

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：82401

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2015～2019

課題番号：15H05948

研究課題名(和文)大規模生体バイオイメージングのための要素技術開発

研究課題名(英文)The development of fundamental bioimaging technologies for comprehensive understanding

研究代表者

宮脇 敦史(Atsushi, Miyawaki)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：80251445

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 193,900,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア品質コントロールを定量的に可視化する蛍光プローブmito-SRAIを開発し、パーキンソン病の病理診断と治療薬開発に応用した(Cell 2020)。人工基質AkaLumineIに合わせて開発した人工酵素AkaLucをもとに、新規生物発光システムAkaBLIを開発し、動物個体深部からの発光シグナルを、従来と比べ100～1,000倍の強さで検出した(Science 2018)。細胞周期依存的ユビキチン介在タンパク質分解を多様に改変することで、細胞周期のG1期・S期・G2期をそれぞれ赤・緑・黄の3色で識別するFucci(CA)を開発した(Mol. Cell 2017)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上記いずれの開発技術もバイオイメージングの課題に真正面から取り組んで創り上げたもので各分野における可視化技術を革新した。学術分野における普及はもちろん、産業分野への伝播も意図されている。実際、mito-SRAIは武田薬品工業で創薬ツールとして導入され、AkaBLIは和光純薬で販売されている。他にも顕微鏡球面収差自動補正装置Deep-C(BBRC 2018)はオリンパスと、液相分離の原理に基づく生体分子相互作用検出技術Fluoppi(Sci. Rep. 2017)は医学生物学研究所との共同研究である。

研究成果の概要(英文)：Mitophagy removes dysfunctional mitochondria through lysosomal degradation. Thorough investigation of the behaviors and fates of fluorescent proteins inside lysosomes enabled us to develop an indicator for mitophagy. Large-scale image-based high-throughput screening led to the discovery of a hit compound that induces selective mitophagy of damaged mitochondria. In a mouse model of Parkinson's disease, we found that dopaminergic neurons selectively failed to execute mitophagy that promoted their survival within lesions. We performed directed evolution of firefly luciferase using a red-shifted and highly deliverable luciferin analogue to establish AkaBLI, an all-engineered bioluminescence in vivo imaging system. AkaBLI produced 100 to 1,000-fold brighter emission in vivo than conventional systems, allowing non-invasive visualization of single cells inside deep internal organs of freely moving animals.

研究分野：バイオイメージング

キーワード：バイオイメージング 共鳴エネルギー移動 細胞周期 レチノイン酸 固定イメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

**レゾナンスパイオ**とは、狭義には、**Resonance Energy Transfer (RET)** (共鳴エネルギー移動) のバイオイメージングへの応用を理論的かつ実践的に進めることを意味する。RET は、分子サイズで起こる現象の光学顕微鏡観察を可能にするツールである。RET を利用するプローブの作製技術、RET 量の評価法および画像化技術、Energy Donor, Acceptor としての色素の選択、RET 量の固定化技術等について、現在のバイオイメージングが直面する課題を洗い出し、それらを解決する革新的技術を提案・実践していく。こうした課題の幾つかについては、研究代表者が、最近の欧文誌 (Annu. Rev. Biochem. 2011; Mol. Cell 2015) の総説で解説を試みている。

## 2. 研究の目的

**レゾナンスパイオ**とはまた、広義には、バイオイメージング技術の協同的開発を通して、バイオサイエンスにおける異なる研究アプローチ間の共鳴を仕掛けることを意味する。

研究代表者は、革新的細胞解析研究プログラム、セルイノベーション (H24-26 年度) に参画し、**細胞の個性**を重視する遺伝子解析を行ってきた。例えば細胞周期を可視化する Fucci 技術を upgrade し、細胞周期に沿って 7 色に標識・分画する技術 Fucci3.2 を開発した (Cell Cycle Rainbow)。従来の同調培養では見逃してしまう S 期特異的遺伝子転写変化を発見し、生化学実験の為に細胞分画においてバイオイメージングが発揮する威力を証明した。本計画研究においては、細胞個性として、細胞周期に加え、酸化ストレス、炎症、代謝等を観察していく。

