

タンパク質化学に立脚した革新的生細胞内分子分析法の創製

Developments of Innovative Methods for Analyzing Biological Molecules in Living Cells Based on Protein Chemistry



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

生命の素過程を化学的視点から理解する試みは、科学全体の発展の為に極めて重要な課題である。本研究では、タンパク質再構成法をさらに発展させ、生細胞中の分子素過程を解明する新たな基盤技術の開発を目的とする。具体的には、1) 生きた細胞内の生体分子の機能を可視化する分子プローブ、2) 細胞内シグナル伝達に関与する新規分子種同定法、3) 生体分子の機能を時空間制御する機能性分子材料、の開発を目指す。タンパク質化学に関する知見を元に、分子科学と遺伝子工学の最先端技術を利用して、革新的光生体分析法を創出する。

研究分野：理工系・化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：可視化・ナノバイオ・光スイッチ・バイオテクノロジー・酵素反応

1. 研究開始当初の背景

生命の素過程を化学的視点から理解する試みは、科学全体の発展の為に極めて重要な課題である。この課題に挑むため、生命現象に学習した新しい化学的基盤技術の創出が強く求められている。我々は独自に初めて見出した現象-プロテインスプライシング反応による緑色蛍光タンパク質 (GFP) の再構成-の発見に端緒をなし、生細胞内で分子の素過程を可視化するプローブ開発を展開してきている。

2. 研究の目的

本研究では、タンパク質再構成法をさらに発展させ、生細胞中の分子素過程を解明する新たな基盤技術の開発を目的とする。具体的には、

- 1) 生きた細胞内の生体分子の機能を可視化する分子プローブ
- 2) 細胞内シグナル伝達に関与する新規分子種同定法
- 3) 生体分子の機能を時空間制御する機能性分子材料

の開発を目指す。タンパク質化学に関する知見を元に、分子科学と遺伝子工学の最先端技術を利用して、革新的機能性分子を創出する。

3. 研究の方法

タンパク質の立体構造と機能に関する情報に基づき合理的な設計を行う。遺伝子工学

手法ならびに合成化学を利用して、作製する分子の機能評価を、試験管内および細胞内で行う。さらにランダムなアミノ酸の変異導入・削除・挿入を行う「分子進化法」を取り入れ、タンパク質ライブラリーから目的の機能性分子をスクリーニングする。新規分子種同定法では、生理活性物質のスクリーニング法を開発し、遺伝子ライブラリーから、開発する機能性分子を用いて、目的とする機能性分子を探索する。光制御分子の開発では、光受容タンパク質と機能性分子の融合タンパク質を作製し、生細胞内で酵素活性を光制御する分子プローブを創出する。

4. これまでの成果

研究目的 1) では、コメツキムシ由来の発光タンパク質 (ルシフェラーゼ) にアミノ酸変位を加え、535 nm~615 nm の発光極大波長を有するルシフェラーゼ変異体の開発に成功した。次にこのルシフェラーゼの切断位置を決定し、各ルシフェラーゼフラグメントを利用して、ツメガエル卵の発生段階で重要な Smad1-Smad4、および Smad2-Smad4 タンパク質の競争的な相互作用をリアルタイムで可視化することに成功した。蛍光イメージングが困難な不透明な組織や動物個体を対象とした新たなイメージング技術を提唱した。

ウミシイタケ由来ルシフェラーゼを三分割し、再構成させることに成功した。この三

分割したフラグメントを用いて、G タンパク質 α 、 β 、 γ サブユニットの複合体形成と解離反応をリアルタイムに検出することに成功した。

細胞内の 1 分子 β アクチン mRNA の可視化を可能にする技術革新を行った。EGFP の再構成技術を応用することにより background 蛍光を抑制すると同時に、全反射蛍光顕微鏡を用いて背景光を削除することに成功した。その結果、細胞骨格のチューブリン上を移動する β アクチン mRNA の 1 分子観察を可能にした。 β アクチン mRNA の動態および運動速度の解析に成功した。

その他、ルシフェラーゼフラグメントを利用して、cAMP および cGMP 発光プローブの開発、エストロゲンの高感度発光イメージング法を開発し、基礎生命化学研究等に役立っている。

