

Analytical Chemistry

Annual Research Review

(1) Molecular Sensors Based on Biological Signal Transduction

Fluorescent Indicators for Imaging Lipid Second Messengers in Single Living Cells

Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP₃) regulates diverse cellular functions including cell proliferation and apoptosis, and is related to diabetes, cancer, etc.; however, little is known about exactly when, where and how PIP₃ is produced. We herein describe fluorescent indicators for PIP₃ to reveal spatio-temporal regulations of PIP₃ production in single living cells. Upon ligand stimulations, PIP₃ was found to increase to a large extent at the endomembranes, i.e. the ER and Golgi, rather than at the plasma membrane. This PIP₃ increase at the endomembranes was revealed to be originated from its *in situ* production at the endomembranes, which was directly promoted by receptor tyrosine kinases endocytosed from the plasma membrane to the endomembranes. This PIP₃ production by receptor endocytosis appears to have solved a long-lasting question about how its downstream signaling pathways including Akt are activated at endoplasmic compartments located remote from the plasma membrane, such as the Golgi and mitochondria.

1-(1)-1) *Nat. Cell Biol.* **5**, 1016-1022 (2003)

(2) A Genetic Approach to Identifying Mitochondrial Proteins

The control of intricate networks within eukaryotic cells relies on differential compartmentalization of proteins. We have developed a method that allows rapid identification of novel proteins compartmentalized in mitochondria by screening large-scale cDNA libraries. The principle is based on reconstitution of split-enhanced green fluorescent protein (EGFP) by protein splicing of DnaE derived from *Synechocystis* sp. PCC6803. The cDNA libraries are expressed in mammalian cells following infection with retrovirus. If a test protein contains a functional mitochondrial targeting signal (MTS), it translocates into the mitochondrial matrix, where EGFP is then formed by protein splicing. The cells harboring this reconstituted EGFP are screened rapidly by fluorescence-activated cell sorting, and the

cDNAs are isolated and identified from the cells. The analysis of 258 cDNAs revealed various MTSs, among which we identified new transcripts corresponding to mitochondrial proteins. This method should provide a means to map proteins distributed within intracellular organelles in a broad range of different tissues and disease states.

1-(1)-7) *Nat. Biotechnol.* **21**, 287-293 (2003)

(3) Chemical Sensing Based on Molecular STM Tips *Control of Chemical Selectivity*

Four kinds of molecules having functional groups with differing extent of hydrogen bond acidity or basicity were used as molecular STM tips. STM observation of CH₃(CH₂)₂₀COO(CH₂)₁₆OH with the molecular tips allowed the selective observation or discrimination of one from the other of the hydroxy and carboxylate moieties. With basic 4-mercaptopyridine tips, the hydroxy groups were selectively observed as bright contrasts. 4-Mercaptobenzenesulfonic acid tips, which contain acidic sulfonyl groups, gave bright contrasts for both the hydroxy and carboxylate moieties. However, 4-mercaptobenzoic acid tips having a weaker acidic carboxy groups exhibited bright contrasts only for the hydroxy groups. Unmodified tips did not reveal the position of the two functional groups. It was concluded that the change in image contrast occurs only at the position where hydrogen bond pairing is possible between tip and sample and requires strong hydrogen bond interaction between them. This suggests that the selective observation of oxygen-containing functional groups can be tailored by controlling the extent of the hydrogen bond acidity or basicity of the tip-modifying molecules.

1-(1)-4) *J. Electroanal. Chem.* **550-551**, 125-129 (2003)

