

Annual Research Highlights**(1) Development of a bioluminescent tool for detection of p53 translocation to mitochondria**

To explore the inhibitors of p53, we developed a bioluminescent probe to monitor p53 translocation from cytosol to mitochondria using luciferase fragment complementation assays. The probe is composed of a pair of luciferase fragments, CBGN and McLuc1. The combination of luciferase fragments showed significant luminescence intensity and high signal-to-background ratio. When the p53 connected with McLuc1 translocates from cytosol into mitochondrial matrix, CBGN in mitochondrial matrix enables to complement with McLuc1, resulting in the restoration of the luminescence. Pifithrin- μ , a selective inhibitor of p53 mitochondrial translocation, prevented the mitochondrial translocation of the p53 probe in a concentration-dependent manner. This p53 mitochondrial translocation assay is a new tool for high-throughput screening to identify novel p53 inhibitors, which could be developed as drugs to treat diseases in which necrotic cell death is a major contributor.

1.(1)-5) *Biotechnol. Bioeng.*, 114, 2818-2827 (2017).

(2) Discrimination of postmortem and antemortem blood through ATR FT-IR spectroscopy

We developed an approach to obtain body fluid signals that are embedded in strong substrate interferences using attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR FT-IR) spectroscopy and an innovative multivariate spectral processing. We discriminated between ATR FT-IR spectra of postmortem and antemortem blood and those of antemortem blood by creating a multivariate statistics model. From ATR FT-IR spectra of the blood stains on interfering substrates such as polyester, cotton, and denim, blood-originated signals were extracted by a weighted linear regression approach which we developed originally using principal components of both blood and substrate spectra. The blood-originated signals were finally classified by the discriminant model, demonstrating high discriminant accuracy. The present method can identify body fluid evidence independently of the substrate type, which will promote applications of vibrational spectroscopy in forensic analysis.

1.(1)-3) *Anal. Chem.*, 89, 9797-9804 (2017).

(3) Development of a fluorescent probe to detect SUMOylation in living cells

The reversibility of SUMOylation and the differences in the SUMOylation level in living cells makes it difficult to explore infrequently-SUMOylated proteins in mammalian cells. Here, we developed a method to screen for mammalian SUMOylated proteins using the reconstitution of split fluorescent protein fragments in living mammalian cells. Briefly, the cells harboring cDNAs of SUMOylated proteins were identified by the reconstituted fluorescence emission and separated by cell sorting. The method successfully identified 36 unreported SUMO2- substrate candidates with distinct intracellular localizations and functions. Of the candidates, we found Atac2, a histone acetyltransferase,

was SUMOylated at a lysine 408, and further modified by multiple SUMOs without isoform specificity. Because the present method is applicable to other SUMO isoforms and mammalian cell-types, it could contribute to a deeper understanding of the role of SUMOylation in various biological contexts.

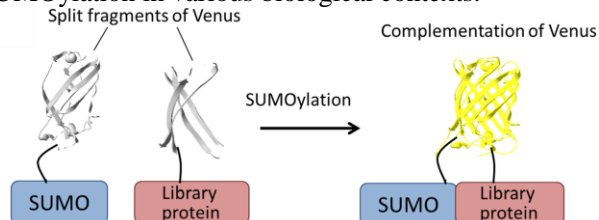


Fig. 1. Split fluorescent-based SUMOylation probe.

1.(1)-2) *Sci. Rep.*, 7, 17443 (2017).

(4) Raman-fluorescence hybrid microscopy to monitor protein expression and chemical profiles in living cells

In this study, we developed an imaging method using fluorescence-Raman hybrid microscopy that monitors the chemical micro-environment associated with protein expression patterns in living cells. Simultaneous detection of fluorescence and Raman signals, realized by spectrally separation of the two modes through the anti-Stokes fluorescence emission of fluorescent proteins, enables the accurate correlation of the chemical fingerprint of a specimen to its physiological state. Subsequent experiments revealed chemical differences that enabled the chemical profiling of mouse embryonic stem cells depending *oct4* expression. Using the fluorescent probe as a localization indicator, we analyzed the detailed chemical content of the cell nucleus and Golgi bodies. The present technique has a potential to be applied to a wide range of biomedical studies for the better understanding of chemical events during biological processes.

