

細胞内現象をリアルタイムに可視化する技術と光で操作する技術の開発

●宮脇 敦史¹⁾ ◆下藪 哲¹⁾ ◆深野 天¹⁾ ◆筒井 秀和¹⁾²⁾

1) 理化学研究所 脳科学総合研究センター 2) 大阪大学医学部

<研究の目的と進め方>

生きた細胞や組織において、入力（外界刺激など）に依存して起こる、生体分子間相互作用（酵素—基質相互作用を含む）や生体分子の構造変化を出力として測定し、入力と出力との関係を解析するための光技術を開発する。光を用いることによって、入力の供給、出力の観察における高い時間・空間的分解能を追求することができる。たとえば、細胞のある細胞内小器官の一部で、ある生体分子を光によって瞬間的に活性化し、その分子に関わる複数の細胞内動態の時間的、空間的变化を蛍光イメージングによって解析していくような実験が考えられる。

当領域にあって、上記の技術開発を、バイオインフォマティクスを武器に展開させることを狙う。すなわち、ゲノム情報やシステム情報を活用し、“生きた細胞にどのような摂動を加えるか？何をどのように観察すると面白いのか？何と何を同時に観るべきか？”などを議論しながら、新しい蛍光色素、プローブの開発を行う。ゲノム解析、プロテオーム解析と比較して、生命システムに関する、より“柔らかい”あるいは“動的な”情報が得られることが期待される。

光を用いる可視化技術の中でも、可視域光を用いる蛍光イメージングは、その発展が世界的に注目されつつある。とくに蛍光蛋白質やQドットなどの台頭の影響が大きい。しかしながら、生命システムに関する問題を、蛍光イメージングによって見事に解明した研究例はまだ少ない。先述したように、生命システム論に基づいたイメージングデザインが必要である。また、光で操作する技術の発展によって、細胞内現象の拡がりをもより定量的に記述することができるようになってきた。reaction-limited processあるいはdiffusion-limited processを区別することによってシュミレーションは大きく進展するはずである。

<研究開始時の研究計画>

まず、分子プローブ作製担当者および当領域内の有識者を交えて、“生きた細胞にどのような摂動を加えるか？何をどのように観察すると面白いのか？何と何を同時に観るべきか？”などを議論する。細胞内のシグナル伝達として、カルシウム、チロシンリン酸化、低分子G蛋白質の活性化、アポトーシスに伴う蛋白質分解などの現象に注目し、それらのカスケード内、あるいは間で複数の現象を同時に可視化するための実験系を構築する。生命システムを記述する連立微分方程式から、観るべき分子をしぼっていき、適当な分子を材料にして蛍光プローブを開発する。一方、光で操作する技術は、注目する分子を適切に蛍光ラベルすると同時に、光照射を自由自在にコントロールする機器の調整および開発が必要である。後者をエンジニアリング担当者が行う。細胞内における分子の動態などを定量し、分子と分子とを結ぶ線が、反応によるのか（reaction-limited）、拡散によるのか（diffusion-limited）を検討する。とくに局所的な刺激に対して、シグナルがいかに発生して時空間的に細胞内を広がっていくかを議論できるようなsimulationを試みる。

