

## 研究課題別評価書

### 1. 研究課題名

生体情報分子の先端的可視化計測法の開発

### 2. 氏名

佐藤 守俊

### 3. 研究のねらい

生体分子の可視化計測技術(分子イメージング技術)は、生きた一つ一つの細胞内における生体分子動態の時空間可視化解析を可能にする。そのため、100万個の細胞をすりつぶして構成成分を分析する従来法では得られない「生きた情報」を与え、生命科学研究のための先端計測分析技術としてその発展が強く望まれている。また、ポストゲノム時代に入り、この生体分子の可視化計測技術は、基礎研究のみならず、創薬研究、スクリーニング、副作用の有無の判定、あるいは疾患細胞の分子診断においても不可欠な研究手法になると期待されている。この生体分子の挙動を可視化する分子イメージング研究においては、興味ある生体分子もしくはタンパク質リン酸化などの生体反応を捕まえて光を発生する、いわゆるプローブ(probe)と呼ばれる機能性分子の開発が必須である。本さきがけ研究では、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。

### 4. 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-トリスリン酸(PI(3,4,5)P<sub>3</sub>)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(GFP, 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)P<sub>3</sub>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 $\alpha$ 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

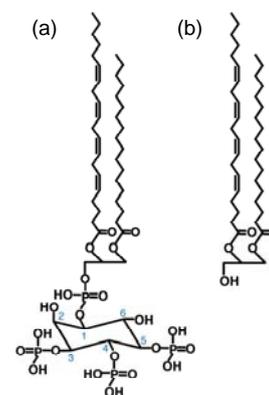


図1 生体脂質の構造。  
(a) PI(3,4,5)P<sub>3</sub>.  
(b) DAG.

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を蛍光顕微鏡で計測し生体脂質の細胞内動態を可視化する。

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)P<sub>3</sub>の蛍光プローブ (Flip; 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を可視化計測した。DAGについては以下のことが明らかとなった(図 3)。(1)細胞膜における

DAG濃度は極めて低く保たれているものの、リガンド刺激により、速やかに一過性のDAG生成が誘起されること。(2)細胞内膜においては、DAG濃度はリガンド刺激以前から高く保たれており、その濃度はリガンド刺激によりさらに上

昇すること。(3)ミトコンドリアの外膜でも、細胞内膜同様に、リガンド刺激以前からDAGが生成しているが、その濃度はリガンド刺激によりほとんど変化しないこと。また、Daglasでの可視化計測と薬理学的手法を組み合わせることにより、(4)細胞膜でのDAGはホスホリパーゼCによるホスファチジルイノシトール 4,5-ニリン酸 (PI(4,5)P<sub>2</sub>) の加水分解により一過的に生成すること、(5)細胞内膜およびミトコンドリア外膜でのDAGはホスホリパーゼC経路ではなく、ホスファチジン酸ホスファターゼによるホスファチジン酸の脱リン酸化により生成すること、を明らかにした。PI(3,4,5)P<sub>3</sub>について本研究者は、先行研究によりPI(3,4,5)P<sub>3</sub>が細胞膜のみならず細胞内膜(ゴルジ体膜, 小胞体膜)にも生成していることを既に明らかにしている。本さがけ研究においては、ミトコンドリア外膜に蛍光プローブ (Flip) を局在化させてそのオルガネラ膜でPI(3,4,5)P<sub>3</sub>を可視化計測し、当該脂質がリガンド刺激依存的にミトコンドリア外膜に生成していることを始めて明らかにした。

