

総合論文

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

佐藤 守俊¹

生命機能やその破綻^{たん}の結果である疾患の理解を目的として、生きた細胞内の分子過程を可視化計測する蛍光プローブを開発した。その成果はセカンドメッセンジャーと呼ばれる種々の生体小分子や生体脂質、タンパク質のリン酸化など多岐に及んでいる。このようなプローブの開発に基づく研究アプローチは、基礎生命科学研究のみならず、薬物候補物質の高速スクリーニングや薬理評価等においても key technology になると期待される。

1 緒言

蛍光を使ったバイオイメージングは、生きた細胞の中のどこで特定の生体分子がいつ・どの程度生成し、機能しているのかを、高い時間・空間分解能で可視化するのに最適である。このバイオイメージングには、細胞内に数多くある生体イオン・分子の中から、検出目的のイオン・分子を特異的に捕まえて、それにより蛍光シグナルを生起する、いわゆる蛍光プローブと呼ばれる機能性分子の開発が必要となる。一例として、カルシウムと結合して蛍光波長を変化させる Fura-2 という蛍光プローブを挙げることができる。Fura-2 は有機合成の手法に基づいて 1985 年に開発された蛍光プローブである¹⁾。この合成有機プローブはカルシウム濃度振動やカルシウム波など、それまで未知であったカルシウムイオンの細胞内動態をみごとに可視化し、我々の生命に対する理解を一変させた。それと同時に、数十万個ないしは数百万個の細胞をすりつぶして生体イオンや脂質、タンパク質などの構成成分を抽出し、それを電気泳動、あるいはラジオアイソトープを用いた方法等で分析する、いわゆる従来の破壊分析法だけでは“生命”を理解できない、ということを実感させた。しかし、合成有機分子によるアプローチには“検出対象の分子認識”という点において限界があり、イオンや酸化窒素などの数原子から成る分子を検出対象とした蛍光プローブしか開発されていないのが現状である。生命機能において重要な役割を果たすタンパク質、脂質等は、合成有機分子によるアプローチで特異的に分子認識するには余りに複雑なのである。そこで著者らは、タンパク質ドメインを分子認識素子として活用し、遺伝子工学的アプローチに基づいて、セカンドメッセンジャーと呼ばれる生体小分子やタンパク質リン酸化

など、細胞の生理機能や疾患の理解に重要な生体分子の蛍光プローブを開発し、それらが生きた細胞内の分子イメージングの強力なツールになることを実証してきた。更に、開発した蛍光プローブを駆使して、既存の研究手法では知り得なかった細胞内分子過程の時空間動態を明らかにしてきた。

2 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 [phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, PI(3,4,5)P₃] は、細胞内シグナル伝達において key となる生体脂質である (Fig. 1a)。細胞内に生成した PI(3,4,5)P₃ は、タンパク質リン酸化酵素やグアノシン三リン酸 (guanosine triphosphate, GTP) 結合タンパク質など数多くのタンパク質と結合し、それらを活性化する。このように活性化した PI(3,4,5)P₃ 結合タンパク質が、細胞増殖、アポトーシスなどの数多くの細胞応答を制御するとともに、そのシグナル伝達の破綻^{たん}は多くの疾患に関与する。しかし、PI(3,4,5)P₃ が一つ一つの生きた細胞内のどこに、どのタイミングで、どの程度産生されているのかについては明らかではない。そこで著者らは、生きた細胞内での PI(3,4,5)P₃ の動態を明らかにすべく、新しい遺伝子コード型蛍光プローブを開発した (Fig. 2)²⁾。

蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) を原理として PI(3,4,5)P₃ を可視化計測するために、シアン色蛍光タンパク質 (CFP) と黄色蛍光タンパク質 (YFP) をプローブの中に導入している。ちなみに CFP と YFP はオワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein, GFP) の異変異体の蛍光タンパク質であり、それぞれ FRET のドナー、アクセプターとして機能する³⁾。PI(3,4,5)P₃ と特異的に結合する部位として、プレクストリン相同ドメイン (pleckstrin homol-

¹ 東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻：153-8902 東京都目黒区駒場 3-8-1

ogy domain, PHD) を使い, CFP, PHD, YFP を Glu-Ala-Ala-Ala-Arg の繰り返し配列から成る剛直なアルファヘリックスで連結し, プローブを構築する. このプローブには更に特定の膜局在化配列を連結する. プローブ内の剛直なヘリックスの1箇所に, 側鎖が最も小さいアミノ酸であるグリシンを2個導入することによって, PI(3,4,5)P₃ 非存

在下においては, ここを蝶番 (hinge) としてプローブが比較的自由に回転できるようになっている. 一方, PI(3,4,5)P₃ が膜に生成してプローブ内の PHD が結合すると, プローブのフレキシビリティが大幅に減少し, プローブ内の CFP, YFP の相対的距離及び配向の変化によって, ドナーである CFP からアクセプターである YFP への FRET が増加する. したがって, CFP と YFP の蛍光を二波長測光することにより, PI(3,4,5)P₃ の量を蛍光顕微鏡下で可視化計測することができる. このように開発した PI(3,4,5)P₃ の蛍光プローブを Fllip (フリップ, *fluorescent indicator for lipid second messenger that can be tailor-made*) と名付けた.

