

ANALYTICAL CHEMISTRY

Annual Research Highlights

(1) Development of a novel probe for imaging single mRNAs in live cells.

Single mRNA imaging in live cells is a powerful technique to elucidate its precise localization and dynamics. In this study, we developed a method for visualizing endogenous mRNAs in living cells with single molecule sensitivity through producing a novel genetically encoded probe.

The probe consists of two molecules; N-terminal fragment of enhanced green fluorescent protein (EGFP) fused to a mutant of Pumilio homology domain (PUM-HD), and C-terminal fragment of EGFP fused to another PUM-HD mutant. PUM-HD is an RNA binding protein that binds to a specific 8-base RNA sequence. These two PUM-HD mutants in the probe were designed to recognize respective 8-base sequences in β -actin mRNA. Upon the PUM-HD moiety of the probe binds to β -actin mRNA, the EGFP fragments come close to each other. The EGFP is then reconstituted, recovering its fluorescence. We performed live-cell imaging of β -actin mRNA using the probe. In the obtained images, many fluorescent spots were observed, and homogeneously distributed in starved cells. The fluorescent spots showed single-step photobleaching and a single-Gaussian intensity distribution. These results indicate that each fluorescent spot represents a single probe molecule. Stimulation with serum induced expansion of the cells. The spots were localized in the expanding region, in which β -actin mRNA is known to accumulate. Moreover, several fluorescent spots moving along microtubules to the cell periphery were observed. This motion of the probe is consistent with the transportation dynamics of β -actin mRNA. These results indicate that the present method is applicable to observe single-molecule dynamics of β -actin mRNA without disrupting the natural movement of the mRNA.

In conclusion, we succeeded in developing a novel genetically-encoded mRNA probe. The probe is applicable to visualize single-molecule dynamics of β -actin mRNAs in living cell. This probe would be a powerful tool for investigation functional mechanisms of mRNA transportation, local translation, etc.

1.(1)-1) *Anal. Chem.*, **83**, 5708–5714 (2011)

(2) Dual-color bioluminescence analysis for quantitatively monitoring G-protein-coupled receptor and β -arrestin interactions.

G protein-coupled receptors (GPCRs) are crucial elements in mammalian signal transduction, and are considered to represent potent drug targets. We have previously developed a GPCR assay system in cultured cells based on complementation of split fragments of click beetle (*Pyrearinus termitilluminans*) luciferase. The interaction of GPCRs with its target, β -arrestin, resulted in strong emission of bioluminescence upon stimulation with its specific ligand. In this study, we improved precision of the GPCR assay system by using railroad worm (*Phrixothrix hirtus*) luciferase as an internal control. We generated stable cell lines harboring the railroad worm luciferase and quantitatively evaluate the extent of GPCR- β -arrestin interactions. We showed concentration-dependent bioluminescence responses for four GPCRs: β 2-adrenoceptor, endothelin receptor type A, α 2-adrenoceptor and human μ -opioid receptor. We also demonstrated that the variation of responses was reduced significantly by normalizing the data with bioluminescence from railroad worm luciferase. This assay system represents a simple and reliable approach for screening drug candidates in a high throughput manner.

1.(1)-2) *Pharmaceuticals*, **4**, 457–469 (2011)

(3) Detection of protein–protein interactions in bacteria by GFP-fragment reconstitution.

Association/dissociation of protein in living organisms plays a pivotal role in intra-/extracellular signaling transduction, involved in gene expression, cell division, and cell differentiation. For further understanding of these biological processes, it is important to monitor protein–protein interactions in model organisms. Although yeast is a widely used model organisms for screening of large libraries of proteins, many of these proteins cannot be used in yeast due to cytotoxicity. Herein we describe a general method based on an intein-mediated protein reconstitution system (PRS) to detect protein–protein interactions in bacterial cells. Protein–protein interaction triggers the reconstitution of green fluorescent protein (GFP) fragments, resulting in the recovery of its fluorescence. The PRS-based approach does not require any other reagents such as coenzymes and ATP. Another advantage is that matured GFP accumulates in a targeted cell till degraded. These allow highly sensitive screening of protein–protein interactions.

