

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に加え、近年の新しい遺伝子導入技術、顕微鏡機器、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, 原, 濱, 安藤, 小暮, 宮脇)

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、800nm付近の長波長レーザー光を用いた2光子励起法が、yellow cameleonによる Ca^{2+} イメージングの断層像の観察(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、オワンクラゲGFPのmutantの1つ

であるサファイアをドナー、六放サンゴから得られたRFPをアクセプターにすると非常に効率のよいFRETが実現できることを見いだした。このペアの利点の1つとして、サファイア、RFPともにpHに対して全く抵抗性をもつことがあげられる。従って両者を組み込んで作製されたRed cameleonは、pH変化が激しく起こる神経細胞での Ca^{2+} イメージングに適することが示された。

(2) pericam(永井, 沢野, 下園, 宮脇)

我々は、GFPの β -can構造にメスを入れたものに、 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GFPを創り出した。我々が最近開発したのが Ca^{2+} 感受性GFP“pericam”である。本年度については、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。現在、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+} によって色が変わる2波長励起1波長測光型の“ratiometric-pericam”がある。

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, 沢野, Eli, 日野, 宮脇)

プレート上の、GFP, RFPを発現する多数のコロニーの蛍光の特性を一度に解析するシステムを作製した。モノクロメーターで励起光を選択し、光ファイバーを使ってプレートを均一に照射する。プレートの蛍光像を様々な干渉フィルターを経てCCDカメラで撮り画像化する構成になっている。

本年度については、一度にプラスミド上のあらゆる箇所ランダム変異を含めた変異導入ができる遺伝子工学的手法を開発した。この方法は、応用範囲が広く、迅速で低コストという利点を併せ持つ。この手法を利用してGFPの試験管内進化を試みたところ、新しい色の蛍光タンパク質(CGFP)の遺伝子が得られた。CGFPは著しくpHに対して抵抗性を示すことが分かった。また本年度より沖縄県阿嘉島臨海研究所との共同で、六放サンゴの中でどういう種のももの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ている。(浜松ホトニクス 平野氏との共同研究)

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, 宮脇)

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。本年度については、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、 Ca^{2+} 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。(オリンパス光学工業株式会社 清水氏との共同研究)

4. OCT の開発 (深野, 宮脇)

本年度については、ショウジョウバエのさなぎの断層像を連続的に取得することで、幼虫から成虫への変態を可視化するプロジェクトを推し進めている。技術的には、ビデオレートで断層像を得ることを目指し、共振型ガルバノスキャナーとウェッジプレートを用いた高速可変光学遅延の基礎実験を行っている。

5. 動物間のコミュニケーションを司る分子種の探索 (水野, 安藤, 宮脇)

我々は、マウス鋤鼻器に特異的に発現する、リポ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、リポ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。

誌上発表 Publications

(原著論文) *印は査読制度がある論文誌

Tamura H., Miyawaki A., Yoneshima H., Mikoshiba K., and Matsui M.: "Molecular cloning, expression and characterization of a phenol sulfotransferase cDNA from mouse intestine", *Biol. Pharm. Bull.* **22**, 234-239 (1999). *

Matsushita F., Miyawaki A., and Mikoshiba K.: "Vomeroglandin/CRP-Ductin is strongly expressed in the glands associated with the mouse vomeronasal organ: Identification and characterization of mouse vomeroglandin", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **268**, 275-281 (2000). *

Mizuno H., Sawano A., Eli P., Hama H., and Miyawaki A.: "Red fluorescent protein from *Discosoma* as a fusion tag and a partner for fluorescence resonance energy transfer", *Biochemistry* **40**, 2502-2510 (2001). *

Sawano A. and Miyawaki A.: "Directed evolution of green

fluorescent protein by a new versatile PCR strategy for site-directed and semi-random mutagenesis", *Nucleic Acids Res. Methods Online (WEB)* **28**, (2000). *

Nagai T., Sawano A., Park E., and Miyawaki A.: "Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca^{2+} ", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 3197-3202 (2001). *

(総説)

宮脇敦史: "緑色ケイ光タンパク質がもたらす技術革新", *パリティ* **14**, No. 12, pp. 81-83 (1999).

宮脇敦史: "FRET しませんか?", *実験医学* **18**, 1111-1119 (2000).

宮脇敦史: " Ca^{2+} イメージング革命", *生物工学会誌* **78**, 388-392 (2000).

宮脇敦史: "Green fluorescent protein を用いた新しいプローブの開発", *生物物理* **228**, 83-88 (2000).

宮脇敦史: "細胞機能のリアルタイム可視化", *精密工学会誌* **67**, 570-573 (2001).

(単行本)

Miyawaki A. and Mizuno H.: "Cameleons as cytosolic and intra-organellar calcium probes", *Calcium Signalling: A Practical Approach*, edited by Alexei V. Tepikin, Oxford University Press, Oxford, pp. 3-16 (2001).

Miyawaki A.: "Monitoring protein conformations and interactions by fluorescence resonance energy transfer between mutants of green fluorescent protein", *Methods in Enzymology*, edited by J. Thorner, S. D. Emr, and J. N. Abelson, Academic Press, **327**, 472-500 (2000).

宮脇敦史: *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, (2000).

(その他)

Mikoshiba K., Aruga J., Nagai T., Nakata K., Nakajima K., Miyata T., and Ogawa M.: "Molecular mechanism involved in neural induction and neuronal fate determination", *Proc. Int. Workshop on Neuronal Precursor Cell Biology and Application for Treatment of Inborn Error of Metabolism*, pp. 168-183 (1999).

