

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17017039

研究課題名（和文）

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

研究課題名（英文）

New approaches for imaging and controlling the molecules of life.

研究代表者

宮脇 敦史 (Miyawaki Atsushi)

独立行政法人理化学研究所・細胞機能探索技術開発チーム・チームリーダー

研究者番号：80251445

研究成果の概要（和文）：

（蛍光蛋白質を利用した可視化技術の開発）

細胞周期をリアルタイムにモニタする蛍光プローブ Fucci を開発し、動物個体発生における細胞周期の時空間パターンを解析した。珊瑚類からクローニンした蛍光蛋白質のペアに FRET を応用して膜電位プローブ Mermaid を開発した。大きなストークスシフトを示す蛍光蛋白質 Keima を開発し、一本のレーザー発振線で行う蛍光相互相関分光法やデュアルカラー 2 光子励起顕微鏡観察を提案した。

（蛍光蛋白質を利用した光操作技術の開発）

フォトクロミズム蛍光蛋白質 Dronpa について、その暗状態の構造的基盤を NMR 解析によって明らかにした。また明暗スイッチングの速度が異なる変異体を作製し、超解像度顕微鏡技術への応用を試みた。フォトコンバージョン蛍光蛋白質 KikGR について、 $\beta$  脱離反応における中間体を見出し、E1 (unimolecular) 反応を支持するデータを得た。また KikGR を利用して、細胞分裂後 30 分間に核膜の透過性が亢進することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We harnessed the regulation of cell-cycle-dependent ubiquitination to develop a genetically encoded indicator for cell-cycle progression, Fucci. This technology permits us to visualize the cell-cycle behavior of individual cells within complex tissues of experimental animals, such as mice and fish. We used two new coral fluorescent proteins as FRET donor and acceptor to develop a voltage sensor, Mermaid. This technology allows for direct visualization of electrical activities in excitable cells. We developed a far-red fluorescent protein endowed with a large Stokes shift, Keima. We show the usefulness of Keima for dual-color fluorescence imaging technologies, such as fluorescence cross-correlation spectroscopy and two-photon excitation microscopy. The structural basis for the photochromism in the fluorescent protein Dronpa is poorly understood. We performed NMR analyses of Dronpa in solution at ambient temperatures to find structural flexibility of the protein in the dark state. We have also developed numerous mutants of Dronpa, which change between bright and dark states with different speeds. These mutants were used to improve performance of super-resolution microscopy. KikGR is a fluorescent protein engineered to display green-to-red photoconvertibility that is induced by irradiation with violet light. Through crystallographic studies on both green and red states, we obtained evidence that the  $\beta$ -elimination reaction governing the green-to-red photoconversion follows an E1 (unimolecular) mechanism. Using KikGR as an optical highlighter, we demonstrate that diffusion barrier across the nuclear envelope is less restrictive during nuclear reassembly.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	7,100,000	0	7,100,000
2006年度	11,700,000	0	11,700,000
2007年度	11,800,000	0	11,800,000
2008年度	12,100,000	0	12,100,000
2009年度	12,200,000	0	12,200,000
総計	54,900,000	0	54,900,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：蛍光蛋白質、細胞周期、レシオイメージング、膜電位、蛍光イメージング、神経前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

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。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。

2. 研究の目的

生きた細胞や組織において、入力(外界刺激)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。

3. 研究の方法

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？”などを議論した。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、観るべき分子をしばっていき、適当な分子を材料にして蛍光プローブを開発した。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った。

4. 研究成果

- 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。
- 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。
- 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。
- フォトクロミズムを示す蛍光蛋白質 Dronpa の溶液・常温での構造的特徴を NMR 解析した。
- 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。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。
- 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。
- 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。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。

- mKeima と EGFP を組み合わせ、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。
- サンゴ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、サンゴ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。
- 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。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。
- 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。
- 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。
- 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当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。
- 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。
- DMD (digital micromirror device) を搭載した蛍光顕微鏡システムを開発し、褪色を抑える定量性の高い FRET 観察を可能とした。
- 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。
- 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。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 17 件) 全て査読有り

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.**, 106 (49): 20812-20817.

