

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 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：2010～2014

課題番号：22113003

研究課題名（和文）ズームイン（高精細）とズームアウト（広視野・深部）観察を可能にする革新技術の開発

研究課題名（英文）Visualizing biological functions at many different scales

研究代表者

宮脇 敦史（Miyawaki, Atsushi）

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・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） 120,000,000 円

研究成果の概要（和文）：個体、器官、組織内の個々の細胞について、その働きに関する時空間パターンを調べる技術を開発してきた。本研究では、細胞周期プローブFucciの開発とその発生、癌研究への応用、レチノイン酸プローブGEPRAの開発とその発生研究への応用、生体固定組織の透明化技術Scaleの開発とその中枢変性疾患研究への応用などを行ってきた。技術間のcrossoverを図ることに努めた。たとえばFucci+Scaleで、マウス胎仔における細胞の増殖と分化の協調パターンを包括的に可視化した。また、Fucci+GEPRAで、魚胚の体節形成における細胞周期とレチノイン酸濃度勾配との関係について理解することが出来た。

研究成果の概要（英文）：Using population and time-lapse imaging analyses of cancer cells expressing new versions of the fluorescent cell-cycle indicator, Fucci, we found great diversity in the cell-cycle alterations induced by anticancer drugs. Drug-induced cell cycle modulation varied not only between different cell types or following treatment with different drugs, but also between cells treated with different concentrations of the same drug. Using newly developed probes for retinoic acid (RA), GEPRA, we performed live imaging of zebrafish embryos at the gastrula and somitogenesis stages, which revealed a linear concentration gradient of endogenous RA in a two-tailed source-sink arrangement across the embryo. We developed a simple yet efficient method, Scale, that increases the transparency of biological tissue while preserving the signals of fluorescent labels. We established procedures for large-scale high-resolution 3D reconstruction of labeled structures within fixed specimens of millimeter size.

研究分野：バイオイメージング

キーワード：イメージング 蛍光たんぱく質 細胞周期 酸化ストレス 透明化試薬 レチノイン酸 FRET 細胞内結晶

1. 研究開始当初の背景

細胞周期蛍光プローブ Fucci (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator) (Sakaue-Sawano et al. 2008) は、G1 期の細胞核を赤色に、S/G2/M 期の細胞核を緑色にラベルするプローブである。培養細胞に発現させれば、リアルタイムで G1→S/G2/M→2x G1 の進行を可視化できる。個体、器官、組織内の個々の細胞（とくに癌細胞）について、細胞周期位相の変化の時空間的パターンを調べることが次の課題であった。また、そうした細胞周期パターンと腫瘍血管パターンを合わせて観察することが求められていた。様々な空間スケールで3次元的に可視化する光学技術を開発する必要があった。我々は経常研究の一旦として、脳内の神経ネットワークを3次元的に可視化する技術（Scale 技術）の開発を進めており、こうした研究で得られた成果 (Hama et al. 2011) や経験を、癌イメージングの技術開発に生かすことを考えた。

細胞の「細胞周期進行」に対しネガティブな現象として「酸化ストレス」、「アポトーシス」(Nagai et al. 2004)、「オートファジー」(Katayama et al. 2008) を可視化する蛍光プローブを開発してきた。

より広く、より深く、より細かく、より速く、より長く、という要求・要望を全部最大限に満たすことはできない。イメージングの時空間を巡る技術要素の間には様々な trade offs がある。イメージングの性質に応じて、最先端的要素と妥協的要素をうまく協調させるシステムが必要である。

2. 研究の目的

細胞が様々な外界刺激を受けながら増殖・分化を営む過程で、生物学的諸現象が見せる時空間パターン（細胞内、組織内、個体内）を解析するためのバイオイメーキング技術を開発し、幅広い実践を通して癌研究への応用を検討する。

蛍光タンパク質技術と光学顕微鏡技術を新規に開発し、癌に関連する生物学的現象の時空間パターンを制御するメカニズムを調べる。Google Map のように、異なる空間スケール（動物個体、器官、組織、細胞、細胞内小器官、細胞内微小領域）を自由自在に往来しながら、複数の現象をイメージングすることによって癌バイオロジーの多角的な理解を目指す。

