

令和 4 年 5 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2016～2020

課題番号：16H06487

研究課題名（和文）脳組織構築過程で移動する神経細胞と取り巻く場の可視化と光操作

研究課題名（英文）Visualization and photomanipulation of migrating neuronal cells and surrounded field during the formation of brain tissue

研究代表者

松田 知己（Matsuda, Tomoki）

大阪大学・産業科学研究所・准教授

研究者番号：50419206

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 65,820,000 円

研究成果の概要（和文）：リソソーム等の酸性条件下での蛍光イメージングを達成する耐酸性緑色蛍光タンパク質、小胞体等のカルシウム濃度の高いオルガネラでのカルシウム動態の観察を可能にする生物発光低親和性カルシウムセンサー、細胞間接着タンパク質カドヘリンの相互作用を検出する蛍光センサー等の細胞内外の様々な環境でのライブイメージングに適用可能なプローブを開発した。また、光照射によって活性酸素を産生し、タンパク質、細胞の機能破壊の時空間制御を行うことのできる緑色の光増感蛍光タンパク質を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ライブイメージングは生命科学研究で汎用的に用いられているが、蛍光タンパク質や生物発光タンパク質の光化学的な性質やセンサーの検出範囲の制限等により、既存のプローブがあらゆる環境でうまく機能するという訳では無い。本研究で開発したプローブは、酸性条件下や高カルシウム濃度の様な既存のプローブではイメージングが困難であった環境でのイメージングを可能にし、これまで得ることのできなかったイメージングデータから、脳神経発生における新たな発見がもたらされることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We have developed probes adapted for live imaging in various intracellular and extracellular environments, such as acid-resistant green fluorescent protein to achieve fluorescence imaging under acidic conditions, such as lysosomes; bioluminescent low-affinity calcium sensor to observe calcium dynamics in organelles with high calcium concentration, such as endoplasmic reticulum; fluorescent sensor to detect an interaction of intercellular adhesion protein cadherin. We also developed a green photosensitizing fluorescent protein that can produce reactive oxygen species upon light irradiation and is available for spatiotemporally control the disruption of protein and cellular functions.

研究分野：生物物理学

キーワード：ライブイメージング 蛍光タンパク質 生物発光 細胞動態

1. 研究開始当初の背景

発生過程では、各臓器において組織幹細胞が増殖するとともに、あらかじめ決められたタイミングと順番で多様な細胞に分化する。これらの分化細胞は、あらかじめ決められたスケジュールで各々適切な場所へと移動することによって成熟し、正しい組織が構築される。組織幹細胞の増殖期は長すぎても短すぎても臓器の大きさが異常になり、また、誤ったタイミングで出現した細胞は本来置かれるべき細胞外環境との相互作用を実現できず、正しく組織を構築できなくなる。このように、それぞれの発生イベントのタイミングは細胞内に内在された時間プログラム(発生時計)によって厳密に制御される必要があるが、その詳細な分子機構はよく分かっていない。この状況に対して、本研究領域は脳神経発生過程の発生時計と場との連携機構を明らかにすることで、世界的にもあまり研究が進んでいない発生時間の制御機構を解明する新興領域の創成を目指して開始された。共同研究の効率を上げるために、ES細胞培養系の構築、ライブイメージング、数理シミュレーションといった解析手法を実験技術開発班に揃えた本領域研究の中で、本計画研究班では生細胞に対するイメージングや光操作技術の開発と改良を担当した。

2. 研究の目的

領域の A01 及び A02 計画班メンバーの研究者らは、領域の発足以前より脳神経発生過程で起こるタンパク質発現の時系列変化をイメージング等を用いて解析し、脳発生過程で起こる様々な現象を明らかにしてきた。それらの研究成果を土台に、本研究領域では場(細胞外環境)と神経細胞の連携という新たな視点を加えて、脳発生時間の制御機構を解明する研究を開始した。その発展のためには、主として時間軸の情報が取得される従前の発現動態のイメージングに加えて、神経細胞のダイナミックな移動に伴って神経とそれを取り巻く場の間で起こる分子・細胞機能の変化を可視化するイメージング手法を新たに取り入れることが必要となった。研究代表者らは、これまでに蛍光タンパク質や生物発光タンパク質を利用したライブイメージングのための様々なプローブを開発してきた。その知識と経験を生かすことにより、領域研究で幅広く利用することのできるイメージングツールや領域の個々の研究者の研究に特化したイメージングツールを開発し、領域の研究の加速に大きく貢献すべく本研究領域に参画した。本研究課題では、領域研究に役立つことが予想される申請者らの開発中のイメージングツールの改良、および領域参加予定のメンバー同士の情報交換の中で申請者が着想を得たイメージングツールの新たな開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

