

ANALYTICAL CHEMISTRY

Annual Research Highlights

(1) Ratiometric Bioluminescence Indicators for Monitoring Cyclic AMP in Live Cells Based on Luciferase-Fragment Complementation

Cyclic 3',5'-monophosphate AMP (cAMP) plays important roles in signal transduction as a second messenger. For quantifying and imaging of intracellular cAMP in living organisms, several bioluminescent indicators have been developed based on the structural information of luciferases. The indicators are now used as powerful tools for noninvasive detection of cAMP with high sensitivity. However, the absolute photon counts of the luciferase are affected substantially by adenosine 5'-triphosphate (ATP) and D-luciferin concentrations, limiting temporal and quantitative analysis in live cells.

In the present study, we developed a genetically encoded bioluminescent indicator for detecting intracellular cAMP based on complementation of split fragments of two-color luciferase mutants originated from click beetles. A cAMP-binding domain of protein kinase A was connected with an engineered carboxy-terminal fragment of luciferase, of which ends were connected with amino-terminal fragments of green luciferase and red luciferase (Fig. 1). We demonstrated that the ratio of green to red bioluminescence intensities was less influenced by the changes of ATP and D-luciferin concentrations. We also showed an applicability of the bioluminescent indicator for time-course and quantitative assessments of intracellular cAMP in living cells and mice. The bioluminescent indicator will enable quantitative analysis and imaging of spatiotemporal dynamics of cAMP in opaque and auto-fluorescent living subjects.

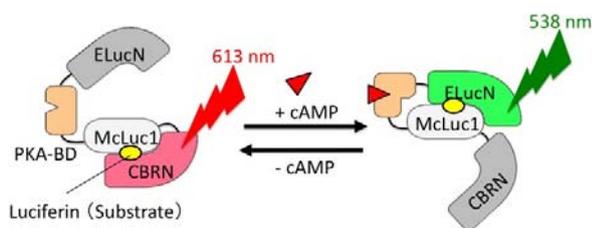


Fig. 1. Principle of ratiometric bioluminescence indicators for monitoring cAMP in living cells.

(2) Rapid and High-Sensitivity Cell-Based Assays of Protein-Protein Interactions Using Split Click Beetle Luciferase Complementation: An Approach to the Study of G-Protein-Coupled Receptors

Formation of protein-protein complexes is a central mechanism for signal transduction in living organisms. Many genetic methods have been developed to investigate the complicated network of protein-protein interactions and to screen chemicals that regulate the interactions specifically on the basis of reporter-protein-fragment complementation system. However, most of these methods have limitations in terms of sensitivity and the signal-to-background ratio.

We reported the development of a novel optical technique for monitoring protein-protein interactions in living cells based on complementation of split luciferase fragments from a Brazilian click beetle (*Pyrearinus termitilluminans*). A new pair of amino- and carboxy-terminal fragments of the luciferase was identified using semirational library screening. The fragments were applied to the study of five pairs of G-protein coupled receptors (GPCR)- β -arrestin interactions on the plasma membrane, which are major targets of drug development. By generating cell lines stably expressing the GPCRs and β -arrestin connected with the luciferase fragments, we demonstrated rapid and sensitive screening of potential chemicals that act on GPCRs using a 96-well microtiter plate format. This luciferase complementation method also enabled high spatial and temporal analyses of interactions in single living cells using bioluminescence microscopy (Fig. 2). The novel luciferase fragments are applicable to the different assay formats to screen various chemical compounds for drug discovery.

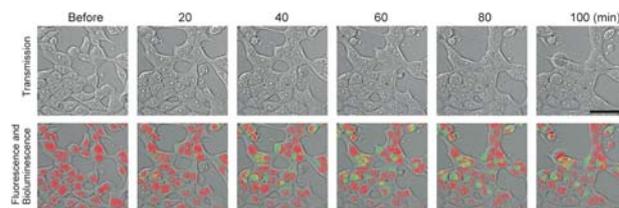


Fig. 2. Real time bioluminescence images of GPCR- β -arrestin interactions. Stable cell lines expressing luciferase-fragment-fused GPCR and β -arrestin were treated with a nucleus staining fluorescent dye, DRAQ5, and stimulated with 1.0×10^{-7} M somatostatin at 0 min. The obtained bioluminescence (green) and fluorescence (red) images were superimposed (*lower*) on the bright field images (*upper*). Bar: 50 μ m.

