

平成21年 5月19日現在

研究種目：若手研究（A）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18687014
 研究課題名（和文）少数分子による自己組織化過程の生体機能シグナル可視化による解析
 研究課題名（英文） Elucidation of self-organization process in living organism by small number of molecules using functional imaging
 研究代表者
 永井健治（NAGAI TAKEHARU）
 北海道大学電子科学研究所 教授
 研究者番号：20311350

研究成果の概要：

本研究は細胞性粘菌のcAMPに対する走化性の分子過程を可視化することで、細胞がゆらぎと同じレベルの濃度勾配の中で、その勾配の方向を的確に認識し、運動する方向を決定する仕組みを解明することを目的とした。その為に、タンパク質性Ca²⁺センサーであるカメレオンYC3.60のCa²⁺センシングドメインにアミノ酸変異を導入することで、これまで報告された如何なるCa²⁺センサーよりもCa²⁺に対して高い親和性(Kd=20nM)を持つ、つまり超高感度なCa²⁺センサーcameleon ZEROを開発した。驚いたことにこのセンサーを発現させた細胞性粘菌は野生型同様に分裂増殖することから内在のCa²⁺キレート効果による細胞毒性は無いと考えられた。この細胞株を用いて集合体形成時におけるカルシウム動態の観察を行ったところ、BZ(ペルーゾフ・ジャボチンスキー)反応様のスパイラルおよびターゲットパターンのみならず、時空間的にランダムに発火するカルシウム動態を観察することに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	18,800,000	5,640,000	24,440,000
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
年度			
総計	23,400,000	7,020,000	30,420,000

研究分野：生物物理

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：シグナル伝達、イメージング、顕微鏡、FRET、自己組織化

1. 研究開始当初の背景

分子生物学の進展に伴い生体内で機能する各々の分子の性質が明らかになってきた。しかしながら、それらが多数組み合わせたシステムにおける動的状態(時空間構造)がどのようにして生み出されているのか全く分かっていない。時空間パターンの形成等、生命現象を再現するような数理モデルを構築あるいは利用する研究も行われているが、マイクロ(ナノ)な分子論とマクロ

な形態形成をつなげるウェット研究は極めて少ない。生物学におけるナノ(分子機能動態)とマクロ(時空間構造)を結びつける鍵として、また生物が人工機械と根本的に異なる特徴として“少数分子による自己組織化能”が挙げられる。何故なら、細胞内に存在する各種のタンパク質分子の数は数個から数千個のオーダーであり、熱ゆらぎも考慮するとある部位における各タンパク質分子の“濃度”はかなり大きなゆらぎを持つこと

になり「ゆらぎの多い確率的な情報入力から安定した出力(構造や挙動)がアウトプットされる」生物的特長は単純な機械論では説明できないからである。このような生物学的問題は古くから研究なされており、中でも細胞性粘菌の cAMP に対する走化性については、“平均濃度が 10pM から 1mM の cAMP に反応する”ことや、“細胞長に対し数%の濃度勾配を見分けることができる”ことなど多くの知見が蓄積されてきた。このような観察結果から例えば cAMP の平均濃度が 1nM 程度で濃度勾配を2%と仮定すると、細胞周囲に存在するcAMPの数は300個程度で、濃度勾配に沿った細胞前後における分子数は10個程度と算出される。統計論的には300個のシグナルが持つノイズはその標準偏差として表されるため、およそ17程度のノイズを含むことになるが、これは細胞前後における分子数の差である10よりも大きい。従って、細胞性粘菌はノイズに埋もれたシグナルを検出し、cAMP の濃度の高い方向に移動することができると考えられ、「ゆらぎの多い確率的な情報入力から安定した出力(構造や挙動)がアウトプットされる」原理を探求するための優れたモデルとして研究に使われてきた。

2. 研究の目的

本研究は生物的情報(機能)が空間的・時間的にどのように流れて行くのかを分子レベルでリアルタイムに可視化する顕微鏡を構築し、細胞性粘菌の cAMP に対する走化性を観察対象として、cAMP の受容によって誘起される細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を細胞運動と共に可視化することで、細胞の刺激受容と形態変化の間に潜む基本原理を探索を行い、少数分子による自己組織化能の秘密に迫ることを目的とした。