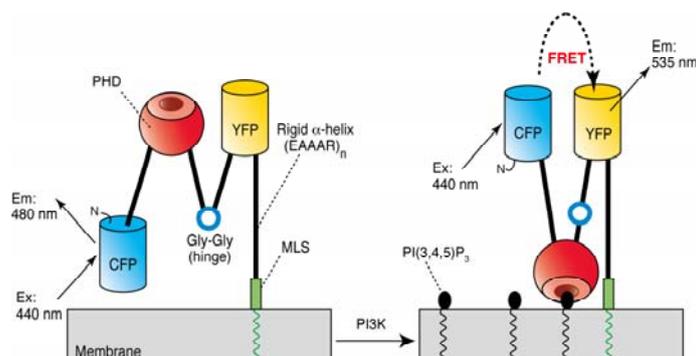


図 2 生体脂質(例としてPI(3,4,5)P<sub>3</sub>)の蛍光プローブの原理。

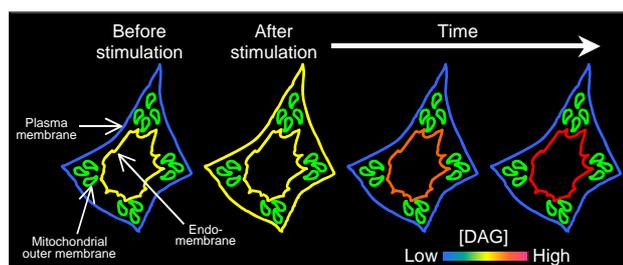


図 3 蛍光プローブが明らかにした DAG の動態

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。本研究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、これを報告している(図4)(Nature Biotechnol.

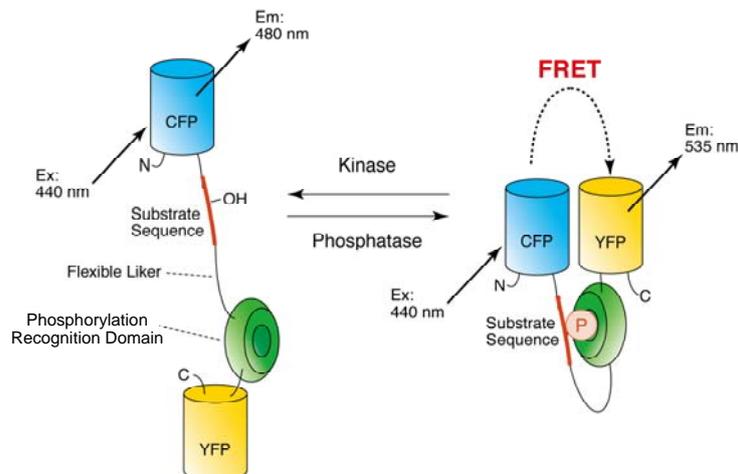


図4 タンパク質リン酸化を可視化する蛍光プローブの原理。

2002). 本さきがけ研究では、

本研究者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。蛍光プローブに導入する基質配列としては、ERKの細胞内基質由来のアミノ酸配列(Lys-Arg-Glu-Leu-Val-Glu-Pro-Leu-Thr-Pro-Ser-Ile-Glu-Ala-Pro-Asn-Gln-Ala-Leu-Leu-Arg)を用いている。蛍光プローブに導入するリン酸化認識ドメインとして、リン酸化スレオニン配列に結合するFHA2ドメインを用いた。このように作製した

蛍光プローブ(Erkus; アーカス)にさらに核内局在アミノ酸配列と細胞質局在アミノ酸配列をそれぞれ連結して細胞内にプローブを局在化させ(それぞれErkus-nuc, Erkus-cyto), これを用いて核内、細胞質でのERKによるタンパク質リン酸化の動態をそれぞれ可視化計測した(図5)。この結果、(1)リガンド刺激によりERKの活性化は細胞質では一過性であること(つまり細胞質では、活性化されたERKは10分程度で不活性化されてしまうこと)、(2)一方の核内では、ERKの活性化は持続的であること(つまり核内では、一端活性化されたERKは一時間程度その活性を失わないこと)、が明らかとなった(Anal. Chem. 2007)。またチロシンキナーゼのSrcによるタンパク質リン酸化を可視化計測する蛍光プローブ(Srcus; サークス)を開発した。これを用いた蛍光イメージングの結果、(1)リガンド刺激の種類によってSrcが活性化する膜系が異なること(例として、男性ホルモンは細胞膜でしかSrcを活性化しないが、女性ホルモンは細胞膜のみならずオルガネラ膜でもSrc活性化すること)およびその分子メカニズム(J. Biol. Chem. 2007)、(2)Srcは生体膜において一様に活性しているのではなく、生体

