

戦略的国際科学技術協力推進事業（日本－英国 BBSRC 研究交流）

1. 研究課題名：「生細胞内のタンパク質間相互作用を検出するかく技術革新と解析」
2. 研究期間：平成 21 年 4 月～平成 24 年 3 月
3. 支援額： 総額 17,241,000 円
4. 主な参加研究者名：

日本側（研究代表者を含め 6 名までを記載）

	氏名	所属	役職
研究代表者	小澤 岳昌	東京大学大学院理学系研究科	教授
研究者	菅野 憲	東京大学大学院理学系研究科	助教
研究者	竹内 雅宜	東京大学大学院理学系研究科	助教
研究者	服部 満	東京大学大学院理学系研究科	博士研究員
研究者	比田 直輝	東京大学大学院理学系研究科	博士研究員
研究者	長岡 靖崇	東京大学大学院理学系研究科	博士課程
参加研究者 のべ 10 名			

英国側（研究代表者を含め 6 名までを記載）

	氏名	所属	役職
研究代表者	M. White	School of Biological Sciences, University of Liverpool	Prof.
研究者	M. Awais	School of Biological Sciences, University of Liverpool	Dr.
研究者	D. Spiller	School of Biological Sciences, University of Liverpool	Dr.
研究者	N. Jones	School of Biological Sciences, University of Liverpool	Mr.
参加研究者 のべ 4 名			

5. 研究・交流の目的

日本側の研究代表者である小澤は、タンパク質再構成法という独自の技術を開発し、タンパク質化学と分子機能イメージングを専門としている。一方英国側の研究代表者である White 博士は、NF- κ B シグナルの蛍光イメージングと数理モデル解析を専門としている。本事業では、日英間の相互訪問を通じて、各々の研究室が真価を発揮しうる技術を融合することで、生命を包括的かつ体系的に捉える数理モデル解析研究に昇華させることを目的とする。さらに、長期持続可能な日英研究交流の基盤形成の一環として、若手研究者・大学院生の交換研修ならびに日英両国でのミニシンポジウムまたはワークショップの開催を毎年度実施する。

6. 研究・交流の成果

6-1 研究の成果

科学技術の進展では、（1）生細胞内タンパク質間相互作用解析技術の開発、（2）NF- κ B/I κ B タンパク質間相互作用を検出する発光プローブの開発、（3）ネクローシス検出のためのカルパイン発光プローブの開発、を進めてきた。また双方が議論を重ねる段階で、新たな技術開発（4）光制御可能なキナーゼの開発と細胞内シグナルの制御、に着手し研究が大きく進展している。以下、具体的な成果の要点を記す。

生細胞内タンパク質間相互作用解析技術の開発（1）では、細胞内でおこる 2 組のタンパク質間相互作用を、2 種類のルシフェラーゼの波長の異なる発光で同時イメージングする技術を開発した。タンパク質間相互作用を可逆的かつリアルタイムにイメージングすることができること、また生物発光を利用するため相互作用の程度を定量

できる利点を有している。Smads 間相互作用等を例に、様々な細胞内タンパク質間相互作用の可視化が可能であることを実証した。

このルシフェラーゼ再構成法を利用したタンパク質間相互作用検出プローブを利用して、NF- κ B/I κ B タンパク質間相互作用を検出する発光プローブの開発（2）を遂行した。NF- κ B シグナルの数理モデル解析は、M. White 教授のグループがターゲットとしている。NF- κ B と I κ B 各々にルシフェラーゼプローブを連結し、プローブを細胞に発現させ TNF α 刺激すると、発光が大きく減少することを実証した。現在、プローブの細胞内発現量をコントロールするために、プロモーターを含めたベクターを作製し実験条件の検討を進めている。

また、ネクローシス検出のためのプローブの開発（3）を行った。カルパイン活性をルシフェラーゼの発光を利用して検出するプローブを開発した。カルパインの基質となるアミノ酸配列 (LGS₄HEV) を、ルシフェラーゼの N 末端と C 末端に挿入した。プローブを細胞内に発現させ、イオノフォア A23187 で刺激すると、24 時間後に約 3 倍の発光値を示した。また、カルパインの阻害剤 MDL28170 を添加すると、阻害剤濃度依存的に発光値が減少することから、プローブがカルパイン特異的に応答していることが解った。本プローブは数理モデル解析に応用することができる。

