

動物個体内の生体分子を可視化する機能性発光タンパク質の開発

Development of Functional Luminescent Proteins for Visualizing Biomolecules in  
Living Subjects

(日本化学会推薦)

代表研究者 東京大学 小澤岳昌 University of Tokyo Takeaki Ozawa  
協力研究者 東京大学 菅野 憲 University of Tokyo Akira Kanno  
協力研究者 東京大学 梅澤喜夫 University of Tokyo Yoshio Umezawa

Complicated proteolytic signalings in eukaryotic cells involve the programmed cell death, apoptosis. To visualize the apoptosis in living mice, we developed a bioluminescent indicator for high-throughput sensing and noninvasive real-time imaging of caspase activities in living cells and animals. Firefly luciferase connected with a substrate sequence of caspase-3 (Asp-Glu-Val-Asp) is cyclized by an intein DnaE (a catalytic subunit of DNA polymerase III). When the cyclic luciferase is expressed in living cells, the luciferase activity greatly decreases due to a steric effect. If caspase-3 is activated in the cells, it cleaves the substrate sequence embedded in the cyclic luciferase and the luciferase activity is restored. We demonstrated quantitative sensing of caspase-3 activities in living cells upon extracellular stimuli. Furthermore, the indicator enabled noninvasive imaging of the time-dependent caspase-3 activities in living mice. Although we demonstrate the usefulness of the present indicator showing caspase-3 activation, it should be emphasized that the present cyclic luciferase using the protein splicing can be applied to any proteases.

研究目的

生きた動植物個体内における生体分子の動態を解明することは、現在の生命科学研究において最も重要な課題の一つである。これまでの生化学的研究法では、特定時間における状態の記述しかできず、生体内で時々刻々と変化する現象を追跡することは困難であった。生体分子の時間変化を検出するためには、標的分子を特異的に認識し、電磁波に情報変換する“プローブ”の開発が必要である。申請者はこれま

で、二分した蛍光あるいは発光タンパク質をペプチド組み継ぎ反応(プロテインスプライシング)により再連結し、その発光能を回復させる新たなプローブ分子の概念を創案した。この概念を用いて、タンパク質間相互作用や細胞内タンパク質の動態を検出する、新規プローブ分子の開発を進めてきた。本研究では、発光タンパク質(luciferase)を利用した新たなプローブ分子の概念を創出し、プローブ分子の歪みを利用したペプチド切断酵素 Caspase-3 の活性化検出プローブの開発を目的とした。

## 研究経過

ペプチド切断酵素の一つ Caspase-3 は、プログラム細胞死(アポトーシス)の中心的な役割を担っている。動物個体内で機能する Caspase-3 の活性を低侵襲的に検出するプローブ開発を目的として、ルシフェラーゼを環状ペプチドにした新たな原理に基づくプローブを開発した。Firefly luciferase (Fluc)は、X線結晶構造解析によりN末とC末の2つの球状ドメインから成り、そのN末端とC末端は約 4nm 離れていることが知られている(図1参照)。一方、caspase-3 は DEVD の4アミノ酸を特異的に認識し、ペプチド結合を切断することが知られている。この DEVD4 アミノ酸を、Fluc のN末とC末に連結して、環状 luciferase を細胞内で合成する。環状化反応にはプロテインスプライシングを利用する。Luciferase のN末端とC末端に DEVD を挟んでスプライシングタンパク質(DnaEn と DnaEc)を連結することにより、細胞内で環状 luciferase が形成される。さらに 4nm 離れたN末とC末が僅か2nm のリンカーでスプライシングにより繋がるため、活性部位の立体構造に“ひずみ”が入り、luciferase の

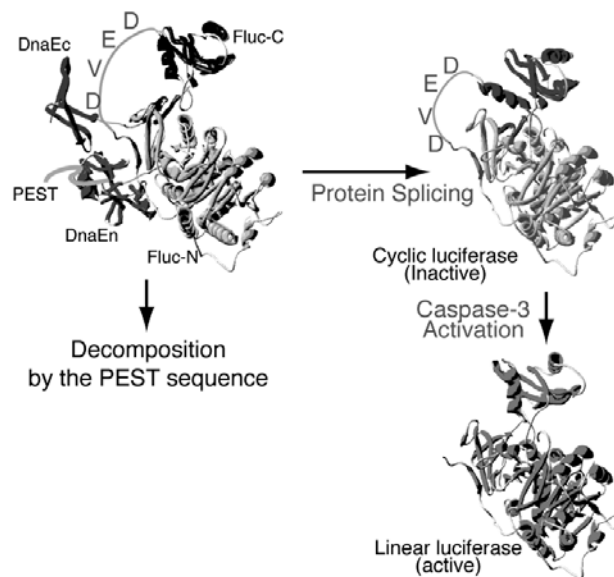


Fig. 1. Principle for monitoring activity of caspase-3 using cyclic firefly luciferase (Fluc). The C-terminal fragment of Fluc (dark gray) is connected with the N-terminal fragment of Fluc (light gray) using a protease substrate (DEVD). Flanking sides of the peptide are connected with C- and N-terminal fragments of DnaE (DnaEc in blue and DnaEn). To decompose the unspliced product, a PEST sequence is attached at the C-terminal end. When the fusion protein is expressed in the cytosol, the DnaEc interacts with DnaEn, and the fragment undergoes protein splicing, resulting in the production of inactive cyclic Fluc. When caspase-3 is activated in the cytosol, it cleaves the DEVD sequence and the Fluc restores its activity.

