターンに細胞機能の制御メカニズムが内包されることを示す結果であり、学術的に大きなインパクトを与えている。

(2B)細胞膜受容体キナーゼ(DCC)活性光操作法の開発—DCC の多量化を光照射によって誘導するタンパク質プローブ、PA-DCC (photo-activatable DCC) を設計した。光誘導には、青色光 (およそ 450 nm) を吸収することによって多量化するタンパク質 CRY2 (Cryptochrome 2) を用いた。PA-DCC が軸索の光誘導能を有することを示すため、PA-DCC をニワトリ胎児由来神経細胞に導入した。軸索先端部に青色光 (440 nm) を照射し、継時的に観察したところ、軸索が光を照射した部位へと伸長する様子が確認できた。同様の現象は、線虫においても確認することに成功した。開発した技術は膜レセプター一般に応用展開が可能である。

研究課題 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—GPCR の活性制御を化学的・物理的に操作することを目的として、GPCR 活性を制御する化合物をケミカルライブラリーからスクリーニングした。GPCR は重症薬疹の原因タンパク質をターゲットとした。一次スクリーニングでは G タンパク質の活性化

シグナルとして細胞内カルシウム濃度上昇を阻害する分子を、二次スクリーニングでは β アレスチンとの相互作用を阻害する分子をセレクションした。結果、GPCR の両シグナルを阻害する分子として 10 種類の化合物を同定した。この化合物の作用機序を調べるために、G タンパク質の活性化を蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)により定量評価する技術を開発した。多細胞からの FRET シグナルを、PMT により高感度検出するシステムを構築し、リガンド濃度依存的な G タンパク質の活性評価が可能なシステムを構築した。GPCR 活性の新たな検出技術は、その作用機序解析の新たな基盤技術となることが期待できる。

5. 今後の計画

研究課題 1 では、RNA ならびに膜局在タンパク質を分子計測する方法としての敷衍性を実証するため、様々な標的 RNA およびタンパク質で方法の展開を図る。また、蛍光・ラマンハイブリッド顕微鏡によるサイトクロムbの可視化を実現する。研究課題 2 では、開発した光制御ツールをマウス個体で操作する技術基盤を確立する。さらに、異なるシグナルを同一細胞で定量操作する技術を新たに開発し、細胞内デュアルシグナルの時空間操作を実現する。研究課題 3 では、GPCR の細胞膜上の動態解析技術を確立するとともに、GPCR の新たな光操作技術をこれまでの成果をもとに構築する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Spatiotemporal analysis with a genetically encoded fluorescent RNA probe reveals TERRA function around telomeres. T. Yamada, H. Yoshimura, R. Shimada, M. Hattori, M. Eguchi, T. K. Fujiwara, A. Kusumi, * T. Ozawa, *Sci. Rep.* **6**, 38910 (2016).

2. In Situ Characterization of Bak Clusters Responsible for Cell Death Using Single Molecule Localization Microscopy. Y. Nasu, A. Benke, S. Arakawa, G. J. Yoshida, G. Kawamura, S. Manley, S. Shimizu, and * T. Ozawa, *Sci. Rep.*, **6**, 27505 (2016).

3. Optogenetic activation of axon guidance receptors controls direction of neurite outgrowth. M. Endo, M. Hattori, H. Toriyabe, H. Ohno, H. Kamiguchi, Y. Iino, * T. Ozawa, *Sci. Rep.*, **6**, 23976 (2016).

4. An optogenetic system for interrogating the temporal dynamics of Akt. Y. Katsura, H. Kubota, K. Kunida, A. Kanno, S. Kuroda, * T. Ozawa, *Sci. Rep.*, **5**, 14589 (2015).

他, 26 件

ホームページ等

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