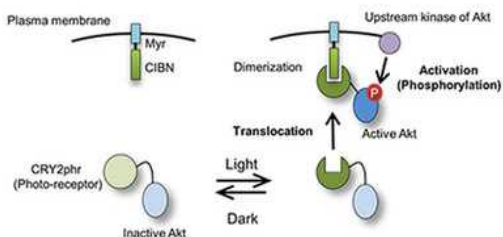


**Annual Research Highlights****(1) Development of a photo-controllable module for regulation of intracellular signal transduction**

Dynamic activity of the serine/threonine kinase Akt is essential for the regulation of diverse cellular functions, but the precise spatiotemporal control of the activity remains a critical issue. Here we developed a photo-activatable Akt (PA-Akt) system based on a light-inducible protein interaction module CRY2PHR and CIB1 (Fig. 1). PA-Akt was reversibly activated by blue light illumination in a few minutes, resulting in specific regulation of downstream signaling and induction of biological functions. We generated a mathematical model which describes CRY2-Akt activity quantitatively. Simulation using the model provides evidence that the temporal patterns of Akt activity are crucial for downstream signaling and cellular functions. Consequently, combination of the optogenetic module with computational modeling provides a general framework for interrogating the temporal dynamics of the biomolecules.

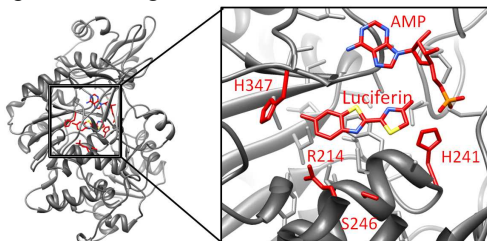


**Fig. 1** Schematic of the principle of PA-Akt.

1.(1)-1) *Sci. Rep.*, **5**, 14589 (2015).

**(2) Development of a red-light emitting luciferase**

Luciferases have been used in various analytical tools to detect and visualize intracellular phenomena. Luciferase with red light emission is desirable for bioluminescence imaging due to high transmittance in tissues. To achieve a general strategy to design red luciferases, we produced mutants of Emerald luciferase (Eluc), which emits the strongest bioluminescence among beetle luciferases. We performed structure prediction of Eluc through homology modeling with a knowledge of the structures of a green luciferase CBG and a red luciferase CBR. We found four amino acids crucial for generating a red luciferase. In the luminescence measurements, a mutant R214K/H241K/S246H/H347A emitted the longest-wavelength luminescence among the prepared mutants with emission maximum at 626 nm, 88-nm red-shift from the wild-type luciferase. This result is useful in development of bright red luciferases.



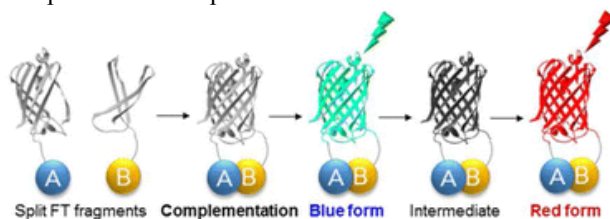
**Fig. 2** The locations of the mutated amino acid in the predicted

Eluc stereo structure.

1.(1)-5) *J. Biomed. Opt.*, **20**, 101205 (2015).

**(3) Development of a split fluorescent timer protein**

Studies of temporal behaviors of protein association in living cells are important for elucidating the fundamental roles and the mechanism of intracellular molecular organization in cell activities. We developed a method for investigating the temporal progression of a particular protein assembly using monomeric fluorescent proteins, fluorescent timers (FTs), of which the fluorescent color changes from blue to red over time. We identified a dissection site of the FTs for complementation of the split FT fragments upon bringing closely to come together. The split fragments of each FT variant recovered their fluorescence and showed inherent rates of the color changes upon the reconstitution of the FTs *in vitro*. We used this split FT to visualize the aggregation process of  $\alpha$ -synuclein in living cells. The size of the agglomerates and ratio of the blue and red fluorescence from reconstituted FT attached on  $\alpha$ -synuclein was analyzed to estimate the aggregation rates of  $\alpha$ -synuclein. This method enables tracing and visualizing temporal alternations of various protein associations by fluorescence measurements at a particular time point.

