

ANALYTICAL CHEMISTRY

Annual Research Highlights

(1) Sustained accurate recording of intracellular acidification in living tissues with a photo-controllable bioluminescent protein.

Regulation of an intracellular acidic environment plays a pivotal role in biological processes and functions. However, spatiotemporal analysis of the acidification in complex tissues of living subjects persists as an important challenge. We developed a photo-inactivatable bioluminescent indicator, based on a combination of luciferase-fragment complementation and a photoreaction of a light, oxygen, and voltage domain from *Avena sativa* Phototropin1 (LOV2), to visualize temporally dynamic acidification in living tissue samples. Bioluminescence of the indicator diminished upon light irradiation and it recovered gradually in the dark state thereafter. The recovery rate was remarkably sensitive to pH changes but unsusceptible to fluctuation of luciferin or ATP concentrations. Bioluminescence imaging, taken as an index of the recovery rates, enabled long-time recording of acidification in apoptotic and autophagous processes in a cell population and an ischemic condition in living mice. This technology using the indicator is widely applicable to sense organelle-specific acidic changes in target biological tissues.

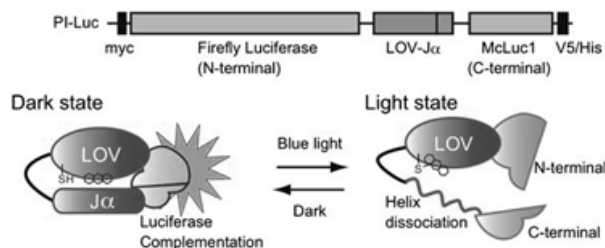


Fig. 1 Photoreaction of the pH indicator (PI-Luc) in mammalian cells. The LOV2-J α domain was connected with an N-terminal fragment of firefly luciferase and a mutant of C-terminal fragment of click beetle luciferase named Mcluc1. The LOV core domain interacts with J α helix in the dark, causing complementation of the luciferase fragments to emit luminescence. Photon absorption of flavin mononucleotide (FMN) bound to the LOV core domain would engender release of J α -helix from the LOV core domain and dissociation between the luciferase fragments. When the light is turned off, the LOV core domain would again interact with J α -helix to recover the bioluminescence.

1.(1)-1) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 9332–9337 (2013).

(2) A bioluminescent probe to analyze phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate production using split luciferase complementation technique.

Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (PIP₃) is a signaling molecule that mediates central cellular events such as growth, motility, and development by activating downstream proteins. Although functions of various PIP₃ binding partners have been unveiled, the various roles of PIP₃ have not been resolved comprehensively due to limitations of quantitative and dynamic analysis of PIP₃. We developed a novel method for the analysis of relative PIP₃ amount based on split luciferase complementation. An N-terminal fragment of a luciferase was tethered on the plasma membrane (LucN-pm). A C-terminal fragment of a luciferase fused with PIP₃ binding units, Pleckstrin homology domains (PHD) of the general receptor for phosphoinositides 1 (GRP1), was expressed in cytosol (PP-LucC). In response to PIP₃ production, PP-LucC was recruited to the plasma membrane, triggering reconstitution of the split luciferase fragments of LucN-pm and PP-LucC to form an active luciferase. We quantified bioluminescence signals corresponding to PIP₃ amounts successfully upon PDGF stimulation to the cells. We also demonstrated high-throughput screening format and for monitoring of PIP₃ production on the plasma membrane by bioluminescence. This method enables further study of PIP₃ and supports versatile applications related to the PIP₃ amount.

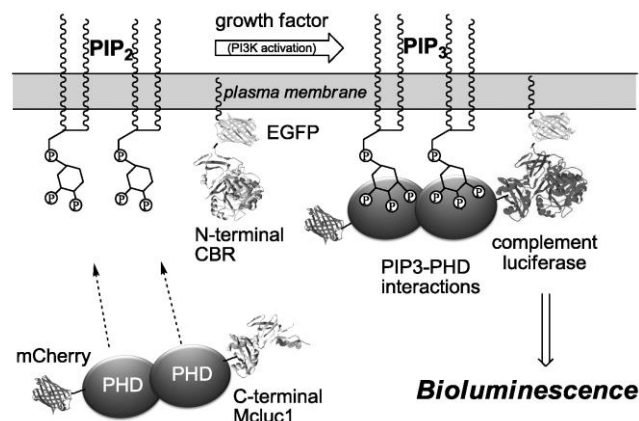


Fig. 2 Principle for membrane PIP₃ detection. PIP₃ production in the plasma membrane induces PP-LucC migration to the plasma membrane, resulting in reconstitution of the luciferase fragments and recovery of bioluminescence. EGFP and mCherry are fused respectively in LucN-pm and PP-LucC for confirmation of the probe localizations.