Fllip の最大の特徴は, 細胞内の興味あるオルガネラ膜に Fllip を自由自在に局在させ, そのオルガネラ膜の PI(3,4,5)P₃ の動態を測定できることにある. まず, 細胞膜 (plasma membrane, pm) への局在化配列 (Gln-Gly-Cys-Met-Gly-Leu-Pro-Cys-Val-Val-Met), 及び小胞体膜とゴルジ体膜つまり細胞内膜 (endomembranes, em) への局在化配列 (Gln-Gly-Ser-Met-Gly-Leu-Pro-Cys-Val-Val-Met) を連結し, 当該生体膜で PI(3,4,5)P₃ を可視化するプローブ (それぞれ Fllip-pm, Fllip-em) を開発した (Fig. 3a, b). Fllip-pm と Fllip-em を用いて, 細胞膜と細胞内膜における PI(3,4,5)P₃ の動態を可視化計測した. Fllip-pm を発現させた細胞に外部刺激を加えたところ, 刺激直後から FRET 応答が観察され, 細胞膜において PI(3,4,5)P₃ が生成したことが分かる (Fig. 3c). 次に, 細胞内膜には PI(3,4,5)P₃ が生成するの否かを明らかにすべく, Fllip-em を発現させた細胞を刺激した. 刺激直後には Fllip-em の応答は見られなかったが, 約2分後から急激な FRET 応答が観察された (Fig. 3c). このことは, 従来考えられていた細胞膜の

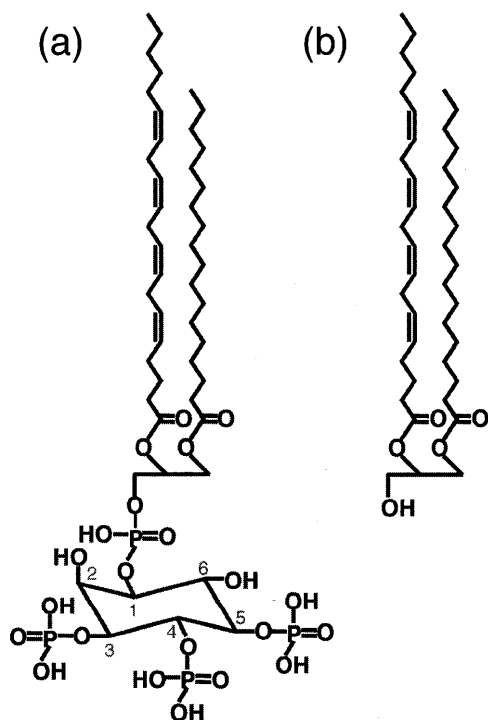


Fig. 1 Chemical structures of lipid second messengers

(a) Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PI(3,4,5)P₃).
(b) Diacylglycerol (DAG)

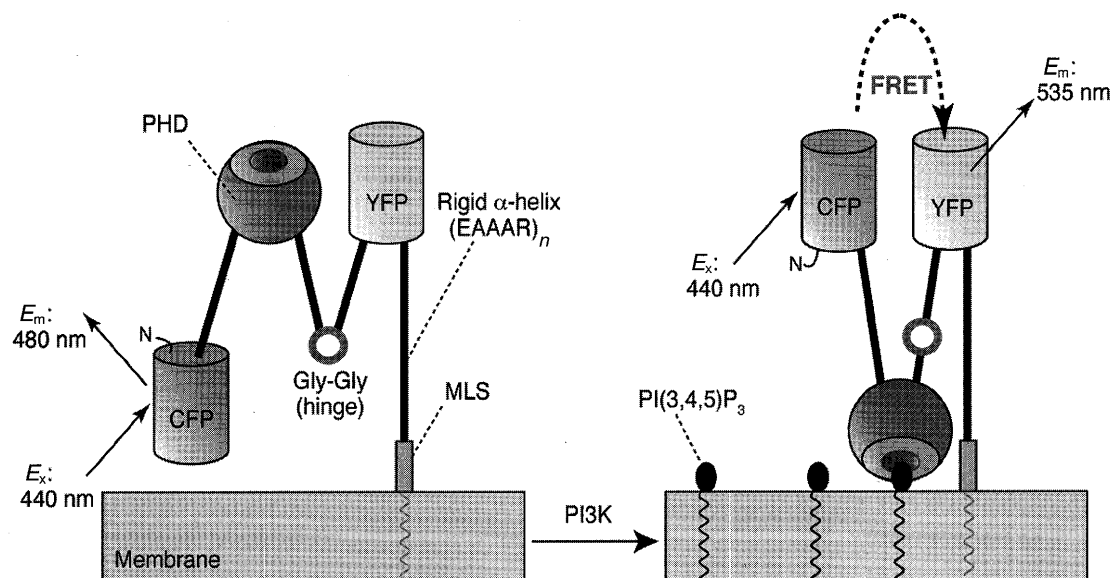


Fig. 2 Principle of the fluorescent indicator for PI(3,4,5)P₃, named "Fllip"

