

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2010～2014

課題番号：22113001

研究課題名(和文)細胞機能と分子活性の多次元蛍光生体イメージング

研究課題名(英文)Multi-dimensional fluorescent live imaging of cellular functions and molecular activities

研究代表者

松田 道行(Michiyuki, Matsuda)

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：10199812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 85,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年の蛍光生体イメージングの進歩は著しい。様々な蛍光特性を有する新規蛍光タンパク質やユニークな作動原理を有する蛍光プローブを用いると、細胞周期や情報伝達分子の活性など様々な細胞や分子機能が可視化することが可能となってきた。本研究ではこの蛍光生体イメージングをさらに発展させ、研究者が細胞、組織、動物を多次元で観察できるようにすることである。この目的のため、全職員が参加する研究会を毎年開催したほか、国際シンポジウムを3回にわたり組織し、国内外の研究者の情報交換を促した。さらに、若手研究者育成のためのヴィヴィッドワークショップを毎夏開催したほか、蛍光プローブを500件以上、国内外に配布した。

研究成果の概要(英文)：Recent progress of fluorescent live imaging is enormous. New fluorescent proteins with various optical properties and many fluorescent protein-bases probes with unique mode of actions have enabled us to visualize many cellular and molecular functions such as cell cycle status and activity of signaling molecules. The rapid evolution of fluorescent live imaging owes not only to the progress in the probes, but also to the development of microscopes based on a novel modality. The aim of this research project is to further promote the fluorescent live imaging, which allows researchers to observe cells, tissues, and animals in multiple dimensions. For this purpose, we annually held domestic workshop and organized three international symposia. For fostering young researchers, retreat named "vivid workshop" was held every year in the summer. More than 500 expression plasmids encoding fluorescent probes are distributed not only to domestic but also to foreign researchers.

研究分野：細胞生物

キーワード：蛍光イメージング 蛍光タンパク質 蛍光プローブ 細胞生物 がん

1. 研究開始当初の背景

蛍光生体イメージング技術の進歩には括目すべきものがある。様々な光学的特性をもつ蛍光タンパク質が出現し、新しい動作原理の蛍光分子プローブが開発され、細胞周期や情報伝達分子の活性状態など、これまで生化学的にしか知ることのできなかつた分子や細胞の機能情報が可視化できるようになった。G タンパク質バイオセンサーRaichu、細胞周期センサーFucci の開発など、本邦はこの研究分野において世界に誇る実績を有している。また、蛍光生体イメージング技術の急速な発展は単に蛍光プローブの進歩のみならず顕微鏡の進歩に負うところも非常に大きい。本邦は四大光学顕微鏡メーカーのうち二社を有し、光学顕微鏡を用いた研究はお家芸の一つである。また、二光子励起顕微鏡の開発により、組織を三次元的に観察することが可能となってきた。脳組織において 1 mm を超える深部までのイメージングが可能となっているほか、免疫系や骨組織においても、生体内での細胞社会をリアルタイムに可視化することができている。このように、時間、空間、機能と多次的に観察することが可能になった蛍光生体イメージングは、革命期を迎えているといってもよい。

2. 研究の目的

蛍光生体イメージングの技術革新の流れが生命科学全般に及んでいるかと言えば必ずしもそうではない。本邦においてはがん、神経、免疫、発生などのそれぞれの分野のいて蛍光生体イメージングをツールとして優れた研究を行っている科学者は多くいるものの、分野を超えた情報交換や協力はあまり進んでいない。そこで、これらの各分野の研究者を横系に、多次元蛍光生体イメージングの高度化を計る研究者を縦系に、既存の学問分野の枠に収まらない新興・融合領域の創成を目指すのが本計画研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 研究会・内部評価会： 毎年1回の研究会・内部評価会を、研究領域の計画班員および公募班員を集めて開催する。また、計画班員は学会等で生体蛍光イメージングをトピックとしたシンポジウムを開催する。さらに、財団等と協力し、国際シンポジウムを開催して国内外の蛍光生体イメージングの研究者の情報交換を促す。