研究目的 2) では、Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) タンパク質をターゲットとして、その修飾を受けるタンパク質の網羅解析法を創案した。マウス cDNA Library に分割した蛍光タンパク質 VENUS を連結し、タンパク質が融合したプローブ (VC-Library) を細胞内に発現させた。VC-Library を導入した細胞群から、蛍光性の細胞を FACS にて分離回収することで、SUMO 化が起こったと推定される Library タンパク質のスクリーニングを行った。塩基配列を解読した結果、SUMO 化の報告例がない全 27 種類の SUMO 化候補タンパク質の取得に成功した。現在、SUMO 化候補タンパク質の生化学的解析を進めている。

アポトーシスの重要なチェックポイントの一つである「ミトコンドリアからのタンパク質の放出」を可視化するプローブを開発した。紫外線照射すると、ミトコンドリアから Smac が放出され、GFP の 2 断片が自発的再構成を引き起こし、蛍光が回復することを実証した。プローブを恒常的に安定発現する細胞株を樹立し、化合物ライブラリーのスクリーニングに着手している。

研究目的 3) では、セリン/トレオニンキナーゼ Akt/PKB のキナーゼ活性を光照射により制御するツールの開発を行った。440 nm のレーザー光照射にともない、1 秒以内で細胞膜に移行し、数分かけてサイトゾルに拡散する様子を観察した。次に Akt/PKB のキナーゼ活性を調べたところ、Akt/PKB 自身のリン酸化、基質である一酸化窒素合成酵素 (eNOS) や PLC γ のリン酸化を確認した。さらに、光照射にともなう細胞内における NO 産生や細胞遊走、アクチンタンパク質の重合などが制御できることが解った。開発した方法は、セリン/トレオニンリン酸化酵素を光制御できることを実証した初めての例であり、新たな生命分析法を創出することができる。

5. 今後の計画

研究課題 1)–3) について、今後の主たる計画と方法を項目毎に記す。課題 1) では、ルシフェラーゼ再構成法を利用したタンパク質間相互作用の検出法の応用例を実証する。細胞内シグナルに関与する重要なタンパク質間相互作用に焦点を絞り実践する。課題 2) では、同定した SUMO 化候補タンパク質について、SUMO 化修飾を受けるアミノ酸を同定する。次に SUMO 化部位を欠損した新規タンパク質を細胞内に過剰発現させ、その時の細胞内シグナルおよび細胞表現系を観察する。SUMO 化タンパク質を同定する方法論の提唱に加え生化学的知見を与えることが期待できる。課題 3) では、光パルス幅及び強度を変化させ、Akt/PKB 活性を時間的に変動させる。この時の FOXO1 の核外輸送の時間変化を追跡する。FOXO1 核外輸送と遺伝子発現及び Akt/PKB の活性化パターンとの関係を、数理モデルにより解析する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

・ Visualization and Quantitative Analysis of G Protein-Coupled Receptor- β -Arrestin Interaction in Single Cells and Specific Organs of Living Mice Using Split Luciferase Complementation. H. Takakura, M. Hattori, M. Takeuchi and T. Ozawa, *ACS Chem. Biol.*, in press.

・ Visualization of non-engineered single mRNAs in living cells using genetically encoded fluorescent probes. T. Yamada, H. Yoshimura, A. Inaguma and T. Ozawa, *Anal. Chem.*, **83**, 5708-5714 (2011).

・ Ratiometric Bioluminescence Indicators for Monitoring Cyclic AMP in Live Cells Based on Luciferase-Fragment Complementation. M. Takeuchi, Y. Nagaoka, T. Yamada, H. Takakura and T. Ozawa, *Anal. Chem.*, **82**, 9306-9313 (2010).

・ Rapid and high-sensitivity cell-based assays of protein-protein interactions using split click beetle luciferase complementation: An approach to the study of G protein-coupled receptors. N. Misawa, A.K.M. Kafi, M. Hattori, K. Miura, K. Masuda and T. Ozawa, *Anal. Chem.*, **82**, 2552-2560 (2010).

・ High-Sensitivity Real-Time Imaging of Dual Protein-Protein Interactions in Living Subjects Using Multicolor Luciferases. N. Hida, M. Awais, M. Takeuchi, N. Ueno, M. Tashiro, T. Singh, M. Hayashi, K. Ohmiya and T. Ozawa, *PLoS ONE*, **4**, e5868 (2009).

受賞等

小澤岳昌、平成 23 年 2 月 第 7 回 (平成 22 年度) 日本学術振興会賞