

研究課題別評価

1 研究課題名: タンパク質オルガネラ移行と遺伝子発現の非侵襲的時空間解析法の確立

2 研究者氏名: 小澤 岳昌

3 研究のねらい:

環境変化等の細胞外刺激が引き起こす遺伝子の発現とタンパク質の細胞内諸器官(オルガネラ)への移行は、細胞が効率的かつ協調的に機能するための重要な仕組みである。オルガネラ特有の機能を解明するためには、細胞が生きた状態で、オルガネラに局在する生体分子の機能を解析する新たな技術が必要である。本研究では、二分した蛍光あるいは発光タンパク質を細胞内で再構成させる新たな手法を用いて、生きた細胞や動物個体内での遺伝子の発現とタンパク質のオルガネラへの移行の詳細を時空間解析する新しい研究手法の確立を目的とした。

4 研究成果:

(1) ミトコンドリア膜間腔移行シグナル配列の同定

ミトコンドリアの直径は $1\mu\text{m}$ 以下であるため、通常の光学顕微鏡では外膜と内膜で仕切られた空間を判別することはできない。ミトコンドリア内膜で囲まれるマトリックスに局在するタンパク質と、外膜と内膜で囲まれる膜間腔(IMS)に局在するタンパク質を、二分した GFP の再構成を利用して高速に判別する方法を開発した(図1左)。二分した GFP のC末側を含むプローブ(EGFPc-DnaEc)を作製し、マトリックスおよび IMS に局在させた細胞2種類を作製した。試験タンパク質には、GFP のN末側を含むプローブ(EGFPn-DnaEn)を連結した。もし試験タンパク質がマトリックスに移行すれば、図1左側の細胞のみが蛍光性となる。もし試験タンパク質がIMSに移行すれば、図1右側の細胞のみが蛍光性となる。

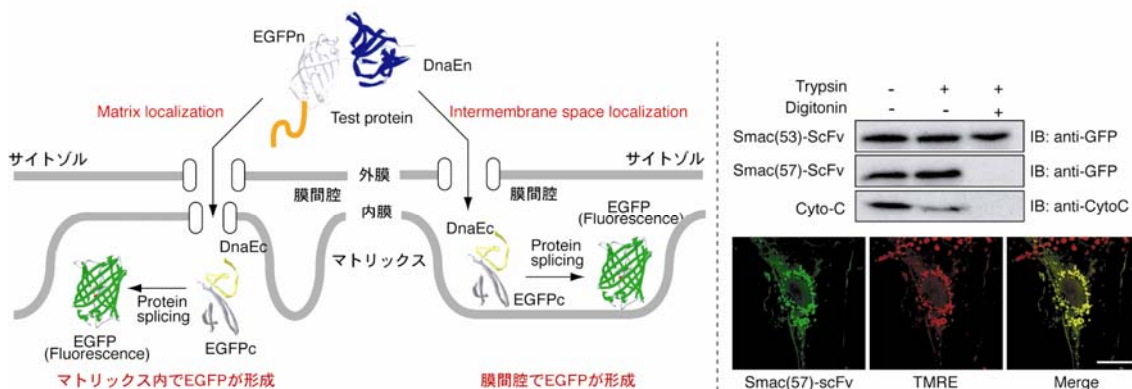


図1. ミトコンドリア内空間に局在するタンパク質の判別法の原理(左)とScFvのミトコンドリア膜間腔へのターゲッティング。

IMS 局在タンパク質の一つである Smac を用いて、Smac のどのアミノ酸が IMS 局在に重要であるか、IMS シグナル配列の同定を目的とした。Smac にランダムにアミノ酸置換を加え(Smac mutants), そのミトコンドリア内局在を解析した。その結果、N末から 50 番目の Met が Lys に、あるいは 53 番目の Cys が Arg に1アミノ酸置換するだけで、Smac はIMS からマトリックスに局在が変わることを明らかにした。またミトコンドリアへのシグナル配列として考えられてきたN末から 53 アミノ酸は、マトリックスへの移行シグナルとして機能していること、さらにそれに続く4アミノ酸-Ala-Val-Pro-Ile-を付加した 57 アミノ酸は、IMS へのシグナル配列として機能することを実証した。

このミトコンドリア膜間腔移行シグナル配列を、様々な機能を有するタンパク質プローブに連結した。GFP 変異体の酸化還元プローブ、GFP 変異体2分子を含むカルシウムプローブ、外部

基質でラベル可能な halotag, single chain antibody (ScFv) を IMS に局在させることが可能であることを実証した(図1右). この IMS へタンパク質を輸送する短いペプチド配列は, 本研究により初めて同定されたものである. IMS シグナルペプチド配列を様々なプローブに連結すれば, IMS の機能解析の進展が期待できる.