分析化学研究室

研究ハイライト

(1) 生細胞内の cyclic AMP を検出する二波長測光型発光プローブの開発

セカンドメッセンジャーのひとつである cyclic AMP (cAMP) の、生体内でその存在量および変動を知ることは、高等生物の情報伝達を解析する上で極めて重要である。我々は、分割したルシフェラーゼを再構成させる独自の技術を用いて、二波長の発光測定により、細胞内 cAMP 濃度を定量評価できる新規プローブを開発した。さらに、生細胞内および動物個体内において cAMP 濃度の解析を行った。二波長測光型 cAMP 検出发光プローブは、ブラジル産ヒカリコメツキムシルシフェラーゼ (ELuc) (極大波長 538 nm) の N 末端側断片 (ELucN)、プロテインキナーゼ A の制御サブユニット由来の cAMP 結合ドメイン (PKA-BD)、ジャマイカ産ヒカリコメツキムシルシフェラーゼ CBR の変異型 C 末端側断片 (McLuc1)、CBR (極大波長 613 nm) の N 末端側断片 (CBRN) からなる融合タンパク質の構造を持つ。McLuc1 は ELucN および CBRN ともに再構成可能な C 末端側断片である。cAMP 非存在下では、CBRN のみが McLuc1 と再構成し、613 nm の発光が検出される (図 1)。一方、cAMP 存在下では、cAMP が PKA-BD に結合し、プローブの立体構造が変化する。その結果、ELucN が McLuc1 と近接し、ELucN-McLuc1 が再構成され、538 nm の発光が検出される。同時に、CBRN-McLuc1 は解離し、613 nm の発光は消失する。プローブ発現細胞の破砕物を用いた解析から、本プローブは、538 nm の発光では cAMP 濃度に依存した発光強度上昇を示すのに対して、613 nm の発光では cAMP 濃度に依らず、ほぼ一定の発光強度を示すことが明らかとなった。また、二波長の発光強度比 (538 nm/613 nm) は、cAMP に対する高い選択性と濃度依存性を示した。ある一定濃度の cAMP を検出する際の発光強度比 (538 nm/613 nm) は、反応基質 D-ルシフェリンや補助因子 ATP の濃度に依らず、ほぼ一定であった。さらに、プローブを発現させた生細胞および動物個体を用いた解析において、本プローブは高い定量性を持ち、生細胞内でリアルタイムに起こる cAMP 濃度変化を非侵襲的に可視化検出できることが実証された。以上の結果から、本プローブは、生物個体を用いた解