(2) 若手ワークショップ(生き生きとした若手による色鮮やかなイメージング研究会の意を込めて、ヴィヴィッドワークショップ、と命名する)： 蛍光生体イメージングは、生物学と情報学の両方の素養が必要であり、既存の教育体制からはなかなか研究者が育ってこない。製薬業界等においても生体イメージングに卓越した人材が望まれており、若手を育てることが喫緊の課題である。そこで、

細胞生物学会等の学会と連携した若手ワークショップを開催し、若手の医学・生物学研究者と蛍光生体イメージング研究者との情報交換の場とする。研究報告会を開催することにより、より多くの研究者に本領域の研究内容を伝える工夫をする。

(3) イメージング講習会： 顕微鏡メーカーの協力のもと、蛍光生体イメージング技術の講習会を、京都、四国、東京などで開催する。また、画像解析についても、研究者および画像解析ソフトを開発するメーカーと協力して講習会を実施する。

(4) バーチャル蛍光生体イメージングセンター： 本邦の研究者の蛍光生体イメージング技術の向上に貢献し、ひいては生物学全般のレベルアップを行うことを目的とし、バーチャル蛍光生体イメージングセンターを立ち上げる。このセンターは、様々な疑問質問に答える Web 上でのサポートセンターおよびディスカッショングループを形成する。

(5) 技術支援： 計画ならびに公募研究者、あるいはまた広く一般の研究者のニーズに応じ、バイオセンサーや蛍光タンパク質の発現プラスミドを配布する。

4. 研究成果

(1) 研究会・内部評価会：
国際シンポジウム「Casting Light on Life」

日時：平成 22 年 12 月 1 日～2 日

場所：東京都港区

武田科学財団主催、新学術領域研究「蛍光生体イメージ」後援のシンポジウムを開催した。新学術研究領域「蛍光生体イメージ」のキックオフミーティングの位置づけのもと、領域代表者(松田)および計画班員(宮脇)が組織委員を務めた。全計画班員が発表し、外国からの著名な研究者や一般の参加者と意見を交わすことができた。

公開シンポジウム「生体の生理や病理の統合的解明を目指す「光」を用いた可視化・操作法の展開」および研究代表者会議

日時：平成 23 年 6 月 29～30 日

場所：札幌市

シンポジウムは日本細胞生物学会と共催で開催した。翌日の内部評価会は班員間での共同研究を開始する契機となった。

千里ライフサイエンスセミナー「細胞の“こころ”を生きた個体で観察する 蛍光生体イメージングの最前線」および研究代表者会議

日時：平成 25 年 1 月 23～24 日

場所：大阪府豊中市

ライフサイエンス財団主催のシンポジウムを領域としてオーガナイズし、翌日に研究代

表者会議および内部評価会を行った。

公開シンポジウム「最新の光学イメージングと生体観察」および研究代表者会議

日時：平成 25 年 5 月 20～21 日

場所：大阪府豊中市

日本顕微鏡学会と共催の公開シンポジウムを開催後、全体班会議を開催し、二期目の公募班員を含めた共同研究等について討議した。

国際シンポジウム「Bioimaging-a paradigm shift for the life sciences.」

日時：平成 26 年 7 月 15 日～18 日

場所：北海道ニセコ町

第 37 回内藤コンファレンス（内藤記念財団主催）の本シンポジウムにはほぼすべての計画班員を含む多くの班員、所属する研究室の若手研究者が出席し、国内外の研究者と情報交換を行った。

「細胞機能と分子活性の多次元蛍光生体イメージング」国際シンポジウムおよび研究代表者会議

日時：平成 27 年 1 月 26 日～28 日

場所：京都府

参加者：310 名

展示企業：15 社

本領域の最後を締めくくる国際シンポジウムは、班員、国内外の招待演者、一般参加者など 300 名を超える参加者があり、狭い会場が熱気であふれかえるものとなった。特に、招待講演を依頼した Eric Betizig 博士が 2014 年度の Nobel 化学賞を受賞されたことは、この領域のますますの発展を期待させ、本領域研究で播かれた種が次年度以降に芽をだし、花が咲くことを期待させてくれるシンポジウムとなった。

(2) 若手ワークショップ (Vivid Workshop):