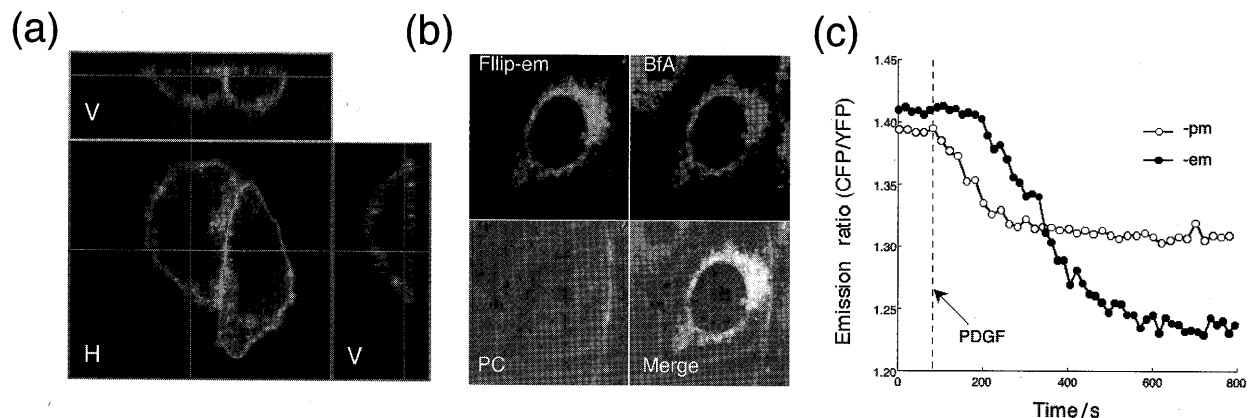


Fig. 3 Imaging PIP_3 dynamics at subcellular membranes

(a) Fluorescence images of cells that express Fflip-pm at the plasma membrane; (b) Fluorescence images of cells that express Fflip-em at the endomembrane; (c) Time courses of the CFP/YFP emission ratio of Fflip-em (closed circle) and Fflip-pm (open circle) upon stimulation with PDGF. The cells were stimulated with 50 ng mL^{-1} PDGF at the time shown with a broken line.

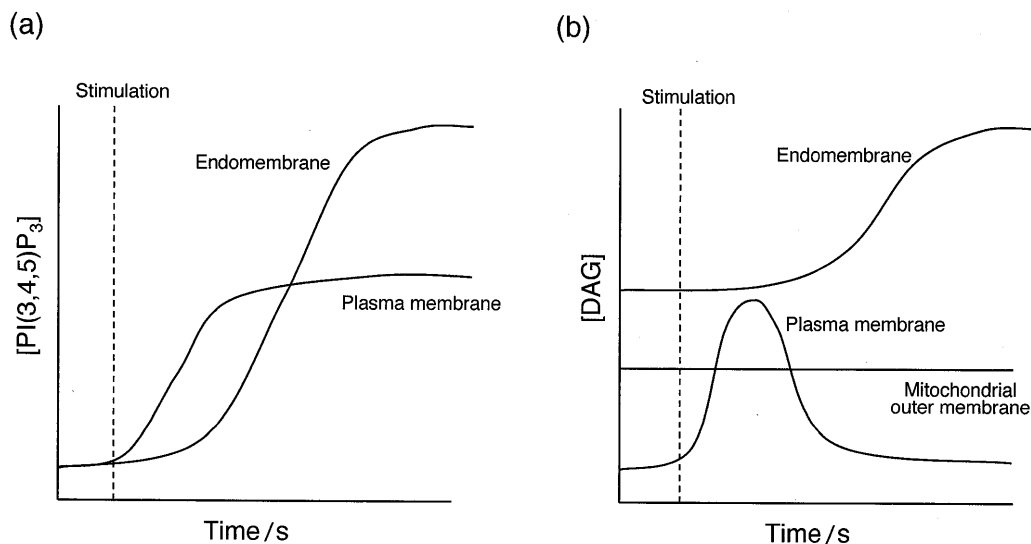


Fig. 4 Subcellular dynamics of lipid second messengers in living cell

(a) $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$; (b) DAG

みならず、細胞内膜においても細胞膜の2倍程度の $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ の産生が起きていることを示している (Fig. 4a). なお、このような Fflip を用いた $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ の可視化と、細胞内の特定の分子過程を阻害する薬理学的あるいは分子生物学的手法とを組み合わせることにより、 $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ 時空間動態を制御するメカニズムに切り込むこともできる。このようにして著者らは、エンドサイトーシスにより細胞膜から細胞内膜上に移動した受容体が細胞内膜上において $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ の生成を誘起することも明らかにしている。