<研究期間の成果>

- ・ CFP から YFP へ 98% の FRET (Fluorescence resonance energy transfer) 効率を達成する融合蛋白質を開発し、それを細胞・蛋白質のマーキング技術に応用した。
- ・ 世界で最も大きいストークスシフト（励起波長と蛍光波長の差）を示す蛍光タンパク質 (Keima) を開発し、一本のレーザー発振線で行う FCCS (fluorescence cross-correlation spectroscopy) 技術の有用性を証明した。
- ・ DMD (digital micromirror device) を搭載した蛍光顕微鏡システムを開発し、褪色を抑えることによって、定量性の高い FRET 観察を可能とした。
- ・ 蛍光タンパク質を用いた FRET を行うためのコンストラクト作製法について概説すると共にフレキシブルなリンカーをもつ融合タンパク質を簡便に作製可能なベクターを開発した。
- ・ フォトクロミズムを示す蛍光蛋白質 Dronpa の新しい変異体を開発し、405nm と 488nm の二つのレーザー光が同時にあたった部分でのみ蛍光シグナルを発生させるようなイメージングを提案した。
- ・ 高出力 LED と高速液晶シャッターを用いた 2 波長同時励起レシオイメージング法を開発し、従来法の問題点である時間ずれを完全に解決した。これを用いてラット心筋のカルシウムの濃度変化をビデオレートで測定した。
- ・ 細胞周期をリアルタイムにモニタする蛍光プローブを開発した。これを用いてマウスに移植されたがん細胞の浸潤・転移や、マウスの胚で起こる神経細胞の分化、移動などにおける細胞周期進行の時空間パターンを観察することに成功した。
- ・ AFM カンチレバーを用いた培養細胞への分子導入の方法・装置の開発を行った。これを用いて、HeLa 細胞へ高効率に分子導入を可能にし、培養神経細胞への分子導入にも成功した。
- ・ サング由来蛍光タンパク質による凝集体様構造物 (dots) について解析し、この dots が形成される原因が、サング由来蛍光タンパク質のリソソームプロテアーゼに対する抵抗性であることを示した。
- ・ 2 光子励起蛍光イメージングを異なる色の 2 つの蛍光タンパク質を用いて行う場合、従来はそのそれぞれを異なる波長の超短パルスレーザーで励起するしかなかったが、mKeima と EGFP の組み合わせを用いることにより赤と緑によるデュア

ルカラー2光子イメージングを1つの励起波長で実現した。

- 細胞周期のS/G2/M期にだけ細胞のシルエットを描出することができる蛍光イメージング技術を開発した。これは以前に開発した細胞周期の蛍光プローブ (Fucci) を改変したことによる研究成果である。新しいFucciプローブを活用して、胎生期の神経上皮における神経前駆細胞が、DNA複製と連関して形状を変えながら移動する様子を観察することに成功した。
- われわれが今までに開発してきた2波長同時励起1波長測光によるレシオイメージングの3つの手法について、それぞれの手法の原理および測定例を示すとともに、実際使用する上での利点および欠点について比較検討した。
- 沖縄の海で採取した珊瑚(ウミキノコ)から新しい蛍光蛋白質をクローニングした。試験管内分子進化により、単量体で、明るく、pH抵抗性のある蛍光タンパク質mUKGを開発した。さらに、それを用いて、細胞膜電位の高感度な時空間計測法を開発した。
- 蛍光タンパク質ドロンパはフォトクロミズムを示すが、その分子機構は不明であった。著者らはNMRにより、溶液・常温でのドロンパの構造的特徴を解析した。明状態では水素結合によって発色団が β -バレルにつなぎ留められ、またバレル上のイミダゾール環が発色団の平面性を安定化していた。暗状態ではこれらの相互作用が消滅し、 β -バレルの一部と発色団が可動性となった。分子振動による無輻射遷移が主経路となり無蛍光になると考えられる。
- フォトコンバージョン可能な蛍光タンパク質KikGRを用い、少なくとも細胞分裂後30分間は核膜の透過性が高いことを明らかにした。
- 紫外光で色が換わる蛍光タンパク質kikGRの結晶構造解析を行ったところ、 β 脱離反応における中間体を発見することができた。
- 哺乳類以外で働く細胞周期プローブを作製し、ゼブラフィッシュの発生段階における増殖と分化の相関について知見を得た。

<国内外での成果の位置づけ>

蛍光タンパク質の特性を活用したイメージング技術の開発、および生物現象の時空間制御の解析に関しては、世界をリードしている。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

蛍光タンパク質などの色素の様々な特性を利用して、新しい蛍光イメージングのモードを提案していきたいと考えているのだが、そうした特性を発揮させるべきハードウェアおよびソフトウェアがタイムリーに開発されていない状況である。色素、ハード、ソフトが揃って初めて「使える技術」として普及することが期待される。

