

# 蛍光タンパク質の特徴を活用したタンパク質間相互作用調整剤評価系の開発

渡部 拓

# 要旨

タンパク質間相互作用 (Protein-Protein Interaction; PPI) は、すべての細胞プロセスにおいて重要な役割を果たし、生命現象の重要な分子機構としてのみならず、新薬の標的群としても注目されている。既存の PPI 調整剤開発手法が有する課題を解消する事を目的とし、本研究では、蛍光タンパク質を用いた新規アッセイ法の開発を行った。

第一に、単量体型である monomeric Kusabira Green (mKG)による Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC)を利用し、操作が簡便であり、ハイスループットなインビトロアッセイ系を構築した。本系を用いて、がん細胞の増殖を促進する transcription factor 7 (TCF7)と $\beta$ -catenin の相互作用阻害剤および、がん細胞で活性が高いプロテアソームの複合体形成に必須である Proteasome assembling chaperone 1 (PAC1) と Proteasome assembling chaperone 2 (PAC2) の相互作用阻害剤、Proteasome assembling chaperone 3 (PAC3)のホモ二量体化阻害剤を取得する為に、天然物由来の 123,599 サンプルから構成されるライブラリーをスクリーニングし、PPI 阻害剤を同定する事で、本系の有用性を実証した。

第二に、細胞内で PPI を可視化する新規技術を開発した。従来の蛍光タンパク質(FP)を利用した系は、ダイナミックレンジおよび定量的再現性に限界があり、また、インビトロアッセイ系では細胞膜透過性を有する PPI 阻害化合物を同定することが困難な為、本研究を実施した。開発した技術は、タンパク質の多価性を利用した相転移により、

PPI 依存的に液相液滴を形成させることで、コントラスト、感度、反応速度、可逆性、系の構築の簡便性、及び汎用性について、総合的に他の PPI 検出手法よりも優れた系となり、Fluorescent PPI visualization (Fluoppi)と名付けた。Fluoppi を用いることで、抗がん剤の標的 PPI としてよく知られているが、これまでセルベースアッセイ系の無かった X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)と second mitochondria-derived activator of caspase (Smac)の PPI を可視化し、特異的 PPI 阻害薬の効果を検証した。また、Fluoppi を応用展開し、光変換 FP を用いた生細胞内 PPI キネティクス解析(photoconvertible Fluppi; pcFluoppi)や、ホモ二量体検出法(homoFluoppi)を開発した。後者により、細胞増殖や細胞分化等、複数のシグナル伝達系に関与し、mitogen-activated protein (MAP) kinase ファミリーに属する Extracellular signal regulated kinase 2(ERK2)のホモ二量体形成の動態を生細胞内で明らかにした。本研究により開発されたインビトロアッセイ系およびセルベースアッセイ系により、今後 PPI 研究ならびに PPI 調整剤の探索・開発が加速されることが期待される。

# 目次

略語	5
第一章 緒論	
第一節 タンパク質間相互作用(PPI)調整剤	11
第二節 蛍光タンパク質を利用した PPI 検出系	18
第三節 本論文の概要	26
第二章 タンパク質断片補完法を用いた新規ハイスループットスクリーニング系の構築	
第一節 序論	27
第二節 材料と方法	30
第三節 結果	34
第四節 考察	40
第三章 液相転移を利用した PPI 可視化法の開発	
第一節 序論	47
第二節 材料と方法	50
第三節 結果	57
第四節 考察	71
第四章 結論	77
謝辞	81
参考文献	83
図表	96
補足図表およびビデオ	119

## 略語

Ab: Amyloid  $\beta$

AG: Azami-Green

ATCC: American Type Culture Collection

BAD: Bcl-2-associated death promoter

Bcl-2: B-cell lymphoma protein 2

BH3 domain: Bcl-2 homology 3 domain

BiFC: Bimolecular Fluorescence Complementation

BIR domain: Baculovirus Inhibitor of apoptosis protein Repeat domain

BRD4: bromodomain containing protein 4

CaM: calmodulin

CFP: cyan fluorescent protein

CHO: Chinese hamster ovary

CV: Coefficient of Variation

ddFP: dimerization-dependent fluorescent protein

DMSO: Dimethyl sulfoxide

DTT: dithiothreitol

EC50: half maximal (50%) effective concentration

EGF: Epidermal Growth Factor

EGFP: enhanced green fluorescent protein

ERK2: Extracellular signal regulated kinase 2

F2H: fluorescent two-hybrid

F3H: fluorescent three-hybrid

FBDD: fragment based drug design

FKBP12: FK506-binding protein

FLIP: fluorescence loss in photobleaching

Fluoppi: Fluorescent PPI visualization

FP: Fluorescent protein

FPX: fluorescent protein exchange

FRAP: fluorescence recovery after photobleaching

FRB: FKBP-rapamycin binding

FRET: fluorescence resonance energy transfer

FtsZ: Filamenting temperature-sensitive mutant Z

Fucci: Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator

GFP: green fluorescent protein

GPCR: G protein coupled receptor

GRIP: GFP-assisted readout for interacting proteins

HCA: high content analysis

HD: B/B Homodimerizer

HEK293: Human embryonic kidney cells 293

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HIV: immunodeficiency virus

HPLC: high performance liquid chromatography

HTS: high throughput screening

IC50: half maximal (50%) inhibitory concentration

ICY: ICY open bioimage informatics platform

IL-2: interleukin-2

IL-2R: IL-2 receptor

InCell SMART-i: intracellular supramolecular assembly readout trap for interactions

IRES: internal ribosome entry site

KO: Kusabira-Orange

LC-MS: liquid chromatography – mass spectrometry

LEDGF: lens endothelial growth factor

mAG1: bmonomeric Azami Green1

MAP kinase: mitogen-activated protein kinase

MBD: Methyl-CpG-binding domain

Mcl-1: Myeloid cell leukemia 1

MDM2: murine double minute 2

mKG: monomeric Kusabira Green

Mmj: Momiji

mTOR: mammalian target of rapamycin

Nck: non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1

NMR: nuclear magnetic resonance

N-WASP: Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein

P.I.:Punctum Intensity

PAC1: Proteasome assembling chaperone 1

PAC2: Proteasome assembling chaperone 2

PAC3: Proteasome assembling chaperone 3

PA-GFP: photoactivatable GFP

PB1: Phox—Bem1p

P-body: Processing body



PBS: Phosphate buffered saline

PC: phase contrast

PCA: protein complementation assay

pcFluoppi: photoconvertible Fluppi

PCR: polymerase chain reaction

PDE4A4: cyclic AMP phosphodiesterase-4A4

PI3 kinase: Phosphoinositide 3-kinase

PMT: photomultiplier tube

PPI: protein protein interaction

S / B: signal to background

SH3: SRC Homology 3

Smac: second mitochondria-derived activator of caspase

SPR: Surface Plasmon Resonance

SQSTM1: Sequestosome1

T2A: *Thomaspaulsen virus 2A*

TCF7: transcription factor 7

TIRF: Total internal reflection fluorescence

USPS: Ubiquitin-based split protein sensor

UV: ultra violet

V-ATPase: Vacuolar-type H<sup>+</sup> -ATPase

WL: Washout Ligand

XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis

YFP: yellow fluorescent protein

ZipA: Z interacting protein A

# 第一章 緒論

## 第一節 タンパク質間相互作用(PPI)調整剤

PPI は全てのシグナル伝達経路を構成しており、細胞の構造維持や機能発揮に必要不可欠である。また、癌をはじめとした幅広い疾患領域において重要な役割を果たしているため、創薬標的として活発に阻害薬や誘導剤、安定化剤の開発が行われている(1-3)。尚、本論文では、上記を総合して PPI 調整剤と記載する。歴史的には、PPI 調整剤は天然物由来の化合物が知られている。例えば、1960年代にイチイ(*Taxus wallichiana*)から単離された微小管の脱重合を阻害するパクリタキセルや、1970年代から80年代に報告された、*Hypocladium inflatum gams* から単離され、Cyclophilin と Calcineurin の相互作用を誘導する CyclosporineA、*Streptomyces hygroscopicus* から単離され、mTOR と FKBP12 の相互作用を誘導する Rapamycin、*Streptomyces tsukubaensis* から単離され、FKBP12 と Calcineurin の相互作用を誘導する FK506 などが挙げられる(4-7)。これらはいずれも化合物が先に同定され、その後、標的が発見された経緯を有する。

一方で、創薬標的を先に同定し、その相互作用を調整する薬剤を開発するのは、長らく困難であると考えられてきた。なぜなら、これまでに認可されてきた創薬標的である、G protein coupled receptor (GPCR)ファミリーやキナーゼ

ファミリーでは、内在性のリガンドの模倣を創薬の起点とすることが可能であったが、PPI 標的の場合は、概して相互作用界面の面積が大きく、低分子化合物が入り込むポケットが無く比較的平坦であり、弱い相互作用の集合としてアフィニティーを獲得しているため、低分子化合物で PPI を阻害することは困難であると考えられていたためである(8)。しかしながら、1995年にホットスポットの概念が発表され、PPI 界面におけるアミノ酸側鎖同士の相互作用が全て均質というわけではなく、数個の強固な結合によりタンパク質全体の相互作用が担われるモデルが提唱され、標的をうまく選択できれば低分子化合物による PPI 阻害も不可能ではないと考えられ始めた(2,9)。同概念を発端に PPI 創薬が現実的と考えられ始め、現在までに低分子化合物で阻害可能性のある創薬標的は 40 以上同定され、これら創薬標的群は立体構造情報に基づき分類されている(2,10)。その分類の理解は、創薬のみならず、広く PPI 調整剤の開発において重要である。以下に、その代表例について述べる。

第一に、最も単純な構造を有する創薬ターゲットとして、球状のタンパク質ドメインの表面ポケットに直鎖状のペプチドが相互作用する例を挙げる。代表例は X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) と second mitochondria-derived activator of caspase (Smac) もしくは caspase-3、caspase-7、caspase-9 の相互作用である。XIAP-Smac の場合は XIAP の

Baculovirus Inhibitor of apoptosis protein Repeat (BIR)ドメインに存在するポケットに、Smac の N 末端の 4 アミノ酸（アラニン、バリン、プロリン、イソロイシン）が入り込む構造をしている(11,12)。Inhibitor of apoptosis proteins (IAPs)ファミリーには cIAP1、cIAP2、 XIAP などが含まれ、アポトーシスや免疫応答を制御している(13)。XIAP は caspase と相互作用することで、caspase の活性を抑制しているが、アポトーシスのシグナルが活性化され、ミトコンドリアから Smac が放出されると、Smac は caspase と競合する。その結果、caspase が遊離し、アポトーシスが進行する。XIAP は種々の悪性腫瘍において過剰発現しており、また、放射線療法や化学療法を実施した際にも internal ribosome entry site (IRES)依存的なメカニズムにより発現が上昇する為、Smac の N 末端を模倣した化合物は、抗がん剤として機能する事が期待されている(13-15)。

この群の創薬ターゲットには、XIAP-Smac の他に、ヒト immunodeficiency virus (HIV)の Integrase と lens endothelial growth factor (LEDGF)の相互作用や、ヒストンのアセチル化リジンと bromodomain containing protein 4 (BRD4)などの bromodomain の相互作用が挙げられる(2,16,17)。

第二に挙げる PPI は、球状のタンパク質ドメインの表面に存在する溝に、 $\alpha$ ヘリックス構造を有したペプチドが相互作用する例である。代表例は、p53 と murine double minute 2 (MDM2)である。MDM2 の N 末に存在する

p53-binding domain の溝に、p53 の N 末に存在する  $\alpha$  ヘリックス状の transactivation domain (19 番目フェニルアラニン、23 番目トリプトファン、26 番目ロイシン) がホットスポットとして相互作用する構造をしている(18)。

p53 は癌抑制遺伝子であり、癌の半数では変異により機能が抑制され、残りの半数では変異は入っていないものの、機能が抑制されている事が多い(19)。

MDM2 は p53 を分解に導く E3 リガーゼであり、癌で頻繁に過剰発現している。従って、p53 と MDM2 の相互作用を阻害することで、p53 を再活性化させることが可能となる(19,20)。この群の創薬ターゲットには、p53-MDM2 の他に、B-cell lymphoma protein 2 (Bcl-2)ファミリーの Bcl-2、Bcl-xL、Myeloid cell leukemia 1 (Mcl-1)と Bcl-2-associated death promoter (BAD)や Noxa などの Bcl-2 homology 3 (BH3) domain や、原核生物のチューブリンである Filamenting temperature-sensitive mutant Z (FtsZ)と Z interacting protein A (ZipA)などが挙げられる(21-23)。

第三に、球状のタンパク質同士の相互作用について例を挙げる。ホットスポットの概念が提唱されたとはいえ、この群の PPI 調整剤は未だ開発途上である(2)。数少ない例の内、最も有名な例としては interleukin-2(IL-2)と IL-2 receptor (IL-2R)の PPI 阻害剤開発が挙げられる。同 PPI は細胞外で起こる為、dadizumab や basiliximab の様な抗体医薬が免疫抑制剤として既に認可されて

いるが、抗体医薬は製造コストが高く、経口投与ができず、抗体医薬に対する抗体ができてしまうなどの問題点がある。従って、低分子化合物で同 PPI を阻害する試みは理にかなっている(24)。同 PPI の立体構造としては、それぞれの約 20 アミノ酸が PPI 界面を形成しており、上記第一、第二の分類と比較して広い接触面積を有する。しかし、その中に、疎水性のパッチおよび塩橋で構成されるホットスポットが存在し、低分子化合物の標的として狙われている(24,25)。

では、これらの PPI を調整する薬剤（化合物）はどのような手法で開発されているのか。アプローチは大きく 2 つに分けることができる。一つ目は、標的の立体構造情報から PPI 調整剤をデザインするものである。第一と第二の分類に属する標的に対し、ペプチドを低分子化合物で模倣する手法である(26,27)。このアプローチには、コンピューターで化合物をデザインする手法も含まれる(28)。本アプローチは、立体構造情報が無いと、実施できない課題がある。

二つ目のアプローチは、阻害化合物を大規模ライブラリーからスクリーニングするハイスループットスクリーニング(high throughput screening: HTS)である。広く利用されている手法は、インビトロの生化学アッセイとしての fluorescence polarization や fluorescence resonance energy transfer (FRET) である。前者は、蛍光物質を修飾した標的 X を偏光で励起し、放出された蛍光の偏光解消の程度を測定することにより、対象物の分子運動を検出する手法で

ある。相互作用を検出する X と Y の分子量の差が無い場合は十分なダイナミックレンジが得られず、特に第三の分類に属する標的について、系の構築が難しい点が課題である。インビトロの HTS で用いられる FRET は、標的に低分子蛍光物質を直接修飾する手法や蛍光標識抗体を用いて標的を標識する手法が用いられている(29)。蛍光標識抗体を用いる場合は、反応系に抗体と標的の相互作用も含まれるため、得られたヒット化合物の阻害点が複数存在することになる。その様な偽陽性化合物を除くため、別のアッセイ系を用いた二次評価が必要とされる(30)。セルベースアッセイを利用した HTS としては、局在化タグを用いた手法が利用されている(31,32)。細胞内で PPI を検出する手法については、第二節で詳細を述べる。これらスクリーニングのアプローチを成功させるためには、アッセイ法以外に、化合物ライブラリーが重要である。既存の化合物ライブラリーは、GPCR やキナーゼなど古典的な創薬標的における戦略、すなわち認可済みの経口投与可能な薬剤から導き出された経験則に適合する化合物に偏っており、適用可能な PPI 標的に限られる。この課題に対しては、PPI 調整剤に特化した新たな化合物ライブラリーを構築する試みが行われている(33)。

尚、上記とは異なるアプローチとして近年報告が増えている手法は、fragment based drug design (FBDD)である(34)。分子量 300 以下の小さな化合物をスクリーニングし、活性は弱い効率がよく結合しているフラグメントを nuclear



magnetic resonance (NMR)や表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance: SPR)で同定し、その化合物を起点として分子サイズを拡張させる、或いは、複数フラグメントを連結するなどしてアフィニティーを上げていく手法である(35)。FBDD を効率的に進めるためには、標的の立体構造情報や、50 kDa 以下程度の可溶性の精製タンパク質を入手可能か否かが重要である。

この様に、様々なアプローチにより PPI 調整剤の開発が試みられているが、低分子化合物によりホットスポットを標的とする戦略が提唱されてはいるものの、PPI 調整剤は、他の標的に対する薬剤と比較して分子量が大きい傾向にある。従って、細胞内の PPI を標的とした場合、インビトロでの生化学的手法により同定した阻害剤については、セルベースアッセイで効果を確認する必要がある。次節では、蛍光タンパク質(FP)を用いたセルベースアッセイに焦点をあて、現状を述べる。

## 第二節 蛍光タンパク質を利用した PPI 検出系

1962年、下村脩らは「日の光の下では僅かに緑色であり、タングステン光では黄色、そして、紫外線の下では非常に明るい緑色蛍光を発するタンパク質が単離された。」と述べ、オワンクラゲ(*Aequorea victoria*)から緑色蛍光タンパク質(green fluorescent protein: GFP)を発見したことを報告した(36)。その後タンパク質レベルでの解析を経て、1992年に GFP 遺伝子がクローニングされ、1994年には、線虫および大腸菌での GFP タンパク質発現が報告された(37-39)。これにより、GFP 遺伝子は発色団形成に必要な全ての情報をアミノ酸配列上に保有しており、オワンクラゲ特有の酵素等を必要とすることなく、単独で蛍光性を獲得することが可能であることが証明された(40)。すなわち、GFPにより、様々な生物を生きたままの状態でも光らせることが可能であることが示された。その後、GFPの変異体が次々と報告され、cyan fluorescent protein (CFP)や yellow fluorescent protein (YFP)など蛍光特性の多様性が拡張された(40-42)。

1999年、Matzらは花虫類(Anthozoa species)から6つの蛍光タンパク質(FP)をクローニングしたことを報告した(43)。その内の一つが、蛍光波長の極大が583 nmを示すDsRedである。赤色FPの登場は、GFPと組み合わせることで複数の細胞内イベントを同時に解析することが容易となるため、その応用に期待が高まった。しかしながら、DsRedはそれ自身で恒常的(obligate)に四量体

を形成するため、観察対象のタンパク質に直接融合して細胞内の局在を解析する用途には不向きであることが予想された(44)。それに対し、CampbellらはDsRedに33か所のアミノ酸変異を導入した単量体のmRFP1を報告し、以後、タンパク質の局在解析には単量体FPを使用することが主流となった(45,46)。mRFP1は後に更に進化を遂げ、蛍光波長の多様性が拡大した(47)。

FPは、解析対象に直接融合し、その局在を観察する利用方法だけに留まらない。例えば、GFPの立体構造形成が蛍光の有無を指標に測定できる点を利用し、アルツハイマー病治療薬を狙ったAmyloid  $\beta$  (A $\beta$ )ペプチド凝集阻害薬を探索する方法や、FPが細胞内で迅速に分解される点を利用し、細胞周期特異的にFPを分解させることで細胞周期を可視化する方法 (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator: Fucci)、mRFPとEGFPのpH耐性の差や、Keima-Redの励起波長がpH依存的に変化する点を利用し、オートファジーを可視化する方法などが挙げられる(48-51)。また、蛍光の不可逆的褪色を利用した、fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)やfluorescence loss in photobleaching (FLIP)、不可逆的光活性化が可能なphotoactivatable GFP(PA-GFP)、不可逆的光変換が可能なKaede、可逆的光変換型のDronpaなどを用いて、細胞内タンパク質の拡散速度の測定や、特定の細胞のみをハイライトする実験にも利用されている(52-55)。この様にFPの特

徴を活用した技術は多数報告されている。では、PPI を解析するためには、FP はどの様に活用されているのだろうか。

FP の特徴を活用した PPI 解析手法は、大きく 2 群に分類することができる。

「第一群」は FP 等のタグの近接を利用した手法であり、解析対象のタンパク質 X と Y に遺伝的に融合したタグ同士が近接することで、蛍光強度が変化する。

タグ同士が物理的に近接する必要があるため、一般に X と Y の末端間の距離が短く、更に、解析対象とタグを接続するペプチドリンカーの最適化が求められる。

「第二群」は FP の再分布(redistribution)を利用したものである。FP を融合した解析対象の細胞内局在(分布)が PPI の有無で変化することを検出する。

画像解析が必要となるが、ハイコンテンツ解析 (high content analysis: HCA) 機器や解析プログラムの発展により、近年注目を浴びている。

「第一群」の具体的な手法としては、共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer: FRET)、タンパク質補完アッセイ(protein complementation assay: PCA)を FP で実施した二分子蛍光補完(bimolecular fluorescence complementation: BiFC)、二量体依存的 FP (dimerization-dependent fluorescent protein: ddFP)を用いた FP 交換 (fluorescent protein exchange: FPX)が挙げられる。

FRET は、蛍光波長の違いを利用し、ドナーFP からアクセプターFP へのエ

エネルギー移動を検出する技術である。FP を利用した FRET は、1996 年にペプチドの両端にドナーとアクセプターを融合し、トリプシンにより切断されることで FRET が解消される事がインビトロで実証され、1997 年に、Calmodulin と M13 ペプチドの融合タンパク質を用いて、細胞内でカルシウム濃度依存的に FRET が変化するプローブ(cameleons)が発表された(56,57)。現在は翻訳後修飾や立体構造変化依存的な PPI を初めとし、数多くの PPI が FRET で観察されている(58-60)。FRET はリアルタイムで PPI を観察できるメリットがあるが、シグナルのダイナミックレンジが狭く、また、測定系の構築や操作、結果の解析に高度の専門性が必要とされる。

PCA は、1994 年に Ubiquitin-based split protein sensor (USPS)として初めて報告された(61)。USPS はユビキチンを N 末端側と C 末端側の 2 つの不活性な断片に分割し、それぞれをタグとして任意のタンパク質 X と Y に融合する。ここで、C 末端側断片には更にレポータータンパク質が融合されている。X と Y の PPI によりタグ同士が近接すると、ユビキチンが再構成され、ユビキチン特異的プロテアーゼによりレポーターが切断される。その結果、レポーター分子量の变化としてウェスタンブロッティングにより PPI の有無を判定する事ができる。同様の PCA はユビキチン以外にも、adenilate cyclase や anthranilate isomerase において報告されている(62,63)。しかしながら、これらの PCA では、

分割したタンパク質が再構成された後に引き続く反応を検出する為、PPIを間接的にしか検出できない。そこで、PPIを直接検出するために、 $\beta$ ガラクトシダーゼやジヒドロ葉酸レダクダーゼ、ルシフェラーゼ、GFPなどのレポータータンパク質を断片化したPCAが構築された(64-67)。PCAのうち、FPを分割した方法は特にBiFCと呼ばれる。BiFCでは、FPをN末端側とC末端側の2つの断片に分割し、それぞれをタグとして任意のタンパク質XとYに融合する。各断片は蛍光性を有しないが、XとYのPPIによりタグ同士が近接するとFPが再構成され、蛍光性を獲得する。再構成後のFPが自発的に蛍光を発する為、USPSの様にレポータータンパク質を融合する必要はなく、また、シグナルを得るための基質等は不要である。更に、FPの特徴を活かし、複数の波長のFPを利用したマルチプレックスアッセイへの応用も報告されている(68)。BiFCの反応は不可逆的であるため、一度再構成されたFPは解離せず、X-Yの相互作用が解消された後でも、蛍光は残存する(69)。更に、理論上バックグラウンドシグナルが無い為、高い感度を有する。しかし、FPが再構成され蛍光を発する状態になるまでには、タンパク質の折り畳み、発色団を構成するアミノ酸の環状化、脱水、酸化反応に少なくとも30分程度の時間を要する為、細胞内シグナル伝達の過程など、リアルタイムなPPI検出が求められる実験には適さないという課題がある(40,70,71)。

ddFP の概念は 2012 年に発表され、まず、DsRed に変異を導入する事で開発された 2 種の FP のセット (ddRFP) が報告された(72)。通常実験で使用する細胞内濃度 (~1-50  $\mu\text{M}$ ) では蛍光強度が低いのが、両者が FP の PPI を介してヘテロ二量体を形成すると、赤色の蛍光強度が 10 倍明るくなる。ddRFP の相互作用は可逆的であり、細胞内カルシウム振動を観察する事が可能である。また、ddRFP を改変する事で ddGFP や ddYFP が開発され、更に、ddGFP と ddRFP を用いることで、レシオメトリックに蛍光強度が変化するバイオセンサーFPX が開発されている(73,74)。FPX は次世代のバイオセンサー用基盤技術として期待されているが、バックグラウンドが高い点および発現量の調整が複雑であるため細胞内 PPI の定量的な測定には不向きである点が課題である(74)。

FP の特徴を活用した PPI 解析手法「第二群」の具体的な手法としては、X には局在化させる為のタグ (局在化タグ) を、Y には蛍光タンパク質を、それぞれ遺伝的に融合し、Y が局在化タグと同じ場所に集積するか否かにより PPI を判定する手法や、多価の粒子を利用して X と Y の相互作用依存的にクラスターを形成させる手法が挙げられる。

局在化タグを用いる手法の概念は、1998 年に”Pull-Out” binding assay として報告された(75)。本手法では、ホルボールエステル処理依存的に細胞膜に再分布することが知られているプロテインキナーゼ C のホルボールエステル結合ド

メインを局在化タグとして X に融合し、GFP を Y に融合する。X と Y が相互作用する場合、ホルボールエステル(TPA)処理依存的に GFP-Y は細胞膜に集積する。一方、X-Y 間の相互作用が無い場合、GFP-Y は TPA 処理後も細胞内に拡散状態で存在する。すなわち、TPA 処理後の GFP-Y の局在により、PPI を判定できるという手法である。”Pull-Out” binding assay の変法は数多く報告されており、様々な局在化タグが報告されている。例としては、細胞質に顆粒状の封入体を形成するオルトレオウィルス由来 $\mu$ NS タンパク質を使用する手法や、ゲノムに人為的に挿入した 200-1000 コピーの lac オペレーター配列に局所的に集積する lac リプレッサータンパク質を使用する蛍光ツーハイブリッド法 (fluorescent two-hybrid: F2H)、染色体中心に集積する Methyl-CpG-binding domain (MBD)や、核膜に局在するラミニン、中心小体に局在する centrin を使用する蛍光スリーハイブリッド法(fluorescent three-hybrid: F3H)、低分子化合物の RS25344 処理依存的に細胞質で顆粒状の構造を形成する cyclic AMP phosphodiesterase-4A4 (PDE4A4)を局在化タグとして使用する GFP-assisted readout for interacting proteins (GRIP)法などが挙げられる(31,76-78)。

クラスターを形成させる手法は、intracellular supramolecular assembly readout trap for interactions (InCell SMART-i)と呼ばれ、2011 年に報告された(79)。InCell SMART-i では二十四量体のナノ粒子を形成する ferritin タンパ



ク質に FP と mTOR の FKBP-rapamycin binding ドメイン(FRB ドメイン:FRB)を遺伝的に融合し、細胞内に発現させる。その結果、表面に FRB を提示した蛍光性ナノ粒子ができる。更に FKBP12 を遺伝的に融合したタンパク質 X と Y を同細胞へ発現させた後、rapamycin を添加する。Rapamycin は FRB と FKBP12 を結合させる為、X と Y が相互作用する場合、二十四価の蛍光性ナノ粒子が架橋され、クラスターを形成し、細胞質に蛍光輝点として観察される。X-Y 間の PPI が無い場合は、同粒子の架橋は起こらず細胞質に拡散して存在する為、蛍光画像により PPI の有無を判定できる。本手法により、複数の低分子量 G タンパク質と、Phosphoinositide 3-kinase (PI3 kinase)構成因子 (p110 タンパク質中の Ras 結合ドメイン) との相互作用が検出されている(80)。本手法は可逆性が示されておらず、今後の課題として挙げられる。更に、本手法の重要な構成要素である rapamycin は細胞内在性の mTOR の機能を阻害する為、解析対象の PPI を観察している際に、タンパク質合成や脂質合成、オートファジー、リソソーム生成、エネルギー代謝、細胞生存など、様々な細胞機能を阻害する可能性を有する点も、本手法の課題である(81)。

### 第三節 本論文の概要

本研究は、近年現実的となってきたが、未だ様々なアプローチが試みられている PPI 調整剤開発分野において、FP の性質を利用した新たな解析技術の開発とその有用性の証明を目的とする。第一章では、BiFC をインビトロアッセイに展開し、セットアップが簡便な新規 HTS 系の構築を目的とした。同系を用いて、多様性に富んだ化合物を含むと予想される天然物由来サンプルから、HTS により複数のヒット化合物を同定し、系の妥当性を証明した。インビトロアッセイのみでは真のヒット化合物を得ることは困難である為、第二章では、セルベースアッセイ系の開発を行った。汎用性が高く、既存のアッセイ系が保有する課題を解消し得る系の開発を目的とした。その結果、液相分離を作動原理とした新規 PPI 検出手法が開発された。同手法はダイナミックレンジが大きく、可逆的かつ定量的であり、更に、単一の融合タンパク質でホモ二量体を検出する手法にも展開することが可能であった。本手法を用いて PPI 調整剤の細胞内での活性を評価することが可能であることが証明された。