Fflip において特に重要な部分が二つある。一つは膜局在化配列であり、上述のようにオルガネラ膜特異的な $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ の動態計測を可能にする (Fig. 2)。もう一つが生体脂質と結合するドメイン (Fflip の場合 PHD) であ

る。このドメインはプローブの脂質選択性を決めるドメインである (Fig. 2)。 $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ と結合する PHD の代わりに他の生体脂質の結合ドメインを用いることにより、自由自在にプローブの選択性を変えることができる。著者らは最近、このアプローチに基づいてジアシルグリセロール (diacylglycerol, DAG) (Fig. 1b) を可視化計測する蛍光プローブ (Daglas, ダグラス) を開発した⁴⁾。

DAG は $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ 同様に様々なホルモンや神経伝達物質等に依存して細胞の膜に生成する生体脂質であり、多様な DAG 結合タンパク質の活性をコントロールし、細胞増殖や膜輸送などの多様な細胞機能を調節する。しかし、DAG がどのオルガネラの膜に・いつ・どの程度生成しているのか、その時空間動態については未知である。著者らは、DAG 結合ドメインであるシステインリッチドメイン

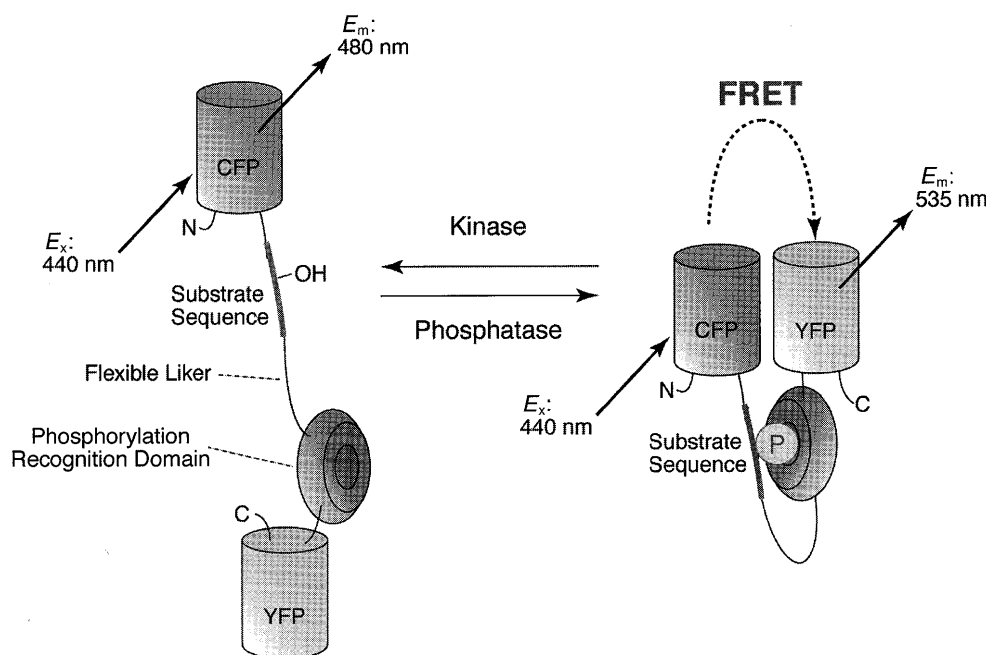


Fig. 5 Principle of the present fluorescent indicator for protein phosphorylation

(cysteine rich domain, CRD) を用いて Daglas を開発した。Daglas には、細胞膜 (pm)、細胞内膜 (em) に加えて、ミトコンドリア外膜 (mit) への局在化配列をそれぞれ連結し、当該オルガネラ膜で DAG を可視化計測するプローブ (それぞれ Daglas-pm, Daglas-em, Daglas-mit) とした。Daglas を発現させた細胞に外部刺激を加えて各オルガネラ膜での DAG の濃度変化を追跡したり、その細胞に生成した DAG を薬理学的手法で枯渇させることにより、DAG の細胞内での時空間動態を可視化計測した。この結果、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が分かった (Fig. 4b)。一方、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更に上昇する (Fig. 4b)。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かった (Fig. 4b)。更に、Daglas を用いた DAG 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、各オルガネラ膜に DAG を産生する酵素の種類がそれぞれ異なっていることも明らかとなった。

見たい生体脂質を見たい場所 (オルガネラ膜) で見る。選択性と局在を自由自在に変えることができる本遺伝子コード型蛍光プローブは、そのような新しい生体脂質の計測を可能にし、新しい生命科学の展開に貢献すると期待できる。