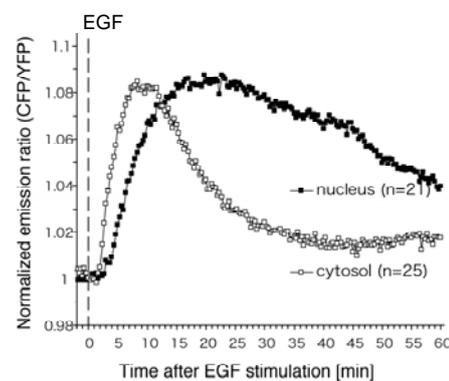
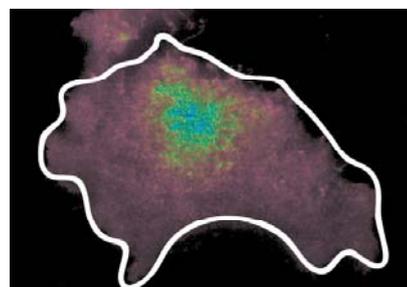


図5 核内外でのERKによるタンパク質リン酸化の可視化計測。



膜上に存在する数十ナノメートルサイズの微小ドメイン群 (lipid raft; リピッドラフト) においてのみ活性していること (図 6) (Cancer Res. 2007), を明らかにした. また, (3) リピッドラフトにおける Src の活性化が, 乳ガン細胞の細胞接着および細胞周期の亢進を制御することを明らかにした (Cancer Res. 2007).

酵素工学に基づく超高感度蛍光プローブ 以下, 本研究者が酵素工学に基づいて設計・開発した増幅検知型の超高感度蛍光プローブとその応用研究について説明する. 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. 本研究者は従来にない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 7) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2005). 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 依存的にセカンドメッセンジャーのサイクリックグアノシン 3',5'-  
 ーリン酸 (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本研究者が開発した cGMP 蛍光プローブ (CGY; シージー) (Anal. Chem. 2000) 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.

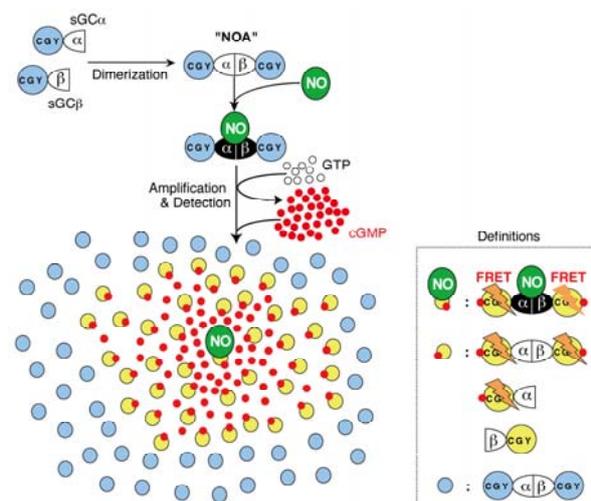


図 7 NO の超高感度蛍光プローブの原理.

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. 一例として, NO の細胞型蛍光プローブ (Piccell; ピクセル) を開発した (Anal. Chem. 2006). Piccell は NO を増幅検知するため, ピコモル濃度領域の NO を超高感度に検出する (検出限界は 20 pM). また, 選択性, 可逆性, 再現性についても, Piccell は極めて優秀な蛍光プローブである. Piccell は細胞型の蛍光プローブであるので, 血管内皮細胞, 神経細胞, マクロファージなどと Piccell を共培養することに

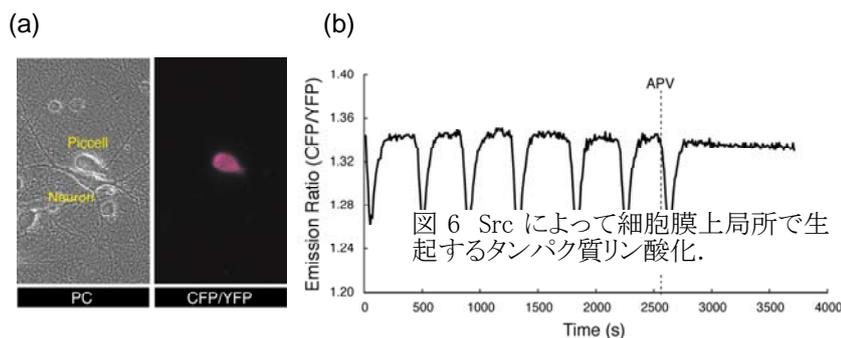


図 8 NO の細胞型蛍光プローブ (Piccell) を神経細胞と共培養し (a), ネットワークを形成した神経細胞からの NO の放出パターンを可視化計測.

