

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2011～2015

課題番号：23115003

研究課題名(和文)分子プローブと光摂動ツールの開発 - 少数生体分子の可視化・操作技術 -

研究課題名(英文) Development of molecular probes and photo manipulation tools - Technologies for visualization and control of small number of biomolecules

研究代表者

永井 健治 (Nagai, Takeharu)

大阪大学・産業科学研究所・教授

研究者番号：20311350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 226,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、少数分子によって引き起こされる生理現象を可視化するプローブや生体内の分子数を制御するための光摂動ツールの開発を行った。これには、光スイッチング蛍光蛋白質、蛍光生理機能センサー蛋白質、光増感蛋白質、ケージドアミノ酸、リガンド応答性イオンチャネル、光摂動顕微鏡、吸収増幅顕微鏡などが含まれる。さらに、これら技術を他班の研究に適用するとともに、cAMPに対して細胞性粘菌が示す走化性応答のメカニズムにアプローチし、10数個/um²という極めて低密度(=少数)で機能する分子を同定するとともに、数千細胞中のごく少数の細胞が自己組織的集合流形成において支配的な役割を担うことを見出した。

研究成果の概要(英文)：We developed a wide variety of tools to visualize physiological events caused by small number of biomolecules, and also to manipulate molecular number inside cells with light. Included are photo-switchable fluorescent proteins, fluorescent/bioluminescent biosensor proteins, photosensitizer proteins, caged amino acids, ligand-responsive ion channel, microscope with a device for patterned illumination and cavity-reflection-enhanced absorption microscope. We supported researches in other groups by applying these technologies. Moreover, with the developed tools we approached the molecular mechanism of chemotaxis in *D. discoideum*, and discovered biomolecules that can function at very low concentrations (several tens molecules/um²). We also found that very small population of cells among thousands of cell have a predominant role in self-organizing aggregation pattern formation.

研究分野：バイオイメージング

キーワード：光スイッチング 蛍光タンパク質 超解像イメージング 光摂動 顕微鏡 細胞性粘菌 cAMP 走化性

1. 研究開始当初の背景

分子生物学の集大成として、あらゆる遺伝子が同定され、それらの遺伝子産物(タンパク質)が形成する分子ネットワークが網羅されつつある。その分子ネットワークに分子集合体(アンサンブル)の振る舞いを扱う生化学的パラメータをインプットすることで、分子ネットワークが動作する様子を疑似計算できるようになった。一方、アンサンブルの解析からは見えてこない、現象の素過程である個々の分子の振る舞いを捉える事が可能な1分子観察技術によって、様々な生体分子の振る舞いがもっぱらガラス基板上で観察されてきた。ところが、確かに素過程を検出・解析できるようになったものの、実験毎のデータが大きくばらつくため、結局のところ多くの1分子観察データをかき集めて平均値や分散値、あるいは自己相関を求め、それらアンサンブル統計量によって議論を展開しているのが現状である。他方、GFPテクノロジーを用いたバイオイメージングによって、多くの生命現象が生きた細胞や個体内で観察されるようになったが、その多くがGFP融合タンパク質を“過剰発現”させ、かつ小分子リガンドやサイトカインなどを“過剰”に与えて何が起きるかを観察するというものであり、真摯に捉えるならば、自発的に起こる生理的反応を観察しているとは言い難い。より現実的な生命システムの動作描像に迫るためには、細胞内の反応を一切攪乱しない分子スパイを忍ばせて、そのスパイからの情報を解析するのが最良である。このような観点に立脚し、当研究班ではこれまで蛍光タンパク質の発光物理化学やフェルスター共鳴エネルギー移動などに基づく分子スパイをタンパク質エンジニアリングにより開発してきた。また、従来の分子ネットワークに欠けている重要な情報である“分子拡散”を簡便に定量化する方法の開発も行ってきた。しかしながら、本領域が標榜する少数性生物学にアプローチするためには少数の要素分子が共存する細胞内環境下での分子反応の素過程を観察する技術の開発が急務である。また、過剰な摂動を与えて攪乱させた分子ネットワークの挙動を観察するのみならず、生理的変動内の摂動を与えて分子ネットワークがどのような挙動を示すのかを解析する技術の開発も必須であった。