3. 研究の方法

より深いバイオイメーキングを目指して、長波長領域に蛍光を発する蛍光（発光）タンパク質、多光子励起の効率が非常に高い蛍光タ

ンパク質を開発する。また、固定標本を観察する場合を考慮し、ホルムアルデヒド固定や各種有機溶媒に耐性を示す蛍光タンパク質を開発する。多光子励起顕微鏡においては、自動波長切り替え、深部での光学（球面収差）補正などの技術を開発する。

より細かいバイオイメーキングを目指して、フォトクロミック蛍光タンパク質の光スイッチング性能の幅を拡大する。

より多角的なバイオイメーキングを目指して、Fucci に加えて、酸化ストレスセンサー、アポトーシスセンサー、オートファジーセンサー、ミトコンドリアセンサー、炎症センサーなどを開発する。また細胞周期センサーを多様化させる。これらセンサーを発現する細胞群をマウスに移植する、あるいは、そうしたセンサーを様々な部位で発現するマウス個体を作製する。さらに、ES 細胞、iPS 細胞を使う再生医療や、抗癌剤開発のための蛍光イメージングシステムの開発を行う。

上記の要素技術を統合させて、時間的にも空間的にもズームインとズームアウトを自在に行えるイメージングシステムを完成させる。

4. 研究成果

1. 細胞周期プローブ Fucci の第 2 世代 Fucci2 を作製した。Fucci2 プローブを発現する HeLa 細胞および NMuMG 細胞を作製し、抗がん剤の作用を再評価する実験系を確立した。特に、endoreplication cycle に入る細胞を高頻度に検出することができた。

2. 細胞周期プローブ Fucci を恒常的に発現するトランスジェニックマウスを用いた解析を行った。まず #474/610 ラインの血球系細胞の細胞周期進行を詳細に調べたところ、G0 期と G1 期とが、Fucci の赤色蛍光の強度によって識別できることがわかった。特にリンパ球が休止期状態と活性化状態との間を往復する様子を観察することができた。また、#474/610 ラインから調製した造血幹細胞画分及び胎盤形成細胞画分を使って、細胞分化と endoreplication（細胞質分裂をスキップして核 DNA 量が指数関数的に増大する現象）との連関を観察することができた。

3. 細胞周期プローブ Fucci を恒常的に発現する培養細胞を長期間にわたって追跡するための培養皿 FulTrac well を開発した。また、培養皿上で増殖する細胞を追跡しながら細胞系譜を解析するソフトウェア（スネーク法を採用）Tador を開発した。

4. 細胞周期プローブ Fucci について、G1/S transition に加えて S/G2 transition を可視化する Fucci probe (Fucci4) の開発に成功、培養細胞での validation を行った。

5. ゼブラフィッシュにおいて機能する Fucci プローブ、zFucci を新たに開発し、トランスジェニックゼブラフィッシュの作製を経て、網膜神経上皮や脊索の発生における細胞周期進行のパターンを可視化した。

6. レチノイン酸センサーGEPRA を開発し、ゼブラフィッシュの胚におけるレチノイン酸濃度の濃度勾配を初めて直接的に可視化した。

6. GEPRA が哺乳類細胞において凝集を形成しやすいことが判明した。哺乳類細胞で機能する mGEPRA を開発し、mGEPRA を発現するトランスジェニックマウスを作製した。胚の各組織、成獣の免疫系や生殖系の組織で起こるレチノイン酸動態について解析を行いつつある。

7. 生体固定試料を透明化する水溶液 Scale 試薬を開発し、試料の表面から深部を観察する技術を開発した。マウス脳の固定サンプルに適用し、神経回路や血管などの構造について大規模・高精細の3次元再構成が容易にできるようになった。3次元空間において構造間の距離を自動的に測定するソフトウェア RINZO を開発した。

8. ニホンウナギの筋肉から緑色蛍光タンパク質をコードする遺伝子を単離した。その遺伝子産物「UnaG」は、クラゲやサンゴ由来の蛍光タンパク質とはまったく異なるしくみで光ることがわかった。UnaGにおいてはビリルビンが特異的に結合し蛍光性発色団として働くのである。こうしたしくみを利用して、生体ビリルビンイメージングを目指した技術開発を進めている。ビリルビンが脂質の酸化を防ぐ「抗酸化物質」であることに注目し、組織内（血管外）のビリルビン濃度勾配を検出することを狙う。