分析化学研究室

研究ハイライト

(1) 細胞内情報伝達過程を検出するセンサー

生きた単一細胞内での脂質セカンドメッセンジャーを可視化する蛍光プローブ

ホスファチジルイノシトール-3,4,5-三リン酸 (PIP₃) は蛋白質リン酸化酵素の Akt を含めた多くのシグナル伝達蛋白質を活性化する脂質セカンドメッセンジャーとして、その発見以来注目を集めている key 生体分子である。この PIP₃ の生きた細胞内での動態を蛍光顕微鏡下で可視化分析するために新しい蛍光プローブ (flip; フリップ) を開発した。この flip は特定のアミノ酸配列を連結して興味ある各オルガネラ膜に配置し、その細胞内局所の PIP₃ 動態をリアルタイムで追跡できる。この flip を用いて、PIP₃ が従来考えられていた細胞膜のみならず、小胞体膜やゴルジ体膜などの細胞内膜でも大量に増加していることを見出した。この細胞膜から遠く離れた細胞内膜に生成した PIP₃ は、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれたホルモンの受容体に刺激されて細胞内膜上で生合成されたものであることを明らかにした。これらの結果は、オルガネラ膜上で in situ 産生された PIP₃ が、Akt などシグナル伝達の下流に位置する蛋白質をそのオルガネラ膜上で活性化し、細胞機能を制御していることを示している。

1-(1)-1) *Nat. Cell Biol.* **5**, 1016-1022 (2003)

(2) ミトコンドリア局在タンパク質同定法

cDNA ライブラリーからミトコンドリア局在タンパク質を genetic なアプローチで網羅解析する方法を開発した。緑色蛍光タンパク質 (GFP) を特定の位置で二分するとその蛍光を失うが、二分したタンパク質にスプライシングタンパク質 (DnaE) を連結すると、スプライシング反応によりタンパク質の再連結が起こり、蛍光が回復する現象を見いだした。この原理を応用して、GFP の C 末と DnaE の C 末からなる融合タンパク質を、培養細胞のミトコンドリア内に局在化させる。一方未知のタンパク質を、GFP の N 末と DnaE の N 末の融合タンパク質に連結する。未知のタンパク質がミトコンドリアに局在すると、GFP の N 末と C 末がミトコンドリア内で近接しスプライシング反応が起こる。その結果、ミトコンドリア内で GFP が形成される。未知のタン

パク質に cDNA ライブラリーを用いて、ミトコンドリアが蛍光性の細胞をセルソーターを用いて回収した。細胞に含まれる 258 種類の cDNA の遺伝子解析を行ったところ、既知のミトコンドリアタンパク質に加え、新規ミトコンドリアタンパク質を同定することに成功した。開発した方法は、ミトコンドリア局在タンパク質の網羅的解析や組織間のミトコンドリアタンパク質発現の比較に応用可能である。

1-(1)-7) *Nat. Biotechnol.* **21**, 287-293 (2003)

(3) 分子探針に基づく走査型トンネル顕微鏡を用いた化学センシング

化学選択性の制御

水素結合能の異なる 3 種の分子をそれぞれ分子探針として用いて、エステル結合、水酸基を含む直線状の分子 CH₃(CH₂)₂₀COO(CH₂)₁₆OH を観察した。4-mercaptopyridine (4MP) 探針を用いて観察された STM 像においては、水酸基が選択的に観察できた。これは、4MP の水素結合受容性のピリジン窒素が水素結合供与体である水酸基のみと水素結合を形成し、トンネル電流が促進されたためであると考えられる。次に、水素結合供与性の官能基を持つ 4-mercaptobenzenesulfonic acid (4MBSA)、4-mercaptobenzoic acid (4MBA) 探針を用いて観察を行った。4MBSA 探針を用いることにより、水素結合を通じたトンネル電流の促進に基づき、試料分子のエステル結合、水酸基を共に明るく観察できた。一方、4MBA 探針では水酸基のみが選択的に観察された。4MBA のカルボキシ基はスルホニル基と同様にエステル結合、水酸基と水素結合を形成できるが、その酸性度はスルホニル基よりも弱いため、より有利な水素結合を形成できる水酸基のみでトンネル電流が促進され、選択的に明るく観察されたと考えられる。

これらの結果は、探針分子の水素結合能をデザインすることにより、STM 像における化学種選択性を調節できることを示している。

1-(1)-4) *J. Electroanal. Chem.* **550-551**, 125-129 (2003)