2. 研究の目的

本研究班では、少数細胞間における協同性の誘発機構にアプローチ可能にすることを目標に、

- (1) 分子レベルでの可視化技術
- (2) 分子レベルでの摂動技術
- (3) 細胞性粘菌細胞の走化性

の3つに取り組み、研究を展開することとした。

3. 研究の方法

(1) 分子レベルでの可視化技術

少数性問題にアプローチするためには、分子や

細胞の数や機能を生きた状態で可視化できる技術を確立することが重要である。そこで、

- ① 光刺激によって可逆的に蛍光状態が on-off スwitchングする蛍光タンパク質
- ② 光switchング蛍光センサータンパク質
- ③ 各種生理活性分子などに対する蛍光センサータンパク質
- ④ 高光度化学発光タンパク質
- ⑤ 顕微鏡

の開発を行った。詳細は以下の通り。

① 光switchング蛍光センサータンパク質

生体内に存在する各種タンパク質の数を解析するためには、超解像顕微鏡を用いた分子局在・動態の計測が有効である。光switchング蛍光タンパク質(PSFP)は、光によりその蛍光性をオン・オフすることが可能な蛍光タンパク質であり、超解像観察を可能にする。しかしながら従来の PSFP は高い励起光照射を必要とするため光毒性が生じ生理的環境下での超解像観察が不可能であった。そこで、極めて少ない励起光照射で生きた細胞の超解像観察を可能にする PSFP の開発を目指した。

② 光switchング蛍光センサータンパク質

細胞内反応は細胞全体で生じるわけではなく、一般的に 1fL 以下の極微小な空間内で生じる。このような微小空間で起きる分子反応を理解するために、光学顕微鏡の回折限界を超える超解像イメージングに適用可能な、光刺激によって可逆的に蛍光状態が on-off switchングする光switchング生理機能センサータンパク質の開発を行った。

③ 各種生理活性分子などに対するセンサー蛍光タンパク質

従来ほとんど可視化解析がなされていないが様々な細胞内現象に関与すると考えられている Mg^{2+} や細胞内反応場の温度、さらには少数性のモデル現象である細胞性粘菌の走化性応答を理解するために必須となる細胞外 cAMP の可視化計測などを可能にする各種センサー蛍光タンパク質の開発を行った。

④ 高光度化学発光タンパク質

(2) で開発する光摂動ツールを利用して生体試料に摂動をかけた後に何が生じているかを可視化解析するためには励起光の照射を必要としない化学発光タンパク質が有用である。しかし、これまで開発されている化学発光タンパク質は蛍光に比べて暗いという問題点があった。そこで、より明るく光る化学発光タンパク質、ならびにそれを基にした生理機能を可視化する化学発光性センサータンパク質の開発を行った。

⑤ 顕微鏡

(2) で開発する光摂動ツールは、高速かつ自由なパターンで細胞や細胞内タンパク質の機能を操作することが可能である。細胞がどの程度刺激されたか観察するために、蛍光センサーを

同時に用いることが多いが、蛍光センサーを観察するための波長に、光摂動のための刺激光が漏れ出たため、光刺激期間中は細胞の状態を観察することができない。そこで、カメラの露光時間と露光時間の間(デッドタイム)のみに光刺激光を照射することで、刺激期間中においても細胞応答を観察することが可能な、デッドタイム光摂動顕微鏡の開発を行った。

一般の超解像計測法は極めて強い光照射(MW/cm^2 以上)が必要であり、光毒性の問題点がある。そこで、光スイッチング蛍光タンパク質の利用を組み合わせることで、生体試料にやさしい超解像イメージングを可能にする顕微鏡の開発を行った。

細胞の個性を計測するためには、細胞本来の状態を計測することが望ましい。細胞内には光を吸収する様々な生体分子が存在する。これら生体分子の吸光度計測を行う場合、細胞の厚みが $10\ \mu\text{m}$ 以下と極めて薄いため、吸光度計測を行うことができない。そこで、吸収を増幅し、無染色でサブ細胞レベルでの吸光度イメージングが可能な吸収増幅顕微鏡の開発を行った。