## 第二章 タンパク質断片補完法を用いた新規ハイスループットスクリーニング系の構築

### 第一節 序論

本章では PPI 研究および PPI 創薬研究に有用な新たな技術・システムの開発を目的とし、インビトロ BiFC を用いた新規ハイスループットスクリーニング (HTS) 系の構築を目指した。これまでに、BiFC を用いたセルベースアッセイでは、薬剤の作用メカニズム評価を実施した例について報告がある(82,83)。また、インビトロ BiFC については、enhanced green fluorescent protein (EGFP) の断片を用いて実施された報告がある(84,85)。しかし、これらのインビトロ系は、大腸菌 (*Escherichia coli*) で発現させた分割 GFP 融合タンパク質の精製、変性およびリフォールディングを必要とするため、工程が簡便ではない点が課題であった。そこで本研究では、単量体 Kusabira Green FP (mKG) を用いたインビトロ BiFC を用いて、取り扱いが非常に簡便であり、タンパク質精製およびリフォールディングを必要としない HTS 系を開発した (図 1)。mKG はサンゴ由来の単量体 FP であり、全長 218 アミノ酸、励起波長および蛍光波長の極大はそれぞれ 494 nm および 506 nm である(71,86)。mKG による BiFC については、哺乳細胞での実施例が報告されている(87)。本研究では、このセルベースアッセイ系をインビトロ系に改良した。すなわち、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成

系を用いて、それぞれ独立して調製した 2 つの mKG 断片融合タンパク質を混合し、標的タンパク質の相互作用依存的に mKG が蛍光を発する系を構築した。本 HTS 系の実証研究として、3 つの PPI 検出系 (TCF7- $\beta$ -catenin、PAC1-PAC2、PAC3 ホモ二量体) を選択し、HTS への適合条件の検討を TCF7- $\beta$ -catenin を用いて実施した。

$\beta$ -catenin は、TCF に結合し、細胞周期調節タンパク質等の転写を活性化する。結腸直腸癌では、 $\beta$ -catenin の安定化とその結果生じる TCF 依存的な転写の促進が細胞増殖を促進する(86)。したがって、TCF7- $\beta$ -catenin の PPI 阻害は、癌細胞の増殖を抑制することが期待される。 $\beta$ -catenin は  $\alpha$  ヘリックスで構成されるアルマジロリピート構造を有し、そこへ、TCF の  $\beta$  ヘアピン構造、伸長領域、 $\alpha$  ヘリックスの 3 つのモジュールが相互作用する。伸長領域もしくは  $\alpha$  ヘリックス領域へのアミノ酸変異導入により、相互作用が解消する事が示されている(88)。立体構造としては、緒論で述べた第二の構造に分類されるが、TCF の  $\alpha$  ヘリックスが入り込む  $\beta$ -catenin の溝は浅く、PPI 阻害薬の開発報告は存在するものの、それらの効果や作用機序については疑問がもたれており、阻害が難しい PPI である(86,89)。

プロテアソームは全ての真核生物に存在するタンパク質分解酵素であり、ユビキチン化タンパク質の分解によりタンパク質の発現と機能を制御し、異常な

タンパク質やミスフォールドタンパク質の細胞内クリアランスに寄与する。癌細胞は連続的に増殖するため、正常細胞より高いプロテアソーム活性を必要とする。また、プロテアソームを阻害することでアポトーシス促進因子の分解を阻害し、抗アポトーシス経路を有する癌細胞での細胞死の活性化が期待される。プロテアソームは約 100 個のタンパク質から構成される分子量 250 万の巨大複合体であり、この複合体が形成されるためには分子シャペロンの **Proteasome assembling chaperone 1 (PAC1)**、**PAC2**、**PAC3** が必須である。PAC1 と PAC2 はヘテロ二量体を形成、PAC3 はホモ二量体を形成し、機能を発揮する(90,91)。立体構造としては、PAC1-PAC2 については未だ解明されていない。PAC3 ホモ二量体については、相同的な配列を有する出芽酵母の **Dmp1-Dmp2** を参考にすると、お互いの  $\beta$  シート同士が界面となる様に相互作用することが示されている(92)。本構造は、緒論で述べた第三の構造に分類される。

上記標的の PPI 阻害剤のスクリーニングにあたり、立体構造を考慮し、化合物の多様性の高い天然物（微生物代謝産物、植物抽出物、海産物）由来のサンプルから構成されるライブラリーを用いてスクリーニングを実施し、ヒット化合物を同定した。

## 第二節 材料と方法

### 試薬および測定機器

HTS に用いた 384 穴および 1536 穴のブラックプレートは、Greiner Bio-One (カタログ番号 784900) および Corning Life Sciences (カタログ番号 3728) から購入した。2103 EnVision™ Multilabel Reader (PerkinElmer、MA) を用いて蛍光測定を行った。マルチドロップコンビディスペンサー (Thermo Fisher Scientific、MA) およびマルチディスペンスステーション ADS-348-8 (BioTec、Japan) を用いて、384 穴または 1536 穴プレートに液体を分注した。

### タンパク質の調整

タンパク質は、全てインビトロで調整した(93)。TCF7L2 (1-67 アミノ酸) と  $\beta$ -catenin (CTNNB、137-665 アミノ酸)、全長 PAC1、PAC2、PAC3 遺伝子を、Gateway エントリープラスミド (Invitrogen、PA) にクローニングした。鋳型プラスミドを構築するために、2 ng の各 Gateway エントリークローン、10 ng の直鎖状 Gateway デスティネーションベクター、1  $\mu$ l の LR Clonase ミックス (Invitrogen) および LR 反応緩衝液 (Invitrogen) を用いて、LR 反応混合物 (5  $\mu$ l) を 25°C で 17 時間インキュベートした。

次に、転写反応に用いるための鋳型を polymerase chain reaction (PCR) で作製した。PCR 反応液 (50  $\mu$ l) は、0.2  $\mu$ M プライマー、0.2 mM dNTP、鋳型

DNA を含む 2  $\mu$ l の LR 反応液、0.63 U の KOD Dash ポリメラーゼ (Toyobo、Japan)、10% (v/v) のジメチルスルホキシド (Dimethyl sulfoxide : DMSO) とした。PCR 反応は以下の条件で行った : 一次変性を 95°C で 1 分行い、その後、変性を 94°C で 20 秒、アニーリングを 55°C で 5 秒、伸長を 74°C で 4 分行い、それを 30 サイクル行った。PCR プライマーは、SP6 プロモーターの上流から attR2 部位の 17 kb 下流までの領域を増幅するように設計した。次に、PCR 産物 (50  $\mu$ l) のインビトロ転写は以下の条件で行った : 80 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) / KOH (pH 7.8)、16 mM 酢酸マグネシウム、2 mM スペルミジン、10 mM dithiothreitol (DTT)、2.5 mM の各ヌクレオチド (ATP、UTP、GTP、CTP)、40 U の RNase 阻害剤 (Toyobo、Japan)、150 U の SP6 RNA ポリメラーゼ (Takara、Japan) 中で、37°C で 17 時間反応させた。転写した mRNA は精製せずに翻訳に使用した。

タンパク質合成は重層法で行った(94)。コムギ胚芽抽出物は、WEPRO7240 (Cell Free Sciences、東京) および HPOWG ( ZoeGene、東京) を用いた。これらの翻訳用キットに含まれる緩衝液を上部層に使用した。下部層 (13.6  $\mu$ l) は、インビトロ転写した 7.5  $\mu$ l の mRNA、8.6 mg のクレアチンキナーゼ、26 U の RNase 阻害剤、5  $\mu$ l のコムギ胚芽抽出物を混合した溶液を使用した。反応混合物は 26°C で 17 時間インキュベートした。

## 測定

インビトロ翻訳系によって調製された 2 つのタンパク質溶液をリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline: PBS) で希釈し、マルチドロップコンビディスペンサーを用いて各 10  $\mu$ l のタンパク質溶液を 384 穴ブラックプレートに分注した。室温で 17 時間インキュベートした後、2103 EnVision™ Multilabel Reader (励起フィルター: 460-480nm、ダイクロイックミラー: 485nm、蛍光フィルター: 495-540nm) を用いて蛍光を測定した。

## ハイスループットスクリーニング (HTS)

マルチドロップコンビディスペンサーを用いて標的の一方のタンパク質溶液 3  $\mu$ l を 1536 穴プレートに分注し、マルチディスペンサー ADS-348-8 を用いて DMSO に溶解したスクリーニング用サンプルを 0.1  $\mu$ l 加えた。室温で 1 時間インキュベートした後、標的の他方の溶液 3  $\mu$ l を分注した。その後、17 時間のインキュベーション後、2103 EnVision™ Multilabel Reader を用いて蛍光を測定した。DMSO 単独で処置したコントロールと比較し、70% の阻害を示すサンプルを阻害活性有りとして選択した。データ解析および管理は、ActivityBase 6.0 (ID Business Solutions、UK) を用いて行った。

## 統計解析

アッセイの性能を評価するために Z 'factor を使用した(95)。 Z 'factor は、0



から 1 までの間の無次元パラメータであり、以下の式で算出した。

$$Z' = 1 - (3\sigma_c + 3\sigma_c -) / |\mu_c + - \mu_c -|$$

( $\sigma_c +$ 、 $\sigma_c -$ 、 $\mu_c +$ および $\mu_c -$ は、高値コントロール (c+) および定値コントロール (c-) の標準偏差 ( $\sigma$ ) および平均 ( $\mu$ ) である。

### 天然物ライブラリー

産業技術総合研究所が保有する天然物ライブラリーを、mKG を用いたインビトロ BiFC による HTS に用いた。このライブラリーは 123,599 のサンプルを含み、粗製代謝産物としては、放線菌 (69,966 サンプル)、放線菌以外の細菌 (4,160 サンプル)、菌類 (40,640 サンプル)、植物抽出物 (4,160 サンプル) を含み、精製サンプルとしては、微生物代謝産物由来 (4,353 サンプル)、海洋天然物由来 (320 サンプル) を含む。すべてのサンプルは DMSO に溶解し使用した。

### 活性を有する化合物の単離

活性を有するサンプルを産生する微生物は、各株に適した発酵培地中で培養した。発酵ブrossの菌糸抽出物もしくは上清を酢酸エチルもしくは n-ブタノールで抽出し、有機層を蒸発乾固させた。乾燥した残渣を、順相または逆相の中圧液体クロマトグラフィーを用いて分離し、活性画分を得た。活性画分を分取逆相高速クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography: HPLC) によりさらに精製した。活性化合物の構造は、liquid chromatography -

mass spectrometry (LC-MS)および NMR 分光法データに基づいて決定した。

## 第三節 結果

### タンパク質のインビトロ調整

本研究では、mKG 断片融合タンパク質を調整するために、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を採用した。この系はスループット性が非常に高く、工程が簡便で再現性が高く、更に、タンパク質のフォールディングが高い特徴を有する。3種の標的タンパク質 (TCF7-mKGN /  $\beta$ -catenin-mKGC、PAC1-mKGN / mKGC-PAC2、mKGN-PAC3 / mKGC-PAC3) を本系で合成した結果、それぞれ可溶性画分に回収された。尚、N 末端側および C 末端側の mKG 断片をそれぞれ mKGN および mKGC と定義する。それぞれの収量は、TCF7-mKGN (15  $\mu$ g/mL),  $\beta$ -catenin-mKGC (8  $\mu$ g/mL), PAC1-mKGN (22  $\mu$ g/mL), mKGC-PAC2 (22  $\mu$ g/mL), mKGN-PAC3 (11  $\mu$ g/mL), mKGC-PAC3 (11  $\mu$ g/mL)であった。コムギ胚芽抽出液はバックグラウンドの蛍光が皆無であったため、合成後はタンパク質を精製せずに実験に用いた。

### スクリーニング系の構築

TCF7- $\beta$ -catenin の PPI を選択し、mKG を用いたインビトロ BiFC が HTS に適用可能か評価した。まず、2つの mKG 断片融合タンパク質のインキュベ-

ション時間を調べた。これらのタンパク質は、インビトロ合成系によって個々に調製後、混合し、室温でインキュベート後、蛍光をマイクロプレートリーダーで測定した。蛍光は、混合後 4 時間以内に検出可能であり、20 時間で最大となった (図 2a)。したがって、17 時間のインキュベーション時間で以下の実験を行った。

次に、TCF7 または  $\beta$ -catenin と mKG 断片の融合位置を決定するために、以下のように 8 つのパターンを構築した。TCF7 (TCF7-mKGN、mKGN-TCF7、TCF7-mKGC および mKGC-TCF7)、 $\beta$ -catenin ( $\beta$ -catenin-mKGN、mKGN- $\beta$ -catenin、 $\beta$ -catenin-mKGC および mKGC- $\beta$ -catenin)。これらの 8 つの mKG 断片融合タンパク質を希釈せずに 8 つの組み合わせで混合した。全ての組み合わせは陰性対照 (コムギ胚芽抽出物) と比較して高い蛍光値を示した (図 2b)。特に、TCF7-mKGN /  $\beta$ -catenin-mKGC および mKGN-TCF7 /  $\beta$ -catenin-mKGC の組み合わせは、シグナル対バックグラウンド (signal to background: S / B) 比が 70 : 1 と高い値を示した。

続いて、PPI 阻害剤をスクリーニングするためのタンパク質溶液の希釈率の検討を行った。全ての組み合わせの S / B 比は、PBS によるタンパク質溶液の希釈によって低下した。しかし、TCF7-mKGN /  $\beta$ -catenin-mKGC の組み合わせは、1:32 の希釈率でも、6 : 1 の S / B 比を示した (図 2b)。したがって、

TCF7-mKGN /  $\beta$ -catenin-mKGC の組み合わせを、天然産物ライブラリーからの PPI 阻害剤のスクリーニングに使用した。同様に、PAC1-PAC2 相互作用および PAC3 ホモ二量体の組み合わせの希釈比を、表 1 に示すように約 5 : 1 の S / B 比を有するように決定し、HTS に使用した。

最後に、TCF7- $\beta$ -catenin、PAC1-PAC2 および PAC3 ホモ二量体の PPI を、それぞれ対応する FLAG タグ融合標的タンパク質 (TCF7-FLAG、PAC2-FLAG、および PAC3-FLAG) を用いて競合的に阻害可能か検討を行った。TCF7-FLAG、PAC2-FLAG および PAC3-FLAG を、これらのアッセイ系に 1-14 : 1 の比で添加し、蛍光を測定した。すべての PPI において、FLAG 融合タンパク質による競合阻害が確認され (図 2c)、この系で検出された蛍光は、目的の相互作用によって引き起こされることが示唆された。しかし、PAC3 については、FLAG 融合 PAC3 自身がホモ二量体を形成する為、PPI 阻害が不完全であった。更に、競合阻害の程度は標的によって異なった。これらの差は、各 PPI の安定性および親和性に依存すると考えられた。

次に、この BiFC システムを 384 穴フォーマットから 1536 穴フォーマットに小型化した。1536 穴フォーマットの HTS では、384 穴フォーマットより 70% 少ない材料でインビトロ BiFC を実施することができた。1536 穴フォーマットアッセイにおける S / B 比は、384 穴フォーマットにおける S / B 比と同一であ

った。次のステップとして、変動係数 (Coefficient of Variation: CV) および Z 'factor を測定することによって HTS のアッセイ性能を評価した。Z 'factor は、アッセイ品質および性能の評価のために、広く用いられている指標である(95)。各ターゲットの 384 穴プレートおよび 1536 穴プレートのコントロールデータポイントは、CV 値は 3.3-7.6%、Z '値は 0.71-0.88 であり (図 3)、値の変動は少なかった。これらの結果は、このアッセイが HTS に適用可能であることを示唆した。以上より、1536 穴フォーマットにて、上記インビトロ BiFC システムで PPI 阻害剤をスクリーニングすることとした。各標的の HTS 条件を、表 1 にまとめるとめる。

#### 天然物ライブラリーからの PPI 阻害薬のスクリーニング

ライブラリースクリーニングは、標的あたり合計 123,599 サンプルを用いて、1 日あたり 20 プレート (1280 サンプル/プレート) のスクリーニングを実施した。液量は 1 ウェルあたり 6  $\mu$ l とし、天然物サンプルの最終濃度は 1.7%とした。TCF7- $\beta$ -catenin、PAC1-PAC2、および PAC3 ホモ二量体の 3 つの標的 PPI に対する一次スクリーニングでは、それぞれ 311 (全サンプルの 0.25%)、399 (0.32%) および 1,503 (1.21%) のヒットサンプル(First Hit)が得られた (表 2)。さらに、各標的のヒットの選択性を評価する目的で、標的 PPI は 70%以上阻害し、他の PPI は 30%以下の阻害を示すサンプルを選択的ヒットサンプル

(Selective Hit)とした。その結果、TCF7- $\beta$ -catenin、PAC1-PAC2 および PAC3 ホモ二量体では、それぞれ 18 (全サンプルの 0.01%)、40 (0.03%) および 257 (0.21%) の選択的ヒットが得られた (表 2)。次に、選択的ヒットサンプルの再現性および用量依存性を評価した。その結果、TCF7- $\beta$ -catenin では再現性および容量依存性が見られず、PAC1-PAC2 に対しては 2 ヒットサンプル、PAC3 ホモ二量体に対しては 9 ヒットサンプルが選択された。これらのヒットサンプルを特異的ヒット(Specific Hit)とする (表 2)。PAC1-PAC2 の特異的ヒットは、放線菌代謝産物に由来し、PAC3 ホモ二量体の 9 つは、放線菌 (3 サンプル)、真菌 (3 サンプル) および植物 (3 サンプル) 代謝産物に由来した。これらのサンプルを生産する微生物を発酵培地で培養したが、2 株の培養液では標的 PPI に対する阻害活性を確認することができなかった。従って、最終的には、PAC1-PAC2 に対しては 1 つの放線菌サンプル、PAC3 ホモ二量体に対しては、2 つの放線菌、3 つの真菌および 3 つの植物サンプルから活性化合物が得られた。

### 活性を有する化合物の同定

PAC1-PAC2 相互作用および PAC3 ホモ二量体形成を阻害する化合物の構造を決定するために、株および植物抽出物を生産する培養ブロスから活性指向分離を行った。活性化合物は、LC-MS および NMR 分光法データによって決定した。TN01 については構造を決定する事ができなかった。放線菌代謝産物から単

離された化合物 TAN 1323D は、PAC1-PAC2 の阻害剤であった (図 4)。

TAN1323D は、PAC1-PAC2 相互作用を 19  $\mu\text{M}$  の half maximal (50%) inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>)で阻害し、PAC3 ホモ二量体および TCF7- $\beta$ -catenin 相互作用をそれぞれ 33  $\mu\text{M}$  および 40  $\mu\text{M}$  の IC 50 値で阻害した (表 3、図 5)。放線菌、真菌および植物の代謝産物からは、PAC3 ホモ二量体阻害剤が複数得られた (表 3、図 5)。TB1、JBIR-22、TN-01 およびリノール酸を真菌代謝産物から単離した。また、放線菌代謝産物からは leucanicidin を、植物由来のサンプルからは大豆サポニンを含むサポニン類縁体を単離した (図 4)。TB1 は Yoshida のグループより同定された phospholipase A2 阻害剤の thielocin B1 であった(96)。また、JBIR-22 はのちに Izumikawa らにより構造が決定され、ドッキングシミュレーションにより PCA3 ホモダイマー界面に結合する事が示された(97)。Izumikawa らの論文では、JBIR-22 を HeLa 細胞に投与する事で、48 時間では細胞死を誘導しないが、120 時間で誘導する事が示された(97)。同定した化合物の中で TB1 は強力な阻害活性および選択性を示した (表 3)。TB1 の IC<sub>50</sub> 値は、PAC3 ホモ二量体の PPI については 0.020  $\mu\text{M}$  であったが、TCF7- $\beta$ -catenin と PAC1-PAC2 相互作用に対しては阻害活性を示さなかった (IC<sub>50</sub>>250  $\mu\text{M}$ )。また、のちに Doi らはドッキングシミュレーションにより TB1 が PCA3 ホモダイマー界面に結合する事を示し、更に、TB1 と

類似の構造を有する thielocin A1 $\beta$  と thielocin B3 は PAC3 ホモ二量体を阻害しない事、すなわち、TB1 の PAC3 に対する特異性が示された(98)。以上より、本研究ではプロテアソーム阻害剤候補として、優れた PPI 阻害剤を複数同定することに成功した。

## 第四節 考察

本研究では、天然物ライブラリーから PPI 阻害剤をスクリーニングするために mKG によるインビトロ BiFC を用いた新規 HTS 系を構築した。本系は、複雑なプロセス（固相タンパク質、洗浄および基質の添加など）または高価な機器を必要とせず、2 つのタンパク質溶液を単に混合することによって簡便に実施され、また、HTS として非常に低コストである。さらに、プラスミド構築、タンパク質調製、プレートスクリーニングも以下の様に簡便なプロセスで実施した。まずプラスミド構築は、Gateway システムを用いて迅速に標的遺伝子と mKG 断片との 8 つの組み合わせのプラスミドを構築し、インビトロタンパク質調製システムを用いて精製することなくタンパク質を調製した。

TCF7- $\beta$ -catenin および PAC3 ホモ二量体を用いて未精製タンパク質溶液と精製タンパク質溶液との間のアッセイデータの差異を評価すると、未精製タンパク質溶液での mKG の蛍光は精製タンパク質の値と同じであることは確認済みで



ある (data not shown)。さらに、TB1 は、PAC3 ホモ二量体において、精製タンパク質と未精製タンパク質で同じ IC50 値を示した (図 5)。これらの結果は、本アッセイにはタンパク質調製が不要であることを示している。さらに、このインビトロ BiFC 系は、1536 穴フォーマットに容易に小型化することができ、CV 値および Z'factor 値は、384 および 1536 穴フォーマットの両方において優れていた。

PCA と無細胞翻訳系を組み合わせるアプローチは、ルシフェラーゼの PCA において既に報告されている(99)。この際、Porter et al.は、分割する対象となるタグを複数検討する中で、Venus FP を選択肢から除外した。なぜなら、分割 Venus では、目的のシグナルとバックグラウンドのシグナルの差が有意ではなかった為である。それに対し本研究では、分割 mKG を用いて、無細胞翻訳系と組み合わせた HTS 系を構築することに成功した。mKG は過去に、哺乳細胞を用いて、分割する為の最適な位置やフレキシブルリンカーが十分に評価されている。その結果を元に、本論文で示す mKG インビトロ BiFC 系を設計したため、S/B 比が高く、基質等の添加が不要であり簡便かつ低コストで実施可能な系を構築する事が出来た。尚、Porter et al.が用いた Venus の分割箇所は、157 番と 158 番目のアミノ酸の間、すなわち、Venus の立体構造上では 11 本の  $\beta$  シートがあるが、その内の 6 本目と 7 本目の  $\beta$  シートを結ぶループ領域であり断片

の長さはそれぞれ 157 アミノ酸と 80 アミノ酸である。一方、mKG の分割箇所は、168 番目と 169 番目のアミノ酸の間であり、8 本目と 9 本目の  $\beta$  シートの間であり、長さは 168 アミノ酸と 51 アミノ酸である。Porter et al. の報告で S/B 比が低い原因は、Venus の両断片が長い為不安定であり、自発的に会合および再構成が起こることでバックグラウンドが高くなった為ではないかと推察する。C 末側断片を更に短くした分割方法として、10 本目と 11 本目の  $\beta$  シートで分割した Venus 断片(1-210)と(210-238)を用いた BiFC が報告されており、高い S/B 比を達成している(100)。

本 HTS 系では微生物代謝産物や植物抽出物のクルードサンプルのスクリーニングに利用することができた。一般的には、この様なサンプルは自家蛍光が高く HTS には困難とされる。しかし、本研究では複数の標的についての HTS を同時に実施することで、最終的に特異的な PPI 阻害剤を同定する事ができた。従って、本論文で示す HTS 系は、他の様々な PPI 標的および化合物ライブラリーにも適応できることが示唆される。

3 つの標的 (TCF7- $\beta$ -catenin、PAC1-PAC2、および PAC3 ホモ二量体) の PPI 阻害剤スクリーニングでは、高いヒット率を示した。それぞれ 0.25%、0.32%、および 1.21% の比率であったが、これらの特異的ヒット率は、それぞれ 0.01%、0.03%、0.21% であった。この結果は、多くのサンプルがこれらのタンパク質に

非特異的に結合し、PPI を阻害することを示唆する。PAC3 ホモ二量体阻害剤として、真菌代謝産物のリノール酸が単離された。他の脂肪酸、例えばオレイン酸やリノレン酸も 3 つの標的全てを阻害した (表 3)。微生物由来の未精製サンプルは、しばしば豊富な脂肪酸を含むため、天然物由来のライブラリーを用いて特異的な PPI 阻害剤を同定するのは困難であると考えられる。従って、このようなライブラリーは、脱脂することで、ヒット率を高めることができるかもしれない。しかしながら、上記の問題を含有しているにも関わらず、本研究ではマクロライドやサポニンの様な、多様な化学構造を有する 8 つの PPI 阻害剤を同定する事に成功した。これらの阻害剤に、共通の構造化学的類似性は見られなかった。これらの化合物の分子量は、376~967 の範囲であり、平均は約 630 であった (脂肪酸を除く)。天然物由来ライブラリーは分子量や構造の多様性が合成ライブラリーと比して高かったことも、PPI 阻害剤同定の成功要因であったと考えられる。

PAC1-PAC2 の阻害剤として放線菌代謝産物から TAN1323D が単離された。TAN1323D の派生物としては、Vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase (V-ATPase)阻害剤のコンカナマイシンと、バフィロマイシンが知られている(101)。コンカナマイシン類似体による V-ATPase 阻害のメカニズムは、V-ATPase 複合体を構成するサブユニット間の相互作用の阻害である(101)。従って、コンカナマイシン類似

体は PPI の阻害を示す可能性がある。PAC1 / PAC2 および PAC3 ホモ二量体系において、コンカナマイシン A の阻害活性を検討したところ、同化合物はこれらの PPI を阻害したが、TAN1323D よりも高い IC<sub>50</sub> 値 (250 μM) であった。従って、TAN1323D は選択性のある PAC1 / PAC2 阻害剤であることがわかった。

本スクリーニング系により、PAC3 ホモ二量体化の特異的阻害剤である TB1 が、真菌代謝産物から同定された。PAC3 は、20S プロテアソームの集合因子であり、プロテアソーム活性に必須である(91)。プロテアソーム阻害剤 Bortezomib は、再発多発性骨髄腫およびマントル細胞リンパ腫の臨床薬として使用されている(102)。従って、TB1 は、抗癌剤を開発するための貴重なリード化合物となり得る。Bortezomib は、高い親和性および特異性で 26S プロテアソームの触媒部位に結合し、プロテアソーム活性を阻害する。一方、TB1 が標的とする作用機序は PAC3 ホモ二量体化の阻害であり、プロテアソームの集合因子の阻害である為、異なる様式のプロテアソーム阻害活性が期待される。 Izumikawa らによる報告内で、HeLa 細胞において細胞死を誘導する際に、長時間を要する点は、新たな作用機序を示していると考えられる(97)。

BiFC は、FRET と比較し、PPI を検出する為の条件検討が複雑ではない。すなわち、FRET はドナーFP とアクセプターFP の組み合わせの選択 (波長の重なりや FP 間ヘテロダイマー形成の有無)、FP 間の距離および発色団の配向 (FP

と測定対象タンパク質間のペプチドリンカーの調整)、フィルターの選択などの検討項目が多いが、BiFCでは上記の様な複雑な検討は不要である。実際、本研究で検討された TCF7/β-catenin では、mKG 断片の融合位置を検討した 8 通りの組み合わせ全てにおいて、蛍光シグナルが検出された。本研究で使用した mKG 断片と標的タンパク質の間のペプチドリンカーは全て同一配列であり、27 アミノ酸のセリンとグリシンから構成されるフレキシブルリンカーである。従って、本研究で開発した方法論は系の構築が簡便であり、多様な PPI を検出できる可能性が示唆された。BiFC を用いることで新規 PPI をハイスループットに同定する手法は既に試みられている(103,104)。しかしながら、cDNA ライブラリーの各サンプルを細胞に発現させる場合、細胞毒性などにより PPI を評価できない場合が存在する可能性がある。本研究で構築した系は *in vitro* であり、更に小麦胚芽系を用いることでタンパク質のフォールディングも良好である為、創薬スクリーニングのみならず、cDNA ライブラリーから新規 PPI を同定する用途に応用できる可能性が考えられる。

一方で、BiFC は不可逆反応である点が課題である。PPI の有無を評価する手法としては有用だが、生きた細胞内では *obligate* な PPI 以外では相互作用の有無が変化するため、PPI の変化は追跡できない。この様な課題を有するが、本研究ではタンパク質を個別に合成する事で、PPI 阻害剤のスクリーニングを実

施す事ができた。本研究で開発したスクリーニング手法を考慮すると、同定された化合物は、PPI が起こる前の状態の単量体のタンパク質に結合し、PPI の発生を阻害する作用機序を有すると考えられる。しかしながら、本手法では、既に発生している PPI を積極的に解離させられるか否かについては、判定する事ができない。更に、*in vitro* の系である為、同定された化合物が細胞膜を透過するか否かについても判定することができない。上記を検証する為には可逆的な PPI を評価することができるセルベースアッセイ系が必要である。