3 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 調節にかかわる最も主要なメカニズムの一つである。我々ヒトは約 500 種類のタンパク質リン酸化酵素 (キナーゼ) と約 140 種類の脱リン酸化酵素 (ホスファターゼ) を有している。タンパク質リン酸化に関連したキナーゼ・ホスファターゼは多様な生命機能を調節すると同時に、がんをはじめとする多くの疾患の原因にもなっている。著者らは生きた細胞内で生起するタンパク質リン酸化を可視化計測するために、新しい遺伝子コード型蛍光プローブ (Phocus, フォーカス) を開発した (Fig. 5)⁵⁾。タンパク質リン酸化酵素 (キナーゼ) により選択的にリン酸化される基質配列と、この基質配列のリン酸化を認識して結合するリン酸化認識ドメインとをフレキシブルなペプチドリンカーで結んだ融合タンパク質を設計し、その両端に CFP と YFP を連結する。このように設計した Phocus の基質配列がリン酸化を受けるとリン酸化認識ドメインが基質配列に結合して分子全体が構造変化する。これに伴って CFP と YFP が相互近接し、FRET に基づく YFP の蛍光が観察される。脱リン酸化酵素 (ホスファターゼ) が働いて Phocus が脱リン酸化されると、Phocus は可逆的に元の構造に戻るため、FRET は起こらず CFP からの蛍光が観察されるようになる。したがって、CFP と YFP 両方の蛍光を蛍光顕微鏡下で同時にモニターすることにより、一つ一つの細胞内のリン酸化の程度をうかがい知ることができる。Phocus とは “fluorescent indicator for *pro*tein phosphorylation that can be *custom-made*” の意味である。つまり

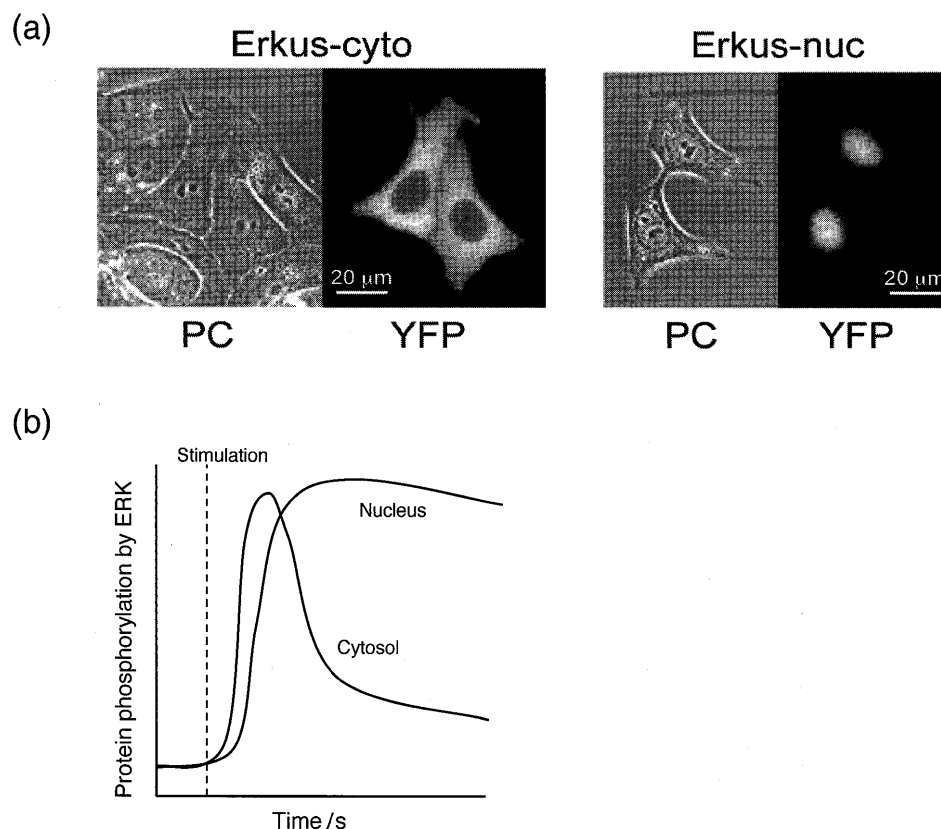


Fig. 6 Imaging protein phosphorylation by ERK

(a) Subcellular distribution of Erkus-cyto (left panel) and Erkus-nuc (right panel) in MCF-7 cell; (b) Time course of the Erkus-nuc or Erkus-cyto response in MCF-7 cells upon stimulation with 100 ng mL^{-1} EGF.