よって、それらの細胞から放出されたNOを可視化計測することが出来る。例えば、ラット海馬より抽出した神経細胞とPiccellとを共培養し、神経細胞から放出されるNOの動態を可視化計測した(図 8a)。大変興味深いことに、ネットワークを形成した神経細胞は外部から刺激を与えなくとも、自発的かつ周期的に 100 pM 程度のNOを産生していることがわかった(図 8b)。この周期的なNO放出は、グルタミン酸受容体(NMDAレセプター)を介した自発的な神経伝達によっていることを明らかにした。このように、Piccellは細胞から放出されたNOの動態を知る上で強力なツールを提供し、NOによる細胞機能の時空間制御を明らかにする。なお、酵素工学に基づいて細胞型蛍光プローブを構築する本アプローチは一般性が高く、一酸化窒素のみならず、ペプチドホルモンや神経伝達物質など、細胞から放出される生体分子一般について、それらの受容体タンパク質を活用して高感度の細胞型蛍光プローブを開発できることを示した。

#### 【参考文献】

- M. Sato, N. Hida, T. Ozawa and Y. Umezawa, “Fluorescent Indicators for Cyclic GMP Based on Cyclic GMP-Dependent Protein Kinase I $\alpha$  and Green Fluorescent Proteins”、Anal. Chem., 72, 5918-5924 (2000)
- M. Sato, T. Ozawa, K. Inukai, T. Asano and Y. Umezawa, “Fluorescent Indicators for Imaging Protein Phosphorylation in Single Living Cells”、Nature Biotechnol., 20, 287-294 (2002)
- M. Sato, Y. Ueda, T. Takagi and Y. Umezawa, “Production of PtdInsP<sub>3</sub> at Endomembranes is Triggered by Receptor Endocytosis”、Nature Cell Biol., 5, 1016-1022 (2003)

## 5. 自己評価

本さきがけ研究では新しい方法、すなわち新しい蛍光プローブの設計・開発と共に、それを用いた細胞内分子過程の可視化計測を目標として開始された。前者の「方法の開発」については、おおむね当初の目標に沿う形で開発研究を展開でき、生命機能の理解に重要な生体分子の蛍光プローブを開発することができた。一方の応用研究については、脂質や一酸化窒素、活性化したキナーゼの動態など可視化計測により得られた知見は、決してそのすべてを予め予想し得たものでなく、まさに新しい発見であるとその成果を位置づけることが出来る。しかし、確かに可視化計測の結果は既存の知見にはない望外なものであったが、これらは必ずしも偶然の発見でないと本研究者は認識している。本研究者の姿勢は、単に生体分子に反応して蛍光シグナルを発するプローブを作ればそれでよいというのではなく、生体分子の細胞内動態に関する情報をうまく抽出するには蛍光プローブにどのような機能を備えるべきかという点、どのようにプローブを用いれば生体分子の細胞内動態やその制御機構に関する情報を抽出できるのか等にその重心が置かれている。これがあってこそそのそれぞれの発見であり、必ずしも偶然のものではないと本研究者は理解している。

## 6. 研究総括の見解

独自の可視化法によって種々の生体情報分子の動態を明らかにするプローブの開発を目指す。主なターゲットは生体脂質、タンパク質リン酸化、一酸化窒素(NO)の蛍光プローブの開発である。

主たる成果は次の3点である。

- ①脂質結合ドメインと局在化配列を有する蛍光プローブを2種作成し、生体脂質の細胞内動態にいくつかの新しい知見を得た。
- ②リン酸化認識ドメインと局在アミノ酸配列を有する蛍光プローブの作成に成功し、In vivo で2種のキナーゼによるリン酸化の細胞内動態について新規性の高い数多くの知見を得た。
- ③神経伝達物質である NO の超高感度可視化プローブを開発し、細胞内で時空間可視化検出することにより、NO の動態に関して新規性の高い知見を得た。