1.(1)-5) *Methods Mol. Biol.*, **705**, 251–258 (2011)

分析化学研究室

研究ハイライト

(1) 生細胞内における RNA 1分子可視化プローブの開発

mRNA の1分子イメージングは、mRNA の制御された細胞内局在や動態の機構解明に有効な手法である。本研究では内在性 mRNA の1分子可視化検出が可能で、細胞内で遺伝子工学的に産生できるプローブ分子を開発した。

本プローブは、緑色蛍光タンパク質 (EGFP) の N 末端断片および C 末端断片をそれぞれ異なる *Pumilio* 相同ドメイン (*Pum*-HD) 変異体に結合した、2つの融合タンパク質からなる。*Pum*-HD は特定の8塩基 RNA 配列を認識する RNA 結合タンパク質である。プローブ中の2つの *Pum*-HD 変異体は、目的 mRNA 中の配列に結合するように設計する。プローブが目的 mRNA に結合すると、2つの EGFP 断片が近接し、再構成することで蛍光が回復する。本研究では細胞内に多く存在し、動態について一定の知見が得られている β -アクチン mRNA を観察対象として選んだ。まず本プローブの β -アクチン mRNA への結合性と選択性を確認した。プローブを発現している細胞からプローブを回収し、結合している RNA を逆転写 PCR により増幅したところ、 β -アクチン mRNA 由来のバンドが強く増幅された。また、プローブを発現した培養細胞を固定し、細胞内の β -アクチン mRNA を蛍光標識した上でプローブと同時観察したところ、多くのプローブが β -アクチン mRNA 上で蛍光を示した。以上の結果から、本プローブの β -アクチン mRNA に対する結合性、選択性が確認された。続いて、 β -アクチン mRNA の蛍光ライブイメージングを行った。飢餓状態の細胞では、プローブ由来の蛍光が輝点として、細胞全体に観察された。これらの輝点は1段階で退色し、輝度分布が単一のガウス関数でフィッティングできた。すなわち、個々の輝点はプローブ1分子に由来することがわかった。この細胞を血清で刺激すると、細胞は伸長し、その伸長している領域にプローブが強く分布する様子が観察された。さらに一部の輝点について微小管上を輸送される直線運動が観測された。これは、細胞が伸長する領域に β -アクチン mRNA が局在する既知の動態と一致する。すなわち、本プローブは生細胞内の β -アクチン mRNA 動態の可視化に成功したことを示している。

以上のように、本プローブは内在性 β -アクチン mRNA の細胞内局在変化や動態の可視化解析に有用であることを実証した。

1.(1)-1) *Anal. Chem.*, **83**, 5708–5714 (2011)

(2) GPCR- β -アレスチン間タンパク質間相互作用を定量検出する二色発光検出法

G タンパク質共役受容体 (GPCR) は、哺乳動物の細胞内情報伝達系において重要な構成要素であり、創薬分野における主要な研究ターゲットとなっている。我々はこれまでに、ヒカリコメツキムシ (*Pyrearinus termitilluminans*) 由来のルシフェラーゼ断片の再構成法を用いて、動物培養細胞における GPCR 活性化の検出系を開発して来た。この系は、特定のリガンド刺激によって誘起された GPCR と β -アレスチン間のタンパク質間相互作用を、高感度に発光検出することを可能とする。本研究では、鉄道虫 (*Phrixothrix hirtus*) 由来のルシフェラーゼを内部標準に用いて、GPCR 活性化の検出系の精度を大幅に向上させた。ルシフェラーゼ断片を連結した GPCR および β -アレスチンと共に鉄道虫ルシフェラーゼを安定的に発現する細胞株を樹立し、GPCR- β -アレスチン間のタンパク質間相互作用を定量検出した。我々は、4種の GPCR (β 2-アドレナリン受容体、 α 2-アドレナリン受容体、エンドセリン受容体タイプ A、 μ -オピオイド受容体) に対して、リガンド濃度依存的な活性化を高精度で発光検出することに成功した。鉄道虫ルシフェラーゼの発光値を用いて規格化することにより、測定誤差による変動を大幅に減少させた。本研究で開発した検出系は、GPCR 情報伝達系に関わる薬剤候補物質の細胞ベース高速スクリーニングへの応用展開が期待される。

