

ANALYTICAL CHEMISTRY

Annual Research Highlights

(1) “A method of controlling neural axon guidance by external light”

To generate an artificial control of the axon outgrowth of nerve cells, we developed a tool in which the photoreceptor protein CRY2 is fused with a neuronal axon guide receptor (DCC). This tool was expressed in primary cultured nerve cells and only a portion of the growth cone at the tip of the axon was irradiated with light. As a result, the axon elongated and guided to the direction of light irradiation. In addition, by expressing this tool in nerve cells in a *C. elegans* and irradiating light, the axon outgrowth direction was induced like the cultured cells. From these results, we concluded that this method is effective not only in cultured cells but also in living organisms to manipulate the elongation of nerve axons by photo-induced receptor clustering (1.(1)-2) *Sci. Rep.*, **6**, 23976 (2016).

(2) “A visualization probe for non-coding RNA TERRA and its single molecule analysis in living cells”

To elucidate the molecular mechanism of a non-coding RNA, TERRA, which is a transcription product of the telomere region at the end of chromosomes, a fluorescent probe was developed. The probe consists of an RNA binding protein domain PUM-HD which was mutated to bind to the telomere-repeat region of TERRA selectively and split fluorescent protein fragments. When the probe molecules bind to TERRA in tandem, fluorescent protein reconstitution occurs between adjacent probes and fluorescence appears. A telomere marker protein TRF1 and hnRNPA1 which is a telomere related protein are also fluorescently labeled and expressed in living cells, and simultaneous single molecule observation was performed using a total internal reflection fluorescence microscope. As a result, specific localization of TERRA in the region about 1 μm away from telomere and hnRNPA1 recruitment into the region was observed. This result suggested the molecular mechanism of TERRA function expression mechanism, that is, TERRA uptake hnRNPA1, which is originally contained in RNP complex on telomeres, resulting in promotion of telomere length recovery (1.(1)-3) *Sci. Rep.* **6**, 38910 (2016).

(3) “Development of a probe to visualize Smac releasing from mitochondria caused by cell death”

We developed a probe to visualize the release of molecules from mitochondria to cytosol in the apoptotic process after ultraviolet light stimulation. This probe used two split fluorescent proteins GFP_{opt}1-10 and GFP_{opt}11, which show spontaneous reconstruction. GFP_{opt}11 was fused to Smac, which is a protein released from mitochondria, and localized in mitochondria. GFP_{opt}1-10 was expressed in the cytoplasm. When

mitochondrial release occurs, Smac-GFP_{opt}11 was released into the cytoplasm, and fluorescence of GFP_{opt} was observed by spontaneous reconstruction. Cells expressing this probe were irradiated with ultraviolet light and observed through time-lapse fluorescence microscopy. Smac release from mitochondria gradually proceeded 2 hours after stimulation, and the cell death was observed in 8 to 10 hours after the stimulation. We also succeeded in visualizing apoptotic cells in zebrafish using the developed probe. (1.(1)-5) *Anal. Chem.*, **88**, 838(2016).

(4) “Super resolution imaging of molecular cluster formation on mitochondrial outer membrane”

As cells undergo apoptosis after ultraviolet light stimulation, molecular release from mitochondria occurs. We performed superresolution imaging of molecular clusters on the outer membrane of mitochondria, which is thought to cause this molecular release. A major molecule in the cluster, Bak, was fused with a photoconversion fluorescent protein mEos3.2, and was observed through photo activated localization microscopy (PALM) method. As a result, Bak forms clusters of about 200 nm or smaller in diameter on the outer membrane of mitochondria. In addition, regardless of the size of the clusters, the molecular density of Bak in the cluster was almost constant. Since pore-like structures, which are required for mitochondrial release, were not observed, aggregation of Bak possibly disturbs the structure of the outer membrane of mitochondria and promotes release of molecules from mitochondria.

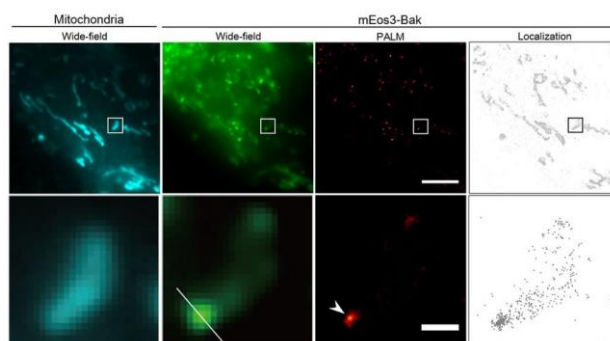


Fig. 1. Images of mitochondria (Wide-field) and mEos3-Bak (Wide-field, PALM and Localization). Mitochondria were visualized by MitoTracker Deep Red dye. Magnified images in the boxed regions are shown in lower panels. An arrowhead indicates a Bak cluster. Scale bars: 3 μm (top) or 500 nm (bottom).

