

ANALYTICAL CHEMISTRY

Annual Research Highlights

(1) “Development of Bioluminescent Probes for Multiple Protein–Protein Interactions in Living Subjects”

Bimolecular complementation using luminescent proteins has a potential to perform reversible and multiplex detection of protein–protein interactions in opaque or auto-fluorescent living subjects. We developed complementation system of multicolor luciferase fragments, of which sensitivity and signal-to-background ratio were considerably improved by using an engineered carboxy (C) terminal fragment of a click beetle luciferase and amino (N) terminal fragments of luciferases with different spectral characteristics. A new C-terminal fragment that has an ability to complement multiple N-terminal fragments was developed by the random mutagenesis. A mutant of the C-terminal fragment including three point mutations (McLuc1) showed most remarkable properties, which enabled complement to all the N-terminal fragments of firefly luciferase (Fluc), click beetle luciferase in red (CBR) and click beetle luciferase in green (ELuc). To apply this method to biological studies using living animals, we focused on heteromeric complexes among Smad1, Smad2 and Smad4 in cytoplasmic signaling of a *Xenopus laevis* embryo. We constructed a set of probes consisting of Smad1 connected with N-terminal CBR, Smad2 connected with N-terminal ELuc and Smad4 connected with McLuc1. We synthesized mRNA from each cDNA construct of the probes and microinjected into a *Xenopus* embryo. The embryonic development was monitored under a bioluminescence microscope equipped with a CCD camera. In several early developmental stages, the interaction between Smad1 and Smad4 was detected in the ventral region of the embryo whereas the interaction between Smad2 and Smad4 in the dorsal region (**Fig. 1**). These results demonstrate that bioluminescence complementation imaging using multicolor luciferase fragments enabled spatial and temporal imaging of multiple protein-protein interactions in living animals.

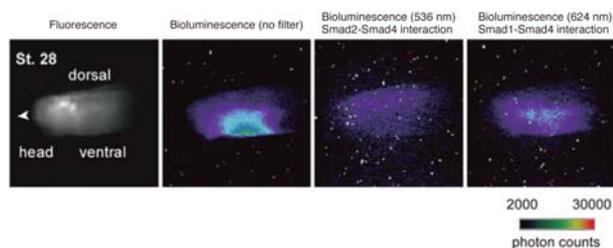


Fig. 1 Bioluminescence imaging of Smad1–Smad4 and Smad2–Smad4 interactions in a *Xenopus* embryo.

(2) “Genetically Encoded Bioluminescent Indicators for Real-Time Dual Imaging of Protease Activities in Living Cells”

Programmed cell death “apoptosis” is an essential chemical process in living eukaryotic cells. Improper apoptosis is significantly involved in pathogenic mechanisms of many diseases including Alzheimer’s disease, hepatitis, autoimmune disorders, and the immortality of cancer cells. Caspases play a central role in mediating the initiation and propagation of apoptosis. Therefore, chemical compounds to inhibit or accelerate caspase activity are a major concern. In addition, further understanding of the physiological apoptotic conditions inside living organisms is of crucial importance for assessing the roles of caspases in normal states and diseases.

Here we report genetically encoded bioluminescent indicators for noninvasive real-time imaging of caspase-3 and -8 activities in living cells and animals. Beetle luciferase connected with a caspase substrate peptide “X-X-X-Asp” (XXXD) is cyclized by inteins. In live cells expressing the cyclic luciferase, the luciferase activity greatly decreases due to a steric effect. If the target caspase is activated in the cells, it cleaves XXXD embedded in the cyclic luciferase and the luciferase activity is restored (**Fig. 2**). Thus, the caspase activity can be evaluated by measuring bioluminescence intensities from the reconstituted luciferase.

We demonstrated quantitative sensing of caspase-3 activities in living cells upon extracellular stimuli with a cooled CCD camera. Furthermore, we succeeded in dual imaging of caspase-3 and -8 activities in living cells by bioluminescence microscopy. The present system is also applicable to highly sensitive real-time sensing of multiple proteases in living organisms.

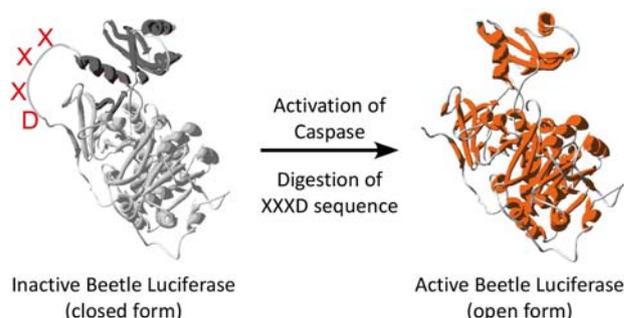


Fig. 2 Principle for monitoring the activity of caspase by using cyclic beetle luciferase.