これらの成果により、開発したプローブを用いて生体分子の細胞内動態に関する情報をうまく抽出できることを証明した。研究者の培ったプローブ設計理論の一般化をより前進させたことは高く評価できる。

研究成果は18篇の原著論文、14件の学会招待講演にまとめられている。この研究成果に基づく特許6件を出願している。また、これら成果により「平成18年度日本化学会進歩賞」、「平成19年度日本分析化学会奨励賞」を受賞している。

これらの成果は、いずれも世界最高性能を有するプローブ開発によるものであり、細胞でのマイクロドメインにおけるタンパク質の局在活性の可視化の幅広い展開は極めて高く評価できる。今後、生化学や生物学、生理学の研究分野に対して大きなインパクトをもたらすことが期待できる。

## 7. 主な論文等

### (A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

#### (1)論文(原著論文)発表

##### 論文(国際)

- ・ 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, 14515–14520 (2005)
- ・ M. Sato, Y. Ueda and Y. Umezawa, “Imaging diacylglycerol dynamics at organelle membranes”, *Nature Methods*, 3, 797–799 (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, 8175–8182 (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, 2570–2575 (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, 8139–8148 (2007).

#### (2)特許出願

発 明 者: 佐藤守俊、梅澤喜夫、一杉太郎  
発明の名称: キナーゼ阻害性融合タンパク質と医薬組成物  
出 願 人: 梅澤喜夫  
出 願 日: 2007.6.8(未公開)  
出 願 番 号: PCT/JP2007/61650

発 明 者: 佐藤守俊、梅澤喜夫  
発明の名称: タンパク質リン酸化インディケーター  
出 願 人: 東京大学  
出 願 日: 2007.3.6(未公開)  
出 願 番 号: PCT/JP2007/054333

### (3)受賞

- ・平成19年3月 平成18年度日本化学会進歩賞
- ・平成19年9月 平成19年度日本分析化学会奨励賞

### (4)著書

- ・ M. Sato and Y. Umezawa, “Fluorescent Indicators for Imaging Protein Phosphorylation in Single Living Cells” Cell Biology: A Laboratory Handbook 3rd Edition, Julio E. Celis (Ed.), Chap. 42, 325–328, Elsevier (2005).
- ・ M. Sato and Y. Umezawa, “FRET-Based Reporters for Intracellular Enzyme Activity” Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Bioinformatics, Wiley (2005).
- ・ 佐藤守俊「細胞の分子イメージング」医療ナノテクノロジーテキスト, 杏林図書, 2007年, p2–17.
- ・ 佐藤守俊「生細胞内の分子過程を時空間計測するプローブ」蛋白質核酸酵素増刊号「ケミカルバイオロジー」, 共立出版, 2007年, p1568–1580.
- ・ 佐藤守俊「細胞内のシグナル伝達を可視化する蛍光プローブ」化学フロンティア, 化学同人, 印刷中..

### (5)学会発表

#### 口頭発表(国内)

- ・ 佐藤守俊、“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”、日本化学会第87春季年会、2007
- ・ 佐藤守俊、“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”、第56回日本分析化学会年会、2007

### (6)招待講演

**招待講演(国際)**

- ・ 佐藤守俊、“Methods to Visualize Molecular Events in Living Cells”、NanoBio-Tokyo 2006、2006
- ・ 佐藤守俊、“Imaging the Nanomolar Range of Nitric Oxide with an Amplifier-Coupled Fluorescent Indicator in Living Cells”、4th International Conference on Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide、2006
- ・ 佐藤守俊、“Illuminating molecular processes in living cells”、The Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences “On the Frontiers of Chemical Biology”、2007

**招待講演(国内)**

- ・ 佐藤守俊、“生体情報分子の可視化計測法”、日本薬学会第127年会、2007
- ・ 佐藤守俊、“細胞内の分子過程の可視化計測法”、第7回蛋白質科学会年会、2007

**(B) その他の主な成果**

なし