(2) 光摂動ツールの開発

少数性問題にアプローチするためには、分子や細胞の数や機能を人為的にコントロールできる技術を確認することが重要である。そこで、①光照射によりタンパク質の機能を破壊する光増感分子や②物質濃度を可逆的に制御する光摂動ツールの開発を行った。

① 光増感分子・タンパク質

光照射によって高効率に活性酸素を放出する小分子化合物として eosin を見出し、細胞内に発現させた HaloTag タンパク質へ特異的に結合させるためにクロロアルカン基で修飾した。また、2量体を形成することが知られている光増感蛍光タンパク質 KillerRed の2量体界面を予測し、変異を導入することにより単量体化した。

② 物質濃度を可逆的に制御する光摂動ツール

cAMPの濃度を光で制御するために、cAMPの加水分解酵素 phosphodiesterase に光応答性黄色蛍光タンパク質(PYP)を融合した。

植物の光受容タンパク質であるフォトトロピン由来のLOV2ドメインを Ca^{2+} 結合タンパク質カルモジュリンに挿入することで、光照射によってLOV2が変性する結果、カルモジュリンから Ca^{2+} が遊離する融合タンパク質を作製した。

(3) 多細胞社会の秩序形成をつかさどる細胞個性のマルチスケール定量と操作

細胞性粘菌の集合流形成は走化性物質であるcAMPの細胞間リレーによって支配される。これに関わる様々な機能分子が同定されているものの、マイクロ秩序である周期信号の発生機構、ならびにマクロ秩序である同心円や螺旋波の形成機構はよくわかっていない。これらの問題を解明するためには、cAMPリレー能力の時空間パターンをmmサイズという広い視野(=数万細胞)を、1

細胞粒度ならびに1分子粒度で解析する必要がある。本研究では、cAMPリレー能力の違いを細胞レベルで定量化できる計測技術を開発し、その時空間発展パターンを詳細に計測するための基盤技術の創出を行った。

4. 研究成果

(1) 分子レベルでの可視化技術

① 光スイッチング蛍光タンパク質

従来の光スイッチング蛍光タンパク質(Padron)に比べ、蛍光性オンの速度が4倍、蛍光性オフの速度が3倍速く、光スイッチング回数が25倍も長く続く、高い安定性を示す新規光スイッチング蛍光タンパク質 Kohinoor の開発に成功した。Kohinoorを用いて、超解像法の一つであるRESOLFT法を行ったところ、観察時の光強度が $0.004\ \text{J}/\text{cm}^2$ と、従来法と比べて $1/10,000 \sim 1/375$ 倍も低い照射密度による超解像計測を実現することに成功した(Nature Methods, 2015)。

② 光スイッチング蛍光センサータンパク質

トロポニンC由来の Ca^{2+} センシングドメインの両末端をPA-GFPとdimVenusと融合することで光活性化型蛍光 Ca^{2+} センサータンパク質PA-TNXLを開発した(Sci Rep, 2013)。また、同様にrsEGFPとmCherryを融合することで、光スイッチング型 Ca^{2+} センサータンパク質を構築することにも成功した。

③ 各種生理活性分子などに対するセンサー蛍光タンパク質

大腸菌由来 Mg^{2+} トランスポーターの Mg^{2+} 結合ドメインの両端に蛍光タンパク質を融合させたFRET型蛍光 Mg^{2+} センサータンパク質MARIOを開発し、A02班前島班との共同研究により細胞分裂時に起こる Mg^{2+} 濃度上昇がクロマチンの凝集を引き起こす瞬間を捉えることに世界で初めて成功した。

温度感受性の異なる蛍光タンパク質を融合することでレシオメトリックな蛍光温度センサータンパク質gTEMPを開発し、細胞内ミトコンドリアの脱共役による温度上昇を観察することに成功した。

微量のcAMPを可視化する蛍光cAMPセンサータンパク質($K_d=40\ \text{nM}$)を開発した。また、これまでプローブ開発では考慮されてこなかったドナーアクセプター間の新たな配向パターンを検討した結果、既存のセンサーに比べシグナル変化量が5倍以上も大きな蛍光cGMPセンサータンパク質の開発にも成功した。

