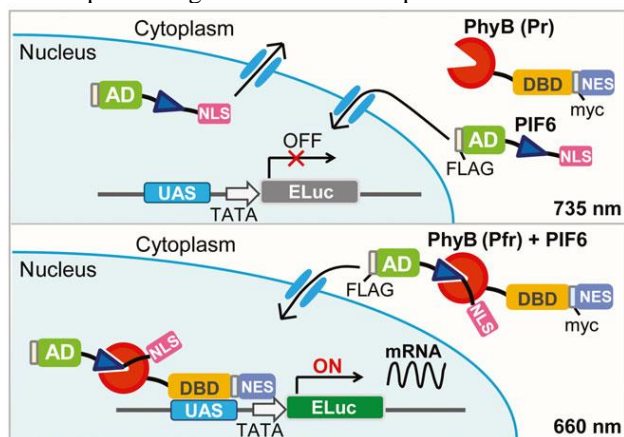


### Annual Research Highlights

#### (1) Development of a transcription regulation system controlled by red light irradiation

Transcriptional regulation is a useful strategy for gene therapy and for biomedical research. In this study, we developed an optogenetic tool based on *Arabidopsis thaliana* phytochrome B (PhyB) and its binding partner, phytochrome-interacting factor 6 (PIF6). The red light illumination only for 5 min induced PhyB translocation from cytoplasm into the nucleus by the association with PIF6, resulting in transcriptional activation based on Gal4 DNA-binding domain and the upstream activating sequence of Gal system. The nucleocytoplasmic shuttling vector using PhyB and PIF6 might be applicable for transcriptional regulation in tissue experiments.



**Fig. 1** Schematic of the principle of photoactivatable transcription regulation system.

1.(1)-5) *Photochem Photobiol.*, 94, 1071-1076 (2018).

#### (2) Development of a bioluminescence-based assay system for cell fusion in myogenesis

Myogenesis-promoting chemicals are important sources of new pharmaceuticals for the treatment of skeletal muscle atrophy. This study presents a quantitative bioluminescence assay system for screening compounds promoting myogenesis in a chemical library. The system consists of two stable C2C12 myoblast cell lines, each of which expresses either an N-terminal or a C-terminal split luciferase fragment fused to a naturally split DnaE intein. Cell fusion during myogenesis induces bioluminescence in the cytosol because of luciferase reconstitution of luciferase. The luminescence intensity quantitatively represents the progress in cell fusion, indicating extent of myogenesis. We applied this system to high-throughput screening of myogenesis-promoting compounds in 1,191 pharmacologically proven bioactive small molecules, and found out two chemicals as myogenesis-promoting compounds: Imatinib and Doxazosin mesylate. The assay system enabled a robust and quantitative evaluation of the extent of myogenesis through simple luminescence measurements. Thus, the system is expected to be widely applicable for high-throughput screening of cell fusion-promoting and inhibiting molecules.

1.(1)-4) *Analyst*, 143, 3472-3480 (2018).

#### (3) Identification of body fluid samples through ATR

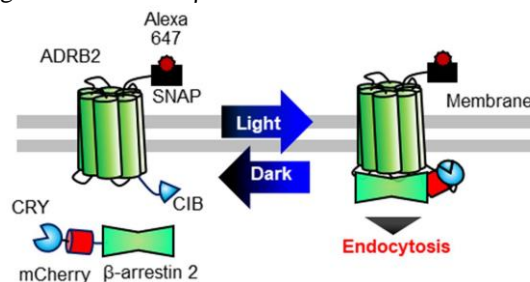
#### FTIR and chemometric analysis

Body fluid (BF) identification is a critical part of a criminal investigation because of its ability to suggest how the crime was committed and to provide reliable origins of DNA. Vibrational spectroscopy provides approaches with advantages for forensic BF identification, such as non-destructivity and versatility for various BF types and analytical interests. However, unexplored issues remain for its practical application to forensics; for example, a specific BF needs to be discriminated from all other suspicious materials as well as other BFs. In this study, we describe a modeling method for discriminating ATR FTIR spectra of various BFs, including peripheral blood, saliva, semen, urine and sweat, to meet the demands described above. Spectra from unexpected non-BF samples were efficiently excluded as outliers by adopting the Q-statistics technique. The robustness of the models against aged BFs was significantly improved through the discrimination scheme of a dichotomous classification tree with hierarchical clustering. This study proposes the use of vibrational spectroscopy and a chemometric strategy for forensic BF identification.

