

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：63904

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657109

研究課題名（和文） 赤外レーザー照射に伴う細胞の温度変化を蛍光タンパク質で捉える

研究課題名（英文） Development of temperature sensing fluorescent protein for in vivo thermal imaging induced by infrared laser irradiation to cells.

研究代表者

亀井 保博（KAMEI YASUHIRO）

基礎生物学研究所・生物機能解析センター・特任准教授

研究者番号：70372563

研究成果の概要（和文）：

細胞系譜や、遺伝子機能の解析を生体内で行うためのツールとして赤外線照射による遺伝子発現誘導法がある。熱ショックプロモーター下流に発現させたい遺伝子のコード領域を持つトランスジェニック生物の細胞に赤外線をあてて温め、目的遺伝子を発現させる。しかし、加熱しすぎると細胞にダメージを与えるので、細胞の温度が計測できればより効率良く研究が行える。そこで細胞の温度を計測できる蛍光タンパク質を開発し、顕微鏡下で生体内の温度計測する系を開発した。

研究成果の概要（英文）：

Single-cell gene induction is a powerful method for gene function and cell fate analysis. Infrared laser evoked gene operator method can enable this by utilizing heat shock response system to induce a target gene in the single cell of transgenic animals or plants which carries the target gene driven by heat shock promoter. However, because excess heating results in cell damage, we developed temperature-sensitive fluorescent protein and real time temperature sensing microscope system to improve the method.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：バイオイメーjing、遺伝子発現、蛍光タンパク質、赤外レーザー

1. 研究開始当初の背景

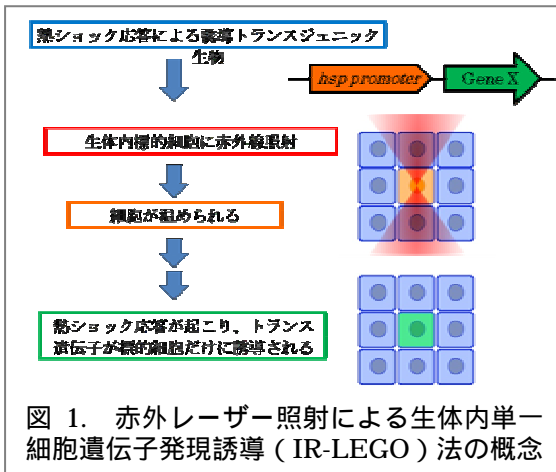
赤外線照射による遺伝子発現系（IR-LEGO）（図1に概念を示す）自体は2009年に線虫での応用（Kamei et al. Nat. Methods, 2009）ならびにメダカ、ゼブラフィッシュ、シロイヌナズナへの応用（T. Deguchi et al. Dev. Growth Differ. 2009）において本研究課題研究代表者が主体となって研究誌、論文として発表した。標的細胞への最適照射条件の検討実験に時間が掛かる点が問題であった。これは生体内の細胞レベルでの精度の良い温度計測技術が無く、赤外線照射出力毎に誘導効率を求めて最適条件を決定しなければならないからであり、生体内細胞の温度計測

が可能であれば克服できるのでこの技術の開発を目指した。

2. 研究の目的

生きた個体の細胞レベルの温度計測技術を確立することが本研究課題の目的であり、これを達成するには2つの方面の技術を確立することが必要である。1つは温度計測のためのプローブ（温度計）開発で、生体細胞に非侵襲的に導入する為に、蛍光タンパク質を改変して温度計測用とする。もう1つは温度計測のための顕微鏡システムである。理想的には3次元的にリアルタイムで局所温度をモニタリングする必要があるが、本研究課題の規

模では共焦点レーザー顕微鏡の構築は不可能なので、通常の蛍光顕微鏡の蛍光画像から焦点位置での温度計測を実証できるレベルを想定した。一方で、局所遺伝子発現技術の応用研究に関しても並行して推進し、本技術の普及に努めた。