3. 研究の方法

シアン色蛍光タンパク質(CFP)と黄色蛍光タンパク質(YFP)間の FRET を利用した Ca^{2+} 指示薬 *cameleonYC3.60* (Nagai T. et al PNAS 2004) の Ca^{2+} センシング部分に変異を導入することにより、 Ca^{2+} に対する親和性が高い、高感度の Ca^{2+} センサーを開発し、それを安定的に発現する細胞性粘菌を作成した。この細胞性粘菌が栄養の枯渇をきっかけにして作り出す同心円波や螺旋波の走化性集合パターンを微分干渉観察と蛍光観察を併用して行うことで、細胞運動と集合全体が示す Ca^{2+} 動態を同時に捉えることで、 Ca^{2+} 波や Ca^{2+} 発火と形態形成の関係を調べた。

4. 研究成果

走化性シグナルの時空間分布を明らかにするため、cAMP 刺激に伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化に注目した。多くの真核細胞同様、粘菌細胞の Ca^{2+} は静止期では 50nM 以下に保たれるが、cAMP 刺激応答時には 30 秒以内に最大 150nM 程度まで上昇することが知られている。この微弱

な Ca^{2+} 応答をイメージングにより検出するため、遺伝子にコードされた Ca^{2+} センサーである *cameleonYC3.60* (Nagai T. et al 2004) の Ca^{2+} センシングドメインに変異を導入した。その結果、これまでに世界中で開発されてきた Ca^{2+} の中でずば抜けて高い ($K_d=20nM$) 超高感度 Ca^{2+} センサー *cameleonZERO* を作成することに成功した。この *cameleonZERO* を用いて、飢餓後 6-7 時間に同心円波の集合パターンを示す細胞集団の Ca^{2+} イメージングを行った。ペースメーカー領域から少なくとも 15 回以上にわたって安定な集合波が生じており、この間、周期と伝播速度はそれぞれ 4.3 分と約 $80 \mu m/分$ に安定に保たれた。同様の結果は細胞内 Ca^{2+} 濃度の変動パターンからも得られるが、興味深いことに同心円状の集合パターンとは一致しない一過的な Ca^{2+} 濃度の上昇が多数見いだされた。その形は直径が 5-10 細胞におよぶ真円形で、発火頻度は集合流あたり $21 \pm 2.3 \text{ plse}/10\text{min}$ であった。この一過的な Ca^{2+} の上昇には 1) 時間的にも空間的にも分布はランダムで周期性は認められないこと、2) 集合流における Ca^{2+} 振動とは波形が異なる、という二つの特徴が見いだされた。また確率的な Ca^{2+} 発火は明確な集合流が生じる前から見いだされ、その頻度は飢餓後 3 から 6 時間までは変化しなかったが、7 時間以後には $1.4 \pm 0.3 \text{ plse}/10\text{min}$ にまでおおしく減少した。

本研究では超感度 Ca^{2+} センサーを利用したライブイメージングにより、走化性集合流を作り出す約 1 万個の粘菌細胞集団内にはランダムな Ca^{2+} 発火がかなり高い頻度で存在することが見いだされた。興奮性媒質において、伝播する化学振動波とノイズとなりうるランダムな発火とは相性が悪い。ランダムな発火が伝播する波と相互作用することで容易に螺旋波が生じ、さらに過剰なランダム発火は集合パターンを乱流化する可能性すらあるからである。今回興奮性媒質である細胞性粘菌の集合流においては、これら二つの発火が長時間にわたって共存できることがあきらかになった。この結果は、細胞性粘菌ではランダムな Ca^{2+} 発火の影響が平面波には伝わらないようにする特別な機構があることを示唆している。詳細な分子機構は今後の研究課題である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 2 件)

- ① Tomosugi W, Matsuda T, Tani T, Nemoto T, Kotera I, Saito K, Horikawa K & Nagai T. An ultramarine fluorescent protein with increased photostability and pH insensitivity. *Nature Methods* 6: 351-353, 2009, 査読有
- ② Yamamoto T, Kumagai T, Saito K & Nagai T. Two-photon excitation behavior of thiophene-based oligomers and a polymer. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 9:

- 670-672, 2009, 査読有
- ③ 永井健治「光スイッチング蛍光蛋白質を用いた超解像観察法」*分光研究* 58:7-9, 2009, 査読有
- ④ 小寺一平、永井健治「ワンステップ全自動プラスミド構築法」*細胞工学* 28:402-407, 2009, 査読無
- ⑤ 永井健治「蛍光タンパク質開発秘話-Pericam-」*蛋白質 核酸 酵素* 53:1858-1864, 2009, 査読無
- ⑥ Saito K, Kobayashi K, Tani T & Nagai T. A mercury arc lamp-based multi-color confocal real time imaging system for cellular structure and function.*Cell Struct Funct.* 33: 133-141, 2008, 査読有
- ⑦ Kotera I & Nagai T. A high-throughput and single-tube recombination of crude PCR products using a DNA polymerase inhibitor and type IIS restriction enzyme.*J. Biotechnol.* 137: 1-7, 2008, 査読有
- ⑧ 永井健治、松田知己「光変換蛍光タンパク質を用いた生体分子の動態解析法」*実験医学*, 26:156-162, 2008, 査読無
- ⑨ 松田知己、永井健治「新規の光変換蛍光蛋白質プローブを用いた生体イメージングと動態解析」*蛋白質 核酸 酵素*, 53:1858-1864, 2008, 査読無
- ⑩ 松田知己、永井健治「光活性化・光変換蛍光タンパク質を用いたタンパク質動態解析」*バイオインダストリー*, 25:21-26, 2008, 査読無
- ⑪ Matsuda T, Miyawaki A & Nagai T. Direct measurement of protein dynamics inside cells using a rationally designed photoconvertible protein. *Nature Methods* 5:339-345, 2008, 査読有
- ⑫ Sunabori T, Tokunaga A, Nagai T, Sawamoto K, Okabe M, Miyawaki A, Matsuzaki Y, Miyata T & Okano H. Cell-cycle-specific nestin expression coordinates with morphological changes in embryonic cortical neural progenitors. *J Cell Sci.* 121:1204-1212, 2008, 査読有
- ⑬ Takemoto K, Kuranaga E, Tonoki A, Nagai T, Miyawaki A & Miura M. Local initiation of caspase activation in *Drosophila* salivary gland programmed cell death in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:13367-13372, 2007, 査読有
- ⑭ 永井健治「蛍光イメージング—最近の進歩:回折限界の壁を越える工夫—」*病理と臨床*, 25, 514-519, 2007, 査読無
- ⑮ 齊藤健太、谷知己、小林健太郎、永井健治「大口径ファイバー白色光源を用いた高速共焦点顕微鏡の開発と評価」*顕微鏡*, 161-165, 2007, 査読有
- ⑯ Kazuno A, Munakata K, Nagai T, Shimozone S, Tanaka M, Yoneda M, Kato N, Miyawaki A & Kato T. Identification of mitochondrial DNA polymorphisms that alter mitochondrial matrix pH and intracellular calcium dynamics. *PLoS Genet.* 2: e128, 2006, 査読有
- ⑰ 永井健治「FRET の上手な使い方」*蛋白質 核酸 酵素*, 51:1989-1997, 2006, 査読無
- ⑱ 永井健治「電顕に期待するもの 4」*細胞工学*, 25:1192-1193, 2006, 査読無
- ⑲ 永井健治「HaloTag テクノロジーが拓く様々な蛍光イメージングの可能性」*バイオテクノロジージャーナル*, 6, 2006, 査読無
- ⑳ 永井健治「組織・個体レベルでの機能イメージングに向けて」*細胞工学*, 25:1010-1013, 2006, 査読無
- ㉑ 永井健治「今、蛍光蛋白質で何ができるか？」*生化学*, 78:759-763, 2006, 査読有
- ㉒ 永井健治「生細胞内ではたらく分子を可視化する」*Bionics*, 3:30-35, 2006, 査読無
- [学会発表] (計 3 1 件)
- ① 永井健治「Imaging biological functions by using FRET-based sensor proteins」ICCB2008, 2008.10.10 (韓国)
- ② Nagai T "Engineering fluorescent and bioluminescent proteins to visualize biological functions" NEWroscience2008, 2008.9.8 (de Sao Paulo university, Brazil)
- ③ Nagai T "Engineering fluorescent and bioluminescent proteins to visualize biological functions" IBRO (I Neurolatam), 2008.9.3 (Buzios, Brazil)
- ④ Nagai T "Direct measurement of protein dynamics in single living cells using a rationally designed photoconvertible fluorescent protein?" 第 60 回日本細胞生物学会大会, 2008.6.29 (パシフィコ横浜、横浜市)
- ⑤ Nagai T "Direct measurement of protein dynamics in living cells using a rationally designed photoconvertible fluorescent protein" NIPS-JST 国際ワークショップ, 2008.4.19(岡崎コンファレンスセンター、岡崎市)
- ⑥ Nagai T, W. Tomosugi, T. Matsuda, I. Kotera & K. Saito "Development of a fluorescent protein with deep blue color." FOM2008, 2008.4.14(兵庫県淡路島夢舞台国際会議場)

