

戦略的国際共同研究プログラム(SICORP)

日本－フランス共同研究

終了報告書 概要

1. 研究課題名：「発蛍光プローブのデザイン・合成による蛋白質機能の細胞内局在履歴の「記憶型」イメージング」
2. 研究期間：平成 28 年 9 月～令和 2 年 3 月
3. 主な参加研究者名：
日本側チーム

	氏名	役職	所属	研究分担
研究代表者	菊地 和也	教授	大阪大学	研究の統括
研究参加者	堀 雄一郎	准教授	大阪大学	プローブの機能評価
研究参加者	蓑島 維文	助教	大阪大学	プローブの合成
研究参加者	Gao Jingchi	大学院生	大阪大学	プローブの合成
研究参加者	梅野 真帆	大学院生	大阪大学	プローブの機能評価
研究参加者	西浦 美也子	技術補佐員	大阪大学	プローブの機能評価
研究期間中の全参加研究者数			14名	

フランス側チーム

	氏名	役職	所属	研究分担
研究代表者	Jens Hasserodt	Professor	Ecole Normale Supérieure de Lyon	研究の統括
研究参加者	Mathieu Bordy	Ph.D. student	Ecole Normale Supérieure de Lyon	プローブの合成
研究参加者	Alix Tordo	Ph.D. student	Ecole Normale Supérieure de Lyon	プローブの合成
研究参加者	Jeremy Salaam	Ph.D. student	Ecole Normale Supérieure de Lyon	プローブの合成
研究参加者	Corentin Gondrand	Ph.D. student	Ecole Normale Supérieure de Lyon	プローブの合成
研究参加者	Damien Curton	Ingenieur d'Etude	Ecole Normale Supérieure de Lyon	プローブの機能評価
研究期間中の全参加研究者数			6名	

4. 国際共同研究の概要

タンパク質の局在の動的変化は、生理的機能を制御する重要な役割を担っている。その異常は、癌や糖尿病などの疾患の原因となることから、タンパク質の動態制御機構を明らかにすることは、生命科学及び医学分野で大きな課題となっている。このため、タンパク質の局在や発現を検出する技術の開発は、この課題を解決するうえで必要不可欠なものであるといえる。一方、タンパク質の過渡的な局在変化や、発現量の少ないタンパク質を生きた細胞で検出することは、現在でも困難な場合が多い。そこで、本研究では、日本とフランスの研究グループの国際共同研究を通じて、蛍光分子を用いたタンパク質の生細胞検出技術を開発する。日本のグループは、高速・高感度にタンパク質を検出することを目的としてタグタンパク質 (PYP タグ) を用いたタンパク質蛍光ラベル化技術を改変・開発した。

更に、糖尿病に関与する膜タンパク質の一種であるグルコース輸送体（GLUT4）の過渡的動態の高感度検出に成功した。フランスのグループは、酵素と反応すると蛍光性沈殿を生じるプローブを開発することで、タンパク質の生細胞における検出に成功した。これらのタンパク質検出技術の開発の一部は、日仏の学生が互いに相手側の研究室に一定期間滞在し実施したものであり、研究推進に大きな貢献を果たしている。以上の結果は、国際共同研究論文として成果発表する共に、特許出願及びスタートアップの起ち上げに繋がった。

5. 国際共同研究の成果

5-1 国際共同研究の学術成果および実施内容

本研究では、2つの異なるタンパク質検出技術を基盤として研究開発を実施した。一つは、日本のグループのタンパク質ラベル化技術である。この技術では、標的タンパク質を PYP タグと呼ぶタグタンパク質に融合させ、蛍光プローブでラベル化する。このプローブは、遊離状態では非蛍光性であるがラベル化反応に伴い蛍光強度が上昇する。もう一つは、フランスのグループで開発を進めている酵素反応と蛍光プローブを利用する技術である。この蛍光プローブは、初めは非蛍光性であるが、酵素と反応すると蛍光性の沈殿を生じる。この結果、酵素 1 分子当たり数千もの蛍光性分子を生み出すことになり、検出の高感度化に繋がる。