蛍光タンパク質の開発・改良、および蛍光・生物発光タンパク質を用いたセンサーの開発は、立体構造情報に基づく変異導入、ランダム変異導入、円順列変異導入、ドメイン間リンカー長やアミノ酸配列の変更等を組み合わせて行われた。作製した蛍光タンパク質やセンサーの光化学的特徴は、大腸菌内で発現し精製したタンパク質溶液を用いた分光測定、および、一過的に遺伝子発現させた哺乳類培養細胞の顕微鏡下での観測と画像解析により評価した。必要に応じて、安定発現株を構築して観測と画像解析を行った。

4. 研究成果

(1)耐酸性緑色蛍光タンパク質の開発

リソソーム・液泡・分泌小胞・エンドソームなどの酸性細胞小器官 (pH=4.5 から 5.5) 内で蛍光を失わない耐酸性緑色蛍光タンパク質の開発を行なった。小脳と脳幹で特徴的な形態異常を示すジュベール症候群では、リソソーム・オートファゴソーム融合の低下がその要因であることが示唆されている例があり [1]、脳発生の分野においても酸性細胞小器官内でのライブイメージングは今後その重要性を増していくことが予想される。シアン色、赤色蛍光タンパク質に関しては酸性細胞小器官内のイメージングに適した酸解離指数 (pK_a) が 4 以下のものが知られていたが、緑-黄色の蛍光タンパク質は pH 感受性が高く pH 6 以下で蛍光強度が著しく減衰するため、酸性細胞小器官内での多色イメージングによる複数イベン

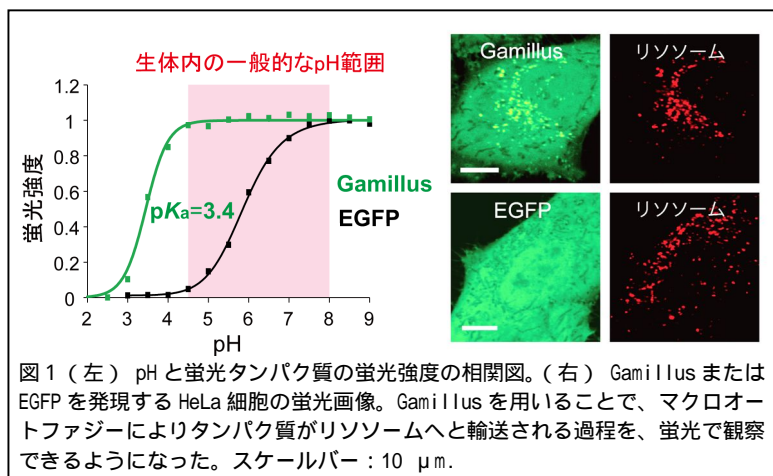


図1 (左) pHと蛍光タンパク質の蛍光強度の相関図。(右) GamillusまたはEGFPを発現するHeLa細胞の蛍光画像。Gamillusを用いることで、マクロオートファジーによりタンパク質がリソソームへと輸送される過程を、蛍光で観測できるようになった。スケールバー：10 μ m。

トの観察には制約があった。我々のグループがハナガサクラゲから遺伝子クローニングした緑色蛍光タンパク質が高い耐酸性能を有していたため、立体構造情報から予想したアミノ酸置換やランダム変異導入により単量体化、蛍光強度増強、可溶性の向上を試みた。そして、高い耐酸性能($pK_a = 3.4$)を示し、EGFPの1.8倍の蛍光強度を持つ単量体緑色蛍光タンパク質 Gamillusを開発した。GamillusはEGFPが蛍光を失うHeLa細胞リソソーム内でも安定に蛍光を発することが確認された(図1)。さらに、Gamillusを改変して、光照射依存的に蛍光 on 状態と off 状態を可逆的に変化させることのできる緑色光スイッチング蛍光蛋白質 rsGamillusを開発した[2]。改変の過程で耐酸性が失われなかったため、rsGamillusは酸性環境下における微細構造を観察するための超解像顕微鏡技術に適用できる。rsGamillusでは、これまでに開発された光スイッチング蛍光タンパク質で起きていた off on 状態の自発的な変化がほとんど見られず、off 状態を長時間保持することができるため、ハイライトした分子や細胞のトラッキングへの応用も期待される。

