戦略的創造研究推進事業
ERATO
追跡評価用資料

「宮脇生命時空間情報」プロジェクト
（2006.10～2013.3）

研究総括：宮脇　敦史

2019 年 3 月

目次

要旨 1
プロジェクトの発足に至る経緯及び展開状況(まとめ図) 2
第 1 章 プロジェクトの概要 3
1.1 研究期間 3
1.2 プロジェクト発足時における科学技術や社会の背景 3
1.2.1 科学技術の背景 3
1.2.2 社会の背景 4
1.3 プロジェクトのねらい 4
1.4 研究体制 6
1.5 プロジェクト終了時点での研究成果やその意義 7
1.5.1 生物個体ライブイメージンググループ 7
1.5.2 数理解析グループ 21
1.5.3 光学システム開発グループ 21
第 2 章 プロジェクト終了から現在に至る状況 26
2.1 各研究テーマの終了後の状況に関する基礎データ 26
2.1.1 調査方法 26
2.1.2 競争的研究資金の獲得状況 28
2.1.3 論文の発表状況 32
2.1.4 特許の出願・登録状況 38
2.1.5 招待講演 39
2.2 各研究テーマの進展状況 40
2.2.1 生物個体ライブイメージングのためのプローブ開発と応用展開 40
2.2.2 光学システム開発 52
2.2.3 その他の研究成果 55
2.3 プロジェクト参加研究員の活動状況 56
2.4 第 2 章まとめ 57
第 3 章 プロジェクト成果の波及と展望 61
3.1 科学技術への波及と展望 61
3.1.1 学術的な新発見や発明による科学技術への波及 61
3.1.2 新たな研究領域や研究の潮流の形成 65
3.1.3 科学技術への波及のまとめと展望 66
3.2 社会経済への波及と展望 66
3.2.1 医療・創薬・健康分野への応用 66
3.2.2 社会への貢献 67
3.2.3 メディアを介した研究成果の発信 68
3.2.4 社会経済への波及のまとめと展望 68
【引用文献】 69

要旨

世界に先駆けて、緑色蛍光タンパク質 GFP に蛍光エネルギー移動(FRET)や円順列変位法の技術を組み合わせてカルシウム指示薬を開発した宮脇は、細胞の増殖・分化・移動・死を可視化する機能プローブの開発と先端的光学機器システムの開発とを双方向的に展開することで、生物個体を扱うバイオイメージングの技術革新を図り、発生学・遺伝学・医学などの分野でのバイオイメージング技術の実践応用を目指して、本プロジェクトを立ち上げた。

本プロジェクト期間中に機能プローブとして、細胞周期の G1 期と S/G2/M 期を識別できるプローブ Fucci、オートファジー活性プローブ mKeima やマイトファジー活性プローブ mt-mKeima、タンパク質分解活性プローブ、および酸化ストレスプローブなどが新たに開発された。また、シラスウナギから取得した新規蛍光タンパク質 UnaG がその発色に、生化学検査項目の 1 つで黄疸原因物質であるビリルビンをリガンドとして必要とすることを見出し、ビリルビンセンサーが開発された。Fucci については、プローブおよびそのトランスジェニックマウスの供給体制が整備され、国内外の多くの研究者に提供された。

光学機器システムについては、多光子励起顕微鏡の光軸自動補正装置、1 つの励起波長で同時に 2 色の蛍光イメージングを行う方法、シリコン樹脂を利用した長時間細胞培養装置、組織の深部観察を可能にする赤外顕微鏡が開発された。さらに、固定した生体組織を透明化する尿素主体の試薬 Sca*I*eA2 が開発され、組織を破壊することなく表面から数 mm の深部を観察することに成功した。Sca*I*e 技術の開発により、機能プローブと光学機器システムとの双方向展開という本プロジェクトの目的は達成された。

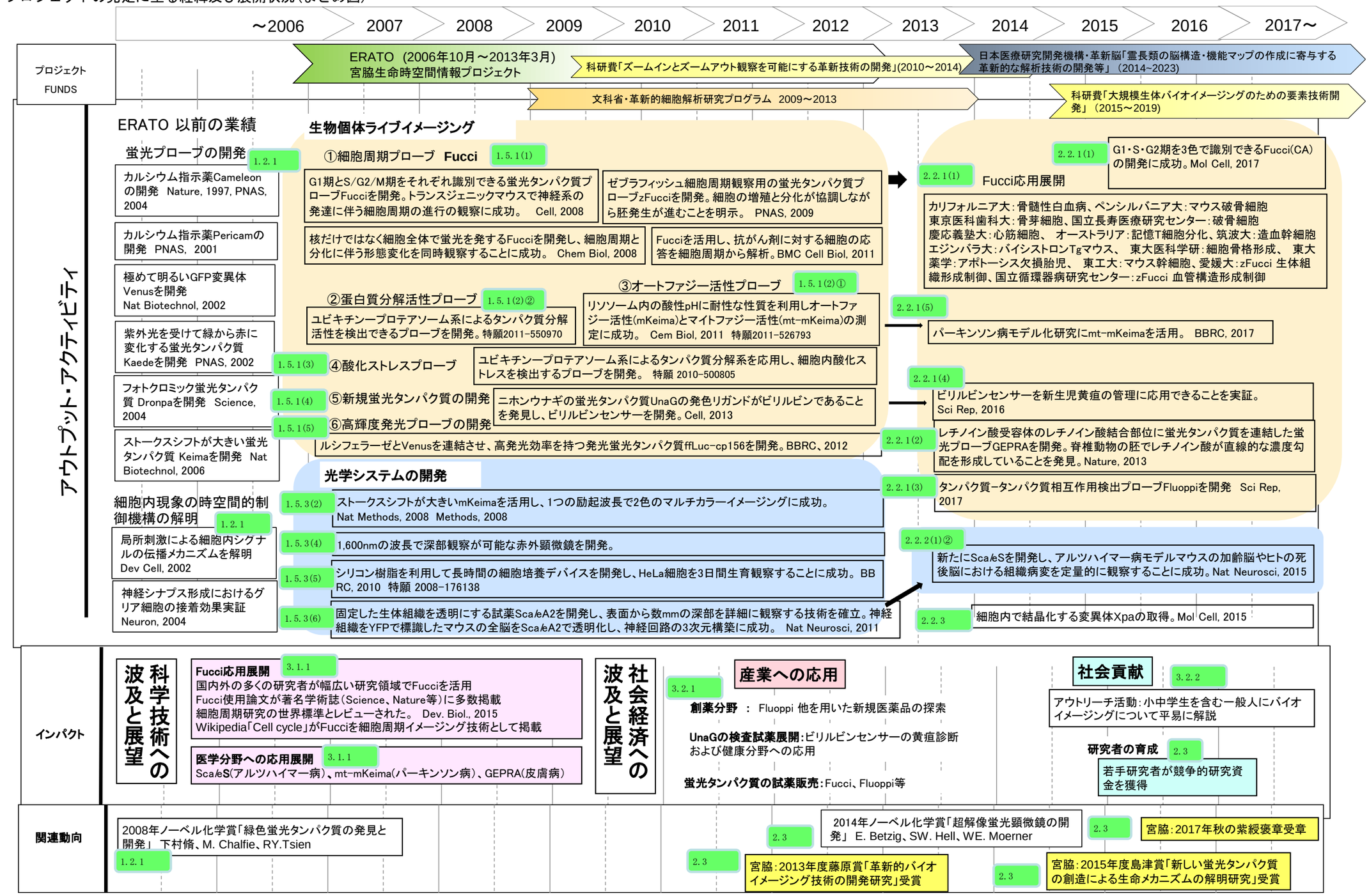
宮脇らは、本プロジェクト終了後も大型の科研費や国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)からの助成金を取得して、バイオイメージング技術研究を継続している。細胞周期プローブについては、G1 期・S 期・G2 期を 3 色で識別できる Fucci(CA)を新たに開発するとともに、Fucci を活用した多くの共同研究成果が発表されている。また、非タンパク質性のモルフォゲンであるレチノイン酸の濃度を測定できるプローブ GEPRA の開発、ならびにタンパク質・タンパク質間の相互作用を高感度で再現性よく検出できるプローブ Fluoppi の開発にも成功した。さらに Sca*I*e 技術の欠点を改良し、抗体染色や化学染色技術も取り込んで、老齢マウスやヒトの死後脳に適用可能な新しい組織透明化技術 Sca*I*eS が開発された。

宮脇は、その先駆的なバイオイメージング技術の開発研究が評価され、「藤原賞」・「島津賞」を受賞し、また 2017 年度の紫綬褒章を受章した。また、本プロジェクトに参画した研究員の多くがそれぞれ助成金を獲得して、バイオイメージング研究を継続している。

本プロジェクトで開発されたプローブや透明化技術は、がん、パーキンソン病、黄疸、アルツハイマー病などの研究に使用されている。特に Fucci は、細胞周期研究のみならず幹細胞分化やがん、免疫研究などの広範囲なライフサイエンス分野で、細胞周期を計測する標準技術として活用されている。Fucci を使用した研究成果は著名学術誌に多数掲載されており、その科学技術への波及効果が大きいことが窺える。

Fluoppi は創薬ベンチャー企業による新規医薬品探索のツールとして利用されている。また、ビリルビンセンサーは健康分野での応用が検討されている。多数の国際学会での講演、小中学生を含む一般人にも平易にバイオイメージング技術の解説など、社会貢献にも尽力している。

プロジェクトの発足に至る経緯及び展開状況（まとめ図）



第 1 章　プロジェクトの概要

本調査の対象である ERATO「宮脇生命時空間情報」プロジェクト(以後、本プロジェクトと記載)の概要を下記に示す。

1.1　研究期間

研究期間は 2006 年 10 月～2013 年 3 月であり、最終の 2012 年度は特別重点期間である。

1.2　プロジェクト発足時における科学技術や社会の背景

1.2.1　科学技術の背景

生体内の分子の挙動を生きたままの状態で観察できるバイオイメージング技術は、1992 年にオワンクラゲに由来する緑色蛍光タンパク質 GFP の遺伝子がクローニングされて以後[1)]、著しく進展した。標識色素として、GFP の変異体や他の動物に由来する新しい蛍光タンパク質に加え、有機化合物としての蛍光色素やルシフェラーゼなどの発光タンパク質も開発され、色(波長)のバリエーションが増大した。また、バイオイメージングのための顕微鏡技術も最新のコンピューター技術を取り込んで進歩し、多光子励起顕微鏡[2)]や超解像蛍光顕微鏡[3)]が開発された。