日本のグループは、PYP タグを特異的にラベル化する新しい蛍光プローブとして、CG1 を開発した。CG1 は、遊離状態ではほぼ非蛍光性で、PYP タグと結合すると 78 倍の蛍光増大を示し、高コントラストでのタンパク質のイメージングを可能にした。また、PYP タグに三つの変異を導入した PYP^{NQN} を創製した。PYP^{NQN} は、CG1 を用いてラベル化反応を行ったとき、野生型 PYP よりも CG1 と速く結合し、より明るい蛍光を発することが分かった。更に、この技術を用いることで、GLUT4 の局在とその過渡的変化をより明瞭に可視化できることが示された。以上の結果から、CG1 と PYP^{NQN} を組み合わせた技術は、タンパク質の高感度・高速検出を可能とし、多くのタンパク質の動態の可視化に有用なツールとなることが期待される。

フランスのグループは、BLAC と CPG2 という酵素にそれぞれ反応する二つのプローブを開発した。前者の酵素に対するプローブは安定であり、*in vitro* の実験において BLAC との反応に伴い固体蛍光を発することが示された。細胞実験においては、細胞膜外の酵素と反応し、蛍光が確認された。後者の酵素に対するプローブは、ほ乳類に内在的に存在する酵素とは反応せず、極めて特異的にバクテリア由来標的 CPG2 に反応することが示された。

この BLAC プローブを用いて GLUT4 の動態を調べたところ、GLUT4 の細胞膜移行を示す蛍光シグナルが観測された。この実験から、過渡的で少数の GLUT4 であっても、その細胞膜局在を明確に検出できることが分かった。

5-2 国際共同研究による相乗効果

日本のグループの研究で開発された PYP^{NQN} は、国際共同研究の賜物である。フランスのグループの当時学生であった Mathieu Bordy 氏（現博士）が PYP タグの 1 アミノ酸変異体を作成・解析したことがきっかけで、優れたラベル化速度と蛍光強度を示す PYP^{NQN} の創製に繋がった。また、日本のグループの学生である梅野真帆氏（現修士）が細胞膜を透過することが期待される BLAC プローブ誘導体の合成経路を確立した。日本のグループは、細胞におけるタンパク質の発現系の構築に関する技術を持ち、酵素に応答するプローブは、フランス側から日本に提供し、技術協力を行うことができた。この技術協力の結果、過渡的で少数のタンパク質の動態の可視化に成功した。

5-3 国際共同研究成果の波及効果と今後の展望

CG1 と PYP^{NQN} は、発現レベルの低いタンパク質の検出に有効であり、過渡的な局在移行を示すタンパク質の高感度検出も可能とする。更に、フランスのグループは、スタートアップ企業の起ち上げと、その企業にライセンスが帰属する二つの特許の出願に繋がった。

Strategic International Collaborative Research Program (SICORP)
 Japan - France Joint Research Program
 Executive Summary of Final Report

1. Project title : 「Intracellular tracking of protein function by design and synthesis of fluorogenic probes for MEMOEY imaging」
2. Research period : September, 2016 ~ March, 2020
3. Main participants :

Japan-side

	Name	Title	Affiliation	Role in the research project
PI	Kazuya Kikuchi	Professor	Osaka University	Director of the entire project
Collaborator	Yuichiro Hori	Associate professor	Osaka University	Functional evaluation of probes
Collaborator	Masafumi Minoshima	Assistant professor	Osaka University	Probe synthesis
Collaborator	Gao Jingchi	Ph.D. student	Osaka University	Probe synthesis
Collaborator	Maho Umeno	Graduate student	Osaka University	Functional evaluation of probes
Collaborator	Miyako Nishiura	Technical staff	Osaka University	Functional evaluation of probes
Total number of participants throughout the research period:				14