(2) mRNA を可視化する蛍光プローブの開発

RNA の塩基配列特異的に mRNA を認識検出する蛍光タンパク質プローブを分子設計し, 生きた細胞内 mRNA の動態を時空間解析する研究手法の開発を目的とした. 標的とする RNA は, ミトコンドリアゲノムから合成される NADH dehydrogenase subunit 6 (ND6)mRNA とした. RNA 結合タンパク質 Pumilio (wtPUM) の核酸認識アミノ酸に mutation を加え, NADH dehydrogenase subunit 6 の mRNA を特異的に認識する mutant PUM (mPUM1, mPUM2) を作製した(図2左). この mPUM1 と mPUM2 それぞれに, split した EGFP を連結した. mRNA の発現に伴い mRNA-mPUM1-mPUM2 三元錯体が形成される. この時 split した EGFP が近接して, EGFP タンパク質が折り畳まれ, その結果 EGFP の蛍光が回復する. EGFP の蛍光シグナルから mRNA の局在を蛍光顕微鏡により解析した.

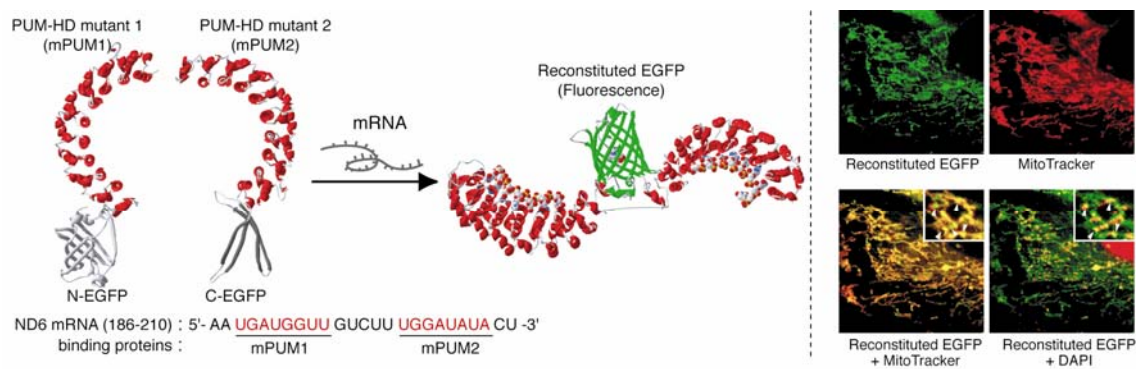


図2. mRNA可視化プローブの原理(左)とND6 mRNAのミトコンドリア内局在(右)

プローブをミトコンドリアにターゲットさせ, ミトコンドリアゲノムをDAPIで, ミトコンドリアを MitoTrackerで染色した後, RNAの局在を蛍光顕微鏡を用いて観察した. RNAはミトコンドリアに一樣に局在するが, ミトコンドリアゲノム近傍に多く局在することを明らかにした(図2右). 次に photobleaching法を用いて, ミトコンドリア内におけるmRNAの動態観察を行った. EGFPを bleaching後 30 分間の蛍光観察を行うと, EGFPはミトコンドリア内で殆ど移動しないことがわかった. これはミトコンドリアmRNAが自由には拡散移動できず, ミトコンドリア内で固定化された状態であることを示している. 次にphotobleaching直後に H_2O_2 刺激を行い, 30 分間の蛍光観察を行った. その結果, ミトコンドリア自体のmotilityが停止した後, mtDNAが消失し, mtRNAのミトコンドリア内での拡散が観察された. 開発した分子は, 細胞内のmRNAの局在と動態観察が可能な新たな原理に基づくmRNA検出プローブである.