9. カルシウム指示薬cameleonを多角的に進化させることを行う。従来は、CFPとYFPのFRETを利用するYellow cameleonが主であったが、GFP、OPF (orange fluorescent protein)、RFPなどを組み合わせて使うorange cameleonやred camelonを開発した。変化量（反応の大きさ）や輝度について改善を行い、長時間にわたるカルシウムイメージングに応用した。

10. 石サンゴ、キクメイシ由来の蛍光タンパク質KikGRを材料に、非常に結晶化しやすい変異体 Xpa 「(Crystalizable and photo-activatable: クリスパ)」を作製したところ、生きた細胞の中でも大きな結晶を作ることがわかった。Xpaタンパク質を発現する培養細胞をタイムラプスイメージングで観察したところ、細胞質中に広がったXpa

タンパク質が一瞬にして集積し、数ミクロン程度のひし形結晶に変身する様子が確認された。結晶を免疫組織学実験および透過型電子顕微鏡観察したところ、リソソームの膜で覆われていることが分かった。その結晶は、生成後にユビキチン、p62、LC3を介する選択的オートファジーによってリソソームへ取り込まれることが明らかとなった。さらに、細胞1個を材料にX線回折構造解析を行い、Xpaタンパク質の立体構造を2.9オングストロームの分解能で決定することに成功した。

11. 蛋白質の構造変化を蛍光シグナルに変換して生体现象を可視化する一分子型センサーについて概説した。蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) および単一蛍光蛋白質に基づくセンサーを網羅し、その原理と技術進化、最新の応用例について解説した。さらに、新たに開発したYCX2.60を発現するトランスジェニックマウスを作製した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件) 全て査読あり

1. *Miyawaki A, Niino Y. (2015) Molecular spies for bioimaging - Fluorescent protein-based probes. **Molecular Cell**, 48 (4): 632-643.
doi: 10.1016/j.molcel.2015.03.002.

2. Tsutsui H, Jinno Y, Shoda K, Tomita A, Matsuda M, Yamashita E, Katayama H, Nakagawa A, *Miyawaki A. (2015) A Diffraction-Quality Protein Crystal Processed as an Autophagic Cargo, **Mol. Cell**, 58 (1), 186-193.
doi: 10.1016/j.molcel.2015.02.007.

3. Madisen L, Garner AR, Shimaoka D, Chuong AS, Klapoetke NC, Li L, van der Bourg A, Niino Y, Egolf L, Monetti C, Gu H, Mills M, Cheng A, Tasic B, Nguyen TN, Sunkin SM, Benucci A, Nagy A, *Miyawaki A, Helmchen F, Empson RM, Knopfel T, Boyden ES, Reid RC, Carandini M, *Zeng H (2015) Transgenic mice for intersectional targeting of neural sensors and effectors with high specificity and performance. **Neuron**, 85, 942-958.
doi: 10.1016/j.neuron.2015.02.022.

