

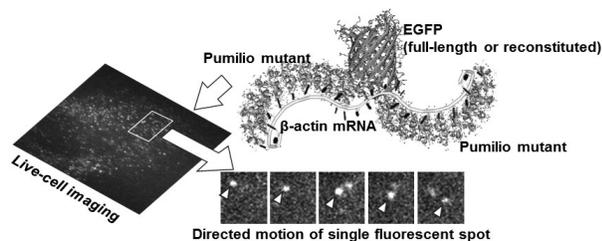
# ANALYTICAL CHEMISTRY

## Annual Research Highlights

### (1) “Development of a fluorescent probe for single mRNA imaging in living cells”

Localization and dynamics of mRNAs in living cells are implicated in various cellular functions. Development of technique to visualize endogenous mRNAs in living cells is crucial in order to investigate intracellular dynamics of mRNAs. A pumilio homology domain of human pumilio1 (PUM-HD) is an RNA binding protein, which can be applied for mRNA probe construction because the domain can be designed to recognize a specific eight-based sequence of a target mRNA.

In this study, we designed two PUM-HD mutants to match the partial sequences of  $\beta$ -actin mRNA, and generated an mRNA probe comprised of the two PUM-HD mutants flanking an enhanced green fluorescent protein (EGFP). The binding ability and specificity of the probe to  $\beta$ -actin mRNA in cultured cells were confirmed by the results of RT-PCR and *in situ* fluorescence hybridization experiments. We next observed living COS7 cells expressing the probe using total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy. The result showed that many diffusing fluorescent spots were observed in the cell. These fluorescent spots bleached in a single-step manner, indicating that the spots represent single-molecule probes. Some of the fluorescent spots moved directionally in living cells. The result was consistent with a previous report in which  $\beta$ -actin mRNA is transported along microtubules. Also we showed that the present probe has ability to visualize endogenous  $\beta$ -actin mRNA dynamics on the single molecule level in living cells.

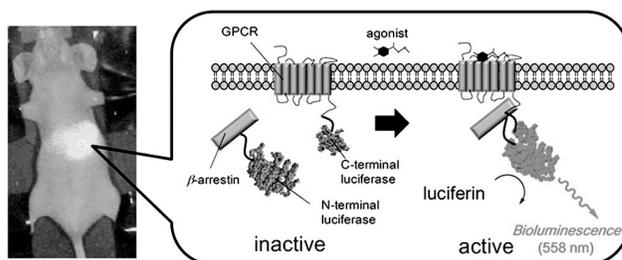


**Fig. 1.** Principle of  $\beta$ -actin mRNA imaging using a Pumilio-based probe. The probe consists of two mutated PUM-HDs and an EGFP. Subcellular localization and single molecule motion of the mRNA was visualized by the present probe using a TIRF microscope.

1.(1)-1) *ACS Chem. Biol.*, **7**, 999-1005 (2012).

### (2) “Visualization and quantitative analysis of G protein-coupled receptor– $\beta$ -arrestin interaction in living mice using split luciferase complementation”

Methods used to assess the efficacy of potentially therapeutic reagents for G protein-coupled receptors (GPCRs) have been developed. Previously, we demonstrated sensitive detection of the interaction of GPCRs and  $\beta$ -arrestin2 (ARRB2) using 96-well microtiter plates and a bioluminescence microscope based on split click beetle luciferase complementation. Herein, using firefly luciferase emitting longer wavelength light, we demonstrate quantitative analysis of the interaction of  $\beta$ 2-adrenergic receptor (ADRB2), a kind of GPCR, and ARRB2 in a 96-well plate assay with single-cell imaging. In addition, we showed bioluminescence *in vivo* imaging of the ADRB2–ARRB2 interaction in two systems; cell implantation and hydrodynamic tail vein (HTV) methods. Specifically, in the HTV method, the luminescence signal from the liver upon stimulation of an agonist for ADRB2 was obtained in the intact systems of mice. The results demonstrate that this method enables noninvasive screening of the efficacy of chemicals at the specific organ in *in vivo* testing. This *in vivo* system can contribute to effective evaluation in pharmacokinetics and pharmacodynamics and expedite the development of new drugs for GPCRs.



