

小澤 岳 昌 (助教授)(2005 年 4 月 1 日着任)

A-1) 専門領域：分析化学、生物物理

A-2) 研究課題：

- a) 発光タンパク質を利用したタンパク質オルガネラ移行の低侵襲的動態解析法に関する研究
- b) 細胞内オルガネラ局在タンパク質の網羅的同定法の開発

A-3) 研究活動の概略と主な成果

- a) 生きている動植物個体内では、生体分子の濃度あるいは活性がダイナミックに変動し、相互にネットワークを構築して細胞そして個体としての高次機能を発現している。この生体分子の機能を解析するためには、生きた動植物個体に低侵襲的な「生体分子イメージング」のための基盤技術が必要である。我々は、タンパク質再構成系というペプチド結合の切断と再連結に基づくレポータータンパク質を開発し、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プローブ開発を進めてきた。本年度は発光タンパク質の一つ *renilla luciferase* (*Rluc*) の切断位置を決定し、*split Rluc* がスプライシング現象により再構成され、発光能が回復することを見出した。*Split Rluc* を用いて、標的タンパク質が細胞核内に移行した時、*Rluc* がスプライシングにより再構成し、発光検出可能なプローブを開発した。このプローブを用いて、ストレスによるグルココルチコイドリセプターの核内移行、タンパク質のリン酸化やコレステロール濃度変化によるタンパク質核内移行検出法を開発した。
- b) 真核細胞の重要な特色の一つは、膜で囲まれた細胞内オルガネラが存在することである。オルガネラは高次機能を有するタンパク質を膜内に取り込み、オルガネラ特有の機能を発揮する。このオルガネラの機能を解明するためには、オルガネラに含まれるタンパク質を網羅的に同定することが必要である。本年度は、細胞内小胞に輸送されるタンパク質を網羅的に確度良く同定する方法の開発に成功した。100万種以上の遺伝子ライブラリーから細胞内小胞に移行するタンパク質のみを高速スクリーニングできることを実証した。1,300クローンの遺伝子解析を行い、既知の細胞内小胞移行タンパク質に加え、27種の新規細胞内小胞移行タンパク質を同定した。開発した方法はペルオキシソームや核等他の細胞内オルガネラにも応用可能な一般性を有する。

B-1) 学術論文

S. B. KIM, T. OZAWA and Y. UMEZAWA, "Genetically Encoded Stress Indicator for Noninvasively Imaging Endogenous Corticosterone in Living Mice," *Anal. Chem.* **77**, 6588–6593 (2005).

S. B. KIM, R. TAKAO, T. OZAWA and Y. UMEZAWA, "Quantitative Determination of Protein Nuclear Transport Induced by Phosphorylation or by Proteolysis," *Anal. Chem.* **77**, 6928–6934 (2005).

S. B. KIM, T. OZAWA and Y. UMEZAWA, "A Genetically Encoded Indicator for Assaying Bioactive Chemicals that Induce Nuclear Transport of Glucocorticoid Receptor," *Anal. Biochem.* **347**, 213–220 (2005).

T. OZAWA, K. NISHITANI, Y. SAKO and Y. UMEZAWA, "A High-Throughput Screening of Genes that Encode Proteins Transported into the Endoplasmic Reticulum in Mammalian Cells," *Nucleic Acids Res.* **33**, e34 (2005).

T. OZAWA, "Methods of Analysis for Protein Dynamics in Living Cells Based on Protein Splicing," *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **78**, 739–751 (2005).

B-3) 総説、著書

T. OZAWA and Y. UMEZAWA, “Inteins for Split-Protein Reconstitutions and Their Applications,” in *Nucleic Acids and Molecular Biology*, M. Belfort, ed., Springer-Verlag; Berlin, **Vol.16**, 307–323 (2005).