<今後の課題、展望>

今回の計画研究では、観察対象を細胞レベルの時空間制御を中心に置いたが、組織レベル、個体レベルでの観察と組み合わせる

必要を痛感してきた。また、超分解顕微鏡技術の台頭に伴い、極小領域を取り扱う観察も考慮することが求められる。よって、サンプルに対して自由自在にズームインかつズームアウトできる蛍光イメージング技術を開発していくことを重要課題と捉えていきたい。

<研究期間の全成果公表リスト>

1) 論文

0606082003

Shimozono S; Hosoi H; Mizuno H; Fukano T; Tahara T; Miyawaki A. (2006) Concatenation of Cyan and Yellow Fluorescent Proteins for Efficient Resonance Energy Transfer. **Biochemistry** 45: 6267-6271.

0606082006

Kogure T, Karasawa S, Araki T, Saito K, Kinjo M, Miyawaki A. (2006) A fluorescent variant of a protein from the stony coral *Montipora* facilitates dual-color single-laser fluorescence cross-correlation spectroscopy **Nature Biotechnology** 24: 577-581.

0601301859

Fukano T, Shimozono S, Miyawaki A. (2005) Fast dual-excitation ratiometry with light-emitting diodes and high-speed liquid crystal shutters. **Biochem Biophys Res Commun.** 330: 250-255.

0601301906

Tsutsui H, Karasawa S, Shimizu H, Nukina N, Miyawaki A. (2005) Semi-rational engineering of a coral fluorescent protein into an efficient highlighter. **EMBO Rep.** 6:233-238.

0705022114

Ando R, Flors C, Mizuno H, Hofkens J, Miyawaki A, (2007) Highlighted generation of fluorescence signals using simultaneous two-color irradiation on Dronpa mutants, **Biophysical J.**, 92: L97-L99.

0701251827

T. Fukano, A. Sawano, Y. Ohba, M. Matsuda, and A. Miyawaki, (2007) "Differential Ras activation between caveolae/raft and non-raft microdomains", **Cell Struct. Func.** 32: 9-15.

0801281129

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., Miyawaki, A. (2008) Visualizing Spatiotemporal Dynamics of Multicellular Cell Cycle Progression. **Cell**, 132: 487-498.

0805201550

Hara, C., Tateyama, K., Akamatsu, N., Imabayashi, H., Karaki, K., Okano, H., Miyawaki, A. (2006) A practical device for delivery of molecules into multiple neurons in culture. **Brain Cell Biology**, 35: 229-237. Epub 2008.

0805201535

Katayama, H., Yamamoto, A., Yoshimori, T., Mizushima, N., Miyawaki, A. (2008) GFP-like proteins stably accumulate in

lysosomes, *Cell Struct Funct.* 33: 1-12.

0805201549

Kawano, H., Kogure, T., Abe, Y., Mizuno, H., Miyawaki, A. (2008) Two-photon dual-color imaging using fluorescent proteins. *Nat Methods.* 5(5): 373-374.

0901151326

Sakaue-Sawano A, Ohtawa K, Hama H, Kawano M, Ogawa M, Miyawaki A. (2008) Tracing the Silhouette of Individual Cells in S/G₂/M Phases with Fluorescence. *Chemistry & Biology*, 15: 1243-1248.

0901151339

Fukano T, Shimozono S, Miyawaki A. (2008) Development of microscopic systems for high-speed dual-excitation ratiometric Ca(2+) imaging. *Brain Cell Biol.*, 36: 43-52

0901151337

Tsutsui H, Karasawa S, Okamura Y, Miyawaki A. (2008) Improving membrane voltage measurements using FRET with new fluorescent proteins. *Nature Methods*, 5: 683-685.

0901151336

Mizuno H, Kumar Mal T, Wälchli M, Kikuchi A, Fukano T, Ando R, Jeyakanthan J, Taka J, Shiro Y, Ikura M, Miyawaki A. (2008) Light-dependent regulation of structural flexibility in a photochromic fluorescent protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 105: 9927-9932.