一方で、細胞内現象を解析するために、多細胞生物に由来する細胞をばらし、カバーグラス上で培養し、これらを生きたまま観察する in culture のバイオイメージングが広く行われていた。しかしながら、in culture システムは人工的な環境を細胞に与えるもので、実際の生物個体の細胞内現象を代表しているとは言えない。実際、生物個体の中では、細胞外刺激の時空間パターンと細胞内シグナルの時空間パターンが絡み合い統合されて、細胞の分裂、分化、移動、老化、死などが協調的に起こっている。時空間的パターンが巧妙に制御されて、発生過程における組織構築や器官形成が達成されている。そして、そうした協調が破綻することによって様々な疾病が生まれている。したがって、生命現象を包括的に理解するためには、in culure ではなく、生物個体の中で解析する必要性が指摘されていた。しかも個体といっても線虫、ハエ、魚、トリ、マウスなど、扱う生物種は多岐に亘っている。また、同一の生物種でも、発生の時期や部位により状況は大きく異なる。このため、生物個体に向かうバイオイメージングは様々な問題に遭遇し、それぞれのバイオイメージングに適した色素や光学系の特別な工夫が要求されていた[4)]。

本プロジェクトの宮脇敦史研究総括(以下、宮脇)は、世界に先駆けて蛍光カルシウムセン

---

[1] GFP：2008 年のノーベル化学賞(下村脩、RY. Tsien、M. Chalfie)「緑色蛍光タンパク質(GFP)の発見と開発」

[2] 多光子励起顕微鏡：フェムト秒パルスレーザーの励起光によって光子密度を高め、自然界ではまれにしか生じない二つ以上の光子が原子に同時に吸収される現象を起こし、試料が発する蛍光を観察する顕微鏡、日本顕微鏡工業会・顕微鏡の基礎　http://www.microscope.jp/knowledge/07-2.html

[3] 超解像蛍光顕微鏡：レンズの回析限界を超えた解像度を持つ顕微鏡。2014 年のノーベル化学賞(E. Betzig、SW. Hell、WE. Moerner)「超解像蛍光顕微鏡の開発」

[4] ERATO「宮脇生命時空間情報プロジェクト」研究終了報告書

サーCameleon[5]や Pericam[6]を開発するとともに、刺胞動物等の海洋動物から多くの新規蛍光タンパク質の遺伝子をクローニングし、変異を加えることで、極めて明るい蛍光タンパク質であるVenus[7]、フォトコンバージョンを示すKaede[8]、フォトクロミズムを示すDronpa[9]、ストークシフトが大きいKeima[10]などの有用な蛍光タンパク質を開発してきた。また、細胞内現象の時空間的制御機構をより生理的な状況下で理解するアプローチを提示し、上皮細胞の局所刺激による細胞内シグナルの伝播メカニズム[11]や、神経シナプス形成におけるグリア細胞の接着効果[12]について報告している。

色素・機能プローブや顕微鏡技術といった個々の要素技術の進歩に反して、生きた個体を対象としたバイオイメージングの実用的技術がまだ充分に普及していない状況を踏まえ、生物個体を扱うバイオイメージングの技術革新と実践的応用を学際的に実施することを目指して、本プロジェクトが開始された。

1.2.2 社会の背景

文部科学省は平成16年度の戦略目標に「新たな手法の開発等を通じた先端的な計測・分析機器の実現に向けた基盤技術の創出」を掲げ、細胞内分子間相互作用ネットワークの動態計測と数理モデル化により、がん、免疫疾患、循環器疾患など高次生命システムの破綻による病態発生機構の解明、iPS細胞や幹細胞の組織分化制御技術の向上など、社会ニーズの高い医学・生命科学全般への応用展開が期待される基盤技術の創出を目指した。

本プロジェクトは、細胞内分子間相互作用ネットワークの動態計測に必須な基盤技術であるバイオイメージングの技術革新と実践的応用を目指したものであり、本戦略目標に合致するものである。

1.3 プロジェクトのねらい

本プロジェクトは、多細胞生物における生命現象の時空間的制御に関する問題の解明を目指した(図 1-1)。細胞の増殖・分化・移動・死を可視化する機能プローブ、ならびに、様々な生物個体を観察可能な先端的光学機器システムを双方向的に開発展開することで、生物

---

[5] Cameleon：遺伝子工学技術を用いてGFP をもとに宮脇らが開発した蛍光タンパク質であり、細胞内の信号伝達を担うCa2+をリアルタイムに検出するセンサー、Miyawaki A et al., *Nature*, 388, 882-887, 1997 および Nagai T et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 10554-10559, 2004

[6] Pericam：宮脇らの開発した蛍光カルシウムセンサーの一つ、Nagai T et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 3197-3202, 2001

[7] Venus：宮脇らが開発した当時としては世界で最も明るい黄色蛍光タンパク質、夜空で最も明るく光る金星にちなみ「Venus(ビーナス)」と命名、Nagai T et al., *Nat Biotechnol*, 20, 87-90, 2002

[8] Kaede：宮脇らがヒユサンゴから発見した蛍光タンパク質、もともとは緑色の蛍光を発するが紫外光(または紫色光)をあてると赤色の蛍光を発するようになる、Ando R et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 12651-12656, 2002

[9] Dronpa：異なる波長の刺激光を照射することで、蛍光のオン状態とオフ状態の繰り返しが可能な「可逆的光スイッチング蛍光タンパク質」の一つ、Ando R et al., *Science*, 306, 1370-1373, 2004

[10] Keima：コモンサンゴよりクローニングし、変異導入により作製した蛍光タンパク質、大きなストークスシフト(励起ピークと蛍光ピークの差)が最大の特長、将棋の駒「桂馬」にちなんで命名された、Kogure T et al., *Nat Biotechnol*, 24, 577-581, 2006

[11] Sawano A et al., *Dev Cell*, 3, 245-257, 2002

[12] Hama H et al., *Neuron*, 41, 405-415, 2004

個体を扱うバイオイメージング[13]の新たな潮流を開花させることを目標とした。

開発技術の実践的応用を通じ、細胞の増殖・分化・移動・死などの現象について、生物種や状況の違いにかかわらず比較可能な定量性の高いデータ集積と、モデル構築が可能となり、バイオイメージング技術の適用範囲の拡大と普及、生命現象の時空間的制御に関する共通理解の深まり、創薬のための生物個体を用いたアッセイ系の確立などへの貢献が期待された。

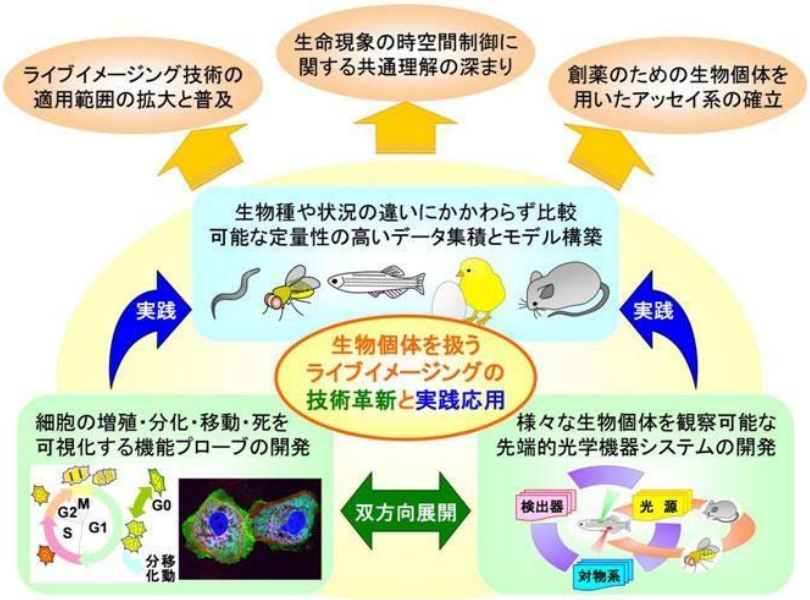


図 1-1 本プロジェクトの概念図[14]

本プロジェクトの具体的な目標は次の 3 点であった。

(1)個々の細胞が細胞周期[15](G1、S、G2、M)のどの期にあるかを見分けるプローブ試薬や、細胞で行われるタンパク質の分解を計測するためのプローブ試薬を開発し、プローブ試薬の材料となる蛍光タンパク質についても新規開発および改良を行う。

(2)ショウジョウバエを材料として、発生過程での蛹の上皮細胞の分裂の頻度や方向を測定し、これらのライブイメージングデータに数理的解析を加えることで、多細胞生物の自己構築過程での細胞動態の時空間的な制御に関するモデルを提示する。

(3)ライブイメージングのための光学技術として、XYZt の四次元のタイムラプスイメージングシステム[16]、厚みのある生物個体の深部イメージングシステム、および顕微鏡のステ

---

[13] ERATO「宮脇生命時空間情報プロジェクト」研究終了報告書では、ライブイメージングと表記されているが、宮脇が研究総括を務める科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「共鳴誘導で革新するバイオイメージング」(2015 年度～2019 年度)では、バイオイメージングと表記されているので、本事後調査報告書ではより広い意味のバイオイメージングの表記も併用した。

[14] ERATO「宮脇生命時空間情報プロジェクト」研究終了報告書

[15] 細胞周期：細胞周期は便宜上 4 つの期間に分けられており、細胞分裂が起こる分裂期（M 期）の後、第 1 間期(G1 期)を経て DNA 合成期(S 期)で DNA が複製され、第 2 間期(G2 期)を経て次の分裂期を迎える（岩波生物学辞典、第 5 版、2013）

[16] タイムラプスイメージング：顕微鏡下の生きた細胞や組織を経時的に観察する手法(理研プレスリリース「蛍光イメージング技術によって抗がん剤の作用を再評価」2011 年 1 月 25 日

ージ上で長時間のタイムラプスイメージングを可能とするインキュベータの開発を行う。

1.4 研究体制

本プロジェクトは以下の 3 グループに分けて研究が開始された。各研究員の個人としての学際性を高めるために、研究員それぞれが 3 グループの研究開発すべてに関わることを目標として、本プロジェクトが運営された。従って、表 1-1 には宮脇を含む本プロジェクトの研究員等の年度別人数を示した。

(1)生物個体ライブイメージンググループ

(2)数理解析グループ

(3)光学システム開発グループ

なお、数理解析グループについては、2009 年 5 月に担当研究員が転出したために、グループとしての活動は停止し、生物個体ライブイメージンググループの研究テーマに数理的解析部分を組み込む形で研究が推進された。この点について、ERATO 宮脇生命時空間情報プロジェクト事後評価(最終評価)報告書は、「柔軟な体制転換についても評価したい」としている[17)]