Y. UMEZAWA, T. OZAWA, M. SATO, H. INADERA, S. KANEKO, M. KUNIMOTO and S. HASHIMOTO, “Methods of Analysis for Chemicals that Disrupt Cellular Signaling Pathways: Risk Assessment for Potential Endocrine Disruptors,” *Environ. Sci.* **12**, 49–64 (2005).

小澤岳昌,「ミトコンドリア局在タンパク質を同定するプローブ分子」, 化学測定の辞典 梅澤喜夫編 朝倉書店 (2005) .

B-4) 招待講演

小澤岳昌,「プロテインスプライシングを用いた新規発光タンパク質の創出とバイオセンシング」, 第5回コンビナトリアル・バイオエンジニアリング研究会, 大阪, 2005年1月.

小澤岳昌,「プロテインスプライシングを用いたタンパク質再構成システムについて」, 第7回生命化学研究会シンポジウム, 仙台, 2005年1月.

小澤岳昌,「プロテインスプライシングを利用した新規リポータータンパク質の開発とその応用」, 第125年会日本薬学会, 東京, 2005年3月.

小澤岳昌,「プロテインスプライシングが拓く生体分子の時空間解析法」, 第18回九州分析化学若手の会春の講演会, 福岡, 2005年5月.

小澤岳昌,「発光プローブを用いた分子イメージングの新たな展開」, 第15回バイオイメージング学会学術総会, 東京, 2005年10月.

小澤岳昌,「スプリットルシフェラーゼを用いた生体内分子イメージング」, 日本分子生物学会第28回年会, 福岡, 2005年12月.

B-6) 受賞、表彰

小澤岳昌, 日本化学会進歩賞 (2004).

小澤岳昌, 文部科学大臣表彰若手科学者賞 (2005).

B-6) 学会および社会的活動

学会の組織委員

東京コンファレンス2004実行委員 (2004).

日本化学会年会プログラム編成委員(2004-).

B-10) 外部獲得資金

住友財団基礎科学研究助成,「蛍光共鳴エネルギー移動による細胞内蛋白質間相互作用の可視化と細胞機能発現の解析」, 小澤岳昌 (1998年-2000年).

笹川科学研究助成,「インシュリン情報伝達系に基づく生理活性物質の化学選択性評価法の研究」, 小澤岳昌 (1999年-2000年).

日産科学振興財団奨励研究,「糖輸送蛋白質の蛍光プローブによる可視化に関する研究」, 小澤岳昌 (1999年-2001年).

奨励研究(A),「インシュリン情報伝達系に基づく生理活性物質の化学選択性評価法の創製」,小澤岳昌 (1999年-2001年).
武田科学振興財団一般研究奨励,「新規蛍光プローブ分子を用いた細胞内タンパク質ネットワークの網羅解析法」,小澤岳昌 (2002年-2004年).

若手研究(A),「プロテインスプライシング反応を利用した機能性プローブ分子の開発と応用」,小澤岳昌 (2003年-2006年).
科学技術振興機構さきかけ研究,「タンパク質の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」,小澤岳昌 (2003年-2006年).

旭硝子財団奨励研究助成,「動物個体内での遺伝子発現を時空間解析する光プローブの開発」,小澤岳昌 (2004年-2006年).

C) 研究活動の課題と展望

蛍光・発光タンパク質のペプチド結合の切断と再連結を利用したタンパク質再構成系は,未知の生命現象を解明するための新たな基盤技術として,多くの応用可能性を有している。このタンパク質再構成系を更に展開し,新たな生体分子を標的とした機能性蛍光・発光タンパク質レポーターを開発する。開発するレポーターを用いて,動物個体に低侵襲的な生体分子イメージングを可能にする。生体分子及び生体内現象は際限なく存在するため,ターゲットとしての重要性,一般性,プローブ開発における独創性や実現可能性を総合的に判断し,標的分子を特定しその分子イメージング法の確立を目指す。平成17年12月よりグループに加わった竹内助手とともに,植物個体の分子イメージングのための基盤技術を新たに開発する。