3. 研究の方法

目的の項目にあるように2つの側面で開発を行った。(1) 温度計測用蛍光タンパク質プロープの開発と、(2) 温度計測顕微鏡の開発に分けて実施した。(1) では研究途中に知り合った研究者がすでに温度計測に使用できる蛍光タンパク質を開発中であることを知り、共同研究により開発することに変更した。そのため詳細は記載できないが、GFPなどの蛍光タンパク質を改変する方法で開発した。蛍光タンパク質による温度計測の可能性は前出の Nat. Methods 誌で実証済みであり、当時は EGFP (緑色蛍光タンパク質) を最も一般的に使用されるバリエーションを使用した(図2)が感度の点で生体内の局所温度変化を捉えるには不十分であるため、より高感度にするためにいくつかの方法を検討した。(2) に関して一部共同研究で実施する。IR レーザーを顕微鏡に導入し、蛍光画像を取得し、独自のプログラムで画像を温度表示させるようにする。このシステムを用いて(1)のプロープを細胞(培養細胞、メダカならびにシロイヌナズナ)に発現させて温度計測が可能かを検証する。以下により詳細を項目別に研究計画・手法を記す。

(1) 温度計測用蛍光タンパク質プロープの開発。

新規に開発した温度センサー機能を有する蛍光タンパク質候補分子を多数設計し、蛍光タンパク質を精製して、*in vitro* で温度感度、温度計測範囲を蛍光分光光度計等で評価し、まずは温度計測が可能なものを選別する。次に、従来の IR-LEGO で実績がある *in vitro* のモデル組織(大腸菌に蛍光タンパク質を発現させ「輝点」とし、局所温度変化を計測す

る系)を用いた実験系を踏襲して評価を行う。評価対象とする新規プロープを発現する大腸菌株を作製し、ポリアクリルアミドゲル中に均一に分散させた試料を調製する。赤外レーザー照射に伴う蛍光強度および蛍光波長の変化を計測する。コントロール群としては従来 IR-LEGO で評価系として用いてきた GFP によって新規蛍光タンパク質の温度応答性を比較し、感度、安定性、定量性、線形応答性などの評価を行う。実際の生体組織中で再現生よく温度計測可能なものを選定する。

(2) 温度計測評価のための赤外レーザー顕微鏡システムの構築。プロープ評価 IR-LEGO 顕微鏡構築を行う。将来観察用対物レンズに対して直角方向から励起用レーザーシートを導入し、IR-LEGO で分解能の低い z 軸方向での温度分布計測を実施する余地を考慮し光学系(後述)を設計し、同時に赤外レーザーを透過する対物レンズ(レンズコーティング剤を変更したもの)を外注しプロープ評価用 IR-LEGO 顕微鏡を構築する。さらに(2)が完成すれば、それを使用して(1)で得られた温度感受性新規蛍光タンパク質と熱ショック応答による遺伝子発現を指標として、組織内の時空間的な温度分布をモニタリングするための条件検討を行う。具体的には温度感受性新規蛍光タンパク質をメダカなどの実験小動物やモデル植物に導入してモデル動物実験系を作成し、*in vivo* で温度計測システムの評価を行い、必要に応じて装置の改良や実験・計測の諸条件の最適化を図っていく。将来的には、生体内の時空間的3次元温度計測を、ライトシートタイプの顕微鏡(DSLM)と組み合わせることで達成し、実時

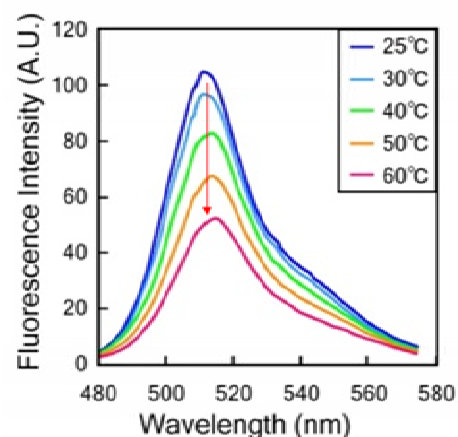


図 2. 緑色蛍光タンパク質 (EGFP) の蛍光スペクトルの温度依存的強度変化
温度上昇に伴い蛍光スペクトル型は変化せず、強度が低下するので、強度を指標に温度計測が可能となる。しかし、感度的には 1 ~ 2 程度 (蛍光強度の低下 1% が約 1 の温度上昇に相当) と低い。

間での生体組織内の温度計測を行い、生体内局所細胞での遺伝子発現や、温度感受性チャンネルタンパク質を用いた細胞制御への応用をめざす。

また一方で、IR-LEGO で実際に細胞マーキングや遺伝子発現による機能解析を行う研究者への技術的なサポートを行いつつ、ユーザーフレンドリーな技術とするためのノウハウを蓄積し、本研究課題へフィードバックする。