(2) 生物発光低親和性カルシウムセンサーの開発

生物発光タンパク質を用いたバイオイメージングは、励起光の照射を必要としないため、蛍光イメージングが潜在的に持つ自家蛍光や光毒性による影響を受けない利点がある。従来の生物発光タンパク質に比べて極めて高い強度で発光する NanoLuc (以下、Nluc) が開発されて以降、生物発光タンパク質のイメージングへの応用は加速し、研究代表者のグループでも、本研究以前に Nluc を利用した Ca^{2+} イメージングのための高光度生物発光 Ca^{2+} センサー green enhanced nanolatern Ca^{2+} (GeNL(Ca^{2+}))を開発していた[3]。GeNL(Ca^{2+})は、主に Ca^{2+} 濃度の低い細胞質等でのイメージングに適した高親和性のセンサーであったため、小胞体等の高 Ca^{2+} 濃度の細胞内小器官でのイメージングには、新たな低親和性のセンサーが必要とされていた。また、異なる Ca^{2+} 濃度レンジの細胞内小器官でのイメージングを同時取得するためには、それぞれの Ca^{2+} 濃度レンジのセンサーに対して異なる発光色を割り当てて多色イメージングする必要があった。そこで、本研究では GeNL(Ca^{2+}) 中の FRET アクセプター蛍光タンパク質の異なる色への置換と Ca^{2+} センシングドメインへの親和性を低下させる変異導入を行い、 Ca^{2+} 濃度の高い小胞体内でのイメージングを行うことのできる低親和性のシアン色生物発光 Ca^{2+} センサー CeNL(Ca^{2+})を開発した[4]。さらに、細胞質、小胞体の中間の親和性を持つ橙色生物発光 Ca^{2+} センサー OeNL(Ca^{2+})を開発した(図2)。そして、高親和性の GeNL(Ca^{2+})、中程度の親和性の OeNL(Ca^{2+})、低親和性の CeNL(Ca^{2+})を共に用いた多色生物発光イメージングを行うことにより、 Ca^{2+} 濃度レンジの異なる核、細胞質、小胞体内の Ca^{2+} 濃度変化を1細胞内で観測することに成功した(図3)。これらのセンサーによる、マルチカラー・マルチ Ca^{2+} レンジの生物発光イメージングは、 Ca^{2+} を介したオルガネラ間のコミュニケーションの解明に貢献することが期待される。

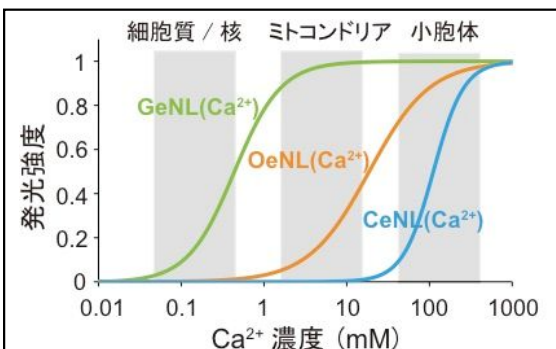


図2 Ca^{2+} 親和性および発光波長の異なる eNL(Ca^{2+}) の Ca^{2+} タイトレーションカーブ。

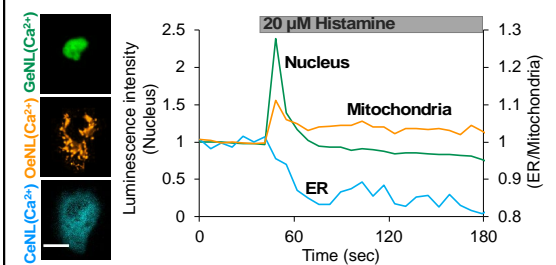


図3 (左) 各細胞内小器官に局在化させた eNL(Ca^{2+}) 親和性・色変異体。スケールバー: 10 μm 。(右) 各細胞内小器官でのヒスタミン刺激によるシグナル変化。

(3) 蛍光・生物発光バイモーダルカルシウムセンサーの開発

細胞内の Ca^{2+} 動態を可視化するために、蛍光および生物発光性の遺伝的にコードされた Ca^{2+} 指示薬 (GECI) が開発されている。これらを用いたイメージングには、それぞれの光化学的性質に起因した制約がある。蛍光 GECI では単一細胞内での高い空間的・時間的分解能でのイメージングを得ることができるが、光褪色、光毒性、および自家蛍光を引き起こす可能性がある外部からの励起光の照射を必要とするため、長期間のイメージングや個体でのイメージングには適さない。一方、外部からの照射を必要としない生物発光イメージングは、励起光に起因する制約を受けず、さらに機能制御のために光を用いる光遺伝学ツールとの親和性も高い。しかし、生物発光のシグナル強度は弱いため時空間分解能は蛍光に比べて劣ってしまう。これらの2つのモードの弱点を補った GECI を目指して、我々は1分子型の蛍光タンパク質性 GECI と分割生物発光タンパク質とを組み合わせたバイモーダル Ca^{2+} 指示薬 GLICO (Green Luminescent Indicator for Calcium Observation)を開発した[5](図4)。GLICOを用いて、比較的広範囲で長期間に渡るイメージン

