

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔令和5（2023）年度 中間評価用〕

令和5年3月31日現在

研究期間：2021～2025
課題番号：21H05041
研究課題名：蛍光タンパク質の「明るさ」と「光安定性」に関する革新的開発研究
研究代表者氏名（ローマ字）：宮脇 敦史（MIYAWAKI Atsushi）
所属研究機関・部局・職：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

研究の概要：

蛍光タンパク質技術分野において、明るさと光安定性の間にトレードオフがあると考えられてきた。研究代表者らが最近に作製した明るさと光安定性を兼ね備える蛍光タンパク質、StayGold をベースに、蛍光タンパク質の発現量を抑えたサンプルの調製および励起および照明を最適化した光学技術を総合することにより、真に生理的かつ定量的で再現性のあるバイオイメージング技術の確立を目指す。

研究分野：蛍光イメージング技術開発

キーワード：蛍光タンパク質、光安定性、超解像顕微鏡法

1．研究開始当初の背景

GFP が生命科学にデビューして四半世紀、蛍光タンパク質技術分野において、明るさと光安定性は両立しないと考えられてきた。これまで多くの変異体が明るさを追求して開発されてきたが、ほぼ全て光安定性を犠牲にした所産である。褪色は、定量性を重視する科学アプローチの敵である。褪色は、対象を明るく標識して観る場合にはあまり問題にならないが、導入蛍光分子の量に厳しい制限があると深刻な問題を生む。個々の実験に際して、明るさを追求するあまり、導入すべき蛍光タンパク質の量的制限の是非はあまり議論されてこなかった。明るさ偏重の蛍光タンパク質技術開発は反省期を迎えつつある。

2．研究の目的

研究代表者らが最近にクローニング・開発した新規蛍光タンパク質、StayGold をベースに、明るさと光安定性のトレードオフを打破した蛍光標識技術を実用的に開発する。明るく且つ光安定な StayGold によって、蛍光タンパク質の発現量を抑えたサンプルの調製が可能となる。StayGold と励起および照明を最適化した光学技術とを総合することにより、真に生理的かつ定量的で再現性のあるバイオイメージング技術の確立を目指す。

3．研究の方法

[革新的蛍光標識技術開発のための StayGold の改変]

革新的蛍光標識技術を開発すべく StayGold を分子生物学的に改変した。StayGold の蛍光タグ機能改善のための N 末端、C 末端の改変においては、StayGold 末端を他蛍光タンパク質（EGFP など）とのキメラとした。細胞内小器官の標識技術開発については、細胞内小器官（ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体など）へのターゲティングシグナルを付加した。

[StayGold の超解像観察への応用]

StayGold を哺乳類細胞のミトコンドリアや小胞体に発現量を抑えて発現させた。超解像顕微鏡法の 1 つである構造化照明顕微鏡法（SIM）によりそれぞれの細胞内小器官の 4 次元像を高い時空間分解能をもって再構成した。

4．これまでの成果

[StayGold の実用的な改変]

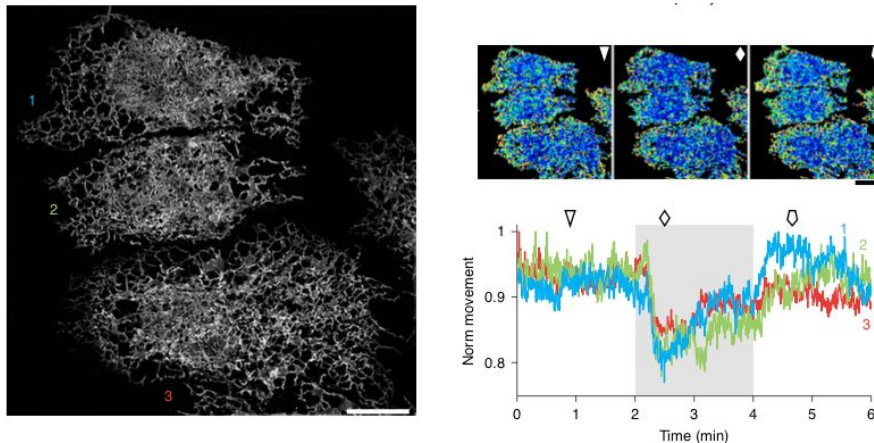
StayGold はこれまでに開発されている蛍光タンパク質と比較して桁違いの photostability を示したが、StayGold の N 末端、C 末端は短く、他機能タンパク質との融合タンパク質の作製にすると蛍光強度が著しく減少するという難点があった。オリジナルの StayGold のままでは、用途が細胞のラベリングやレポーター遺伝子としての利用などに限定される。数多くの N 末端、C 末端改変体を作製・スクリーニングすることにより、融合タンパク質作製可能な StayGold を開発することに成功した。StayGold 技術の実用的な改変に成功した。