④ 高光度化学発光タンパク質

改変型Rluc8とVenusを連結した結果、従来よりも約10倍明るい化学発光タンパク質(Nano-lantern, NL)の開発に成功した。このNLを用いて、自由行動下における体毛があるマウス体内の癌組織を実時間検出することに世界で初めて成功した(Nat Commun, 2012)。またシアン色とオレンジ色のNLの開発にも成功し、3色

の NL を用いて万能細胞の万能性維持に重要な 3 つの遺伝子の発現の様子を同時に観察することに世界で初めて成功した(PNAS, 2015)。

さらに NL を基に、Ca²⁺、ATP、cAMP にそれぞれ反応する生理機能センサータンパク質を開発し、神経細胞の自発的な Ca²⁺振動、光刺激による植物細胞の ATP 動態、及び細胞性粘菌の cAMP 動態の可視化に成功した。

⑤顕微鏡

電子増倍型 CCD から露光時間のタイミング信号を取得し、その信号をトリガーとしてファンクションジェネレーターからパルス信号を生成した。生成したパルス信号を高輝度 LED 光源の変調信号として入力することで、ミリ〜サブミリ秒の時間分解能でデッドタイム中の光刺激を実現するシステムを構築した。本システムを用いて光摂動ツールである Channelrhodopsin2 を発現した細胞に、Ca²⁺指示薬 R-GECO を共発現させた細胞を観察したところ、光刺激中の Ca²⁺上昇をリアルタイムに観察することに成功した (Neurosci Res, 2012)。さらに、本装置は微弱光計測である化学発光イメージングにおいても極めて有用であることが示された(Nat Commun, 2012)。

光スイッチング蛍光タンパク質を用いることで、蛍光性抑制用の光強度を劇的に下げることができると考えられた。そこで、光源として LED 光源を用いた SPoD/ExPAN 顕微鏡を構築し、光スイッチング蛍光タンパク質 Kohinoor を発現する培養細胞を長時間超解像観察が可能かどうかを検証した結果、1W/cm² という極めて弱い照射強度で 50 nm 程度の解像度で超解像イメージングを行うことに成功した。

反射率 99.5%の高反射凹面鏡を向かい合わせに配置した光共振器を作成し、その中心に光を集光させ試料の吸光度を増幅し、スキャンさせることで、吸光度のイメージングが可能な吸収増幅顕微鏡 CREAM を構築した。光源としてはスーパーコンティニュームレーザーを用い、検出器側で分光することで吸収スペクトルの計測を行うことを可能とした。CREAM を用いることで、無染色の様々な培養固定細胞の吸収増幅像の計測に成功した。主成分分析を行った結果、吸収スペクトルから細胞種ごとの違いを計測することができた (PLoS ONE, 2015)。さらに、同一細胞種においても細胞間で有意に吸収スペクトルが異なることを見出された。

(2) 光摂動ツールの開発

①光増感分子・タンパク質

総括班連携企業のプロメガ社との共同で Eosin-HaloTag リガンドを開発した(ACS Chem Biol, 2012)。これを利用して、光照射依存的に細胞分裂に関わる AuroraB タンパク質の時空間特異的機能破壊とそれに伴う細胞分裂の停止を引き起こすことに成功した。

単量体型光増感蛍光タンパク質 SuperNova を開発し、細胞内での分子機能破壊に成功した (Sci Rep, 2013)。

②物質濃度を可逆的に制御する光摂動ツール
シグナル伝達物質の一つである環状アデノシンリン酸(cAMP)の関与する生体機能の光制御を目的として、cAMP 特異的加水分解酵素である光応答性 phosphodiesterase4(PDE4)を構築し、これと光応答性アデニル酸シクラーゼと組み合わせることで、光照射により cAMP 濃度を可逆的に変化させることに成功した。

光刺激により可逆的に Ca²⁺を放出するケイジドカルシウム PACR を開発した。PACR を用いて細胞核内で特異的な Ca²⁺濃度の光操作や線虫神経細胞での光刺激による行動の制御を行うことに成功した。

(3) 多細胞社会の秩序形成をつかさどる細胞個性のマルチスケール定量と操作

細胞性粘菌の走化性応答に関与する分子の数を計測するために、簡便かつ安定に蛍光タンパク質遺伝子をノックインした株を作出可能な手法を確立した。これらを用いることで、cAMP シグナル伝達を制御する機能分子を蛍光タンパク質変異体群で多重標識したトリプルノックイン株を作出し、分子数の絶対定量ならびに時間変化を計測するための基盤整備を行った。

