

# ANALYTICAL CHEMISTRY

## Annual Research Highlights

### **(1) Single Color Fluorescent Indicators for Protein Phosphorylation for Imaging Signaling Flow Dynamics**

Available methods for protein phosphorylation are based on fluorescence resonance energy transfer, which need the measurement of the change in fluorescence intensities at two wavelengths. Therefore, it is difficult to monitor protein phosphorylation together with other related signaling processes such as second messengers and protein translocation. We developed fluorescent indicators each containing a differently colored (cyan and green) single fluorophore (cpFP), a kinase substrate domain, and a phosphorylation recognition domain. Phosphorylation of the substrate domain induces its interaction with the phosphorylation recognition domain, which causes a conformational change in the cpFP and a change in its fluorescence. Using this cyan indicator and GFP-tagged mitogen-activated protein kinase (MAPK), we found that insulin-induced protein phosphorylation occurred immediately upon the addition of insulin, whereas nuclear translocation of MAPK occurred 7 min later. The present approach should be applicable to the analysis of a broad range of protein phosphorylation processes together with a variety of signaling processes in single living cells.

1.(1)-10) *Anal. Chem.*, **76**, 6144-6149 (2004).

### **(2) A method for bioluminescence detection of protein nuclear transport in living cells**

Nucleocytoplasmic trafficking of functional proteins plays a key role in regulating gene expressions in response to extracellular signals. We developed a genetically-encoded bioluminescent indicator for monitoring the nuclear trafficking of target proteins in vitro and in vivo. The principle is based on reconstitution of split fragments of *Renilla reniformis* (Rluc) by protein splicing with a DnaE intein. A target cytosolic protein fused to the amino-terminal half of Rluc is expressed in

mammalian cells. If the protein translocates into the nucleus, the Rluc moiety meets the carboxy-terminal half of Rluc, and full-length Rluc is reconstituted by protein splicing. We demonstrated quantitative cell-based in vitro sensing of ligand-induced translocation of androgen receptor (AR), which allowed high-throughput screening of exo- and endogenous agonists and antagonists. Furthermore, the indicator enabled noninvasive in vivo imaging of the AR translocation in the brain of living mice with a charge-coupled device (CCD) imaging system. These rapid and quantitative analyses in vitro and in vivo provide a wide variety of applications for screening pharmacological or toxicological compounds and testing them in living animals.

1.(1)-9) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **101**, 11542-11547 (2004).

### **(3) Molecular Tips for Chemically Selective STM: Intermolecular Tunneling Microscopy**

A fullerene molecular tip was used to detect electron tunneling from a single porphyrin molecule. The electron tunneling was found to occur locally from an electron-donating moiety of the porphyrin to the fullerene through charge-transfer interaction between them. In addition, the electron tunneling within the single fullerene-porphyrin pair exhibited rectifying behavior in which electrons can be driven only at the direction from the porphyrin to the fullerene. It is demonstrated that the localized electron tunneling enables to spatially visualize the frontier orbital of the porphyrin involved in the electron tunneling. In addition, the rectification demonstrates that the fullerene-porphyrin pair constitutes a molecular rectifier. We believe that molecular tips bring a new insight into intermolecular electron transmission toward realization of molecular electronics.

1.(1)-2) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **102**, 5659-5662 (2005).

# 分析化学研究室

## 研究ハイライト

### (1) 蛋白質のリン酸化を細胞内で可視化検出する単色蛍光プローブ

ヒト遺伝子の解析により、シグナル伝達における蛋白質リン酸化の重要性は広く認識されているが、蛋白質のリン酸化とそれを制御するシグナル、あるいは蛋白質リン酸化により制御されるシグナルとの時空間的相互関係はほとんど明らかになっていない。一つの細胞内で蛋白質リン酸化を中心とした複数のシグナル伝達を同時検出するために、一波長励起一波長測光型の新しい蛍光プローブ (sinphos: シンフォス) を開発した。シアン色蛍光蛋白質を用いて作製した cyan-sinphos は、インスリン受容体の基質を導入することにより当該キナーゼの活性化を可視化できるように設計した。この cyan-sinphos と GFP タグした MAP キナーゼとを同時イメージングすることにより、インスリン受容体の活性化から 7 分後に MAP キナーゼが核内に移動することが可視化により明らかになった。本プローブは蛋白質リン酸化を中心としたシグナル伝達のネットワーク解析に貢献し、細胞内シグナルの包括的理解に繋がるであろう。

1.(1)-10) *Anal. Chem.*, **76**, 6144-6149 (2004).