Phocus 分子内の基質配列、及びリン酸化認識ドメインを自在に入れ替えることができ、検出したいキナーゼに合わせてプローブをカスタムメイドできる。このアプローチは、著者らとアメリカのグループにより展開され、現在までに様々なキナーゼの蛍光プローブが開発されている。

細胞外シグナル制御キナーゼ (extracellular signal-regulated kinase, ERK) は細胞内の特定のタンパク質のセリン、スレオニン残基をリン酸化し、細胞の増殖など数多くの生命機能を制御するキナーゼである。この ERK によるタンパク質リン酸化の動態を可視化計測するために、遺伝子コード型蛍光プローブ ERK-phocus, 略して Erkus (アーカス) を開発した⁶⁾。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。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ドメイン (Forkhead-associated 2 domain, FHA2 domain) を用いて Erkus を設計されている。なお、ERK については、ホルモンなどの外部刺激によって核内に移行することが既に知られている。核内に入った ERK は核内でタンパク質リン酸化を生起し、細胞増殖に必要な遺伝子発現を制御すると考えられているが、核

内の ERK の活性化についての動態は明らかではない。著者らは Erkus に更に核内局在アミノ酸配列と核外局在アミノ酸配列をそれぞれ連結し (それぞれ Erkus-nuc, Erkus-cyto), これらを用いて核内・核外での ERK によるタンパク質リン酸化の動態を可視化計測した (Fig. 6a)。この結果、ERK は細胞質ではホルモンなど外部刺激依存的に一過的に活性化されることが分かった。一方の核内では、ERK は外部刺激に応答して持続的に活性化されることが明らかになった (Fig. 6b)。

上述の ERK に加えて、同じくセリン・スレオニンキナーゼの Akt の蛍光プローブ (Aktus, アクタス)⁷⁾、チロシンキナーゼの Src の蛍光プローブ (Srcus, サーカス)⁸⁾⁹⁾ が既に著者の研究室で開発されている。Aktus はゴルジ体膜やミトコンドリア膜などオルガネラ膜での Akt の活性化動態を初めて明らかにし、Srcus は細胞膜に存在する数十ナノメートル程度のドメイン (lipid raft) における Src の活性化動態について新しい知見を与えた。

4 酵素工学に基づく一酸化窒素の超高感度蛍光プローブ

一酸化窒素 (nitric oxide, NO) は、1987 年に血管内皮

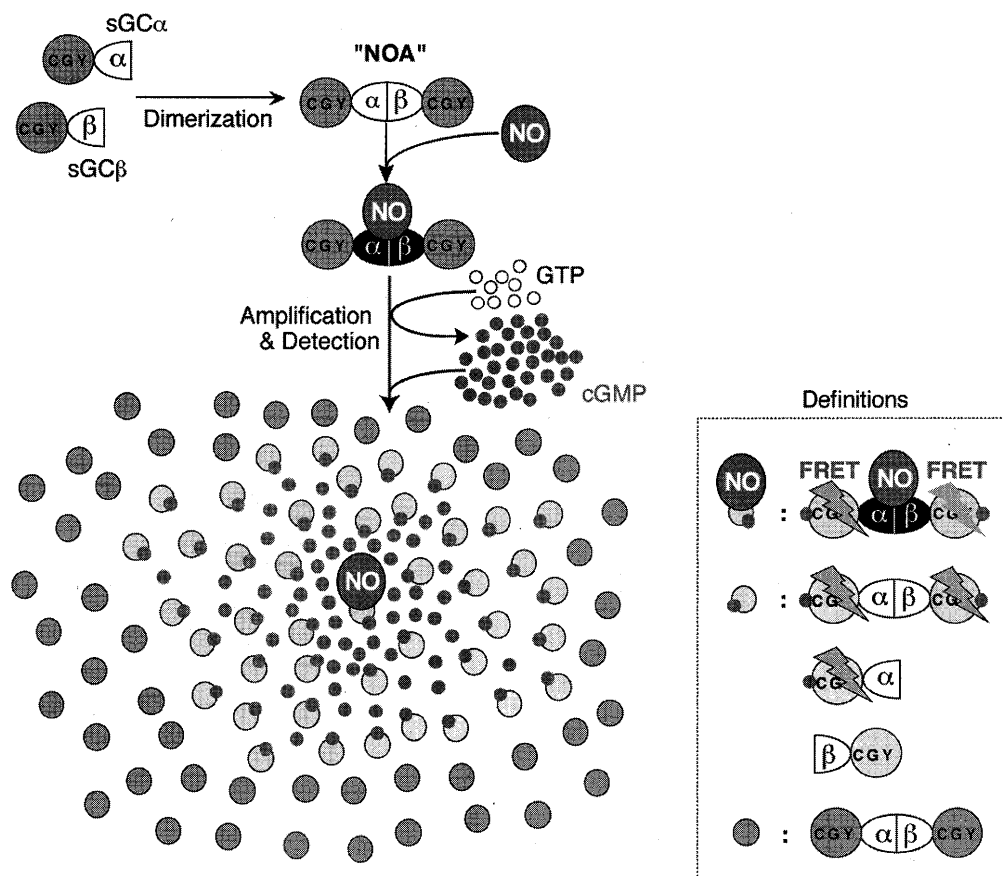


Fig. 7 Principle of an amplifier-coupled fluorescent NO indicator, named "NOA"

sGCα-CGY and sGCβ-CGY are spontaneously associated to form a matured heterodimer, that is, NOA-1. NOA binds with NO and generates cGMP at the rate of 3000~6000 molecules/min. Thus generated cGMP binds to the CGY domain in NOA make NOA emit a FRET signal. Approximately 99.9% of cGMP molecules thus generated diffuse and bind to NO-free NOA. As a result, even a single NO molecule can trigger a large number of NOA to emit FRET signals. Even if sGCα-CGY and sGCβ-CGY exist as monomers, the monomers also emit FRET signals upon binding with generated cGMP.

