

小澤 岳 昌 (准教授) (2005年4月1日～2007年9月30日)*)

A-1) 専門領域：分析化学、生物物理

A-2) 研究課題：

- a) ミトコンドリア mRNA の可視化検出法に関する研究
- b) 細胞内小分子の可視化検出法に関する研究
- c) ペプチド結合切断酵素活性の可視化検出法に関する研究

A-3) 研究活動の概略と主な成果

- a) 生きた細胞内ミトコンドリアで機能する RNA を、塩基配列特異的に可視化する蛍光プローブを開発した。標的とする mRNA 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。ND6 mRNA の選択的な認識を目的として、RNA 結合タンパク質 Pumilio の変異体を作製した。ND6 mRNA 配列選択的なプローブの認識を、ゲルシフトアッセイにより実証した。このプローブを用いて、生きた単一のミトコンドリア内における ND6 mRNA の局在とその動態を、蛍光顕微鏡により観察し明らかにした。細胞内在性の mRNA を可視化できる新たな原理に基づくプローブであり、細胞内 RNA の機能解析の進展が期待できる。
- b) 植物個体やツメガエル卵は自家蛍光が強いため、蛍光プローブを用いた生体分子観察が容易ではない。細胞内情報伝達物質の一つ、cyclic guanosine monophosphate (cGMP) を標的分子として、植物個体とツメガエル卵で機能する cGMP を可視化するための生物発光プローブを開発した。生きた培養細胞を用いて、開発したプローブが cGMP を高感度かつ可逆的に可視化できることを実証した。cGMP プローブを発現する遺伝子導入シロイヌナズナを作製した。外界環境変化に応答して、シロイヌナズナ細胞内の cGMP 濃度が上昇することを見いだした。
- c) 生物発光タンパク質 (ルシフェラーゼ) の N 末端と C 末端を連結し、環状構造を有する新たな発光プローブの概念を創出した。ルシフェラーゼの N 末端と C 末端をプロテインスプライシングにより連結した。この環状ルシフェラーゼは発光能が失われていることを確認した。次にペプチド切断酵素 (caspase-3) を作用させると環状ルシフェラーゼの一部が切断され、発光能が回復することを明らかにした。この環状ルシフェラーゼは、マウス個体内で機能する caspase-3 の活性を低侵襲的に可視化する優れたプローブとなることを実証した。

B-1) 学術論文

A. KANNO, Y. YAMANAKA, H. HIRANO, 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).

T. OZAWA, Y. NATORI, M. SATO and Y. UMEZAWA, "Imaging Dynamics of Endogenous Mitochondrial RNA in Single Living Cells," *Nat. Methods* **4**, 413–419 (2007).

S. B. KIM, A. KANNO, T. OZAWA, H. TAO and Y. UMEZAWA, "Nongenomic Activity of Ligands in the Association of Androgen Receptor with Src," *ACS Chem. Biol.* **2**, 484–492 (2007).

T. OZAWA, Y. NATORI, Y. SAKO, H. KUROIWA, T. KUROIWA and Y. UMEZAWA, "A Minimal Peptide Sequence That Targets Fluorescent and Functional Proteins into the Mitochondrial Intermembrane Space," *ACS Chem. Biol.* **2**, 176–186 (2007).

S. B. KIM, T. OZAWA, H. TAO and Y. UMEZAWA, “A Proinflammatory Cytokine Sensor Cell for Assaying Inflammatory Activities of Nanoparticles,” *Anal. Biochem.* **362**, 148–150 (2007).

M. TAKEUCHI and T. OZAWA, “Methods for Imaging and Analyses of Intracellular Organelles Using Fluorescent and Luminescent Proteins,” *Anal. Sci.* **23**, 25–29 (2007).

B-3) 総説、著書

T. OZAWA and Y. UMEZAWA, “A Genetic Method to Identify Mitochondrial Proteins in Living Mammalian Cells,” *Methods Mol. Biol.* **390**, 119–130 (2007).