# 第三章 液相転移を利用した PPI 可視化法の開発

## 第一節 序論

前章ではインビトロ BiFC を用いた新規 HTS 系を構築し、HTS を実施する事で特異的な PPI 阻害剤が同定された。本研究では次に、細胞内で PPI を検出するためのセルベースアッセイ系の開発に取り組んだ。なぜなら、PPI 調整剤は一般に分子量が大きい為、インビトロ系で同定した化合物が細胞膜を通過し、細胞内で効果を発揮するか否かを検証する必要があるためである。例えば前章で同定した化合物はプロテアソーム阻害であるため、タンパク質の分解をモニターすることで化合物の効果を検証することは可能である。しかし、表現型を検出する作用機序のアッセイ系では標的ごとに別個の系を選択する必要がある、また、細胞内での PPI 阻害を直接検出せず、PPI 阻害後に様々なシグナル伝達系を経由した結果を検出することが多く、オンターゲット効果なのか、オフターゲット効果なのかを判定できない課題がある。その好例としては Vogler らの報告が挙げられる(105)。彼らは、文献報告のあった 6 種の Bcl2 阻害薬を比較し、細胞内で実際に Bcl2 に作用する化合物は 1 種のみであり、他 5 種は別の作用機序、すなわちオフターゲット効果により細胞死を引き起こすことを示した(105)。特異的な Bcl2 阻害剤ではなかった 5 種は、インビトロアッセイにより Bcl2 に

結合する化合物であると同定され、表現型アッセイにより細胞死を引き起こす活性をもつことは示されている。しかし、結果的には、どれも目的とした作用機序、すなわち Bcl2 の PPI を調整する作用機序ではなかった。このような誤認を防ぐために、適用範囲が広く、尚且つ同定した化合物が細胞内で目的の作用機序、すなわち PPI を調整する効果を有するか否かを評価する系が必要であると考えた。

第一章で述べたように、細胞内で PPI を検出する手法は複数存在する。私は汎用性の高いアッセイ系を開発することを目的としたため、「第一群」の FP 等のタグの近接を利用した手法は選択しなかった。なぜなら、これらの群はリンカーの最適化等、系の構築が煩雑なためである。BiFC については第一章で述べたインビトロ系で実証されてはいるものの、不可逆的である為、細胞内で発現させた後で化合物を添加し、PPI の阻害効果を検出する事はできない。また、化合物を添加した状態で遺伝子導入もしくは発現を誘導した場合は、遺伝子導入、転写、翻訳の過程を阻害する様な作用点の異なる化合物も偽陽性として判定されてしまう。そこで、本研究では系の構築が簡便な「第二群」の手法を選択し、更に、前述した手法が有する課題を克服可能な、質的に異なる原理に基づいた PPI 検出方法の開発に取り組んだ。

この目的を達成するために、タンパク質が相転移により液状を維持しつつ分



離され、区画化される現象（液相転移）に着目した。液相転移による液相液滴は、細胞内に普遍的に存在する、膜に包まれないオルガネラ様構造体として近年研究が進んでいる(106,107)。同構造体の多くは Processing body (P-body)や核小体などの RNA-タンパク質の複合体（RNP body）であるが、近年、Liらはシグナル伝達因子の多価結合が液相液滴を形成することを実証した(108)。本研究では、ホモ多量化能力を有する2つのタンパク質タグを設計し、両タグに融合したタンパク質の相互作用依存的な会合により架橋が形成され、液相液滴への相転移が促進されるかどうかを検討した。1つのタンパク質タグは、p62 / Sequestosome1(SQSTM1)の Phox-Bem1p (PB1) ドメインである。p62 PB1ドメインは、一方の側に酸性/疎水性残基を含み、他方の側にリジンおよびアルギニン残基を含有する。これにより、前-背面のトポロジーで高分子量のホモオリゴマーを形成する（図6 a、上）(109,110)。第2のタグは、obligate 四量体を形成するサンゴ由来の緑色発光 FP、Azami-Green (AG) である（図6 a、下）(111)。この系を利用し、生細胞内における蛍光輝点として、PPI 依存的な液相液滴を形成させることに成功した。Fluoppi と命名したこの方法は、HCA および HTS に適しており、多くの異なる PPI を生きた細胞内でモニタリングすることができる。

## 第二節 材料と方法

### 化合物

Rapamycin と nutlin-3 は Merck Millipore から購入した。AT-406 と LCL-161 は Active Biochemicals から購入した。B/B Homodimerizer (HD) と Washout Ligand (WL) はタカラバイオから購入した。

### プラスミド DNA の構築

本章で使用した全てのプラスミド DNA は、phmAG1-MNLinker もしくは phmAG1-MCLinkler (医学生物学研究所) の骨格を使用した。PB1 は、ヒト SQSTM1 (GenBank: NM\_003900) のアミノ酸配列番号 1-102 を使用した。PPI 解析に用いたタンパク質の領域は、以下である。mTOR: ヒト MTOR (NM\_004958) のアミノ酸配列番号 2025-2114、FKBP12: ヒト FKBP1A (NM\_000801) の全長、p53: ヒト TP53 (NM\_000546) のアミノ酸配列番号 1-70、MDM2: ヒト MDM2 (NM\_002392) のアミノ酸配列番号 1-119、calmodulin: ヒト CALM1 (NM\_006888) のアミノ酸配列番号 3-149、M13 peptide: ヒト MYLK2 (NM\_033118) のアミノ酸配列番号 566-591、XIAP: ヒト XIAP (NM\_001167) のアミノ酸配列番号 243-356、SmacNT: ヒト DIABLO (NM\_019887) のアミノ酸配列番号 56-64、BclXL: ヒト BCL2L1 (NM\_138578) のアミノ酸配列番号 1-209、BH3: ヒト BAD (NM\_004322) のアミノ酸配列番号 103-127、HRas: ヒト HRAS (NM\_001130442) のアミノ酸配列番号

1-172、cRaf: ヒト RAF1 (NM\_002880) のアミノ酸配列番号 51-131、ERK2: ヒト MAPK(NM\_002745)の全長。FKBP12(F36V) and PB1(D67A, D69R)は、先行文献と同様の方法で変異を導入し作製した(112)。

### cDNA クローニング

石サンゴ *Scolymia vitiensis* は、アカ島（沖縄）の海から採取された。サンゴの総 RNA はグアニジンチオシアネート法によって単離された。

5'-ATCAAGNTNWRATGGAAGG-3' および

5'-ACVGGDCCATYDGVAAGAAARTT-3' (R = A または G; Y = C または T; V =

A, C または G; および D = A, G, または T) のプライマーを用いて、全長 cDNA

を作製した。その後、タンパク質コード領域を 5'-BamHI および 3'-EcoRI 部位

を含むプライマーを用いて増幅した。制限酵素で処理した DNA 断片を大腸菌で

発現させるために、pRSETB (Thermo Fisher Scientific) の BamHI / EcoRI

部位にクローニングした。哺乳動物細胞における発現効率を高めるため、BamHI

部位の後にコザックコンセンサス配列 (CCACCATG) を含むように遺伝子の 5

'末端を PCR によって改変した。

### タンパク質精製

リコンビナント Momiji (Mmj)タンパク質は、N 末端に His タグを融合し、

*Escherichia coli* (JM109 DE3)で発現させ、先行文献と同様の方法で精製した(111)。

## 細胞培養と遺伝子導入

HeLa、Human embryonic kidney cells 293 (HEK293)、Cos-7、U2OS および Chinese hamster ovary (CHO)-K1 細胞は、American Type Culture Collection (ATCC)から購入した。これらの細胞は、10%ウシ胎児血清 (FBS) およびペニシリン・ストレプトマイシン (Life Technologies) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM、Sigma) で培養した。Polyfect (Qiagen) または Fugene HD (Promega) によりプラスミド DNA を遺伝子導入し、20～24 時間後に細胞を観察した。FRB-FKBP および p53-MDM2 の恒常発現細胞株は、G418 およびハイグロマイシン B を用いて選択し、その後、限界希釈法により単一クローンを単離した。

## レトロウイルスによる恒常発現細胞株の作製

XIAP-AG および SmacNT-PB1 の恒常発現細胞株の樹立は、pQCXIP および pQCXIH (Clontech) レトロウイルスベクターを用いた。GP2-293 パッケージング細胞 (Clontech) によりウイルス粒子を作製し、HEK293T 細胞に感染させ、ピューロマイシンおよびハイグロマイシン B による選択の後、限界希釈法により単一クローンを単離した。

## Wide-field 蛍光顕微鏡による細胞の観察

細胞は、35 mm ガラスボトムディッシュ (IWAKI) または 8 穴ガラスボトム

チャンバースライド (Thermo Scientific) 上で増殖させた。蛍光観察には、IX71 倒立顕微鏡 (オリンパス)、75W キセノンランプ、CCD カメラ (ORCA-ER; Hamamatsu) を用いた。使用した対物レンズは×20 (UPlanApo、NA=0.7)、×40 (UPlanFLN、NA=1.30)、×60 (UPlanSApo、NA=1.35) であった。AG および光変換前の Mmj は BP460-480HQ、BA495-540HQ、DM485

(U-MGFPHQ、オリンパス) の光学フィルターユニットで観察した。

Hoechst33342 の観察には、BP330-385、BA420、DM400 からなるフィルターユニット (U-MWU2; オリンパス) を用い、光変換後の Mmj には 580AF20、600DRLP、645AF75 (Omega Optical) を用いた。KO の観察には、BP520-540HQ、BA555-600HQ、DM545HQ (FSET-KOHQ; オリンパス) を用いた。Epidermal Growth Factor (EGF) 刺激によるライブイメージングには、フェノールレッドを含まない DMEM に 25 mM HEPES (pH 7.4) および 10% FBS を添加した観察培地を使用し、ステージトップインキュベーター (MI-IBC; Tokai Hit) により温度と湿度管理を行った。画像の取得および解析には、MetaMorph ソフトウェア (バージョン 7.8.9.0) (Molecular Devices) を用いた。

### **Photo convertible Fluoppi (pcFluoppi)**

Mmj の光変換は、視野絞りの位置にセットした自家製ピンホールを用いて、バンドパスフィルタ (BP330-385) により行った。光変換後の Mmj からの赤色

蛍光は、蛍光輝点を手動でセグメント化し、測定した。画像の取得および解析は、MetaMorph ソフトウェア（バージョン 7.8.9.0）（Molecular Devices）を用いて行った。

## **FRAP**

細胞は 35 mm ガラスボトムディッシュ（IWAKI）上で培養した。×63（Plan-Apochromat、N.A. = 1.4）、アルゴンガスレーザー（488nm）、バンドパスフィルター（BP505-530）を用いて LSM 5 EXCITER（Carl Zeiss）を用いて FRAP 実験を行った。画像解析は、ZEN black edition ソフトウェア（Carl Zeiss）を用いて行った。

## **液相液滴のタイムラプスイメージング**

Punctum Intensity (P.I.)は、液相液滴内の蛍光強度を測定し算出した。画像中の蛍光輝点は、ICY open bioimage informatics platform (ICY)の spot detector アルゴリズムを用いて自動的に検出した(113)。液相液滴のアスペクト比の測定には、ICY の active contours アルゴリズムを用いた。

## **全反射蛍光顕微鏡イメージング**

細胞は 35 mm ガラスボトムディッシュ（IWAKI）上で培養した。蛍光観察には、IX71 倒立顕微鏡（オリンパス）、75W キセノンランプ、CCD カメラ（ORCA-ER、Hamamatsu）、アーク式全反射ユニット（ARCEVA、オリンパ

ス)を用いた。使用した対物レンズは×60 (ApoN、N.A. = 1.49)であった。

AGの蛍光はBP460-480HQ、BA495-540HQ、DM485 (U-MGFPHQ、オリンパス)の光学フィルターユニットを用いて観察した。

### 画像解析による nutlin-3 の濃度依存性曲線の測定

恒常発現細胞株を40,000細胞/ウェルで底面が透明なポリ-D-リジン96穴ブラックプレート (Corning) に播種し、37°C、5%CO<sub>2</sub>下で20時間インキュベートした。各濃度の nutlin-3 を室温で30分間処理した後、4%パラホルムアルデヒド (PFA) で10分間細胞を固定し、次いでHoechst33342 (同仁化学) で30分間染色した。IN Cell Analyzer 2200 (GEヘルスケア) を用いて画像を取得した。10倍の対物レンズを用いて撮影し、各画像では2,206細胞以上の細胞を解析した。Nutlin-3の各濃度について、N=3ウェルとした。画像解析は、In Cell Investigator (GEヘルスケア) を用いて行った。緑色 (AG) 及び青色

(Hoechst33342) 蛍光画像 (図8a参照) は、それぞれ、蛍光輝点および核をモニターするために使用し、セグメンテーションアルゴリズムにより自動的にセグメント化した。平均P.I.値は、セグメント内の緑色蛍光強度を核の数で割ることで算出し、nutlin-3の最低濃度の値で標準化した値をそれぞれプロットした (図8b)。カーブフィッティングは、カレイダグラフ (Synergy Software) を用いて行った。

### プレートリーダーによる nutlin-3 の濃度依存性曲線の測定

恒常発現細胞株を 20,000 細胞/ウェルでポリ-D-リジン 96 穴ブラックプレート (Corning) に播種し、37°C、5%CO<sub>2</sub> 下で 20 時間インキュベートした。各濃度の nutlin-3 を室温で 30 分間処理した後、0.75%PFA および 2%Triton X-100 で 15 分間細胞を固定し、次いで Hoechst33342 (同仁化学) で 30 分間染色した。代表的な画像 (図 8c) は、細胞をガラスボトムディッシュに播種し、同様の処理を行った細胞を倒立顕微鏡 IX71 (オリンパス) を用いて取得した。緑色 (AG) 及び青色 (Hoechst33342) 蛍光強度を、Wallac Arvo HTS 1420 マルチラベルカウンター (Perkin-Elmer) を用いて測定した。nutlin-3 の各濃度について、N=3 ウェルとした。平均 P.I.値は、緑色蛍光強度を青色蛍光強度で割ることで算出し、nutlin-3 の最低濃度の値で標準化した値をそれぞれプロットした (図 8d)。カーブフィッティングは、カレイダグラフ (Synergy Software) を用いて行った。

### 画像解析による AT-406 の濃度依存性曲線の測定

恒常発現細胞株を 40,000 細胞/ウェルで底面が透明なポリ-D-リジン 96 穴ブラックプレート (Corning) に播種し、37°C、5%CO<sub>2</sub> 下で 20 時間インキュベートした。各濃度の AT-406 を室温で 15 分間処理した後、4%パラホルムアルデヒド (PFA) で 10 分間細胞を固定し、次いで Hoechst33342 (同仁化学) で 30



分間染色した。Cell Voyager CV7000（横河電機）を用いて画像を取得した。20倍の対物レンズを用いて撮影し、各画像では2,679細胞以上の細胞を解析した。AT-406の各濃度について、N=3ウェルとした。画像解析は、Cell Voyager 付属の解析ソフトウェア（横河電機）を用いて行った。緑色（AG）及び青色（Hoechst33342）蛍光画像（図8f参照。）は、それぞれ、蛍光輝点および核をモニターするために使用し、セグメンテーションアルゴリズムにより自動的にセグメント化した。平均P.I.値は、セグメント内の緑色蛍光強度を核の数で割ることで算出し、AT-406の最低濃度の値で標準化した値をそれぞれプロットした（図8g）。カーブフィッティングは、カレイダグラフ（Synergy Software）を用いて行った。

### 第3節 結果

#### PB1 と Azami Green (AG)融合による細胞質顆粒の形成

インビトロ研究により、p62 PB1 ドメインの隣接する酸性表面と塩基性表面との間の静電相互作用は、PB1 のホモオリゴマー化をもたらし、高分子量生成物を形成することが明らかとなっている(109,110)。また、PB1 は、p62 を断片化したプラスミド DNA を遺伝子導入した細胞において、細胞質で蛍光輝点の形

成を担うことも見出されている(114)。後者の発見は GFP タグを用いた実験から得られたものであるが、全てのタグはその融合タンパク質の挙動に影響を与えるリスクがある。そこで、私は PB1 に複数の FP を融合後 HeLa 細胞に遺伝子導入し、それらの細胞内分布を調べた。その結果、PB1 を AG およびその単量体 (monomeric Azami Green1; mAG1) に融合した場合、細胞質における蛍光分布に顕著な差異が観察された (図 6 b、Transient)。AG-PB1 を発現する細胞 (Cos-7) はマイクロメートルサイズの蛍光輝点を示したが、mAG1-PB1 を発現する細胞は拡散状のパターンを示した。この分布の差は、AG-PB1 および mAG1-PB1 を恒常的に発現する HeLa 細胞においても観察され (図 6 b、Stable)、上記融合タンパク質の性質には持続性があることを示唆している。また、他の細胞株を用いた一過性発現実験からも同様の結果が得られた (補足図 1a、b)。

AG はサンゴ由来であり、リソソームプロテアーゼに耐性があるため、蛍光輝点は基底レベルのオートファジーの結果として AG-PB1 を蓄積するリソソームを反映している可能性がある(115)。しかし、共焦点顕微鏡により観察した結果、AG-PB1 の蛍光輝点はリソソームと共存していないことを示した (補足図 1c)。

これらの結果は、mAG1-PB1 は細胞質内で自由に拡散するが、AG-PB1 は細胞質に集積していることを示唆している。注目すべきことに、AG-PB1 トランスフェクションによる蛍光輝点形成は、発現細胞の細胞密度および細胞周期とは

無関係に絶えず観察された (data not shown)。さらに、AG-PB1 恒常発現細胞は、対照細胞と同じ増殖速度を示した (data not shown)。これらの結果より、観察された蛍光輝点を、生細胞における FP 融合構築物の四次構造を反映する指標として利用することが考えられた。

### **PPI 依存的な PB1 と AG の相互作用による、顆粒形成の可視化**

私は、任意の 2 つのタンパク質 (X および Y) 間の PPI において、それぞれの相互作用部位を AG および PB1 に融合させ、生きた細胞における蛍光輝点の形成を指標に X-Y 間の相互作用を判定できるか検討を行った (図 7 a)。この方法論の評価モデルとして、mTOR の FRB ドメインと FKBP12 (FKBP) を採用した (図 7 b) (116,117)。HeLa 細胞 (図 7 b、Transient) へ PB1-FKBP および FRB-AG をコトランスフェクションすると、まず細胞質全体に均質な緑色蛍光の分布が観察された (-5 分)。しかし、100 nM の rapamycin で数分間処理すると、蛍光分布は劇的に変化し、1 マイクロメートル以下のサイズの蛍光輝点 (5 分) を形成した。蛍光輝点形成の過程を観察する為に、PB1-FKBP および FRB-AG を恒常的に共発現する HeLa 細胞を用いたライブイメージングを行った (図 7 b、Stable、補足ビデオ 1)。20 nM の rapamycin を添加して数分後、1 マイクロメートル以下のサイズの蛍光輝点が細胞質中で検出された。長時間 (約 70 分) 観察した結果、蛍光輝点同士が融合し、より大きな輝点を形

成する様子が観察された（補足ビデオ2）。この際、2つの輝点は接触後に融合し、数分で形態が球状になった（補足図2a）。これは、観察された顆粒が、液相である可能性を示唆している。

これらの結果は、AG-PB1間の共有結合だけでなく非共有結合においても、両タグが有する多価性により、蛍光顕微鏡で検出可能な蛍光輝点を形成し得ることを示す。すなわち、AGおよびPB1の両者がホモオリゴマー化する性質を有するため、それぞれが架橋されることにより、集積すると考えられる。実際、AGをmAG1に置き換えた場合、またはPB1にオリゴマー化を抑制するような変異を導入した場合（PB1（D67A/D69R））、rapamycin（100 nM）処置を行っても細胞内蛍光分布は拡散状から輝点状に変化しなかった（補足図2b）。

### **PB1/AG系を利用した、汎用性の高い可逆的なPPI検出**

次に、私は形成された蛍光輝点が解離可能であるかどうかを検討した。拡散状パターンと輝点状パターンとの間の可逆性を調べるために、特定のPPI阻害剤、nutlin-3の投与によってPPIを解離させることができるp53およびMDM2を使用した(20)。PB1-p53およびAG-MDM2をHeLa細胞に一過的にコトランスフェクションし、1日後に観察した結果、融合によってサイズが拡大した直径1~5 μmの明瞭な蛍光輝点が細胞質に形成された（図7c、-1分）。これらの細胞にnutlin-3（20 μM）を投与すると、輝点は分散し始め（図7c、1分）、3

分以内に完全に消失した（図 7 c、3 分、補足ビデオ 3）。蛍光輝点を定量するために、輝点内の総蛍光強度を測定した。本研究では、「punctum intensity (P.I.)」を PPI の指標として用いた（定量方法は補足図 2 c 参照）。細胞 1 および 2 の P.I. 値の経時変化を図 7 c、右端に示す。以上より、2 つのタンパク質間の可逆的 PPI は、両者を PB1 および AG に遺伝的に融合させることによって、生細胞内で可視化できることがわかった。また、PB1 / AG システムは、細胞質内だけでなく、核内（補足図 2 d）および形質膜直下（補足図 2 e、補足ビデオ 4）での PPI にも適用することができた。本手法は fluorescent ppi visualization (Fluoppi) と命名された。

次に私は、AG を他のオリゴマーFP と置き換えることができるかどうかを検討するため、主に二量体で存在するオレンジ色 FP、Kusabira-Orange (KO) を使用した(118)。KO を用いて Fluoppi 系を構築し、カルモジュリン (calmodulin; CaM) とその標的ペプチド (M13) との間のカルシウム依存的相互作用をリアルタイムで観察した（図 7 d）(119)。HeLa 細胞に M13-PB1 と CaM-KO をコトランスフェクションした後、1.5 秒の間隔でタイムラプス観察を行った。過剰量の histamine (100  $\mu$ M) を添加した結果、数分間に渡り、細胞あたり約 10 個の小さな蛍光輝点が振動形成した（補足ビデオ 5）。興味深いことに、各蛍光輝点の大きさと位置は一定していた(120)。P.I をプロットした

結果、典型的なカルシウム振動パターンを得た（図 7 d、右端）(119)。以上の結果は、Fluoppi が可逆的 PPI を秒単位の間隔で繰り返し検出することができることを示した。また、複数の PPI を同時に検出するために、FP のレパートリーを拡張し、多色 Fluoppi を設計できる可能性が示唆された。

#### 低バックグラウンドで高い信頼性を有する、化合物スクリーニング系への応用

次に、HCA を用いて、Fluoppi が PPI 阻害剤の評価に適用可能か検討した。PB1-p53 および AG-MDM2 を恒常的に発現する CHO-K1 細胞が、（図 7 c）で示す一過性発現同様、nutlin-3 の添加で蛍光輝点の消失を引き起こすことを確認した。尚、恒常発現株では、各細胞 2 ~ 3 個の巨大な蛍光輝点を形成した。注目すべきことに、これらの蛍光輝点は、4%パラホルムアルデヒド（PFA）で 10 分間処理しても、蛍光が減弱する、或いは蛍光輝点が解離する等の変化は一切見られなかった。したがって、固定した細胞サンプルにおいて、蛍光輝点を定量化することができた。固定後の細胞にて、0.3 および 40  $\mu\text{M}$  の nutlin-3 添加による蛍光分布の変化を観察した結果を、図 8 a に示す。同様に、nutlin-3 添加による、濃度依存的な P.I. の変化を図 8 b に示す。IC<sub>50</sub> 値は  $5.7 \pm 0.6 \mu\text{M}$ （mean  $\pm$  SD、n = 3）であり、既存文献の細胞ベースのアッセイによって決定された値と一致した(121)。同様に、FRB-AG / PB1-FKBP の rapamycin の half maximal (50%) effective concentration (EC<sub>50</sub>)値は、 $15.1 \pm 1.7 \text{ nM}$  であった(補

足図 3 a、b)。同値も、既存文献での値と同程度であった(122)。

Fluoppi の 2 つの極端な分布の差を利用し、PPI 定量のための HTS システムを構築できないか、検討した。低濃度の PFA (0.75%) により長時間固定すると同時に、2% Triton X-100 を添加することで細胞膜に穴を開けたところ、拡散性の AG 融合タンパク質は細胞から洗い流され、蛍光輝点に存在する AG は細胞内に保持されていた (図 8 c)。従って、同処理を施した細胞を洗浄後、光電子増倍管 (photomultiplier tube ; PMT) を用いて細胞内に残存する蛍光強度を測定することで、PPI を定量的に測定する事ができると考えた。私は、マイクロプレートリーダーを用いて、PB1-p53 / AG-MDM2 に対する nutlin-3 の濃度依存的変化を測定した。この測定では、AG の蛍光輝度を Hoechst の蛍光輝度で割った値を P.I. とした。IC<sub>50</sub> 値は  $5.4 \pm 0.4 \mu\text{M}$  (mean  $\pm$  SD、n = 3) であり、図 8 d で得られた値と同等であった。

次に私は、Fluoppi が XIAP 阻害薬の評価に適用可能か検討を行った。XIAP の BIR3 ドメインおよび Smac の N 末端領域 (SmacNT) を使用して Fluoppi アッセイを構築し、SmacNT-PB1 および XIAP-AG を恒常的に共発現する HEK293 細胞を作製した。これらの細胞はそれぞれ、細胞質に数個の大きな蛍光輝点を有していた (図 8 e、-5 分)。次に、同細胞に AT-406 を添加した。AT-406 は、carboplatin との併用療法で有効であることが示されている XIAP 阻害薬で

ある(123)。AT-406 (25  $\mu\text{M}$ ) を添加後にタイムラプス測定を行った結果、10分以内に蛍光輝点が消失した (図 8 e、補足ビデオ 6)。AT-406 の濃度依存性曲線より、IC<sub>50</sub> 値は  $9.2 \pm 1.2 \mu\text{M}$  (平均  $\pm$  SD、n = 4) と算出された (図 8 f、g)。この値は、細胞毒性アッセイから導き出された値と一致する(124)。タイムラプス観察により、AT-406 (50  $\mu\text{M}$ ) の PPI 阻害過程を、別のよく知られた XIAP 阻害剤、LCL-161 (50  $\mu\text{M}$ ) と比較した (補足図 3 c、d)。その結果、AT-406 は、LCL-161 よりも PPI を阻害するまでに要する時間が長かったが、一方で、より強力で持続的であった。

#### 光変換型 Fluoppi による、PPI キネティクスの測定

Fluoppi は可逆的に PPI を観察できるため、AG を四量体の光変換型 FP と置換することで、不可逆的に蛍光波長を変換した蛍光輝点と、変換していない輝点との間での、蛍光分子の交換速度を解析する事が可能となった。本研究では *Scolymia vitiensis* から、新しい光変換型 FP、Momiji (Mmj) をコードする cDNA をクローニングした。Mmj は Kaede と 74% のアミノ酸配列相同性を示し、同一の発色団形成トリペプチド (His63-Tyr64-Gly65) を有する (補足図 4 a)。また Kaede と同様に、Mmj は ultra violet (UV) ~ 紫色域の光を照射することにより緑色 FP から赤色 FP に変換される性質を有する (補足図 4 b-e)。しかしながら、Mmj は Kaede よりも明るく、より高い光変換量子効率を示した (data not



shown)。 Mmj は四量体であるため、Fluoppi システムに適用可能であった。

私はまず、Mmj-PB1 を Cos-7 細胞にトランスフェクトした (図 9 a)。トランスフェクション 1 日後、各発現細胞は約 10 個の緑色蛍光輝点が形成された。そのうちの 1 つを UV 光の局所照射により光変換した。その結果、120 分間の観察中、赤色および緑色の蛍光に変化は見られず、安定していた。この波長変換した輝点は、光変換 990 分後においても安定して存在しており、新たに合成された緑色の分子に取り囲まれてはいたものの、変換時の形状を保っていた。

次に私は、PB1-p53 および Mmj-MDM2 を Cos-7 細胞にコトランスフェクションした (図 9 b)。 PB1-p53 / AG-MDM2 同様、PB1-p53 / Mmj-MDM2 の可逆性は、別途 20  $\mu$ M の nutlin-3 を用いて確認済である (補足図 4 f)。私は、4 つの緑色蛍光輝点を有する細胞を選択し、そのうちの 1 つを光変換した。赤/緑のコントラストは 1 分後には高かったが、徐々に低下した。 2 時間後、4 つの輝点は全て同様の色であった。以上より、Mmj-MDM2 は (恐らく PB1-p53 も)、4 つの蛍光輝点の間を移動していると結論した。これらの結果は、Fluoppi において形成された蛍光輝点間の分子の交換は、PB1 や AG ホモオリゴマーのオン/オフ速度には依存せず、X と Y の相互作用間のキネティクスに依存することを示唆している。尚、DsRed の四量体は非常に強力的に結合し obligate tetramer であることが示されていることから、同じくサンゴ由来の Mmj や AG も、DsRed