口頭発表 Oral Presentations

(国際会議等)

Yamamoto-Hino M., Miyawaki A., Segawa A., Furuichi T., and Mikoshiba K.: "Polarized Ca^{2+} pools in rat submandibular gland", 11th Int. Symp. on Calcium-Binding Proteins and Calcium Function in Health and Disease, Kisarazu, Oct. (1999).

Miyawaki A.: "GFP creates new windows on a cell", *Focus on Microscopy 2000 Workshop (FOM2000)*, Osaka, Apr. (2000).

Miyawaki A.: "Dynamic and quantitative imaging of cell functions", *Int. Workshop on Microimaging of Neuronal Functions*, (National Institute for Physiological Science), Okazaki, July (2000).

Miyawaki A.: "Dynamic and quantitative imaging of cellular functions", 11th Int. Congr. of Histochemistry and Cytochemistry 2000, York, UK, Sept. (2000).

Miyawaki A.: "Dynamic and quantitative imaging of cell functions", 4th Harima Int. Forum Harima Conf. HIF2000: New Trends in Phosphoinositide Signalling and Protein Phosphorylation, (Hyogo Prefecture and SPring-8), Hyogo, Nov. (2000).

(国内会議)

永井健治, Koyabu Y., 北口哲也, 有賀純, 御子柴克彦: "XZic3 は外胚葉の BMP4 に対する応答能を変化させる", 第 32 回日本発生生物学会大会, 神戸, 5 月 (1999).

北口哲也, 永井健治, 中田勝紀, 有賀純, 御子柴克彦: "頭部神経形成における Zic3 の機能解析ならびにその下流遺伝子の探索", 第 32 回日本発生生物学会大会, 神戸, 5 月 (1999).

宮脇敦史: "脳細胞機能のリアルタイム可視化", 計測連合シンポジウム「先端計測 2000」, (日本学会会議計測工学専門委員会), 東京, 5 月 (2000).

宮脇敦史: "蛍光を用いた蛋白質-蛋白質相互作用の解析", 第 6 回生化学会近畿支部テクニカルセミナー「ブレインサイエンス領域におけるゲノムの機能解析」, 大阪, 5 月 (2000).

宮脇敦史: "生体シグナルの可視化技術", Amersham Pharmacia Biotech Symp. "Genomics & Proteomics2000", 東京, 6 月 (2000).

宮脇敦史: "細胞機能のリアルタイム可視化", 第 15 回バイオサイエンストレーニングコース, (岡崎国立共同研究機構 基礎生物学研究所), 岡崎, 6 月 (2000).

宮脇敦史: "GFP 技法の原理と将来展望", 第 25 回組織細胞化学講習会, (日本組織細胞化学会), 東京, 8 月 (2000).

宮脇敦史, 永井健治: "同時に複数の機能をイメージングする技術", 第 23 回日本神経科学大会・第 10 回日本神経回路学会大会合同大会, 横浜, 9 月 (2000).

宮脇敦史: "Real-time imaging of cellular functions", 日本研究皮膚科学会第 25 回年次学術大会・総会, 岐阜, 9 月 (2000).

宮脇敦史: "生体機能を可視化するためのプローブ", レーザ顕微鏡研究会第 26 回講演会, 東京, 11 月 (2000).

宮脇敦史, 永井健治, 水野秀昭, 沢野朝子: "生体機能を可視化するためのプローブ", 第 9 回日本バイオイメージング学会学術集会, 東京, 11 月 (2000).

宮脇敦史: "レーザーによる遺伝子研究", 平成 12 年度茅コンファレンス「光科学の新しい展開とその応用」, 猪苗代, 11 月 (2000).

宮脇敦史: "GFP と細胞内情報伝達機構", 理研シンポジウム「新しい光応用技術 XV」; 計測自動制御学会第 7 回センシングフォトリクス部会講演会, 和光, 11 月 (2000).

中田勝紀, 永井健治, 小藪芳男, 有賀純, 御子柴克彦: "アフリカツメガエル Zic5 のクローニングおよび神経堤細胞形成における機能解析", 第 22 回日本分子生物学会年会, 福岡, 12 月 (2000).

宮脇敦史, 永井健治, 水野秀昭, 沢野朝子: "オワンクラゲ GFP と六放サンゴ RFP の展望", 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2000).

宮脇敦史: "新しい手法を用いて何ができるようになるのか: FRET・2Photon・FRAP を用いた実験の実際", 蛍光バイオイメージングテクニカルセミナー 2001, (オリンパス販売), 東京, 2 月 (2001).

宮脇敦史: "Let's FRET", 日本薬学会第 121 年会, 札幌, 3 月 (2001).

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 OCT
5. Chemical Communication of Animals

Laboratory Head

Dr. Atsushi MIYAWAKI

Research Scientists

Dr. Farhad ELI
Dr. Hiroshi HAMA
Dr. Hideaki MIZUNO
Dr. Takashi FUKANO

Technical Staffs

Ms. Ryoko ANDO
Ms. Takako KOGURE
Ms. Asako SAWANO
Ms. Chikako HARA

Assistants

Ms. Mizuka HAGA

Special Postdoctoral Researchers

Dr. Takeharu NAGAI

Visiting Members

Mr. Keiji SHIMIZU (Olympus Opt. Co.)
Mr. Masahiko HIRANO (Hamamatsu Photonics K. K.)

Trainees

Mr. Satoshi SHIMOZONO (Univ. Tokyo)