1.(1)-3) *Anal. Chem.*, **85**, 11352–11359 (2013).

分析化学研究室

研究ハイライト

(1) 光制御可能な発光タンパク質を用いた生体組織細胞内の酸性化の正確な経時計測

細胞内の酸性環境の制御は生体反応や生体機能を考える上で重要である。しかし、生物の複雑な組織内において、酸性化を時空間的に解析することは、重要な挑戦的課題である。我々は、ルシフェラーゼ断片の再構成とマカラスムギ *Phototropin1* の LOV2 ドメインの光反応に基づき、生体組織サンプルでの動的な酸性化を継時的に視覚化する光不活化発光インジケータを開発した。プローブの発光は一過的な光照射において減少し、暗状態において徐々に回復した。発光回復速度は顕著に pH 変化に敏感であり、かつルシフェリンまたは ATP の濃度変動による影響を受けなかった。発光回復速度を指標とした発光イメージングは、細胞集団や虚血条件下の生きたマウスにおけるアポトーシスやオートファジーによる酸性化の長時間計測を可能にした。本インジケータを用いた発光イメージング技術は、研究対象の生体組織内の細胞小器官特異的な酸性変化を検出するために広く適用可能である。

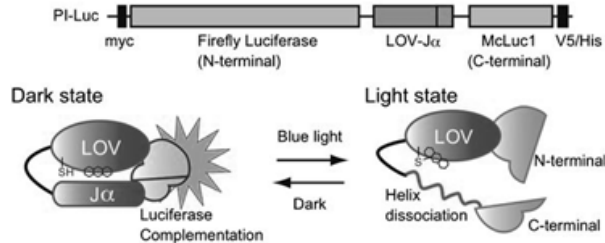


図1 動物細胞における pH インジケータの光反応。LOV2-J α ドメインは、ホタルルシフェラーゼの N 末端断片とヒカリコメツキムシルシフェラーゼの C 末端断片(McLuc1)に連結した。LOV コアドメインは、暗所下で J α ヘリックスと相互作用し、ルシフェラーゼ断片の再構成を誘導し、インジケータを発光させる。LOV コアドメインに結合したフラビンモノヌクレオチド (FMN) の光子吸収は、LOV コアドメインからの J α ヘリックスの解離を誘導し、ルシフェラーゼ断片を解離させ、インジケータを消光させる。インジケータが暗所下に置かれると、LOV コアドメインは、再び J α ヘリックスと相互作用し、インジケータの発光を回復させる。

1.(1)-1) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 9332–9337 (2013).

(2) 発光タンパク質の二分割再構成反応を用いた細胞膜内ホスファチジルイノシトール (3, 4, 5) トリリン酸の刺激依存的産生の検出

ホスファチジルイノシトール(3,4,5) トリリン酸(PIP₃)は細胞膜内で機能するセカンドメッセンジャー分子であり、シグナル下流のタンパク質を活性化することで細胞の成長、運動、発生などを制御する。しかし、PIP₃の動的および定量的評価が実現されていないため、その機能について包括的な理解はなされていない。我々は二分割ルシフェラーゼの再構成法を利用した細胞内 PIP₃ 定量法を開発した。ルシフェラーゼの N 末端断片を細胞膜にアンカーした(LucN-pm) . C 末端断片は PIP₃ 結合タンパク質ユニットである PH ドメインと融合させ(PP-LucC)細胞質に発現させた。PIP₃ が細胞膜内で産生すると、PP-LucC が PIP₃ との相互作用により細胞膜上へとリクルートされる。結果、LucN-pm のルシフェラーゼ断片と再構成反応が起こり、ルシフェラーゼの発光能が回復することで PIP₃ の検出が可能となる。本プローブを用いて、血小板由来成長因子刺激による PIP₃ 産生の定量検出に成功した。また PIP₃ 産生を検出するハイスループットスクリーニング法の構築を行った。本研究で開発した手法は PIP₃ を介した生体機能についての機構の解明や薬剤の探索に有用なアプローチを提供する。