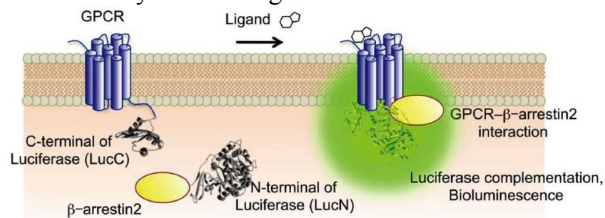


**Fig. 3** Schematic of reconstitution of a split fluorescent timer.

1.(1)-9) *Anal. Chem.*, **87**, 3366-3372 (2015).

**(4) High-throughput method for the analysis of ligand-induced GPCR— $\beta$ -arrestin interaction**

For the design of therapeutic drugs, G protein-coupled receptors (GPCRs) are notable targets. Although many screening methods have been developed to identify effective agents for GPCR signaling, monitoring methods of temporal variations of GPCR activity with specific ligands remain insufficient. We combined bioluminescence imaging technique to our previous high-throughput system for detecting interactions of GPCR with  $\beta$ -arrestin based on split luciferase fragment complementation. Using this method, we demonstrated temporal monitoring of GPCR- $\beta$ -arrestin interactions in living cells during stimulation by different ligands.



**Fig. 4** Detection system of GPCR activity using split luciferase reconstitution.

1.(1)-7) *Anal. Sci.*, **31**, 327-330 (2015).

研究ハイライト

(1) 生細胞内シグナル伝達反応光制御ツールの開発  
シグナル伝達タンパク質 Akt の活性を生細胞内で時空間的に操作・制御するため、光応答性 Akt (PA-Akt) を開発した (図 1)。この分子モジュールを生細胞内に発現し、間欠的な青色光照射の下、生細胞イメージングと生化学解析を行った。その結果、青色光照射により Akt の可逆的な細胞膜移行と Akt 自身およびシグナル下流分子のリン酸化・核内移行・遺伝子発現誘導など、Akt 活性化によるシグナル伝達に特徴的な現象が検出された。さらに、上記実験結果を元に PA-Akt によるシグナル伝達を定量化するコンピューターモデリングを行ったところ、下流へのシグナル伝達量は Akt 活性化の時間パターンに大きく依存することが明らかとなった。

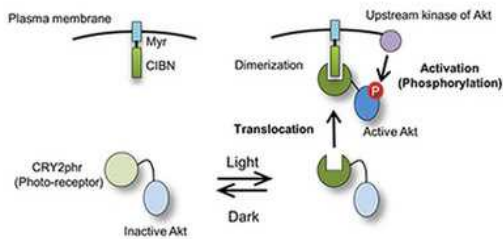


Fig. 1 Schematic of the principle of PA-Akt.  
1.(1)-1) *Sci. Rep.*, **5**, 14589 (2015).

(2) 赤色発光ルシフェラーゼの開発

ルシフェラーゼは生体内や細胞内の生理現象可視化検出ツールとして有用な発光タンパク質である。特に赤色ルシフェラーゼは、光の生体透過性から高い利便性がある。本研究では発光強度が強いヒカリコメツキムシ由来緑色ルシフェラーゼ Eluc の長波長化を目指した。立体構造が既知の緑色および赤色ルシフェラーゼ CBG、CBR と Eluc との配列相同性を元に、Eluc の構造推定を行った。その結果 4 箇所のアミノ酸残基の重要性が予測された。この 4 箇所に変異を導入し発光測定を行ったところ、R214K/H241K/S246H/H347A 変異体が最も長い波長 (626 nm、野生型 Eluc から 88 nm の長波長シフト) を示した。上記結果より、バイオイメージングへの応用に加え、ルシフェラーゼの長波長化に必要な要素についての示唆が得られた。

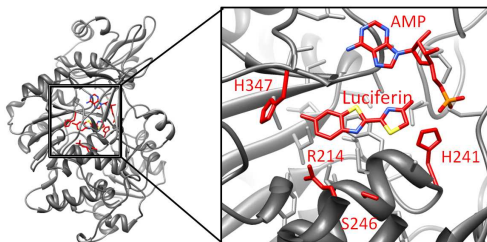


Fig. 2 The locations of the mutated amino acid in the predicted Eluc stereo structure.  
1.(1)-5) *J. Biomed. Opt.*, **20**, 101205 (2015).