発光能は消滅する。この環状 luciferase を発現した細胞内で caspase-3 が活性化すると、DEVD が切断され、luciferase が瞬時に native form に戻る。従って luciferase の発光強度をシグナルとして検出することにより、caspase-3 活性化の時空間解析が可能になる。

環状 luciferase を形成するためのタンパク質をコードする遺伝子を作成した。DEVD 周辺のアミノ酸の長さおよびアミノ酸の種類を random mutagenesis により加え、100 種類以上の環状 luciferase の caspase-3 応答性を評価した。

その結果、caspase-3 認識配列 (DEVD) の直後に Gly を挿入したアミノ酸配列が、もっとも感度よく応答することがわかった。

次に Caspase-3 活性化に伴い、環状 luciferase が直鎖状の luciferase に変化していることを電気泳動により検証した。Luciferase が直鎖状になると泳動速度が少し速くなる。プローブ導入細胞にスタウロスポリン (STS) を添加・非添加した場合との比較から、確かに直鎖状 luciferase が形成されていることがわかった (図 2)。さらに二次元電気泳動と質量分析器 (MS/MS) による解析により、直鎖状の断片は caspase-3 の切断によるものであることを実証した。

次に、Caspase-3 の活性が定量評価できるかどうかを検証した。COS7 細胞に環状

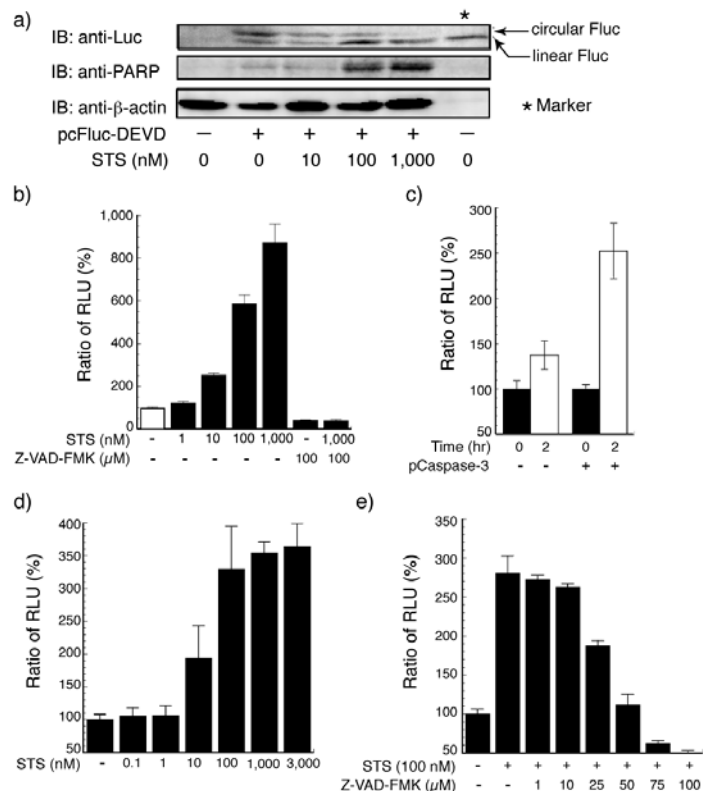


Fig. 2. In vitro characterization of the cyclic Fluc. (A) Western blot analysis of COS-7 cells transfected with pcFluc-DEVD for 48 h. The cells were treated with 1  $\mu$ M STS for 2 h and harvested. The activity of caspase-3 was evaluated by the digested PARP with anti-PARP antibody. As a reference for the amounts of the electrophoresed proteins,  $\beta$ -actin was stained with its specific antibody. (B) Quantitative analysis of the Fluc activities for STS and Z-VAD-FMK. After transfection of COS-7 cells with pcFluc-DEVD, the cells were treated with 100  $\mu$ M Z-VAD-FMK or vehicle (0.1% DMSO) for 1 h, and thereafter, stimulated with various concentrations of STS for 2 h. (C) Analysis of the Fluc activities in the caspase-3-deficient MCF-7 cells. MCF-7 cells were transfected with only pcFluc-DEVD (left) or both pcFluc-DEVD and pCaspase-3 (right). The cells were incubated for 48 h and the luminescence intensities were evaluated at the indicated times after stimulation with 100 nM STS. (D) Quantitative analysis of the Fluc activities for STS. After transfection of HeLa cells with pcFluc-DEVD, the cells were treated with various concentrations of STS for 2 h. (E) Quantitative analysis of the Fluc activities for Z-VAD-FMK. After transfection of HeLa cells with pcFluc-DEVD, the cells were treated with differing concentrations of Z-VAD-FMK or vehicle (0.1% DMSO) for 1 h, and thereafter, stimulated with various concentrations of STS for 2 h.