France-side

	Name	Title	Affiliation	Role in the research project
PI	Jens Hasserodt	Professor	Ecole Normale Supérieure de Lyon	Director of the entire project
Collaborator	Mathieu Bordy	Ph.D. student	Ecole Normale Supérieure de Lyon	Probe synthesis
Collaborator	Alix Tordo	Ph.D. student	Ecole Normale Supérieure de Lyon	Probe synthesis
Collaborator	Jeremy Salaam	Ph.D. student	Ecole Normale Supérieure de Lyon	Probe synthesis
Collaborator	Corentin Gondrand	Ph.D. student	Ecole Normale Supérieure de Lyon	Probe synthesis
Collaborator	Damien Curton	Ingenieur d'Etude	Ecole Normale Supérieure de Lyon	Functional evaluation of probes
Total number of participants throughout the research period:				7

4. Summary of the international joint research

The dynamic change of the whereabouts of a protein in the cell is intimately linked to the regulation of its function. In the case of membrane proteins, their translocation to the cell surface or intracellular vesicle/organelle is crucial for cellular function. The deregulation of this translocation is frequently observed in diseases such as cancer and diabetes. Microscopic techniques to unravel the mechanisms underlying such translocation are mostly based on fluorescence imaging. These mechanisms are the basis for the development of new therapies. The transient nature of protein migration and/or the protein's low copy

numbers inside the cell are significant hurdles to the reliable determination of the protein's whereabouts. A novel strategy currently favored by international experts is to teach the cell to produce a tandem protein, composed of the protein of interest and one that the chemist can label with an intensely fluorescent chemical. The Japanese partner has contributed his proprietary technique to this project (PYP-tag) and his expertise in the creation of cells producing such tandem proteins. The French partner, on the other side, furnished his line of unique small-molecule probes allowing for localization of the activity of a particular class of proteins, the enzymes. Together, they imaged the translocation (tracking) of the protein molecule "glucose transporter 4" (GLUT4) whose deregulation is observed in diabetes.

5. Outcomes of the international joint research

5-1 Scientific outputs and implemented activities of the joint research

Two separate approaches were pursued. 1. The Japanese partner has previously demonstrated that the protein PYP can be permanently labeled with a single copy of a pro-fluorescent small molecule, that becomes intensely fluorescent upon labeling, thus allowing for PYP to be tracked during its intracellular migration. 2. The French partner has developed an independent line of pro-fluorescent small molecules that act as specific substrates for certain proteins called enzymes; their chemical conversion by the enzyme results in the precipitation of the now intensely fluorescent probe fragment which not only promises to allow for the localization of the enzyme, but also to enhance detection sensitivity, because a single copy of the enzyme molecule activates a thousand copies of the pro-fluorescent substrate molecule.

In the PYP-tag project, the Japanese partner developed a new PYP-tag probe, CG1. CG1 enhanced fluorescence upon labeling reactions, and enabled high-contrast imaging of proteins. The partner also created PYP-tag with three mutations, PYP^{NQN}. PYP^{NQN} showed faster labeling kinetics and brighter fluorescence than wild-type PYP when using CG1. PYP^{NQN}-based labeling visualized GLUT4 much more brightly than that using wild-type PYP. The combined use of CG1 and PYP^{NQN} overcame the limitation of protein detection in living cells and will benefit the determination of translocation dynamics of many proteins of interest. The French partner obtained two small molecule probes, one reporting on the activity of BLAC, the other on that of CPG2. The BLAC probe generated solid-state fluorescence upon contact with BLAC in vitro. The CPG2 probe has been determined to be perfectly robust, responding specifically to the bacterial enzyme CPG2, while remaining silent in the presence of mammalian enzyme counterparts, a prerequisite for its exploration as a new protein tag and/or reporter gene system. Using the BLAC probe, the Japanese partner successfully imaged a small number of GLUT4 transiently translocated to the membrane.

