

生体情報分子の先端的可視化計測法の開発

佐藤 守俊

東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻

1. 研究のねらい

細胞機能やその破綻の結果である疾患の理解を目的として、鍵となる生体情報分子が細胞の中のどこで・いつ・どの程度生成し、機能しているのか、その動態を可視化計測する蛍光プローブの開発を行った。特に、生体脂質や生体小分子ならびにキナーゼによるタンパク質リン酸化をそれぞれ可視化計測するプローブを新しく開発すると共に、開発した蛍光プローブを活用して、従来の手法では明らかに出来なかった当該生体情報分子の動態を明らかにした。

2. 研究成果

生体脂質の蛍光プローブ ホスファチジルイノシトール 3,4,5-トリリン酸 (PI(3,4,5)P₃) やジアシルグリセロール (DAG) 等の生体脂質が多様な細胞機能を制御することは明らかにされているが、その細胞内動態については未知の部分が多い (図 1)。本研究では生体脂質を可視化計測すべく新しい蛍光プローブを開発した (図 2)。本プローブは二つの蛍光タンパク質 (CFP, YFP) と計測目的の脂質と特異的に結合するドメイン (PI(3,4,5)P₃の場合はPHD) とを有し、それらが **Glu-Ala-Ala-Ala-Arg** の繰り返し配列からなる剛直な α ヘリックスで連結されている。ヘリックスの一カ所に、側鎖が最も小さいアミノ酸であるグリシンを二個導入し、計測目的の脂質が存在しない場合、ここを蝶番としてプローブが自由回転できるように設計した。一方目的の生体脂質が膜に生成してプローブの脂質結合ドメインが結合すると、プローブの動きやすさが大幅に減少し、ドナーであるCFPからアクセプターであるYFPへ安定的に蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) が生起することになる。このFRETを計測し生体脂質の細胞内動態を蛍光顕微鏡で可視化する。

このプローブには二つ重要な部分がある。一つは脂質結合ドメインであり、プローブの脂質選択性を決める。もう一つがプローブに連結する膜局在化配列 (MLS) であり、様々なオルガネラ膜での脂質計測を可能にする。選択性と局在を自由自在に変えることが可能な本法に基づいてPI(3,4,5)P₃の蛍光プローブ (Fllip; フリップ) (*Nature Cell Biol.* 2003) とDAGの蛍光プローブ (Daglas; ダグラス) (*Nature Methods* 2006) を開発し、当該脂質の細胞内動態 (特にオルガネラ膜での動態) を明らかにした。

NOの蛍光プローブ 一酸化窒素 (NO) は心血管系や神経系において重要な生体小分子である。筆者は酵素工学に基づく全く新しいアプローチでNOの超高感度蛍光プローブ (NOA; ノア) を開発した (図 3)。NOAは酵素ドメインと蛍光ドメインを有する。酵素ドメインとしてはNOと結合しcGMPを生成する可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) を用い、蛍光ドメインとしては筆者が2000年に開発したcGMP蛍光プローブ (CGY; シージー) を用いた。酵素ドメインからNO依存的に大量生成されたcGMPを蛍光ドメインが効率よく蛍光シグナルに変換するため、NOAはサブナノモル濃度

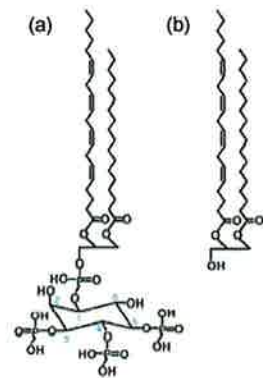


図1 生体脂質の構造. (a) PI(3,4,5)P₃, (b) DAG

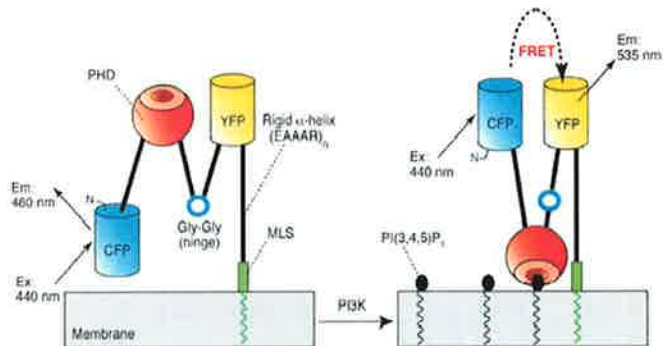


図2 生体脂質 (例としてPI(3,4,5)P₃) の蛍光プローブの原理

領域のNOを可視化する超高感度蛍光プローブとなる。NOAは応答可逆性を有し、複雑なNO濃度変動も可視化計測できる。感度、可逆性の両面に於いて優れたNOAは、既存の手法では明らかにできなかったNO動態の可視化計測を実現した (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005)。