表 1-1 年度別の研究員等の人数

	2006 年度	2007 年度	2008 年度	2009 年度	2010 年度	2011 年度	2012 年度
研究員	3	9 (内兼任 2)	10 (内兼任 2)	10 (内兼任 2)	8 (内兼任 2)	8 (内兼任 2)	9
技術員	0	1	1	0	1	1	0
研究補助員	0	1	2	2	3	3	1
合計	3	11	13	12	12	12	10

研究総括：宮脇敦史　国立研究開発法人理化学研究所(理研)脳科学総合研究センター細胞機能探索技術開発チーム

本プロジェクトは埼玉県和光市の理化学研究所で実施され、所内のレーザー研究棟の 2 室、脳科学総合研究センター池之端棟の 1 室、研究交流棟の 2 室が専用で使用された。

本プロジェクトで購入設置された主要機器は、正倒立顕微鏡[18)]システム(2006 年度購入)、レーザー正立顕微鏡[19)]システム(2007 年度購入)、倒立顕微鏡システム(2008 年度購入)、および赤外顕微鏡[20)](2009 年度購入)である。

---

http://www.riken.jp/pr/press/2011/20110125/#note4)

17 ERATO 宮脇生命時空間情報プロジェクト事後評価(最終評価)報告書
http://www.jst.go.jp/erato/evaluation/posteriori/E_miyawaki_houkoku.pdf

18 正倒立顕微鏡：正立顕微鏡と倒立顕微鏡を組み合わせ、ステージに置いた試料を上下両側から観察できるようにした顕微鏡、観察領域が三次元的に大きく広がる生物個体に対応できる顕微鏡(ERATO「宮脇生命時空間情報プロジェクト」研究終了報告書)

19 レーザー正立顕微鏡：光源に波長可変型フェムト秒パルスレーザーを備え多光子励起による蛍光観察を可能にした顕微鏡(ERATO「宮脇生命時空間情報プロジェクト」研究終了報告書)

20 赤外顕微鏡：1,000nm を超える波長の赤外線でサンプルを観察できる顕微鏡(ERATO「宮脇生命時空間情報プロジェクト」研究終了報告書)

1.5　プロジェクト終了時点での研究成果やその意義

本プロジェクトの研究成果集[21]および研究終了報告書[22]で、本プロジェクトにおける重要な成果として、細胞周期可視化プローブおよびオートファジー[23]可視化プローブ、ならびに生体組織透明化技術、多光子励起顕微鏡によるマルチカラーイメージング、赤外光深部組織イメージングが掲げられている。また、本プロジェクト事後評価報告書[24]では、細胞周期可視化プローブおよび生体組織透明化技術を特筆すべき成果とし、本プロジェクトによりオリジナリティーの高い一流の研究が成し遂げられたと評価された。

以下に本プロジェクト研究終了報告書に記載された各研究グループの研究成果について詳述する。

1.5.1　生物個体ライブイメージンググループ

生物個体ライブイメージンググループは、細胞が示す生命現象を光の強さや色の変化として捉えることができる蛍光および発光プローブ試薬の開発をめざした。本プロジェクトでは、生物個体で安定して発現し、そのシグナルをイメージングにより解析できることを目標に、プローブ試薬の設計や導入法について綿密に検討された。

(1)細胞周期プローブ

細胞の増殖と分化、増殖と移動、あるいは増殖と死との相互作用を解析するために、細胞周期の特定の時期にのみ蓄積する Cdc10 dependent transcript 1 (Cdt1[25]) と Geminin[26]という 2 つのタンパク質に着目し、ヒト由来の Cdt1(hCdt1)と Geminin(hGem)を用いて、個々の細胞が細胞周期のどの位相にいるのかを可視化するプローブ試薬が開発された。

ユビキチンープロテアソーム系[27]による選択的なタンパク質の分解反応によって、細胞周期でのこれらのタンパク質の量は、ダイナミックにかつ正確に調節されている。すなわち、

---

[21] ERATO 宮脇生命時空間情報プロジェクト研究成果集
http://www.jst.go.jp/erato/research_area/completed/msj_PJ.html

[22] ERATO「宮脇生命時空間情報プロジェクト」研究終了報告書

[23] オートファジー：(自己消化)細胞が自己の細胞質の一部を取り囲む液胞を形成し、これをリソソームから供給される加水分解酵素によって消化すること(岩波生物学辞典、第 5 版、2013)

[24] ERATO 宮脇生命時空間情報プロジェクト事後評価(最終評価)報告書
http://www.jst.go.jp/erato/evaluation/posteriori/E_miyawaki_houkoku.pdf

[25] Cdt1：DNA 複製の制御因子。G1 期に複製開始点に局在し、一度複製された DNA が再複製されないように制御(ライセンス化)している。G1 期に発現量が高いが、S 期に入るとユビキチンープロテアソーム系により分解される(理研・JST 共同プレスリリース「DNA 複製や細胞分裂の様子をリアルタイムで観察する新技術」2008 年 2 月 8 日
http://www.riken.jp/~/media/riken/pr/press/2008/20080208_1/20080208_1.pdf)

[26] Geminin：S 期に一度複製が開始されたゲノムの複製開始地点へのライセンス化因子の結合を阻害するライセンス化阻害因子。その発現は、S/G2/M 期では高いが、G1 期に入るとユビキチン依存的分解により低くなる(理研・JST 共同プレスリリース「DNA 複製や細胞分裂の様子をリアルタイムで観察する新技術」2008 年 2 月 8 日
http://www.riken.jp/~/media/riken/pr/press/2008/20080208_1/20080208_1.pdf)

[27] ユビキチンープロテアソーム系：不要なタンパク質を選択的に分解するシステム。分解すべきタンパク質にユビキチンという目印タンパク質がつけられ、これをプロテアソームという大型のタンパク質分解酵素が認識して分解する(理研・JST 共同プレスリリース「DNA 複製や細胞分裂の様子をリアルタイムで観察する新技術」2008 年 2 月 8 日
http://www.riken.jp/~/media/riken/pr/press/2008/20080208_1/20080208_1.pdf)

hCdt1 は G1 期にもっとも増加し S/G2/M 期には存在しない。逆に hGem は、S/G2/M 期に増加し G1 期には存在しない。そこで、これらのタンパク質の分解に関わる領域のみを選び出し、hCdt1 には monomeric Kusabira Orange (mKO 赤色)、hGem には monomeric Azami Green (mAG 緑色)という波長の異なる蛍光タンパク質をそれぞれ結合させることで、G1 期と S/G2/M 期を蛍光の色で識別するプローブ試薬を作製し、Fucci[28]と命名した。Fucci を HeLa 細胞[29]に発現させ観察したところ、核に局在する蛍光が観察された。そして、細胞周期の進行に応じて核の蛍光の色が、G1 期には赤、S/G2/M 期には緑と交互に変化することが確認された(図 1-2)。

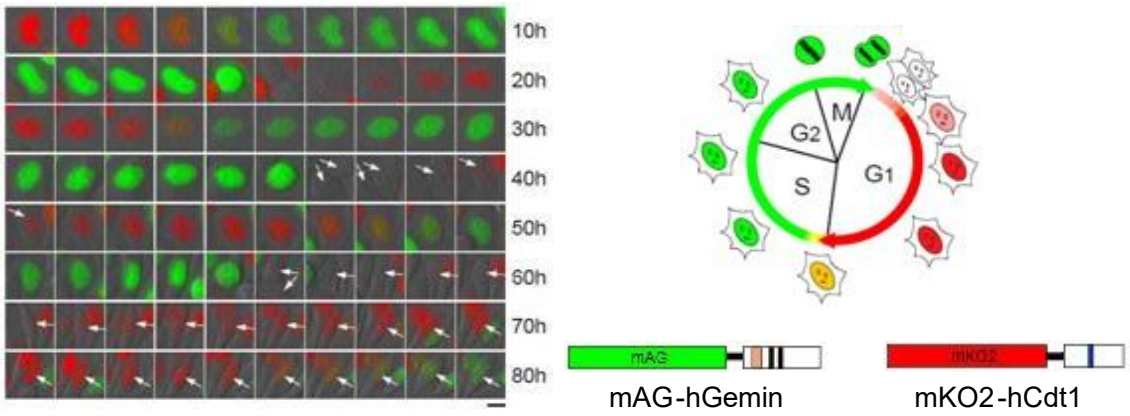


図 1-2 Fucci の蛍光の細胞周期依存性[30]
左図：Fucci を発現した HeLa 細胞の核の蛍光観察結果。Fucci を恒常的に発現するそれぞれの HeLa 細胞を 80 時間以上、タイムラプスイメージングし、蛍光の変化を観察した。
右図：細胞周期プローブ Fucci と細胞周期に応じた蛍光色変化の模式図

次に、Fucci がマウス個体内でも細胞周期プローブとして有用かが検討された。まず、Fucci を恒常的に発現する悪性腫瘍細胞(HeLa 細胞)をヌードマウスの血管の内腔に移植したところ、血管壁を通り抜ける様子や、さらに組織内に侵入し増殖する様子が観察された。すなわち浸潤と転移の過程を細胞の増殖形態と関連づけて観察することができた。浸潤および転移を行う細胞は、そのほとんどが G1 期であったが、転移先では増殖が活発で S/G2/M 期の細胞が優勢であった(図 1-3)。

[28] Fucci:Fluorescent Ubiqutination-based Cell Cycle Indicator
[29] HeLa 細胞：ヒト由来の最初の組織培養株(岩波生物学辞典、第 5 版、2013)
[30] ERATO「宮脇生命時空間情報プロジェクト」研究終了報告書

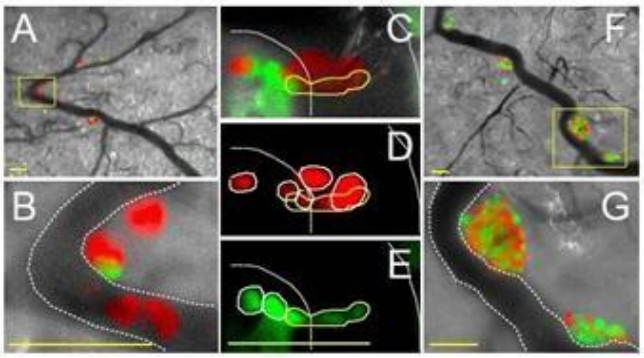


図 1-3 ヌードマウスでの腫瘍細胞の浸潤、転移と細胞周期[31)]
A-B: 血管内壁に留まり浸潤、転移の段階に入った細胞
C-E: 細胞が血管壁を通り抜ける浸潤、転移の瞬間
F-G: 転移先で活発に増殖する細胞