5-2 Synergistic effects of the joint research

PYP^{NQN} created by the Japanese group was generated as a result of international collaboration. Dr. Bordy in the French group created PYP-tag with a single mutation, leading to creation of PYP^{NQN} that allows protein imaging with excellent labeling kinetics and brightness. Umeno of the Japanese partner developed a synthetic route to a molecular variant of the BLAC probe that is explored for its ability to efficiently penetrate the cell wall. The Japanese partner has precious know-how for the preparation of cells expressing proteins. The French partner can supply the Japanese partner with enzyme-responsive probes showing unique performance in microscopic fluorescence imaging. As a result of the collaboration, localization of a small number of proteins were successfully detected.

5-3 Scientific, industrial or societal impacts/effects of the outputs

The protein labeling system using CG1 and PYP^{NQN} offers a solution when the protein expression level is too low to image a protein of interest. The high sensitivity of this system will also allow detection of transiently localized proteins.

The line of small molecule probes developed by the French partner has received a significant boost from the public funding, allowing him to file two new patent applications that have been licensed by the University of Lyon to the startup company Molsid.com.

国際共同研究における主要な研究成果リスト

1. 論文発表等

*原著論文 (相手側研究チームとの共著論文) : 発表件数 : 計 2 件

・査読有り : 発表件数 : 計 2 件

1. J. Gao, Y. Hori, T. Shimomura, M. Bordy, J. Hasserodt and K. Kikuchi, "Development of Fluorogenic Probes for Rapid High-Contrast Imaging of Transient Nuclear Localization of Sirtuin 3", *ChemBiochem*, **2020**, 21(5), 656–662 DOI:10.1002/cbic.201900568

2. J. Gao, Y. Hori, M. Nishiura, Bordy, J. Hasserodt and K. Kikuchi, "Engineered protein-tag for rapid live-cell fluorogenic visualization of proteins by anionic probes", *Chem. Lett.*, **2020**, 49(3), 232–235 DOI: 10.1246/cl.190875.

・査読無し : 発表件数 : 計 0 件

該当なし

*原著論文 (相手側研究チームを含まない日本側研究チームの論文) : 発表件数 : 計 5 件

・査読有り : 発表件数 : 計 5 件

1. S. Mizukami, M. Kashibe, K. Matsumoto, Y. Hori, and K. Kikuchi, "Enzyme-triggered compound release using functionalized antimicrobial peptide derivatives", *Chem Sci.* **2017** Apr 1;8(4):3047-3053. DOI: 10.1039/C6SC04435B

2. Y. Hori, S. Hirayama and K. Kikuchi, "Development of cyanine probes with dinitrobenzene quencher for rapid fluorogenic protein labelling", *Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci.*, **2017**, 375(2107), 20170018. DOI:10.1098/rsta.2017.0018

3. Y. Hori, N. Otomura, A. Nishida, M. Nishiura, M. Umeno, I. Suetake and K. Kikuchi, "Synthetic-Molecule/Protein Hybrid Probe with Fluorogenic Switch for Live-Cell Imaging of DNA Methylation", *J. Am. Chem. Soc.*, **2018**, 140(5), 1686–1690 DOI:10.1021/jacs.7b09713

4. J. Gao, Y. Hori, O. Takeuchi and K. Kikuchi, "Live-Cell Imaging of Protein Degradation Utilizing Designed Protein-Tag Mutant and Fluorescent Probe with Turn-Off Switch", *Bioconjug. Chem.*, 2020;31(3):577–583 DOI:10.1021/acs.bioconjchem.9b00696

5. N. Kumar, Y. Hori, M. Nishiura and K. Kikuchi, "Rapid no-wash labeling of PYP-tag proteins with reactive fluorogenic ligands affords stable fluorescent protein conjugates for long-term cell imaging studies", *Chem. Sci.*, **2020**, in press DOI: 10.1039/D0SC00499E