1 . 原著論文

(1) Refereed Journals

- 1) M. Sato, Y. Ueda, T. Takagi, and Y. Umezawa, "Production of PtdInsP₃ at endomembranes is triggered by receptor endocytosis" *Nat. Cell Biol.*, **5**, 1016-1022 (2003).
- 2) A. Kaihara, Y. Kawai, M. Sato, T. Ozawa and Y. Umezawa, "Locating a protein-protein interaction in living cells via split *Renilla* luciferase complementation" *Anal. Chem.*, **75**, 4176-4181 (2003).
- 3) K. Sasaki, M. Sato and Y. Umezawa, "Fluorescent indicators for Akt/protein kinase B and dynamics of Akt activity visualized in living cells" *J. Biol. Chem.*, **277**, 30945-30951 (2003).
- 4) T. Nishino, T. Ito and Y. Umezawa, "Selective observation of hydroxy and carboxylate moieties by scanning tunneling microscopy using chemically modified tips with differing extent of hydrogen bond acidity or basicity" *J. Electroanal. Chem.*, **550-551**, 125-129 (2003).
- 5) H. Aoki and Y. Umezawa, "Trace analysis of an oligonucleotide with a specific sequence using PNA-based ion-channel sensors" *Analyst*, **128**, 681-685 (2003).
- 6) S. B. Kim, T. Ozawa and Y. Umezawa, "A screening method for estrogens using an array-type DNA glass slide" *Anal Sci.*, **19**, 499-504 (2003).
- 7) T. Ozawa, Y. Sako, M. Sato, T. Kitamura and Y. Umezawa, "A genetic approach to identifying mitochondrial proteins" *Nat. Biotechnol.*, **21**, 287-293 (2003).
- 8) H. Aoki, K. Hasegawa, K. Tohda and Y. Umezawa, "Voltammetric detection of inorganic phosphate using ion-channel sensing with self-assembled monolayers of a hydrogen bond-forming receptor" *Biosensors and Bioelectronics*, **18**, 261-267 (2003).

(2) その他

- 1) Y. Umezawa and T. Ito, "Chemically modified scanning tunneling microscopy tips for molecular imaging" *Electrochemistry*, **71**, 522-529 (2003).
- 2) Y. Umezawa, "Seeing What Was Unseen. New Analytical Methods for Molecular Imaging" *Chemical Record*, **3**, 22-28 (2003).
- 3) T. Ozawa, Y. Sako, Y. Umezawa, "A Genetic Approach to Identifying Organelle-Localized Proteins", *Proceedings of the ISBC*, 276-279 (2003).

2 . 総説・解説

- 1) 梅澤喜夫：「化学センサー（総論）」*ぶんせき* **10**, 567-570 (2003).
- 2) 小澤岳昌：「環境 環境汚染物質のリスク評価・高速スクリーニング法」*ぶんせき* **10**, 592-596 (2003).
- 3) 梅澤喜夫：「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」*化学工業* **54**, 56-64 (2003).
- 4) 谷幸則, 梅澤喜夫「固/液界面の選択的イオン認識によるイオンセンサー」*分析化学* **52**, 491-503 (2003).
- 5) 佐藤守俊, 小澤岳昌, 梅澤喜夫「タンパク質プローブ」*現代化学* **383**, 25-31 (2003).
- 6) 梅澤喜夫「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」*先端ウォッチング領域「ナノ分析化学」報告書（日本化学会）*, **19**, 19-36 (2003).

- 7) 梅澤喜夫, 佐藤守俊, 小澤岳昌「生細胞内情報伝達の蛍光可視化プローブ (Fluorescent Indicators for Imaging Cellular Signaling Pathways in Living Cells)」ぶんせき **337**, 18-25 (2003).
- 8) 梅澤喜夫「細胞内シグナル伝達を攪乱する化学物質の新しい分析法」環境ホルモン学会ニュースレター **6**, December (2003).
- 9) 小澤岳昌「インテイン」Molecular Medicine, **40**, 1384-1386 (2003).

3. 著書

- 1) 梅澤喜夫「化学センサー 試料の前処理ハンドブック」丸善 (2003).