由来の血管弛緩因子であることが報告されて以来、その生理活性物質としての役割が次々に見いだされている。著者らは生きた細胞内で生起するNOの動態を可視化計測する超高感度の遺伝子コード型蛍光プローブ (NOA, ノア) を開発した (Fig. 7)¹⁰⁾。NOAはNOと結合して活性化する酵素 (可溶性グアニル酸シクラーゼ, sGC) を活用して開発されている。NOAとは "fluorescent indicator for NO with a signal amplifier" の意味である。sGCはα、β-サブユニットから成る二量体であり、1分子のNOを数千分子のセカンドメッセンジャー (サイクリックグアノシン3',5'-一リン酸, cGMP) に増幅・変換する酵素である。sGCの両サブユニットに、著者らが開発したFRETに基づくcGMP蛍光プローブ (CGY) (Fig. 8)¹¹⁾を連結した。これにより、NOとの結合によりsGC部位から生成したcGMPをCGY部位で蛍光シグナルとして検出できることになる。このsGCとCGYのハイブリッドタンパク質が新しい蛍光プローブNOAである。重要なのは、大量に生成

されたcGMPは、NOと結合したNOAのCGY部位はもちろんのこと、NOと結合していないNOAのCGY部位にも結合しFRETに基づく蛍光シグナルを与えることである。酵素工学に基づく新しい原理のため、NOAは細胞内で生起するサブナノモル濃度領域のNOの時空間動態を可視化計測する超高感度の蛍光プローブとなる。いったん増加したNO濃度が減少に転じるとNOAのsGC部位の酵素活性が消失するとともに、細胞内のホスホジエステラーゼによりcGMPが急速に加水分解される。したがって、NOAは応答可逆性を示し、細胞内での複雑なNO濃度変動も可視化計測できる (Fig. 9)。感度、可逆性の両面において既存の有機蛍光プローブをはるかにしのぐNOAは、従来の研究手法では明らかにできなかった細胞内での生理的なNO動態の可視化計測を実現した。

なお、著者らは分子型のNOプローブ "NOA" の原理を活用して、細胞型のNOプローブ (Piccell, ピクセル) を開発し、神経細胞や内皮細胞から放出されるピコモル濃

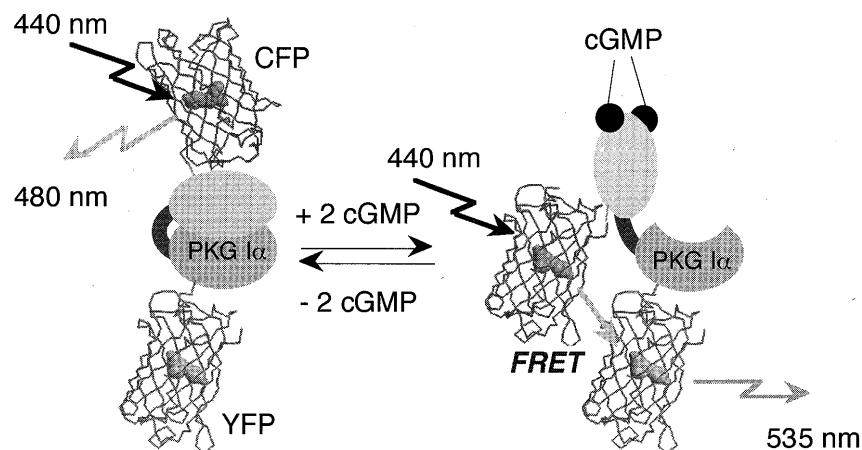


Fig. 8 Principle of a cGMP indicator, CGY

CGY contains major part of cGMP-dependent protein kinase ($\text{PKG}\alpha_{\Delta 1-47}$) having two cGMP-binding sites and thus binds with two molecules of cGMP. The CGY bound with two cGMP molecules emits a fluorescence signal based on FRET from CFP to YFP, which are respectively attached at N and C termini of $\text{PKG}\alpha_{\Delta 1-47}$ in CGY.