ついで Fucci を恒常的に発現するトランスジェニックマウスが作製された。13 日目の胎仔の頭部では、増殖が盛んな部分、例えば脳原基の脳室側、つまり神経前駆細胞がひしめく部分では、細胞の増殖が盛んなため、緑色と赤色の蛍光が混在していた。一方、増殖が終了した部分、例えば脳原基の脳膜側、分化、成熟した神経細胞が蓄積する部分では、赤色の蛍光が支配的であることが観察された。さらに、脳原基のスライスでタイムラプスイメージングを行ったところ、脳室面で分裂した神経前駆細胞が脳室から遠ざかりながら G1 期から S 期に進み、その後また脳室に近づきながら S/G2 期を経て M 期に入ることが確認され、神経系の発達に伴う細胞周期の進行がリアルタイムで観察された(図 1-4)。これらの研究成果は、東京都臨床医学総合研究所および癌研究会癌研究所との共同研究として発表された[1]。

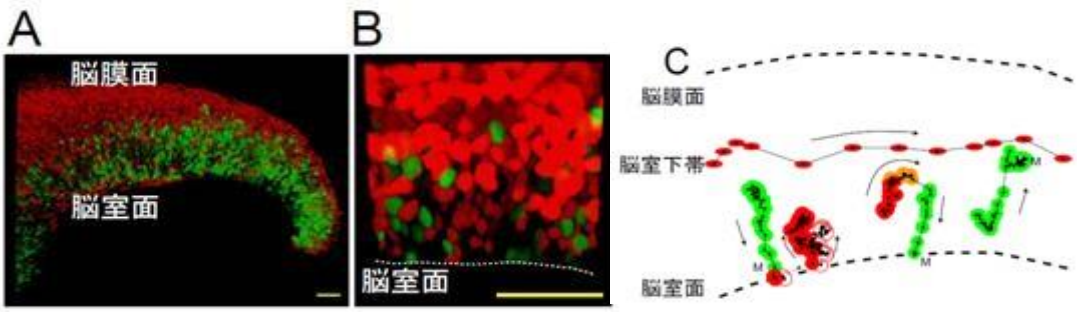


図 1-4 トランスジェニックマウスでの脳原基のイメージング[32)]
A-B: 脳室面では増殖が盛んな細胞、脳膜面では増殖を終了した細胞が多い
C : 細胞が移動しながら細胞周期を変化させる様子

理研と科学技術振興機構(JST)は共同プレスリリースで、生物個体で進行する細胞周期をリアルタイムで可視化する蛍光イメージング技術の開発に世界で初めて成功したと発表し、Fucci が医療分野における前臨床的実験や、創薬分野で細胞増殖に関わる薬の開発で活躍す

31 ERATO「宮脇生命時空間情報プロジェクト」研究終了報告書
32 ERATO「宮脇生命時空間情報プロジェクト」研究終了報告書

る技術として期待できるとした[33]。なお、mKO や mAG よりも高輝度の蛍光タンパク質である mCherry(赤色)と mVenus(緑色)を用いた Fucci2 も開発された[34]。

Fucci の創薬分野への応用を考慮し、抗がん剤に対する細胞の応答が細胞周期の観点から解析された。抗がん剤、etoposide は、DNA topoisomerase[35] II の阻害剤として知られており、この薬剤で処理された細胞は、細胞周期が G2 期で停止し(G2 arrest)、細胞死に至ると言われている。Fucci を発現させた HeLa 細胞と NMuMG 細胞[36]によるイメージングにより、etoposide に対する応答が解析され、HeLa 細胞は etoposide の濃度に依存せず、G2 arrest を示し、一方、NMuMG 細胞では etoposide の濃度に依存して多様な反応を示すことが判明した。1μM 未満の濃度で処理した時は G2 arrest を示し、1μM では多くの細胞で、G1 期で核が分断化する nuclear mis-segregation という現象がみられ、いずれも細胞死に向かう様相を呈した。しかし、10μM の高濃度になると細胞分裂をスキップして核の DNA 量を指数関数的に増大させる特異な細胞周期進行(endoreplication)を引き起こし、etoposide に対する抵抗性を示した(図 1-5)。従来の薬剤応答の評価実験は、セルソータに頼ることが多く、ある一点の時間における細胞集団のデータを扱っている。本実験の結果から、たとえ遺伝的背景が同じでも、個々の細胞が多様な応答を示すことが明らかになった。薬剤の評価やスクリーニングの分野における、動的な現象を解析するプローブ試薬とイメージング技術の有用性を示した例といえる[2]。

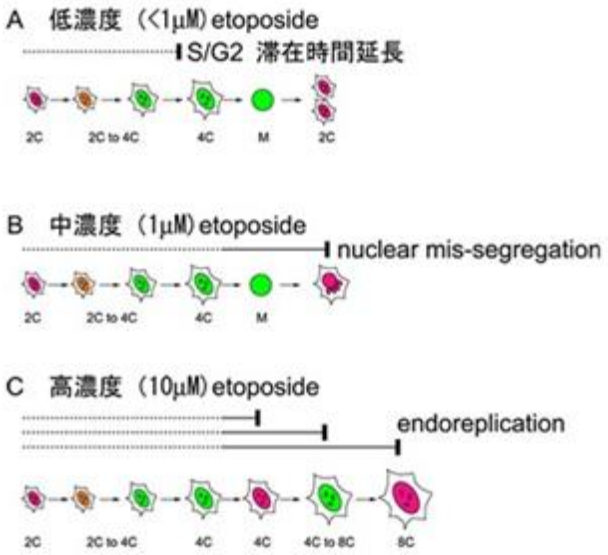


図 1-5 NMuMG 細胞の etoposide に対する細胞応答の多様性[37]
NMuMG 細胞は、etoposide の濃度に依存して異なる細胞周期を示した。

[33] 理研・JST 共同プレスリリース「DNA 複製や細胞分裂の様子をリアルタイムで観察する新技術」2008 年 2 月 8 日 http://www.riken.jp/~/media/riken/pr/press/2008/20080208_1/20080208_1.pdf
[34] 生化学, 84, 47-52, 2012
[35] DNA topoisomerase：DNA 鎖の共役的な切断・再結合反応を触媒する酵素の総称(岩波生物学辞典、第 5 版、2013)
[36] NMuMG 細胞：マウス由来の良性腫瘍細胞
[37] ERATO「宮脇生命時空間情報プロジェクト」研究終了報告書

細胞周期プローブ Fucci は、Thermo Fisher Scientific 社[38]、㈱医学生物学研究所(MBL)[39]、タカラバイオ㈱[40]の 3 社からそれぞれ標識蛍光タンパク質の違うものが試薬として販売されている。また、Fucci を組み込んだトランスジェニックマウスは理研バイオリソースセンターから学術研究を対象として一般に配布されている[41]。

Fucci 蛍光シグナルは核に存在するため、細胞個々の細胞周期進行を追跡するのに都合が良いが、細胞の種類や分化状態に関する情報を与えることはできない。そこで、G1 期にだけユビキチン化される hGem の細胞質への拡散効率を高めることによって、S/G2/M 期特異的に細胞全体を蛍光でラベルする Fucci プローブが開発され、あわせて蛍光タンパク質を異なる波長のものに置き換えてシグナルの色も多様化し、胎生期の神経上皮における神経前駆細胞が、DNA 複製と連関して形状を変えながら移動する様子が観察された[3]。JST と理研は共同プレスリリースで、「細胞の種類や分化状態によって異なる形状を呈するさまざまな細胞から成るサンプルの場合でも、細胞増殖に関連する多くの現象を可視化できる可能性が膨らみつつある」と報じた[42]。

細胞周期プローブ試薬の哺乳類以外の生物種への応用として、ゼブラフィッシュの Cdt1 と Geminin にそれぞれ mKO と mAG を連結させたプローブが作製され、ゼブラフィッシュで機能する zFucci が開発された[4]。その過程で、ヒトと魚との間で Cdt1 分解の制御メカニズムに違いがあることが示された。次に、全身に zFucci を発現するゼブラフィッシュが作製され、胚発生の過程における蛍光イメージングが行なわれ、様々な器官形成における細胞周期の進行が観察された(図 1-6)。その結果、特徴的な現象として、脊索の分化に伴った頭部から尾部へ伝播する 2 つの細胞周期遷移の波が検出された。すなわち、G1 期にある脊索前駆細胞の配列において、頭部から尾部に向かって G1-S 遷移が起こり、その後 G2 期にしばらくとどまった後、頭部から尾部に向かって M-G1 遷移が起こり、脊索の分化が完了していくことが観察された。このことは、胚発生過程で、細胞の増殖と分化が協調しながら進むことを示している。

---

[38] Thermo Fisher Scientific 社　HP　https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/life-science/cell-analysis/cell-viability-and-regulation/cell-cycle/live-cell-imaging-of-cell-cycle-and-division.html

[39] ㈱医学生物学研究所　HP　http://ruo.mbl.co.jp/bio/product/flprotein/fucci.html

[40] タカラバイオ㈱　HP　http://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.php?unitid=U100006751

[41] 理研トピックス「蛍光細胞周期プローブ Fucci を組み込んだマウスの提供開始」2009 年 3 月 30 日 http://www.riken.jp/pr/topics/2009/20090330/

[42] JST・理研共同プレスリリース「細胞周期の S/G2/M 期特異的に細胞のシルエットを描出することに成功」2008 年 12 月 20 日　http://www.jst.go.jp/pr/announce/20081220/index.html

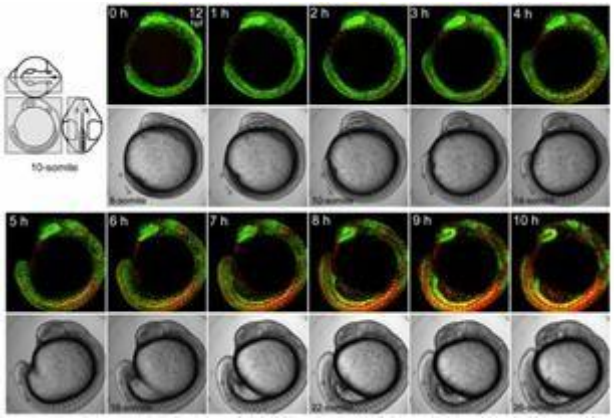


図 1-6 zFucci 形質転換ゼブラフィッシュの体節形成期のイメージング[43)]
左上の灰色で囲った領域空間を経時的に観察。成長と共に、細胞増殖を示す緑色のシグナルが減り、細胞分化を示すオレンジ色のシグナルが増えた。

また、zFucci および形質転換ゼブラフィッシュの提供が開始されることが報じられた[44)]。

(2)タンパク質分解活性プローブ

測定対象とする生命現象としてタンパク質の分解活性に注目し、この活性を計測するプローブ試薬の開発が行われた。

①オートファジー活性プローブ

細胞がもつタンパク質分解経路として、ユビキチンープロテアソーム系の他にオートファジーがある。オートファジーを検出するイメージング技術としては、細胞内成分を囲い込む袋状構造(オートファゴソーム[45)])に集積するタンパク質 LC3 に GFP を連結したものが広く用いられていたが、オートファジーの進行と共にオートファゴソームが消失するため蛍光が持続しないという問題があった。