同様、解離しないと考えられる(44)。

最後に、私は細胞内で PPI の親和性を検討する方法として photoconvertible Fluoppi (pcFluoppi) を利用できないか検討を行った。私は、BclXL と BAD 由来の BH3 ペプチドとの間の PPI に着目した。同相互作用は、0.6 nM と低い Kd 値であることが報告されている(125)。他方、弱い親和性のモデルとして、PB1-p53 および Mmj-MDM2 を採用した。MDM2 / p53 の Kd 値は 260 nM と報告されている(126)。本系では、より定量的な分析を行うために、PB1-BclXL / Mmj-BH3 および PB1-p53 / Mmj-MDM2 をそれぞれ 1 : 1 の化学量論比で発現させるために、*Thosea asigna* virus 2A (T2A) バイシストロニック発現系を用いた。更に、各実験においては、2 つの緑色蛍光輝点を有する細胞を選択した。一方の蛍光輝点を光変換し、1 時間観察を行った結果、PB1-BclXL / Mmj-BH3 では赤色分子の交換は起こらなかった (図 9 c)。しかし、PB1-p53 / Mmj-MDM2 では、交換が観察された (図 9 d)。同様の結果は、他の 3 つの細胞で得られている (補足図 4 g、h)。

### **Fluoppi の蛍光輝点が示す liquid-phase droplet 様の挙動**

液相転移による液相液滴は、細胞内に普遍的に存在する、膜に包まれないオルガネラ様構造体として近年研究が進んでいる(106,107)。Hyman らは、*C. elegans* 胚の RNA および RNA 結合タンパク質を含む P granule の挙動を元に、

細胞内における液相液滴を以下の様に定義した(106)。

- 細胞質と物質の交換が可能であるが、表面張力により、球状の形態を示す。
- 2つの液滴が接触後融合し、その後、球状の形態を示す。
- 液滴の半分を褪色させると、内部の再編により、褪色領域の蛍光が回復する。
- 液滴周囲の流れ（せん断流）により、変形する。

上記の内、細胞質を物質の交換が可能である点は、pcFluoppi で示した（図 9 b, d）。Fluoppi の蛍光輝点が他の定義を満たすか否か、恒常発現細胞株(CHO-K1)

（図 8）における PB1-p53 / AG-MDM2 の蛍光輝点をモデルとして、検証を行った。まず、直径 1~6  $\mu\text{m}$  の蛍光輝点を用いて、融合過程の観察（図 10 a）および FRAP 実験(図 10 b)を行った。融合後の液滴のアスペクト比より、Fluoppi の液相液滴は球形であることが示唆された。FRAP の実験手法は、液滴の半分の褪色ではなく、一部の褪色のみで実施し、液相液滴を示した報告にならった(127)。Fluoppi において、蛍光輝点の融合時間と FRAP の回復時間より、個々の蛍光輝点内部が流動的であり再編成がおこなわれていることが示唆された。

次に、大きな蛍光輝点 (>10  $\mu\text{m}$  の大きさ) を有する細胞の位相差画像(phase contrast; PC)を取得した（図 10 c、左、PC）。蛍光画像（図 10 c、左、AG + PC）と比較すると、蛍光輝点は液相を示す均一な媒体から構成されることが明らかになった。タイムラプス観察の結果、これらの巨大な蛍光輝点は、細胞の運動

に応じて変形可能であり、細胞分裂時に分割される様子が観察された (図 1 0 c、右、補足ビデオ 7)。Hyman らの定義には含まれないが、近年、2 次元での液相液滴形成が Banjade らにより報告された(128)。Fluoppi における蛍光輝点が 2 次元での同様の挙動を示すか検証する為、全反射蛍光顕微鏡 (図 1 0 d) により形質膜上の PB1-HRas および AG-cRaf の相互作用を観察した。EGF 刺激により、細胞表面にマイクロメートルサイズのクラスターが形成された (補足ビデオ 8、左)。このパターンは、PB1 のオリゴマー化能力を欠失させた際には観察されなかった (図 1 0 e、補足ビデオ 8、右)。Banjade らは同様の二次元相分離を、接着分子ネフリンおよびその細胞質パートナー non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1 (Nck)、そして Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP)を含むクラスターが脂質二重層上で形成される系で、報告している(128)。

#### 単一の融合タンパク質を用いたタンパク質ホモ二量体化の可視化

本研究では、ホモ二量体を形成する目的のタンパク質 (X) を mAG1-PB1 に融合させることで Fluoppi システムを拡張し、タンパク質ホモ二量体形成過程を可視化 (homoFluoppi) した (図 1 1 a)。HomoFluoppi では、X のホモ二量体化と PB1 のホモオリゴマー化により架橋が起こり、緑色蛍光を発する液相液滴が形成される。これまでに、PB1 に AG を融合すると、同融合タンパク質

は両ドメインのホモ多量体形成能により分子間で架橋を形成し、液相液滴を形成することが示され (図 6 b)、四量体 AG は二量体 KO に置換可能であることが示された (図 7 d)。上記より、KO を更に任意の二量体形成タンパク質 X に置換する事で、液相液滴が形成されることが予想される。この際、X-PB1 は蛍光を発しない為、X-PB1 の液相液滴形成に影響を与えない mAG1 を更に融合すること、すなわち、mAG1-PB1 を X に融合する事で、X のホモ二量体形成を可視化できると推察される。この場合、AG-PB1 は常に蛍光輝点を形成するため、AG の使用は適切ではない。homoFluoppi の有効性を実証するために、私は F36V 変異を有する FKBP12 (FKBP12 (F36V)) を使用した。FKBP12 (F36V) のホモ二量体化は薬理的に制御することができ、B / B ホモダイマライザー (HD) により誘導され、B / B ウォッシュアウトリガンド (WL) により解離する。PB1-mAG1-FKBP12 (F36V) を恒常的に発現する HEK293 細胞を作製したところ、細胞内緑色蛍光は均一に分布していた (図 1 1 b, 20)。500 nM の HD を添加すると、蛍光輝点が形成され、数時間で徐々に大きくなった (図 1 1 b, 180)。次に、PBS で洗浄し、続いて 1  $\mu$ M の WL を添加した結果、蛍光輝点は 1 時間以内に消失した (図 1 1 b, 296、補足ビデオ 9)。

ERK2 のホモ二量体化はインビトロの生化学的実験では示されているが、細胞内では統一された結果が示されていない。そこで本研究では homoFluoppi を

適用し、**ERK2** のホモ二量体形成過程を観察した（図 1 1 c、補足ビデオ 1 0、1 1）。**ERK2-mAG1-PB1** が遺伝子導入された細胞は、細胞質において僅かな蛍光輝点しか形成しなかった。そこへ **EGF** 刺激（50 ng / ml）を加えると、蛍光輝点の数および大きさは、約 10 分で一過的にピークに達した。いくつかの細胞では、後に第 2 の一過的な増加が観察された（図 1 1 c、細胞 1）。このような一過性または振動性の挙動は、**EGF** 刺激細胞における **ERK2** の核移行において観察されている(129)。本系では、蛍光輝点は核の外で検出された。これは、**ERK2** のホモ二量体化には細胞質中の足場タンパク質が必要であることを示唆している(130)。**ERK2** のホモ二量体化の調節を分析するために、更に薬理学的実験を行った（図 1 1 c、下）。まず、**ERK** ホモ二量体化阻害薬として知られる低分子化合物（**DEL22379**）の効果を検討した(131)。20  $\mu$ M の **DEL22379** で 30 分間前処理した結果、**EGF** 依存的な蛍光輝点の形成は阻害された。次に、**MEK** 阻害剤 **U0126**（10  $\mu$ M）にて細胞を前処理した。その結果、**EGF** 依存的な蛍光輝点形成は有意に減少し、**ERK2** のホモ二量体化は **MEK** によるリン酸化が必要であることが示唆された。

#### 第四節 考察

生命の根幹をなす PPI を生細胞内でモニタリングする手法は、タンパク質が機能するための分子メカニズムの解明や、疾患発症の原因となる PPI を調節する低分子化合物を探索する研究にとって重要である。インビトロアッセイは顕著な細胞毒性を有する化合物や、アッセイ特有の偽陽性を示す化合物を除くことはできない為、生体細胞の PPI をモニタリングするセルベースアッセイが必要である。本研究で開発したセルベースアッセイ法は「Fluoppi」として既に市販され利用されている(132-134)。Fluoppi は非常に簡便なアッセイであり、測定方法も複雑では無い為、PPI をモニターする為の様々なアプリケーションに適用する事ができる。本節では、本研究により明らかとなった Fluoppi の基本原理、およびその応用例によるヘテロ PPI、ホモ PPI、PPI キネティックスの解析について議論する（補足表 1）。

近年、非細胞膜性の顆粒は、細胞質または核質からの相分離によって生じる液相液滴からなることが示されている(106,107)。PPI 調整剤を添加した後の素早い輝点形成および解離（図 7、補足図 2 a）や、流動的で均一な内部組成（図 10 a、b）、高い変形能（図 10 c）、2次元相分離の形態（図 10 d）から判断すると、Fluoppi の蛍光輝点は液相液滴の特徴を有する。Fluoppi の作動原理は、2つの独立したホモオリゴマー化タグを含む融合タンパク質複合体に基づく。そのうちの 1 つは、液相液滴内で弾性の鎖状構造を形成する PB1 である。この原

理は、鎖状であり、かつ、多価性を有するタンパク質ドメインが、動的に液相液滴を形成する事を示した過去の報告を基礎としている(108,135)。Liらは、HeLa細胞に、mCherryに5つのSRC Homology 3 (SH3)ドメインを鎖状に連結したタンパク質と、EGFPに5つのSH3ドメインリガンドを鎖状に連結したものを共発現させると、直径0.5~2  $\mu\text{m}$ の両FPを含む蛍光輝点が形成されることを示した(108)。Fluoppiでは長くて柔軟性のあるPB1鎖が、細胞内での液相液滴形成に重要であると推測される。実際に、2つのホモオリゴマーFPを有するがPB1を有さない任意の融合タンパク質（複合体）では大きな蛍光輝点は観察されなかった（補足図5）。Liらは、多価性を増加させると、相分離の臨界濃度を有意に減少させることも示した(108)。FluoppiはPB1の高分子量ホモオリゴマーを含むため多価性が高く、発現レベルが低くとも、効率的に液相液滴が形成されると推察する。

Fluoppiは、既存のFPベースのPPI検出技術（補足表2）に対して複数のメリットを有する。第一に、Fluoppiは、大きなダイナミックレンジを示す。PPIに依存する蛍光分布の変化は、容量が無限の液相液滴に分子を濃縮する液相分離の原理に由来すると考えられる。対照的に、第一章で述べたPPI解析手法「第2群」の局在化タグを用いる手法では、局在させる場の容量に限界が有る為、高いダイナミックレンジを得られず、バックグラウンドの高いアッセイとなり、



信頼性が低い(77,78)。従って、画像データを取得し処理する従来の HCA システムにより Fluoppi アッセイを実施する事で、再現性の高い化合物スクリーニングおよび評価を実施する事ができると考えられる。さらに、Fluoppi 法は細胞の固定に耐性があるため、大量のサンプルを扱う場合、サンプル処理の時間を均一に設定する事が可能である。また、Fluoppi が画像データを使用しない HTS 手法とうまく組み合わせられることも示した (図 8 c、d)。

第二に、Fluoppi はタンパク質の会合と解離を可逆的に、迅速にモニタリングできる。これは PPI を阻害する低分子化合物のスクリーニングおよび評価のための基盤技術として有用である。例えば、本研究では Smac 模倣化合物を同定する為の XIAP / Smac Fluoppi システムを構築し、既存 PPI 調整剤を添加後、約 30 分で PPI の阻害、すなわち液相液滴の解消が完了したことが見出された。これとは対照的に、InCell SMART-i は強固な凝集体を生成し、タンパク質同士の会合は検出されているが、解離の検出については報告されていない。また、 $\mu$ NS ウイルス封入体を用いた手法でも、可逆性についての報告は無い(76)。

第三に、Fluoppi は FRET や ddFP とは異なり、単一の FP を使用するため、他の蛍光色素との組み合わせが可能である。また、リンカーの調整や測定の妥当性評価など、系の構築に複雑な過程を必要とせず、さまざまな PPI システムに簡便に適用できる。さらに、Fluoppi は、トランスフェクションのための T2A

バイシストロニック発現系を介して連結可能な 2 つの遺伝子構築物のみを必要とし、多くのタイプの細胞において使用可能である。対照的に、既存の局在化タグを用いる手法は、使用する細胞が予め形成された安定したプラットフォームを有することを必要とし、例えば InCell SMART-i ではフェリチンナノ粒子の事前形成を、F2H の一様態ではゲノムに人為的に挿入した lac オペレーター配列を必要とする。

最後に、Fluoppi は、他の特徴的な FP を使用することで、新しい PPI モニタリング手法に展開する事ができる。例えば、AG を Mmj (新規光活性化型 FP) に置き換えると、pcFluoppi を構築することができ、細胞内における PPI キネティクスを解析する為の液相液滴内および液相液滴間の分子の交換を観察する事ができた (図 9)。

本研究では、PB1 と mAG1 (homoFluoppi) を含む単一の融合タンパク質でタンパク質ホモ二量体化を検出した。多くの研究がタンパク質のホモ二量体化の機能的重要性を示しており、ヒトでは全酵素の 3 分の 1 以上がホモ二量体として機能すると考えられている(136)。しかし、いくつかの単量体タンパク質は、結晶構造において非生理学的なホモ二量体を形成するため、タンパク質の量体形成については、生理学的条件で検証する必要がある(137)。

生存細胞におけるタンパク質のホモ二量体化は、一般に CFP および YFP を用

いる従来の FRET 技術、または YFP を用いるホモ FRET 技術によって検出される(59,138)。しかしながら、ホモ二量体化検出のために FRET を用いることには、多くの制限がある。CFP/YFP を用いた FRET では、CFP-CFP および YFP-YFP の会合が起こる為、理論的にはホモ二量体化の検出効率が半分に減少する。また、ホモ FRET 検出には、蛍光異方性測定のための特別な装置が必要である。いずれの場合も、FRET ベースのアプローチは、PPI 検出の感度が低いという課題がある。

homoFluoppi では、生理的条件下でタンパク質の四次構造を解明するための情報が得られる。リン酸化 ERK2 の結晶構造が示されたことにより、活性型の ERK2 はホモ二量体であるとのモデルが受け入れられている。しかしながら、その仮説に疑問を投げかける報告も存在する(139)。インビトロでの生化学的実験は非生理学的条件である点が課題であるが、培養細胞を用いた実験についても、多くは細胞試料を固定し、また、細胞集団から調製したホモジネートを使用する。従って、ERK2 がホモ二量体化し活性化する時期や局在については議論の余地がある。本研究では、単一の生細胞で EGF 刺激による ERK2 ホモ二量体化を調べるために homoFluoppi を用いた (図 1 1 c)。ERK2 のホモ二量体化が MEK の活性に依存し、振動的に起こることが見出された。注目すべきことに、EGF 刺激細胞における ERK2 ホモ二量体化のタイミングおよび数には異

種混交性がみられた。本研究は、ERK2 ホモ二量体化は homoFluoppi を用いて単一の生きた細胞レベルでの解析においてのみ、正確に定量され得ることを示した。

Fluoppi は人工的な系であり、真の生理学的な状況で PPI を監視することができない可能性も考えられる。また、AG または PB1 のオリゴマー化は、それらが融合されるタンパク質の機能または局在化を妨害し得る。しかしながら、本研究では Fluoppi は生きた細胞内での信頼性の高い PPI 検出に有用であることが示され、HTS や HTS で取得された PPI 調整剤の評価に理想的な系であると考えられる。今後、Fluoppi はインビトロでの生化学実験系を補完する手法として広く使われると考えている。

## 第四章 結論

PPI は、生命現象を支える根幹であり、その分子メカニズムの解明は生命科学における重要な課題である。また、PPI は細胞機能および疾患の発症においても多大な役割を果たしており、重要な創薬標的として知られている。本研究は、近年、アカデミアや産業界で研究開発が盛んに行われている PPI 調整剤開発手法において、FP の性質を利用した新たな技術を開発する事および、開発した技術の有用性を示す事を目的とした。PPI 調整剤の開発は難易度が高いと言われており、その理由は、アッセイ系に対する課題と、化合物に対する課題に大きく分けられる。前者は、既存の手法では系の構築過程が煩雑である点や、適用可能な PPI 標的の性質が限定される点、シグナルのダイナミックレンジが小さい点が課題であり、後者は、既存の化合物ライブラリーを適用するのが困難な点が課題であった。本研究は FP の性質を利用し、上記課題を解消することを目的とした。本研究で利用した FP の性質とは、①FP が単一のレポーターとして機能する性質、②分割後、PPI 依存的に再構成が可能である性質 (BiFC)、③多量体形成能、④不可逆的光変換能である。

第二章では、①、②の性質を利用し、更に既存技術 (Gateway, コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系) を組み合わせることで操作が簡便で低コストな HTS 系を構築した。BiFC には、Venus よりもバックグラウンドの低い mKG FP を使

用した。BiFC では FP 断片の 8 通りの融合パターンを試行する必要があり工程がやや煩雑であるが、Gateway システムによりプラスミド DNA の構築過程を効率化し、更に、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いてハイスループットにタンパク質を調整する事で、簡便に最適な融合パターンを見出すシステムを構築した。コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系が有する高いタンパク質の折り畳み効率および、合成系自身が自家蛍光を有しない点を利用し、インビトロ合成したタンパク質をクルードの状態ですべて HTS に使用することができた。BiFC の課題である、不可逆性および、再構成後、蛍光を発するまでに時間を要する点については、標的タンパク質を個別に合成し、一方とライブラリーのサンプルをまず混合してインキュベートし、その後で他方を混合し、蛍光を発するまでのインキュベート時間を調整する事で解消した。本 HTS 系は、ミニチュアライズする事が可能であり、1536 プレートを用いても系の安定性が低下する事がなく、一度のアッセイで大量のサンプルを処理することができた。本研究で開発した HTS 系により、天然物由来サンプルから多様な化学構造を有する、分子量 376~967 の 8 つの PPI 阻害剤を同定することができ、系の実用性が証明された。インビトロ BiFC により HTS 系を構築し、PPI 調整剤スクリーニング系に応用した報告はこれまでに存在せず、従って、本研究では PPI 創薬分野において新たなスクリーニング手法を確立する事ができた。

インビトロアッセイ系では細胞膜透過性を有する化合物を同定するのが困難な為、次に本研究では FP の性質③を利用し、新規アッセイ原理の開発に取り組んだ。これまで FP は単量体に融合して利用する事が一般的であり、FP の多量化能を積極的に利用する報告は無かった。しかし、本研究では FP の多量化能と、更に別の多量体形成タグ PB1 の性質を利用し、相分離により生じる液相液滴を人工的に形成させることで、新規原理に基づいた PPI 検出手法を開発した。PB1 はこれまで単独で細胞内顆粒状構造を形成すると考えられていたが、それは EGFP がホモ二量体を形成することに起因する現象であった。私は単量体 FP の mAG1 を利用する事で、PB1 がそれ自身では細胞内で蛍光輝点を形成するほどには集積しないことを初めて見出した。多量体 FP と PB1 の性質を利用する事で、全く新しい原理に基づいた生細胞内 PPI 検出手法であり、ダイナミックレンジの大きなセルベースアッセイ系を構築し、Fluoppi と命名した。現存する FRET、BIFC、局在化タグを用いる手法などの細胞内 PPI 検出手法は、系の安定性、可逆性、定量性、ダイナミックレンジについて、課題を有していた。それに対し Fluoppi は、コントラスト、感度、反応速度、可逆性、系の構築の簡便性、及び汎用性について、総合的に他の PPI 検出手法よりも優れている。更に、本研究では新たに発見した PB1 の性質を利用し、新規ホモダイマー検出法 (homoFluoppi) も開発した。homoFluoppi を用いることで、EGF 添加後の

ERK2 ホモ二量体形成に振動が存在することを初めて示し、更に、振動の有無は個々の細胞によって異なることを示した。この様な細胞の多様性は、細胞集団を解析するインビトロの生化学的手法では解析が困難であり、蛍光イメージングだからこそ、得られた知見である。

本研究では FP の性質④、すなわち不可逆的光変換能を有する新規 FP を単離し、Fluoppi に応用することで pcFluoppi が開発され、細胞内での PPI キネティクスが検出された。pcFluoppi は現状では定性的手法であるため、今後は画像認識プログラムと観察を同時に実施し、定量化を試みたい。また、PPI 解析手法への直接の応用ではないが、蛍光イメージングの利点を活用し、FP の褪色能を利用した FRAP やライブイメージングにより、Fluoppi で形成される蛍光輝点が液相液滴であることを示した。更に、全反射照明蛍光顕微鏡 (Total internal reflection fluorescence: TIRF) により細胞膜付近を局所的に照明することで、細胞膜直下においても、2次元相分離に特徴的な形態を観察し、Fluoppi が液相分離を基本原理としている事を示した。動的な相転移により形成される液相液滴は、細胞内でユビキタスにみられる現象として、近年細胞生物学で注目を浴びている。構造の多くは、P-body や核小体など RNP を内包するものであるが、Li らの報告をはじめとした多価結合能を有するタンパク質によるシグナル伝達の場合としての機能は、近年、生物学において新たな概念を生み出している。



Fluoppi は PPI 創薬研究への適用を目的に開発されたが、例えばシグナル伝達を人為的に誘発する仕組みなど、別の視点からの応用可能性も秘めているだろう。

以上、本研究では、生命の根幹を成す PPI を検出する技術を蛍光タンパク質の性質を利用することで開発し、基礎生命科学分野での有用性を示すことができた。また、PPI 創薬分野におけるインビトロおよびセルベースアッセイでの有用性も実証され、今後本研究にて開発された手法が生命科学発展の一助となることを願う。

## 謝辞

本論文作成のご指導を快く引き受けて下さり、また、大変丁寧にご指導下さった名古屋大学大学院理学研究科の東山哲也教授に感謝申し上げます。旧 Amalgaam 有限会社出向時は、産業技術総合研究所にて新家一男研究グループ長および高木基樹先生に大変お世話になりました。この場で感謝の意を述べさせていただきます。また、本研究を共に遂行し、またご支援くださった株式会社医学生物学研究所および旧 Amalgaam 有限会社の社員の皆様に感謝申し上げます。最後に、蛍光タンパク質のおもしろさを教えて下さり、本研究を導いて下さっ

た理化学研究所脳科学総合研究センター 宮脇敦史先生および同研究室研究員  
の皆様に、多大なる感謝申し上げます。

## 参考文献

1. Fry, D. C. (2006) Protein-protein interactions as targets for small molecule drug discovery. *Biopolymers* **84**, 535-552
2. Arkin, M. R., Tang, Y., and Wells, J. A. (2014) Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing toward the reality. *Chemistry & biology* **21**, 1102-1114
3. Fischer, E. S., Park, E., Eck, M. J., and Thoma, N. H. (2016) SPLINTS: small-molecule protein ligand interface stabilizers. *Current opinion in structural biology* **37**, 115-122
4. Sehgal, S. N., Baker, H., and Vezina, C. (1975) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *The Journal of antibiotics* **28**, 727-732
5. Borel, J. F., Feurer, C., Gubler, H. U., and Stahelin, H. (1976) Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents and actions* **6**, 468-475
6. Kino, T., Hatanaka, H., Hashimoto, M., Nishiyama, M., Goto, T., Okuhara, M., Kohsaka, M., Aoki, H., and Imanaka, H. (1987) FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *The Journal of antibiotics* **40**, 1249-1255
7. Nicolaou, K. C., Guy, R. K., and Potier, P. (1996) Taxoids: new weapons against cancer. *Scientific American* **274**, 94-98
8. Hopkins, A. L., and Groom, C. R. (2002) The druggable genome. *Nature reviews. Drug discovery* **1**, 727-730
9. Clackson, T., and Wells, J. A. (1995) A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. *Science (New York, N.Y.)* **267**, 383-386
10. Scott, D. E., Bayly, A. R., Abell, C., and Skidmore, J. (2016) Small molecules, big targets: drug discovery faces the protein-protein interaction challenge. *Nature reviews. Drug discovery* **15**, 533-550
11. Liu, Z., Sun, C., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., Betz, S. F., Oost, T., Herrmann, J., Wu, J. C., and Fesik, S. W. (2000) Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. *Nature* **408**, 1004-1008
12. Wu, G., Chai, J., Suber, T. L., Wu, J. W., Du, C., Wang, X., and Shi, Y. (2000) Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* **408**, 1008-1012
13. Berthelet, J., and Dubrez, L. (2013) Regulation of Apoptosis by Inhibitors of Apoptosis (IAPs). *Cells* **2**, 163-187
14. Fulda, S., and Vucic, D. (2012) Targeting IAP proteins for therapeutic intervention

- in cancer. *Nature reviews. Drug discovery* **11**, 109-124
15. Dubrez, L., Berthelet, J., and Glorian, V. (2013) IAP proteins as targets for drug development in oncology. *OncoTargets and therapy* **9**, 1285-1304
  16. Engelman, A., Kessler, J. J., and Kvaratskhelia, M. (2013) Allosteric inhibition of HIV-1 integrase activity. *Current opinion in chemical biology* **17**, 339-345
  17. Filippakopoulos, P., and Knapp, S. (2014) Targeting bromodomains: epigenetic readers of lysine acetylation. *Nature reviews. Drug discovery* **13**, 337-356
  18. Kussie, P. H., Gorina, S., Marechal, V., Elenbaas, B., Moreau, J., Levine, A. J., and Pavletich, N. P. (1996) Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science (New York, N.Y.)* **274**, 948-953
  19. Cheok, C. F., Verma, C. S., Baselga, J., and Lane, D. P. (2011) Translating p53 into the clinic. *Nature reviews. Clinical oncology* **8**, 25-37
  20. Vassilev, L. T., Vu, B. T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., Kong, N., Kammlott, U., Lukacs, C., Klein, C., Fotouhi, N., and Liu, E. A. (2004) In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science (New York, N.Y.)* **303**, 844-848
  21. Petros, A. M., Olejniczak, E. T., and Fesik, S. W. (2004) Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochimica et biophysica acta* **1644**, 83-94
  22. Day, C. L., Chen, L., Richardson, S. J., Harrison, P. J., Huang, D. C., and Hinds, M. G. (2005) Solution structure of prosurvival Mcl-1 and characterization of its binding by proapoptotic BH3-only ligands. *The Journal of biological chemistry* **280**, 4738-4744
  23. Mosyak, L., Zhang, Y., Glasfeld, E., Haney, S., Stahl, M., Seehra, J., and Somers, W. S. (2000) The bacterial cell-division protein ZipA and its interaction with an FtsZ fragment revealed by X-ray crystallography. *The EMBO journal* **19**, 3179-3191
  24. Wilson, C. G., and Arkin, M. R. (2011) Small-molecule inhibitors of IL-2/IL-2R: lessons learned and applied. *Current topics in microbiology and immunology* **348**, 25-59
  25. Rickert, M., Wang, X., Boulanger, M. J., Goriatcheva, N., and Garcia, K. C. (2005) The structure of interleukin-2 complexed with its alpha receptor. *Science (New York, N.Y.)* **308**, 1477-1480
  26. Flygare, J. A., Beresini, M., Budha, N., Chan, H., Chan, I. T., Cheeti, S., Cohen, F., Deshayes, K., Doerner, K., Eckhardt, S. G., Elliott, L. O., Feng, B., Franklin, M. C., Reisner, S. F., Gazzard, L., Halladay, J., Hymowitz, S. G., La, H., LoRusso, P., Maurer, B., Murray, L., Plise, E., Quan, C., Stephan, J. P., Young, S. G., Tom, J., Tsui, V., Um, J., Varfolomeev, E., Vucic, D., Wagner, A. J., Wallweber, H. J., Wang, L., Ware,