研究代表者は、新学術領域研究「蛍光生体イメージング」(H22-26 年度) に参画し、生物現象を**個体レベルで観察、解析**する技術を開発してきた。例えば新奇プローブとして、FRET 型レチノイン酸プローブ GEPRA、ニホンウナギ由来のビリルビン蛍光センサー UnaG 等がある。GEPRA や UnaG の改良を経て、現在のトランスジェニックマウスが完成する状況にある。本研究では、生きた個体の様々な臓器、器官におけるレチノイン酸やビリルビンの濃度勾配を直接に可視化することを一目標に掲げる。また、研究代表者は平成 23 年度に、固定組織を透明化して蛍光標識構造を 3 次元的に大規模再構成する技術 Scale を開発した。現時点で Scale 技術の多角的改良が終了しており、レチノイン酸やビリルビンの固定個体内濃度勾配を網羅的に解析することを一目標に掲げる。これらの代謝産物はモルフォゲンや抗酸化物質として様々な研究領域で注目されている。本研究の成果を元に、神経、癌、代謝、老化、感染症など複数の研究領域に跨がる共鳴を興し、新境界領域の創成に繋げることを大目標に据える。

## 3. 研究の方法

### (1) RET プローブの理論的および実践的開発

RET プローブの励起法について根本班と、RET プローブのトランスジェニックマウスの作製および観察について松田班と連携する。

### (2) 細胞個性の多角的理解を目指すバイオイメージング

酸化ストレス可視化について神谷班と、細胞周期可視化について今村、松田班と連携する。

### (3) 個体レベルで生物現象を観察、解析するためのライブおよび固定イメージング

生物個体深部イメージングについて曾我、根本班と連携する。

本計画研究で得られる画像の管理、処理、提示について横田班と密接な連携を図り、色素・顕微鏡・ソフトの三位一体型研究開発を進める。また、蛍光タンパク質関連のライセンス問題をクリアすることで、本計画研究成果物の産業界への普及に努める。

#### 4. 研究成果

(1) ストレスで傷ついたミトコンドリアは活性酸素などを放出し、その蓄積は細胞を死に至らせる。そこで、傷害ミトコンドリアを選択的に細胞内ゴミ処理場リソソームに送り込んで分解する仕組み「ミトコンドリア品質コントロール」が働いている。この仕組みに異常が起ると、パーキンソン病などの様々な疾病が起こることが分かっている。リソソームは酸性でタンパク質分解酵素に満ちている。こうした環境でびくともしない頑強な蛍光タンパク質 TOLLES をまず開発した。さらに TOLLES を材料にミトコンドリア品質コントロールを定量的に可視化する蛍光プローブ mito-SRAI を開発した。パーキンソン病の病理診断と治療薬開発に mito-SRAI が活躍することを証明した。すなわち、パーキンソン病モデル動物において、ミトコンドリア品質コントロールの不全と神経細胞の死が相関することを示した。さらにハイスループットスクリーニングを実践し、パーキンソン病治療薬の候補化合物を見出すことに成功した。Cell, 2020.

(2) 生体組織などの屈折率が高く厚みのある標本を光学顕微鏡を用いて観察する際、対物レンズから出射された光は焦点面にずれを生じ、観察像が不鮮明になる(球面収差)。球面収差は、観察位置が深くなるにつれて増大するため、生体イメージングにおいて重要課題である。1) 回転を電動化した補正環と顕微鏡 Z ステージを連動させ、焦点位置の変化を補償する(Zlin-C) デバイスと、2) 取得画像のコントラスト値が最大になるように最適な補正環位置を計算するアルゴリズム(Peak-C) を作製し、これらから構成される自動球面収差補正システム(Deep-C) を開発した。Deep-C をマウス生体脳イメージングに適用した結果、特に大脳皮質深部において、光学的収差の少ないより鮮明な画像が得られることを見いだしました。Biochem. Biophys. Res. Commun., 2018.

(3) 新しい生物発光システム AkaBLI を開発した。これは、人工基質 AkaLumine と、AkaLumine に合わせて開発した人工酵素 AkaLuc から構成される。深部からの発光シグナルを、従来と比べ 100~1,000 倍の強さで検出できることがわかった。AkaBLI を用いて、マウスの線条体の中の標識神経細胞からの発光を、無麻酔かつ自由行動の状態でも非侵襲的に可視化することに成功した。AkaBLI を使えば、注目する神経回路を遺伝的に AkaLuc で標識し、その活性化を非侵襲的かつ包括的にモニタすることができる。本技術は、高等動物の高次脳機能をより自然な状況で解析するための技術として期待できる。また、AkaLuc で標識した腫瘍細胞がマウスの肺の毛細血管にトラップされる現象を一細胞レベルで可視化することにも成功した。AkaBLI は、少数の腫瘍細胞や幹細胞の新生や移入、さらにその後起こる生着、増殖、転移などの現象を高感度にかつ定量的に観察することを可能にし、動物個体を扱う生命科学分野で幅広い活躍が期待される。Science, 2018.