オートファジーには、マクロオートファジーやミクロオートファジーなど複数の経路が知られているが、いずれのタイプのオートファジーでも、分解を受ける細胞質成分は最終的にリソソーム[46)]や液胞に取り込まれて分解される。細胞質の pH が 7 付近の中性であるのに対し、リソソームや液胞の pH は 4 付近の酸性である。そこで、コモンサンゴから取得した蛍光タンパク質 mKeima が、pH4 に耐性で且つリソソーム内の分解酵素に対しても耐性を持つことから、mKeima をプローブとしたオートファジー活性の簡便な測定法が開発された。

マウス胎児線維芽細胞に mKeima を発現させ、そのオートファジー活性を測定した。mKeima の cDNA をトランスフェクションで導入してから 24 時間後に、438nm と 550nm の 2 波長で励起したときの 610nm 以上の蛍光のイメージングを行ったところ、550nm 励起で強

[43] ERATO「宮脇生命時空間情報プロジェクト」研究終了報告書
[44] 理研プレスリリース「魚の胚発生における増殖と分化のパターンが生きたまま丸見え」2009 年 11 月 17 日 http://www.riken.jp/pr/press/2009/20091117/
[45] オートファゴソーム：オートファジーによって形成される液胞(岩波生物学辞典、第 5 版、2013)
[46] リソソーム：一群の加水分解酵素をもち、消化作用を営む細胞小器官(岩波生物学辞典、第 5 版、2013)

い蛍光を発する多数の小胞が観察された。550nm/438nm の蛍光強度の比は小胞内で高く、その領域の pH が酸性であることが示された。この小胞の分布を、リソソームを選択的に染色する蛍光色素の蛍光の分布と比較したところ両者の局在が重なったことから、この小胞がリソソームであることが確認された。これらの結果は、細胞内で生じたオートフォゴソームが mKeima を含みながらリソソームへ輸送され蓄積されて、その蛍光特性の変化として検出されたことを示している(図 1-7)[5]。

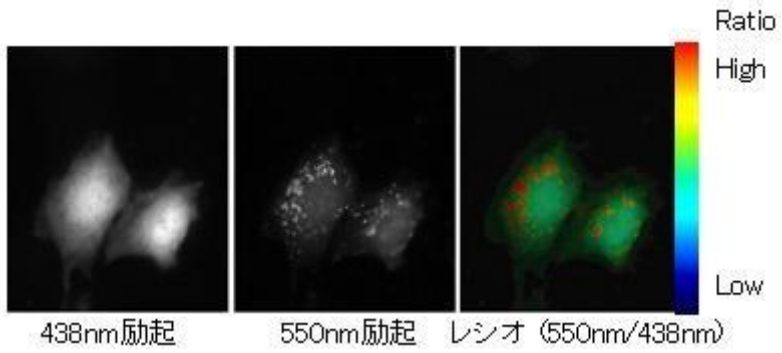


図 1-7　mKeima によるオートファジー活性のイメージング[47)]
赤色部分がリソソームへ輸送されたオートファゴソームを示している。

オートファジー活性の応用として、mKeima を疾患に関連した特定のタンパク質と融合させて発現させることで、特にそのタンパク質に注目したオートファジー活性の測定を行うことができる。また、オートファジーは選択的にオルガネラを分解するように作用することもあるので、mKeima を特定のオルガネラのみに設置することで、そのオルガネラに注目したオートファジーの活性の測定を行うことができる。実際、ミトコンドリアに局在する mkeima(mt-mkeima)が作製され、ミトコンドリアのオートファジー(マイトファジー)を選択的にイメージングすることに成功した(図 1-8)[5]。

[47] ERATO「宮脇生命時空間情報プロジェクト」研究終了報告書

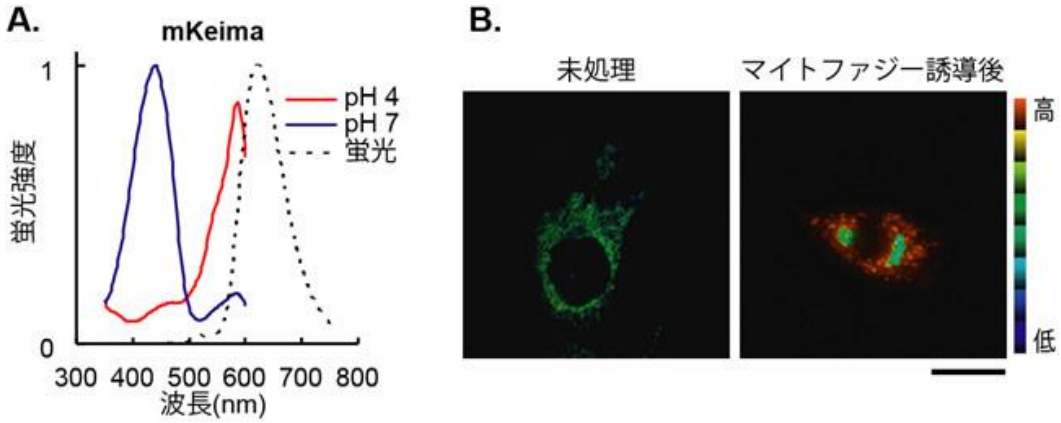


図 1-8　ミトコンドリア局在型 mt-mkeima を用いたマイトファジーの検出[48)]
(A) mkeima の励起、蛍光スペクトル。励起スペクトルは中性環境(青)では短波長側優勢であるが、酸性環境(赤)では長波長側優勢に変わる。
(B) マイトファジーを検出、可視化した例。mt-mkeima を発現する細胞のレシオ画像(スケールバー：20μm)。通常の状態ではミトコンドリア内の pH は中性であり、緑色で表示されるが(左)、薬剤処理によりミトコンドリアを傷害し、マイトファジーを誘導すると、ミトコンドリアとそこに局在する mt-mkeima がリソソームに移行し、酸性を示す赤色シグナルが検出される(右)。

オートファジーの破綻が関与すると報告されているがん化や細菌感染、神経変性疾患などの発症メカニズムの解明や治療薬の探索に、オートファジー活性プローブを使用できる可能性があると JST と理研から報じられた[49)]。

この研究成果は特許として出願され[50)]、登録された(表 2-5 参照)。

②プロテアソーム系タンパク質分解活性プローブ

ユビキチンープロテアソーム系によるタンパク質の分解反応は、単に変性タンパク質の除去だけではなく、細胞周期の制御、遺伝子発現の調節、ストレス応答、DNA の修復など、多種多様な生命現象の制御に積極的に関わっていることが明らかとなっている。この反応系を精確かつ簡便に測定する手法を開発することは、生命現象のメカニズムの解明だけでなく、その異常によって誘発される疾患に対する治療法や薬剤の開発にも大きく貢献するものと考えられる。

プロテアソームは樽型の構造をしたタンパク質分解装置であり、ユビキチン化の修飾を受けたタンパク質を、その立体構造をほどきながら内腔部に取り込み、数アミノ酸のペプチドにまで破壊する。しかし、すべてのタンパク質が完全に破壊されるわけではなく、中には分解が特異的に一部のみにとどまるタンパク質がある。例えば、転写因子 NFκB[51)]の 1 つで

[48] JST・理研共同発表「細胞の自食現象(オートファジー)を高感度で定量的に検出するイメージング技術を開発」　http://www.jst.go.jp/pr/announce/20110826/index.html
[49] JST・理研共同発表「細胞の自食現象(オートファジー)を高感度で定量的に検出するイメージング技術を開発」　http://www.jst.go.jp/pr/announce/20110826/index.html
[50] 宮脇，片山，特願 2011-526793，オートファジーの測定方法，2009 年 8 月 10 日
[51] NFκB：(核内因子κB、nuclear factor-kappa B)は転写因子として働くタンパク質複合体である、NFκB は 1986 年にノーベル生理学医学賞受賞者デビッド・ボルティモアらにより発見された(ウィキペディア、https://ja.wikipedia.org/wiki/NF-κB)

ある p105 というタンパク質は静止時には細胞質に分布し、転写因子としての活性が抑えられている。しかし、活性化のシグナルを受けるとユビキチン化され、プロテアソームで C 末側からおよそ半分までの構造は破壊されるが、残りは分解されずに p50 というタンパク質として放出される。そしてこの p50 が核に移行して遺伝子の転写活性を促す。これまでに、プロテアソームでタンパク質の分解を途中で停止させるための特徴的な構造として、同じアミノ酸が連続して並ぶ simple sequence とよばれる配列と、その分解が進む方向の後方に強固な立体構造である tightly folded domain が配置されることが必要であることが報告されている。p105 の場合、グリシンが高頻度に現れる glycine-rich region(GRR)とよばれる部分が simple sequence に、その N 末側にある Rel homology domain[52] が tightly folded domain に相当する。

こうした限定的な分解反応を利用したプローブ試薬が開発された。β バレル構造をとる蛍光タンパク質を tightly folded domain と想定し、これに simple sequence 配列をもつペプチド(分解停止ペプチド)を組み合わせることで、プロテアソームでの分解を途中で停止させるプローブ試薬が作製された。すなわち、波長が異なる 2 種類の蛍光タンパク質 I および II を、分解停止ペプチドをはさむように配置し、これらの C 末側にプロテアソームで分解を受けるタンパク質(デグロン[53] タンパク質)が連結された。分解停止ペプチドとしては p105 の GRR 配列を利用した。デグロンタンパク質が分解されるとき、これに直接連結された蛍光タンパク質 II は道連れとなって分解されて消失するが、もう 1 つの蛍光タンパク質 I は分解停止ペプチドによって分解を免れる。これにより、タンパク質の分解活性を 2 波長の蛍光強度の変化として測定することができる(図 1-9)。

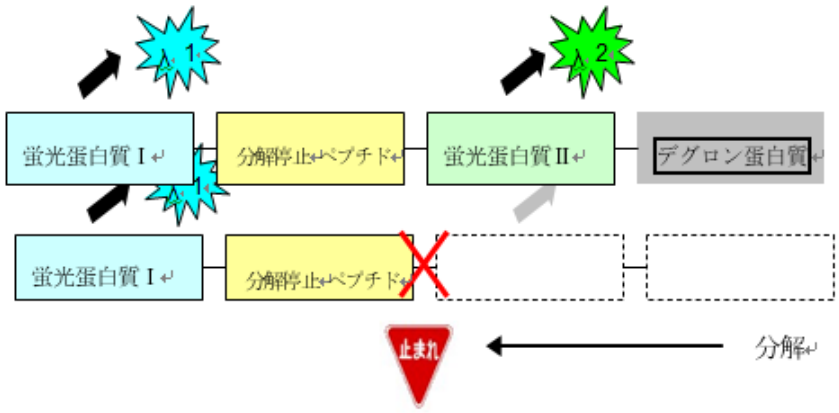


図 1-9 プロテアソーム系タンパク質分解活性プローブの概念図[54]
上図：タンパク質の分解活性が低いときには、2 色の蛍光が観察される。
下図：タンパク質の分解活性が高まると、1 色の蛍光のみが観察される。