1.(1)-1) *Sci. Rep.*, **6**, 27505 (2016).

分析化学研究室

研究ハイライト

(1) 光による神経軸索伸張方向制御法の開発

神経細胞の軸索伸張の人為的制御を目指して、神経軸索誘導物質受容体 (DCC) に光応答して集合する光受容体タンパク質 CRY2 を融合したツールを作成した。このツールを初代培養神経細胞に発現させ、軸索先端にある成長円錐の一部分のみに光照射を行った。その結果、神経軸索は光照射した方向へと伸長した。また、このツールを線虫体内の神経細胞に発現し光照射を行うことで、培養細胞と同様に軸索伸張方向が誘導された。これらの結果から、受容体を人為的に集合させることで神経軸索の伸長を操作できること、この手法は培養細胞のみならず生物個体内でも有効であることを明らかにした。

1.(1)-2) *Sci. Rep.*, **6**, 23976 (2016)

(2) 機能性 RNA TERRA 可視化プローブ開発と 1 分子動態解析

染色体末端のテロメア領域の転写産物である機能性 RNA, TERRA の機能発現機構を解明するため、TERRA 可視化プローブを作成し生細胞内 1 分子観察を行った。プローブは TERRA 中のテロメア反復配列に結合するよう改変を加えた RNA 結合タンパク質 PUM-HD と二分割蛍光タンパク質から成る。このプローブ分子が複数 TERRA のテロメア反復配列に結合すると、隣接したプローブ間で蛍光タンパク質の再構成が生じ、蛍光性が表れる。本プローブに加え、テロメアマーカである TRF1 およびテロメア関連タンパク質である hnRNPA1 にも蛍光標識を施して生細胞内に発現し、蛍光顕微鏡を用いて同時 1 分子観察を行った。その結果、TERRA はテロメアから 1 μm 程度離れた領域に強く局在すること、そこに hnRNPA1 がリクルートされることが明らかとなった。この結果から、テロメア上の RNP 複合体に含まれる hnRNPA1 を TERRA が取り込み除去することで、テロメア長回復が促されるという TERRA 機能発現機構が示唆された。

1.(1)-3) *Sci. Rep.*, **6**, 38910 (2016)

(3) 細胞死の際に生じるミトコンドリアからの分子放出可視化プローブ開発

紫外光刺激を受けてアポトーシスを起こす細胞が示すミトコンドリア内分子の放出を可視化するプローブを開発した。本プローブは自発的再構成を示す二分割蛍光タンパク質 GFPopt1-10 と GFPopt11 を用いた。GFPopt11 をミトコンドリアから放出されるタンパク質 Smac に融合し

ミトコンドリア内に局在させ、GFPopt1-10 は細胞質に局在させた。ミトコンドリア放出が生じると、Smac-GFPopt11 が細胞質に放出され、自発的再構成により GFPopt の蛍光が観察される。本プローブを発現した細胞を紫外線照射し、タイムラプス蛍光顕微鏡観察を行った結果、刺激後 2 時間程度から徐々にミトコンドリア放出が生じ、刺激後 8-10 時間で細胞死に至る様子が観察された。この結果から、ミトコンドリア放出が生じる時間経過の可視化解析が実現した。

1.(1)-5) *Anal. Chem.*, **88**, 838(2016)

(4) ミトコンドリア外膜上分子集合体の超分解能評価

細胞が紫外光刺激を受けアポトーシスを起こす際に、ミトコンドリア内分子の放出が生じる。この分子放出を起こしていると考えられているミトコンドリア外膜上分子集合体の超分解能観察を行った。集合体の主要分子である Bak にフォトコンバージョン蛍光タンパク質である mEos3.2 を融合し、photo activated localization microscopy (PALM) 法を用いて Bak 集合体を超分解能観察した。その結果、Bak はミトコンドリア外膜上で直径 200 nm 以下の集合体を形成していることが明らかとなった。また、集合体の大きさにかかわらず含まれる Bak の分子密度は一定であった。ミトコンドリア内分子の放出に必要なとされている孔のような構造体は観察できなかったことから、Bak が集合することでミトコンドリア外膜そのものの構造が乱され、ミトコンドリア内分子の放出が促されるという機構が示唆された。