グを生物発光モードで、1細胞レベルで短時間に起こる速いイメージングを蛍光モードで取得すれば、同一試料で蛍光センサーと発光センサーのそれぞれの利点を受したトランススケールのイメージングを行うことができる。GLICOで行う幅広い時空間でのイメージングから、単一モードでは得られない新たな知見が得られることが期待される。

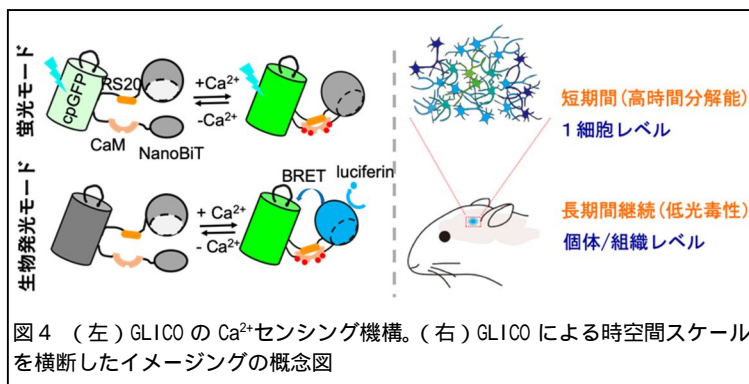


図4 (左) GLICO の Ca^{2+} センシング機構。(右) GLICO による時空間スケールを横断したイメージングの概念図

(4) 緑色光増感蛍光蛋白質の開発

光照射により活性酸素種を発生する光増感蛍光タンパク質は、タンパク質や細胞の時空間的な不活性化に利用することができるため、それらを用いた機能破壊の影響を解析するによりタンパク質機能、細胞内シグナル伝達経路、細胞間相互作用などの理解の手がかりを得ることができる。光増感物質の活性酸素種の産生は特定の波長の光の照射で起こるため、光増感蛍光タンパク質の波長変異体を用いることにより、複数要素の独立した不活性化が達成可能である。そこで、既存の光増感赤色蛍光タンパク質 SuperNova (SNR) を元に緑色の変異体 SuperNova Green (SNG) を開発した[6]。

SNG は青色光の照射により活性酸素種を発生した(図5、左)。活性酸素指示薬や抗酸化物質を用いた解析により、SNG は活性酸素種のうちのスーパーオキシドおよびその誘導体を主に産生し、一重項酸素に関しては有意な産生がみられないことを明らかにした。また、SNG を用いた光刺激による光増感反応により phospholipase C の PH ドメインの機能破壊、HeLa 細胞への細胞死の誘導が引き起こされることを示した。さらに、二種類の要素の時空間的制御への応用の可能性を示すため、緑色光照射により活性酸素種を産生する SNR と併用することにより、個々のタンパク質や細胞に対する機能破壊や細胞死の誘導を独立に引き起こすことにも成功した(図5、右)。SNG により光増感蛍光タンパク質の応用の可能性が広がり、複数要素の時空間的な機能破壊から様々な生理現象に対する新たな機能メカニズムが解明されることが期待される。

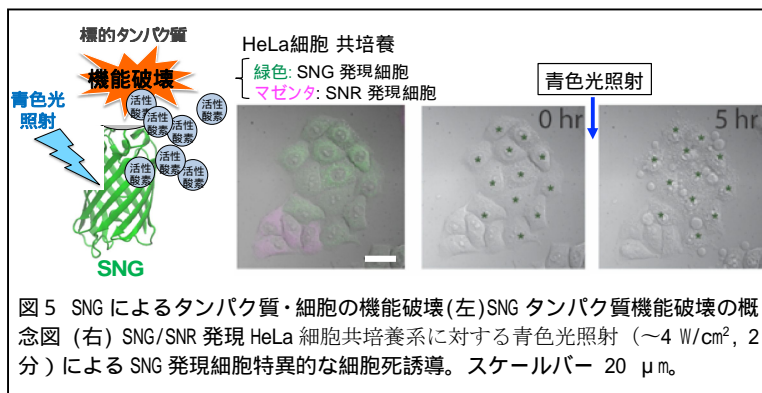


図5 SNG によるタンパク質・細胞の機能破壊(左)SNG タンパク質機能破壊の概念図(右) SNG/SNR 発現 HeLa 細胞共培養系に対する青色光照射 ($\sim 4 \text{ W/cm}^2$, 2分) による SNG 発現細胞特異的な細胞死誘導。スケールバー 20 μm 。