### (2) 生細胞内においてタンパク質の核内移行を検出する生物発光検出法

真核細胞内におけるタンパク質の局在やタンパク質間相互作用及びその動態解析は、生物の高次機能を解明する上で重要なターゲットである。我々は、二分した *renilla luciferase* をプロテインプライミングにより再構成させる新たな発光プローブ分子を開発し、生きた細胞や動物個体内での男性ホルモンリセプター (Androgen Receptor: AR) の動態を発光検出する新しい研究方法を開発した。本プローブにより、AR の核内移行を発光強度を指標に定量的に検出できることを示した。さらに、生きたマウス個体内で、AR の核内移行に伴い形成された *renilla luciferase* の酵素活性を、非侵襲的に検出できることを明らかとし、マウス個体内における AR の核内移行検出法を開発した。以上の方法は、AR に限らず、他のステロイドホルモンリセプターやリン酸化により核内に移行するタンパク質など、タンパク質の核

内移行を定量検出する一般性を有している。

1.(1)-9) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **101**, 11542-11547 (2004).

### (3) 分子探針による化学選択性 STM: 分子間トンネル効果顕微鏡

fullerene を STM 探針として用い (C<sub>60</sub> 探針), cobalt(II) porphyrin を観察した。未修飾の金探針を用いた場合、porphyrin の中心金属である Co(II) イオンが明るく観察された。C<sub>60</sub> 探針では、Co(II) イオンを取り囲む porphyrin の共役  $\pi$  系のみが選択的に観察された。これは、探針分子の fullerene と試料 porphyrin の共役  $\pi$  系とが電荷移動相互作用を形成し、これに伴う波動関数の重なり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、zinc(II) porphyrin (ZnPor) と free-base porphyrin (FBPor) の混合吸着膜では、未修飾金探針では両者を識別できないのに対し、C<sub>60</sub> 探針を用いることにより、ZnPor が FBPor よりも明るく観察され、両者を選択識別できることが明らかとなった。これは、ZnPor の HOMO が FBPor の HOMO よりも fullerene の LUMO とエネルギー的に近いため、より有利な電荷移動相互作用を形成し、従ってトンネル電流がより促進されたためであると考えられる。以上の結果より、分子探針との電荷移動相互作用に基づき、電子供与対あるいは受容体に対する選択性が得られることが分かった。また、C<sub>60</sub> 探針を用いた場合、porphyrin を負に印加した時には分子像が得られたが、逆に、正に印加した際には分子像が全く得られなかった。探針分子である fullerene と試料 porphyrin からなる分子ペアは、電子供与体-受容体からなる分子整流素子と見なすことができ、この極性依存性はその整流性に起因すると考えられる。これまで困難だった分子間電子移動の測定が可能であることが示された。

1.(1)-2) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **102**, 5659-5662 (2005).