細胞型蛍光プローブ 酵素工学に基づく上述の超高感度蛍光プローブ (NOA) のコンセプトを一般化する目的で細胞型蛍光プローブを開発し、種々の生細胞から放出される生体分子の超高感度可視化計測を実現した。例えば、NOの細胞型蛍光プローブ (Piccell; ピクセル) (検出限界; 20 pM) を開発し、ネットワークを形成した神経細胞が 100 pM程度のNOを周期的に放出して

いることを初めて明らかにした (*Anal. Chem.* 2006)。NOに加えてペプチド性の神経伝達物質についても超高感度の細胞型蛍光プローブを開発し、本アプローチが細胞から放出される生体分子の動態を理解する上で強力なツールを提供することを示した。

タンパク質リン酸化の蛍光プローブ タンパク質のリン酸化は細胞内シグナル伝達のON/OFF調節に関わる最も主要なメカニズムの一つである。筆者はタンパク質リン酸化を可視化計測する蛍光プローブ (Phocus; フォーカス) を既に開発している (*Nature Biotechnol.* 2002)。本研究では、この独自の技術を展開し、生命機能と疾患の理解に重要なキナーゼによるタンパク質リン酸化を可視化する蛍光プローブを新しく開発した。ERKは細胞の増殖など数多くの生命機能を制御するセリン・スレオニンキナーゼである。ERKによるタンパク質リン酸化を可視化する蛍光プローブ (Erkus; アーカス) を開発し、生細胞の核内・核外におけるERKによるタンパク質リン酸化の動態を可視化して明らかにした (*Anal. Chem.* 2007)。またチロシンキナーゼのSrcの蛍光プローブ (Srcus; サーカス) を開発し、細胞膜のマイクロドメイン (lipid raft) におけるSrcの局所的な活性化を明らかにした (*J. Biol. Chem.* 2007 and *Cancer Res.* 2007)。

3. 主な論文

- M. Sato, N. Hida and Y. Umezawa, Imaging the Nanomolar Range of Nitric Oxide with an Amplifier-Coupled Fluorescent Indicator in Living Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 14515 (2005).
- M. Sato, Y. Ueda and Y. Umezawa, Imaging Diacylglycerol Dynamics at Organelle Membranes, *Nature Methods*, 3, 797 (2006).
- M. Sato, T. Nakajima, M. Goto and Y. Umezawa, Cell-Based Indicator to Visualize Picomolar Dynamics of Nitric Oxide Release from Living Cells, *Anal. Chem.*, 78, 8175 (2006).
- M. Sato, Y. Kawai and Y. Umezawa, Genetically Encoded Fluorescent Indicators to Visualize Protein Phosphorylation by Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) in Single Living Cells, *Anal. Chem.*, 79, 2570 (2007).
- T. Hitosugi, M. Sato, K. Sasaki and Y. Umezawa, Lipid Raft-Specific Knockdown of Src Family Kinase Activity Inhibits Cell Adhesion and Cell Cycle Progression of Breast Cancer Cells, *Cancer Res.*, 67, 8139 (2007).

4. その他

特許

- 佐藤守俊, 梅澤喜夫, タンパク質リン酸化インディケーター, 特願 2006-211072, 出願人: 東京大学

受賞

- 日本化学会進歩賞, 細胞内の分子過程を可視化する遺伝子コード型蛍光プローブ (2007年3月)
- 日本分析化学会奨励賞, 遺伝子コード型蛍光プローブによる生体情報分子の動態分析法 (2007年9月)

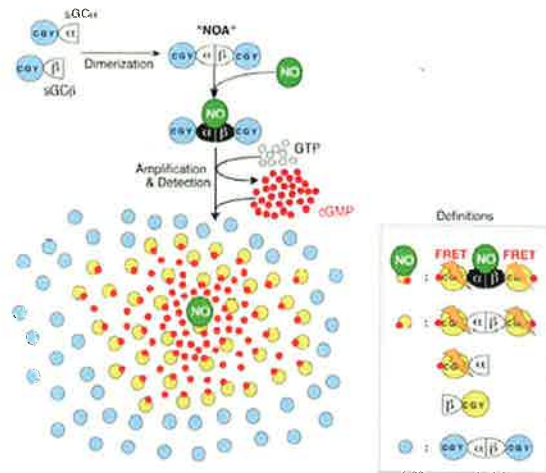


図3 NOの超高感度蛍光プローブの原理