1.(1)-6) *Sci. Rep.*, 8, 8459 (2018).

#### (4) Photoregulation of GPCR-Arrestin interaction to control its intracellular trafficking

Intracellular trafficking of G protein-coupled receptors (GPCRs) controls their localization and degradation, affecting a cells' ability to adapt to extracellular stimuli. Although the perturbation of trafficking induces diseases, the trafficking mechanisms are poorly understood. In this study, we demonstrated an optogenetic method using an optical dimerizer, cryptochrome (CRY) and its partner protein (CIB), to analyze the trafficking mechanisms of GPCRs and their regulatory proteins. Temporal control of the interaction between  $\beta$ -arrestin and  $\beta$ 2-adrenergic receptor (ADRB2) reveals that the duration of the interaction determines the trafficking pathway of ADRB2 to recycling or degradation. Remarkably, the phosphorylation of ADRB2 by G protein-coupled receptor kinases is unnecessary to trigger clathrin-mediated endocytosis, and  $\beta$ -arrestin interacting with unphosphorylated ADRB2 fails to activate a downstream signaling. Temporal control of  $\beta$ -arrestin-GPCR interactions will provide an approach to investigate the roles of  $\beta$ -arrestin and the mechanism in



$\beta$ -arrestin-specific trafficking of various GPCRs.

**Fig. 4** Detection system of GPCR activity using split luciferase reconstitution.

1.(1)-10) *Sci. Rep.*, 8, 677 (2018).

研究ハイライト

(1) 赤色光刺激による転写調節光操作ツールの開発

転写調節は、遺伝子治療および生物医学研究にとって有用な戦略である。本研究では、シロイヌナズナのフィトクロム B (PhyB) とその結合パートナーである PIF6 に基づく光遺伝学的ツールを開発した。5 分間の赤色光照射は、PIF6 との結合により、PhyB の細胞質から核への移行を誘導し、Gal4 DNA 結合ドメインと Gal システムの上流活性化配列に基づいた転写活性化をもたらした。本研究で開発した核細胞質シャトルベクターは、組織実験における転写調節への応用が期待される。

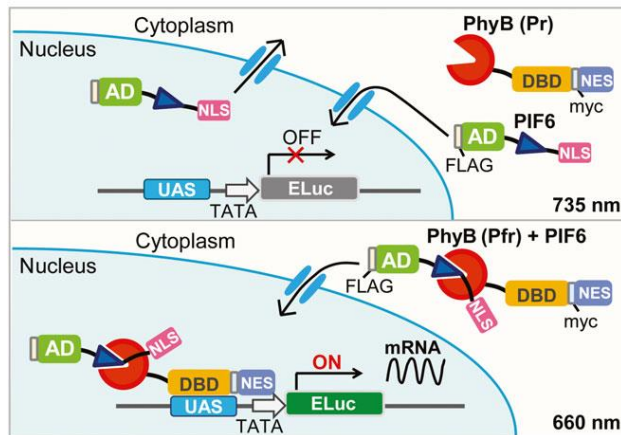


Fig. 1. Schematic of the principle of photoactivatable transcription regulation system.

1.(1)-5) *Photochem Photobiol.*, 94, 1071-1076 (2018).