また、走化性集合流の自己組織化は数万個の細胞が関与するマクロ現象である。したがって、秩序化動態を完全に理解するには、1 分子ひいては1細胞粒度を保持しつつ、数万個の細胞を対象にした大規模イメージングが必要になる。これを可能にするため、高速電動ステージを利用した、タイリングスキャンシステムを構築した。

以上の技術を用いることにより、cAMP による化学信号波の、周期・振幅・頻度と走化性応答に関与する各種タンパク質の発現数の定量化し、螺旋波というマクロな秩序構築に果たす、1 細胞レベルならびに 1 分子レベルでの非対称化機構を解明した。

[雑誌論文] (計71 件、うち査読付論文66 件)

1. Ohta Y, Kamagata T, Mukai A, Takada S, Nagai T, and Horikawa K. Non-trivial effect of the color-exchange of a Donor/Acceptor pair in the engineering of Förster resonance energy transfer (FRET)-based indicators. *ACS Chem. Biol.* In press.
2. Morikawa, T.J., Fujita, H., Kitamura, A., Horio, T., Yamamoto, J., Kinjo, M., Sasaki, A., Machiyama, H., Yoshizawa, K., Ichimura, T., Imada, K., Nagai, T., and Watanabe, T.M., Dependence of fluorescent protein brightness on protein concentration in solution and enhancement, *Sci Rep.*, 査読有, 6, 2016, 22342, DOI:10.1038/srep22342
3. Tiwari, D.K., Arai, Y., Yamanaka, M., Matsuda, T., Agetsuma, M., Nakano, M., Fujita, K. and Nagai, T., A fast- and positively photoswitchable fluorescent protein for ultralow-laser-power RESOLFT nanoscopy., *Nat. Methods*, 査読有, 12, 2015, 515-518, DOI:10.1038/nmeth.3362
4. Arai, Y., Yamamoto, T., Minamikawa, T.,

- Takamatsu, T. and Nagai, T., Spectral fingerprinting of individual cells visualized by cavity-reflection-enhanced light-absorption microscopy., *PLoS ONE*, 査読有, 10, 2015, e0125733, DOI:10.1371/journal.pone.0125733
5. Yamanaka, M., Saito, K., Smith, IN., Arai, Y., Uegaki, K., Yonemaru, Y., Mochizuki, K., Kawata, S., Nagai, T. and Fujita, K., Visible-wavelength two-photon excitation microscopy for fluorescent protein imaging., *J. Biomed. Opt.*, 査読有, 20, 2015, 101202, DOI:10.1117/1.JBO.20.10.101202
 6. Takai, A., Nakano, M., Saito, K., Haruno, R., Watanabe, T.M., Ohyanagi, T., Jin, T., Okada, Y., and Nagai, T., Expanded palette of Nano-lantern for real-time multi-color luminescence imaging, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有, 112, 2015, 4352-4356, DOI:10.1073/pnas.1418468112
 7. Sagawa, T., Kikuchi, Y., Inoue, Y., Takahashi, H., Muraoka, T., Kinbara, K., Ishijima, A., and Fukuoka, H., Single-Cell E. coli Response to an Instantaneously Applied Chemotactic Signal, *Biophysical Journal*, 査読有, 107, 2014, 730-739, DOI:10.1016/j.bpj.2014.06.017
 8. Shima, T., Muraoka, T., Tabata, K.V., Noji, H., and Kinbara, K., Light-Triggered Vesicle Formation: Important Factors for Generation of Vesicles and Possible Applications, *Pure and Applied Chemistry*, 査読有, 86, 2014, 1259-1267, DOI:10.1515/pac-2014-0604
 9. Ui, M., Harima, K., Takei, T., Tsumoto, K., Tabata, V.K., Noji, H., Endo, S., Akiyama, K., Muraoka, T., and Kinbara, K., Grafting Synthetic Transmembrane Units to the Engineered Low-Toxicity alpha-Hemolysin to Restore Its Hemolytic Activity, *Molecular Biosystems*, 査読有, 10, 2014, 3199-3206, DOI:10.1039/C4MB00405A
 10. Chang, Y.F., Arai, Y., and Nagai, T., Optogenetic activation during detector "dead time" enables compatible real-time fluorescence imaging., *Neurosci Res.*, 査読有, 73, 2012, 341-347, DOI:10.1016/j.neures.2012.05.007
 11. Saito, K., Chang, Y.F., Horikawa, K., Hatsugai, N., Higuchi, Y., Hashida, M., Yoshida, Y., Matsuda, T., Arai, Y., and Nagai, T., Luminescent protein for high-speed single-cell and whole-body imaging., *Nat Commun.*, 査読有, 3:1262, 2012, 1-9, DOI:10.1038/ncomms2248.
 12. Hihara, S., Pack, C.G., Kaizu, K., Tani, T., Hanafusa, T., Nozaki, T., Takemoto, S., Yoshimi, T., Yokota, H., Imamoto, N., Sako, Y., Kinjo, M., Takahashi, K., Nagai, T., and Maeshima, K., Local Nucleosome Dynamics Facilitate Chromatin Accessibility in Living Mammalian Cells., *Cell Rep.*, 査読有, 2, 2012, 1645-1656, DOI:10.1016/j.celrep.2012.11.008.