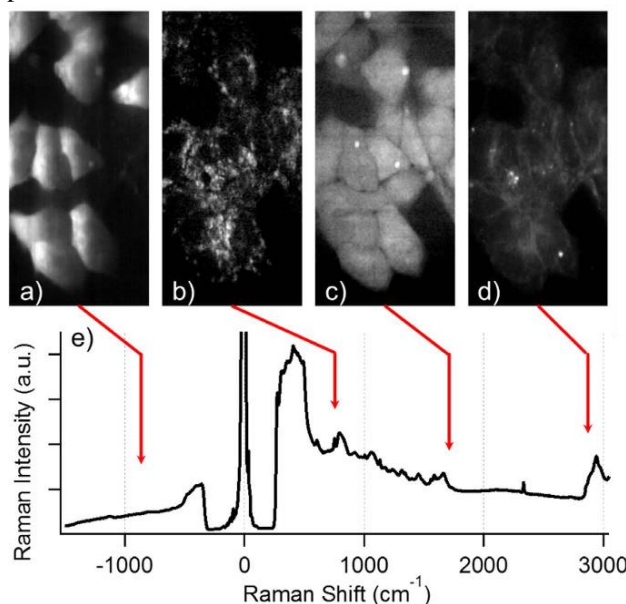


Fig. 2. The fluorescence-Raman hybrid spectrum and images on specific wavenumbers.

1.(1)-9) *Sci. Rep.*, 7, 43569 (2017).

研究ハイライト

(1) p53 ミトコンドリア移行検出発光ツールの開発

本研究では p53 の阻害剤を探索するために、ルシフェラーゼフラグメント再構成アッセイを用いて、p53 の細胞質からミトコンドリアへの移行を検出する生物発光プローブを開発した。プローブは、ヒカリコメツキムシ緑ルシフェラーゼ CBG68 の N 末端断片 (CBGN), および複数種類のルシフェラーゼ N 末端断片と再構成可能な C 末端断片 (McLuc1) から構成されている。McLuc1 に連結された p53 が細胞質からミトコンドリアマトリックスに移行すると、ミトコンドリアマトリックスの CBGN が McLuc1 により相補され、発光が回復する。p53 のミトコンドリア移行の選択的阻害剤であるピフィスリン μ は、濃度依存的に p53 プローブのミトコンドリア移行を阻害した。この p53 のミトコンドリア移行アッセイは、p53 の新規な阻害剤を同定するためのハイスループットスクリーニングを可能にする。これは、壊死性細胞死が主原因である疾患を治療する新規薬剤の開発に貢献する。

1.(1)-5) *Biotechnol. Bioeng.*, 114, 2818-2827 (2017).

(2) ATR FT-IR と多変量解析による体液サンプルスペクトル解析法開発

本研究では ATR F-IR 法と多変量スペクトル処理に基づく手法を開発し、強い基質干渉下において体液由来のシグナルを検出する手法を開発した。本手法に基づく多変量統計モデルを作製することにより、死後血液と生前血液の ATR FT-IR スペクトルを認識できた。また、ポリステルや綿、デニム生地にしみこんだ血液において、得られた ATR FT-IR スペクトルから、加重線形回帰アプローチをとることで、血液由来の信号を抽出した。得られた信号を分類した結果、高い判別精度を有することが示された。以上のように本研究で開発した手法は血液がしみこむ基質に依存せず血液のスペクトル同定を実現した。この結果は法医学的体液分析における振動分光技術の応用へと展開されることが期待できる。

1.(1)-3) *Anal. Chem.*, 89, 9797-9804 (2017).