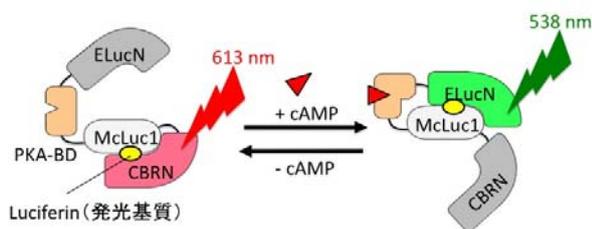


図1 二波長測光型cAMP検出发光プローブの検出原理図

析に広範な応用を可能とする、新規 cAMP 検出法として確立された。

(2) ヒカリコメツキムシ由来ルシフェラーゼ断片の再構成を利用した高感度アッセイ法。G タンパク質共役受容体を標的とした分析手法の開発

タンパク質の複合体形成は、細胞内シグナルの伝達に重要な役割を担っている。生体内のタンパク質間相互作用ネットワークやタンパク質間相互作用を促進もしくは阻害する化学物質をスクリーニングするため、様々な手法が開発されてきた。しかし、その手法の多くは感度及び S/N 比が低く、また細胞が生きた状態で検出できない問題を抱えている。本研究では、ブラジル産ヒカリコメツキムシ (*Pyrearinus termitilluminans*) 由来ルシフェラーゼを用い、生体内でのタンパク質間相互作用を可視化検出する新たな技術を開発した。まず FKBP-FRB タンパク質間相互作用をモデルとして、高感度かつ高 S/N 比を示す新規ルシフェラーゼ断片を開発した。このルシフェラーゼ断片を用いて、G タンパク質共役受容体 (GPCR)- β -アレスチン間相互作用の可視化検出を行った。ルシフェラーゼ断片を連結した GPCR および β -アレスチンを安定的に発現する細胞株を樹立した。この細胞株を用い、マイクロタイタープレート上で、GPCR を標的とする化学物質のスクリーニングが可能であることを実証した。また、独自に開発した生物発光顕微鏡を用いて、生きた細胞内の GPCR- β -アレスチン間相互作用を高い時空間分解能で検出することに成功した (図 2)。

本研究で開発した新規ルシフェラーゼ断片を用いれば、標的タンパク質・リガンドに応じたスクリーニング系の確立が可能である。特定のタンパク質間相互作用を促進もしくは阻害す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できる。

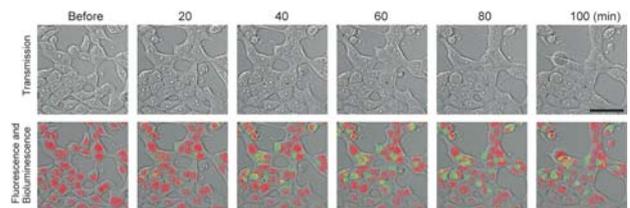


図 2 生物発光を利用した GPCR- β -アレスチン間相互作用のリアルタイム可視化検出。ルシフェラーゼ断片を連結した GPCR および β -アレスチンを安定的に発現する細胞株を、細胞核を染色する蛍光色素 DRAQ5 で処理した後、 1.0×10^{-7} M のソマトタチンで刺激した。生物発光画像 (緑色) および蛍光画像 (赤色) を明視野像 (上段) と重ね合わせて表示している。スケールバーは 50 μ m を表す。

1. 原著論文

(1) Refereed Journals

- 1) N. Misawa, A.K.M. Kafi, M. Hattori, K. Miura, K. Masuda and T. Ozawa, “Rapid and High-Sensitivity Cell Based Assays of Protein–Protein Interactions Using Split Click Beetle Luciferase Complementation: An Approach to the Study of G-Protein Coupled Receptors”, *Anal. Chem.*, **82**, 2552–2560 (2010).
- 2) M. Takeuchi, Y. Nagaoka, T. Yamada, H. Takakura and T. Ozawa, “Ratiometric Bioluminescence Indicators for Monitoring Cyclic AMP in Live Cells Based on Luciferase-Fragment Complementation”, *Anal. Chem.*, **82**, 9306–9313 (2010).
- 3) S. Haga, N. Morita, K. Irani, M. Fujiyoshi, T. Ogino, T. Ozawa and M. Ozaki, “p66(Shc) Has a Pivotal Function in Impaired Liver Regeneration in Aged Mice by a Redox-Dependent Mechanism”, *Lab. Invest.*, **90**, 1718–1726 (2010).

2. 総説・解説

- 1) A.K.M. Kafi, M. Hattori and T. Ozawa, “Luciferases for the Study of Protein–Protein Interactions in Live Cells and Animals”, *Nano Life*, **1**, 45–62 (2010).
- 2) S. B. Kim and T. Ozawa, “Creating Bioluminescent Indicators to Visualize Biological Events in Living Cells and Animals”, *Supramol. Chem.*, **22**, 439–448 (2010).
- 3) 小澤岳昌, “蛍光・発光タンパク質を用いた再構成法による分子イメージング”, *実験医学*, **28**, 27–32 (2010).

3. 著書

- 1) 小澤岳昌, “生細胞内 mRNA イメージングの現状と課題”, *生命現象を理解する分子ツール, 化学フロンティア*, p33–40(2010).
- 2) 小澤岳昌, “生体分子と生理機能を可視化するタンパク質再構成法”, *シングルセル解析の最前線*, p40–48(2010).