## 1. 原著論文

### (1) Refereed Journals

- 1) Imaging nanomolar range of nitric oxide with an amplifier-coupled fluorescent indicator in vascular endothelial cells. M. Sato, N. Hida and Y. Umezawa, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **102**, No 41, 14515-14520 (2005).
- 2) 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**, No. 16, 5659-5662 (2005).
- 3) A high-throughput screening of genes that encode proteins transported into the endoplasmic reticulum in mammalian cells. T. Ozawa, K. Nishitani, Y. Sako and Y. Umezawa, *Nucleic Acids Res*, **33**, No. 3, e34 (2005).
- 4) Quantitative Determination of Protein Nuclear Transport Induced by Phosphorylation or by Proteolysis. S. B. Kim, R. Takao, T. Ozawa and Y. Umezawa, *Anal. Chem.*, **77**, No. 21, 6928-6934 (2005).
- 5) Genetically Encoded Stress Indicator for Noninvasively Imaging Endogenous Corticosterone in Living Mice. S. B. Kim, T. Ozawa and Y. Umezawa, *Anal. Chem.*, **77**, No. 20, 6588-6593 (2005).
- 6) Locating Inositol 1,4,5-trisphosphate in the Nucleus and Neuronal Dendrites with Genetically Encoded Fluorescent Indicators. M. Sato, Y. Ueda, M. Shibuya and Y. Umezawa, *Anal. Chem.*, **77**, No. 15, 4751-4758 (2005).
- 7) A genetically encoded indicator for assaying bioactive chemicals that induce nuclear transport of glucocorticoid receptor. S. B. Kim, T. Ozawa and Y. Umezawa, *Analytical Biochemistry*, **347**, 213-220 (2005).
- 8) Intramolecular Ion-Channel Sensors Using Gold Electrodes Immobilized with Macrocyclic Polyamines for Voltammetric Detection of Adenine Nucleotides. H. Radecka, I. Szymanska, M. Pietraszkievicz, O. Pietraszkeiwicz, H. Aoki and Y. Umezawa, *Chem. Anal. (Warsaw)*, **50**, No. 1, 85-102 (2005).
- 9) High-throughput sensing and non-invasive imaging of protein nuclear transport by using reconstitution of split *Renilla* luciferase. S. B. Kim, T. Ozawa, S. Watanabe and Y. Umezawa, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **101**, No. 32, 11542-11547 (2004).
- 10) Single Color Fluorescent Indicators of Protein Phosphorylation for Multicolor Imaging of Intracellular Signal Flow Dynamics. Y. Kawai, M. Sato and Y. Umezawa, *Anal. Chem.*, **76**, No. 20, 6144-6149 (2004).
- 11) A Genetically Encoded Fluorescent Indicator Capable of Discriminating Estrogen Agonists from Antagonists in Living Cells. M. Awais, M. Sato, K. Sasaki and Y. Umezawa, *Anal. Chem.*, **76**, No. 8, 2181-2186 (2004).
- 12) A New Protein Conformation Indicator Based on Biarsenical Fluorescein with an Extended Benzoic Acid Moiety. J. Nakanishi, M. Maeda and Y. Umezawa, *Anal. Sci.*, **20**, 273-278 (2004).

## 2. 総説・解説

- 1) Chemically Modified Scanning Tunneling Microscopy (STM) Tips. T. Nishino and Y. Umezawa, *Sensor Letters*, **3**, No. 3, 231-236 (2005).
- 2) Ion-Selective Electrodes. Y. Tani and Y. Umezawa, *Sensor Letters*, **3**, No. 2, 99-107 (2005).
- 3) Genetically Encoded Optical Probes for Imaging Cellular Signaling Pathways. Y. Umezawa, *Biosens. Bioelectron.*, **20**, No. 12, 2504-2511 (2005).
- 4) Methods of Analysis for Chemicals that Disrupt Cellular Signaling Pathways: Risk Assessment for Potential Endocrine disruptors. Y. Umezawa et al., *Environmental Sciences*, **12**, No. 1, 049-064 (2005).
- 5) Genetically encoded optical probes for molecular processes in living cells. Y. Umezawa, *TrAC Trends Anal. Chem.*, **24**, No. 2, 138-146 (2005).
- 6) 分子探針を用いる走査型トンネル顕微鏡. 西野智昭, 梅澤喜夫「分析化学」総合論文, 特集号“ナノ空間と分析化学”, **54**, No. 6, 417-426 (2005).
- 7) Seeing what was unseen in biological systems. Y. Umezawa, *TrAC Trends Anal. Chem., Guest Editorial*, **23**, No. 6, xvii (2004).
- 8) Ion-Channel Sensors Based on Artificial Receptors. Y. Umezawa and H. Aoki, *Anal. Chem., A-page*, **76**, No. 17, 320A-326A (2004).
- 9) Imaging protein phosphorylation by fluorescence in single living cells. M. Sato and Y. Umezawa, *Methods*, **32**, No. 4, 451-455 (2004).
- 10) Ion-Selective adsorption/desorption processes at inorganic materials/solution interfaces as a novel mode for ion sensing. Y. Tani and Y. Umezawa, *Anal. Lett. (Review)*, **37**, 845-869 (2004).
- 11) 佐藤守俊, 上田善文, 梅澤喜夫「PIP<sub>3</sub>の可視化動態分析」*実験医学*, **22**, No. 15, 2141-2146 (2004).
- 12) 内分泌攪乱作用を捉える 見えないものを可視化する. 梅澤喜夫, 「現代化学」内分泌攪乱物質 どこまでわかったか(7), 2004年6月, **399**, 47-54 (2004).
- 13) タンパク質間相互作用の生体での非破壊イメージング. 小澤岳昌, 梅澤喜夫, 「実験医学」クローズアップ実験法 **22**, No. 4, 529-533 (2004).