4. 研究成果

成果概要。赤外レーザーによる遺伝子発現顕微鏡 (IR-LEGO) の応用としては Nat. Commun. 誌などいくつかの論文が公表された。温度計測蛍光タンパク質プローブは 0.5~1 程度の感度を持つものを開発できた (論文投稿準備中)。生体内温度計測用としては 0.1 程度の感度をもつ物質が開発されているが、化学合成物質であるため、培養細胞でしか実用できないが、我々の開発したプローブは、感度は劣るが個体レベルで使用できる点で生物学における「温度」問題に取り組める計測技術となったと考えられる。一方で、温度計測顕微鏡については現時点組み上げが完了した状態で、実証実験はこれからとなる。本研究課題のテーマである IR-LEGO 法は日本発の技術であり、その応用が生物学に有効な新しい手法であることは上記 Nat. Commun. 誌など数誌の論文に掲載されたことから明らかである。本研究課題はまだ完成していないが、今後生物学で様々な使われ方をすると考えられる IR-LEGO がさらに使いやすい技術となり、様々な知見を生みだすものと考えている。詳細については以下に記す。

(1) 温度計測蛍光タンパク質プローブ開発に関しては、原理的なことや詳細は特許等に関わるためここでは報告できないが、蛍光分光光度計で温度変化させて最大限の感度持ち、定量的に評価できるプローブの開発に成功した。実際にこれを大腸菌・培養細胞、そしてメダカトランスジェニック系統の樹立を行っている。

(2) 研究期間中にプローブ評価用 IR-LEGO 顕微鏡構築により温度感受性プローブの評価を行う予定であったが、一部に特注対物レンズなど納期がぎりぎりになった物があったため、期間終了時点やっと顕微鏡の構築が 90% 完了した状態である。これから実験方法の項目で記した評価実験を開始する。

また、IR-LEGO の有効性を示し、本技術の改良にフィードバックさせるために進めていた応用研究においては幾つかの成果をえている。発生学におけるメダカの細胞系譜解析の研究で論文を 1 報 (発表論文 1; 図 3)、ゼブラフィッシュの血管形成過程を単一細胞レベルでトレースした研究でも 1 報 (発表論

文 2) など 4 報を発表し、現在 1 報が投稿中である。また、遺伝子発現ではなく、純粋に赤外線照射により局所的な温度上昇に伴う生理学的な研究にも IR-LEGO が応用できることを示すため、メダカにおけるストレスに伴う性転換に関する研究も共同で進めているが、こちらも順調に進んでいる。温度計測蛍光タンパク質プローブトランスジェニックメダカ系統を樹立中であり、樹立されればすぐさま温度計測し、具体的な温度感受組織を同定し、報告できる状態である。こちらは IR-LEGO の新たな用途となり、さらに本研究課題で進める温度計測技術が直接的に必要な研究であり、IR-LEGO なくしては達成できないマイルストーン的な研究となると思われる。