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

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.

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.

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

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

Sakaue-Sawano A, Ohtawa K, Hama H, Kawano M, Ogawa M, Miyawaki A. (2008) Tracing the Silhouette of Individual Cells in S/G<sub>2</sub>/M Phases with Fluorescence. **Chemistry & Biology**, 15: 1243-1248.

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.

Katayama H, Yamamoto A, Yoshimori T, Mizushima N, Miyawaki A. (2008) GFP-like proteins stably accumulate in lysosomes, **Cell Struct Funct**. 33: 1-12.

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.

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.

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

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

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.

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.

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.

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.

[学会発表] (計 27 件)

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.

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" "9th NIBB-EMBL Symposium: Functional Imaging, Okazaki, Japan, 2009. 4.

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. "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. "New Fluorescent Probes and New Perspectives in Bioscience" "Nature Chemical Biology Symposium 2008: Chemical Neurobiology, New York, USA, 2008. 2. 22.

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" HHMI Meeting on Fluorescent Proteins and Biological Sensors, Janelia Farm, USA, 2007. 10. 29.

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" 25<sup>th</sup> JES Summer Seminar on Endocrinology & Metabolism, Awaji, 2007. 7. 18

Miyawaki A. "New Fluorescent Probes and New Perspectives in Bioscience", International Symposium: Leading edge in Bioscience, Tokyo, 2007. 3. 17.

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”, 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. “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. “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. “Spatio-temporal Patterns of Intracellular Signaling”, 7th International Conference on Systems Biology, Yokohama, Japan, 2006.10.9.

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

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

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

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

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

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.

〔図書〕 (計 14 件)

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)

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, 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, 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, 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 : “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)

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

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).

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

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 : “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)

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 : “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)

Miyawaki A, Nagai T, Mizuno H. (2005)  
Engineering fluorescent proteins. **Adv.  
Biochem. Eng. Biotechnol.** 95: 1-15

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: 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: 理化学研究所・東京都医学研究機構  
種類: 特許  
番号: 2007-068240  
出願年月日: 2007年3月16日  
国内外の別: 国内

名称: 蛍光蛋白質  
発明者: 宮脇敦史、安藤亮子、水野秀昭  
権利者: 理化学研究所  
種類: 特許  
番号: 2006-513770

出願年月日: 2005年5月20日  
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮脇 敦史 (Miyawaki Atsushi)

独立行政法人理化学研究所・細胞機能探索技術開  
発チーム・チームリーダー  
研究者番号: 80251445

(2) 研究分担者

水野 秀昭 (Mizuno Hideaki)

独立行政法人理化学研究所・細胞機能探索技術開  
発チーム・専門職研究員  
研究者番号: 80301779

下 蘭 哲 (Shimozono Satoshi)

独立行政法人理化学研究所・細胞機能探索技術開  
発チーム・研究員  
研究者番号: 40391982

深野 天 (Fukano Takashi)

独立行政法人理化学研究所・細胞機能探索技術開  
発チーム・研究員  
研究者番号: 80373364

筒井 秀和 (Tsutsui Hidekazu)

独立行政法人理化学研究所・細胞機能探索技術開  
発チーム・客員研究員  
研究者番号: 30392038

永井 健治 (Nagai Takeharu)

北海道大学・電子科学研究所・教授  
研究者番号: 20311350

(3) 研究協力者

井端 啓二 (Ibata Keiji)

独立行政法人理化学研究所・細胞機能探索技術開  
発チーム・研究員

宮内 崇行 (Miyachi Takayuki)

独立行政法人理化学研究所・細胞機能探索技術開  
発チーム・研究員  
研究者番号: 00392142

Lakshmanan Vetrivel

独立行政法人理化学研究所・細胞機能探索技術開  
発チーム・研究員