

ANALYTICAL CHEMISTRY

Annual Research Highlights

(1) “Development of Multicolor Bioluminescent Probes for 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 constructed multicolor luciferase fragments, of which sensitivity and signal-to-background ratio were considerably improved by using an engineered carboxy-terminal fragment of a click beetle luciferase and amino-terminal fragments of luciferases with different spectral characteristics. We investigated complementation of split luciferases from firefly (FLuc), click beetle in green (ELuc) and click beetle in red (CBRLuc). The N- and C-terminal fragments were fused to FK506-binding protein (FKBP) and FKBP-binding domain (FRB). A pair of the fusion proteins was coexpressed in mammalian cells and the luminescence intensities were examined by a luminometer. N- and C-fragments of individual luciferase were found complement enough to recover the bioluminescence upon interaction between FKBP and FRB in the presence of rapamycin. But, no cross complementation was detected when combination of different luciferase fragments was used. To make cross complementation possible, 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 FLuc, CBRLuc and ELuc (**Fig. 1**). The signal-to-background ratio upon using McLuc1 was improved higher than that of the native one. Thus, McLuc1 allowed new complementation partners of all the N-terminal luciferases, which can be widely used for monitoring protein-protein interactions in living subjects.

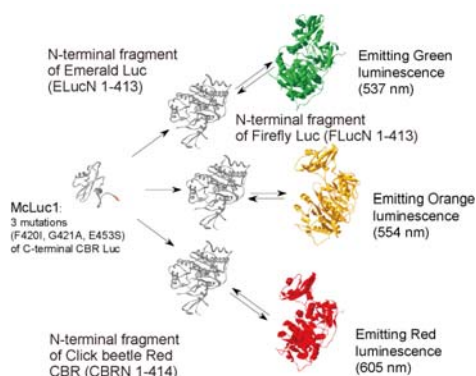


Fig. 1 Function of McLuc1. McLuc1 has the ability to complement multiple N-terminal luciferases.

(2) “Cyclic Luciferase for Real-Time Sensing of Caspase-3 Activities in Living Mammals”

Apoptosis is of important chemical processes in living systems, such as cell turnover, the immune system, development, or metamorphosis. Improper apoptosis is involved in many diseases including Alzheimer’s disease, Huntington’s disease, ischemia, autoimmune disorders and immortality of cancer cells. The programmed cell death is evolutionarily conserved biological systems, in which their executioners are called caspases. Caspase is a cysteine aspartic acid-specific protease that digests a specific peptide sequence containing asparagines in an early stage of apoptosis. Especially, caspase-3 is a crucial component of the apoptotic machinery. Herein, we report the development of a novel genetically encoded circular bioluminescent indicator for detecting activities of the caspases in living cells and mammals. The indicator consists of two DnaE inteins, two fragments of firefly luciferase (Fluc), and an amino acid substrate Asp-Glu-Val-Glu (DEVD) to be digested by caspase-3. After translation into a single polypeptide in living cells, the amino (N) and carboxy (C) terminals of the luciferase are ligated by the DnaE inteins, which results in a closed circular polypeptide chain. Since the structure of the cyclic luciferase is distorted, the luciferase loses its bioluminescence activity. If the substrate sequence is digested by activated caspase-3, the luciferase changes into an active form and restores its activity (**Fig. 2**). In vitro assay with cell lines showed ~9-fold increase in bioluminescence upon stimulation with an apoptosis-inducing compound, staurosporine. Additionally, in vivo imaging of caspase-3 activity with living mice also displayed increases in bioluminescence after the intraperitoneal injection of STS. This approach opens an avenue not only for salvaging anticancer drugs but also for developing inhibitors of caspases in the live mouse level.

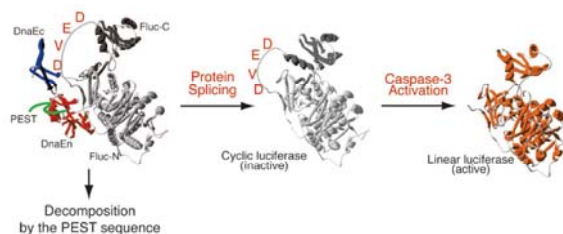


Fig. 2 Principle for monitoring the activity of caspase-3 by using cyclic firefly luciferase (Fluc).

分析化学研究室

研究ハイライト

(1) 生物個体内において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

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 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 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を開発した。北米産ホタル (FLuc)、緑色発光コメツキムシ (ELuc)、赤色発光コメツキムシ (CBRLuc) の分割型ルシフェラーゼ断片の再構成を検討した。各ルシフェラーゼの N 末端側断片と C 末端側断片に、それぞれ FK506 結合タンパク質 (FKBP) と FKBP 結合ドメイン (FRB) と融合させた後、動物細胞に対して、全ての組み合わせで導入した。各々の細胞の発光はルミノメーターにより計測した。その結果、FKBP-FRB 間の相互作用を誘導するラパマイシンの存在下において、同一種のルシフェラーゼ断片の組み合わせでは、再構成による発光回復が検出された。しかしながら、異なる種間の組み合わせでは、発光回復は検出されなかった。異なる種間での再構成を可能にするために、ランダム変異導入法を用いて、複数種の N 末端側断片と再構成することができる、新しい C 末端側断片の開発を行った。変異型 C 末端側断片 (McLuc1) は 3 つのアミノ酸残基に変異を持ち、FLuc、CBRLuc と ELuc のすべての N 末端側断片と再構成できることを見出した。また、McLuc1 を用いた場合には、シグナル/ノイズ比が改善されることを実証した。開発したルシフェラーゼ断片は、生物個体内の複数のタンパク質間相互作用検出において広範な応用が可能である。