luciferase を発現させ、アポトーシスシグナルに伴う発光シグナル変化を評価した。Caspase 不活性化状態では、1well の培養細胞 ( $1 \times 10^5$  細胞) から単位時間 (1min) あたりの発光 (background 発光) が  $\sim 10,000$  au/min, かつ細胞内 caspase が活性化した時に background 発光の約 10 倍 ( $100,000$  au/min) の発光強度変化が起こるプローブであることがわかった(図2)。また発光強度は、STS 濃度依存的であること、Caspase-3 を含まない MCF7 細胞では、発光シグナルの上昇がないことを実証した。アポトーシス阻害剤である Z-VAD-FMK 存在下 STS を添加すると、Z-VAD-FMK の阻害活性を定量的に評価できることを実証した。以上、細胞内 caspase-3 を発光検出する環状 luciferase プローブおよび細胞の作成に成功した。

次に生きたマウス個体内の caspase-3 活性の低侵襲的イメージング法の開発を行った。プローブを発現した細胞をマウスの皮下に移植し、STS を腹腔に投与した時の発光シグナルを高感度 CCD カメラにより検出した。STS 刺激に伴い時間依存的に発光上昇し、2〜3時間後に発光シグナルが最大に到達することを示した。またそのシグナル変化は、バックグラウンド発光にくらべて発光強度が約5倍上昇することを実証した。

## 考察

Firefly luciferase のN末端とC末端をプロテインスプライシングで連結した、環状 luciferase を新たにデザインし、caspase が活性化した時に background 発光の約 10 倍 ( $100,000$  au/min) の発光強度変化が起こるプローブを開発した。開発したプローブは、マルチプレートウェルを利用したアポトーシス誘導あるいは阻害剤のハイスループットスクリーニングに利用可能である。さらにプローブを発現した細胞をマウスの皮下に移植し、STS を腹腔に投与した時の発光シグナルを高感度 CCD カメラにより検出した。STS 刺激に伴い時間依存的に発光上昇し、2〜3時間後に発光シグナルが最大に到達することを示した。またそのシグナル変化は、バックグラウンド発光にくらべて発光強度が約5倍上昇することを実証した。以上の結果は、マウス個体内の caspase-3 活性を、低侵襲的に可視化できることを示している。今後は、Caspase の活性化検出プローブの有用性を示すために、プローブをマウス全身および臓器特異的に発現する動物個体の作製が重要となる。このような動物が作製されれば、薬物の作用を動物1個体で時間変化を追跡しつつ評価が可能となる。現在は、プローブをマウス個体の臓器に発現させるためのアデノウィルスの作製が終わり、培養細胞とマウス個体を利用して基礎評価を進めている。またプローブを全身に発現するトランスジェニックマウス作製を開始した。マウス個体を利用した、より簡便な薬物スクリーニング系を今後開発する予定

である。

#### 研究発表

##### 口頭発表

1. 小澤岳昌, 「生きた細胞と生物個体内の生体分子イメージング」, 名古屋大学公開セミナー, 愛知, 2007年12月.
2. 小澤岳昌, 「生体分子を可視化する分子プローブの開発と応用」, 日本分光学会・生細胞分光部会, 神奈川, 2007年12月.
3. T. OZAWA, “Protein engineering for biomolecular imaging,” Tateshina Conference 2007, Nagano, 2007年11月.
4. 小澤岳昌, 「光タンパク質でひろがる生理機能イメージング」, 学習院大学生命分子科学シンポジウム, 東京, 2007年10月.
5. 小澤岳昌, 「生体分子を光センシングする機能性タンパク質」, 化学センサー研究懇談会, 徳島, 2007年9月.
6. 小澤岳昌, 「創薬に向けた生体分子イメージングの新たな技術開発」, ゲノム創薬フォーラムキーテクノロジー2007, 東京, 2007年9月.
7. 小澤岳昌, 「細胞と生物個体内の生体分子イメージング法」, 第9回分子ダイナミック分光ワークショップ, 静岡, 2007年7月.
8. 小澤岳昌, 「レポータータンパク質の再構成法を利用した生きた生物個体内の生体分子イメージング」, 第40回日本発酵生物学会, 福岡, 2007年5月.
9. T. Ozawa, “Visualization of organelle-localized proteins in living cells using split-reporter reconstitution analysis,” VII European Symposium of the Protein Society, Stockholm, Sweden, 2007年5月.
10. T. Ozawa, “Imaging biomolecules in living cells and animals using split-reporter reconstitution analysis,” 1<sup>st</sup> International Symposium on Nanomedicine, Aichi, 2007年4月.

##### 誌上発表

1. Kanno, Y. Umezawa and T. Ozawa, “Cyclic Luciferase for Real-Time Sensing of Caspase-3 Activities in Living Mammals.” *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 7595-7599 (2007).