第 1 回

日時：平成 23 年 3 月 10 日～12 日

場所：長野県茅野市

計画班 9 名、一般 15 名、班員ならびに事務局 6 名 合計 30 名。

第 2 回

日時：平成 24 年 3 月 1 日～3 日

場所：石川県加賀市

参加者：24 名、班員ならびに事務局 6 名 合計 30 名

第 3 回

日時：平成 25 年 2 月 21 日～23 日

場所：石川県加賀市

参加者：28 名、班員ならびに事務局 7 名 合計 35 名

第 4 回

日時：平成 26 年 2 月 20 日～22 日

場所：石川県加賀市

参加者：26 名、班員ならびに事務局 8 名 合計 34 名

第 5 回

既述の「細胞機能と分子活性の多次元蛍光生体イメージング」国際シンポジウムへ若手研究者を招聘し、討論を行った。

(3) イメージング講習会：

平成 23 年度イメージング講習会

日時：平成 23 年 7 月 19 日～21 日

場所：愛媛大学医学部

プロテオ医学研究センター

平成 24 年度画像解析講習会

日時：平成 24 年 3 月 6 日～7 日

場所：京都大学医学研究科

FRET バイオセンサー発現マウスを使った二光子顕微鏡技術講習会

日時：平成 24 年 3 月 21 日～22 日

場所：京都大学医学研究科

平成 24 年度イメージング講習会

日時：平成 24 年 7 月 24 日～27 日

場所：愛媛大学医学部

プロテオ医学研究センター

平成 24 年度イメージング講習会

日時：平成 24 年 12 月 18 日～19 日

場所：東京大学医科学研究所

平成 25 年度イメージング講習会

日時：平成 25 年 7 月 23 日～26 日

場所：愛媛大学医学部

総合研究支援センター (INCS)

多光子顕微鏡生体イメージング講習会

日時：平成 25 年 9 月 17 日

場所：京都大学医学研究科

平成 25 年度イメージング講習会

日時：平成 26 年 1 月 30 日～31 日

場所：東京大学医科学研究所

平成 26 年度蛍光生体イメージ講習会

京都大学に蛍光生体イメージング室が設置されたことに伴い、平成 26 年度からは毎月 1 回の講習会を定期的で開催した。

(4) バーチャル蛍光生体イメージングセンター：

本邦の研究者の蛍光生体イメージング技術の向上に貢献し、ひいては生物学全般のレベルアップを行うことを目的とし、バーチャル蛍光生体イメージングセンターを立ち上げた。このセンターは、様々な疑問質問に答える Web 上でのサポートセンターおよびディ

スカッシュングループを形成した。

(5) 技術支援:

ホームページに資材提供ページを作成し、
蛍光バイオセンサーの発現プラスミド等を
供与した。

平成 22 年度: 80 件

平成 23 年度: 96 件

平成 24 年度: 101 件

平成 25 年度: 130 件

平成 26 年度: 107 件

(6) アウトリーチ活動

京都大学蛍光生体イメージング室オー
プンラボ

日 時: 平成 25 年 9 月 17 日

場 所: 京都大学医学研究科 A 棟

参加者: 同志社中学校生徒他 35 名

公開シンポジウム「第 6 回形態科学シン
ポジウム『医学・生物学研究の魅力を語る:
高校生のための集い』日本学術会議主催

日 時: 平成 25 年 10 月 12 日

場 所: 京都大学医学研究科

参加者: 約 100 名 の関西圏の高校生

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に
は下線)

[雑誌論文](計 23 件)