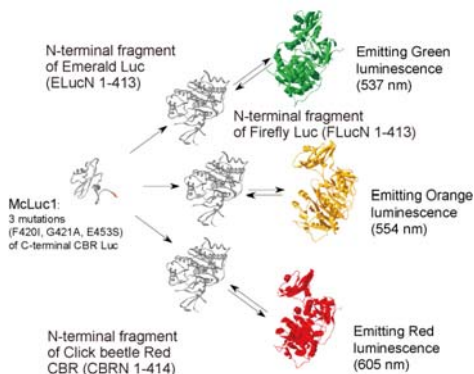


図 1 McLuc1 の機能。McLuc1 は複数種のルシフェラーゼの N 末端側断片と再構成することができる。

(2) 生体内のカスパーゼ-3 活性をリアルタイム検出する環状ルシフェラーゼの開発

生体内においてアポトーシスは、細胞の交代や分化・免疫系など、重要な化学的プロセスに関与している。アポトーシスに不具合が起こると、アルツハイマー病・ハンチントン病・虚血・自己免疫疾患・ガン細胞の不死化などのさまざまな病変が引き起こされる。遺伝子にプログラムされた細胞の自殺であるアポトーシスは、進化的に保存された生命現象であり、カスパーゼと呼ばれるタンパク質がその過程において中心的な役割を担う。カスパーゼは、その活性中心にシステイン残基を持ち、アスパラギン酸を含む特異的な塩基配列を認識・切断するタンパク質分解酵素である。特に、カスパーゼ-3 はアポトーシスの情報伝達経路において、細胞の自殺を決定づける重要な鍵となるタンパク質である。我々は、生体内のカスパーゼ-3 活性を検出するための新奇環状発光タンパク質インジケーターを開発した。カスパーゼ-3 インジケーターは、2 つの DnaE インテイン、2 つのホタルルシフェラーゼ (Fluc) 断片、およびカスパーゼ-3 が認識・切断するアミノ酸配列 Asp-Glu-Val-Glu (DEVD) から成る。細胞内で発現した直鎖状のカスパーゼ-3 インジケーター前駆体は DnaE インテインの作用により、そのアミノ末端とカルボキシル末端がペプチド結合により連結されて閉環する。この環状 Fluc の立体構造にひずみがあるため、本来有する生物発光活性は大きく減弱する。DEVD 配列がカスパーゼ-3 により切断されると、環状 Fluc は直鎖状に戻り、生物発光活性が回復する (図 2)。培養細胞レベルの実験では、スタウロスポリンによりアポトーシスを誘導した後、約 9 倍の発光強度の上昇を観察した。また、本インジケーターを用い、生きたマウス体内のカスパーゼ-3 活性をリアルタイムで検出することに成功した。本研究で開発したカスパーゼ-3 インジケーターは、ガン細胞のアポトーシスを促進させる新薬やタンパク質分解酵素の阻害剤の探索に応用可能である。

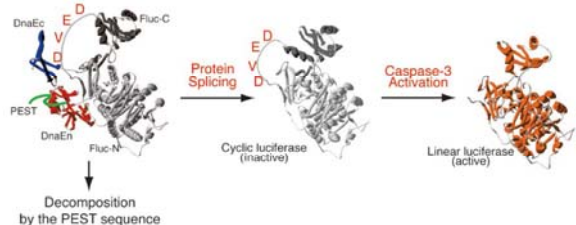


図 2 環状ホタルルシフェラーゼ (Fluc) を用いたカスパーゼ-3 活性検出の原理。

1. 原著論文

(1) Referred Journals

- 1) T. Ozawa, "Molecular Science for Analyzing Dynamics of Biomolecules in Living Cells", *J. JSCAS*, **10**, 489–439 (2008).

2. 総説・解説

- 1) 小澤岳昌:「RNA イメージング法」, 実験医学増刊, **26**, 59–67 (2008).
- 2) 菅野憲, 小澤岳昌:「レポータータンパク質の再構成法を利用した生体分子イメージング」, 生体の科学, **59**, 66–72 (2008).
- 3) 小澤岳昌:「タンパク質再構成法を用いた細胞内生体分子の解析法」, *BIOINDUSTRY*, **25**, 27–36 (2008).
- 4) 小澤岳昌, 宮脇敦史:「クラゲから生まれた GFP 革命」, 現代化学, **453**, pp25–28 (2008).

3. 著書

- 1) 小澤岳昌:「可視化プローブによる時空間情報を損なわないミトコンドリア RNA の動態観察」, 和田昭允編「ナノイメージング」(エヌ・ティー・エス), 第 4 編 1–1, p199–206 (2008).
- 2) 小澤岳昌:「生理機能を可視化する新たな分子プローブ」, 宇理須恒雄編「ナノメディシン」(オーム社), 第 1 章 1–2, p13–24 (2008).