[52] Rel homology domain：真核細胞転写因子ファミリーに見られるおよそ 300 アミノ酸残基の DNA 結合/二量体形成ドメイン Wikipedia、 https://en.wikipedia.org/wiki/Rel_homology_domain)
[53] デグロン：(degron)基質タンパク質に存在するタンパク質分解のシグナルとなる固有のアミノ酸配列やそれによって作られる構造(実験医学増刊、 https://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/keyword/2466.html)
[54] ERATO「宮脇生命時空間情報プロジェクト」研究終了報告書

蛍光タンパク質として mCherry と Venus、またデグロンタンパク質を NFκB の阻害タンパク質である IκBα としたプローブ試薬が作製され、HeLa 細胞でタンパク質分解活性プローブとして機能することが確認された。この研究成果は特許として出願され[55]、登録された(表 2-5 参照)。

(3)酸化ストレスプローブ

転写因子 NF-E2-related factor 2(Nrf2)は、細胞内で発生した酸化ストレスに応答して防御機能を担う抗酸化タンパク質の発現を誘導する。細胞に酸化ストレスがない状態では、Nrf2 は調節因子である Kelch-like ECH-associated protein 1(Keap1)というタンパク質と結合した形で細胞質に存在している。このとき、Keap1 はユビキチンリガーゼ複合体と結合して、Nrf2 のユビキチン化を促進している。ユビキチン化された Nrf2 はプロテアソームによって分解を受けるため、その増加が抑えられている状態にある。一方、細胞が酸化ストレスにさらされると、活性酸素が Keap1 と反応し、その構造に変化を与えることで Nrf2 からの解離が促進されるとともに Nrf2 のユビキチン化が抑制され、分解が抑制された Nrf2 は、転写因子としての機能を発揮するようになる[56]。宮脇らは、この酸化ストレスに特異的に働くユビキチンープロテアソーム系のタンパク質分解反応を利用したプローブ試薬を開発した。

Keap1 との結合部位およびユビキチン結合部位を含む Nrf2 のドメインの N 末側に蛍光タンパク質 mKO を連結させた。また、C 末側には自己切断ペプチドである T2A を介して Keap1 を連結させたプローブ試薬を作製した。細胞内で発現されると Keap1 は切り離されて、Nrf2 ドメインに結合する。このプローブ試薬は、酸化ストレスがない場合には、Nrf2 とそれに連結された mKO はプロテアソームにより分解されるため蛍光を発しない。一方、酸化ストレスが増加したときはその分解が抑制される結果、mKO の蛍光強度が増加する(図 1-10)。

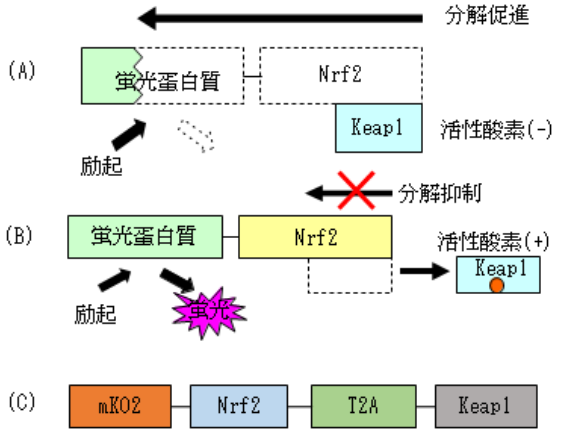


図 1-10 酸化ストレスプローブの概念図[57]
(A): 酸化ストレスがないときは、Nrf2 と蛍光タンパク質の分解が促進される。
(B): 酸化ストレスが増加したときは、Nrf2 と蛍光タンパク質の分解が抑制される。
(C): 作製された酸化ストレスプローブの模式図

[55] 宮脇, 平野, 特願 2011-550970, 蛋白質の分解活性を測定するためのプローブ試薬, 2010 年 1 月 22 日
[56] ERATO「宮脇生命時空間情報プロジェクト」研究終了報告書
[57] ERATO「宮脇生命時空間情報プロジェクト」研究終了報告書

宮脇らは、酸化ストレスプローブを発現させたHeLa細胞をマウスの腹腔に移植し、動物の個体内で腫瘍細胞の増殖に伴う酸化ストレスの動態を可視化することに成功し[58]、これらの研究成果を特許として出願した[59]。本特許出願は登録されている(表2-5参照)。

(4)新規蛍光タンパク質の開発

宮脇は、生物個体でのライブイメージングでのプローブ試薬の材料として適した蛍光タンパク質の開発をめざし、これまでほとんど報告されていなかった動物から蛍光タンパク質を単離し、必要な改良を行った。

脊椎動物であるナメクジウオのゲノム配列から、GFPに似た配列をもつ26個の遺伝子に注目し、それらの遺伝子を合成してタンパク質の特性を評価した。そのうちの1つは、量子収率(励起によって蛍光分子に吸収された光子数と、蛍光によって放出された光子数の比)が0.93で、これまで報告された蛍光タンパク質の中で最も高い値を持っており、銅に対する耐性も強いことがわかった[60]。また、別のタンパク質からは、メタノールに耐性を示すものも見出された[61]。

ニホンウナギの筋細胞にも緑色の蛍光タンパク質が存在することが報告されていたが、その構造や発光のメカニズムがオワンクラゲ GFP とは異なることが予測されたことから、仔魚であるシラスウナギからcDNAが作製され、すでに知られている断片的なアミノ酸配列の情報をもとに全長遺伝子がクローニングされた。得られた緑色蛍光タンパク質をUnaGと命名し、その発光メカニズムの詳細が解明され、同時に生化学検査試薬としてのUnaGの有用性が発見された[6]。

UnaGは139個のアミノ酸残基から成る蛍光タンパク質で、その構造から脂肪酸結合タンパク質のファミリーに属することから、脂溶性の低分子をリガンドとして取り込むことが予想された。UnaG遺伝子を導入された大腸菌とHeLa細胞の蛍光発色を調べたところ、大腸菌では発色せず、HeLa細胞でのみ発色が見られた(図1-11)。このことから、UnaGが蛍光発色するためには、哺乳類培養細胞由来の何らかのリガンドの結合が必要なことが示唆された。HeLa細胞で作らせた蛍光性UnaG(ホロ UnaG)からリガンドを抽出し解析するとともに、大腸菌で作らせた無蛍光性UnaG(アポUnaG)を蛍光性に変える生体成分を探索することにより、ビリルビンがUnaGのリガンドであることが明らかになった(図1-12)。

[58] ERATO「宮脇生命時空間情報プロジェクト」研究終了報告書
[59] 宮脇, 佐々木, 特願 2010-500805, 酸化ストレスを測定するためのプローブ試薬, 2008年2月29日
[60] ERATO「宮脇生命時空間情報プロジェクト」研究終了報告書
[61] ERATO「宮脇生命時空間情報プロジェクト」研究終了報告書

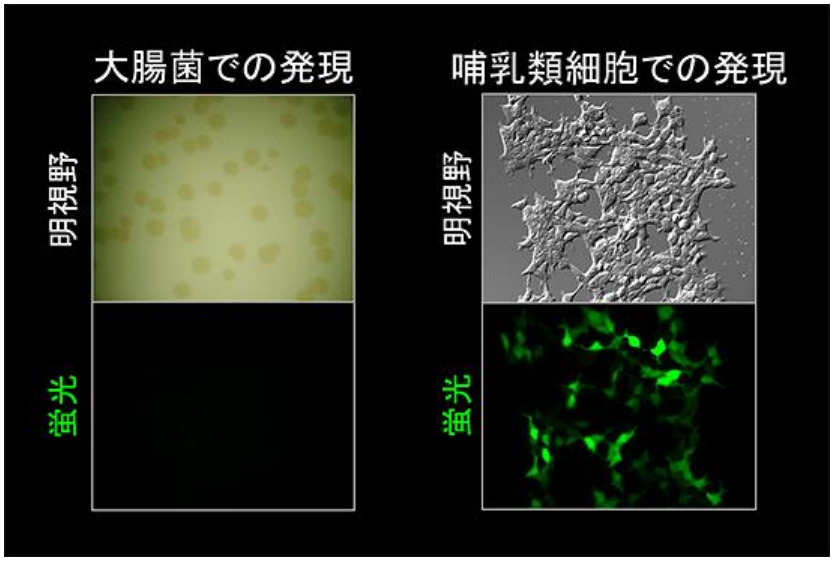


図 1-11　UnaG 遺伝子を導入した大腸菌および哺乳類細胞(HeLa 細胞)の蛍光画像[62)]
UnaG 遺伝子を導入された大腸菌のコロニーは光っていないが、HeLa 細胞は緑色に光っている。

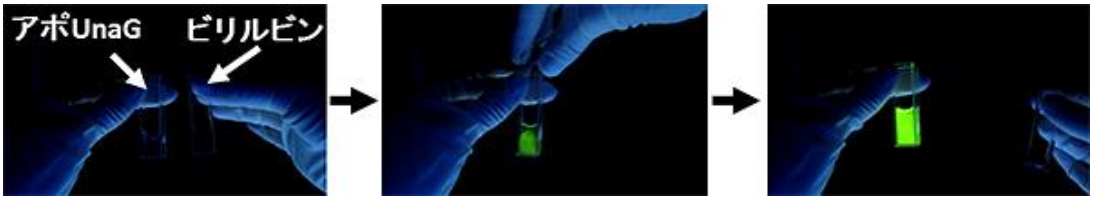


図 1-12　大腸菌で作らせたアポ UnaG とビリルビンとの混合実験[63)]
混合の瞬間に緑色蛍光が発色する。アポ UnaG により直接的なビリルビンの蛍光検出が可能になる。

ホロ UnaG の結晶構造解析が行なわれ、1.2 オングストロームの分解能でその構造が決定され、ビリルビン分子が UnaG タンパク質内部のポケットに完全にはまり込んでいることが明らかになった(図　1-13)。ビリルビンを構成する 4 つのピロール環(A、B、C、D)のうち、蛍光発生に関与すると考えられる A/B 環もしくは C/D 環がそれぞれ 1 つの平面上に配置されており、UnaG とビリルビンとの結合が非常に特異的で、他のビリルビン誘導体は結合できないことが示唆された[64)]。