(5) カドヘリン相互作用センサーの開発

脳発生過程で移動する神経細胞の N-カドヘリンを介した相互作用を可視化するセンサーを開発した。シナプス結合の検出には、分割した GFP の再構成を利用した検出法 (GRASP 法) が用いられてきたが、蛍光発色団の形成に数時間を要して観察がリアルタイムで行うことができ無上に再構成が不可逆的であるため、移動する細胞間の相互作用の観察に適さないものであった。そこで、2量体形成により可逆的に蛍光を出現させることのできる ddGFP (dimerization-dependent green fluorescent protein) を利用したセンサーを開発した。ヘテロ二量体を形成する2種類の異なる ddGFP 要素 ddGFP-A と ddGFP-B の片方ずつを細胞外ドメインに挿入した N-カドヘリンを作製し、それぞれを異なる細胞に発現させて共培養して観察したところ、隣り合う ddGFP-A 発現細胞と ddGFP-B 発現細胞の結合表面で特異的に蛍光シグナルが観察された。しかし、観察において異なる ddGFP を発現する細胞が隣り合う配置を示すのは確率的で、任意の位置での相互作用の観察のためには不都合である。そこで、ddGFP-A と ddGFP-B を共発現する細胞が、隣接した場合に相互作用特異的にシグナルを発するかどうかの検証を行い、共発現させた場合においても細胞間の相互作用を有意に検出できることを確認した。さらに、キレート剤により N-カドヘリン相互作用に必須の Ca^{2+} を取り去って細胞間隔を離れた場合に時間依存的にシグナル減衰が観測されたことから、相互作用検出の可逆性が示された。開発したプローブを用いて、これまでに、神経初代培養細胞間の相互作用の観測(計画班 仲嶋班と共同)、多細胞からなるオルガノイド内での細胞間相互作用の2光子顕微鏡観察(計画班 永楽班と共同)に成功した。

また、N-カドヘリンとは結合様式の異なるプロトカドヘリンの相互作用を検出するセンサーを開発した。脳神経系においては、個々の神経細胞ごとに異なるアイソフォームの細胞表面タンパク質クラスター型プロトカドヘリン (cPcdh) が発現しており、同一アイソフォームの cPcdh 同士のみが細胞接着活性を持っていることが知られている。そして、cPcdh は神経回路形成等で重要

な神経の自己認識に関わっていることが示唆されている。そのメカニズムを探るために有効な分子間 FRET を利用した cPcdh 接着センサーを開発し、同一 cPcdh を発現する細胞間での接着の可逆的なイメージングに適用できることを示した[7]。