(3) マウス個体内でのタンパク質のオルガネラ内外移行検出法

細胞外刺激や環境の変化に伴い, タンパク質は核内外を移行する. 化学物質刺激に伴う男性ホルモン受容体(AR)のサイトゾルから核内への移行を, luciferase の再構成により定量・検出するプローブ分子を開発した. DnaE のN末に *renilla* luciferase のN末(RLuc-N)と核移行シグナル配列(NLS)を連結し, あらかじめ核内に局在させる(図3左). *Renilla* luciferase のC末側(RLuc-C)には DnaE のC末側と AR を連結し, サイトゾルに局在させる. 細胞に男性ホルモン(DHT)を添加すると, AR は DHT に結合して核内に移行する. この時 DnaE のN末とC末が相互作用してスプライシング反応が起こり, *Renilla* luciferase の発光能が回復する. この酵素活性を基質である coelenterazine により発光強度を測定する. DHT を 10pM から 10 μM まで細胞に添加したところ, luciferase の発光強度は濃度依存的に増大した. また, プローブを導入した細胞をマウス個体に

移植し、マウス個体内での AR の核内移行を低侵襲的に検出できることを実証した(図3右)。開発した方法をさらに展開し、コルチコステロン受容体, STAT-3, SREBP2, NF- κ B の核内移行の検出を可能にした。またアポトーシスに伴うミトコンドリアからの Smac の放出を、マウス個体内で検出する方法を開発した。以上開発した方法は、オルガネラ内外を移行するタンパク質一般に応用可能である。

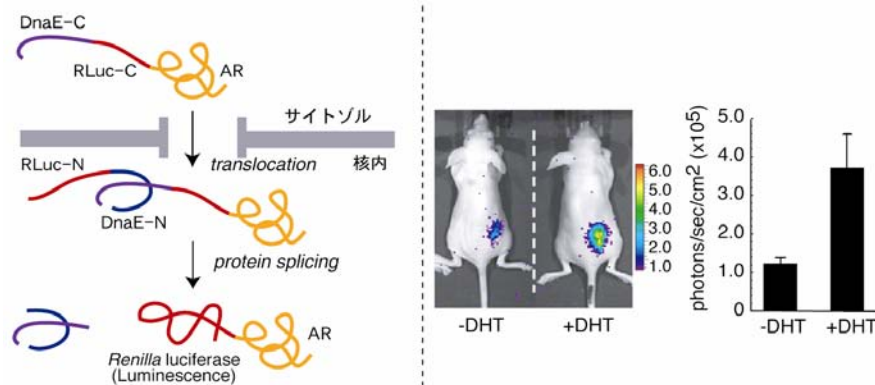


図3. Renilla luciferase再構成システムを利用したAR核内移行検出法の原理(右)と、生きたマウス個体内(皮下)におけるAR核内移行の検出(左)。

5 自己評価:

本研究はまず、タンパク質のオルガネラ移行を生きた細胞と動物個体内で可視化する新たな研究手法の開発に取り組んだ。採択以前の成果であるミトコンドリアタンパク質の網羅的解析法の発展研究として、生きた動物細胞内でミトコンドリアのマトリックスと膜間腔に局在するタンパク質を簡便に識別する方法を開発し、Smac タンパク質から膜間腔局在化シグナル配列を同定することに成功した。膜間腔に様々なプローブを局在させることが可能であり、今後膜間腔のイメージング研究に必要とされるペプチド配列であると考えている。当初は膜間腔局在タンパク質の収集を目標としたが、国際的にミトコンドリアプロテオームの競争が激しくなり、個人研究によるタンパク質収集と解析には限界が生じた。新規な膜間腔局在タンパク質を数分子同定はしたが、オミックス研究の成果として纏められなかった点は反省している。

またタンパク質の動態研究の一環として、タンパク質の核内移行とアポトーシスに伴うミトコンドリアからの放出過程を、マウス個体内で可視化する発光プローブを開発した。当初創案した検出の基本コンセプトを実験的に実証することに成功し、これまで組織切片標本を作製しなくては観察できなかった現象が、生きたマウス個体内から取り出せるようになったことは大きな成果であった。発光系を利用した分子イメージングの端緒が開かれたと考えている。検出の感度や空間分解能、また個体深部の臓器特異的な検出が可能であるかなど、克服すべき課題が多く残されている。今後はこれらの課題を解決していきたい。