分析化学研究室

研究ハイライト

(1) 生体内の複数のタンパク質間相互作用を検出する多色発光プローブの開発と応用

発光タンパク質再構成法は、不透明あるいは自家蛍光の強い生物個体内において、複数のタンパク質間相互作用検出に有効である。我々は、コメツキムシルシフェラーゼのカルボキシ末(C末)端側断片と、発光波長の異なる種々の生物種由来のルシフェラーゼのアミノ末(N末)端側断片を用いることにより、感度とシグナル/ノイズ比を改良した多色ルシフェラーゼ断片の再構成法を開発した。具体的には、ランダム変異導入法を用いて、コメツキムシルシフェラーゼのC末端側断片に3つのアミノ酸残基に変異を導入することにより、ホタル(FLuc)、緑色コメツキムシ(ELuc)、赤色コメツキムシ(CBR)などのすべてのルシフェラーゼのN末端側断片と再構成可能な変異型C末端側断片(McLuc1)を開発した。この解析法を生物個体における解析に応用するために、アフリカツメガエル胚の細胞情報伝達系で働く因子Smad1, Smad2 および Smad4 のタンパク質複合体形成に注目した。具体的には、Smad1 に CBR の N 末端側断片, Smad 2 に ELuc の N 末端側断片, Smad4 に McLuc1 を融合させたプローブ cDNA を作製した。この cDNA から プローブ mRNA を試験管内にて合成した後、アフリカツメガエル胚に導入し、その胚発生過程を発光顕微鏡下にてイメージング解析した。その結果、幾つかの初期発生段階において、Smad1-Smad4 間相互作用は胚の腹側で、Smad2-Smad4 間相互作用は胚の背側において活性化されることが明らかになった(図1)。これらの結果から、開発した多色ルシフェラーゼ断片の再構成法は、生物個体内の複数のタンパク質間相互作用の可視化検出を可能とし、それらの時空間的な解析に広範な応用が可能であることが実証された。

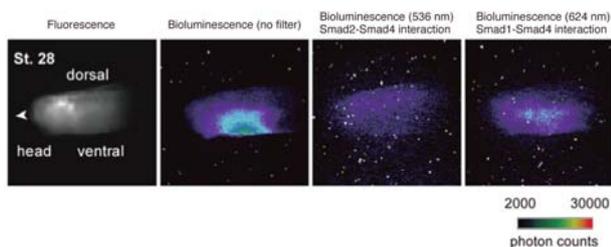


図1 アフリカツメガエル胚における Smad1-Smad4 間相互作用と Smad2-Smad4 間相互作用の発光検出。

(2) 生体内のカスパーゼ-活性を可視化検出する環状ルシフェラーゼの開発

遺伝子にプログラムされた細胞死(アポトーシス)は、生体内における重要な化学プロセスのひとつである。アポトーシス過程に不具合が生じると、アルツハイマー病・肝炎・自己免疫疾患・ガン細胞の不死化など、さまざまな疾患の発症に関わっている。このアポトーシスの開始および伝播において、カスパーゼは中心的な役割を果たす。したがって、生体内でのカスパーゼの動態を分析

することは、アポトーシスを標的とした生命科学の基礎研究だけでなく、医療・創薬・環境化学物質のリスクアセスメントの観点からも非常に重要であるといえる。本研究では、生きたほ乳類体内でのカスパーゼ-3 活性、および、生きた細胞内でのカスパーゼ-3 活性とカスパーゼ-8 活性を高感度にリアルタイム検出する新規生物発光タンパク質プローブの開発を行った。発光タンパク質である甲虫ルシフェラーゼ(Luc)のアミノ末端とカルボキシ末端をカスパーゼの基質ペプチド配列 X-X-X-Asp(XXXD)を介して連結・環状化し、立体構造をひずませるとLucが不活化する、ということを実験で見いだした。この環状 Luc を発現した細胞のアポトーシスを誘導すると、XXXD 配列が活性化カスパーゼにより認識・切断され、立体構造のひずみが解消される。結果、Luc の生物発光活性が回復するため、発光量を指標にカスパーゼ活性を評価できる(図2)。