T. OZAWA and Y. UMEZAWA, “Identification of Proteins Targeted into the Endoplasmic Reticulum by cDNA Library Screening,” *Methods Mol. Biol.* **390**, 269–280 (2007).

C. WEI, M. YAMOTO, W. WEI, Z. ZHAO, K. TSUMOTO, T. YOSHIMURA, T. OZAWA and Y. J. CHEN, “Genetic Nanomedicine and Tissue Engineering,” *Med. Clin. North Am.* **91**, 889–898 (2007).

小澤岳昌, 「光プローブの新しいデザインと生体機能の可視化」*化学工業*, **58**, 860–864 (2007).

小澤岳昌, 「細胞の構造と機能：細胞内」*ナノテクのためのバイオ入門*, 荻野俊郎、宇理須恒雄編, 共立出版, 7–24 (2007).

B-4) 招待講演

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.

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.

T. OZAWA, “Protein engineering for biomolecular imaging,” Tateshina Conference 2007, Nagano, 2007年11月.

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.

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.

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.

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.

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回日本発生物学会, 福岡, 2007年5月.

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.

T. OZAWA, “Imaging biomolecules in living cells and animals using split-reporter reconstitution analysis,” 1st International Symposium on Nanomedicine, Aichi, 2007年4月.

T. OZAWA, “Genetic approaches to identifying mitochondrial proteins and their localization,” Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine, Seoul (Korea), 2007年2月.

小澤岳昌, 「細胞と個体内の生体分子イメージング」電気学会バイオ・マイクロシステム研究会, 名古屋, 2007年1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-7) 学会および社会的活動

学会の組織委員

日本化学会春季年回講演企画委員 (2007-).
東京コンファレンス実行委員 (2004-2006).
日本化学会年会プログラム編成委員 (2004-2005).

学会誌編集委員

日本分析化学会「ぶんせき」編集委員 (2007-).
日本化学会欧文誌編集委員 (2007-).

その他

基礎生物学研究所バイオイメージングアドバイザー委員 (2006-).

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がけ研究, 「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).

基盤研究(B), 「生体内情報伝達分子の可視化検出法に関する研究」小澤岳昌 (2006年-2008年).

特定領域研究, 「タンパク質立体構造情報に基づく生物発光プローブの開発」小澤岳昌 (2006-2008年).

新エネルギー・産業技術総合開発機構・産業技術研究助成事業, 「低侵襲的生体分子イメージングに向けた生物発光プローブの開発」小澤岳昌 (2006年-2008年).

山田科学振興財団, 「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」小澤岳昌 (2006年-2007年).

上原記念生命科学財団, 「ミトコンドリアRNAの可視化解析」小澤岳昌 (2006年-2007年).

科学技術振興機構さきがけ研究, 「不透明な生体内における細胞内小分子の可視化と光制御法の開発」小澤岳昌 (2007年-2010年).

C) 研究活動の課題と展望

蛍光・発光タンパク質の切断と再連結を利用したタンパク質再構成法は、我々が世界に先駆けて創出した方法であり、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様な応用可能性を有している。これまでに開発したRNAや細胞内小分子検出プローブは、従来困難であった生細胞内で機能する分子の「時空間情報」が得られる特徴を有する。今後は機構内外の共同研究を推進し、プローブを動植物組織・個体に応用した生体分子可視化技術の発展研究と、さらに生命現象の新たな発見を目指す。また生命の本質を理解する上で観る技術に加え、未知の生体分子を同定する技術、および特定の生体分子を制御する技術が今後重要になる。新たな独創的原理に基づいた生体分子のライブラリースクリーニング法や、生体分子の光制御法を開発し、研究をさらに展開し発展させる予定である。

*) 2007年10月1日東京大学大学院理学系研究科教授、分子科学研究所教授兼任