(4) 日本ウナギから遺伝子クローニングしたビリルビン結合性蛍光タンパク質 UnaG と Calmodulin というカルシウム感受性タンパク質との融合タンパク質 BReleaCa を開発した。カルシウム存在下で UnaG のビリルビン結合が阻害されて蛍光が消光するので、カルシウム濃度で UnaG のオン・オフ比を詳細に制御できる。超解像技術における標識ターゲ

ットの存在分布に応じて蛍光性タグの密度を制御できる技術開発を進めている。

Biochem. Biophys. Res. Comm., 2018.

(5) 2008年に報告した細胞周期プローブ Fucci は、G1 期を赤、S/G2/M 期を緑に標識する。しかし、S 期と G2 期を色分けすることができない。また、高速に増殖する細胞の短い G1 期を検出できない。今回、細胞周期依存的ユビキチン介在タンパク質分解を多様に改変することで、Fucci (CA) を新たに開発した。Fucci (CA) は、細胞周期の G1 期・S 期・G2 期をそれぞれ赤・緑・黄の 3 色で識別する。通常の光学顕微鏡で蛍光シグナル分布を併せて観察すれば M 期も識別でき、すなわち四つの細胞周期全てを光学的に分離することができる。Fucci (CA) を用いて、培養細胞の紫外線に対する感受性が S 期に最も高いことを明らかにした。さらに、未分化性マウス ES 細胞の極端に短い G1 期を確実に検出できることが分かった。Mol. Cell, 2017.

(6) phase separation (水と油の例にみられる相分離) を利用し、生きた細胞内でタンパク質間相互作用 (PPI: protein-protein interaction) をイメージングする手法 Fluoppi を開発した。従来、観察対象(X)に融合する蛍光タンパク質(FP)は単量体 FP が好まれていた。多量体 FP を使用すると X が多量体化し、本来の機能を果たせなくなる恐れがある為である。しかし Fluoppi ではこの欠点を活用し、タンパク質間相互作用を変幻自在な liquid phase droplet として可視化することに成功した。従来の PPI 検出手法とは異なり、無制限のダイナミックレンジを誇る検出手法である。本手法では、p62 タンパク質由来の多量化能を有するドメイン(PB1)と、4 量体 FP の Azami-Green(AG)をそれぞれ任意のタンパク質 X, Y に融合する。X と Y の相互作用により、PB1 と AG を介してクロスリンクが起こり、その結果、PPI を蛍光性の輝点として検出することができる。本手法は近年新しいメカニズムの治療薬として注目されている PPI 阻害薬の評価に適しており、今後、PPI 創薬研究を飛躍的に加速させることが期待される。Sci. Rep., 2017.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Fukuda M, Sakaue-Sawano A, Shimura C, Tachibana M, Miyawaki A, Shinkai Y.	4. 巻 9
2. 論文標題 G9a-dependent histone methylation can be induced in G1 phase of cell cycle.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 956
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-37507-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mano T, Albanese A, Dodt HU, Erturk A, Gradinaru V, Treweek JB, Miyawaki A, Chung K, Ueda HR.	4. 巻 38
2. 論文標題 Whole-Brain Analysis of Cells and Circuits by Tissue Clearing and Light-Sheet Microscopy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Neurosci.	6. 最初と最後の頁 9330-9337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Laptenok SP, Gil AA, Hall CR, Lukacs A, Iuliano JN, Jones GA, Greetham GM, Donaldson P, Miyawaki A, Tonge PJ, Meech SR.	4. 巻 10
2. 論文標題 Infrared spectroscopy reveals multi-step multi-timescale photoactivation in the photoconvertible protein archetype dronpa	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nat. Chem.	6. 最初と最後の頁 845-852
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41557-018-0073-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ue Y, Monai H, Higuchi K, Nishiwaki D, Tajima T, Okazaki K, Hama H, Hirase H, Miyawaki A.	4. 巻 500
2. 論文標題 A spherical aberration-free microscopy system for live brain imaging.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 236-241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.04.049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Iwano S, Sugiyama M, Hama H, Watakabe A, Hasegawa N, Kuchimaru T, Tanaka KZ, Takahashi M, Ishida Y, Hata J, Shimozono S, Namiki K, Fukano T, Kiyama M, Okano H, Kizaka-Kondoh S, McHugh TJ, Yamamori T, Hioki H, Maki S, Miyawaki A.	4. 巻 359
2. 論文標題 Single-cell bioluminescence imaging of deep tissue in freely moving animals.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 935-939
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1126/science.aaq1067	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shitashima Y, Shimozawa T, Asahi T, Miyawaki A.	4. 巻 496
2. 論文標題 A dual-ligand-modulable fluorescent protein based on UnaG and calmodulin.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 872-879
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.bbrc.2018.01.134.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakaue-Sawano A, Yo M, Komatsu N, Hiratsuka T, Kogure T, Hoshida T, Goshima N, Matsuda M, Miyoshi H, Miyawaki A.	4. 巻 68
2. 論文標題 Genetically Encoded Tools for Optical Dissection of the Mammalian Cell Cycle	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mol. Cell	6. 最初と最後の頁 626-640
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.molcel.2017.10.001.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe T, Seki T, Fukano T, Sakaue-Sawano A, Karasawa S, Kubota M, Kurokawa H, Inoue K, Akatsuka J, Miyawaki A.	4. 巻 7
2. 論文標題 Genetic visualization of protein interactions harnessing liquid phase transitions.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Science Report	6. 最初と最後の頁 46380
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep46380	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計15件(うち招待講演 15件/うち国際学会 12件)