(3) 生細胞内 SUMO 化タンパク質検出発光プローブの開発

細胞内で低頻度に SUMO 化されるタンパク質を検出することは困難である。本研究では、二分割蛍光タンパク質再構成法を利用して、生細胞内における SUMO 化タンパク質を検出・スクリーニングする手法を開発した。SUMO 化タンパク質の cDNA を保持する細胞内では再構成蛍光タンパク質が生成する。その蛍光に基づきフローサイトメトリーを行うことで、SUMO 化タンパク質を有する細胞を分離し、SUMO 化タンパク質を同定できる。ホ乳類細胞において本手法を適用した結果、未知の SUMO2 基質候補 36 種を特定した。そのうち、ヒストンアセチルトランスフェラーゼである Atac2 がリジン 408 で SUMO 化され、アイソフォーム特異性のない複数の SUMO によってさらに修飾されていることを見出した。本

方法は、他の SUMO アイソフォームおよび様々な細胞に適用可能であり、特定の生理的状況における SUMO 化が果たす機能解明に貢献することが期待される。

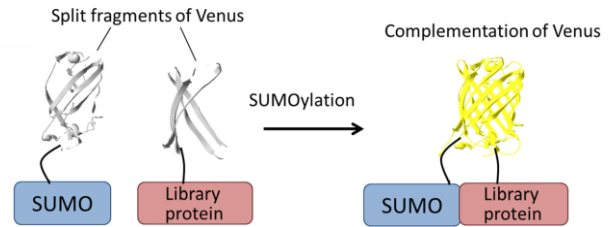


Fig. 1. Split fluorescent-based SUMOylation probe.

1.(1)-2) *Sci. Rep.*, 7, 17443 (2017).

(4) 細胞内タンパク局在と化学的性質の同時可視化を実現する蛍光-ラマンハイブリッド顕微鏡法の開発

本研究では、蛍光-ラマンハイブリッド顕微鏡を開発し、生細胞内タンパク質発現パターンと細胞内微小環境における化学的特徴を可視化解析した。本手法では蛍光タンパク質のアンチストークス蛍光を観測することで、蛍光スペクトルとラマンスペクトルの同時検出を実現し、検体の化学的指紋と生理学的状態の正確な観測を可能にした。本手法をマウス胚性幹細胞に適用したところ、*oct4* 遺伝子発現の有無によるわずかな化学的差異が検出できた。さらに、蛍光プローブを細胞内小器官インディケーターとして使用して細胞核とゴルジ体を標識し、その領域のラマンスペクトルを解析することで、小器官内の詳細な化学成分分析を実現した。開発した手法は、様々な生物学・医学研究に適用可能で、細胞内化学的現象の理解に貢献することが期待される。

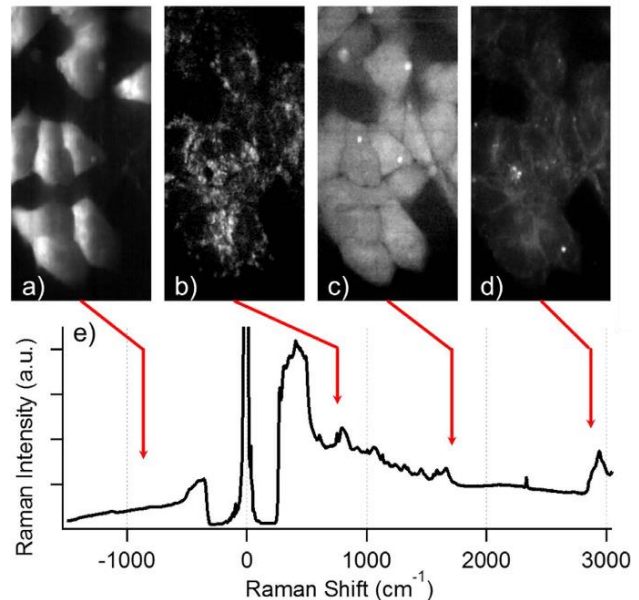


Fig. 2. The fluorescence-Raman hybrid spectrum and images on specific wavenumbers.

1.(1)-9) *Sci. Rep.*, 7, 43569 (2017).