**Fig. 2** Schematic diagram of the complementation strategy showing fusion of the N-terminal and C-terminal luciferase fragments to the GPCR and the cytoplasmic  $\beta$ -arrestin protein, respectively. An agonist binding to GPCR recruits  $\beta$ -arrestin to intracellular domains in the receptor, bringing each luciferase fragment into proximity and reconstituting luciferase activity to emit bioluminescence in the presence of luciferin.

1.(1)-2) *ACS Chem. Biol.*, **7**, 901–910 (2012).

# 分析化学研究室

## 研究ハイライト

### (1) 生細胞内 mRNA 1 分子可視化プローブの開発

新規な mRNA プローブとして RNA 結合タンパク質 Pumilio と緑色蛍光タンパク質 GFP との融合タンパク質を構築し、生細胞内 mRNA の 1 分子可視化を開発した。Pumilio は 8 塩基からなる特定の RNA 配列と特異的に結合し、アミノ酸置換により様々な配列の RNA を認識できる。本研究では Pumilio 2 分子と GFP との融合タンパク質を作製し、16 塩基の RNA 配列を認識する RNA プローブを作成した。観察対象として、細胞内動態の知見が報告されている  $\beta$ -actin mRNA を選び、アフリカミドリザル由来の Cos7 細胞にプローブを発現させ、蛍光顕微鏡により観察を行った。

本プローブの  $\beta$ -actin mRNA への結合選択性を検証した。プローブを発現した Cos7 細胞を化学固定し、 $\beta$ -actin mRNA を赤色蛍光色素により相補的オリゴ核酸で標識した上で、蛍光顕微鏡観察を行った。その結果、プローブ由来の輝点と、オリゴ核酸由来の輝点の局在が一致した。この結果から、プローブは  $\beta$ -actin mRNA と特異的に結合していることが確認された。次に、開発したプローブを用いて生細胞内  $\beta$ -actin mRNA の 1 分子観察を行った。全反射蛍光顕微鏡を用いて、プローブを発現した Cos7 細胞を観察したところ、多数の蛍光輝点が拡散運動を示す様子が観察された。観察された輝点は 1 段階で消光し、輝度分布はガウス分布を示した。本結果は、各輝点が 1 分子蛍光に由来していることを示している。一部の輝点は細胞質内で直線運動を示した。 $\beta$ -actin mRNA は細胞骨格を形成する微小管上を輸送されることが知られている。観察された直線運動は、 $\beta$ -actin mRNA の細胞内輸送についての過去の知見と一致する。以上より、新規 mRNA 蛍光プローブを開発し、生細胞内における  $\beta$ -actin mRNA の動態を 1 分子可視化することに成功した。

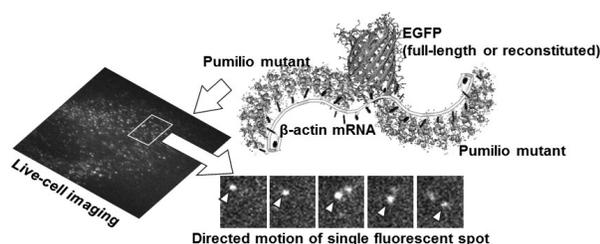


図 1 mRNA プローブと顕微鏡観察結果の概念図。プローブは 2 つの PUM-HD 変異体と蛍光タンパク質からなる。

1.(1)-1) *ACS Chem. Biol.*, 7, 999-1005 (2012).