- J., Wen, Z., Wong, H., Wong, J. M., Wong, M., Wong, S., Yu, R., Zobel, K., and Fairbrother, W. J. (2012) Discovery of a potent small-molecule antagonist of inhibitor of apoptosis (IAP) proteins and clinical candidate for the treatment of cancer (GDC-0152). *Journal of medicinal chemistry* **55**, 4101-4113
27. Billard, C. (2012) Design of novel BH3 mimetics for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* **26**, 2032-2038
  28. Vanhee, P., van der Sloot, A. M., Verschuere, E., Serrano, L., Rousseau, F., and Schymkowitz, J. (2011) Computational design of peptide ligands. *Trends in biotechnology* **29**, 231-239
  29. Du, Y., Nikolovska-Coleska, Z., Qui, M., Li, L., Lewis, I., Dingle, R., Stuckey, J. A., Krajewski, K., Roller, P. P., Wang, S., and Fu, H. (2011) A dual-readout F2 assay that combines fluorescence resonance energy transfer and fluorescence polarization for monitoring bimolecular interactions. *Assay and drug development technologies* **9**, 382-393
  30. Arkin, M. R., Glicksman, M. A., Fu, H., Havel, J. J., and Du, Y. (2004) Inhibition of Protein-Protein Interactions: Non-Cellular Assay Formats. in *Assay Guidance Manual* (Sittampalam, G. S., Coussens, N. P., Brimacombe, K., Grossman, A., Arkin, M., Auld, D., Austin, C., Baell, J., Bejcek, B., Chung, T. D. Y., Dahlin, J. L., Devanaryan, V., Foley, T. L., Glicksman, M., Hall, M. D., Hass, J. V., Inglese, J., Iversen, P. W., Kahl, S. D., Kales, S. C., Lal-Nag, M., Li, Z., McGee, J., McManus, O., Riss, T., Trask, O. J., Jr., Weidner, J. R., Xia, M., and Xu, X. eds.), Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda (MD). pp
  31. Lundholt, B. K., Heydorn, A., Bjorn, S. P., and Praestegaard, M. (2006) A simple cell-based HTS assay system to screen for inhibitors of p53-Hdm2 protein-protein interactions. *Assay and drug development technologies* **4**, 679-688
  32. Dudgeon, D. D., Shinde, S. N., Shun, T. Y., Lazo, J. S., Strock, C. J., Giuliano, K. A., Taylor, D. L., Johnston, P. A., and Johnston, P. A. (2010) Characterization and optimization of a novel protein-protein interaction biosensor high-content screening assay to identify disruptors of the interactions between p53 and hDM2. *Assay and drug development technologies* **8**, 437-458
  33. Ivanov, A. A., Khuri, F. R., and Fu, H. (2013) Targeting protein-protein interactions as an anticancer strategy. *Trends in pharmacological sciences* **34**, 393-400
  34. Wu, B., Barile, E., De, S. K., Wei, J., Purves, A., and Pellecchia, M. (2015) High-Throughput Screening by Nuclear Magnetic Resonance (HTS by NMR) for the Identification of PPIs Antagonists. *Current topics in medicinal chemistry* **15**,

2032-2042

35. Congreve, M., Carr, R., Murray, C., and Jhoti, H. (2003) A 'rule of three' for fragment-based lead discovery? *Drug discovery today* **8**, 876-877
36. Shimomura, O., Johnson, F. H., and Saiga, Y. (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of cellular and comparative physiology* **59**, 223-239
37. Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., and Cormier, M. J. (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**, 229-233
38. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., and Prasher, D. C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science (New York, N.Y.)* **263**, 802-805
39. Inouye, S., and Tsuji, F. I. (1994) *Aequorea* green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS letters* **341**, 277-280
40. Tsien, R. Y. (1998) The green fluorescent protein. *Annual review of biochemistry* **67**, 509-544
41. Heim, R., Prasher, D. C., and Tsien, R. Y. (1994) Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 12501-12504
42. Cubitt, A. B., Heim, R., Adams, S. R., Boyd, A. E., Gross, L. A., and Tsien, R. Y. (1995) Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends in biochemical sciences* **20**, 448-455
43. Matz, M. V., Fradkov, A. F., Labas, Y. A., Savitsky, A. P., Zaraisky, A. G., Markelov, M. L., and Lukyanov, S. A. (1999) Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nature biotechnology* **17**, 969-973
44. Baird, G. S., Zacharias, D. A., and Tsien, R. Y. (2000) Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 11984-11989
45. Campbell, R. E., Tour, O., Palmer, A. E., Steinbach, P. A., Baird, G. S., Zacharias, D. A., and Tsien, R. Y. (2002) A monomeric red fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 7877-7882
46. Zacharias, D. A., Violin, J. D., Newton, A. C., and Tsien, R. Y. (2002) Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science (New York, N.Y.)* **296**, 913-916
47. Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N., Palmer, A. E., and

- Tsien, R. Y. (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature biotechnology* **22**, 1567-1572
48. Kim, W., Kim, Y., Min, J., Kim, D. J., Chang, Y. T., and Hecht, M. H. (2006) A high-throughput screen for compounds that inhibit aggregation of the Alzheimer's peptide. *ACS chemical biology* **1**, 461-469
49. Sakaue-Sawano, A., Kurokawa, H., Morimura, T., Hanyu, A., Hama, H., Osawa, H., Kashiwagi, S., Fukami, K., Miyata, T., Miyoshi, H., Imamura, T., Ogawa, M., Masai, H., and Miyawaki, A. (2008) Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell* **132**, 487-498
50. Kimura, S., Noda, T., and Yoshimori, T. (2007) Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy* **3**, 452-460
51. Katayama, H., Kogure, T., Mizushima, N., Yoshimori, T., and Miyawaki, A. (2011) A sensitive and quantitative technique for detecting autophagic events based on lysosomal delivery. *Chemistry & biology* **18**, 1042-1052
52. Swaminathan, R., Hoang, C. P., and Verkman, A. S. (1997) Photobleaching recovery and anisotropy decay of green fluorescent protein GFP-S65T in solution and cells: cytoplasmic viscosity probed by green fluorescent protein translational and rotational diffusion. *Biophysical journal* **72**, 1900-1907
53. White, J., and Stelzer, E. (1999) Photobleaching GFP reveals protein dynamics inside live cells. *Trends Cell Biol* **9**, 61-65
54. Ando, R., Hama, H., Yamamoto-Hino, M., Mizuno, H., and Miyawaki, A. (2002) An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 12651-12656
55. Ando, R., Mizuno, H., and Miyawaki, A. (2004) Regulated fast nucleocytoplasmic shuttling observed by reversible protein highlighting. *Science* **306**, 1370-1373
56. Heim, R., and Tsien, R. Y. (1996) Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Current biology : CB* **6**, 178-182
57. Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J. M., Adams, J. A., Ikura, M., and Tsien, R. Y. (1997) Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* **388**, 882-887
58. Piston, D. W., and Kremers, G. J. (2007) Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends in biochemical sciences* **32**, 407-414

59. Miyawaki, A. (2011) Development of probes for cellular functions using fluorescent proteins and fluorescence resonance energy transfer. *Annual review of biochemistry* **80**, 357-373
60. Hochreiter, B., Garcia, A. P., and Schmid, J. A. (2015) Fluorescent proteins as genetically encoded FRET biosensors in life sciences. *Sensors (Basel, Switzerland)* **15**, 26281-26314
61. Johnsson, N., and Varshavsky, A. (1994) Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 10340-10344
62. Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., and Ladant, D. (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 5752-5756
63. Tafelmeyer, P., Johnsson, N., and Johnsson, K. (2004) Transforming a (beta/alpha)<sub>8</sub>-barrel enzyme into a split-protein sensor through directed evolution. *Chem Biol* **11**, 681-689
64. Rossi, F., Charlton, C. A., and Blau, H. M. (1997) Monitoring protein-protein interactions in intact eukaryotic cells by beta-galactosidase complementation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8405-8410
65. Remy, I., and Michnick, S. W. (1999) Clonal selection and in vivo quantitation of protein interactions with protein-fragment complementation assays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5394-5399
66. Ozawa, T., Kaihara, A., Sato, M., Tachihara, K., and Umezawa, Y. (2001) Split luciferase as an optical probe for detecting protein-protein interactions in mammalian cells based on protein splicing. *Anal Chem* **73**, 2516-2521
67. Hu, C. D., Chinenov, Y., and Kerppola, T. K. (2002) Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Molecular cell* **9**, 789-798
68. Hu, C. D., and Kerppola, T. K. (2003) Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nature biotechnology* **21**, 539-545
69. Kerppola, T. K. (2006) Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**, 449-456
70. Shyu, Y. J., Liu, H., Deng, X., and Hu, C. D. (2006) Identification of new fluorescent protein fragments for bimolecular fluorescence complementation analysis under physiological conditions. *BioTechniques* **40**, 61-66
71. Miyawaki, A., and Karasawa, S. (2007) Memorizing spatiotemporal patterns. *Nature*



- chemical biology* **3**, 598-601
72. Alford, S. C., Abdelfattah, A. S., Ding, Y., and Campbell, R. E. (2012) A fluorogenic red fluorescent protein heterodimer. *Chemistry & biology* **19**, 353-360
  73. Alford, S. C., Ding, Y., Simmen, T., and Campbell, R. E. (2012) Dimerization-dependent green and yellow fluorescent proteins. *ACS Synth Biol* **1**, 569-575
  74. Ding, Y., Li, J., Enterina, J. R., Shen, Y., Zhang, I., Tewson, P. H., Mo, G. C., Zhang, J., Quinn, A. M., Hughes, T. E., Maysinger, D., Alford, S. C., Zhang, Y., and Campbell, R. E. (2015) Ratiometric biosensors based on dimerization-dependent fluorescent protein exchange. *Nature methods* **12**, 195-198
  75. Shen, K., Teruel, M. N., Subramanian, K., and Meyer, T. (1998) CaMKIIbeta functions as an F-actin targeting module that localizes CaMKIIalpha/beta heterooligomers to dendritic spines. *Neuron* **21**, 593-606
  76. Miller, C. L., Arnold, M. M., Broering, T. J., Eichwald, C., Kim, J., Dinoso, J. B., and Nibert, M. L. (2007) Virus-derived platforms for visualizing protein associations inside cells. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **6**, 1027-1038
  77. Zolghadr, K., Mortusewicz, O., Rothbauer, U., Kleinhans, R., Goehler, H., Wanker, E. E., Cardoso, M. C., and Leonhardt, H. (2008) A fluorescent two-hybrid assay for direct visualization of protein interactions in living cells. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **7**, 2279-2287
  78. Herce, H. D., Deng, W., Helma, J., Leonhardt, H., and Cardoso, M. C. (2013) Visualization and targeted disruption of protein interactions in living cells. *Nature communications* **4**, 2660
  79. Lee, S., Lee, K. H., Ha, J. S., Lee, S. G., and Kim, T. K. (2011) Small-molecule-based nanoassemblies as inducible nanoprobe for monitoring dynamic molecular interactions inside live cells. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **50**, 8709-8713
  80. Yang, H. W., Shin, M. G., Lee, S., Kim, J. R., Park, W. S., Cho, K. H., Meyer, T., and Heo, W. D. (2012) Cooperative activation of PI3K by Ras and Rho family small GTPases. *Molecular cell* **47**, 281-290
  81. Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Sengupta, S., Sheen, J. H., Hsu, P. P., Bagley, A. F., Markhard, A. L., and Sabatini, D. M. (2006) Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Molecular cell* **22**, 159-168
  82. Westwick, J. K., and Michnick, S. W. (2006) Protein-fragment complementation assays (PCA) in small GTPase research and drug discovery. *Methods in enzymology* **407**, 388-401

83. MacDonald, M. L., Lamerdin, J., Owens, S., Keon, B. H., Bilter, G. K., Shang, Z., Huang, Z., Yu, H., Dias, J., Minami, T., Michnick, S. W., and Westwick, J. K. (2006) Identifying off-target effects and hidden phenotypes of drugs in human cells. *Nature chemical biology* **2**, 329-337
84. Stains, C. I., Porter, J. R., Ooi, A. T., Segal, D. J., and Ghosh, I. (2005) DNA sequence-enabled reassembly of the green fluorescent protein. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 10782-10783
85. Demidov, V. V., Dokholyan, N. V., Witte-Hoffmann, C., Chalasani, P., Yiu, H. W., Ding, F., Yu, Y., Cantor, C. R., and Broude, N. E. (2006) Fast complementation of split fluorescent protein triggered by DNA hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 2052-2056
86. Arkin, M. (2005) Protein-protein interactions and cancer: small molecules going in for the kill. *Current opinion in chemical biology* **9**, 317-324
87. Ueyama, T., Kusakabe, T., Karasawa, S., Kawasaki, T., Shimizu, A., Son, J., Leto, T. L., Miyawaki, A., and Saito, N. (2008) Sequential binding of cytosolic Phox complex to phagosomes through regulated adaptor proteins: evaluation using the novel monomeric Kusabira-Green System and live imaging of phagocytosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **181**, 629-640
88. Graham, T. A., Weaver, C., Mao, F., Kimelman, D., and Xu, W. (2000) Crystal structure of a beta-catenin/Tcf complex. *Cell* **103**, 885-896
89. Grossmann, T. N., Yeh, J. T., Bowman, B. R., Chu, Q., Moellering, R. E., and Verdine, G. L. (2012) Inhibition of oncogenic Wnt signaling through direct targeting of beta-catenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 17942-17947
90. Hirano, Y., Hendil, K. B., Yashiroda, H., Iemura, S., Nagane, R., Hioki, Y., Natsume, T., Tanaka, K., and Murata, S. (2005) A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Nature* **437**, 1381-1385
91. Hirano, Y., Hayashi, H., Iemura, S., Hendil, K. B., Niwa, S., Kishimoto, T., Kasahara, M., Natsume, T., Tanaka, K., and Murata, S. (2006) Cooperation of multiple chaperones required for the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Molecular cell* **24**, 977-984
92. Yashiroda, H., Mizushima, T., Okamoto, K., Kameyama, T., Hayashi, H., Kishimoto, T., Niwa, S., Kasahara, M., Kurimoto, E., Sakata, E., Takagi, K., Suzuki, A., Hirano, Y., Murata, S., Kato, K., Yamane, T., and Tanaka, K. (2008) Crystal structure of a chaperone complex that contributes to the assembly of yeast 20S proteasomes. *Nature structural & molecular biology* **15**, 228-236

93. Goshima, N., Kawamura, Y., Fukumoto, A., Miura, A., Honma, R., Satoh, R., Wakamatsu, A., Yamamoto, J., Kimura, K., Nishikawa, T., Andoh, T., Iida, Y., Ishikawa, K., Ito, E., Kagawa, N., Kaminaga, C., Kanehori, K., Kawakami, B., Kenmochi, K., Kimura, R., Kobayashi, M., Kuroita, T., Kuwayama, H., Maruyama, Y., Matsuo, K., Minami, K., Mitsubori, M., Mori, M., Morishita, R., Murase, A., Nishikawa, A., Nishikawa, S., Okamoto, T., Sakagami, N., Sakamoto, Y., Sasaki, Y., Seki, T., Sono, S., Sugiyama, A., Sumiya, T., Takayama, T., Takayama, Y., Takeda, H., Togashi, T., Yahata, K., Yamada, H., Yanagisawa, Y., Endo, Y., Imamoto, F., Kisu, Y., Tanaka, S., Isogai, T., Imai, J., Watanabe, S., and Nomura, N. (2008) Human protein factory for converting the transcriptome into an in vitro-expressed proteome. *Nature methods* **5**, 1011-1017
94. Sawasaki, T., Hasegawa, Y., Tsuchimochi, M., Kamura, N., Ogasawara, T., Kuroita, T., and Endo, Y. (2002) A bilayer cell-free protein synthesis system for high-throughput screening of gene products. *FEBS Lett* **514**, 102-105
95. Zhang, J. H., Chung, T. D., and Oldenburg, K. R. (1999) A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *Journal of biomolecular screening* **4**, 67-73
96. Matsumoto, K., Tanaka, K., Matsutani, S., Sakazaki, R., Hino, H., Uotani, N., Tanimoto, T., Kawamura, Y., Nakamoto, S., and Yoshida, T. (1995) Isolation and biological activity of thielocins: novel phospholipase A2 inhibitors produced by *Thielavia terricola* RF-143. *The Journal of antibiotics* **48**, 106-112
97. Izumikawa, M., Hashimoto, J., Hirokawa, T., Sugimoto, S., Kato, T., Takagi, M., and Shin-Ya, K. (2010) JBIR-22, an inhibitor for protein-protein interaction of the homodimer of proteasome assembly factor 3. *Journal of natural products* **73**, 628-631
98. Doi, T., Yoshida, M., Ohsawa, K., Shin-ya, K., Takagi, M., Uekusa, Y., Yamaguchi, T., Kato, K., Hirokawa, T., and Natsume, T. (2014) Total synthesis and characterization of thielocin B1 as a protein-protein interaction inhibitor of PAC3 homodimer. *Chemical Science* **5**, 1860-1868
99. Porter, J. R., Stains, C. I., Jester, B. W., and Ghosh, I. (2008) A general and rapid cell-free approach for the interrogation of protein-protein, protein-DNA, and protein-RNA interactions and their antagonists utilizing split-protein reporters. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 6488-6497
100. Ohashi, K., Kiuchi, T., Shoji, K., Sampei, K., and Mizuno, K. (2012) Visualization of cofilin-actin and Ras-Raf interactions by bimolecular fluorescence complementation assays using a new pair of split Venus fragments. *BioTechniques* **52**, 45-50
101. Huss, M., and Wiczorek, H. (2009) Inhibitors of V-ATPases: old and new players.

- The Journal of experimental biology* **212**, 341-346
102. Moore, B. S., Eustaquio, A. S., and McGlinchey, R. P. (2008) Advances in and applications of proteasome inhibitors. *Current opinion in chemical biology* **12**, 434-440
  103. Braun, P., Tasan, M., Dreze, M., Barrios-Rodiles, M., Lemmens, I., Yu, H., Sahalie, J. M., Murray, R. R., Roncari, L., de Smet, A. S., Venkatesan, K., Rual, J. F., Vandenhoute, J., Cusick, M. E., Pawson, T., Hill, D. E., Tavernier, J., Wrana, J. L., Roth, F. P., and Vidal, M. (2009) An experimentally derived confidence score for binary protein-protein interactions. *Nature methods* **6**, 91-97
  104. Remy, I., and Michnick, S. W. (2004) A cDNA library functional screening strategy based on fluorescent protein complementation assays to identify novel components of signaling pathways. *Methods (San Diego, Calif.)* **32**, 381-388
  105. Vogler, M., Weber, K., Dinsdale, D., Schmitz, I., Schulze-Osthoff, K., Dyer, M. J., and Cohen, G. M. (2009) Different forms of cell death induced by putative BCL2 inhibitors. *Cell death and differentiation* **16**, 1030-1039
  106. Hyman, A. A., Weber, C. A., and Julicher, F. (2014) Liquid-liquid phase separation in biology. *Annual review of cell and developmental biology* **30**, 39-58
  107. Berry, J., Weber, S. C., Vaidya, N., Haataja, M., and Brangwynne, C. P. (2015) RNA transcription modulates phase transition-driven nuclear body assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, E5237-5245
  108. Li, P., Banjade, S., Cheng, H. C., Kim, S., Chen, B., Guo, L., Llaguno, M., Hollingsworth, J. V., King, D. S., Banani, S. F., Russo, P. S., Jiang, Q. X., Nixon, B. T., and Rosen, M. K. (2012) Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins. *Nature* **483**, 336-340
  109. Saio, T., Yokochi, M., Kumeta, H., and Inagaki, F. (2010) PCS-based structure determination of protein-protein complexes. *Journal of biomolecular NMR* **46**, 271-280
  110. Ren, J., Wang, J., Wang, Z., and Wu, J. (2014) Structural and biochemical insights into the homotypic PB1-PB1 complex between PKCzeta and p62. *Science China. Life sciences* **57**, 69-80
  111. Karasawa, S., Araki, T., Yamamoto-Hino, M., and Miyawaki, A. (2003) A green-emitting fluorescent protein from Galaxeidae coral and its monomeric version for use in fluorescent labeling. *The Journal of biological chemistry* **278**, 34167-34171
  112. Sawano, A., and Miyawaki, A. (2000) Directed evolution of green fluorescent protein by a new versatile PCR strategy for site-directed and semi-random mutagenesis.

- Nucleic acids research* **28**, E78
113. de Chaumont, F., Dallongeville, S., Chenouard, N., Herve, N., Pop, S., Provoost, T., Meas-Yedid, V., Pankajakshan, P., Lecomte, T., Le Montagner, Y., Lagache, T., Dufour, A., and Olivo-Marin, J. C. (2012) Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nature methods* **9**, 690-696
  114. Bjorkoy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, A., Stenmark, H., and Johansen, T. (2005) p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *The Journal of cell biology* **171**, 603-614
  115. Katayama, H., Yamamoto, A., Mizushima, N., Yoshimori, T., and Miyawaki, A. (2008) GFP-like proteins stably accumulate in lysosomes. *Cell structure and function* **33**, 1-12
  116. Sabatini, D. M., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Tempst, P., and Snyder, S. H. (1994) RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* **78**, 35-43
  117. Chen, J., Zheng, X. F., Brown, E. J., and Schreiber, S. L. (1995) Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 4947-4951
  118. Karasawa, S., Araki, T., Nagai, T., Mizuno, H., and Miyawaki, A. (2004) Cyan-emitting and orange-emitting fluorescent proteins as a donor/acceptor pair for fluorescence resonance energy transfer. *The Biochemical journal* **381**, 307-312
  119. Miyawaki, A., Griesbeck, O., Heim, R., and Tsien, R. Y. (1999) Dynamic and quantitative Ca<sup>2+</sup> measurements using improved cameleons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 2135-2140
  120. Nakamura, H., Bannai, H., Inoue, T., Michikawa, T., Sano, M., and Mikoshiba, K. (2012) Cooperative and stochastic calcium releases from multiple calcium puff sites generate calcium microdomains in intact HeLa cells. *The Journal of biological chemistry* **287**, 24563-24572
  121. Yurlova, L., Derks, M., Buchfellner, A., Hickson, I., Janssen, M., Morrison, D., Stansfield, I., Brown, C. J., Ghadessy, F. J., Lane, D. P., Rothbauer, U., Zolghadr, K., and Krausz, E. (2014) The fluorescent two-hybrid assay to screen for protein-protein interaction inhibitors in live cells: targeting the interaction of p53 with Mdm2 and Mdm4. *Journal of biomolecular screening* **19**, 516-525
  122. Remy, I., and Michnick, S. W. (2006) A highly sensitive protein-protein interaction

- assay based on Gaussia luciferase. *Nature methods* **3**, 977-979
123. Cai, Q., Sun, H., Peng, Y., Lu, J., Nikolovska-Coleska, Z., McEachern, D., Liu, L., Qiu, S., Yang, C. Y., Miller, R., Yi, H., Zhang, T., Sun, D., Kang, S., Guo, M., Leopold, L., Yang, D., and Wang, S. (2011) A potent and orally active antagonist (SM-406/AT-406) of multiple inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) in clinical development for cancer treatment. *Journal of medicinal chemistry* **54**, 2714-2726
  124. Brunckhorst, M. K., Lerner, D., Wang, S., and Yu, Q. (2012) AT-406, an orally active antagonist of multiple inhibitor of apoptosis proteins, inhibits progression of human ovarian cancer. *Cancer biology & therapy* **13**, 804-811
  125. Petros, A. M., Nettesheim, D. G., Wang, Y., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., Mack, J., Swift, K., Matayoshi, E. D., Zhang, H., Thompson, C. B., and Fesik, S. W. (2000) Rationale for Bcl-xL/Bad peptide complex formation from structure, mutagenesis, and biophysical studies. *Protein science : a publication of the Protein Society* **9**, 2528-2534
  126. Ferreon, J. C., Lee, C. W., Arai, M., Martinez-Yamout, M. A., Dyson, H. J., and Wright, P. E. (2009) Cooperative regulation of p53 by modulation of ternary complex formation with CBP/p300 and HDM2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 6591-6596
  127. Zhang, H., Elbaum-Garfinkle, S., Langdon, E. M., Taylor, N., Occhipinti, P., Bridges, A. A., Brangwynne, C. P., and Gladfelter, A. S. (2015) RNA Controls PolyQ Protein Phase Transitions. *Molecular cell* **60**, 220-230
  128. Banjade, S., and Rosen, M. K. (2014) Phase transitions of multivalent proteins can promote clustering of membrane receptors. *eLife* **3**
  129. Cohen-Saidon, C., Cohen, A. A., Sigal, A., Liron, Y., and Alon, U. (2009) Dynamics and variability of ERK2 response to EGF in individual living cells. *Molecular cell* **36**, 885-893
  130. Casar, B., Pinto, A., and Crespo, P. (2008) Essential role of ERK dimers in the activation of cytoplasmic but not nuclear substrates by ERK-scaffold complexes. *Molecular cell* **31**, 708-721
  131. Herrero, A., Pinto, A., Colon-Bolea, P., Casar, B., Jones, M., Agudo-Ibanez, L., Vidal, R., Tenbaum, S. P., Nuciforo, P., Valdizan, E. M., Horvath, Z., Orfi, L., Pineda-Lucena, A., Bony, E., Keri, G., Rivas, G., Pazos, A., Gozalbes, R., Palmer, H. G., Hurlstone, A., and Crespo, P. (2015) Small Molecule Inhibition of ERK Dimerization Prevents Tumorigenesis by RAS-ERK Pathway Oncogenes. *Cancer cell* **28**, 170-182
  132. Koyano, F., Okatsu, K., Kosako, H., Tamura, Y., Go, E., Kimura, M., Kimura, Y., Tsuchiya, H., Yoshihara, H., Hirokawa, T., Endo, T., Fon, E. A., Trempe, J. F., Saeki,

- Y., Tanaka, K., and Matsuda, N. (2014) Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature* **510**, 162-166
133. Yamano, K., Queliconi, B. B., Koyano, F., Saeki, Y., Hirokawa, T., Tanaka, K., and Matsuda, N. (2015) Site-specific Interaction Mapping of Phosphorylated Ubiquitin to Uncover Parkin Activation. *The Journal of biological chemistry* **290**, 25199-25211
134. Asamitsu, K., Omagari, K., Okuda, T., Hibi, Y., and Okamoto, T. (2016) Quantification of the HIV transcriptional activator complex in live cells by image-based protein-protein interaction analysis. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **21**, 706-716
135. Jiang, H., Wang, S., Huang, Y., He, X., Cui, H., Zhu, X., and Zheng, Y. (2015) Phase transition of spindle-associated protein regulate spindle apparatus assembly. *Cell* **163**, 108-122
136. Matthews, J. M., and Sunde, M. (2012) Dimers, oligomers, everywhere. *Adv Exp Med Biol* **747**, 1-18
137. Marianayagam, N. J., Sunde, M., and Matthews, J. M. (2004) The power of two: protein dimerization in biology. *Trends in biochemical sciences* **29**, 618-625
138. Gautier, I., Tramier, M., Durieux, C., Coppey, J., Pansu, R. B., Nicolas, J. C., Kemnitz, K., and Coppey-Moisan, M. (2001) Homo-FRET microscopy in living cells to measure monomer-dimer transition of GFP-tagged proteins. *Biophys J* **80**, 3000-3008
139. Lee, S., and Bae, Y. S. (2012) Monomeric and dimeric models of ERK2 in conjunction with studies on cellular localization, nuclear translocation, and in vitro analysis. *Molecules and cells* **33**, 325-334

## 図表

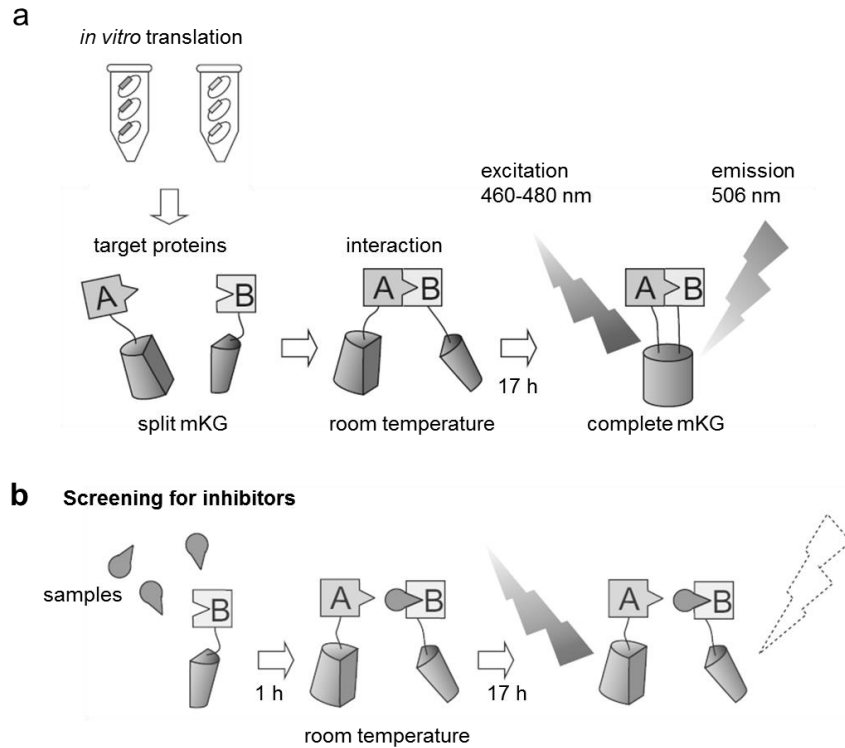


図 1. インビトロ BiFC アッセイの模式図

(a) mKG を用いたインビトロ BiFC の原理図。コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系(*in vitro* translation)により、mKG 断片(split mKG)を融合した標的タンパク質(target proteins)を合成する。タンパク質を室温で混合することで、標的タンパク質 A および B の相互作用に依存し、mKG 断片の局所有効濃度が増加する。その結果、460-480 nm の光で励起することで 506 nm をピークとした蛍光を放出する mKG(complete mKG)が再構成される。(b) インビトロ BiFC による相互作用阻害剤スクリーニング系の模式図。mKG 断片融合標的タンパク質



B および天然産物サンプルを混合し、1時間インキュベートする。次に、mKG  
断片融合標的タンパク質Aを混合物に加え、室温で17時間インキュベートする。  
スクリーニングサンプルが標的タンパク質Bに結合しPPIを阻害する場合、  
mKGは再構成されず、蛍光は放出されない。