遺伝子にコードされたプローブで mRNA を可視化する研究成果は、世界に先駆けて行われたものである。これまで標的 mRNA の配列に応じて、認識可能なタンパク質プローブは存在しなかった。開発したプローブが RNA 配列に応じてデザインできること、そしてミトコンドリア mRNA の動態を初めて捉えたことは、新たな RNA 研究法になると考えている。当初はサイトゾルで発現する mRNA をマウス個体内で検出することを目標に掲げた。しかしサイトゾルに多種類存在する mRNA の特異的な検出は、漸く活路が見いだせた段階である。さきがけ研究の成果を土台として、今後は生きた動物個体内の特異的 RNA 検出を実現する予定である。

6 研究総括の見解:

細胞外刺激が引き起こす遺伝子発現とタンパク質のオルガネラ移行の時間軸を含めたダイナミクスを非侵襲的に検出するという、非常に難度の高い、高度な技術レベルを要する研究課題であるが、本人の極めて緻密で地道な研究態度と高い研究能力により、タンパク質の核内移行の検出や初めて RNA 動態を検出できるプローブによる可視化は世界的にも第一級の質の高い成果

として評価できる。日本化学会進歩賞や若手科学者賞を受賞したように、客観的にも高い評価を得ている。

7 主な論文等:

論文 国際誌 14 件

- (1) High-Throughput Sensing and Noninvasive Imaging of Protein Nuclear Transport by Using Reconstitution of Split *Renilla* Luciferase. S. B. Kim*, T. Ozawa*, S. Watanabe, Y. Umezawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **101**, 11542–11547 (2004). (* Equal contribution to this work)
 - (2) A High-Throughput Screening of Genes that Encode Proteins Transported into the Endoplasmic Reticulum in Mammalian Cells, T. Ozawa, K. Nishitani, Y. Sako, Y. Umezawa, *Nucleic. Acids Res.*, **33**, e34 (2005).
 - (3) Genetically Encoded Stress Indicator for Noninvasively Imaging Endogenous Corticosterone in Living Mice. S.B. Kim, T. Ozawa, Y. Umezawa, *Anal. Chem.*, **77**, 6588–6593 (2005).
 - (4) A Short Peptide Sequence that Targets Fluorescent and Functional Proteins into the Mitochondrial Intermembrane Space. T. Ozawa, Y. Natori, Y. Sako, H. Kuroiwa, T. Kuroiwa and Y. Umezawa, submitted.
 - (5) Imaging Endogenous RNA in Single Living Cells; Dynamics of Mitochondrial RNA during Oxidative Stress. T. Ozawa, Y. Natori and Y. Umezawa, submitted.
- 他国際誌9件

受賞 2件

- (1) 小澤岳昌 日本化学会進歩賞 (2004)
- (2) 小澤岳昌 文部科学大臣表彰若手科学者賞 (2005)

招待講演 国際6件, 国内17件

- (1) “Visualization of Organelle-Localized Proteins in Living Cells Using Split-Reporter Reconstitution Analysis”, T. Ozawa, *The VIIth European Symposium of the Protein Society*, Stockholm, Sweden; scheduled in May, **2007**.
- (2) “Genetic Approaches to Identifying Mitochondrial Proteins and Their Localization”, T. Ozawa, *4th Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine*, Seoul, Korea; scheduled in February, **2007**.
- (3) “Design of Split Reporter Proteins for Biomolecular Imaging”, T. Ozawa, *Korean Society of Medical Biochemistry and Molecular Biology*, Seoul, Korea; October, **2006**.
- (4) “Methods for Identifying Organelle-Targeting Proteins”, T. Ozawa, *The Second NIBB-EMBL Symposium*, Aichi, Japan; March, **2006**.
- (5) “Reporter Protein Reconstitution: In vivo Sensing of Organelle-Localized Proteins”, T. Ozawa, *32nd Annual Meeting of the American Society for Photobiology*, Seattle, USA; July, **2004**.

他国際招待講演1件, 国内招待講演17件