4. Sakaue-Sawano A, *Miyawaki A. (2014) Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progressions with fucci technology. **Cold Spring Harb Protoc.** 2014(5).
doi: 10.1101/pdb.prot080408.
5. Sakaue-Sawano A, Hoshida T, Yo M, Takahashi R, Ohtawa K, Arai T, Takahashi E, Noda S, Miyoshi H, *Miyawaki A. (2013) Visualizing developmentally programmed endoreplication in mammals using ubiquitin oscillators. **Development**, 140, 4624-4632.
doi: 10.1242/dev.099226.
6. *Tomura M, Sakaue-Sawano A, Mori Y, Takase-Utsugi M, Hata A, Ohtawa K, Kanagawa O, Miyawaki A. (2013) Contrasting Quiescent G₀ Phase with Mitotic Cell Cycling in the Mouse Immune System. **PLoS ONE** 8(9): e73801.
doi: 10.1371/journal.pone.0073801.
7. Kumagai A, Ando R, Miyatake H, Greimel P, Kobayashi T, Hirabayashi Y, Shimogori T, *Miyawaki A. (2013) A Bilirubin-Inducible Fluorescent Protein from Eel Muscle. **Cell**, 153 (7): 1602-1611.
doi: 10.1016/j.cell.2013.05.038.
8. Shimozono S, Iimura T, Kitaguchi T, Higashijima SI, *Miyawaki A. (2013) Visualization of an endogenous retinoic acid gradient across embryonic development. **Nature**, 496 (7445):363-366.
doi: 10.1038/nature12037.
9. *Miyawaki A, Shcherbakova DM, Verkhusha VV. (2012) Red fluorescent proteins: chromophore formation and cellular applications. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, 22 (5): 679-688.
doi: 10.1016/j.sbi.2012.09.002.
10. Kurokawa H, Noda H, Sugiyama M, Sakaue-Sawano A, Fukami K, *Miyawaki A. (2012) Software for precise tracking of cell proliferation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 417 (3): 1080-1085.
doi: 10.1016/j.bbrc.2011.12.100.
11. *Miyawaki A. (2011) Proteins on the move: insights gained from fluorescent protein technologies. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, 12 (10): 656-668.
doi: 10.1038/nrm3199.
12. Hama H, Kurokawa H, Kawano H, Ando R, Shimogori T, Noda H, Fukami K, Sakaue-Sawano A, *Miyawaki A. (2011) Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain, **Nature Neuroscience**, 14 (11): 1481-1488.
doi: 10.1038/nn.2928.
13. Katayama H, Kogure T, Mizushima N, Yoshimori T, *Miyawaki A. (2011) A Sensitive and Quantitative Technique for Detecting Autophagic Events Based on Lysosomal Delivery. **Chemistry & Biology**, 18 (8): 1042-1052.
doi: 10.1016/j.chembiol.2011.05.013.
14. *Miyawaki A. (2011) Development of Probes for Cellular Functions Using Fluorescent Proteins and Fluorescence Resonance Energy Transfer. **Annu Rev Biochem.**, 80: 357-373.
doi: 10.1146/annurev-biochem-072909-094736.
15. Sakaue-Sawano A, Kobayashi T, Ohtawa K, *Miyawaki A. (2011) Drug-induced cell cycle modulation leading to cell-cycle arrest, nuclear mis-segregation, or endoreplication **BMC Cell Biology**, 12:2.
doi: 10.1186/1471-2121-12-2.
- 〔学会発表〕(計 17件)
1. 宮脇敦史: Cruising inside cells, “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, 国立京都国際会館 (京都府京都市) 2015.1.26
2. 宮脇敦史: Cruising inside cells, 日本動物遺伝育種学会第15回年次大会, 理化学研究所 (埼玉県和光市), 2014.11.1
3. 宮脇敦史: Cruising inside cells, 第35回日本肥満学会「肥満症学の知の創造と実践」, シーガイアコンベンションセンター (宮崎県宮崎市), 2014.10.25.
4. Atsushi Miyawaki, Akiko Kumagai, Ryoko Ando: A Bilirubin-Inducible Fluorescent Protein from Eel Muscle, Janelia Conference on Fluorescent Proteins and Biological Sensors IV, Janelia Farm, USA. 2014.9.28-10.1.
5. 宮脇敦史: Cruising inside cells” 第57回日本腎臓学会学術総会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市), 2014.7.5.
6. 宮脇敦史: Cruising inside Xs” 日本実験動物科学・技術さっぽろ, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市), 2014.5.16.

7. 宮脇敦史: The interplay between light and life, 第1回最先端創薬科学シンポジウム『蛍光と創薬』, 長崎大学(長崎県長崎市), 2013.9.28-2013.9.29.

8. 宮脇敦史: 新規蛍光プローブとバイオサイエンスの新展開, JASIS 2013英国王立化学会(RSC)東京国際コンファレンス, 幕張メッセ国際展示場(千葉県千葉市), 2013.9.6.