(2) 筋形成過程における細胞融合を検出する生物発光システムの開発

筋形成促進化合物は、生活の質を損なう骨格筋萎縮の治療薬候補として注目されている。本研究では、化合物ライブラリから筋形成促進化合物を見出す定量的生物発光スクリーニング法の開発を行った。開発したシステムは、2つの筋芽細胞株 C2C12 細胞安定発現株からなり、それぞれの細胞株が DnaE インテインに融合した N 末端または C 末端の二分割ルシフェラーゼ断片を発現している。筋形成過程における細胞融合が生じるとルシフェラーゼの再構成が生じ、細胞質での発光を誘発する。検出された発光強度は細胞融合の進行度と定量的相関を有し、すなわち筋形成の指標として用いることが可能であった。本システムを用い、1,191 化合物からなるの生理活性小分子ライブラリからの筋形成促進化合物のハイスループットスクリーニングを行った結果、筋形成促進化合物としてイマチニブとメシル酸ドキサゾシンを見出した。本研究で開発したシステムにより、発光測定により簡便な筋形成定量評価が実現した。このシステムは、細胞融合促進および阻害分子のハイスループットスクリーニングに広く適用できると期待される。

1.(1)-4) *Analyst*, 143, 3472-3480 (2018).

(3) ATR-FTIR と計算化学を利用した体液サンプル同定法の開発

体液 (BF) の特定は、犯罪捜査において信頼できる DNA の起源を提供しうる重要な情報を与える。振動分光法は、さまざまな BF 種に対する非破壊性および汎用性など、BF の識別に有用な手法である。ただし、法医学への実際の適用に関しては、スペクトルを他含有物や他の BF と分離・識別することや、経時劣化した BF サンプルにも適用できることが求められる。本研究では、上記の要求を満たすために、末梢血、唾液、精液、尿、汗を含むさまざまな BF の ATR FT-IR スペクトルを識別するためのモデリング法を開発した。未知の非 BF サンプルのスペクトルは、Q 統計手法を採用することにより、外れ値として除外した。さらに階層化クラスタリングを伴う二分木を用いた識別スキームを使用することにより、経時劣化した BF に対するモデルの信頼性が有意に向上した。本研究の成果は、法医学的 BF 同定のための振動分光法および計算化学を利用した新たな方法論の提案となる。

1.(1)-6) *Sci. Rep.*, 8, 8459 (2018).

(4) GPCR-アレスチン相互作用の光制御による内在化操作法の開発

G タンパク質共役受容体 (GPCR) の細胞内輸送は、その局在と分解を通じて細胞外シグナル適応を制御している。細胞内輸送の混乱は様々な疾患の原因となるが、これら細胞内輸送の機構は十分理解されていない。本研究では、GPCR とその調節タンパク質の細胞内輸送機構を理解するため、クリプトクロム (CRY) およびそのパートナータンパク質 (CIB) を使用した細胞内輸送の光操作手法を開発した。本手法を用いた解析の結果、 $\beta$ -アレスチン-ADRB2 相互作用継続時間が ADRB2 の輸送経路がリサイクリングに向かうか分解へと向かうかを決定することを見出した。さらに G タンパク質共役受容体キナーゼによる ADRB2 のリン酸化はクラスリンによるエンドサイトーシスを引き起こすのに不要であり、非リン酸化 ADRB2 と相互作用する  $\beta$ -アレスチンは ADRB2MAPK シグナル伝達を活性化しなかった。  $\beta$ -アレスチン-GPCR 相互作用の時間的制御法は、 $\beta$ -アレスチンのユニークな役割と、さまざまな GPCR の  $\beta$ -アレスチン特異的輸送経路を調節する機構の詳細解明に資すると期待される。

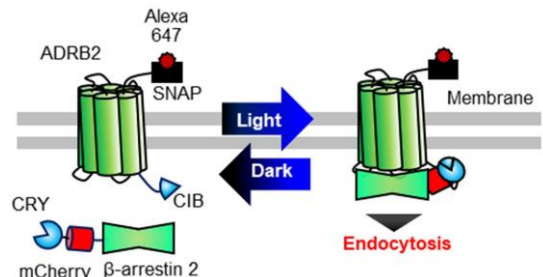


Fig. 4. Detection system of GPCR activity using split luciferase reconstitution.

1.(1)-10) *Sci. Rep.*, 8, 677 (2018).