1. 発表者名 Atsushi Miyawaki
2. 発表標題 Luminescent protein applications in research, medicine, and bioengineering
3. 学会等名 The 9th BRI International Symposium on Visualization of brain network and function (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsushi Miyawaki
2. 発表標題 Cruising inside cells - A graduate fantasy at IPR in the 80's -
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研究所創設60周年記念国際シンポジウム(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮脇敦史
2. 発表標題 光と生命
3. 学会等名 第39回日本炎症・再生医学会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Atsushi Miyawaki
2. 発表標題 Genetically encoded tools based on luminescent proteins
3. 学会等名 WCP2018(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Atsushi Miyawaki
2. 発表標題 Cruising inside cells: New Fluorescent Probes and New Perspectives in Bioscience
3. 学会等名 2017 SGP Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Atsushi Miyawaki
2. 発表標題 Genetically encoded tools for brain analysis
3. 学会等名 a KIBM symposium on imaging the brain (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Atsushi Miyawaki
2. 発表標題 Genetically encoded tools based on fluorescent proteins
3. 学会等名 EMBL Symposia on Seeing is Believing (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Atsushi Miyawaki
2. 発表標題 Fluorescent Protein
3. 学会等名 19th International Symposium on Bioluminescence & Chemiluminescence (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Atsushi Miyawaki
2. 発表標題 巡航分子スパイ
3. 学会等名 第3回京都大学 - 稲盛財団合同京都賞シンポジウム (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Atsushi Miyawaki
2. 発表標題 Fluorescent protein applications in research, medicine, and bioengineering
3. 学会等名 International conference on Labeling & Nanoscopy (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 宮脇敦史
2. 発表標題 Cruising inside the cells
3. 学会等名 第90回日本薬理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Atsushi Miyawaki
2. 発表標題 Flourescent Protein Technologies for Neurosciences
3. 学会等名 The Thirty-Seventh Annual W. Alden Spencer Award and Lecture (招待講演)
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 Atsushi Miyawaki
2. 発表標題 Genetically encoded tools for brain analysis
3. 学会等名 EMBL symposium on Seeing is Believing - Imaging the Processes of Life, invited speaker (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 Atsushi Miyawaki
2. 発表標題 Visualizing developmentally programmed endoreplication in mammals and drug-induced cell cycle modulation using ubiquitin oscillators
3. 学会等名 EMBO Cell Cycle Workshop 2015 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 Atsushi Miyawaki
2. 発表標題 Cruising Inside X
3. 学会等名 PicoQuant to hold 21st International Single Molecule Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2015年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 濱裕、日置寛之、並木香奈、星田哲志、黒川裕、宮脇敦史	4. 発行年 2017年
2. 出版社 生体の科学	5. 総ページ数 94 (85-93)
3. 書名 組織の透明化技術. 生体の科学	

1. 著者名 日置寛之、濱裕、孫在隣、黄晶媛、並木香奈、星田哲志、黒川裕、宮脇敦史	4. 発行年 2017年
2. 出版社 日本薬理学雑誌	5. 総ページ数 42 (173-179)
3. 書名 脳透明化技術の現状と今後の発展 ScaleS法に焦点を当てて	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>共鳴誘導で革新するバイオイメーシング  <a href="https://reso.m.ehime-u.ac.jp/">https://reso.m.ehime-u.ac.jp/</a></p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	牧 昌次郎 (Maki Shojirou) (20266349)	電気通信大学・大学院情報理工学研究科・准教授  (12612)	
研究分担者	小松 直貴 (Komatsu Naoki) (30737440)	国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・研究員  (82401)	
研究分担者	下園 哲 (Shimozono Satoshi) (40391982)	国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・研究員  (82401)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	阪上 朝子 (Sakaue Asako) (90462689)	国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・ 研究員  (82401)	
研究分担者	濱 裕 (Hama Hiroshi) (30261796)	独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・専門 職研究員  (82401)	
連携研究者	岩野 智 (Iwano Satoshi) (10734832)	国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・ 研究員  (82401)	