0911061431

Shimozono S, Tsutsui H, Miyawaki A. (2009) Diffusion of large molecules into assembling nuclei revealed using an optical highlighting technique. *Biophys J.*, 97(5):1288-1294.

0911091753

Tsutsui H, Shimizu H, Mizuno H, Nukina N, Furuta T, Miyawaki A. (2009) The E1 mechanism in photo-induced β -elimination reactions for green-to red conversion of fluorescent proteins. *Chemistry & Biology*, 16:1140-1147.

0911091756

Sugiyama M, Sakaue-Sawano A, Iimura T, Fukami K, Kitaguchi T, Kawakami K, Okamoto H, Higashijima S, Miyawaki A. (2009) Illuminating cell-cycle progression in the developing zebrafish embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, in press.

2) 学会発表

Miyawaki, A. "Novel Approaches to Visualizing Protein Functions in Living Cells", 3rd The Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences: On the Frontiers of Neuro-PharmaSciences, Tokyo, Japan, 2005.12.6.

Miyawaki, A. "New Fluorescent Probes and New Perspectives in Bioscience", Multi-Institutional International Symposium on "MEI", Sapporo, Japan, 2005.12.7.

Miyawaki, A. "Spatio-temporal dynamics of intracellular signaling", International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2005), Hawaii, USA, 2005.12.18.

Miyawaki, A. "Photo-modulatable fluorescent proteins", International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2005), Hawaii, USA, 2005.12.19.

Miyawaki, A. "New Fluorescent Probes and New Perspectives in Bioscience", Photonics West 2006, Biomedical Optics (BIOS 2006), Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences 6, San Jose, USA, 2006.1.22.

Miyawaki, A. "New Fluorescent Probes and New Perspectives in Bioscience", RIKEN Center for Developmental Biology Symposium 2006: Logic of Development: New Strategies and Concepts, Kobe, Japan, 2006.4.

Miyawaki, A. "Spatial and temporal dynamics of intracellular signaling revealed by bioimaging", Okinawa Institute of Science and Technology (OIST) International Workshop: Single Molecule Analysis, Okinawa, Japan, 2006.4.17

Miyawaki, A. "Visualization of the Spatial and Temporal Dynamics of Intracellular Signaling", National Institutes of Health (NIH) meeting: Frontiers in Live Cell Imaging, Bethesda, USA, 2006.4.20.

Miyawaki, A. "New Fluorescent Probes and New Perspectives in Bioscience", International Conference on Microtechnologies in Medicine and Biology (MMB2006), Okinawa, Japan, 2006.5.10.

Miyawaki, A. "New methods of visualizing signaling with fluorescent imaging", 2006 Gordon Research Conference (GRC): Molecular & Cellular Neurobiology, Hong Kong, 2006.6.13.

Miyawaki, A. "Fluorescence imaging for cellular functions", 2006 Gordon Research Conference (GRC): Single Molecular Approaches to Biology, New London, USA, 2006.6.22.

Miyawaki, A. "Spatio-temporal Patterns of Intracellular Signaling", 7th International Conference on Systems Biology, Yokohama, Japan, 2006.10.9.

Miyawaki, A. "Optical Labeling Techniques", European Molecular Biology Organization (EMBO) Practical Course: Multi-photon imaging of living cells and tissues, Munich, Germany, 2006.10.26.

Miyawaki, A. "New Fluorescent Probes and New Perspectives in Bioscience", National Institutes of Health (NIH) and Japan Society for Promotion of Science (JSPS) Joint Symposium: Frontiers in 21st Century Biomedical Science, Bethesda, USA, 2006.11.7.

Miyawaki, A. "New Fluorescent Probes and New Perspectives in Bioscience", Research Institute of Molecular Pathology (IMP), Institute of Molecular Biotechnology of the Austrian Academy of Science (IMBA) and Boehringer Ingelheim (BI) Meeting: Cellular

and In Vivo Imaging, Vienna, Austria, 2006.11.10.