カスパーゼ-3 の基質ペプチド配列 Asp-Glu-Val-Asp (DEVD) を有する環状の北米産ホタル (*Photinus pyralis*) 由来 Luc (FLuc) を、培養細胞に発現させた。アポトーシス誘導剤であるスタウロスポリン (STS) で環状 Fluc 発現細胞を刺激したところ、約 10 倍の発光量の増加が観察された。一方、環状 FLuc 発現細胞をカスパーゼ-3 阻害剤で前処理した後、STS で刺激したが、発光量の変化は観察されなかった。さらに、生きたマウス個体内でのカスパーゼ-3 活性を高感度にリアルタイム検出できることを実証した。また、DEVD 配列を有する環状のヒカリコメツキムシ (*Pyrophorus plagiophthalmus*) 由来赤色発光 Luc (CBR) および、カスパーゼ-8 の基質ペプチド配列 Ile-Glu-Thr-Asp (IETD) を有する環状の *P. plagiophthalmus* 由来緑色発光 Luc (CBG) を開発した。これらの環状 CBG および環状 CBR を共発現した培養細胞を高感度 CCD カメラ搭載顕微鏡のもとで観察し、アポトーシス誘導後のカスパーゼ-3 活性およびカスパーゼ-8 活性を 10 時間以上にわたってリアルタイムで同時検出することに成功した。本研究で開発した環状 Luc 内の XXXD 配列を、他のタンパク質分解酵素(プロテアーゼ)が認識・切断するアミノ酸配列に変更することで、複数のプロテアーゼ活性をリアルタイムで可視化検出することも可能である。

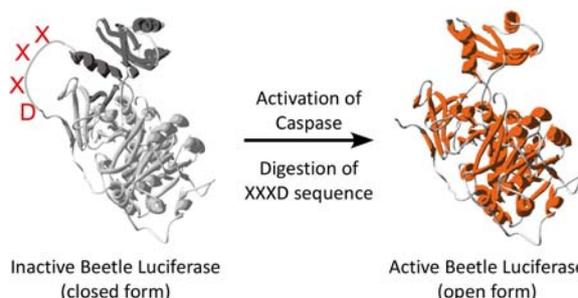


図2 環状ルシフェラーゼによるカスパーゼ活性検出の原理。

1. 原著論文

(1) Refereed Journals

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

(2) その他

- 1) T. Ozawa, “Imaging Biological Molecules Using Novel Optical Probes”, *Photomed. Photobiol.*, **31**, 27–28 (2009).

2. 総説・解説

- 1) A. Kanno, T. Ozawa, and Y. Umezawa, “Bioluminescent Imaging of MAPK Function with Intein-Mediated Reporter Gene Assay”, *Methods Mol. Biol.*, **574**, 185–192 (2009).
- 2) A. Kanno, Y. Umezawa and T. Ozawa, “Detection of Apoptosis Using Cyclic Luciferase in Living Mammals”, *Methods Mol. Biol.*, **574**, 105–114 (2009).
- 3) T. Ozawa, “Protein Reconstitution Methods for Visualizing Biomolecular Function in Living Cells”, *YAKUGAKU ZASSHI*, **129**, 289–295 (2009).
- 4) 小澤岳昌:「生体分子の機能を可視化する GFP 再構成法」, 化学と工業, **62**, 129–132 (2009).
- 5) 小澤岳昌:「発光タンパク質で細胞内をみる」, 未来材料, **9**, 28–35 (2009).
- 6) 小澤岳昌:「新領域開拓の先導的立場を担う化学」, 化学, **64**, pp.21–22 (2009).

3. 著書

- 1) 小澤岳昌 監訳:「光る遺伝子 オワンクラゲと緑色蛍光タンパク質 GFP」, Marc Zimmer 著, 大森充香 訳, (丸善, 2009).
- 2) 小澤岳昌:「RNA とタンパク質局在のイメージング」, 北森武彦 編, 新しい地平をひらく分析手法の最前線, (化学同人, 2009), pp.111–118.
- 3) 小澤岳昌:「蛍光タンパク質の設計と応用」, 超分子サイエンス&テクノロジー 基礎からイノベーションまで, (エヌ・ティー・エス, 2009), 第4章.

4. その他

- 1) 日経産業新聞(2009年11月19日)「細胞常時観察タンパク質, 発光の強さ2倍に. NEDO・東大 ホタル酵素利用」