その他に、メカニカルストレス応答分子 YAP のリン酸化状態を可視化するプローブのプロトタイプを作製し、計画班影山班、公募班佐々木班に配布して評価を依頼した。

<引用文献> _

- [1] Hasegawa J et al., Autophagosome-lysosome fusion in neurons requires INPP5E, a protein associated with Joubert syndrome, *EMBO J.* 2016;35(17):1853-1867.
- [2] Shinoda H et al., Acid-Tolerant Monomeric GFP from *Olindias Formosa*, *Cell Chem Biol.* 2018;25(3):330-338.e7.
- [3] Suzuki K et al., Five colour variants of bright luminescent protein for real-time multicolour bioimaging, *Nat Commun.* 2016;7:13718.
- [4] Hossain MN et al., Bioluminescent Low-Affinity Ca²⁺ Indicator for ER with Multicolor Calcium Imaging in Single Living Cells, *ACS Chem Biol.* 2018;13(7):1862-1871.
- [5] Farhana I et al., Genetically Encoded Fluorescence/Bioluminescence Bimodal Indicators for Ca²⁺ Imaging, *ACS Sens.* 2019;4(7):1825-1834.
- [6] Riani YD et al., Green monomeric photosensitizing fluorescent protein for photo-inducible protein inactivation and cell ablation, *BMC Biol.* 2018;16(1):50.
- [7] Kanadome T et al., Development of FRET-based indicators for visualizing homophilic trans interaction of a clustered protocadherin, *Sci Rep.* 2021;11(1):22237.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 14件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Kanadome Takashi、Hoshino Natsumi、Nagai Takeharu、Matsuda Tomoki、Yagi Takeshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Development of FRET-based indicators for visualizing homophilic trans interaction of a clustered protocadherin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 22237(10頁)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-01481-2	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 Hossain Md Nadim、Ishida Ryuichi、Hattori Mitsuru、Matsuda Tomoki、Nagai Takeharu	4. 巻 20
2. 論文標題 Bioluminescent Ratiometric Indicator for Analysis of Water Hardness in Household Water	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sensors	6. 最初と最後の頁 3164～3164
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/s20113164	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 松田知己、永井健治	4. 巻 4
2. 論文標題 多色の光増感蛍光タンパク質を用いた複数機能の個別破壊	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 61-65
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 松田 知己、永井 健治	4. 巻 52
2. 論文標題 光増感蛍光タンパク質を用いた多色機能破壊	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月刊 細胞	6. 最初と最後の頁 93-96
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Thasaneeya Kuboki, Hiroyuki Ebata, Tomoki Matsuda, Yoshiyuki Arai, Takeharu Nagai, Satoru Kidoaki	4. 巻 45
2. 論文標題 Hierarchical Development of Motile Polarity in Durotactic Cells Just Crossing an Elasticity Boundary	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 33-43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.19040	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 Ryosuke Oketani, Haruka Suda, Kumiko Uegaki, Toshiki Kubo, Tomoki Matsuda, Masahito Yamanaka, Yoshiyuki Arai, Nicholas I. Smith, Takeharu Nagai, Katsumasa Fujita	4. 巻 25
2. 論文標題 Visible-wavelength two-photon excitation microscopy with multifocus scanning for volumetric live-cell imaging	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JOURNAL OF BIOMEDICAL OPTICS	6. 最初と最後の頁 014502 (5項)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1117/1.JBO.25.1.014502	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 Hajime Shinoda, Kai Lu, Ryosuke Nakashima, Tetsuichi Wazawa, Kosuke Noguchi, Tomoki Matsuda, and Takeharu Nagai	4. 巻 26
2. 論文標題 Acid-Tolerant Reversibly Switchable Green Fluorescent Protein for Super-resolution Imaging under Acidic Conditions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1469-1479.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chembiol.2019.07.012	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 Israt Farhana, Md Nadim Hossain, Kazushi Suzuki, Tomoki Matsuda, Takeharu Nagai	4. 巻 4
2. 論文標題 Genetically encoded fluorescence/bioluminescence bimodal indicators for Ca ²⁺ imaging	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Sensors	6. 最初と最後の頁 1825-1834
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssensors.9b00531	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 Hossain Md Nadim、Suzuki Kazushi、Iwano Megumi、Matsuda Tomoki、Nagai Takeharu	4. 巻 13
2. 論文標題 Bioluminescent Low-Affinity Ca ²⁺ Indicator for ER with Multicolor Calcium Imaging in Single Living Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1862 ~ 1871
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.7b01014	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 Riani Yemima Dani、Matsuda Tomoki、Takemoto Kiwamu、Nagai Takeharu	4. 巻 16
2. 論文標題 Green monomeric photosensitizing fluorescent protein for photo-inducible protein inactivation and cell ablation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Biology	6. 最初と最後の頁 50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12915-018-0514-7	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 Hara-Kuge Sayuri、Nishihara Tomonobu、Matsuda Tomoki、Kitazono Tomohiro、Teramoto Takayuki、Nagai Takeharu、Ishihara Takeshi	4. 巻 13
2. 論文標題 An improved inverse-type Ca ²⁺ indicator can detect putative neuronal inhibition in <i>Caenorhabditis elegans</i> by increasing signal intensity upon Ca ²⁺ decrease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0194707
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0194707	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 Suzuki Kazushi、Onishi Takahito、Nakada Chieko、Takei Shunsuke、Daniels Matthew J.、Nakano Masahiro、Matsuda Tomoki、Nagai Takeharu	4. 巻 11
2. 論文標題 Uninterrupted monitoring of drug effects in human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes with bioluminescence Ca ²⁺ microscopy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Research Notes	6. 最初と最後の頁 313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13104-018-3421-7	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 該当する