・査読無し : 発表件数 : 計 0 件

該当なし

*その他の著作物 (相手側研究チームとの共著総説、書籍など) : 発表件数 : 計 0 件

該当なし

*その他の著作物 (相手側研究チームを含まない日本側研究チームの総説、書籍など) : 発表件数 : 計 4 件

1. N. Kumar, Y. Hori and K. Kikuchi, "Live-Cell Imaging of DNA Methylation Based on Synthetic-Molecule/Protein Hybrid Probe", *Chem. Rec.*, **2018**, 18(12), 1672–1680 DOI:10.1002/tcr.201800039

2. S. I. Reja, M. Minoshima, Y. Hori and K. Kikuchi, "Development of an effective protein-labeling system based on smart fluorogenic probes", *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2019**, 24(4), 443–455 DOI:10.1007/s00775-019-01669-y

3. N. Kumar, Y. Hori and K. Kikuchi, "Photoactive yellow protein and its chemical probes: an approach to protein labelling in living cells", *J. Biochem.*, **2019**, 166(2), 121–127 DOI:10.1093/jb/mvz051

4. Y. Hori and K. Kikuchi, "Chemical Tools with Fluorescence Switches for Verifying Epigenetic Modifications", *Acc. Chem. Res.*, **2019**, 52(10):2849–2857 DOI:10.1021/acs.accounts.9b00349

2. 学会発表

* 口頭発表 (相手側研究チームとの連名発表)

発表件数 : 計 0 件 (うち招待講演 : 0 件)

* 口頭発表 (相手側研究チームを含まない日本側研究チームの発表)

発表件数 : 計 27 件 (うち招待講演 : 15 件)

* ポスター発表 (相手側研究チームとの連名発表)

発表件数 : 計 0 件

* ポスター発表 (相手側研究チームを含まない日本側研究チームの発表)

発表件数 : 計 29 件

3. 主催したワークショップ・セミナー・シンポジウム等の開催

1. Meeting for JST/ANR Joint Program on "Molecular Technology" -Gluttrack: Intracellular tracking of protein function by design and synthesis of fluorogenic probes for MEMORY imaging-, K. Kikuchi (Osaka University, Professor) and J. Hasserodt (ENS de Lyon, Professor), ENS de Lyon (France, Lyon) Aug 27-28, 2018, 10 participants

2. The 2nd Meeting for JST/ANR Joint Program on "Molecular Technology" -Gluttrack: Intracellular tracking of protein function by design and synthesis of fluorogenic probes for MEMORY imaging-, K. Kikuchi (Osaka University, Professor) and J. Hasserodt (ENS de Lyon, Professor), Osaka University (Osaka, Suita) Jun 7, 2019, 10 participants

4. 研究交流の実績 (主要な実績)

【合同ミーティング】

- ・ 2016年11月21-22日 : ジョイントミーティング、ENS de Lyon、Lyon、フランス
- ・ 2018年8月28日 : ジョイントミーティング、ENS de Lyon、Lyon、フランス
- ・ 2019年6月7日 : ジョイントミーティング、大阪大学、吹田、日本

【学生・研究者の派遣、受入】

- ・ 2017年4月 : 相手国側研究員が、進捗報告を兼ねた成果発表を行った。
- ・ 2017年10月~11月 : 相手国側学生を日本側研究機関に約1か月受け入れ、共同研究を行った。
- ・ 2018年8月~9月 : 日本側学生を相手国側研究機関に約1か月派遣し、共同研究を行った。
- ・ 2019年9月~10月 : 日本側学生を相手国側研究機関に約1か月派遣し、共同研究を行っ

た。

・2019年11月～12月：相手国側学生を日本側研究機関に約1か月受け入れ、共同研究を行った。

5. 特許出願

研究期間累積出願件数：2件

6. 受賞・新聞報道等

1. 平成30年度 科学技術分野の文部科学大臣表彰 科学技術賞(研究部門), 菊地 和也, 2018/4/10

2. 15th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC 15) Poster Award, Nozomi Yamazaki, 2019/6/5

7. その他

該当なし