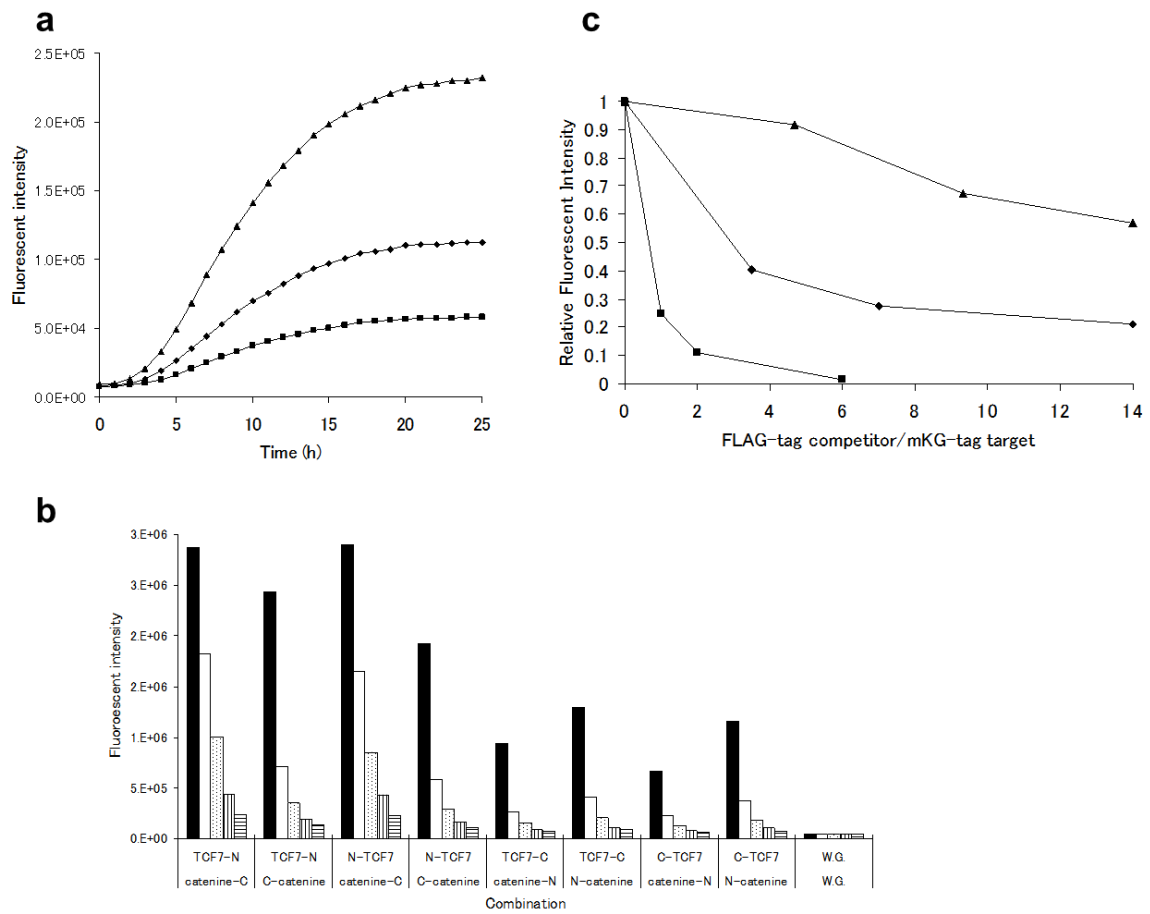


図2. アッセイ条件の検討

(a) 蛍光強度の時間経過。三角形は 1 : 8、ひし形は 1:16、正方形は 1:32 の希釈倍率を示す。(b) TCF7-β-catenin の mKG 断片融合位置および希釈倍率の最適化。黒は 1 : 2、白は 1 : 4、ドットは 1 : 8、縦縞は 1:16、横縞は 1:32 の希釈倍率を示す。N は mKGN を、C は mKGC を示す。W.G. は合成たんぱく質を含まない小麦胚芽抽出物であり、バックグラウンド溶液の蛍光強度を示す。

(c) TCF7-β-catenin、PAC1-PAC2、PAC3 ホモ二量体の競合アッセイ。ひし形は TCF7-β-catenin、正方形は PAC1-PAC2、三角形は PAC3 ホモ二量体を示す。

す。 TCF7-FLAG、 PAC2-FLAG および PAC3-FLAG は、 N 末端に FLAG タグを融合したタンパク質を用いた。 それぞれ、 FLAG タグ競合タンパク質不在時の蛍光強度を 1 と定義した。

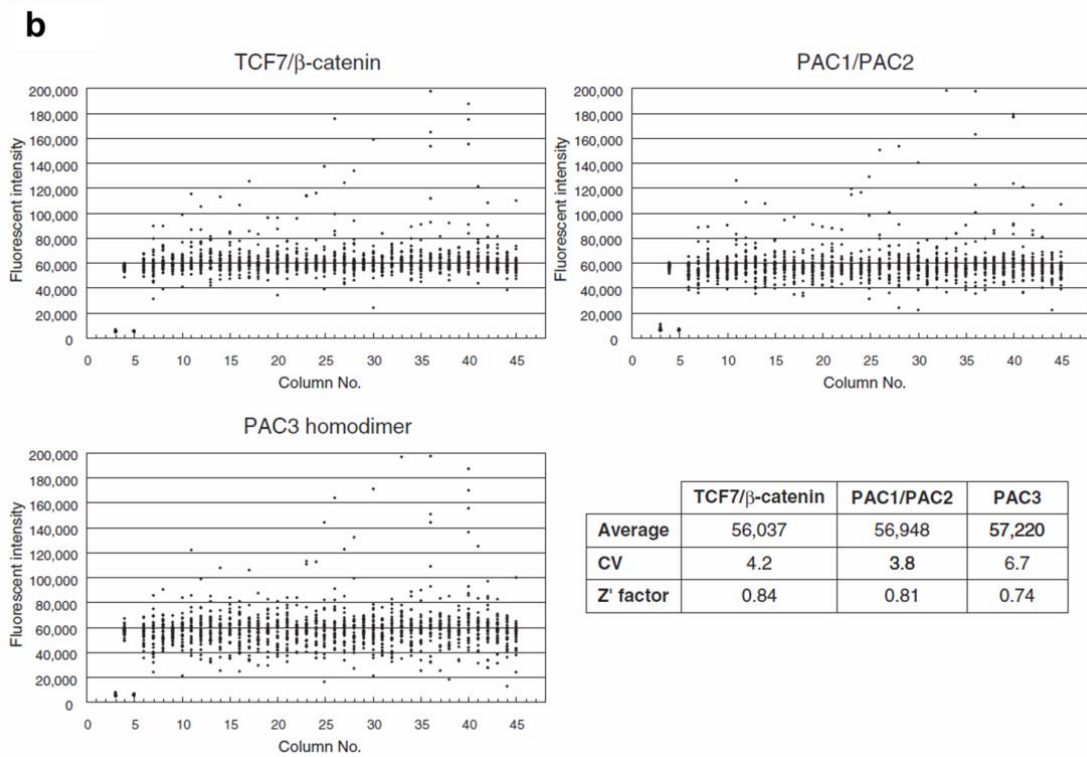
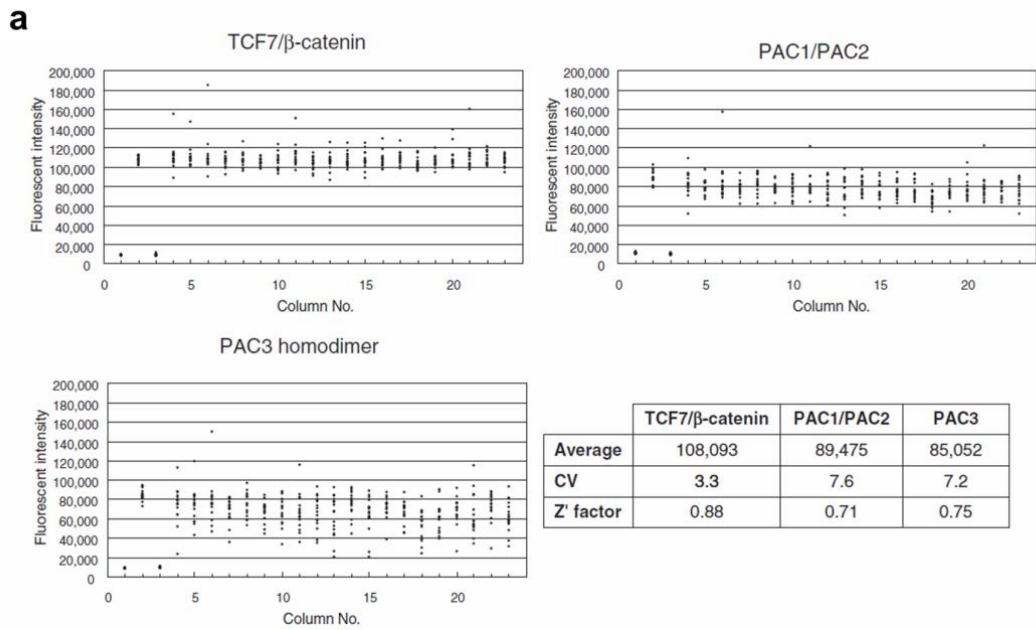


図 3. 384 穴と 1536 穴プレートを用いたインビトロ BiFC アッセイの散布図

各プロットは、バックグラウンド、コントロール、100%阻害コントロール(100  $\mu$ M オレイン酸)、およびサンプル処理ウェルを含む。(a) 384 ウェルプレー

ト。Column 1 はバックグラウンド、2 は阻害物質を含まないコントロール、3 は 100%阻害コントロール、4~23 はサンプル処理を示す。(b) 1536 ウェルプレート。Column 3 はバックグラウンド、4 は阻害物質を含まないコントロール、5 は 100%阻害コントロール、6~45 はサンプル処理を示す。グラフに付随する表に、各プレートの平均変動係数 (CV) 値および Z 'factor 値を示す。

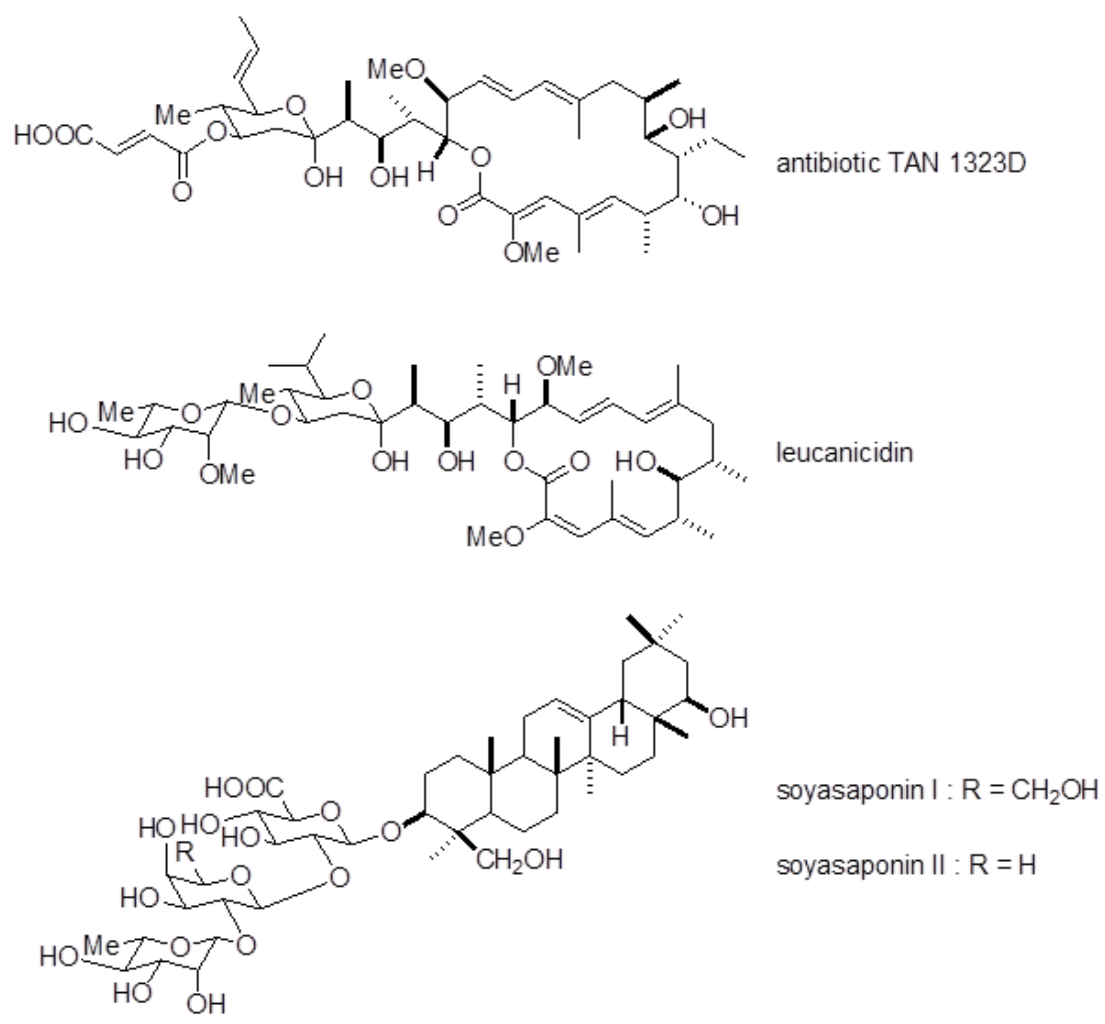


図4. 同定した化合物の構造

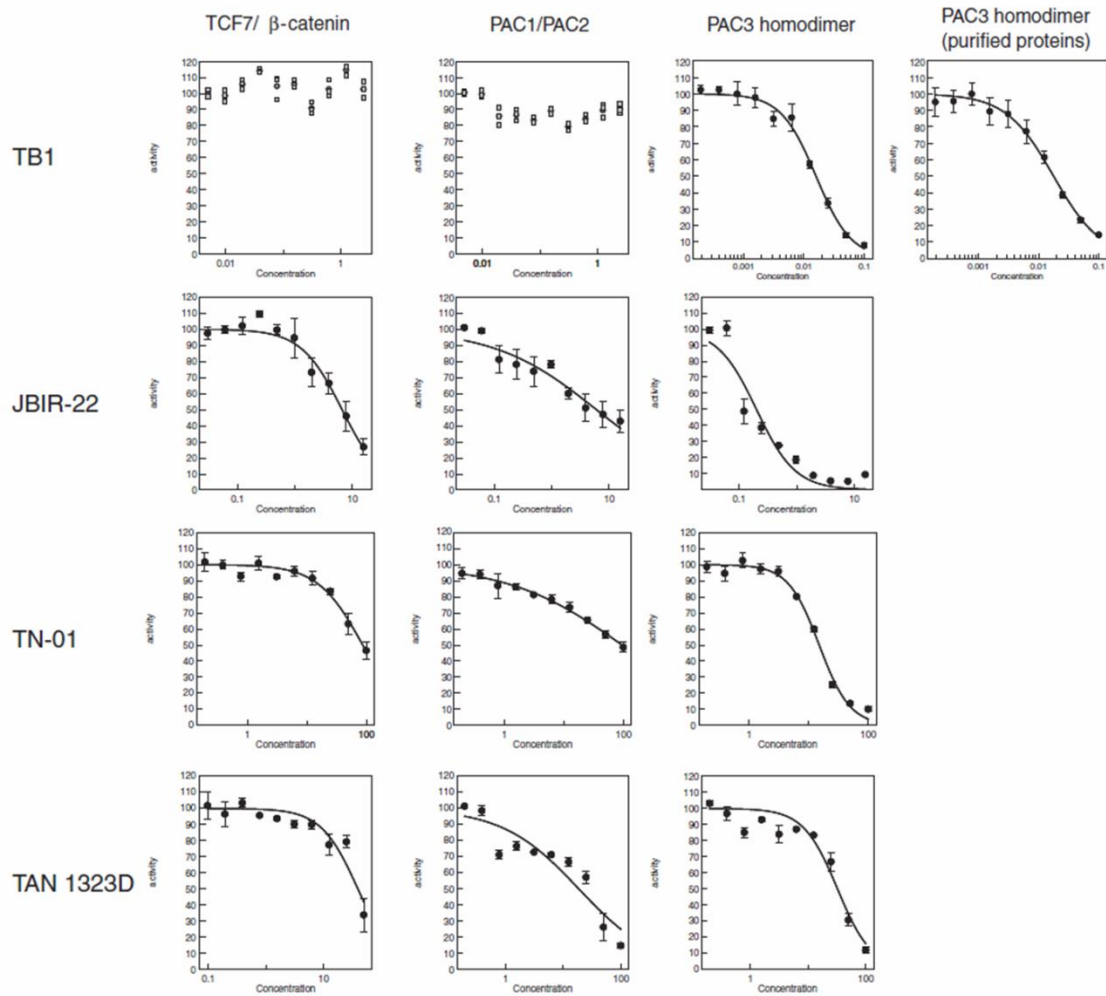


図5. TB1, JBIR-22, TN-01, TAN 1323D の TCF7-β-catenin、PAC1-PAC2 および PAC3 ホモ二量体相互作用に対する用量阻害曲線

各グラフにおける Concentration の単位はμM。

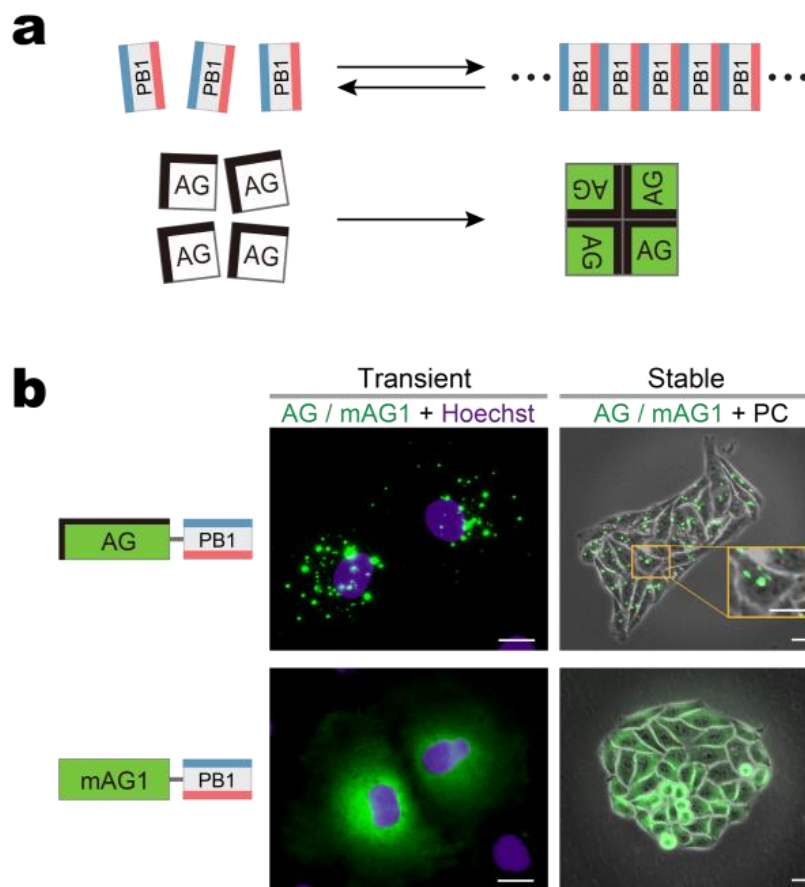


図 6 . PB1 と AG の融合による、細胞質での蛍光輝点形成

(a) p62 PB1 ドメイン (上) および緑色 FP である AG (Azami Green) (下) のホモオリゴマー化。 PB1 は、前面-背面トポロジーによる平衡状態で自己会合し、高分子量のホモオリゴマーを形成する。 PB1 の酸性/疎水性残基およびリジン/アルギニン残基を、それぞれ赤色および青色のバーで示す。 AG は、四量体を形成する事で、緑色の蛍光性を獲得する。AG サブユニット間の疎水性界面を、隣接する 2 辺の太い黒色のバーで示す。 (b) AG と PB1 の融合タンパク質もし



くは、AG の多量体変異体 (mAG1) と PB1 の融合タンパク質を発現する培養細胞の蛍光画像。mAG1 の模式図に太い黒色のバーがないことは、mAG1 がその表面に疎水性パッチを有していないことを示す。(AG / mAG1 + Hoechst) トランスフェクションの 1 日後に AG-PB1 (上) および mAG1-PB1 (下) を一過的に発現する Cos-7 細胞の蛍光画像。AG / mAG1 (緑色) および Hoechst33342 により染色した核 (紫色) の画像を重ね合わせた。それぞれ、約 50 個の他の細胞で同じ分布パターンが観察された。(AG / mAG1 + PC) AG-PB1 (上) および mAG1-PB1 (下) を恒常的に発現する HeLa 細胞の画像。蛍光画像と位相差画像を重ね合わせた。オレンジ色の枠内は、AG-PB1 の蛍光輝点を拡大した高倍率画像を示す。それぞれ、4 つの他の HeLa 細胞クローンで同じ分布パターンが観察された。スケールバーは 5  $\mu\text{m}$  を示す。補足図 1 も参照のこと。

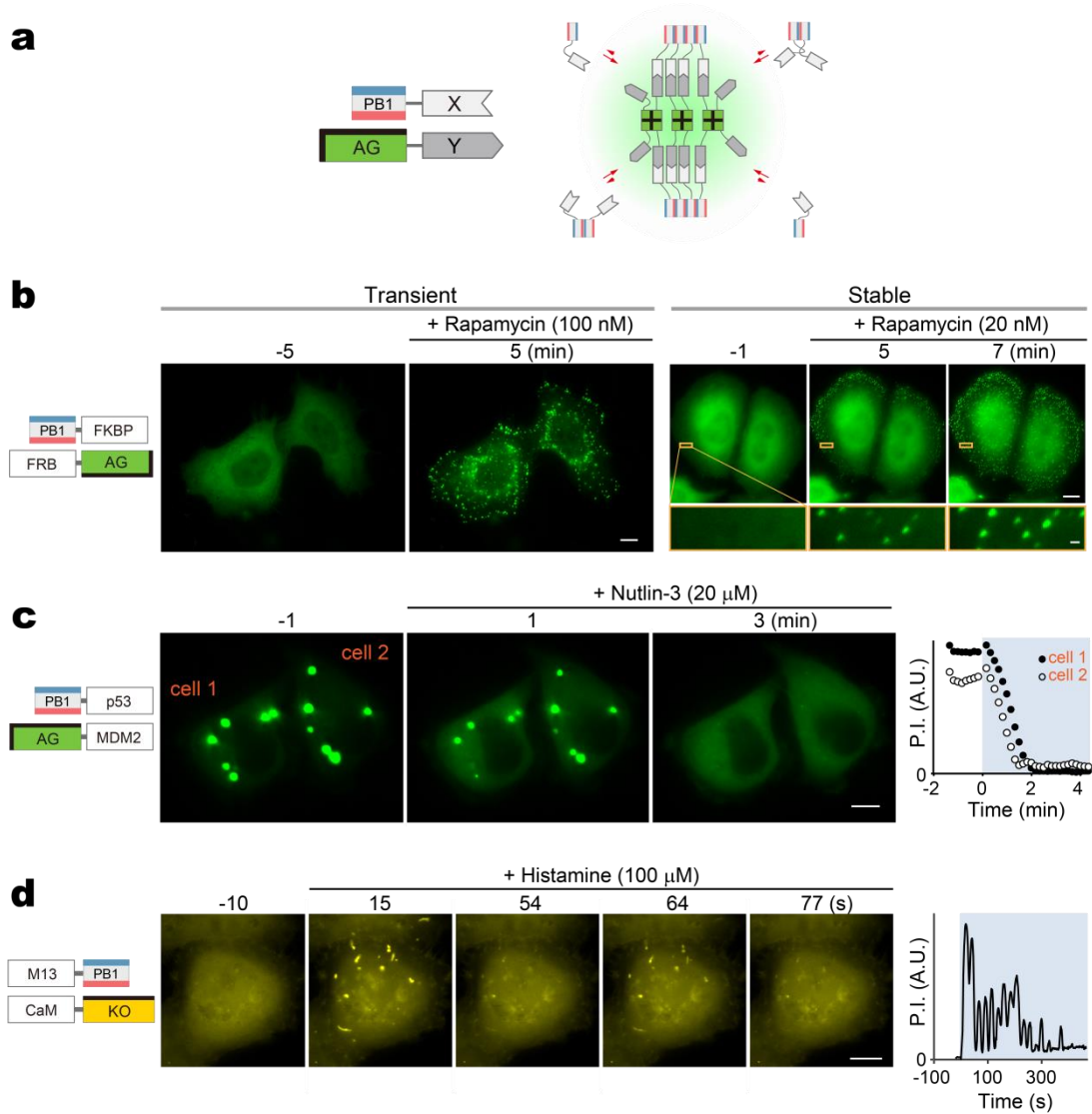


図7. PB1 と多量体 FP を用いた PPI 検出システム Fluoppi の設計と評価

(a) PPI 依存的な蛍光輝点形成の模式図。 X と Y との相互作用により、PB1-X と AG-Y は架橋形成し、AG 蛍光の濃度が上昇することで蛍光輝点が形成される (緑色の陰影)。 PB1 および AG の模式図は、図6 と同様である。 (b) PB1-FKBP および FRB-AG を共発現する HeLa 細胞における FRB と FKBP 間のラパマイシ

ン依存的相互作用の視覚化（左：一過性発現細胞、右：恒常発現細胞）。蛍光輝点の大きさを示すために、拡大図をオレンジ色の枠内に示す。補助ビデオ 1 および 2 も参照のこと。一過性発現細胞および恒常発現細胞ともに、それぞれ約 50 個の細胞において、同様の結果が得られている。(c) PB1-p53 および AG-MDM2 を一過的に共発現した 2 個の HeLa 細胞（細胞 1 および細胞 2）における、p53 と MDM2 相互作用の nutlin-3 依存的解離の可視化。補助ビデオ 3 も参照のこと。同様の結果は、3 回の独立した実験において、約 50 個の細胞から得られている。

(d) M13-PB1 および CaM-KO を同時発現した HeLa 細胞における、CaM と M13 相互作用のヒスタミン依存的振動の可視化。画像取得間隔は 1.5 秒。KO は obligate 二量体を形成する。模式図において、KO モノマー間の疎水性界面を、一辺における太い黒いバーで示す。補足ビデオ 5 も参照のこと。他の 4 つの細胞で同様の振動的変化が観察された。(b-d) 遺伝子導入した構築物のドメイン構造を模式的に示す（左端）。各ドメインを長方形で表す。薬剤添加時を 0 とし、各画像を取得した時間を上に示す。(c、d) 細胞中の蛍光輝点内の総蛍光強度 (P.I.) を時間に対してプロットした（右端）。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$  を示す。(b) における拡大画像のスケールバーは 1  $\mu\text{m}$  を示す。補足図 2 も参照のこと。

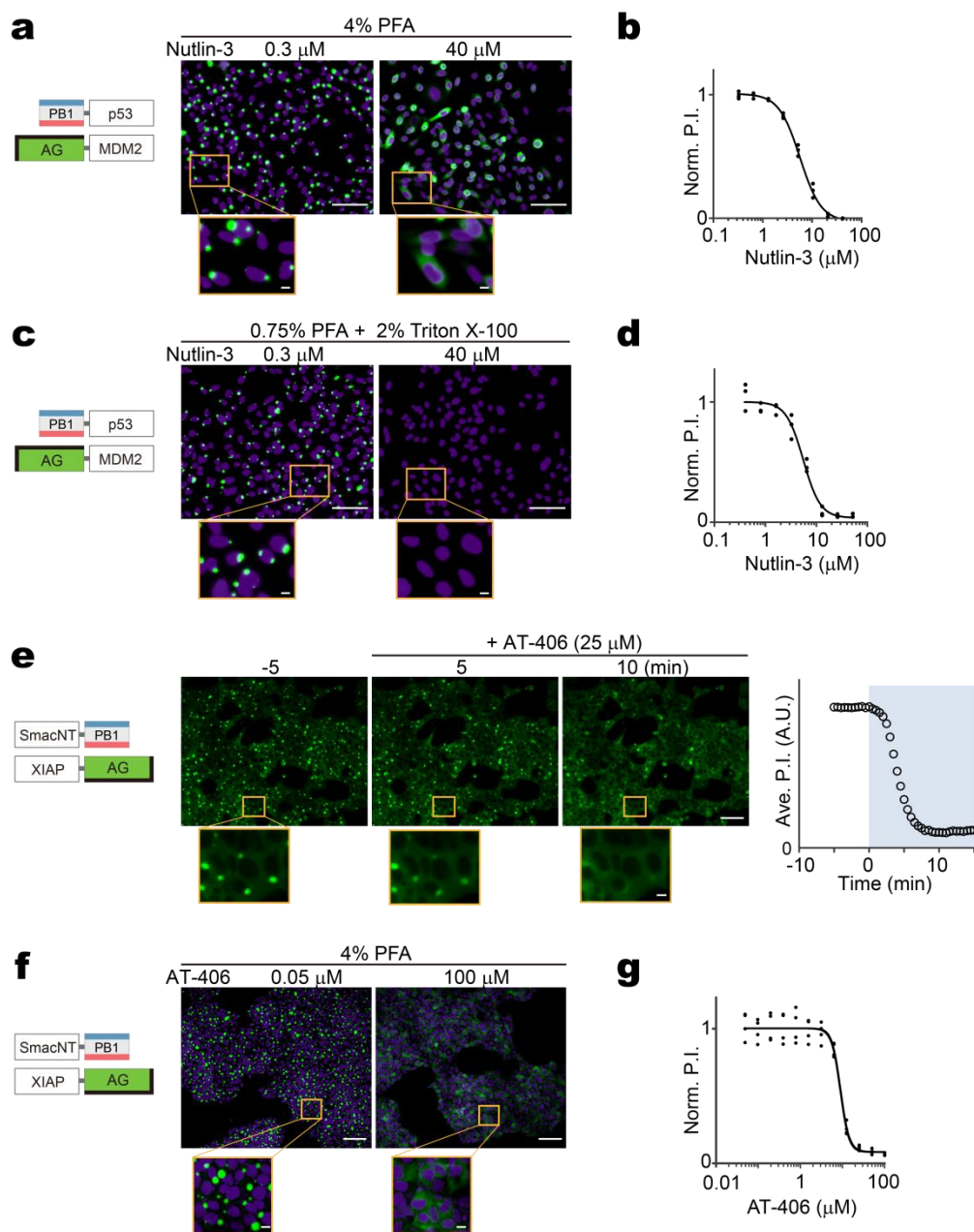


図 8. Fluoppi における PPI 阻害剤効果の定量

(a, b) PB1-p53 および AG-MDM2 を恒常的に共発現する CHO-K1 細胞における p53 / MDM2 複合体の nutlin-3 依存的解離を定量化するための HCA アプローチ。各濃度の nutlin-3 を 30 分間処理した後、細胞を 4%PFA で 10 分間固定し、