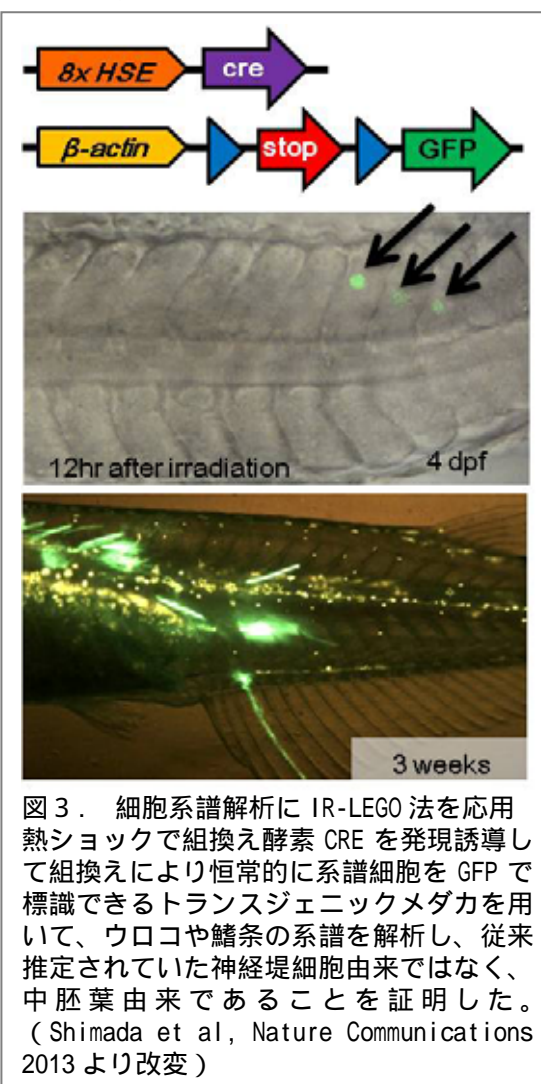


図 3. 細胞系譜解析に IR-LEGO 法を応用熱ショックで組換え酵素 CRE を発現誘導して組換えにより恒常的に系譜細胞を GFP で標識できるトランスジェニックメダカを用いて、ウロコや鰭条の系譜を解析し、従来推定されていた神経堤細胞由来ではなく、中胚葉由来であることを証明した。(Shimada et al, Nature Communications 2013 より改変)

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 4 件)

(1) Shimada A, Kawanishi T, Kaneko T,

Yoshihara H, Yano T, Inohaya K, Kinoshita M, Kamei Y, Tamura K and Takeda H. Trunk exoskeleton in teleosts is mesodermal in origin. *Nature Communications*. 4, 1639. (2013). doi:10.1038/ncomms2643(査読有)

(2) Kimura E, Deguchi T, Kamei Y, Shoji W, Yuba S and Hitomi J. Application of infrared laser to the zebrafish vascular system: gene induction, tracing, and ablation of single endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (in press) (査読有)

(3) Kobayashi K, Kamei Y, Kinoshita M, Czerny T, Tanaka M. A heat-inducible CRE/LOXP gene induction system in medaka. *Genesis*, 51, 59-67, (2013) (査読有)

(4) Okuyama T, Isoe Y, Hoki M, Suehiro Y, Yamagishi G, Naruse K, Kinoshita M, Kamei Y, Shimizu A, Kubo T and Takeuchi H. Controlled Cre/loxP site-specific recombination in the developing brain in medaka fish, *Oryzias latipes*. *PLoS One* (in press) (査読有)

〔学会発表〕(計6件)

(1) 亀井保博(他9名), Applications of IR-LEGO (infrared laser-evoked gene operator) to the model plant as collaborative research projects in NIBB, 日本植物生理学会, 2013年3月22日, 岡山大学(岡山県)

(2) Misako Saida-Taniguchi, Takuya Kaneko, Atsuko Shimada, Hiroyuki Takeda and Yasuhiro Kamei, Infrared Laser Mediated Single-Cell Gene Induction Method: Development and Application of IR-LEGO System. 18th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting, 2012年9月22日, 京都大学(京都府)

(3) Yasuhiro Kamei, Development of IR laser-mediated gene induction system, 2nd NUS-TLL-NIBB International Practical Course-Genetics, Genomics and Imaging in Zebrafish and Medaka, 2012年7月26日, National Univ. of Singapore (シンガポール)招待講演

(4) 亀井保博, 浦和博子, 岡田清孝, 赤外レーザーによる1細胞遺伝子発現法. 日本植物生理学会. 2012年3月16日. 京都産業大学(京都府)

(5) 亀井保博, (他16名), 赤外レーザーによる遺伝子発現システム(IR-LEGO)の様々なモデル生物への応用. 日本分子生物学会. 2011年12月13日. パシフィコ横浜(神奈川県)

(6) Yasuhiro Kamei, Infrared laser mediated single-cell gene induction

method: Development and application of IR-LEGO system. 1st Strategic meeting for medaka research, 2011年11月23日, 岡崎カンファレンスセンター(愛知県)

〔図書〕(計1件)

亀井保博(他111名), エルアイシー出版, 生物機能モデルと新しいリソース・リサーチツール, (2011) 579-582.

〔その他〕

(1) ホームページ
研究内容ならびに研究成果は研究室 HP (<http://www.nibb.ac.jp/lspectro/kamei.htm#original>) に随時掲載

(2) プレスリリース

・Nature Communications 誌での論文発表に関しては東京大学ならびに基礎生物学研究所からプレスリリースを実施(2013年3月28日)

・*Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 誌での論文発表に関しては岩手医科大学・基礎生物学研究所共同プレスリリースを実施(2013年5月31日予定)

(3) 技術講習会

局所遺伝子発現技術(IR-LEGO法)はトレーニングコースとして、シンガポール大学(2012年7月)と、基礎生物学研究所(2012年10月)で実施した。また、2013年6月に中部地区技術職員向けにも実施予定。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

亀井 保博(KAMEI YASUHIRO)
基礎生物学研究所・生物機能解析センター・特任准教授
研究者番号: 70372563

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者