[62] 理研プレスリリース「ニホンウナギから人類初のビリルビンセンサー」2013 年 6 月 14 日
http://www.riken.jp/pr/press/2013/20130614_1/
[63] 理研プレスリリース「ニホンウナギから人類初のビリルビンセンサー」2013 年 6 月 14 日
http://www.riken.jp/pr/press/2013/20130614_1/
[64] 理研プレスリリース「ニホンウナギから人類初のビリルビンセンサー」2013 年 6 月 14 日
http://www.riken.jp/pr/press/2013/20130614_1/

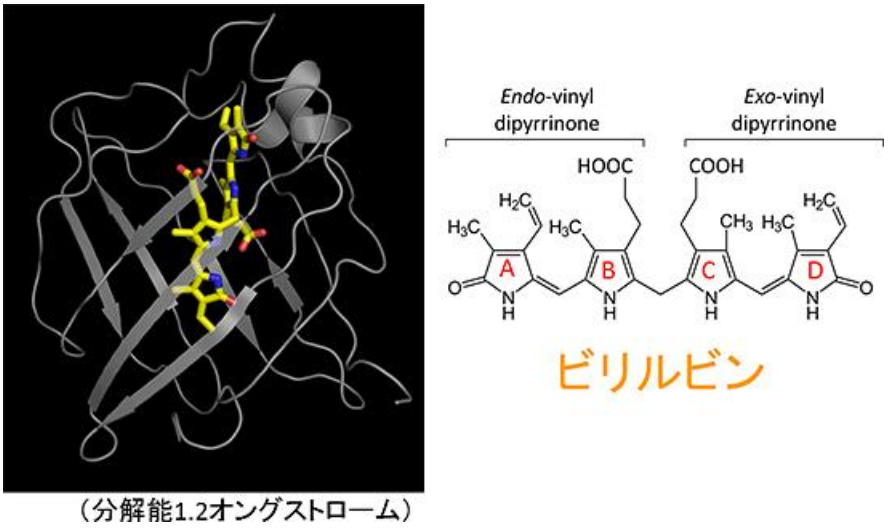


図 1-13　ホロ UnaG の結晶構造とビリルビン分子構造[65)]
UnaG タンパク質部分を灰色リボンで、ビリルビンをボール＆スティック（炭素原子が黄色、酸素原子が赤色、窒素原子が青色）で表す。ビリルビンは UnaG タンパク質が作るポケットの中に、奥から（図では下から）D 環、C 環、B 環、A 環の順にはまり込んでいる。A 環と B 環、C 環と D 環がそれぞれ同一平面上に配置されている。ビリルビンは B 環と C 環の間で大きくねじれている。

ビリルビンは赤血球に含まれる酸素運搬タンパク質ヘモグロビンの代謝産物の 1 つで、血液中のビリルビン濃度が異常に増えると組織に沈着し黄疸症状が現われることから、血清ビリルビン濃度は肝臓機能を評価する指標として健康診断の生化学検査項目に含まれている。特に、新生児は胎生期に使った余分な赤血球を壊すために黄疸になりやすく、重篤な場合、核黄疸やビリルビン脳症などの後遺症が残る可能性があるため、血清ビリルビン濃度の測定は必須となっている。現行のビリルビン測定法は、複雑な工程を必要とする比色法で実施されており、煩雑で時間がかかり、感度が低く、様々な因子に影響されやすいなどの問題点が指摘されている。

そこで、UnaG とビリルビンとの結合力が極端に強いことを利用して、UnaG をビリルビンセンサーとするヒト血清ビリルビン濃度の蛍光測定法が開発された（図 1-14）。この測定法では血液中のアルブミンと結合したビリルビンも検出することが可能で、その検出感度は従来法と比べて 3 桁以上向上し、測定に必要な血液量が微量となるため、出生時体重が 1,000g 未満の超低出生体重児の採血時の負荷を軽減できると期待される。

[65] 理研プレスリリース「ニホンウナギから人類初のビリルビンセンサー」2013 年 6 月 14 日 http://www.riken.jp/pr/press/2013/20130614_1/

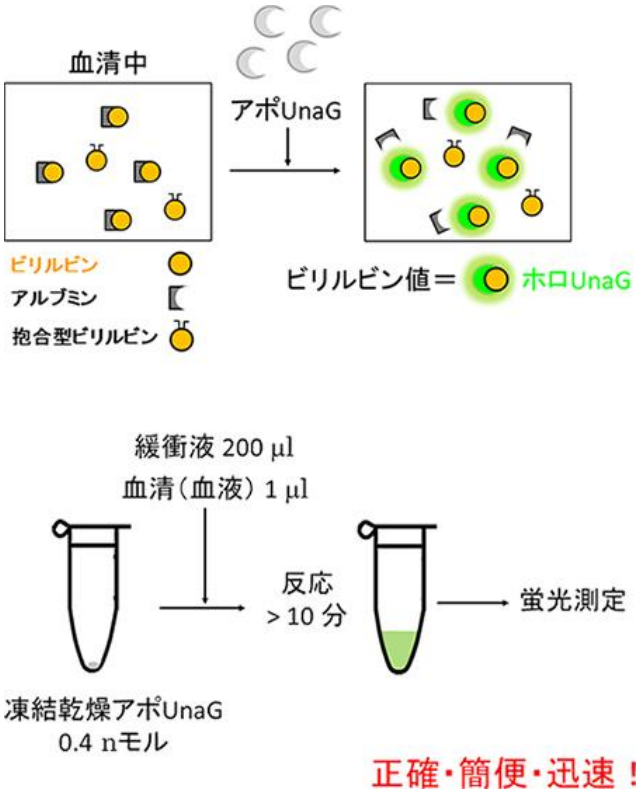


図 1-14　アポ UnaG を使って開発したビリルビン定量法[66)]

アポ UnaG はアルブミンよりも 1,000 倍ほど強くビリルビンに結合する。しかもホロ UnaG が強い緑色蛍光を発するので、直接的なビリルビン検出が可能となる。アポ UnaG の凍結乾燥品が入ったチューブに緩衝液と極少量のサンプルを加えて蛍光を測るだけでビリルビンの定量ができる。

本研究によりウナギが光る仕組みが解明され、人類初のビリルビンセンサーが開発されたと理研からプレスリリースがあり[67)]、それを受け「黄疸検査応用に期待」との報道が各社から行われた[68)]。

(5) 高輝度発光プローブの開発

発光イメージングは蛍光イメージングと比べると励起光を照射する必要がなく、自家蛍光の影響を受けないなど、動物個体深部からのシグナルの検出に有利な点が多い。しかしこれまではその発光の弱さから、イメージングに数分の露光時間を要し、解像度の高いイメージングが困難であったことから、明るい発光プローブの開発が待たれていた。

---

66 理研プレスリリース「ニホンウナギから人類初のビリルビンセンサー」2013 年 6 月 14 日 http://www.riken.jp/pr/press/2013/20130614_1/

67 理研プレスリリース「ニホンウナギから人類初のビリルビンセンサー」2013 年 6 月 14 日 http://www.riken.jp/pr/press/2013/20130614_1/

68 毎日新聞「ウナギ：たんぱく質、緑に発光　血液成分と反応、肝機能検査に応用も」2013 年 6 月 22 日、東京読売新聞「ウナギでピカッ　肝機能検査　血中物質光らす試薬　少量採血　黄だん判定 10 分」2013 年 6 月 18 日、日本経済新聞「ウナギに光るたんぱく質、理研発見、血液検査に活用、人間の肝機能少量で判定」2013 年 6 月 14 日

ホタル由来のルシフェラーゼと蛍光タンパク質 Venus を連結させることで、高い発光効率を示す発光蛍光タンパク質 ffLuc-cp156 が開発された。ffLuc-cp156 を全身に発現するトランスジェニックマウスを作製し、外部からルシフェリン[69]を与えることで動物個体の発光イメージングが行われた。例えば、ルシフェリンを餌に混ぜて与えた実験では、マウスが餌を食べたわずか 2～3 分後に腹部からの発光が検出された(図 1-15)。マウスからの発光は、家庭用のデジタルカメラでも撮影できるほど強く、自由行動を行うマウスをリアルタイムでイメージングすることに成功した[7]。

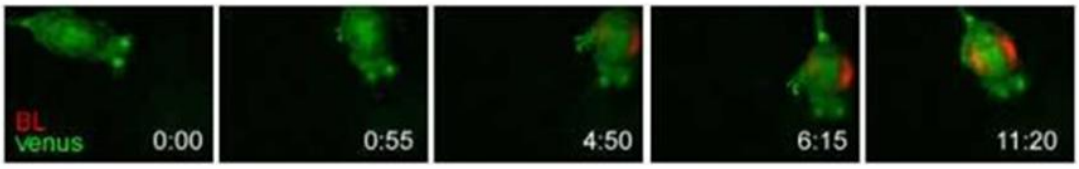


図 1-15 ルシフェリン入りの餌を食べた ffLuc-cp156 発現マウスの発光イメージング[70]
赤：発光シグナル、緑：蛍光シグナル

1.5.2 数理解析グループ

数理解析グループは、ショウジョウバエを材料として、細胞の増殖や分化、移動などのイメージングデータに対し、数理的な解析を加えることで、これらの現象の時間的、空間的な制御に関してモデルの構築を行うことを目標とした。

ショウジョウバエの幼虫の翅の成虫原基、および蛹で進行する翅の発生を対象として、その細胞の動態のイメージングを行うために、生きている試料で発生期のタイムラプスイメージングが行えるような観察系が構築された。例えば、約 3 時間の観察に耐える成虫原基や蛹の処理法、細胞膜のみに GFP を発現する系統や Fucci を発現する系統の樹立などである。構築された観察系を用いて翅の発生過程での細胞増殖や細胞周期をイメージングすることで、蛹の翅の発生過程で見られる細胞競合(cell competition)[71]と呼ばれる現象が、1 つのモデル化の対象として扱える可能性があることが示された。

しかしながら、2009 年度途中で当グループの研究員が退職したため、本研究は停止された。

1.5.3 光学システム開発グループ

光学システム開発グループは、生物個体に発現されたプローブ試薬の蛍光や発光をイメージングするための顕微鏡システムや、生体試料を顕微鏡のステージ上で長時間維持させるインキュベータなどの周辺装置を開発することを目標とした。

---

[69] ルシフェリン：(luciferin) 生物発光における発光物質で、ルシフェラーゼの触媒作用の基質となる物質の総称(岩波生物学辞典、第 5 版、2013)