それらの核を Hoechst33342 で染色した。(a) 遺伝子導入した構築物のドメイン構造を左に示す。画像は、0.3 および 40  $\mu\text{M}$  の nutlin-3 で処理した際の代表的な視野を示す。(b) 横軸を Nutlin-3 濃度、縦軸を標準化 P.I.とした用量阻害曲線。蛍光輝点と核は、それぞれ解析ソフトウェアを用いて自動的に領域決定した。P.I.は、視野中の全ての蛍光輝点の蛍光輝度を核の総数で割ることにより算出した。P.I.は最も低い nutlin-3 濃度添加時の値で標準化した。(c、d) PB1-p53 および AG-MDM2 を恒常的に共発現する CHO-K1 細胞における p53 / MDM2 複合体の nutlin-3 依存的解離を定量化するための HTS アプローチ。各濃度の nutlin-3 を 30 分間処理した後、0.75%PFA および 2%Triton X-100 を含む PBS ( - ) で細胞を処理し、それらの核を Hoechst33342 で染色した。(c) 遺伝子導入した構築物のドメイン構造を左に示す。画像は、0.3 および 40  $\mu\text{M}$  の nutlin-3 で処理した際の代表的な視野を示す。(d) 横軸を Nutlin-3 濃度、縦軸を標準化 P.I.とした用量阻害曲線。蛍光輝点および核の領域決定は行っていない。P.I.は各視野での AG (緑) 蛍光強度を総 Hoechst33342 (青) 蛍光強度で割ることにより算出した。P.I.は最も低い nutlin-3 濃度添加時の値で標準化した。(e-g) SmacNT-PB1 および XIAP-AG を恒常的に共発現する HEK293 細胞における Smac / XIAP 複合体の AT-406 依存的解離の定量。(e) 遺伝子導入した構築物のドメイン構造を左に示す。25  $\mu\text{M}$  の AT-406 の添加 5 分前および 5 分後、10 分後の細胞の蛍光画像

を示す（中央）。蛍光輝点は解析ソフトウェアを用いて自動的に領域決定し、細胞数は手動で計測した。右端に、平均した PI の時間経過を示す。補足ビデオ 6 も参照のこと。(f) 遺伝子導入した構築物のドメイン構造を左に示す。画像は、0.05 および 100  $\mu\text{M}$  の AT-406 で処理した際の代表的な視野を示す。(g) 横軸を AT-406 濃度、縦軸を標準化 P.I.とした用量障害曲線。蛍光輝点と核は、それぞれ解析ソフトウェアを用いて自動的に領域決定した。P.I.は、視野中の全ての蛍光輝点の蛍光輝度を核の総数で割ることにより算出した。P.I.は最も低い AT-406 濃度添加時の値で標準化した。(a-g) 各実験は 3 回実施した。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$  を示す。拡大画像内のスケールバーは 10  $\mu\text{m}$  を示す。補足図 3 も参照のこと。

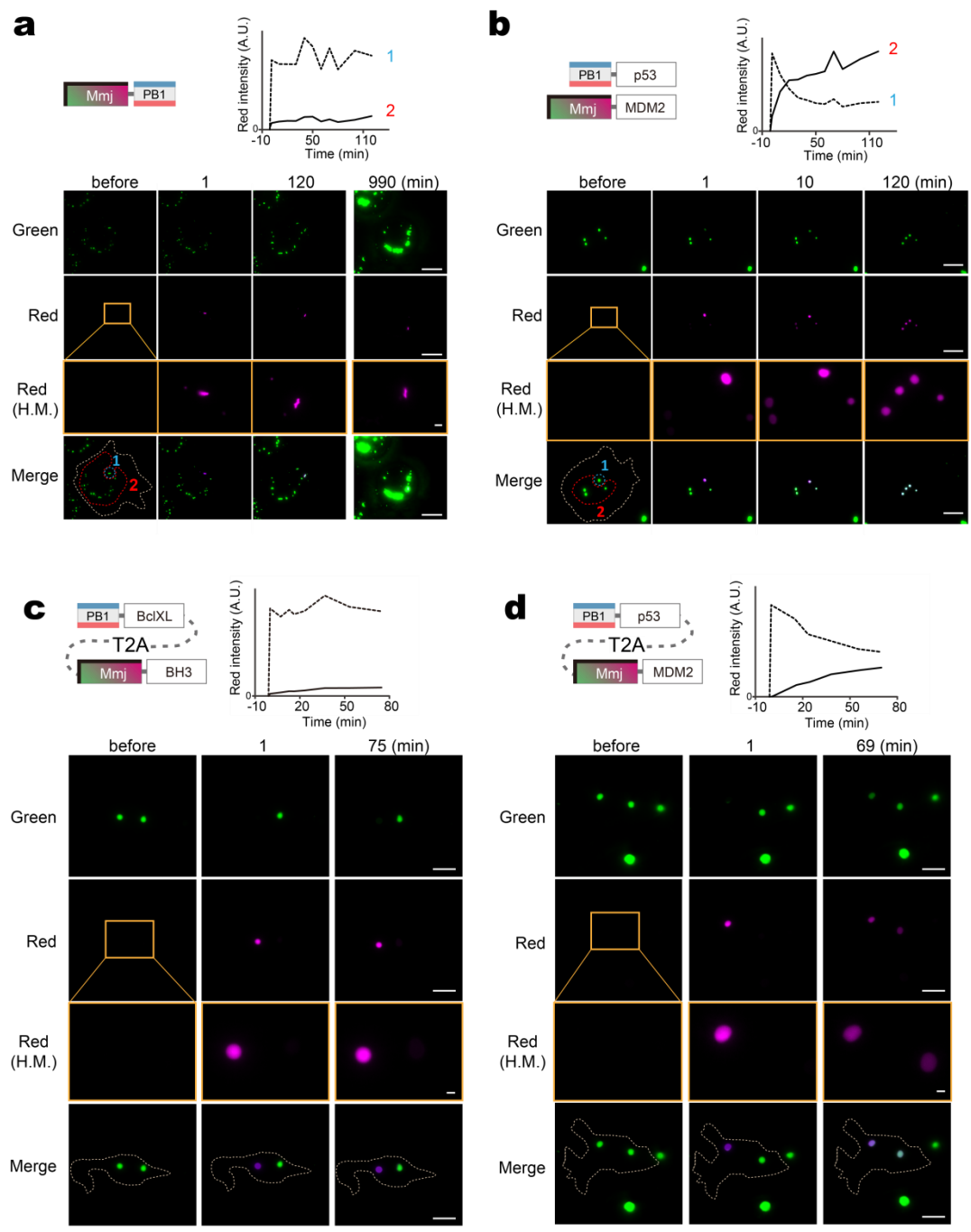


図 9. PB1 と Mmj を用いた PPI キネティクス解析手法(PcFluoppi)

Mmj サブユニット間の疎水性界面は、隣接する 2 辺の側面に示す太いバーを示す。

(a、b) 局所 UV 照射後の Cos-7 細胞 (細胞の輪郭を白色点線で表示) におけ

る Mmj 蛍光の蛍光輝点間交換。紫外線を照射した領域（1、青色点線で囲まれた領域）および未照射の領域（2、赤色点線で囲まれた領域）において、光変換された（赤色）蛍光を測定し、その強度を時間に対してプロットした（上）。（a） Mmj-PB1 の遺伝子導入 1 日後の細胞を、光変換の前、1 分後、120 分後、990 分後に緑色および赤色蛍光について画像化した。（b） PB1-p53 および Mmj-MDM2 の遺伝子導入 1 日後の細胞を、光変換の前、1 分後、10 分後、120 分後に緑色および赤色蛍光について画像化した。（c、d） PB1-BclXL : T2A : Mmj-BH3 (c) および PB1-p53 : T2A : Mmj-MDM2 (d) を発現する HEK293 細胞（細胞の輪郭を白色点線で表示）における Mmj 蛍光の蛍光輝点間交換。各実験において、2 つの大きな蛍光輝点を有する細胞を選択し、1 つの蛍光輝点にのみ UV を照射した。UV 照射（点線）および未照射（実線）蛍光輝点における赤色蛍光の強度を、時間に対してプロットした（上）。（a~d）各実験について、3 つの他の細胞において同様の結果が得られている。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$  を示す。高倍率 (H.M.) 画像のスケールバーは 1  $\mu\text{m}$  を示す。補足図 5 も参照のこと。



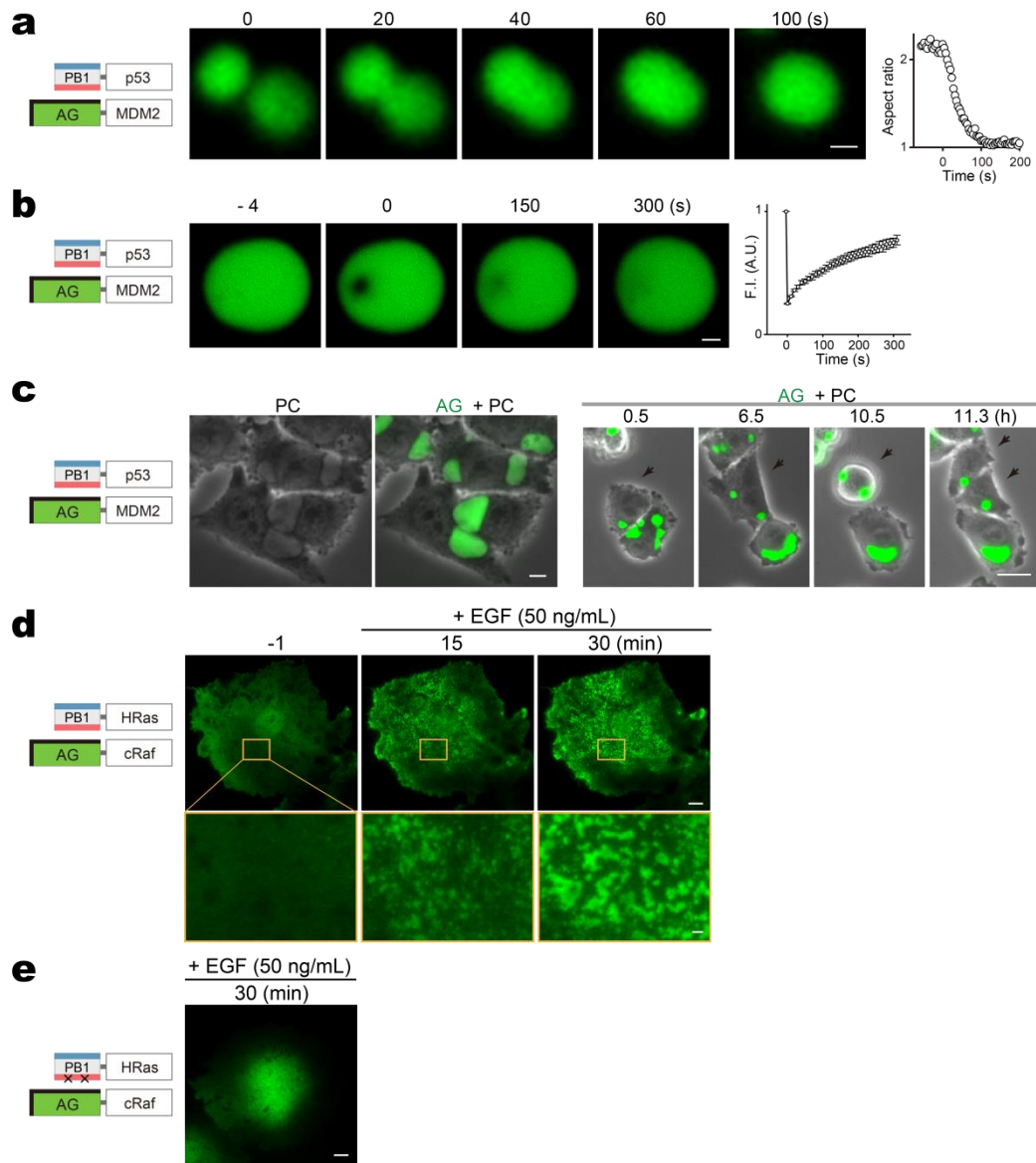


図 10. Fluoppi の蛍光輝点における液相転移

(a-c) PB1-p53 および AG-MDM2 を恒常的に共発現する CHO-K1 細胞における Fluoppi 蛍光輝点構造内の液体様状態。(a) 蛍光輝点の消失を引き起こすために、細胞を 20 $\mu$ M nutlin-3 で処理した。薬剤を洗い流し、その後、蛍光輝点が再

形成され成長する様子を観察した。直径 $\sim 2\mu\text{m}$ の2つの円形の蛍光輝点が触れ  
(0秒)、2分間で融合し、円形を回復した。時間経過に対するアスペクト比の  
変化をプロットした(右端)。 $< 3\mu\text{m}$ の直径を有する4つの他の蛍光輝点におい  
ても、同様の結果を得ている。(b) 蛍光輝点(直径 $5\mu\text{m}$ )へのFRAPの適用。  
褪色領域における蛍光強度の変化を経時的にプロットした(右端)。同様の結果  
は、 $10\mu\text{m}$ 未満の直径を有する他の4つの蛍光輝点においても観察された。

(c) 蛍光輝点を有する細胞を経時的に観察した結果を示す。PCは位相コント  
ラスト画像を示す。AG+PCは蛍光画像と位相差画像を重ね合わせた画像を示  
す。右に、増殖細胞のタイムラプスイメージング(AG+PC)の画像を示す。1  
つの細胞が分裂する様子を黒色の矢印で示す。補助ビデオ7も参照のこと。最  
も大きな蛍光輝点( $> 10\mu\text{m}$ )は不規則な形態であった。同様の画像は別の  
CHO-K1クローンを用いる事でも得られている。(d, e) TIRF顕微鏡画像。EGF  
(C)で刺激した後のPB1-HRasおよびAG-cRafを共発現するCos-7細胞の表面  
には、2次元相分離(スピノーダル文様)が観察された。同様の文様は5つの他  
の細胞でも観察されている。モノマーPB1(mPB1)を使用した場合、この文様  
は観察されなかった(補足図2b参照)。補助ビデオ8も参照のこと。(a-d) 遺伝  
子導入した構築物のドメイン構造を左端に示す。スケールバーは $1\mu\text{m}$ (a, b)、  
および $10\mu\text{m}$ (c-e)を示す。拡大画像内のスケールバー(d)は $1\mu\text{m}$ を示す。

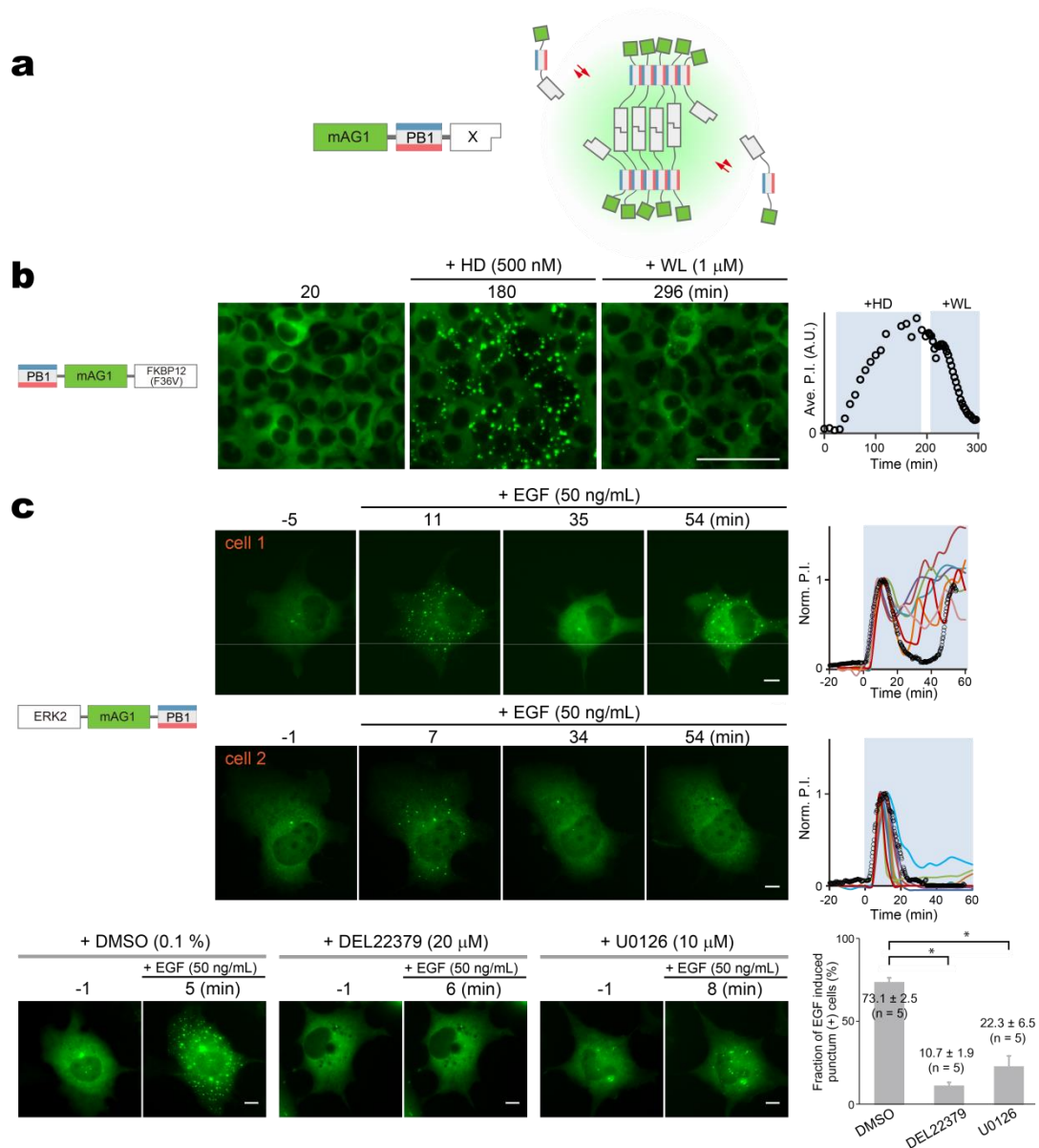


図 1 1. mAG1-PB1 タグを用いたホモダイマー検出手法(HomoFluoppi)

(a) X のホモ二量化により、複数の mAG1-PB1-X 分子が架橋を形成し、mAG1 蛍光の濃度が上昇することで蛍光輝点が形成される (緑色の陰影)。(b) PB1-mAG1-FKBP12 (F36V) を恒常的に発現する HEK293 細胞を用いて、FKBP12 (F36V) のホモ二量体化を薬理的に調整した。ホモ二量体化を 500 nM の HD

により誘導し、その後 1  $\mu$ M の WL により阻害した。観察開始時を 0 とした。蛍光輝点は、解析ソフトウェアを用いて自動的に領域決定し、細胞数は手動で計測した。右端に、平均化した PI の時間経過を示す。スケールバーは 100  $\mu$ m を示す。補足ビデオ 9 も参照のこと。実験は 3 回実施した。(c) ERK2-mAG1-PB1 を一過的に発現する Cos-7 細胞において、ERK2 の EGF 依存的ホモ二量体化を観察した。ERK2 ホモ二量体化を 21 個の細胞で定量したところ、蛍光輝点形成は 9 細胞では振動的であり、12 細胞では一過的であった。代表的な画像を細胞 1 (上) および細胞 2 (下) として示す。PI の時間経過を右端のグラフに示す。細胞 1 および細胞 2 からのデータは黒色のドットで表示。蛍光輝点は解析ソフトウェアを用いて自動的に領域決定した。50 ng / mL の EGF を添加した時点を 0 とし、PI を第一ピークの値で標準化した。PI の時間プロファイルには多様性が観察されたが、全ての細胞において第一の蛍光輝点形成は、EGF 添加の 5~10 分後に観察された。補足ビデオ 10 および 11 も参照のこと。50 ng / mL EGF の添加 30 分前に、DMSO、DEL22379、U0126 処理を行った結果を下に示す。それぞれ、代表的な画像を示す。グラフは、EGF 誘導性の蛍光輝点が観察された細胞の割合を示す。各実験において、約 20 個の細胞をカウントし、5 回の実験の平均  $\pm$  s.e.m を表示。統計的有意差は、Bonferoni の多重比較試験により算出 (\* p < 0.0001)。スケールバーは 10  $\mu$ m を示す。

表 1. HTS の標的 PPI

<i>Target Proteins</i>		<i>Functions</i>	<i>Dilution Ratio</i>
TCF7-mKGN	$\beta$ -catenin-mKGC	Regulation of transcription factor	1 : 32
PAC1-mKGN	mKGC-PAC2	Proteasome assembly factor	1 : 8
mKGN-PAC3	mKGC-PAC3	Proteasome assembly factor	1 : 32

表 2. スクリーニングを実施したサンプル数とヒット率

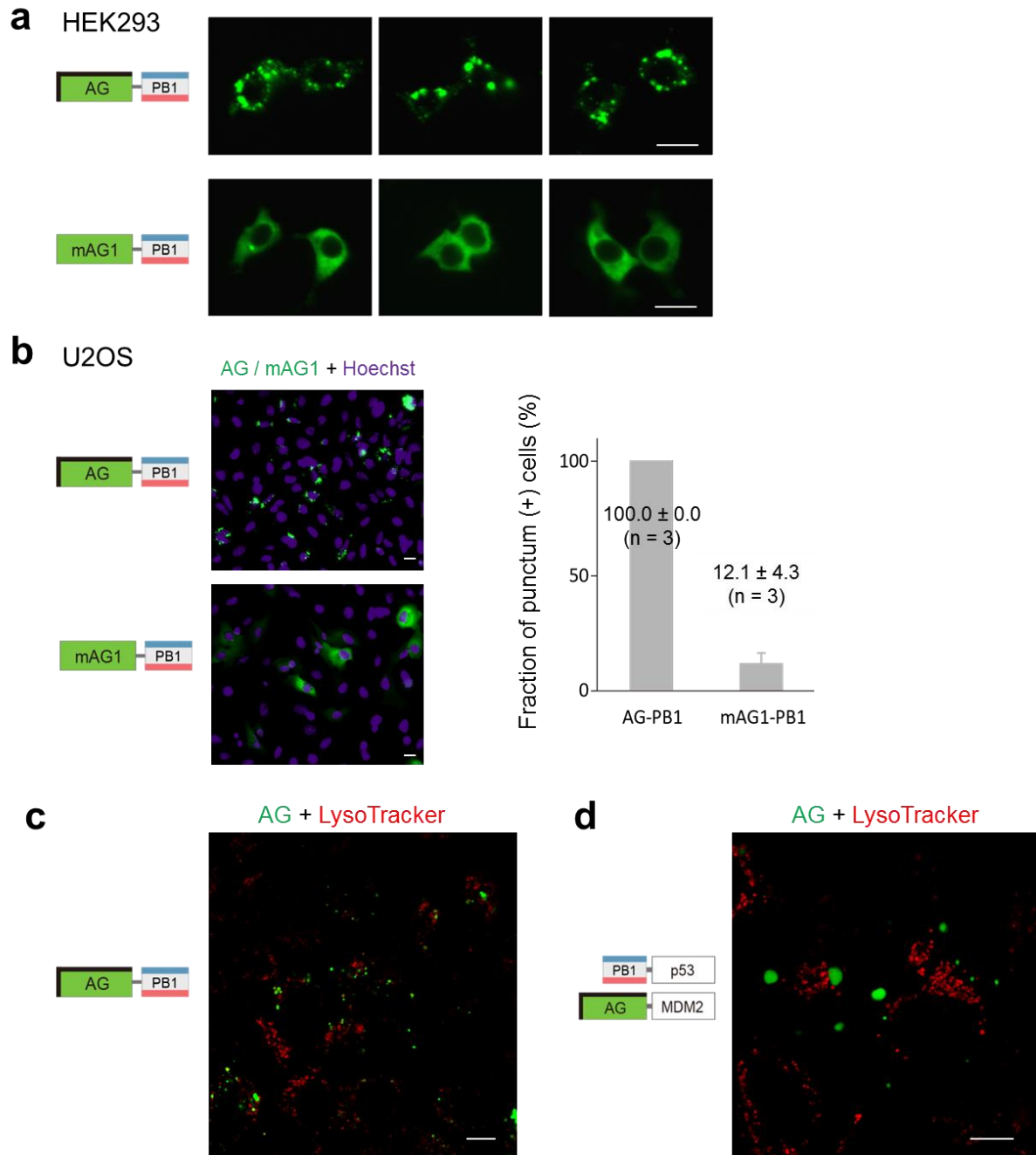
Target	Number of Screened Samples	First Hit, n (%) <sup>a</sup>	Selective Hit, n (%) <sup>b</sup>	Specific Hit, n (%) <sup>c</sup>
TCF7/ $\beta$ -catenin	123,599	311 (0.25)	18 (0.01)	0 (0)
PAC1/PAC2	123,599	399 (0.32)	40 (0.03)	2 (0.0016)
PAC3 homodimer	123,599	1,503 (1.21)	257 (0.21)	9 (0.0073)

- a. 標的に対し、70%以上の活性を示すヒットサンプル。  
 b. a の内、標的以外に対し、30%以下の活性を示すヒットサンプル。  
 c. b の内、再現性と容量依存性が確認されたヒットサンプル。

表 3. 阻害剤の各 PPI における IC50 値( $\mu\text{M}$ )

Compound	PAC3 homodimer	PAC1/PAC2	TCF7/ $\beta$ -catenin
TB1	0.020	>250	>250
JBIR-22	0.20	6.0	6.6
TN-01	15	95	87
TAN 1323D	32	19	40
Soyasaponin I	1.2	7.8	44
Soyasaponin II	6.8	55	25
Leucanidicin	15	>250	>250
Oleic acid	1.0	2.2	29
Linoleic acid	2.3	3.5	30
Linolenic acid	7.0	11	71