1. Wakayama, Y., Fukuhara, S., Ando, K., Matsuda, M. & Mochizuki, N. Cdc42 mediates Bmp-induced sprouting angiogenesis through Fmnl3-driven assembly of endothelial filopodia in zebrafish. *Dev Cell* 32, 109-122, (2015). doi:10.1016/j.devcel.2014.11.024
2. Kumagai, Y., Naoki, H., Nakasyo, E., Kamioka, Y., Kiyokawa, E. & Matsuda, M. Heterogeneity in ERK activity as visualized by in vivo FRET imaging of mammary tumor cells developed in MMTV-Neu mice. *Oncogene* 34, 1051-1057, (2015). doi:10.1038/onc.2014.28
3. Komatsu, N., Fujita, Y., Matsuda, M. & Aoki, K. mTORC1 upregulation via ERK-dependent gene expression change confers intrinsic resistance to MEK inhibitors in oncogenic KRas-mutant cancer cells. *Oncogene*, (2015). doi:10.1038/onc.2015.16
4. Hiratsuka, T., Fujita, Y., Naoki, H., Aoki, K., Kamioka, Y. & Matsuda, M. Intercellular propagation of extracellular signal-regulated kinase activation revealed by in vivo imaging of mouse skin. *eLife* 4, e05178, (2015). doi:10.7554/eLife.05178
5. Hirata, E., Girotti, M. R., Viros, A., Hooper, S., Spencer-Dene, B., Matsuda, M., Larkin, J., Marais, R. & Sahai, E. Intravital Imaging Reveals How BRAF Inhibition Generates Drug-Tolerant Microenvironments with High Integrin beta1/FAK Signaling. *Cancer cell* 27, 574-588, (2015). doi:10.1016/j.ccell.2015.03.008
6. Goto, A., Nakahara, I., Yamaguchi, T., Kamioka, Y., Sumiyama, K., Matsuda, M., Nakanishi, S. & Funabiki, K. Circuit-dependent striatal PKA and ERK signaling underlies rapid behavioral shift in mating reaction of male mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, (2015). doi:10.1073/pnas.1507121112
7. Yukinaga, H., Shionyu, C., Hirata, E., Ui-Tei, K., Nagashima, T., Kondo, S., Okada-Hatakeyama, M., Naoki, H. & Matsuda, M. Fluctuation of Rac1 activity is associated with the phenotypic and transcriptional heterogeneity of glioma cells. *J. Cell Sci.* 127, 1805-1815, (2014). doi:10.1242/jcs.139733
8. Ueyama, T., Sakaguchi, H., Nakamura, T., Goto, A., Morioka, S., Shimizu, A., Nakao, K., Hishikawa, Y., Ninoyu, Y., Kassai, H., Suetsugu, S., Koji, T., Fritzsche, B., Yonemura, S., Hisa, Y., Matsuda, M., Aiba, A. & Saito, N. Maintenance of stereocilia and apical junctional complexes by Cdc42 in cochlear hair cells. *J. Cell Sci.* 127, 2040-2052, (2014). doi:10.1242/jcs.143602
9. Sadaie, W., Harada, Y., Matsuda, M. & Aoki, K. Quantitative in vivo fluorescence cross-correlation analyses highlight the importance of competitive effects in the regulation of protein-protein interactions. *Mol. Cell Biol.* 34, 3272-3290, (2014). doi:10.1128/mcb.00087-14
10. Mizuno, R., Kamioka, Y., Kabashima, K., Imajo, M., Sumiyama, K., Nakasho, E., Ito, T., Hamazaki, Y., Okuchi, Y., Sakai, Y., Kiyokawa, E. & Matsuda, M. In vivo imaging reveals PKA regulation of ERK activity during neutrophil recruitment to inflamed intestines. *J. Exp. Med.* 211, 1123-1136, (2014). doi:10.1084/jem.20132112
11. Miura, H., Matsuda, M. & Aoki, K. Development of a FRET biosensor with high specificity for Akt. *Cell Struct. Funct.* 39, 9-20, (2014).

