

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⁾ ◆水野 秀昭¹⁾ ◆下蘭 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ミュレーションは大きく進展するはずである。

<2008 年度の研究の当初計画>

- ・神経細胞の興奮（膜電位変化）を可視化するための蛍光プローブを、蛍光タンパク質を用いて開発する。単一活動電位をモニタできるように顕微鏡光学系を開発する。
- ・細胞分裂に伴う核の新生過程において、核膜の透過性がどのように変化するかを解析する。光で色を変えられる蛍光タンパク質の核膜を介する拡散を測定することで、時間分解能の高いデータを収集する。
- ・高感度・定量性のある Rac 指示薬、Rho 指示薬を開発する。培養細胞内における Rac と Rho との活性化の相互作用を解析する。
- ・明状態—暗状態間の移行効率が異なる Dronpa 変異体を揃え

る。高輝度キセノンランプを備えた、大腸菌コロニーのスクリーニングシステムは設置済みである。光変換異特性を備えた蛍光たんぱく質を活用する次世代の光学顕微鏡システムとして、PALM、SPIM への応用を試みる。

<2008 年度の成果>

- ・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。

<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>

光変換特性を備えた蛍光たんぱく質を活用する次世代の超分解能光学顕微鏡システム PALM への応用は、実験環境の整備が遅れている。

<今後の課題>

以下の3項目について技術開発およびデータ取得を行い、細胞内現象の「局所と全体」を議論する。

- ・ 抗ガン剤が細胞周期に及ぼす影響について、Fucci を使った解析を行う。
- ・ アストログリアが神経細胞のシナプス形成に及ぼす影響について、培養細胞を使った解析を行う。
- ・ 短波長の光の照射による DNA 損傷にตอบสนองして起こるシグナリングの可視化技術を開発する。光照射技術とシグナリング可視化技術の両方を開発する。

<成果公表リスト>

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