

細胞機能探索技術開発チーム

Laboratory for Cell Function Dynamics

チームリーダー 宮脇 敦史

MIYAWAKI, Atsushi

細胞内の様々な事象を、同時に生きたままリアルタイムで可視化する技術を開発することが我々の研究目的である。これらは、主に蛍光（標識）分子などで作製した機能プローブを細胞内に送り込み、受け取った情報、例えば蛍光の強度を画像化することで達成される。GFP (Green Fluorescent Protein) は自ら発色団を形成して蛍光を発するタンパク質である。遺伝子工学的手法により、蛍光分子を自由自在に細胞内に創り出すことが可能である。GFP の物理化学的特性を利用すれば、微小環境プローブが開発できる。また異なる色の GFP を組み合わせ、蛍光エネルギー移動 (FRET) を実現すれば、タンパク質-タンパク質相互作用や、タンパク質構造変化を生きた細胞でリアルタイムで追跡することができる。このような GFP をベースにした指示薬の蛍光シグナルを最大限に検出するべき顕微鏡光学系を開発対象とする。近年の新しい遺伝子導入技術、画像処理技術を駆使することで、我々の単一細胞内イメージング技術は飛躍的に進歩する。細胞内情報伝達機構を、より局所的に、より個体に近い生理的状況で解析することができるようになる。

更に、こうした細胞内機能イメージング技術に、生物の形態をリアルタイムにイメージングする光干渉技術を融合することを計画している。後者は、外来性の蛍光プローブを導入することなく、生物試料が示す内因性の光シグナルを最大限に利用することで達成される。当研究チームは、現象を記述するための同時観測可能なパラメータを増やすことによって、生物現象をより多角的に理解することを目指す。

1. *cameleon*, *pericam* による Ca^{2+} イメージング

(1) *cameleon* (水野, 永井^{*1}, 濱, 安藤, 小暮, 原)

細胞生物学のための蛍光指示薬は、UV 照射を避け長波長側にシフトする傾向にある。我々は長波長域に励起、発光スペクトラムを示す *yellow cameleon* を作製した。これによって S/N 比が大きく改善された。また UV 照射が避けられ、サンプルの傷害を最小化することができた。さらに遺伝子を改変し、大腸菌で作らせたタンパク質を分光光度計を用いて、 Ca^{2+} 濃度依存的に起こる FRET 量 (指示薬のダイナミックレンジ) をより大きくする、また、*cameleon* の Ca^{2+} 親和性のレポーターを増やす (殊に小胞体内腔の Ca^{2+} 濃度を正確に測定する上で重要である) などを検討している。また、イメージングのための光源 (励起光の強度)、励起光の選択法 (band pass filter か、monochrometer か)、蛍光の検出法 (cooled CCD camera か、PMT か) などの光学系を吟味してきた。我々は、800 nm 付近の長波長レーザー光を用いた二光子励起法が、*yellow cameleon* による Ca^{2+} イメージングの断面像の観察 (ビデオレイト) を可能にすることを証明している。

本年度においては、*yellow cameleon* における acceptor の発色団形成を向上させることによって、遺伝子導入から Ca^{2+} イメージングまでの時間を大幅に短縮した。これによって脳の急性スライス標本に遺伝子銃で遺伝子を打ちこんだ後、わずか数時間以内で Ca^{2+} イメージングの実施が可能になった。

(2) *pericam* (永井^{*1}, 深野, 沢野, 下園^{*2})

我々は、GFP の β -can 構造にメスを入れた柔らかい GFP に、 Ca^{2+} センサーとしてのカルモデュリンとその標的ペプチドを組み込み、 Ca^{2+} 濃度に従って蛍光特性を変える Ca^{2+} 指示薬を創り出した ("*pericam*"). 我々は、*pericam* のバリエーションを増やし、個々についても明るさなどの向上を図った。1 波長励起 1 波長測光型のものとして、 Ca^{2+} によって蛍光強度が増大する "*flash-pericam*", 蛍光強度が減少する "*inverse-pericam*", Ca^{2+} によって色が変化する 2 波長励起 1 波長測光型の "*ratiometric-pericam*" がある。

本年度においては、2 波長励起 1 波長測光型のプローブを用いて共焦点画像を取得するための新しいレーザー走査顕微鏡システムを開発した。408 nm の半導体レーザーと 488 nm の固体レーザーとを 2 台の AOTF を用いて高速に切り替える仕組みになっている。これによって、*ratiometric-pericam* による細胞内 Ca^{2+} 変化を Z 軸方向の分解能を高めながら観察することに成功した。

2. GFP, RFP の改良, および新奇蛍光タンパク質の

遺伝子のクローニング (永井^{*1}, 唐澤^{*1}, 安藤, 水野, 沢野, Eli, 片山^{*2}, 平野^{*1}, 日野)