## 1. 原著論文

### (1) Refereed Journals

- 1) Circadian BMAL1–HSF1–p53 interplay regulates UV-triggered synchronization to promote stress protection., G. Kawamura, M. Hattori, K. Takamatsu, T. Tsukada, Y. Ninomiya, I. Benjamin, P. Sassone-Corsi, T. Ozawa and T. Tamaru, *Commun. Biol.*, 1, 204 (2018).
- 2) A split luciferase-based probe for quantitative proximal determination of Gαq signalling in live cells., T. Littmann, T. Ozawa, C. Hoffmann, A. Buschauer, and G. Bernhardt, *Sci Rep.*, 8, 17179 (2018).
- 3) A Preferential Photoreaction in a Porous Crystal, Metal-Macrocyclic Framework (MMF): PdII-Mediated Olefin Migration over [2+2] Cycloaddition., H. Yonezawa, S. Tashiro, T. Shiraogawa, M. Ehara, R. Shimada, T. Ozawa and M. Shionoya, *J. Am. Chem. Soc.*, 140,16610-16614 (2018).
- 4) A Robust Split-Luciferase-Based Cell Fusion Screening for Discovering Myogenesis-Promoting Molecules, Q. Li, H. Yoshimura, M. Komiya, K. Tajiri, M. Uesugi, Y. Hata, T. Ozawa, *Analyst*, 143, 3472-3480 (2018).
- 5) Light-controllable Transcription System by Nucleocytoplasmic Shuttling of a Truncated Phytochrome B., N. Noda, T. Ozawa, *Photochem Photobiol.*,94, 1071-1076 (2018).
- 6) Soft and Robust Identification of Body Fluid Using Fourier Transform, Infrared Spectroscopy and Chemometric Strategies for Forensic Analysis. A. Takamura, K. Watanabe, T. Akutsu and T. Ozawa., *Sci. Rep.*, 8, 8459 (2018).
- 7) Photo-activatable Akt probe - A new tool to study Akt-dependent physiopathology of cancer cells., S. Haga, T. Ozawa, N. Morita, M. Asano, S. Jin, Y. Min and M. Ozaki, *Oncol. Res.*,26, 467-472 (2018).
- 8) Establishing a split-luciferase-assay for PKG interaction studies., A. Schramm, P.Mueller -Thuemen, T. Littmann, M. Harloff, T. Ozawa, J. Schlossmann. *Int. J. Med. Sci.*, 19, 1180 (2018).
- 9) Detection of necroptosis in ligand-mediated and hypoxia-induced injury of hepatocytes using a novel optic probe detecting receptor-interacting protein (RIP)1/RIP3 binding., S. Haga, A. Kanno, T. Ozawa, N. Morita, M. Asano and M. Ozaki, *Oncol. Res.*, 26, 503-513 (2018).
- 10) Unique Roles of β-Arrestin in GPCR Trafficking Revealed by Photoinducible Dimerizers., O. Takenouchi, H. Yoshimura, T. Ozawa., *Sci. Rep.*, 8, 677 (2018).
- 11) Real-time fluorescence imaging of single-molecule endogenous non-coding RNA in living cells., H. Yoshimura and T. Ozawa, *Methods Mol. Biol.*, 1649, 337-347 (2018).

### 2. 総説・解説

- 1) Optogenetics, Sophie Vriza and Takeaki Ozawa (Eds.), Royal Society of Chemistry. (2018).
- 2) Quantitative Control of Kinase Activity with a Mathematical Model., G. Kawamura and T. Ozawa, Optogenetics, Royal Society of Chemistry., pp149-168 (2018).
- 3) 生命分子の機能を超えるための解析化学, 吉村英哲, 小澤岳昌, 生命機能に迫る分子化学, 化学同人, pp28-33 (2018).
- 4) 第3章プローブタンパク質, 小澤岳昌, 蛍光イメージング/MR I プローブの開発, シーエムシー出版, pp22-34 (2018).
- 5) Nano-Materials for Bioimaging., T. Ozawa, *Anal. Sci.*, 34, 125-126 (2018).