9. Atsushi Miyawaki: Cruising inside X, 26th International Conference on Photochemistry, Leuven, Belgium, July 30, 2013.

10. 宮脇敦史: Cruising inside cells, 第60回日本実験動物学会総会, つくば国際会議場(茨城県つくば市), 2013.5.15.

11. Hiroshi Hama, Hisorhi Kurokawa, Atsushi Miyawaki: Scale: a chemical approach for high-resolution fluorescence imaging and 3D reconstruction of transparent mouse brain, 8th FENS Forum 2012, Barcelona, Spain, July 15, 2012.

12. Atsushi Miyawaki: A chemical approach for high-resolution fluorescence imaging and 3D reconstruction of transparent mouse brain, ISSCR 10th Annual Meeting, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), June 12, 2012.

13. Atsushi Miyawaki: Seeing both the trees and the forest, FOM 2012, Singapore, April 1, 2012.

14. Atsushi Miyawaki: New Fluorescent Probes and New Perspectives in Bioscience, 1st POSTECH International symposium on Bio-Imaging, Pohang, Korea, September 29, 2011.

15. Atsushi Miyawaki: New Fluorescent Probes and New Perspectives in Bioscience, 2011 Champalimaud Neuroscience Symposium, Lisbon, Portugal, September 19, 2011.

16. Atsushi Miyawaki: New Fluorescent Probes and New Perspectives in Bioscience, Cold Spring Harbor Asia Conference on New Advances in Optical Imaging of Live Cells and Organisms, Suzhou, China, May 9, 2011.

17. Atsushi Miyawaki: 3D quantifying the association of proliferative neural stem cell nuclei with blood vessels in the SGZ, Light-based approaches to neural circuit reconstruction, Janelia Farm, USA., October 25, 2010.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
○出願状況(計3件)

名称: オートファジーの測定方法
発明者: 宮脇敦史、片山博幸
権利者: 科学技術振興機構
種類: 特許
番号: 特許 5339387号
出願年月日: 平成22年8月10日
国内外の別: 国内

名称: 生物材料用の透明化試薬、及びその利用
発明者: 宮脇敦史、濱裕、黒川裕、河野弘幸、阪上-沢野 朝子
権利者: 理化学研究所
種類: 特許
番号: PCT/JP2011/056502
出願年月日: 平成23年3月11日
国内外の別: 国内・海外

名称: 生物材料用の透明化試薬、及びその利用
発明者: 宮脇敦史、濱裕、阪上-沢野 朝子
権利者: 理化学研究所
種類: 特許
番号: PCTJP2012/062874
出願年月日: 平成23年5月18日
国内外の別: 国内・海外

名称: 蛍光特性を示す新規なポリペプチド、およびその利用
発明者: 宮脇敦史、熊谷安希子
権利者: 理化学研究所、科学技術振興機構
種類: 特許
番号: PCT/JP2014/055160
出願年月日: 平成25年2月28日
国内外の別: 国内

○取得状況(計1件)

名称: オートファジーの測定方法
発明者: 宮脇敦史、片山博幸
権利者: 科学技術振興機構
種類: 特許
番号: 5339387号
出願年月日: 平成22年8月10日
取得年月日: 平成25年8月16日
国内外の別: 国内

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.brain.riken.jp/jp/faculty/details/30>

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・脳科学総合研究センター・チームリーダー
研究者番号：80251445
- (2)研究分担者 濱裕 (Hama Hiroshi)
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
研究者番号： 30261796
- (3)研究分担者 佐々木和樹 (平成 22-23 年)
(Sasaki Kazuki)
独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員
- (4)研究分担者 下 藺 哲 (平成 26 年)
(Shimozono Satoshi)
独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員
研究者番号： 40391982
- (5)研究分担者 新野祐介(平成 26 年)
(Niino Yusuke)
独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員
研究者番号： 10584584
- (6)連携研究者 阪上朝子 (Sakaue Asako)
独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員
研究者番号： 10415169
- (7)連携研究者 河野弘幸
(Kawano Hiroyuki)
独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員
研究者番号： 10332256
- (8)連携研究者 深野天 (Fukano Takashi)
独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員
研究者番号： 80373364
- (8)連携研究者 安藤亮子 (Ando Ryoko)
独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員
研究者番号： 10706170