他 59 件

[学会発表] (計316件、うち招待講演128件)

1. Takeharu Nagai, Prospect of minority biology, Pacificchem 2015 (The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies), 2015/12/19, Hawaii Convention Center (Honolulu, Hawaii)
2. 堀川一樹, Minority control of synchronized dynamics in biological oscillator, 第38回日本分子生物学会, 2015年12月01日~2015年12月04日, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)
3. Tomoki Matsuda, Fluorescent and bioluminescent sensors for imaging biological events, Roundtable Discussion Photoreceptors, DFG-Rundgespräch (招待講演), 2015/10/10, Benedictine abbey of Frauenworth (Chiemsee, Germany)
4. Takeharu Nagai, Genetically-encoded tools to optically control and image neuronal activity, 4th International Frontiers in Neurophotonics Symposium (招待講演), 2015/10/04, the Musee de la civilisation (Quebec city, Canada)
5. Takeharu Nagai, A fast- and positively photoswitchable fluorescent protein for ultralow-laserpower RESOLFT nanoscopy, ABA2015 (招待講演), 2015/05/11, Shangyu International Hotel (Shangyu, China)
6. 永井健治, 少数性生物学概説および少数性分子の可視化・操作技術の開発, 第14回名古屋大学・遺伝子実験施設 公開セミナー (招待講演), 2014/12/17, 名古屋大学 坂田・平田ホール (愛知県名古屋市)
7. 堀川一樹, 生理機能を可視化する FRET プローブの開発, 第55回日本生化学会 中国・四国支部例会 (招待講演), 2014/06/06, 愛媛大学 (愛媛県松山市)
8. 永井健治, 少数性生物学って何?, 静岡県立大学 市民勉強会「環境・生命・宇宙ーわたしたちの星、地球、月そして太陽ー」 (招待講演), 2014/03/15, 静岡県立大学 (静岡県静岡市)
9. 永井健治, Manipulation and visualization of biological function with genetically encoded molecular spies., 2013 ASCB Annual Meeting (招待講演), 2013/12/14, Morial Convention Center (New Orleans, USA)
10. 堀川一樹, 2個の細胞で多細胞生物は作れるか: 細胞性粘菌の多細胞化を可能にする細胞の数, 第36回日本分子生物学会年会, 2013/12/04, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
11. Kazushi Kinbara, Design of Engineered α -Hemolysins for Regulation of Hemolytic Activity by External Stimuli, Tenth International Conference on Flow Dynamics (招待講演), 2013/11/26, 仙台国際センター (宮城県仙台市)
12. Yoshiyuki Arai, Realtime fluorescence and chemiluminescence imaging with optogenetic activation in living cells., International Workshop on Quantitative Biology 2013 (招待講演), 2013/11/25, ICHO-Kaikan, Osaka University (大阪府吹田市)