本年度においては、発色団形成効率を著しく向上させることによって世界で最も明るい改変 GFP を作製し、*Venus* と命名した。*Venus* をニューロペプチド Y に融合させることで PC12 細胞の分泌顆粒を高効率に蛍光ラベルした。脱分極刺激による分泌課程を実時間で観察できるようになった。また、阿嘉島臨海研究所 (沖縄県) や、その他の臨海研究所および水族館との共同で、刺胞動物の中でどういう種のもが蛍光を発するのかをスクリーニングし始めた。蛍光を発するものについて cDNA ライブラリーを作製し、先述したプレートイメージングシステムを利用して新奇蛍光タンパク質の遺伝子クローニングを行った。

3. 新しい分子スパイの開発, および細胞諸現象の多角

的理解 (日野, 濱, 小暮, 永井^{*1}, 清水^{*1}, 河野^{*1}, 三島^{*1})

我々は、FRET 効率を定量化する簡便な方法を確立した。ドナー、アクセプターとして CFP-YFP のペアを用い、アクセプターである YFP を光学的にブリーチングさせることによって起こる CFP の蛍光回復量から FRET 量を測定

する方法である。昨年度については、この方法を用いて、Cキナーゼの基質として有名な MARCKS タンパクと、カルモデュリンとの直接相互作用を、生きた細胞内で実証することに成功した。更に、Ca²⁺ 動態とその下流の事象である Cキナーゼの活性化、および MARCKS タンパク質の細胞質への移行とを同時にハイスピードで可視化できる光学的システムを作製した。

4. 蛍光タンパク質を用いたバイオイメーキングのための顕微鏡光学システムの開発（深野，沢野）

本年度においては、通常の落射蛍光顕微鏡システムにおける reflector として透過特性の高いガラス板を設置した簡易なマルチカラーイメージングシステムを開発した。用いる蛍光色素の波長特性にかかわらず reflector を切り替える必要がなく、高速なマルチカラーイメージングが可能となった。

5. 動物間のコミュニケーションを司る分子種の探索（佐々木，安藤）

我々は、マウス鋤鼻器に特異的に発現する、リボカリンファミリーのメンバーである、2つのタンパク質（VNSP I and II）をクローニングした。一般に、リボカリンタンパク質は疎水性の低分子化合物を運搬するため、我々は VNSP I and II をフェロモンの運搬タンパク質と仮定している。両者のリコンビナントタンパク質を昆虫細胞発現系を用いて大量に調製し（アポタンパク質）、マウス尿などと混合した後に、リガンド（フェロモン）と結合したホロタンパク質を精製する。さらにタンパク質部分をジクロロメタンで変性し、リガンド分子を抽出して、GC-MS や LC-MS にて分析している。

本年度については、マウス鋤鼻器に豊富に発現する分泌タンパク質 clone611 について、その全一次構造解析を明らかにし、機能解析を行った。その結果、トリプトシンなどのプロテアーゼ活性を阻害する働きを有することが明らかになった。

*1 非常勤研究員，*2 研修生

Research Subjects and Members of Laboratory for Cell Function Dynamics

1. Ca²⁺ Imaging Using cameleons and pericams
2. Improvement of GFP and RFP, cDNA Cloning for Novel Fluorescent Proteins
3. Development of Indicators for Various Cellular Events
4. Development of Novel Microscopy for Observing GFP's Fluorescence
5. Chemical Communication of Animals

Laboratory Head

Dr. Atsushi MIYAWAKI

Research Scientists

Dr. Pharhad ELI

Dr. Hiroshi HAMA

Dr. Hideaki MIZUNO

Dr. Yasunori SASAKI

Dr. Takashi FUKANO

Dr. Miki YAMAMOTO (HINO)

Technical Staffs

Ms. Ryoko ANDO

Ms. Takako KOGURE

Ms. Asako SAWANO

Ms. Chikako HARA

Assistants

Ms. Mizuka HAGA

Visiting Scientists

Dr. Takeharu NAGAI (JST)

Dr. Masahiko HIRANO (Hamamatsu Photonics K.K.)

Mr. Satoshi KARASAWA (Med. Biol. Lab. Co., Ltd.)

Mr. Keiji SHIMIZU (Olympus Optical Co., Ltd.)

Mr. Yoshihiro KAWANO (Olympus Optical Co., Ltd.)

Mr. Shuzo MISHIMA (Olympus Optical Co., Ltd.)

Trainees

Mr. Satoshi SHIMOZONO (Univ. Tokyo)

Mr. Hiroyuki KATAYAMA (Hokkaido Univ.)