(3) 二分割型蛍光タイマータンパク質の開発

生細胞内におけるタンパク質間相互作用形成の経時変化は細胞活動における複合体形成の役割を理解する上で重要である。本研究では時間依存的に蛍光が青色から赤色へと変化する蛍光タンパク質 Fluorescent Timer (FT) の二分割体を構築し、特定のタンパク質における細胞内集合の時間経過を可視化解析する手法を開発した。まず FT 2 分割体が再構成反応を起こすような切断サイトを探索し、再構成により FT 本来の蛍光特性を示す 2 分割体の形成に成功した。本ツールを用いて、パーキンソン病の原因となる  $\alpha$  シヌクレインの凝集反応を生細胞内で可視化追跡した。 $\alpha$  シヌクレインに 2 分割 FT を融合し、細胞内で生じた凝集体の直径と蛍光の赤/青比を測定することで、凝集体の成長速度解析に成功した。

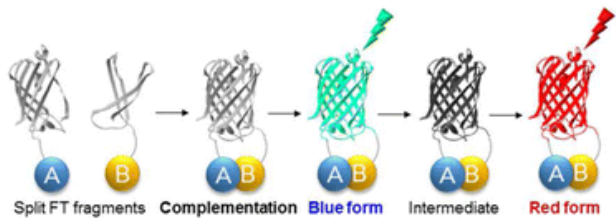


Fig. 3 Schematic of reconstitution of a split fluorescent timer.  
1.(1)-9) *Anal. Chem.*, **87**, 3366-3372 (2015).

(4) GPCR-アレクチン相互作用のハイスループット検出法開発

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は、医薬品開発の重要なターゲットの 1 つであり、これまでに GPCR 系シグナル伝達に対する有効な薬剤を同定するための化合物スクリーニング法が開発されてきた。しかし、特定の薬剤に対して生じる GPCR 活性変化の時間依存性を追跡する分析手法は十分に開発・実用されていない。本研究では、当研究室で以前に開発した、2 分割型ルシフェラーゼ再構成法を利用した GPCR- $\beta$ -arrestin 相互作用のハイスループット検出法に、発光イメージング法を導入した。この手法を用いることで、異なる薬剤によって刺激を導入した生細胞内で生じる GPCR- $\beta$ -arrestin 間相互作用の経時変化の可視化解析に成功した。

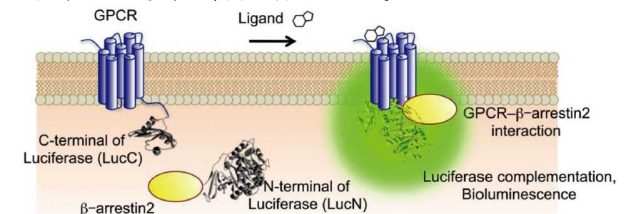


Fig. 4 Detection system of GPCR activity using split luciferase reconstitution.  
1.(1)-7) *Anal. Sci.*, **31**, 327-330 (2015).