13. 金原数, 環状ヌクレオチド cGMP, cAMP シグナル伝達の可視化, 生理学研究所研究会「超階層シグナル伝達研究の新展開」(招待講演), 2012/10/01, 自然科学研究機構・生理学研究所(愛知県岡崎市)
14. 永井健治, 少数性生物学って何?, 新学術領域「秩序形成ロジック」2012 年度班会議(招待講演), 2012/06/19, ルスツ・レポート(北海道虻田郡)
15. Kazushi Kinbara, Development of molecular tools for controlling activity of proteins, BIT's 2nd Annual World Congress of Nanomedicine-2011 (招待講演), 2011/11/03, Shenzhen Convention & Exhibition Center (China, Shenzhen)
16. Nagai Takeharu, Spying biological events in living cells by genetically-encoded functional indicators, The third RIES-CIS international symposium (招待講演), 2011/10/28, NCTU (Sinchu, Taiwan)

他 300 件

〔図書〕(計31件)

1. 永井健治, 朝倉書店, 発光の事典・蛍光イメージング/蛍光タンパク質 (7.1.3), 2015, 12(536-547)
2. 新井由之, 朝倉書店, 発光の事典・蛍光イメージング/蛍光イメージング技術/画像処理 (7.2.1.3), 2015, 6(594-599)
3. 永井健治, 松田知己, 化学同人, 化学フロンティア 1 分子ナノバイオ計測 15 章, 2014, 10(190-199)
4. 堀川一樹, 永井健治, (株)エヌ・ティー・エス, 生物の科学、遺伝 65 細胞性粘菌の集合流形成における細胞間シグナル伝達, 2012, 5(87-91)
5. 金原 数, 日本光学会, 光学 41 光で駆動する分子機械, 2012, 6(78-83)

他 26 件

〔産業財産権〕

○出願状況(計5件)

名称: 蛍光観察方法及び蛍光観察装置
 発明者: 藤田克昌、永井健治、齊藤健太、山中真仁、瀧本真一
 権利者: オリンパス株式会社
 種類: 特許
 番号: 特願 2012-068686
 出願年月日: 2012 年 03 月 26 日
 国内外の別: 国内

名称: 蛍光蛋白質
 発明者: 永井健治、Tiwari Dharmendra K.、新井由之
 権利者: 大阪大学
 種類: 特許
 番号: 特願 2013-191058、PCT/JP2014/074121、特願 2015-536629 (PCT 出願日本移行)、15/021371 (PCT 出願アメリカ移行)、14843850.0

(PCT 出願 EPO 移行)、
 出願年月日: 2013 年 09 月 13 日、2014 年 09 月 11 日、2016 年 03 月 02 日、2016 年 03 月 10 日、2016 年 03 月 31 日
 国内外の別: 国内、外国

○取得状況(計 2 件)

〔その他〕
 ホームページ等
 (1) 永井健治研究室
<http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/bse/index.html>
 (2) 金原数研究室
<http://www.kinbara.bio.titech.ac.jp/jp/>
 (3) 堀川研究室
<http://www.tbis2013.net>

6. 研究組織

- (1) 研究者代表者
 永井 健治 (TAKEHARU NAGAI)
 大阪大学・産業科学研究所・教授
 研究者番号: 20311350
- (2) 分担研究者
 金原 数 (KAZUSHI KINBARA)
 東京工業大学・生命理工学研究所・教授
 研究者番号: 30282578
- (2) 分担研究者
 堀川 一樹 (KAZUKI HORIKAWA)
 徳島大学・医歯薬学研究部・教授
 研究者番号: 70420247
- (3) 連携研究者
 山東 信介 (SHINSUKE SANDO)
 東京大学・工学研究科・教授
 研究者番号: 20346084
- (3) 連携研究者
 浦野 泰照 (YASUTERU URANO)
 東京大学・薬学研究科・教授
 研究者番号: 20292956
- (3) 連携研究者
 小澤 岳昌 (TAKEAKI OZAWA)
 大阪大学・理学研究科・教授
 研究者番号: 40302806
- (3) 連携研究者
 松田 知己 (TOMOKI MATSUDA)
 大阪大学・産業科学研究所・准教授
 研究者番号: 50419206
- (3) 連携研究者
 新井 由之 (YOSHIYUKI ARAI)
 大阪大学・産業科学研究所・助教
 研究者番号: 20444515