1. 原著論文

(1) Refereed Journals

- 1) A genetic screen to discover SUMOylated proteins in living mammalian cells., M. Komiya, A. Ito, M. Endo, D. Hiruma, M. Hattori, H. Saitoh, M. Yoshida, and T. Ozawa, *Sci. Rep.*, 7, 17443 (2017).
- 2) In Search for NPY Y4R Antagonists: Incorporation of Carbamoylated Arginine, Aza-Amino Acids or D-Amino Acids into Oligopeptides Derived from the C-Termini of the Endogenous Agonists., K. Kuhn, T. Littmann, S. Dukorn, M. Tanaka, M. Keller, T. Ozawa, G. Bernhardt, and A. Buschauer, *ACS Omega*, 2, 3616-3631 (2017).
- 3) Spectral Mining for Discriminating Blood Origins in the Presence of Substrate Interference via ATR FT-IR: Postmortem or Antemortem Blood?, A. Takamura, K. Watanabe, T. Akutsu, H. Ikegaya and T. Ozawa, *Anal. Chem.*, 89, 9797-9804 (2017).
- 4) Dynamic Monitoring of p53 Translocation to Mitochondria for the Analysis of Specific Inhibitors Using Luciferase-fragment Complementation., N. Noda, R. Awais, R. Sutton, M. Awais and T. Ozawa, *Biotechnol. Bioeng.*, 114, 2818-2827 (2017).
- 5) Optogenetic interrogation reveals separable G-protein dependent and independent signalling linking G-protein coupled receptors to the circadian oscillator., H. J. Bailes, N. Milosavljevic, L.-Y. Zhuang, E. J. Gerrard, T. Nishiguchi, T. Ozawa and R. J. Lucas, *BMC Biology*, 15, 40 (2017).
- 6) Luminescent sensors for single cell analysis. T. Ozawa, *Progress Photon Sci.*, 115, 97-108 (2017).
- 7) Single-shot phase-shifting incoherent digital holography., T. Tahara, T. Kanno, Y. Arai and T. Ozawa, *J. Optics*, 19, 065705 (2017).
- 8) Liquid/Liquid Interfacial Synthesis of 'Click' Nanosheet., A. Rapakousiou, R. Sakamoto, R. Shiotsuki, R. Matsuoka, U. Nakajima, T. Pal, R. Shimada, M. A. Hossain, H. Masunaga, S. Horike, Y. Kitagawa, S. Sasaki, K. Kato, T. Ozawa, D. Astruc and H. Nishihara, *Chem. Eur. J.*, 23, 8443-8449 (2017).
- 9) Protein expression guided chemical profiling of living cells by the simultaneous observation of Raman scattering and anti-Stokes fluorescence emission., L.-D. Chiu, T. Ichimura, T. Sekiya, H. Machiyama, T. Watanabe, H. Fujita, T. Ozawa, and K. Fujita, *Sci. Rep.*, 7, 43569 (2017).
- 10) Split luciferase complementation assay for the analysis of G protein-coupled receptor ligand response in *Saccharomyces cerevisiae*., Y. Fukutani, J. Ishii, A. Kondo, T. Ozawa, H. Matsunami and M. Yohda, *Biotech. Bioeng.*, 114, 1354-1361 (2017).
- 11) Rapid in vivo lipid/carbohydrate quantification of single microalgal cell by Raman spectral imaging to reveal salinity-induced starch-to-lipid shift., L.-D. Chiu, S.-H. Ho, R. Shimada, N.-Q. Ren and T. Ozawa, *Biotechnol. Biofuels*, 10, 9 (2017)
- 12) Strategies for development of optogenetic systems and their applications., M. Endo and T. Ozawa, *J. Photochem. Photobiol.* 30, 10-23 (2017).

2. 総説・解説

- 1) クリスチャン分析化学 I. 基礎編. 6章化学平衡の一般概念, (Analytical Chemistry 7th edition 訳) 小澤岳昌, 丸善出版, p179-206 (2016).
- 2) 三次元発光イメージング 服部満, 小澤岳昌, 先端計測・研究を支える機器開発, 化学同人, p82-87 (2016) .