1. 著者名 Arai Yoshiyuki, Takauchi Hiroki, Ogami Yuhei, Fujiwara Satsuki, Nakano Masahiro, Matsuda Tomoki, Nagai Takeharu	4. 巻 13
2. 論文標題 Spontaneously Blinking Fluorescent Protein for Simple Single Laser Super-Resolution Live Cell Imaging	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1938 ~ 1943
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.8b00200	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 Agetsuma Masakazu, Matsuda Tomoki, Nagai Takeharu	4. 巻 64
2. 論文標題 Methods for monitoring signaling molecules in cellular compartments	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Calcium	6. 最初と最後の頁 12 ~ 19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ceca.2016.12.002	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 Shinoda Hajime, Ma Yuanqing, Nakashima Ryosuke, Sakurai Keisuke, Matsuda Tomoki, Nagai Takeharu	4. 巻 25
2. 論文標題 Acid-Tolerant Monomeric GFP from <i>Olindias formosa</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 330 ~ 338.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chembiol.2017.12.005	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 Maeshima Kazuhiro, Matsuda Tomoki, Shindo Yutaka, Imamura Hiromi, Tamura Sachiko, Imai Ryosuke, Kawakami Syoji, Nagashima Ryosuke, Soga Tomoyoshi, Noji Hiroyuki, Oka Kotaro, Nagai Takeharu	4. 巻 28
2. 論文標題 A Transient Rise in Free Mg ²⁺ Ions Released from ATP-Mg Hydrolysis Contributes to Mitotic Chromosome Condensation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 444 ~ 451.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2017.12.035	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24件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Tomoki Matsuda
2. 発表標題 Development of fluorescent indicators for visualization of N-cadherin interaction across cells
3. 学会等名 The International Symposium on Development and Plasticity of Neural Systems (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松田知己
2. 発表標題 蛍光タンパク質の基本的性質と多角的な利用 / X-Light V2を用いたSRRF超解像イメージング
3. 学会等名 Imaging Bootcamp, 北海道大学大学院医学研究院 細胞生理学教室 主催、文部科学省科学研究費助成事業学術変革領域研究(A)「物質共生」共済 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田 知己、永井 健治
2. 発表標題 ライブイメージング・操作のための高機能蛍光タンパク質の開発
3. 学会等名 レーザー学会 学術講演会 第41回年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hajime Shinoda, Ryosuke Nakashima, Tetsuichi Wazawa, Kosuke Noguchi, Tomoki Matsuda, Takeharu Nagai
2. 発表標題 Acid-resistant Reversibly Switchable Green Fluorescent Protein for Super-resolution Imaging in Acidic Environments
3. 学会等名 Focus on Microscope, London, United Kingdom (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yemima Dani Riani, 松田 知己, 竹本 研, 永井 健治
2. 発表標題 光刺激によりタンパク質機能阻害・細胞死を誘導する単量体光増感緑色蛍光タンパク質
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会, 神戸国際会議場
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoki Matsuda, Yemima Dani Riani, Kiwamu Takemoto, Takeharu Nagai
2. 発表標題 Monomeric green fluorescent protein based photosensitizer for photo-inducible protein inactivation and cell death
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会, 宮崎県・シーガイアコンベンションセンター
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hajime Shinoda, Kai Lu, Ryosuke Nakashima, Tetsuichi Wazawa, Kosuke Noguchi, Tomoki Matsuda, Takaharu Nagai
2. 発表標題 Acid-tolerant Reversibly Switchable Green Fluorescent Protein for Super-resolution Imaging in Acidic Conditions
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会, 宮崎県・シーガイアコンベンションセンター
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kai Lu, Tomoki Matsuda, Tetsuichi Wazawa, Takeharu Nagai
2. 発表標題 Fluorescent Ca ²⁺ indicators for multiplexed super-resolution imaging at nanoscopic cellular domain
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会, 宮崎県・シーガイアコンベンションセンター
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoki Matsuda, Yenima Dani Riani, Kiwamu Takemoto, Takeharu Nagai
2. 発表標題 Photosensitizing green fluorescent protein for photo-inducible protein inactivation and cell death Presenter
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会, 福岡国際会議場
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoki Matsuda, Israt Farhana, Kazhshi Suzuki and Takeharu Nagai
2. 発表標題 A bimodal bioluminescent Ca ²⁺ indicator toward spatiotemporally-scalable imaging
3. 学会等名 SPIE. PHOTONICS WEST BIOS, The Moscone Center San Francisco, United States (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Israt Farhana, Kazushi Suzuki, Tomoki Matsuda, Takeharu Nagai
2. 発表標題 Bimodal Ca ²⁺ indicator toward spatiotemporally-scalable imaging
3. 学会等名 生理学研究所研究会, 生理学研究所
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomoki Matsuda
2. 発表標題 Fluorescent and Bioluminescent Protein Based Probes for Visualization of Biological events
3. 学会等名 24th iCeMS International Symposium, iCeMS Kyoto University (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松田 知己
2. 発表標題 蛍光タンパク質とハサミは使いよう
3. 学会等名 日本化学会生体機能関連化学部会若手の会, ANA ホリデイ・イン リゾート 宮崎 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松田 知己
2. 発表標題 ライブイメージングツール開発のための蛍光・生物発光蛋白質工学
3. 学会等名 第18回 日本蛋白質科学会年会, 朱鷺メッセ
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松田 知己、藤原 沙都姫、永井 健治
2. 発表標題 光スイッチング Ca ²⁺ 指示薬 -超解像機能イメージングを目指して-
3. 学会等名 生理学研究所研究会「シグナル動態の可視化と操作に基づく多階層機能解析の新展開」, 生理学研究所
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 篠田 肇、Yuanqing Ma、中島 良介、櫻井 啓介、松田 知己、永井 健治
2. 発表標題 酸性オルガネラ内機能イメージングのための、耐酸性GFP の開発
3. 学会等名 生理学研究所研究会「シグナル動態の可視化と操作に基づく多階層機能解析の新展開」, 生理学研究所
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nadim H、鈴木 和志、岩野 恵、松田 知己、永井 健治
2. 発表標題 Development of chemiluminescent low affinity Ca ²⁺ indicators applicable to analyzing Ca ²⁺ dynamics in endoplasmic reticulum
3. 学会等名 生理学研究所研究会「シグナル動態の可視化と操作に基づく多階層機能解析の新展開」, 生理学研究所
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 篠田 肇、Ma Yuanqing、中島 良介、櫻井 啓介、松田 知己、永井 健治
2. 発表標題 ハナガサクラゲ由来の耐酸性・単量体型GFP
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会, 熊本大学
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nadim H, Suzuki K, Iwano M, Matsuda T, Nagai T.
2. 発表標題 Multicolor Bioluminescent Calcium Imaging Across Three Orders of [Ca ²⁺] Magnitude in Single Living Cells
3. 学会等名 20th International Symposium on Calcium Binding Proteins and Calcium Function in Health and Disease, Awaji Yumebutai
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Matsuda T, Nagai T.
2. 発表標題 Fluorescent/Bioluminescent Protein-Based Ca ²⁺ Probes and Photo Manipulation for Imaging of Physiological Functions
3. 学会等名 20th International Symposium on Calcium Binding Proteins and Calcium Function in Health and Disease, Awaji Yumebutai (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松田 知己、永井 健治
2. 発表標題 生理機能イメージングのための蛍光・発光タンパク質を用いたCa ²⁺ プローブと光操作
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸ポートアイランド
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Mai Ashitani, Kazushi Suzuki, Tomoki Matsuda and Takeharu Nagai
2. 発表標題 Development of Chemiluminescent Ca ²⁺ Indicators with Expanded Dynamic Range
3. 学会等名 The 20th ISIR International Symposium "Molecular Technology Frontiers towards IoT World" (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Hajime Shinoda, Yuanqing Ma, Ryosuke Nakashima, Keisuke Sakurai, Akihito Yamaguchi, Tomoki Matsuda, Takeharu Nagai
2. 発表標題 Acid resistant monomeric GFP derived from <i>Olinidias formosa</i>
3. 学会等名 The 20th ISIR International Symposium "Molecular Technology Frontiers towards IoT World" (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Nadim Hossain, Kazushi Suzuki, Megumi Iwano, Tomoki Matsuda and Takeharu Nagai
2. 発表標題 Development of Bioluminescent Low Affinity Ca ²⁺ Indicators Applicable to Analysis of Ca ²⁺ Dynamics in Endoplasmic Reticulum
3. 学会等名 The 20th ISIR International Symposium "Molecular Technology Frontiers towards IoT World" (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 監修：澤田 嗣郎 編集：小澤 岳昌、北森 武彦、中村 洋、藤浪 真紀、宮村 一夫、石丸 洋 一郎、浦野 泰照、加地 範匡、坂 真智子、鈴木 茂、瀬藤 光利、宗林 由樹、馬場 嘉信、船津 公人、本 田 暁紀、末 永 智一、宮野 博、本山 晃	4. 発行年 2022年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 1072
3. 書名 先端の分析法 第2版 / 永井 健治, 松田 知己, 鈴木 和志, 篠田 肇, タンパク質プローブ, pp.317-323	