1.(1)-2) *Pharmaceuticals*, **4**, 457–469 (2011)

(3) GFP 断片の再構成を利用したバクテリア内タンパク質間相互作用の検出

生体内でのタンパク質同士の会合や解離は、遺伝子発現・細胞分裂・細胞分化などに関わる細胞内外情報伝達において、中心的役割を果たしている。これらの生命現象を理解する上で、モデル生物内でのタンパク質間相互作用検出は重要である。タンパク質間相互作用のライブラリースクリーニングに酵母が広く用いられている。しかし、酵母に標的タンパク質を発現させると、細胞毒性を示すことがしばしばある。そこで、標的タンパク質の細胞毒性の影響を受けにくいバクテリアをモデル生物とした、生体内タンパク質間相互作用検出法を開発した。標的タンパク質同士が近接すると、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 断片が再構成して蛍光を回復する。GFP 断片の再構成には、補酵素や ATP は不要である。また、再構成した GFP が細胞内に蓄積されるため、タンパク質間相互作用の高感度検出が可能となる。

1.(1)-5) *Methods Mol. Biol.*, **705**, 251–258 (2011)

1. 原著論文

(1) Refereed Journals

- 1) T. Yamada, H. Yoshimura, A. Inaguma and T. Ozawa, “Visualization of non-engineered single mRNAs in living cells using genetically encoded fluorescent probes”, *Anal. Chem.*, **83**, 5708–5714 (2011).
- 2) A.K.M. Kafi, M. Hattori, N. Misawa and T. Ozawa, “Dual-color bioluminescence analysis for quantitatively monitoring G-protein-coupled receptor and β -Arrestin Interactions”, *Pharmaceuticals*, **4**, 457–469 (2011).
- 3) T. Tamaru, M. Hattori, K. Honda, I. Benjamin, T. Ozawa and K. Takamatsu, “Synchronization of circadian Per2 rhythms and HSF1-BMAL1: CLOCK interaction in mouse fibroblasts after short-term heat shock pulse”, *PLoS ONE*, **6**, e24521 (2011).
- 4) T. Ozawa and Y. Umezawa, “Genetically-encoded fluorescent probes for imaging endogenous mRNA in living cells”, *Methods Mol. Biol.*, **714**, 175–188 (2011).
- 5) A. Kanno, T. Ozawa and Y. Umezawa, “Detection of protein-protein interactions in bacteria by GFP-fragment reconstitution”, *Methods Mol. Biol.*, **705**, 251–258 (2011).
- 6) T. Ishimoto, T. Ozawa and H. Mori, “Real-time monitoring of actin polymerization in living cells using split luciferase”, *Bioconjugate Chem.*, **22**, 1136–1144 (2011).

2. 総説・解説

- 1) M. Awais and T. Ozawa, “Illuminating intracellular signaling and molecules for single cell analysis”, *Mol. Biosystems*, **7**, 1376–1387 (2011).
- 2) T. Ozawa and Y. Umezawa, “Imaging of endogenous RNA using genetically-encoded probes”, *Current Protocols Chem. Biol.*, **3**, 27–37 (2011).

3. 著書

- 1) 菅野憲, 小澤岳昌: 「タンパク質核内移行の可視化」, 生体の科学, **65**, 494–495 (2011).
- 2) 上村想太郎, 小澤岳昌, 加地範匡, 権田幸祐: 「見つけることに意義がある—1分子計測技術の可能性—」, 現代化学, **488**, 26–30 (2011).
- 3) 佐藤健太郎, 小澤岳昌: 「写真で見る日本化学の源流」, 化学, **66**, 43–47 (2011).
- 4) 小澤岳昌: 「プローブタンパク質」, 蛍光イメージング/MRI プローブの開発, 菊地和也監修, シーエムシー出版, 22–34(2011).
- 5) 菅野憲, 小澤岳昌: 「対象別試料分析法 5.4.5 細胞」分析化学便覧, 日本分析化学会編, 516–522 (2011).
- 6) 小澤岳昌: 「生命分子科学」, 学術の動向, 5月号, 53–57 (2011).
- 7) 小澤岳昌: 「発光タンパク質による細胞活動リアルタイム観察」, *BIOINDUSTRY*, **28**, 11–17 (2011).