- ⑦ T. Matsuda & A. Miyawaki & Nagai T “Direct measurement of protein dynamics in single living cells using a rationally designed photo-convertible fluorescent protein” FOM2008, 2008.4.13(兵庫県淡路島夢舞台国際会議場)
- ⑧ 友杉亘、松田知己、小寺一平、斉藤健太、永井健治「群青色蛍光蛋白質の開発」日本生物物理学会第45回年会、2007.12.23(横浜)
- ⑨ 松田知己、宮脇敦史、永井健治「新規光色変換蛍光タンパク質による生細胞のタンパク質動態測定」平成19年度日本顕微鏡学会北海道支部学術講演会、2007.12.1(北海道大学)
- ⑩ 永井健治「合理的に設計した光変換蛍光タンパク質による生きた細胞内のタンパク質」光学会、2007.11.28(大阪)
- ⑪ 永井健治「イメージングの現在と未来」視る生物学2-イメージングの現在と未来-、2007.11.21(奈良)
- ⑫ Nagai T ”Engineering fluorescent and bioluminescent proteins to visualize biological functions” Annual Meeting of Korean Society for Molecular Biology and Biochemistry, 2007.10.19 (Seoul, Korea)
- ⑬ Nagai T ”Engineering fluorescent and bioluminescent proteins to visualize biological functions” The 5th International Forum on Post-Genome Technologies, 2007.9.10 (Shujo, China)
- ⑭ Nagai T ”Engineering fluorescent and bioluminescent proteins to visualize biological functions” The 2nd International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis , 2007.9.7 (Tokyo)
- ⑮ Nagai T ” Visualization of biological function by using FRET- and BRET-based indicator” APBP2007 3rd Asian and Pacific Rim Symposium on Biophotonics & Biophotonics Downunder II, 2007.7.11 (ケアンズ・オーストラリア)
- ⑯ 永井健治「蛍光・化学発光タンパク質を利用して何が出来るか？」生物発光化学発光研究会第25回学術講演会、2007.6.30(札幌)
- ⑰ Nagai T ”Various Applications of Fluorescent Proteins for Cell Biology” 16th Annual Meeting of the Korean Society for Smooth Muscle Research, 2007.6.16 (Seoul, Korea)
- ⑱ 松田知己、宮脇敦史、永井健治 「Phamret: 光活性化と蛍光エネルギー移動を利用した細胞生物学研究のための効果的な蛍光マーカー蛋白質」第7回日本蛋白質科学会年会、仙台国際センター、2007.5.25(仙台)
- ⑲ 永井健治「蛍光・化学発光タンパク質を利用した生細胞内のリアルタイム機能イメージング」第127回日本薬理学会、ヴォルフオートとやまホール、2007.3.30(富山)
- ⑳ 永井健治「蛍光・発光タンパク質を利用した生理機能センサーの開発とライブイメージング」第96回日本病理学会、2007.3.14(大阪国際会議場、大阪)
- ㉑ Tani T, Saito K & Nagai T “Single molecule imaging of nerve growth factor receptor trkA expressed in the growth cones of dorsal root ganglion explants” Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2006.11.12(Okinawa Convention Center, Okinawa, Japan)
- ㉒ Takemoto k, Nagai T “A genetically-encoded indicator for RNA in living cells” Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2006.11.13(Okinawa Convention Center, Okinawa, Japan)
- ㉓ Saito K, Nagai T “Ca²⁺ imaging of single living cell with bioluminescence resonance energy transfer (BRET)” Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2006.11.13(Okinawa Convention Center, Okinawa, Japan)
- ㉔ 永井健治「近未来的バイオイメージング技術の展望」第15回バイオイメージング学会、2006.11.2(岩手医科大学60周年記念館)
- ㉕ 永井健治 「蛍光・化学発光タンパク質を利用した生理機能イメージング」分子構造討論会2006、2006.9.20(グランシップ、静岡)
- ㉖ Nagai T “Development of FRET- and BRET-based functional indicators with expanded dynamic range” 16th International Microscopy Congress, 2006.9.5 (Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan)
- ㉗ 永井健治「蛍光分子を利用して生体機能と情報をはかる」生命をはかる研究会、2006.8.30(日本コンベンションセンター、幕張)