誌上発表 Publications

[雑誌]

(原著論文) *印は査読制度がある論文誌

Kitaguchi T., Nakata K., Nagai T., Aruga J., and Mikoshiba K.: “*Xenopus Polycomblike 2 (XPcl2)* controls anterior to posterior patterning of the neural tissue”, *Dev. Genes Evol.* **211**, 309–314 (2001). *

Robert V., Gurlini P., Tosello V., Nagai T., Miyawaki A., Lisa F. D., and Pozzan T.: “Beat-to-beat oscillations of mitochondrial [Ca²⁺] in cardiac cells”, *EMBO J.* **20**, 4998–5007 (2001). *

Kurokawa K., Mochizuki N., Ohba Y., Mizuno H., Miyawaki A., and Matsuda M.: “A pair of fluorescent resonance energy transfer-based probes for tyrosine phosphorylation of the CrkII adaptor protein *in vivo*”, *J. Biol. Chem.* **276**, 31305–31310 (2001). *

Truong K., Sakaue A., Mizuno H., Hama H., Tong K. I., Mal T. K., Miyawaki A., and Ikura M.: “FRET-based *in vivo* Ca²⁺ imaging by a new calmodulin-GFP fusion molecule”, *Nat. Struct. Biol.* **8**, 1069–1073 (2001). *

Mochizuki N., Yamashita S., Kurokawa K., Ohba Y., Nagai T., Miyawaki A., and Matsuda M.: “Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1”, *Nature* **411**, 1065–1068 (2001). *

Sudo T., Yagasaki Y., Hama H., Watanabe N., and Osada H.: “Exip, a new alternative splicing variant of p38 α , can induce an earlier onset of apoptosis in HeLa cells”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291**, 838–843 (2002).

★

- Sakaue A., Hama H., Saito N., and Miyawaki A.: "Multicolor imaging of Ca²⁺ and protein kinase C signals using novel epifluorescence microscopy", *Biophys. J.* **82**, 1076–1085 (2002). ★
- Nagai T., Ibata K., Park E. S., Kubota M., Mikoshiba K., and Miyawaki A.: "A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications", *Nat. Biotechnol.* **20**, 87–90 (2002). ★
- Shimozono S., Fukano T., Nagai T., Kirino Y., Mizuno H., and Miyawaki A.: "Confocal imaging of subcellular Ca²⁺ concentrations using a dual excitation ratiometric indicator based on green fluorescent protein", *Science's stake (Web)*, (2002). ★

(総説)

- 宮脇敦史: "刺胞動物と蛍光タンパク質", *みどりいし*, No. 13, pp. 1–4 (2002).
- 宮脇敦史: "GFP を用いた分子間 FRET", *生体の科学* **53**, 75–81 (2002).

[単行本・Proc.]

(原著論文) ★印は査読制度がある論文誌

- 宮脇敦史: "GFP の実用的基礎知識", *実験医学別冊: ポストゲノム時代の実験講座 3*, 宮脇敦史 (編), 羊土社, 東京, pp. 17–30 (2000).
- 松崎正晴, 宮脇敦史: "市販されている GFP の種類, 特性と選択方法", *実験医学別冊: ポストゲノム時代の実験講座 3*, 宮脇敦史 (編), 羊土社, 東京, pp. 31–37 (2000).
- 宮脇敦史: "GFP を使って何が出来るか", *実験医学別冊: ポストゲノム時代の実験講座 3*, 宮脇敦史 (編), 羊土社, 東京, pp. 38–45 (2000).
- 宮脇敦史: "GFP 融合タンパク質の設計", *実験医学別冊: ポストゲノム時代の実験講座 3*, 宮脇敦史 (編), 羊土社, 東京, pp. 46–49 (2000).
- 宮脇敦史: "GFP の単独発現", *実験医学別冊: ポストゲノム時代の実験講座 3*, 宮脇敦史 (編), 羊土社, 東京, pp. 50–51 (2000).
- 永井健治, 宮脇敦史: "アフリカツメガエル", *実験医学別冊: ポストゲノム時代の実験講座 3*, 宮脇敦史 (編), 羊土社, 東京, pp. 118–129 (2000).
- 宮脇敦史: "イメージング技術におけるリアルタイムとは?", *実験医学別冊: ポストゲノム時代の実験講座 3*, 宮脇敦史 (編), 羊土社, 東京, pp. 154–155 (2000).
- 宮脇敦史: "蛍光のバイオイメージングの基礎", *実験医学別冊: ポストゲノム時代の実験講座 3*, 宮脇敦史 (編), 羊土社, 東京, pp. 156–176 (2000).
- 宮脇敦史: "定量的 GFP イメージング", *実験医学別冊: ポストゲノム時代の実験講座 3*, 宮脇敦史 (編), 羊土社, 東京, pp. 181–184 (2000).
- 宮脇敦史: "細胞内生体分子間相互作用の可視化: 定量的 FRET の実践", *実験医学別冊: ポストゲノム時代の実験講座 3*, 宮脇敦史 (編), 羊土社, 東京, pp. 185–190 (2000).
- 宮脇敦史, 沢野朝子: "蛍光イメージアナライザーを用いた新規 GFP (RFP) の探索", *実験医学別冊: ポストゲノム時代の実験講座 3*, 宮脇敦史 (編), 羊土社, 東京, pp. 244–247 (2000).