Miyawaki, A. "Innovations in Fluorescence Imaging of Cellular Functions Using Fluorescent Proteins", The 46th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, San Diego, USA, 2006.12.12.

Miyawaki, A. "New Fluorescent Probes and New Perspectives in Bioscience", International Symposium: Leading edge in Bioscience, Tokyo, 2007.3.17.

Miyawaki, A. "New Fluorescent Probes and New Perspectives in Bioscience" 25th JES Summer Seminar on Endocrinology & Metabolism, Awaji, 2007.7.18

Miyawaki, A. "Spatially restricted generation of fluorescence signals using simultaneous 488- and 405-nm irradiation" Keio International Symposium on Photonics and Molecular Therapy, Tokyo, 2007.8.7.

Miyawaki, A. "New fluorescent probes and new perspectives in bioscience" HHMI Meeting on Fluorescent Proteins and Biological Sensors, Janelia Farm, USA, 2007.10.29.

Miyawaki, A. "New Fluorescent Probes and New Perspectives in Bioscience" 4th Takeda Science Foundation Symposium on Pharma Sciences On the Frontiers of Chemical Biology, Tokyo, 2007.12.3.

Miyawaki, A. "New Fluorescent Probes and New Perspectives in Bioscience" Nature Chemical Biology Symposium 2008: Chemical Neurobiology, New York, USA, 2008.2.22.

Miyawaki, A. "Spatiotemporal dynamics of multicellular cell cycle progression revealed by fluorescence imaging" 3rd Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest Under Stress, Okinawa, Japan, 2008.4.7.

Miyawaki, A., Sakaue-Sawano A., Ando R., Mizuno H., Kogure T., Kurokawa H., Sugiyama M., Sugimura K. "New fluorescent probes and new perspectives in bioscience" Focus on Microscopy 2008, 2008.4.14.

Miyawaki, A. "New Fluorescent Probes and New Perspectives in Bioscience" 9th NIBB-EMBL Symposium: Functional Imaging, Okazaki, Japan, 2009.4.

Miyawaki, A. "New Fluorescent Probes and New Perspectives in Bioscience" Gordon Research Conference on Dendrites: Molecules, Structure and Function, Lucca, Italy, 2009.5.17.

Miyawaki, A. "New Fluorescent Probes and New Perspectives in Bioscience" The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, Kyoto, Japan, 2009.7.28.

3) 図書

Miyawaki, A., Nagai, T., Mizuno, H. (2005) Engineering

fluorescent proteins. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.. 95: 1-15

宮脇 敦史: "フォトクロミック蛍光タンパク質、Dronpa (ドロンパ)" **未来材料**, 5(9),2-4 (2005)

宮脇 敦史: "フォトクロミック蛍光タンパク質、Dronpa(ドロンパ)" **ブレインテクノニュース**, 109, 14-16 (2005)

宮脇 敦史: "タンパク質間相互作用を観る蛍光技術" **現代化学**, 425, 45-50, (2006)

深野 天, 宮脇 敦史: "高輝度発光ダイオードと強誘電性液晶シャッターを用いたビデオレート細胞内カルシウムイオンイメージング" **液晶**, 11, 63-70, (2007).

宮脇 敦史: "蛍光蛋白質の化学" **蛋白質 核酸 酵素**, 37(3), 228-237, (2007).

宮脇 敦史: "フォトクロミック蛍光タンパク質を使って探る生体分子ダイナミズム" **光学**, 36(11), 639-642, (2007).

Shimozono, S., Miyawaki, A. (2007) Engineering FRET Constructs Using CFP and YFP. **Methods Cell Biol.**, 85C: 381-393.