- ⑳ Nagai T “Vivid visualization of biological functions by using DNA-encodable indicators- Toward multifunctional imaging-“ 7th Joint Meeting of The Histochemistry Society & The Japan Society of Histochemistry and Cytochemistry, 2006.8.24 (Hilton Waikoloa Village, Big Island of Hawaii, USA)
- ㉑ Nagai T “Realtime imaging and manipulation of biological functions by fluorescent proteins” 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, 2006.6.21(Kyoto, Japan)
- ㉒ Nagai T “Molecular and cellular imaging of living organisms” 63rd KSBMB Annual Meeting, COEX, 2006.5.26 (Seoul, Korea)

〔図書〕 (計 1 1 件)

- ① 永井健治「発光性蛋白質を利用したバイオセンサーの開発」 **バイオとナノの融合 I** 新生命科学の基礎、北海道大学 COE 研究成果編集委員会(分担執筆)、第 8 章、97-113、北海道大学、2007
- ② Wei C, Nagai T, Wei W, Nemoto T, Awais M, Niwa O, Kurita R and Baba Y. “New advances in nanomedicine: diagnosis and preventive medicine. “ **Med Clin North Am.**, 91: 871-879, 2007
- ③ 永井健治「改変型蛍光タンパク質の利用」、67-78 **講義と実習 生細胞蛍光イメージング** 原口徳子、木村宏、平岡泰 編集(分担執筆)、共立出版、2007
- ④ 永井健治、小寺一平「共鳴エネルギー移動(FRET)の基礎」、110-117 **講義と実習 生細胞蛍光イメージング** 原口徳子、木村宏、平岡泰 編集(分担執筆)、共立出版、2007
- ⑤ 永井健治、斉藤健太「FRET の測定法と評価」、118-128 **講義と実習 生細胞蛍光イメージング** 原口徳子、木村宏、平岡泰 編集(分担執筆)、共立出版、2007
- ⑥ 斉藤健太、松田知己、原口徳子、永井健治「実習6 FRET」、268-277 **講義と実習 生細胞蛍光イメージング** 原口徳子、木村宏、平岡泰 編集(分担執筆)、共立出版、2007
- ⑦ 小寺一平、谷知己、永井健治「実習9 全反射顕微鏡」 291-297 **講義と実習 生細胞蛍光イメージング** 原口徳子、木村宏、平岡泰 編集(分担執筆)、共立出版、2007

- ⑧ 竹本研、永井健治、宮脇敦史、三浦正幸
「アポトーシスの検出」、143-146 **実験がうまくいく 蛍光・発光試薬の選び方と使い方** 三輪佳宏 編集(分担執筆)、羊土社、2007
- ⑨ 谷知己、永井健治「Column:スパイはひとりで充分」147 **実験がうまくいく 蛍光・発光試薬の選び方と使い方** 三輪佳宏 編集(分担執筆)、羊土社、2007
- ⑩ 小寺一平、永井健治「FRETプローブ」158-162 **実験がうまくいく 蛍光・発光試薬の選び方と使い方** 三輪佳宏 編集(分担執筆)、羊土社、2007
- ⑪ 永井健治「円順列 GFP 変異体を利用した機能プローブの作製法と2波長励起1波長取得共焦点イメージング」**実験医学別冊:染色・バイオイメージング実験ハンドブック (分担執筆)** 羊土社、210-215, 2006

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 3 件)

名称：組み換えDNAの調整法

発明者：永井健治、小寺一平

権利者：北海道大学

種類：特許

番号：特願 2007-215238

出願年月日：2007. 8. 21

国内外の別：国内および PCT

名称：群青色蛍光タンパク質

発明者：永井健治、友杉亘、松田知己

権利者：北海道大学

種類：特許

番号：特願 2007-203300

出願年月日：2007. 8. 3

国内外の別：国内および PCT

名称：DNA塩基配列を決定する方法

発明者：永井健治、谷知己、小寺一平、米田悦啓

権利者：北海道大学

種類：特許

番号：特願 2006-043211, PCT/JP2007/053461

出願年月日：2007. 2. 20

国内外の別：国内および PCT

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.es.hokudai.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 健治 (NAGAI TAKEHARU)

北海道大学・電子科学研究所・教授
研究者番号：20311350

(3)連携研究者

谷 知己 (TANI TOMOMI)
北海道大学・電子科学研究所・准教授
研究者番号：80332378

堀川 一樹 (HORIKAWA KAZUKI)
北海道大学・電子科学研究所・特任准教授
研究者番号：70420247