- doi:10.1247/csf.13018
12. Fujita, Y., Komatsu, N., Matsuda, M. & Aoki, K. Fluorescence resonance energy transfer based quantitative analysis of feedforward and feedback loops in epidermal growth factor receptor signaling and the sensitivity to molecular targeting drugs. *FEBS J* 281, 3177-3192, (2014). doi:10.1111/febs.12852
 13. Mori, Y., Yagi, S., Sakurai, A., Matsuda, M. & Kiyokawa, E. Insufficient ability of Rac1b to perturb cystogenesis. *Small GTPases* 4, (2013). doi:10.4161/sgtp.23311.
 14. Kagawa, Y., Matsuda, M., Ishii, M. (他 22 名) Cell cycle-dependent Rho GTPase activity dynamically regulates cancer cell motility and invasion in vivo. *PLoS One* 8, e83629, (2013). doi:10.1371/journal.pone.0083629
 15. Goto, A., Sumiyama, K., Kamioka, Y., Nakasyo, E., Ito, K., Iwasaki, M., Enomoto, H. & Matsuda, M. GDNF and Endothelin 3 Regulate Migration of Enteric Neural Crest-Derived Cells via Protein Kinase A and Rac1. *J. Neurosci.* 33, 4901-4912, (2013). doi:10.1523/JNEUROSCI.4828-12.2013
 16. Aoki, K., Takahashi, K., Kaizu, K. & Matsuda, M. A quantitative model of ERK MAP kinase phosphorylation in crowded media. *Sci Rep* 3, 1541, (2013). doi:10.1038/srep01541
 17. Aoki, K., Kumagai, Y., Sakurai, A., Komatsu, N., Fujita, Y., Shionyu, C. & Matsuda, M. Stochastic ERK activation induced by noise and cell-to-cell propagation regulates cell density-dependent proliferation. *Mol. Cell* 52, 529-540, (2013). doi:10.1016/j.molcel.2013.09.015
 18. Yagi, S., Matsuda, M. & Kiyokawa, E. Chimaerin suppresses rac1 activation at the apical membrane to maintain the cyst structure. *PLoS One* 7, e52258, (2012). doi:10.1371/journal.pone.0052258
 19. Yagi, S., Matsuda, M. & Kiyokawa, E. Suppression of Rac1 activity at the apical membrane of MDCK cells is essential for cyst structure maintenance. *EMBO Rep.* 13, 237-243, (2012). doi:10.1038/embor.2011.249.
 20. Sakurai, A., Matsuda, M. & Kiyokawa, E. Activated ras protein accelerates cell cycle progression to perturb madin-darby canine kidney cystogenesis. *J. Biol. Chem.* 287, 31703-31711, (2012). doi:10.1074/jbc.M112.377804
 21. Kunida, K., Matsuda, M. & Aoki, K. FRET imaging and statistical signal processing reveal positive and negative feedback loops regulating the morphology of randomly migrating HT-1080 cells. *J. Cell Sci.* 125, 2381-2392, (2012). doi:10.1242/jcs.096859.
 22. Kamioka, Y., Sumiyama, K., Mizuno, R., Sakai, Y., Hirata, E., Kiyokawa, E. & Matsuda, M. Live imaging of protein kinase activities in transgenic mice expressing FRET biosensors. *Cell Struct. Funct.* 37, 65-73, (2012). doi:10.1247/csf.11045
 23. Hirata, E., Yukinaga, H., Kamioka, Y., Arakawa, Y., Miyamoto, S., Okada, T., Sahai, E. & Matsuda, M. In vivo fluorescence resonance energy transfer imaging reveals differential activation of Rho-family GTPases in glioblastoma cell invasion. *J. Cell Sci.* 125, 858-868, (2012). doi:10.1242/jcs.089995.
- 〔学会発表〕(計 6 件)
結果欄に記載のごとく、6 回の公開シンポジウムを開催した。演者が多数にわたるため、記載を省略する。
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)
- 〔その他〕
ホームページ等：
「蛍光生体イメージ」
<http://www.imaging.lif.kyoto-u.ac.jp/>
- 6 . 研究組織
- (1) 研究代表者
松田 道行 (MATSUDA, Michiyuki)
京都大学・生命科学研究所・教授
研究者番号：10199812
- (2) 研究分担者
今村 健志 (IMAMURA, Takeshi)
愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号：70264421
- 清川 悦子 (KIYOKAWA, Etsuko)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：80300929

(3)連携研究者

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

根本 知己 (NEMOTO, Tomomi)
北海道大学・電子科学研究所・教授
研究者番号：50291084

岡田 峰陽 (OKADA, Takaharu)
独立行政法人理化学研究所・免疫細胞動
態研究ユニット・ユニットリーダー
研究者番号：50452272

石井 優 (ISHII, Masaru)
大阪大学・大学院・生命機能研究科・教授
研究者番号：10324758

福原 茂朋 (FUKUHARA, Shigetomo)
独立行政法人国立循環器病研究センタ
ー・細胞生物学部・室長
研究者番号：70332880