阪上-沢野 朝子, 宮脇 敦史: "インキュベーション顕微鏡を用いた長時間観察" **組織細胞化学**2008, 117-124, (2008)

阪上-沢野 朝子, 正井 久雄, 宮脇 敦史: "細胞周期をリアルタイムに可視化する技術" **実験医学増刊 生命現象の動的理解を目指すライブイメージング**, 26(17), 148-155, (2008)

阪上-沢野 朝子, 宮脇 敦史: "細胞周期を時空間的に可視化する技術" **細胞工学**, 28(1), 15-21, (2008)

阪上-沢野 朝子, 宮脇 敦史: "細胞の分裂を色で追跡する技術" **メディカル・サイエンス・ダイジェスト**, 35(3), 4-5, (2009)

阪上-沢野 朝子, 正井久雄, 宮脇 敦史: "細胞周期を時空間的に可視化する技術" **最新医学**, 64(3), 218-231, (2009)

阪上-沢野 朝子, 正井久雄, 宮脇 敦史: "細胞周期イメージング技術" **Medical Bio**, 6(11), 54-59, (2009)

4) データベース/ソフトウェア
なし

5) 特許出願
特願: 2005-093542 蛍光蛋白質
発明者: 宮脇敦史・下蘭哲
権利者: 理研
出願日: 2005年3月29日

特願: 2004-018344 蛍光蛋白質
発明者: 宮脇敦史・小暮貴子・唐澤智司
権利者: 理研・MBL社

出願日：2004年1月27日

特願：2004-239228 レシオイメージング装置

発明者宮脇敦史・深野天

権利者：理研

出願日：2004年8月19日

特願：2004-150607:蛍光蛋白質

発明者：宮脇敦史・安藤亮子・水野秀昭・唐澤智司

権利者：理研

出願日：2004年5月20日

特願：2007-068240 細胞周期可視化プローブ

発明者：宮脇敦史・阪上朝子・正井久雄

権利者：理研・臨床研

出願日：2007年3月16日

6) 新聞発表、その他顕著なもの

- 2006/5/1 日刊工業新聞 14面「新蛍光たんぱく質を開発」
- 2006/5/1 化学工業日報 9面「新蛍光たんぱく質 開発」
- 2006/5/1 産経新聞 朝刊25面「「赤く光る」タンパク質」
- 2006/5/1 毎日新聞 朝刊3面「細胞 カラフルに観測」
- 2006/5/1 日本経済新聞 朝刊21面「青紫光で赤く光るたんぱく質」
- 2006/5/1 朝日新聞 夕刊3面「分子染め分け 動きくっきり」
- 2006/5/1 夕刊読売新聞 14面「6色に光る細胞」
- 2006/5/2 日経産業新聞 朝刊9面「青紫光で赤く光るたんぱく質」
- 2006/5/12 科学新聞 14面「新しい蛍光タンパク質Keima (ケイマ) 開発」
- 2008/2/8 日経産業新聞 11面「リアルタイムに細胞分裂を観察」
- 2008/2/8 日本経済新聞 朝刊16面「リアルタイムで細胞分裂観察」
- 2008/2/8 読売新聞 朝刊2面「がん細胞分裂色で追跡」
- 2008/2/15 科学新聞 1面「細胞分裂周期リアルタイム可視化」
- 2008/2/18 産経新聞 朝刊9面「生きた細胞の動静”色別”」
- 2008/2/18 毎日新聞 朝刊3面「細胞光らせ増殖観察」
- 2008/2/18 化学工業日報 8面「DNA複製や細胞分裂 蛍光色変化で可視化」
- 2008/12/22 日経産業新聞 10面「光る分子で観察可能」
- 2008/6/25 日経産業新聞 11面「蛍光たんぱく質 発光のしくみを解明」
- 2008/6/27 科学新聞 4面「蛍光タンパク質ドロンパ」
- 2008/7/15 フジサンケイ ビジネスアイ 7面「細胞活動を可視化」
- 2008/7/16 日経産業新聞 12面「検知感度 数倍-10倍に」
- 2008/7/17 化学工業日報 9面「脳などの電気活動可視化」
- 2008/7/18 科学新聞 6面「蛍光タンパク質組み入れ膜電位プローブ感度向上」
- 2009/11/17 日経産業新聞 9面「細胞の増殖常時観察」
- 2009/11/27 科学新聞 4面「ゼブラフィッシュの細胞周期 リアルタイムで可視化 蛍光プローブ開発」