1. 著者名 Editor: Eli Zamir	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Humana, New York, NY	5. 総ページ数 343
3. 書名 Multiplexed Imaging Methods in Molecular Biology / Kazushi Suzuki, Md Nadim Hossain, Tomoki Matsuda, Takeharu Nagai, Multicolor Bioluminescence Imaging of Subcellular Structures and Multicolor Calcium Imaging in Single Living Cells, pp 229-237	

1. 著者名 Editors: Hiromu Yawo, Hideki Kandori, Amane Koizumi, Ryoichiro Kageyama	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer, Singapore	5. 総ページ数 663
3. 書名 Advances in Experimental Medicine and Biology, Optogenetics / Yemima Dani Riani, Tomoki Matsuda, Takeharu Nagai, Genetically Encoded Photosensitizer for Destruction of Protein or Cell Function, pp 265-279	

1. 著者名 Editor: Sung-Bae Kim	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Humana, New York, NY	5. 総ページ数 447
3. 書名 Live Cell Imaging Methods in Molecular Biology / Mitsuru Hattori, Tomoki MatsudaTakeharu Nagai, Method for Detecting Emission Spectral Change of Bioluminescent Ratiometric Indicators by a Smartphone, Chapter 25, pp295-304	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 水の硬度の測定	発明者 永井健治、ホサイン ナディム エムディ、 石田竜一、松田知己	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-6110	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 蛍光タンパク質	発明者 永井健治、篠田肇、 松田知己、マユアン キン	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特許第6762069号（日本）、10899804号（米国）	取得年 2020年	国内・外国の別 外国

〔その他〕

発光・蛍光タンパク質プローブの開発 耐酸性・単量体型緑色蛍光タンパク質Gamiillusの開発 https://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/bse/fluorescentprotein.html
--

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------