[StayGold の超解像観察への応用]

StayGold と超解像顕微鏡法（SIM）を組み合わせることにより、細胞内小器官（ミトコンドリアおよび小胞体）の高速、長時間、高空間分解能の観察に成功した。小胞体構造は高時空間分解能に観察すると振動

運動していることが明らかにされている。小胞体から細胞質へのカルシウムイオン放出時に小胞体の振動運動が抑制されるという未知の現象を発見した(下図)。

更に StayGold と SIM を組み合わせて、新型コロナウイルス SARS-CoV-2 の細胞内可視化を行った。北里大学、花王株式会社が取得した SARS-CoV-2 S タンパク質に対する VHH 抗体に StayGold を融合することにより、SARS-CoV-2 感染細胞内において増殖中のウイルス成分の 3 次元可視化に成功した。



StayGold によってラベリングした小胞体を SIM により観察し、小胞体の動態を観察した。

グラフの灰色部分において小胞体からカルシウムイオンが放出され、小胞体の動きが抑制されている。

5 . 今後の計画

[StayGold の実用的改変 : StayGold の「単量体」化]

StayGold の実用性向上のために克服しなければならない性質の 1 つは 2 量体形成傾向である。蛍光タンパク質自身が 2 量体を形成することで融合されたタンパク質の機能に影響を与え、膜などへの局在化に問題を起こすことが多い。StayGold をより汎用的な技術とするには 2 量体としての性質を解消する必要がある。

タンデムダイマー化

「単量体」化の 1 つの方法としてタンデムダイマーの開発を行う。タンデムダイマーとは同一のタンパク質 2 分子をリンカーで融合し、あたかも 1 分子として振る舞わせる技術である。既にタンデムダイマーのプロトタイプは開発しているが、暗い。リンカーの長さ、アミノ酸構成を検討することにより、単量体性能を示し且つ明るいタンデムダイマーを開発する。

単量体化

2 量体を形成する界面を改変することにより真の意味での単量体を開発する。結晶構造情報に基づいた変異導入等により単量体の開発を目指す。一般的に蛍光タンパク質を単量体化するとその蛍光強度は減少することが多いが、高輝度の mStayGold を得る。

[StayGold の超解像観察への応用]

tdStayGold および mStayGold の開発によって可能となる細胞構造ラベリング技術と超解像顕微鏡法を組み合わせることにより、細胞内/外小胞のような小さく動的な細胞構造体の可視化を狙う。

また、細かく、速く、広く、長く観察することで予想されるデータ容量の著増に対応するために、画像解析に関わるソフトウェア環境の整備を進める。

6 . これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

A highly photostable and bright green fluorescent protein.

Hirano M, Ando R, Shimozono S, Sugiyama M, Takeda N, Kurokawa H, Deguchi R, Endo K, Haga K, Takai-Todaka R, Inaura S, Matsumura Y, Hama H, Okada Y, Fujiwara T, Morimoto T, Katayama K, Miyawaki A. *Nat Biotechnol.* 査読有り、**40(7)**:1132-1142 (2022)

7 . ホームページ等

プレスリリース

https://www.riken.jp/press/2022/20220426_1/