## 補足図表およびビデオ

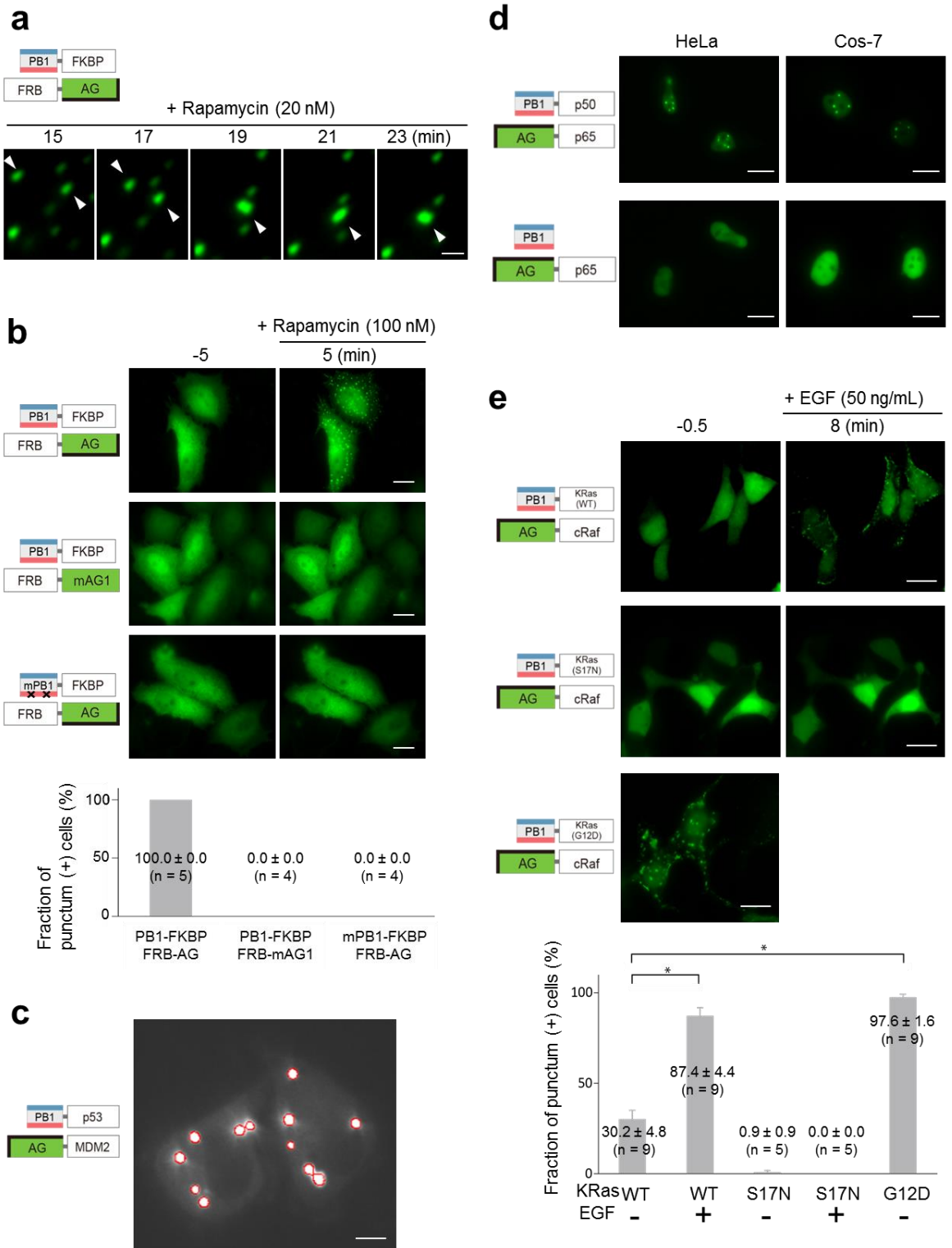


補足図 1. PB1 を AG もしくは mAG1 に融合させた場合の細胞内蛍光分布

(a) AG-PB1 (上) および mAG1-PB1 (下) を発現する HEK293 細胞の代表的

な蛍光画像。遺伝子導入の1日後に画像を取得した。スケールバーは10  $\mu\text{m}$ を示す。(b) AG-PB1 (上) および mAG1-PB1 (下) を発現する U2OS 細胞の代表的な蛍光画像。Hoechst33342 で核染色した後、遺伝子導入の1日後に画像を取得した。AG-PB1 または mAG1-PB1 の被験細胞における蛍光輝点形成細胞の割合を計算した。各実験において、約20個の細胞をカウントし、3回の実験の平均 $\pm$ s.e.mを表示。スケールバーは10  $\mu\text{m}$ を示す。(c、d) AG-PB1 (c) および PB1-p53 / AG-MDM2 (d) を発現する HeLa 細胞の代表的な蛍光画像。遺伝子導入の1日後、50 nM の LysoTracker Red DND-99 (L7528) を含む HBSS 中で、30分間 37°C CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養し、その後画像を取得した。蛍光輝点はリソソームから分離されていた。スケールバーは10  $\mu\text{m}$ を示す。

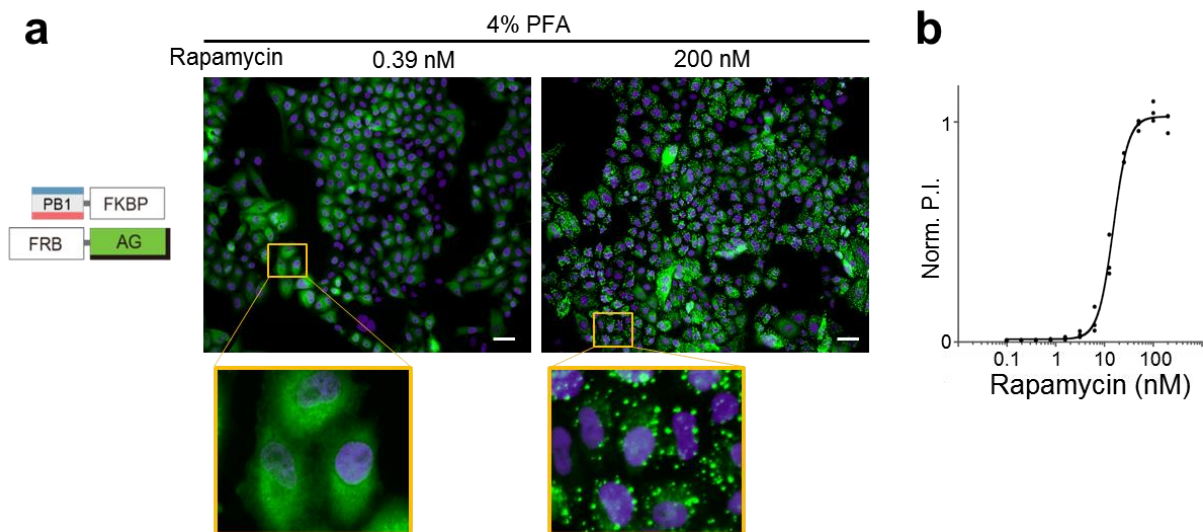




補足図 2. PB1 と AG を用いた Fluoppi の評価と応用

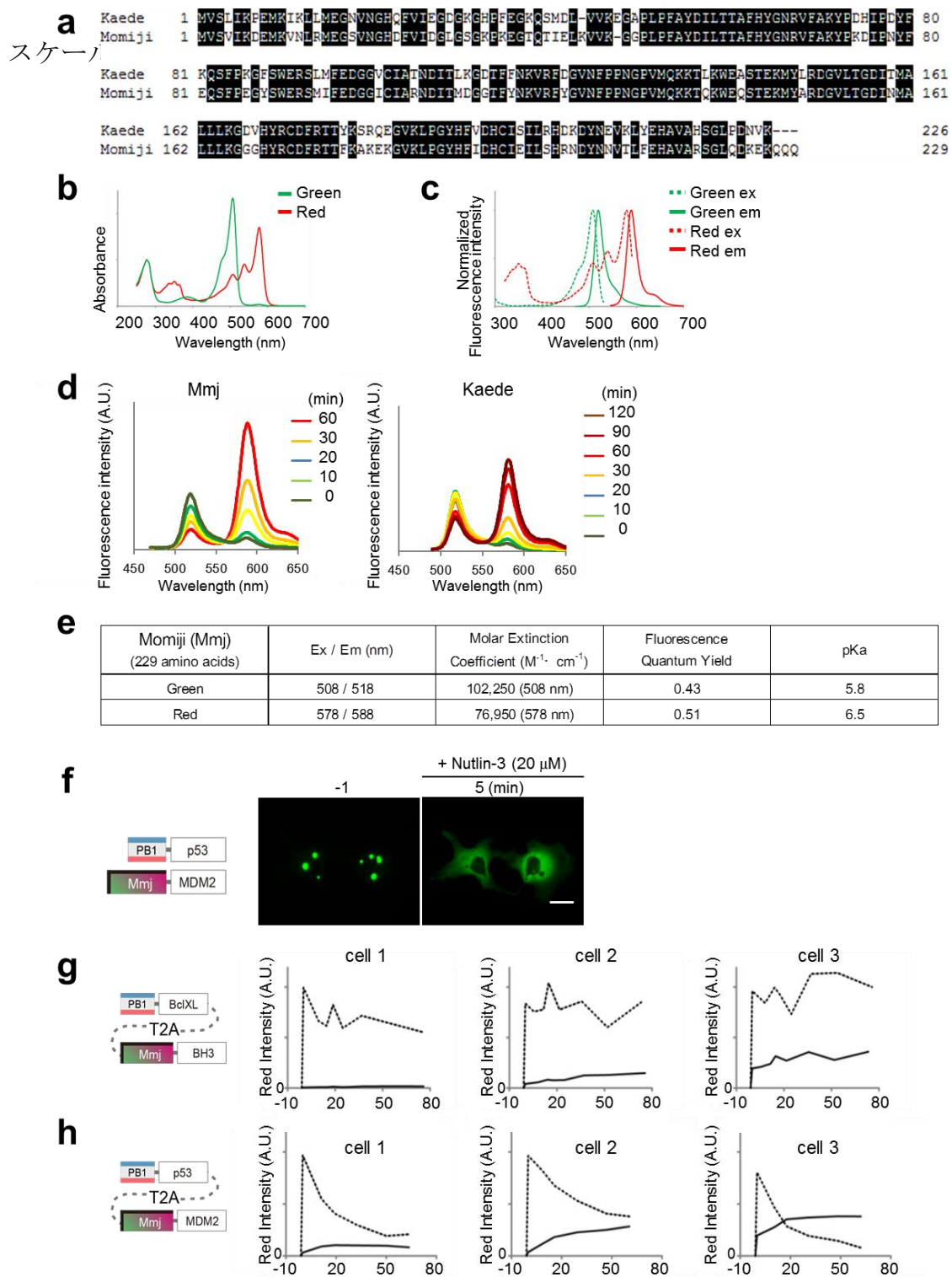
(a) PB1-FKBP および FRB-AG を共発現する HeLa 細胞における rapamycin 依存的蛍光輝点形成のタイムラプスイメージング。矢印は、互いに衝突して融合した 2 つの輝点を示す。スケールバーは 1  $\mu\text{m}$  を示す。(b) HeLa 細胞における FRB と FKBP との間の rapamycin 依存的蛍光輝点形成は、AG と PB1 の両方のホモオリゴマー化能力を必要とした。PB1-FKBP / FRB-AG (上段)、PB1-FKBP / FRB-mAG1 (中段)、および mPB1 (2 つの突然変異を有する単量体 PB1 : D67A および D69R) -FKBP / FRB-AG (下段)。100 nM rapamycin の添加前 (-5 分) および添加後 (5 分) に細胞を画像化した。3 回の遺伝子導入実験について、蛍光輝点を有する細胞の割合を計算した。データは平均  $\pm$  s.e.m を表示 (n = 4 または 5)。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$  を示す。(c) P.I.を計算する際の、蛍光輝点の領域決定。輝点の認識は、ICY open bioimage informatics platform の Spot detector plugin を使用して実施した。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$  を示す。(d) 核内で起こる PPI への Fluoppi の適用。PB1-p50 / AG-p65 (上) および PB1 / AG-p65 (下) を発現する HeLa (左) および Cos-7 (右) 細胞の代表的な蛍光画像。遺伝子導入の 1 日後に画像を取得した。p50 と p65 との相互作用により、核内で蛍光輝点の形成が観察された。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$  を示す。(e) 細胞膜直下で起こる PPI への Fluoppi の適用。PB1-KRas (野生型) / AG-cRaf (上)、PB1-KRas (S17N) / AG-cRaf (中) および PB1-KRas (G12D) / AG-cRaf (下) を発現する HEK293 細胞の代

表的な蛍光画像。50 ng / mL EGF の添加の前 (-0.5 分) および添加後 (8 分) に画像化した。KRas と cRaf の EGF 依存的相互作用により、細胞膜付近で蛍光輝点の形成が観察された。グラフは、蛍光輝点を有する細胞の割合を計測した。約 20 個の細胞をカウントし、5 または 9 回の実験の平均 ± s.e.m を表示。統計的有意差は、Bonferoni の多重比較試験により算出 (\* p < 1E-9)。スケールバーは 10 μm を示す。



補足図 3. HCA アプローチによる、薬剤依存的 PPI 調整の評価

(a、b) FKBP / FRB 複合体の rapamycin 依存的相互作用。PB1-FKBP および FRB-AG の恒常発現 HeLa 細胞を使用した。各濃度の rapamycin を 30 分間処理した後、細胞を 4%PFA で 10 分間固定し、それらの核を Hoechst33342 で染色した。 (a) 遺伝子導入した構築物のドメイン構造を左端に示す。画像は、0.39 および 200 nM の rapamycin で処理した細胞の代表的な視野を示す。 (b) 横軸を rapamycin 濃度、縦軸を標準化 P.I.とした用量阻害曲線。蛍光輝点と核は、それぞれ解析ソフトウェアを用いて自動的に領域決定した。P.I.は、視野中の全ての蛍光輝点の蛍光輝度を核の総数で割ることにより算出した。P.I.は最も高い rapamycin 濃度添加時の値で標準化した。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$  を示す。

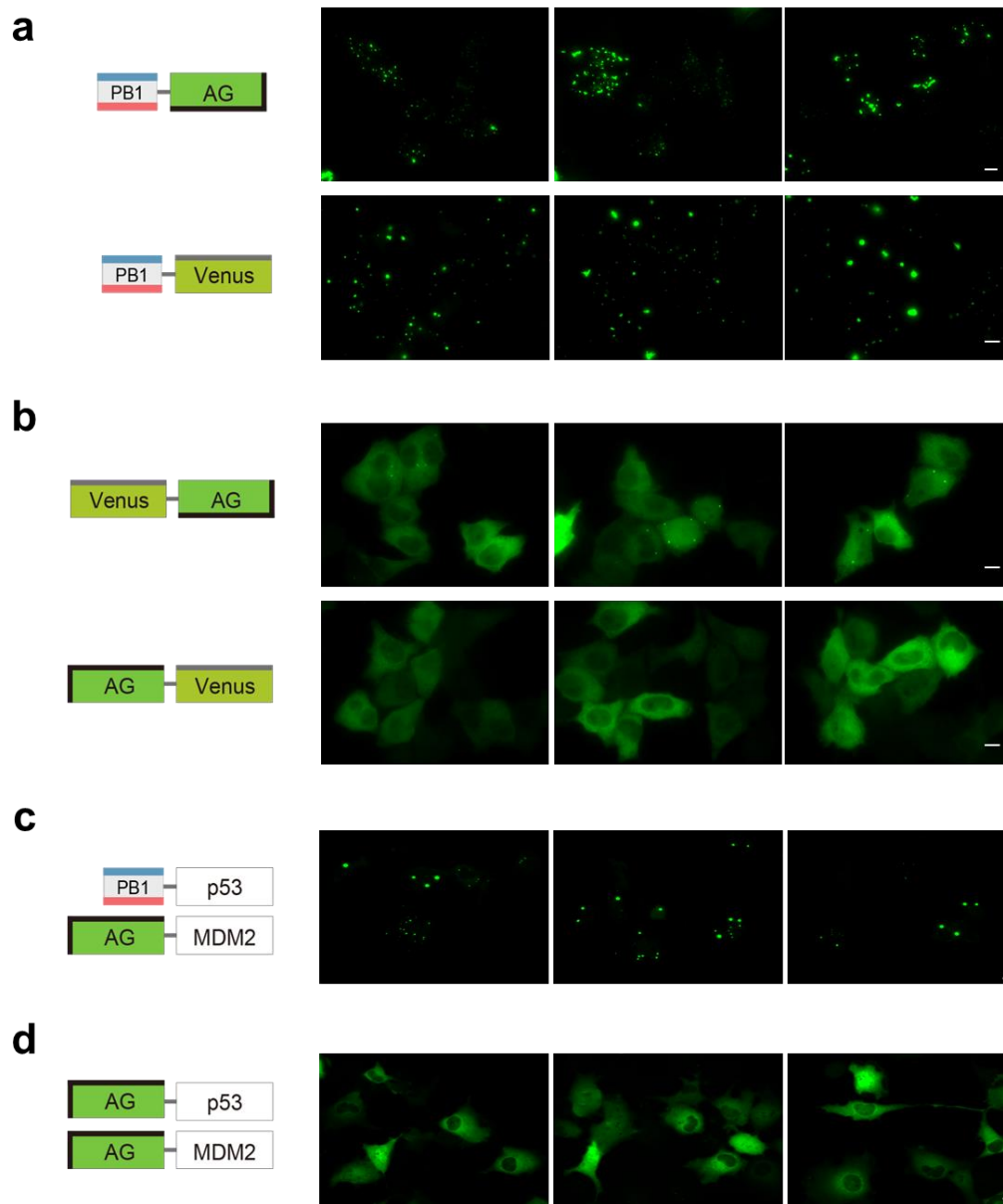


補足図 4. 新規光変換型 FP, Momiji (Mmj)とその Fluoppi への応用

(pcFluoppi)

(a) Momiji (Mmj)のアミノ酸配列（一文字表記）および、Kaede との配列アライメント。 (b) Mmj の波長変換前（緑色）および変換後（赤色）の吸収スペクトル。 (c) Mmj の波長変換前（緑色）および変換後（赤色）の励起（破線）および蛍光（実線）スペクトル。スペクトルは、各ピークにて標準化した。(d) Mmj および Kaede に 365nm の光を連続的に照射した際の、緑色から赤色への波長変換。蛍光スペクトルの変化を示す。(e) Mmj の緑色および赤色状態の性質。

(f) p53 / MDM2 複合体の nutlin-3 依存的解離。 PB1-p53 と Mmj-MDM2 の遺伝子導入 1 日後、細胞を 20  $\mu$ M の nutlin-3 で処理した。nutlin-3 の添加前 (-1 分) および添加後 (5 分) の蛍光画像を示す。スケールバーは 10  $\mu$ m を示す。 (g) BcLXL / BH3 複合体の蛍光輝点間交換に関する同様のデータを、3 つの他の細胞から得た。 (h) p53 / MDM2 複合体の蛍光輝点間交換に関する同様のデータを、3 つの他の細胞から得た。



補足図 5. PB1 の多量体形成能は Fluoppi 蛍光輝点の形成に必要なである

(a) PB1 を AG または Venus に融合することで PB1-AG (上) および PB1-Venus (下) を作製し、HeLa 細胞に遺伝子導入した結果を示す。両構築物は大きな蛍光輝点を形成した。(b) (a) で使用した 2 種の異なるホモオリゴマー化 FP を

遺伝的に融合した。 Venus-AG（上）および AG-Venus（下）。 どちらも蛍光輝点を生じなかった。（c） PB1-p53 と AG-MDM2 の遺伝子導入は図 2C 同様、大きな蛍光輝点を形成した。（d） AG-p53 および AG-MDM2 の同時発現では蛍光輝点は形成されなかった。（a-d） スケールバーは 10  $\mu\text{m}$  を示す。



補足表 1. 本研究における Fluoppi 法で解析した PPI (補足図は除く)

Figure	Construct	Event	Stimulation	Segmentation		Quantification	
				Punctum	Cell (Nuc)	Punctum intensity	Graph
2	PB1 - p53 : AG - MDM2	dissociation	Nutlin-3	automatic	manual	AG fluorescence / cell no.	Temporal Profile
	M13 - PB1 : CaM - KO	oscillatory association	Histamine			KO fluorescence / cell no.	Temporal Profile
3	PB1 - p53 : AG - MDM2	dissociation	Nutlin-3	automatic	automatic	AG fluorescence / cell no.	Dose-Response Curve
	PB1 - p53 : AG - MDM2	dissociation	Nutlin-3	-	-	AG fluorescence / Hoechst fluorescence	Dose-Response Curve
	SmacNT - PB1 : XIAP - AG	dissociation	AT-406	automatic	manual	AG fluorescence / cell no.	Temporal Profile
	SmacNT - PB1 : XIAP - AG	dissociation	AT-406	automatic	automatic	AG fluorescence / cell no.	Dose-Response Curve
4	PB1 - p53 : Mmj - MDM2	fast exchange					
	PB1 - BclXL : Mmj - BH3	slow exchange	light	-	-	Mmj (red) fluorescence / region	
	PB1 - p53 : Mmj - MDM2	fast exchange					
6	PB1 - mAG1 - FKBP12(F36V)	association dissociation	B/B Homodimerizer B/B Washout Ligand	automatic	manual	mAG1 fluorescence / cell no.	Temporal Profile
	ERK2 - mAG1 - PB1	pulsatile association	EGF	automatic	manual	mAG1 fluorescence / cell no.	Temporal Profile

補足表 2. 他の FP を利用した PPI 検出手法と Fluoppi の性能比較

Properties	Redistribution										Tag proximity	
	Phase transition	Cluster formation		Translocation to platforms				RET	PCA	dimer formation		
	Fluoppi	InCell SMART-i	F2H (Lac operator)	F3H (Lac operator)	F3H (MBD/Lamin/Centrin)	FLS	GRIP	FRET	BFC	ddFP		
Reversibility (Dissociation)	Yes	N.T.	Yes	Yes	Yes	N.T.	Yes	Yes	No	Yes		
PPI Kinetics (Kon, Koff)	Yes	?	No	No	No/Yes (Lamin)	?	N.T.	No	No	No		
Foci formation by chemicals	No	Yes (Rapamycin)	No	No	No	No	Yes (RS25344)	—	—	—		
Dynamic range	High	High	Modest <sup>d</sup>	Modest <sup>d</sup>	Modest <sup>d</sup> / High (MBD)	High <sup>g</sup>	Modest <sup>d</sup>	Low	High	Modest ~ High		
Simplicity	Yes	No <sup>b,c</sup>	No <sup>b,c</sup>	No <sup>b,c</sup>	No <sup>c</sup>	?	No <sup>h</sup>	No <sup>i</sup>	Yes	Yes		
Compartment	JM/Cyto/Nuc	JM/Cyto/Nuc	Nuc	Nuc	Cyto/Nuc	Cyto	Cyto	Anywhere	Anywhere	Anywhere		
Homodimer detection	Efficient <sup>a</sup>	Possible	Possible	Possible	Possible	Possible	Possible	Possible	Possible	Possible		
Wide applicability	Yes	Yes	Yes	Yes	N.T. <sup>f</sup>	Yes	N.T. <sup>f</sup>	Yes	Yes	Yes		
Fixation resistance	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	N.T.		
HCA (Image based)	Yes	N.T.	Yes	N.T.	N.T.	N.T.	Yes	Yes	Yes	N.T.		
HTS (Detection by PMT)	Yes	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	Yes	Yes	N.T.		
References	This report	9, 10	6, 8, 49-55	7, 56	7	41, 57	58	2, 26, 59, 60	3, 61	4, 5		

a, Single fusions are sufficient.

b, Requires Rapamycin.

c, Requires 3 or more gene transfection.

d, High background noise or limited dynamic range.

e, Requires stable cell lines which possess the Lac operator integrated genome.

f, Only p53/MDM2 reported.

g, Accompanied by immunostaining in mammalian cells.

h, Requires RS25344.

i, Requires expertise.

N.T., Not tested.

RET, Resonance energy transfer.

PCA, Protein complementation assay.

F2H, Fluorescent two hybrid.

F3H, Fluorescent three hybrid strategy using genome-integrated Lac operator array.

FLS, Factory-like structures.

GRIP, Green fluorescent protein-assisted readout for interacting proteins.

BIFC, Bimolecular fluorescence complementation.

HCA, High content analysis.

HTS, High throughput screening.

PMT, Photomultiplier tube.

JM, Juxta Membrane ; Cyto, Cytosol; Nuc, Nucleus.

Bioluminescent methods, such as bioluminescence resonance energy transfer, are not covered here.

<https://www.nature.com/article-assets/npg/srep/2017/170413/srep46380/extra/srep46380-s1.mov>

#### 補足ビデオ 1. Rapamycin による FRB/FKBP 相互作用の誘導

PB1-FKBP および FRB-AG を恒常的に共発現する HeLa 細胞における、FRB と

FKBP の rapamycin 依存的相互作用の可視化。約 10 秒ごとに画像を取得した。

観測時間 (分 : 秒)。t = 00 : 00 に rapamycin (20 nM) を添加した。図 7b に示し

た画像は、このビデオから作成した。

<https://www.nature.com/article-assets/npg/srep/2017/170413/srep46380/extra/srep46380-s2.mov>

#### 補足ビデオ 2. 蛍光輝点の頻繁な融合

補足ビデオ 1 に示したビデオを拡大して表示した。観測時間 (分 : 秒)。

<https://www.nature.com/article-assets/npg/srep/2017/170413/srep46380/extra/srep46380-s3.mov>

#### 補足ビデオ 3. Nutlin-3 による p53/MDM2 相互作用の解離

PB1-p53 と AG-MDM2 を一過的に発現する 2 つの HeLa 細胞における、

p53/MDM2 複合体の nutlin-3 依存的解離の可視化。約 10 秒ごとに画像を取得し

た。観測時間 (分 : 秒)。t = 00 : 00 に nutlin-3 (20  $\mu$ M) を添加した。図 7c に示した画像は、このビデオから作成した。

<https://www.nature.com/article-assets/npg/srep/2017/170413/srep46380/extra/srep46380-s4.mov>

#### 補足ビデオ 4. EGF による KRas/c-Raf 相互作用の誘導

PB1-KRas および AG-cRaf を一過的に共発現する HEK293 細胞における、KRas と cRaf の EGF 依存的相互作用の可視化。約 10 秒ごとに画像を取得した。観測時間 (分 : 秒)。t = 00 : 00 に EGF (50 ng/mL) を添加した。補足図 2e (上) に示した画像は、このビデオから作成した。

<https://www.nature.com/article-assets/npg/srep/2017/170413/srep46380/extra/srep46380-s5.mov>

#### 補足ビデオ 5. ヒスタミンによる CaM/M13 の振幅的相互作用の誘導

M13-PB1 および CaM-KO を一過的に共発現する HeLa 細胞における、CaM と M13 のヒスタミン添加による振幅的相互作用の可視化。1.5 秒ごとに画像を取得した。観測時間 (秒)。t = 0 にヒスタミン (100  $\mu$ M) を添加した。図 7d に示した画像は、このビデオから作成した。

<https://www.nature.com/article-assets/npg/srep/2017/170413/srep46380/extra/srep46380-s6.mov>

#### 補足ビデオ 6. AT-406 による Smac/XIAP 相互作用の解離

SmacNT-PB1 と XIAP-AG を恒常的に発現する HEK293 細胞における、Smac/XIAP 複合体の AT-406 依存的解離の可視化。約 30 秒ごとに画像を取得した。観測時間 (分 : 秒)。t = 00 : 00 に AT-406 (25  $\mu$ M) を添加した。図 8e に示した画像は、このビデオから作成した。

<https://www.nature.com/article-assets/npg/srep/2017/170413/srep46380/extra/srep46380-s7.mov>

#### 補足ビデオ 7. 液相液滴のタイムラプス観察

PB1-p53 と AG-MDM2 を恒常的に発現する CHO-K1 細胞の観察。15 分ごとに画像を取得した。観測時間 (時間 : 分)。図 10c に示した画像は、このビデオから作成した。

<https://www.nature.com/article-assets/npg/srep/2017/170413/srep46380/extra/srep46380-s8.mov>

#### 補足ビデオ 8 . HRas/cRaf 相互作用時の相分離

細胞膜上の 2 次元相分離の可視化。 ミクロンサイズの構造は、EGF 刺激および PB1 多量化能により誘導された HRas と cRaf との間の相互作用に依存して現れた。 PB1-HRas および AG-cRaf (左) および mPB1-HRas および AG-cRaf (右) を共発現する Cos-7 細胞を、全反射顕微鏡によって経時的に画像化した。約 10 秒ごとに画像を取得した。観測時間 (分:秒)。図 10d および図 10e に示した画像は、このビデオ (左および右) から作成した。

<https://www.nature.com/article-assets/npg/srep/2017/170413/srep46380/extra/srep46380-s9.mov>

#### 補足ビデオ 9 . FKBP12(F36V)ホモ二量体形成の薬剤による制御

PB1-mAG1-FKBP12(F36V)を恒常的に発現する HEK293 細胞における、FKBP12(F36V)の HD (500 nM)依存的相互作用と、続く WL(1  $\mu$ M)依存的解離の可視化。10 分ごとに画像を取得した。観測時間 (分:秒)。t = 29 : 59 に HD を添加した。液交換は t = 180:06 に行った。その後、t = 204 : 19 に WL を添加した。図 11b に示した画像は、このビデオから作成した。

<https://www.nature.com/article-assets/npg/srep/2017/170413/srep46380/extra/srep46380-s10.mov>

#### 補足ビデオ 10. EGF による ERK2 ホモ二量体形成

ERK2-mAG1-PB1 を一過的に発現する Cos-7 細胞における、ERK2 の EGF 依存的相互作用の可視化。約 10 秒ごとに画像を取得した。観測時間 (分:秒)。。t = 00 : 00 に EGF (50 ng/mL) を添加した。図 11c (上) に示した画像は、このビデオから作成した。

<https://www.nature.com/article-assets/npg/srep/2017/170413/srep46380/extra/srep46380-s11.mov>

#### 補足ビデオ 11. EGF による ERK2 ホモ二量体形成

ERK2-mAG1-PB1 を一過的に発現する Cos-7 細胞における、ERK2 の EGF 依存的相互作用の可視化。約 10 秒ごとに画像を取得した。観測時間 (分:秒)。。t = 00 : 00 に EGF (50 ng/mL) を添加した。図 11c (中) に示した画像は、このビデオから作成した。