研究の発展課題について、（4）光制御可能なキナーゼの開発と細胞内シグナルの制御法に関する研究が想起した。細胞内の酵素活性を時間軸に対して自在に制御し、そのアウトプットをモニターして、複数の時系列データからモデル化する試みである。実際にキナーゼ活性の光制御系の開発に成功し、基質のリン酸化や細胞遊走などを制御できることを実証した。開発した方法は、セリン・スレオニンリン酸化酵素の光制御を実証した初めての例であり、新たな生命分析法を創出することから今後の大きな展開が期待できる。

上記成果を今後も引き続き展開し発展させるために、細胞内シグナル多点情報に基づく精密な数理解析モデル、及び細胞内シグナルの光制御を利用した複雑なシグナルの人為的制御を連携して進める予定である。

6-2 人的交流の成果

日英間の相互訪問を通じて、各々の研究室が特異とする領域を理解し、技術融合を行った。数理モデル解析研究の基盤となる細胞内シグナルイメージング技術を確認し、モデルの精密化を進めてきた。特に、若手研究者・大学院生は、交換研修ならびに日英両国でのミニシンポジウムとワークショップの開催を通じて、学術に対する広い見識を習得させることができた。具体的には、若手研究者および若手学生の海外における研究討論、及び若手学生（博士課程）に短期海外滞在の機会を設けることにより、海外研究者のキャリアパスに対する考え方や研究に対する motivation など討論する機会を設定した。大学院教育の一環として行われている英語による授業や、外国人講師による発表練習、研究室内における英語の討論など、これまでの教育の成果を実践する優れた機会となった。

日本における国際シンポジウムの 2 度の主催、及びリバプール大学における 2 度の NF- κ B training sessions & symposium の参加等により、研究交流メンバーはもとより関連する研究者と密なディスカッションを行い、最先端の技術について情報収集するとともに、近未来の本研究領域の動向について討論できたことは大きな成果である。

また成果発表に加え、シンポジウムの前後にトレーニングコースを開催した。日本側の若手教員および学生は、リバプール大学で蛍光イメージング技術を習得し、また日本では独自の技術である生物発光イメージングの講習会を開催した。若手教員とポスドクが実演指導することにより、リバプール大学への技術移転を指向した闊達な意見交換が行われた。

7. 主な論文発表・特許等（5件以内）

相手国側との共著論文については、その旨を備考欄にご記載ください。

論文 or 特許	・論文の場合： 著者名、タイトル、掲載誌名、巻、号、ページ、発行年 ・特許の場合： 知的財産権の種類、発明等の名称、出願国、出願日、 出願番号、出願人、発明者等	備考
論文	N. Hida, M. Awais, M. Takeuchi, N. Ueno, M. Tashiro, T. Singh, M. Hayashi, K. Ohmiya and T. Ozawa, High-Sensitivity Real-Time Imaging of Dual Protein-Protein Interactions in Living Subjects Using Multicolor Luciferases. <i>PLoS ONE</i> , 4 , e5868 (2009).	共著論文
論文	M. Awais and T. Ozawa “Illuminating Intracellular Signaling and Molecules for Single Cell Analysis”, <i>Mol. Biosyst.</i> , 7 , 1376-1387 (2011).	共著論文
論文	M Takeuchi, Y. Nagaoka, T. Yamada, H. Takakura and T. Ozawa, Ratiometric Bioluminescence Indicators for Monitoring Cyclic AMP in Live Cells Based on Luciferase-Fragment Complementation. <i>Anal. Chem.</i> , 82 , 9306-9313 (2010).	
論文	N. Misawa, A.K.M. Kafi, M. Hattori, K. Miura, K. Masuda and T. Ozawa, Rapid and high-sensitivity cell-based assays of protein-protein interactions using split click beetle luciferase complementation: An approach to the study of G protein-coupled receptors. <i>Anal. Chem.</i> , 82 , 2552-2560 (2010).	
論文	Visualization and Quantitative Analysis of G Protein-Coupled Receptor- β -Arrestin Interaction in Single Cells and Specific Organs of Living Mice Using Split Luciferase Complementation. H. Takakura, M. Hattori, M. Takeuchi and T. Ozawa, <i>ACS Chem. Biol.</i> , in press.	