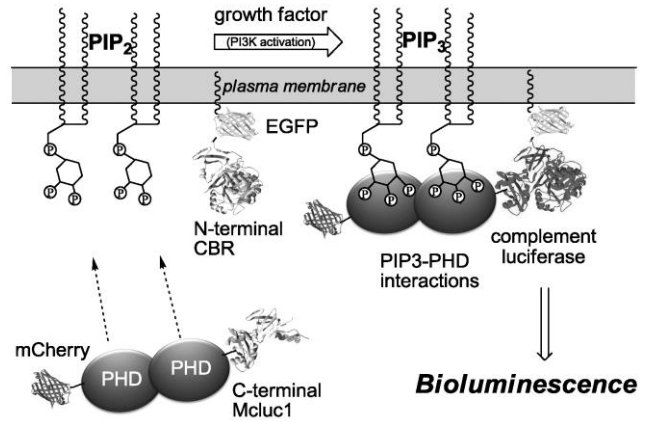


図2 PIP₃ 定量発光プローブの原理。細胞膜内で PIP₃ が産生すると、PP-LucC が PIP₃ との相互作用により細胞膜にリクルートされる。すると細胞膜上にアンカーされている LucN-pm のルシフェラーゼ断片と再構成反応を生じ、ルシフェラーゼの発光能が回復する。発光強度を測定することで、細胞膜内に産生した PIP₃ 量を定量評価する。

1.(1)-3) *Anal. Chem.*, **85**, 11352-11359 (2013).

1. 原著論文

(1) Refereed Journals

- 1) M. Hattori, S. Haga, H. Takakura, M. Ozaki and T. Ozawa, “Sustained accurate recording of intracellular acidification in living tissues with a photo-controllable bioluminescent protein”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **110**, 9332-9337 (2013).
- 2) M. Hattori, M. Tanaka, H. Takakura, K. Aoki, K. Miura, T. Anzai and T. Ozawa, “Analysis of temporal patterns of GPCR- β -arrestin interactions using split luciferase-fragment complementation”, *Mol. Biosystems*, **9**, 957-964 (2013).
- 3) L.Z. Yang, Y. Nasu, M. Hattori, H. Yoshimura, A. Kanno, T. Ozawa, “Bioluminescent probes to analyze ligand-induced phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate production with split luciferase complementation”, *Anal. Chem.*, **85**, 11352-11359 (2013).
- 4) M. Ito, T. Ozawa and S. Takada, “Folding coupled with assembly in split green fluorescent proteins studied by structure-based molecular simulations”, *J. Phys. Chem. B*, **117**, 13212-13218 (2013).
- 5) S.B. Kim and T. Ozawa, “Fabrication of split-luciferase complementation assays for molecular imaging”, *Curr. Mol. Imaging*, **2**, 148-157 (2013).
- 6) T. Ozawa, H. Yoshimura and S.B. Kim, “Advances in fluorescence and bioluminescence imaging”, *Anal. Chem.*, **85**, 590-609 (2013).
- 7) T. Tamaru, M. Hattori, Y. Ninomiya, G. Kawamura, G. Varès, K. Honda, D., P. Mishra, B. Wang, I. Benjamin, P. Sassone-Corsi, T. Ozawa and K., Takamatsu, “ROS stress resets circadian clocks to coordinate pro-survival signals”, *PLoS ONE*, **8**, e82006 (2013).
- 8) H. Inoue, T. Sakaue, T. Ozawa and S. Higashiyama, “Spatiotemporal visualization of proHB-EGF ectodomain shedding in living cells”, *J. Biochem.*, **154**, 67-76 (2013).
- 9) G. Niu, L. Zhu, D.N. Ho, F. Zhang, H. Gao, Q. Quan, N. Hida, T. Ozawa, G. Liu and X. Chen, “Longitudinal bioluminescence imaging of the dynamics of doxorubicin induced apoptosis”, *Theranostics*, **3**, 190-200 (2013).
- 10) R. Kojima, H. Takakura, T. Ozawa, Y. Tada, T. Nagano and Y. Urano, “Rational design and development of near-infrared-emitting firefly luciferins available in vivo”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **52**, 1175-1179 (2013).

(2) その他

2. 総説・解説

- 1) 金誠培, 小澤岳昌, 長縄竜一: 「ホルモン診断に資するルミネセンス分析技術の進歩」, *ぶんせき*, **467**, 678-686 (2013).
- 2) 小澤岳昌, 尾崎倫孝: 「死細胞誘導シグナルの可視化」, *医学のあゆみ*, **246**, 357-363 (2013).

3. 著書

4. その他

- 1) 北海道新聞 (2013年5月23日(夕刊)) 「ホタルの酵素で細胞酸性度測定」
- 2) 日経産業新聞 (2013年5月23日) 「ホタルの光で pH 測定」