### (2) 分割ルシフェラーゼ再構成法による GPCR- $\beta$ -アレスチン間タンパク質間相互作用の可視化と定量解析

G タンパク質共役受容体 (GPCR) は 7 回膜貫通型の膜受容体であり、近年創薬のターゲットとして注目されている。これまでに我々は、二分割したコメツキムシ由来のルシフェラーゼ (ELuc) の再構成法に基づいて、GPCR と  $\beta$ -アレスチン (ARRB2) との相互作用を、ルシフェラーゼ発光として検出するプローブ開発に成功している。本研究ではマウス個体で低侵襲的に GPCR と ARRB2 との相互作用を発光イメージングすることを目的とした。ルシフェラーゼには、ELuc より長波長の発光を示すホタル由来のルシフェラーゼ (FLuc) を用いた。GPCR の 1 つである  $\beta$ 2- アドレナリン受容体 (ADRB2) と ARRB2 との相互作用を可視化するために、それぞれのタンパク質に 2 分割した FLuc を連結した。このプローブを HEK293 細胞に発現させ、96 穴マイクロタイタープレート上でアッセイできることを実証した。次に、細胞移植法並びに尾静脈注入法 (HTV) の 2 つの方法を用いて、プローブタンパク質をマウス肝臓細胞に発現させた。マウスにイソプロテネロールを投与すると、ADRB2 - ARRB2 間相互作用に由来する生物発光が観察できることが解った。以上の結果は、本方法が、*in vivo* 試験において、特定の臓器での化学物質の有効性を、非侵襲的にスクリーニング可能であることを示している。この *in vivo* システムは、薬物動態および薬力学の評価に貢献し、GPCR のための新薬の開発を迅速化する。

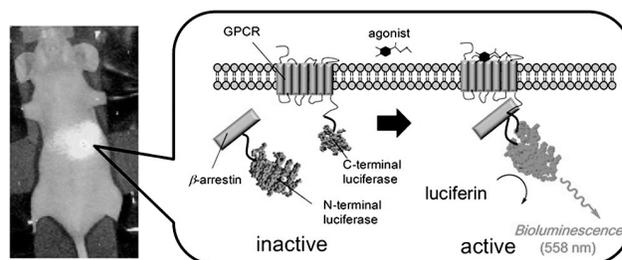


図 2 プローブの概略図。GPCR と細胞質  $\beta$ -アレスチン・タンパク質に N 末端および C 末端ルシフェラーゼ断片が融合されている。GPCR への作用薬の結合は、GPCR の細胞内領域への  $\beta$ -アレスチンの結合を引き起こし、各々のルシフェラーゼ断片を近づけ、ルシフェラーゼ活性を再構成し、基質ルシフェリンの存在下で発光する。

1.(1)-2) *ACS Chem. Biol.*, 7, 901-910 (2012).

## 1. 原著論文

### (1) Refereed Journals

- 1) H. Yoshimura, A. Inaguma, T. Yamada and T. Ozawa, “Fluorescent probes for imaging endogenous  $\beta$ -actin mRNA in living cells using fluorescent protein-tagged pumilio”, *ACS Chem. Biol.*, **7**, 999-1005 (2012).
- 2) H. Takakura, M. Hattori, M. Takeuchi and T. Ozawa, “Visualization and Quantitative Analysis of G Protein-Coupled Receptor  $\beta$ -Arrestin Interaction in Single Cells and Specific Organs of Living Mice Using Split Luciferase Complementation”, *ACS Chem. Biol.*, **7**, 901-910 (2012).
- 3) S.B. Kim, M. Hattori and T. Ozawa, “Intelligent Design of Nano-Scale Molecular Imaging Agents”, *Int. J. Mol. Sci.*, **13**, 16986-17005 (2012).
- 4) T. Ishimoto, H. Mano, T. Ozawa and H. Mori, “Measuring CREB activation using bioluminescent probes that detect KID-KIX interaction in living cells”, *Bioconjugate Chem.*, **23**, 923-932 (2012).
- 5) H. Takakura, R. Kojima, T. Ozawa, T. Nagano and Y. Urano, “Development of 5 and 7 Substituent Luciferin Analogues as an Acidic-Tolerant Substrate of Firefly Luciferase”, *ChemBioChem*, **13**, 1424-1427 (2012).
- 6) M. Ozaki, S. Haga and T. Ozawa, “In vivo monitoring of liver damage using caspase-3 probe”, *Theranostics*, **2**, 207-214 (2012).

## 2. 総説・解説

- 1) 小澤岳昌:「生体分子と細胞内シグナルの可視化分析法」, ヒューマンサイエンス, **23**, 12-16 (2012).
- 2) 宮脇敦史, 小澤岳昌, 高松哲郎, 長野哲雄:「分子イメージング-基礎から創薬までの新展開」, ヒューマンサイエンス, **23**, 4-11 (2012).

## 3. 著書

- 1) 服部満, 小澤岳昌:「死細胞誘導シグナルの可視化」, ここまで進んだバイオセンシング・イメージング, 日本化学会編, 化学同人, 108-113 (2012).