(総説)

- 宮脇敦史: "Green Fluorescent Protein はなぜ光るか?", *生命科学を拓く新しい光技術*, 船津高志 (編), 共立出版, 東京, pp. 77–92 (1999).
- 宮脇敦史: "はじめに: なぜ GFP なのか", *実験医学別冊: ポストゲノム時代の実験講座 3*, 宮脇敦史 (編), 羊土社, 東京, pp. 10–12 (2000).
- 宮脇敦史: "あとがき: 再び "バイオイメージングとは?"", *実験医学別冊: ポストゲノム時代の実験講座 3*, 宮脇敦史 (編), 羊土社, 東京, pp. 270–271 (2000).
- 阪上 (沢野) 朝子, 宮脇敦史: "Thermal cycling による新実用的遺伝子変異導入法", *別冊実験医学ザ・プロトコールシリーズ: 遺伝子の機能阻害実験法*, 多比良和誠 (編), 羊土社, 東京, pp. 17–25 (2001).

口頭発表 Oral Presentations

(国際会議等)

- Miyawaki A.: "FRET with GFP creates new windows on a cell", 7th JST Int. Symp. on Molecular Processes and Biosystems, Tokyo, Feb. (1999).
- Miyawaki A.: "Imaging of cellular functions by FRET-ing", *FRET and FLIM: Advanced Fluorescence Techniques for Biological Imaging*, (Hamamatsu Photonics), San Antonio, USA, June (2001).
- Miyawaki A., Nagai T., Mizuno H., and Sawano A.: "Dynamic imaging of cellular functions and morphology", 14th Int. Congr. of Developmental Biology, (The Japanese Society of Developmental Biologists), Kyoto, July (2001).
- Kitaguchi T., Nagai T., Nakata K., Aruga J., and Mikoshiba K.: "Zic3 is involved in the left-right specification of *Xenopus* embryo", 14th Int. Congr. of Developmental Biology, (The Japanese Society of Developmental Biologists), Kyoto, July (2001).
- Miyawaki A.: "Localized activation of two important molecular switches: Ras and Rap 1", *Gordon Research Conf. on Calcium Signalling*, Oxford, UK, Sept. (2001).
- Miyawaki A.: "Dynamic imaging of cellular functions and morphology", *China-Japan-Korea Joint Workshop on Neurobiology and Neuroinformatics (NBNI-2001)*, Hangzhou, China, Nov. (2001).

(国内会議)

- 宮脇敦史: "蛍光蛋白質によるリアルタイムイメージング", 第 26 回組織細胞化学会講習会, 京都, 7 月 (2001).
- 宮脇敦史: "細胞機能解析へのアプリケーション", 第 10 回メディカルホトニクスコース, (浜松医科大学), 浜松, 8 月 (2001).
- 齋藤加奈子, 小川正晴, 宮脇敦史, 永井健治, 倉持浩, 宮田卓樹, 川口綾乃, 八杉貞雄: "マウス網膜スライス培養法: 網膜発生のリアルタイム断面視", 第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会 (Neuro2001), 京都, 9 月 (2001).
- 宮脇敦史, 永井健治, 水野秀昭, 濱裕, 阪上朝子: "細胞内情報伝達リズムとゆらぎ", 第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会 (Neuro2001), 京都, 9 月 (2001).

宮脇敦史: “細胞内機能の可視化”, 第 16 回生体機能関連化学シンポジウム若手フォーラム「視覚で紐解く生命現象」, (日本化学会), 東京, 9 月 (2001).

宮脇敦史: “遊び心のイメージングを目指して”, 国立遺伝学研究所セミナー, 三島, 11 月 (2001).

宮脇敦史: “蛍光で細胞内情報伝達機構を紐解く”, 第 24 回慶應ニューロサイエンス研究会「21 世紀の脳科学: 基礎と臨床の接点を求めて」, 東京, 12 月 (2001).

宮脇敦史: “蛍光バイオイメージングのための顕微鏡”, 第

24 回日本分子生物学会 OLYMPUS バイオテクノロジーセミナー, 横浜, 12 月 (2001).

竹本研, 永井健治, 徳重直子, 宮脇敦史, 三浦正幸: “FRET を用いた生細胞内における活性型カスパーゼの可視化”, 第 24 回日本分子生物学会年会シンポジウム, 横浜, 12 月 (2001).

宮脇敦史: “細胞機能の可視化技術”, 第 42 回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 東京, 12 月 (2001).