## 3. 著書

- 1) Fluorescent Indicators for Imaging Protein Phosphorylation in Single Living Cells. M. Sato and Y. Umezawa, *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, 3<sup>rd</sup> Edition, Julio E. Celis (ed.), Chap. 42, 325-328, Elsevier (2005).
- 2) 「化学測定の事典 — 確度・精度・感度—」梅澤喜夫 編著, 朝倉書店 (2005).
- 3) Ion Selective Electrodes. Y. Umezawa, *Encyclopedia of Supramol. Chem.*, J. Atwood and J. Steed (eds.) Marcel Dekker, Inc., 747-752 (2004).
- 4) 「先端の分析法 — 理工学からナノ・バイオまで —」監修 梅澤喜夫, 澤田嗣郎, 寺部 茂, エヌ・ティー・エス (2004).
- 5) 「分析化学データブック」, “表面・界面分析” 梅澤喜夫, 伊藤貴志, 177-178, 日本分析化学会編, 丸善 (2004).

- 6) 梅澤喜夫共著：「分析化学 III 超微量分析」，丸善 (2004).
- 7) 生きた単一細胞内の化学過程を可視化する蛍光プローブ分子—生命現象を担う細胞情報伝達の動態分析．梅澤喜夫共著：「先端化学シリーズ VI IV ナノ分析」，日本化学会編，丸善，第 4 編 (2004).
- 8) 「基礎分析化学実験」梅澤喜夫，本水昌二，渡會 仁，寺前紀夫 編著，東京化学同人 (2004).

#### 4. その他（新聞掲載・特許など）

##### (1) 新聞掲載

- 1) “A discriminating assay for endocrine disrupters”, by Katie Cottingham, Research Profiles in *Anal. Chem.*, May 1, 154-155A (2004).

*Anal. Chem.* 掲載の下記論文に関する評価・解説記事

A Genetically Encoded Fluorescent Indicator Capable of Discriminating Estrogen Agonists from Antagonists in Living Cells. M. Awais, M. Sato, K. Sasaki and Y. Umezawa, *Anal. Chem.*, **76**, No. 8, 2181-2186 (2004).

##### (2) 特許（出願人はいずれも科学技術振興機構）

- 1) 「核酸塩基の検出方法」
  - ・ 出願日：平成 16 年 12 月 28 日（特願 2004-381406）
  - ・ PCT 出願中
- 2) 「一酸化窒素検出用センサー細胞とそれを用いた一酸化窒素の検出・定量方法」
  - ・ 出願日：平成 16 年 7 月 5 日（特願 2004-198240）
  - ・ PCT 出願：2005 年 7 月 5 日（PCT/JP2005/012721）
- 3) 「一酸化窒素検出・定量用プローブとそれを用いた一酸化窒素の検出・定量方法」
  - ・ 出願日：平成 16 年 7 月 5 日（特願 2004-198239）
  - ・ PCT 出願：2005 年 7 月 5 日（PCT/JP2005/012722）
- 4) 「イノシトール 1,4,5-三リン酸検出・定量用プローブおよびそれを用いたイノシトール 1,4,5-三リン酸検出・定量方法」
  - ・ 出願日：平成 16 年 5 月 21 日（特願 2004-152484）
  - ・ PCT 出願：2005 年 5 月 17 日（PCT/JP2005/009299）
- 5) 「蛋白質核内移行検出用プローブとそれを用いた蛋白質核内移行の検出・定量方法」
  - ・ 出願日：平成 16 年 3 月 9 日（特願 2004-066424）
  - ・ PCT 出願：2005 年 3 月 9 日（PCT/JP2005/04591）
- 6) 「核内レセプターのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブとそれを用いた核内レセプターに対するアゴニストおよびアンタゴニストのスクリーニング方法」
  - ・ 出願日：平成 16 年 2 月 12 日（特願 2004-035678）
  - ・ PCT 出願：平成 17 年 2 月 14 日（PCT/JP2005/002660）