## 1. 原著論文

### (1) Refereed Journals

- 1) Y. Katsura, H. Kubota, K. Kunida, A. Kanno, S. Kuroda, T. Ozawa, “An optogenetic system for interrogating the temporal dynamics of Akt.” *Sci. Rep.*, **5**, 14589 (2015).
- 2) T. Tamaru, M. Hattori, K. Honda, G. T. J. Horst, Y., Nakahata, P. Sassone-Corsi, T. Ozawa and K. Takamatsu., “CRY Drives Circadian CK2-mediated BMAL1 Phosphorylation to Control the Mammalian Clock.” *PLoS Biol.*, **13**, e1002293 (2015).
- 3) T. Littmann, M. Gottle, M.T. Reinartz, S. Kalble, I. W. Wainer, T. Ozawa, R. Seifert., “Recruitment of  $\beta$ -Arrestin 1 and 2 to the  $\beta$ 2-Adrenoceptor: Analysis of 65 Ligands.” *J Pharmacol Exp Ther.*, **355**, 183-190 (2015).
- 4) M. Hattori and T. Ozawa, “Bioluminescent Tools for the Analysis of G-Protein-Coupled Receptor and Arrestin Interactions.” *RSC Adv.*, **5**, 12655-12663 (2015).
- 5) T. Nishiguchi, T. Yamada, Y. Nasu, M. Ito, H. Yoshimura, T. Ozawa, “Development of red-shifted mutants derived from luciferase of Brazilian click beetle *Pyrearinus termitilluminans*” *J. Biomed. Opt.*, **20**, 101205 (2015).
- 6) M. Kodaka, Z. Yang, K. Nakagawa, J. Maruyama, X. Xu, A. Sarkar, A. Ichimura, Y. Nasu, T. Ozawa, H. Iwasa, M. Ishigami-Yuasa, S. Ito, H. Kagechika, Y. Hata, “A new cell-based assay to evaluate myogenesis in mouse myoblast C2C12 cells.” *Exp. Cell. Res.*, **336**, 171-181 (2015).
- 7) M. Hattori, T. Ozawa, “High-throughput live cell imaging and analysis for temporal reaction of G protein-coupled receptor based on split luciferase fragment complementation.” *Anal. Sci.*, **31**, 327-330 (2015).
- 8) H. Segawa, M. Okuno, P. Leproux, V. Couderc, T. Ozawa, H. Kano, “Multimodal imaging of living cells with multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS), third-order sum frequency generation (TSFG) and Two-photon excitation fluorescence (TPEF) using a nanosecond white-light laser source” *Anal. Sci.*, **31**, 299-305 (2015).
- 9) A. Takamura, M Hattori, H. Yoshimura, T Ozawa, “Simultaneous time-lamination imaging of protein association using a split fluorescent timer protein.” *Anal. Chem.*, **87**, 3366-3372 (2015).
- 10) H. Takakura, M Hattori, M. Tanaka, T Ozawa, “Cell-based assays and animal models for GPCR drug screening.” *Methods. Mol. Biol.*, **1272**, 257-270 (2015).
- 11) M.T. Reinartz, S. Kälble, T. Littmann, T. Ozawa, S. Dove, V. Kaefer, I.W. Wainer, R. Seifrt, “Structure-bias relationships for fenoterol stereoisomers in six molecular and cellular assays at the  $\beta$ 2-adrenoceptor.” *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, **388**, 51-65 (2015)

### (2) その他

## 2. 総説・解説

- 1) 吉村英哲, 小澤岳昌: 「蛍光顕微鏡を用いた生細胞内 1 分子可視化解析法」, ナノ学会会報, **13**, 61-65 (2015).
- 2) 吉村英哲, 小澤岳昌: 「生細胞内 RNA イメージング」, 細胞工学 **34**, 53-58 (2015)
- 3) 小澤岳昌: 「ジャーナル戦国時代」 ぶんせき, **9**, p371 (2015)

## 3. 著書

- 1) 菅野憲, 小澤岳昌: 「発光の生物—6.1.1 化学発光概説」 発光の事典, 朝倉書店, p482-488 (2015)
- 2) 菅野憲, 小澤岳昌: 「発光の生物—6. 1. 2 液相化学発光反応」 発光の事典, 朝倉書店, p488-493 (2015)
- 3) 菅野憲, 小澤岳昌: 「発光の生物—7.1.6 化学発光」 発光の事典, 朝倉書店, p561-570 (2015)
- 4) 菅野憲, 小澤岳昌: 「発光の生物—7.2. 2.2 再構成法」 発光の事典, 朝倉書店, p616-623 (2015)

#### 4. その他

- 1) 教育新聞 (2015年12月7日) 「日周リズム調整に道」
- 2) 日刊工業新聞 (2015年11月16日) 「体内時計制御の酵素活性-1日周期の変動解明」
- 3) 化学工業日報 (2015年11月16日) 「体内時計の一端解明」
- 4) 日経産業新聞 (2015年10月7日) 「光で活性化人工酵素-東大, 糖尿病治療に応用へ」
- 5) 日刊工業新聞 (2015年10月6日) 「細胞内の酵素 光で制御-東大 疾患発症解明に道」