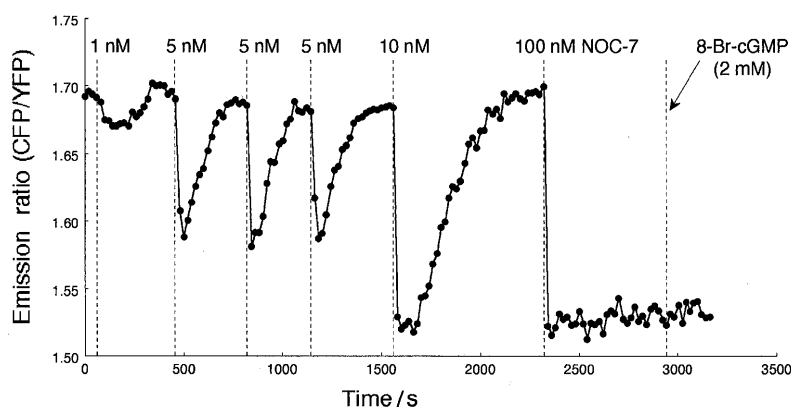


Fig. 9 Time course of the CFP/YFP emission ratio of NOA expressed in living cells upon stimulation with various concentrations of a NO donor, NOC-7

度の NO 動態の超高感度可視化計測を実現した（検出限界は 20 pM）。この新しい細胞型蛍光プローブ Piccell を用いて、ネットワークを形成した神経細胞が神経伝達依存的に 100 pM 程度の NO を周期的に放出していることを見いだした¹²⁾。

5 ま と め

著者は生きた細胞内でのシグナル伝達において重要な役割を果たす生体分子の動態を可視化計測する遺伝子コード型蛍光プローブを開発してきた。この新しい蛍光プローブは、既存の研究手法では得ることのできない細胞内の分子の時空間情報を計測する新しい研究ツールとして世界中で利用され始めている。まさに「見えないものを見えるようにする」研究と言えよう。このような技術は、基礎生命科学研究はもちろんのこと、薬物候補物質の高速スクリーニングや薬理評価等においても key technology になると期待

されている。また、本稿で記したバイオイメーjing技術は、細胞のみならず、線虫やゼブラフィッシュなどの透明なモデル動物への応用も既に始まっている。マウスなど動物個体での分子過程の可視化計測についても既に基礎研究が展開されており、今後の飛躍的な進展が期待されている。著者らの蛍光プローブはいずれも、目的の生体分子を高い選択性で認識し、その分子認識に引き続いて蛍光シグナルが生起するようにデザインされている。更に、細胞内の局所情報を得るべく局在化配列をつなぎ変えたり、時には超高感度検出を実現すべく酵素反応を組み込んだりして蛍光プローブを自由自在に設計・構築する。そして開発したプローブを使って生命を明らかにする。このように、分子を自在に扱う化学と生命科学との境界領域の楽しさを実感しながら日々研究している。

文 献

- 1) G. Grynkiewicz, M. Poenie, R. Y. Tsien : *J. Biol. Chem.*, **260**, 3440 (1985).
- 2) M. Sato, Y. Ueda, T. Takagi, Y. Umezawa : *Nature Cell Biol.*, **5**, 1016 (2003).
- 3) R. Y. Tsien : *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 509 (1998).
- 4) M. Sato, Y. Ueda, Y. Umezawa : *Nature Methods*, **3**, 797 (2006).
- 5) M. Sato, T. Ozawa, K. Inukai, T. Asano, Y. Umezawa : *Nature Biotechnol.*, **20**, 287 (2002).
- 6) M. Sato, Y. Kawai, Y. Umezawa : *Anal. Chem.*, **79**, 2570 (2007).
- 7) K. Sasaki, M. Sato, Y. Umezawa : *J. Biol. Chem.*, **278**, 30945 (2003).
- 8) T. Hitosugi, K. Sasaki, M. Sato, Y. Suzuki, Y. Umezawa : *J. Biol. Chem.*, **282**, 10694 (2007).
- 9) T. Hitosugi, M. Sato, K. Sasaki, Y. Umezawa : *Cancer Res.*, **67**, 8139 (2007).
- 10) M. Sato, N. Hida, Y. Umezawa : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 14515 (2005).
- 11) M. Sato, N. Hida, T. Ozawa, Y. Umezawa : *Anal. Chem.*, **72**, 5918 (2000).
- 12) M. Sato, T. Nakajima, M. Goto, Y. Umezawa : *Anal. Chem.*, **78**, 8175 (2006).

Methods to Visualize Molecular Processes in Living Cells Based on Genetically Encoded Fluorescent Indicators

Moritoshi SATO¹

¹ Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo, 3-8-1, Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8902

(Received 29 November 2007, Accepted 31 January 2008)

We have been developing fluorescent indicators for a variety of molecular processes in living cells, including small molecules, known as second messengers, and protein phosphorylation reactions. This is because fluorescence imaging could be the most powerful technique available for observing the spatial and temporal dynamics of molecular processes in living cells, if fluorescent indicators for the relevant molecular processes become available. We have visualized the spatial and temporal dynamics of these molecular events in single living cells using our fluorescent indicators. The present fluorescent indicators are becoming an indispensable tool for understanding the complex mechanism of cellular signaling and for screening pharmaceuticals that inhibit or promote molecular processes in a cell.

Keywords : fluorescence imaging ; cellular signaling ; second messengers ; lipids ; protein phosphorylation ; fluorescent indicators ; fluorescence resonance energy transfer ; fluorescent proteins.