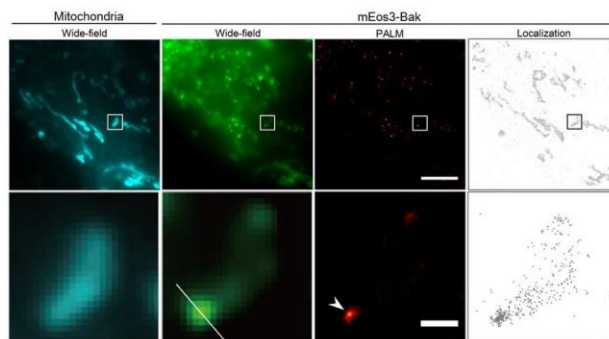


図1 ミトコンドリアと mEos3-Bak の像。ミトコンドリアは、広視野顕微鏡を用いて、mEos3-Bak は、広視野顕微鏡、PALM 顕微鏡、透過型電子顕微鏡を用いて観察された。ミトコンドリアは MitoTracker Deep Red dye によって染色された。下段のパネルがボックス領域の拡大図である。矢頭が Bak cluster を示す。スケールバー: 3 μm (上段) ならびに 500nm (下段)。

1.(1)-1) *Sci. Rep.*, **6**, 27505 (2016)

1. 原著論文

(1) Refereed Journals

- 1) Y. Nasu, A. Benke, S. Arakawa, G. J. Yoshida, G. Kawamura, S. Manley, S. Shimizu, and T. Ozawa, “In situ characterization of Bak clusters responsible for cell death using single molecule localization microscopy”, *Sci. Rep.*, **6**, 27505 (2016).
- 2) M. Endo, M. Hattori, H. Toriyabe, H. Ohno, H. Kamiguchi, Y. Iino, and T. Ozawa, “Optogenetic activation of axon guidance receptors controls direction of neurite outgrowth”, *Sci. Rep.*, **6**, 23976 (2016).
- 3) T. Yamada, H. Yoshimura, R. Shimada, M. Hattori, M. Eguchi, T. K. Fujiwara, A. Kusumi, and T. Ozawa, “Spatiotemporal analysis with a genetically encoded fluorescent RNA probe reveals TERRA function around telomeres”, *Sci. Rep.* **6**, 38910 (2016).
- 4) M. Hattori, G. Kawamura, R. Kojima, M. Kamiya, Y. Urano, and T. Ozawa, “Confocal bioluminescence imaging for living tissues with a caged substrate of luciferin”, *Anal. Chem.*, **88**, 6231-6238 (2016).
- 5) Y. Nasu, Y. Asaoka, M. Namae, H. Nishina, H. Yoshimura and T. Ozawa, “Genetically encoded fluorescent probe for imaging apoptosis in vivo with spontaneous GFP complementation”, *Anal. Chem.*, **88**, 838-844 (2016).
- 6) O. Takenouchi, A. Kanno, H. Takakura, M. Hattori, and T. Ozawa, “A Bioluminescent indicator for highly sensitive analysis of estrogenic activity in a cell-based format”, *Bioconjug. Chem.*, **27**, 2689–2694 (2016).
- 7) T. Frank, A. Reichel, O. Larsen, A.-C. Stilp, M. M. Rosenkilde, T. Stamminger, T. Ozawa and N. Tschammer, “Attenuation of chemokine receptor function and surface expression as an immunomodulatory strategy employed by HCMV is linked to vGPCR US28”, *Cell Commun. Signal.*, **14**, 31 (2016).
- 8) S. Lieb, T. Littmann, N. Plank, J. Felixberger, M. Tanaka, T. Schafer, S. Krief, S. Elz, K. Friedland, G. Bernhardt, J. Wegener, T. Ozawa and A. Buschauer, “Label-free versus conventional cellular assays: functional investigations on the human histamine H1 receptor”, *Pharmacol. Res.*, **114**, 13-26 (2016).

2. 総説・解説

- 1) S.B. Kim, T. Ozawa, and Y. Umezawa, “A genetically encoded bioluminescent indicator for illuminating proinflammatory cytokines”, *MethodsX*, **7**, 483-489 (2016).
- 2) M. Hattori and T. Ozawa, “Live cell bioluminescence imaging in temporal reaction of G protein-coupled receptor for high-throughput screening and analysis”, *Methods Mol. Biol.*, **1461**, 195-202 (2016).
- 3) Yoshimura and T. Ozawa, “Monitoring of RNA dynamics in living cells using PUM-HD and fluorescent protein reconstitution technique”, *Methods Enzymol.*, **572**, 65-85 (2016).

3. 著書

- 1) 小澤岳昌:「クリスチャン分析化学 I. 基礎編. 6章化学平衡の一般概念」, 丸善出版, pp. 179-206 (2016).
- 2) 服部満, 小澤岳昌:「三次元発光イメージング 先端計測・研究を支える機器開発」, 化学同人, pp. 82-87 (2016).