[70] ERATO「宮脇生命時空間情報プロジェクト」研究終了報告書

[71] 細胞競合(cell competition): 生物個体を構成する細胞社会において、異なる性質を持った細胞間で生じる生存を賭けた多彩な「競合」現象(科研費新学術領域研究「細胞競合」、http://cell-competition.com/about/)

(1) 多光子励起顕微鏡励起位置自動調整システムの開発

多光子励起顕微鏡を改良して、顕微鏡に入射されるレーザー光の強度を常にモニタすることで、波長が変更された場合でもレーザービームが最適な角度で入射されるように光軸を自動補正する流鏑馬システムが開発された。神経細胞に蛍光タンパク質を発現させたマウスの大脳皮質を励起波長 920nm で二光子励起イメージングを行い、光軸を自動補正することで鮮明な像を得ることが可能になった(図 1-16)。

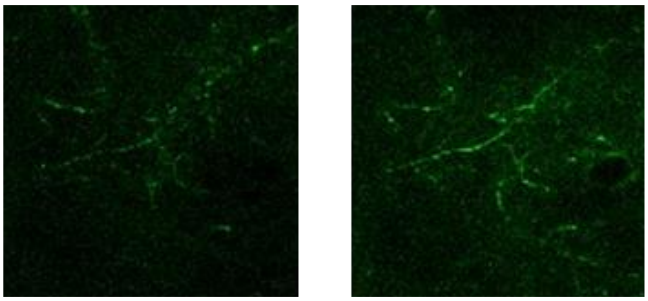


図 1-16　光軸の自動補正による二光子励起イメージング[72)]
左が光軸補正前、右が光軸補正後の画像

(2) 多光子励起顕微鏡によるマルチカラーイメージング

多光子励起顕微鏡の応用として、ストークスシフトが大きい蛍光タンパク質 mKeima を利用したマルチカラーイメージング法が検討された[8,9]。種々の蛍光タンパク質の二光子吸収断面積を測定し、Enhanced Cyan Fluorescent Protein (ECFP[73)])や Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP[74)])などが、そのスペクトルで mKeima と重なりを持つことが見出された[9]。その結果、細胞の核やミトコンドリア、小胞体などのオルガネラを mKeima と ECFP、または mKeima と EGFP で染め分けて二光子励起イメージングを行い、それぞれ 1 つの励起波長で、同時に 2 色の蛍光のイメージングが行えることが示された(図 1-17)。

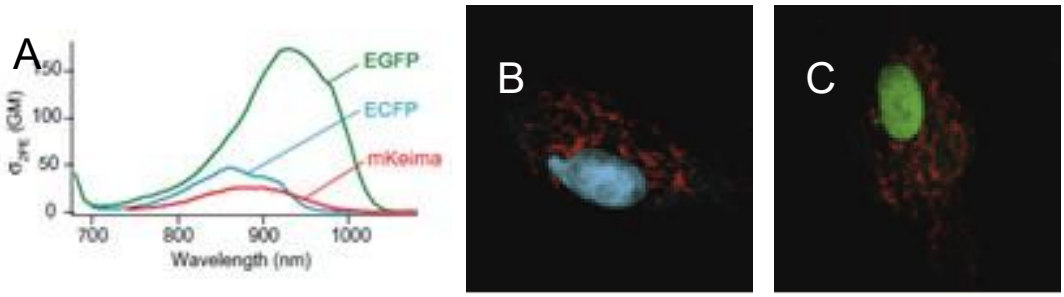


図 1-17　 mKeima を利用した 2 色同時イメージング[75)]
A: 蛍光タンパク質の二光子励起吸収断面積
B: ECFP-核と mKeima-ミトコンドリア、励起 880nm、ECFP の蛍光 485nm、mKeima の蛍光 618nm
C: EGFP-核と mkeima-ミトコンドリア、励起 960nm、EGFP の蛍光 518nm、mKeima の蛍光 618nm

[72] ERATO「宮脇生命時空間情報プロジェクト」研究終了報告書
[73] ECFP： 高感度シアン色蛍光タンパク質
[74] EGFP： 高感度緑色蛍光タンパク質
[75] ERATO「宮脇生命時空間情報プロジェクト」研究終了報告書

(3) フェムト秒レーザーによる DNA 損傷の可視化

多光子励起顕微鏡では、励起光源としてフェムト秒のパルスレーザーが使われるが、その高いピークパワーが生物試料、特に DNA に与える影響はあまり評価されていない。試料の上下の両側から励起光を照射できる正倒立顕微鏡が開発され、これに正立側から 680～1,080 nm の波長可変フェムト秒レーザー光を導入し、対物レンズを通して細胞に局所的に照射する光学系が構築された。照射に対する DNA の影響は、DNA の損傷部位に集積する性質を持つ Proliferating Cell Nuclear Antigen(PCNA[76])の動態から評価された。蛍光タンパク質 Venus で標識した PCNA を HeLa 細胞に発現させ、核の一部に 24 mW のレーザー光を照射したところ、PCNA が集光点に集積し(図 1-18)、分裂能が無くなることがわかった。一方、8 mW の照射では PCNA の弱い集積が見られるものの細胞分裂に異常は無く、通常の二光子励起イメージングで使用されるパワー(<5mW)では DNA 損傷を与えないことが明らかになった。

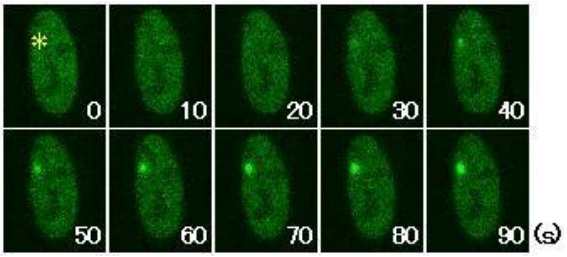


図 1-18 フェムト秒レーザーによる DNA 損傷[77]
レーザー光が照射された点(*)に、DNA 損傷に伴う PCNA の集積が観察された。

(4) 赤外顕微鏡の開発

一般的に生体の深部組織の観察には、水やヘモグロビンなどによる吸収が少ない 700～900 nm の波長域の光が最適であるとされている。まず、実際の生体組織での光の透過性を知るために 200μm 厚のマウスの大脳のスライス標本を作製し、可視域から 2,400nm までの透過スペクトルを測定した結果、1,400nm 付近に小さな水の吸収ピークがあるものの、1,600nm までは長波長側に行くほど透過率が上昇していくことが判明した。しかし、1,800nm 以降は大きな水の吸収のピークが現れるため、逆に透過率の低下が見られた。そこで、光源を赤外波長域の輝度が高いハロゲンランプとし、顕微鏡内部のレンズや、光学素子、対物レンズのすべてで 1,000nm 以上の光の透過率を 80%以上に向上させ、さらに落射照明による蛍光観察のための光路の設置、および検出器に 1,000～1,600nm の波長でも高い分光感度を有する冷却型の InGaAs カメラを採用することで、1,600 nm の波長で微分干渉観察が行える赤外顕微鏡が作製された。

宮脇は、1,000nm 以上の波長を発振するレーザーを光源とした二光子励起顕微鏡の開発を継続することで、従来の限界を超えた深部組織のイメージングを目指した[78]。

---

[76] PCNA：(増殖細胞核抗原)、DNA ポリメラーゼデルタのコファクターとして機能し、リーディング鎖の DNA 複製に関与するホモ三量体タンパク質で DNA 合成期の有用なマーカー(クロモテック・カタログ、http://www.funakoshi.co.jp/contents/8099)

[77] ERATO「宮脇生命時空間情報プロジェクト」研究終了報告書

[78] ERATO「宮脇生命時空間情報プロジェクト」研究終了報告書

(5)シリコン樹脂を利用した細胞培養デバイスの開発

シリコン樹脂で高い気体保持能を持つ poly(dimethylsiloxane)(PDMS)を利用して、空気の補充を必要としない細胞の培養デバイス Self-Contained Onstage Breathing Aapparatus(SCOBA) が開発された[10]。

38mmφ×30mmの円柱状に加工したPDMSのブロックの底面に幅1mm×高さ0.5mmの溝を彫り、この面にカバーガラスが接着し、溝とカバーガラスの間にできた小空間が、細胞を培養するためのチャンバーとして使用された(図 1-19)。

PDMSのブロックはあらかじめ一晩CO_2インキュベータに置くことで、5%CO_2濃度の空気を充満させ、チャンバーに細胞と培養液を入れ、ブロック全体にアクリル製のキャップを被せることで大気から遮断される。PDMSに充填された空気は徐々にチャンバー側に抜けて培養液に供給されるため、長時間にわたり培養液のpHを細胞の生育に適正な値に維持することができる。培養液の温度は、油浸の対物レンズをヒータで暖めることで約37℃に保持したころ、3 日間にわたりそのチャンバー内で HeLa 細胞を生育させることができた。SCOBAは特許出願されたが[79]、 登録には至っていない(表2-5参照)。

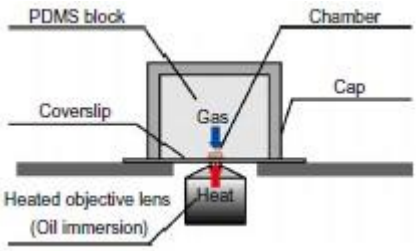


図 1-19　シリコン樹脂による簡易型細胞観察用チャンバー[80]

(6)生体組織の透明化技術の開発

生体組織の深部を光学的に観察しようとする場合、光が組織内部で散乱するため、深くなるにつれて像がぼけてしまう。深部まで観察できるとされる二光子励起顕微鏡でも0.7mm程度の深さまでの観察が限界である。また、当時用いられていた固定組織の透明化試薬は有機溶媒系であるため、あらかじめ標識した組織の蛍光が、その処理過程で消失してしまう問題があった。これらの問題点をクリアするために、固定した生体組織を透明化する試薬Sca*I*eA2 が作製され、組織を破壊することなく表面から数mmの深部を高精細に観察する技術が開発された[11]。Sca*I*eA2は尿素、グリセロール、界面活性剤を成分とする水溶性試薬である。

ホルマリン固定したマウスの胎児や脳をこの試薬で 2 日から 2 週間処理すると、組織が透明になり、その内部に発現された蛍光タンパク質の蛍光が保持されることが判明した(図1-20)。

---

[79] 宮脇，星田，平野，特願 2008-176138，培養細胞観察用チャンバー及びその使用，2008 年 7 月 4 日
[80] ERATO「宮脇生命時空間情報プロジェクト」研究終了報告書

図 1-20　Sca*I*eA2 試薬による組織の透明化[81)]
左図：ホルマリン固定後生理食塩水溶液に浸したマウス胎児
右図：ホルマリン固定後 Sca*I*eA2 試薬に浸したマウス胎児

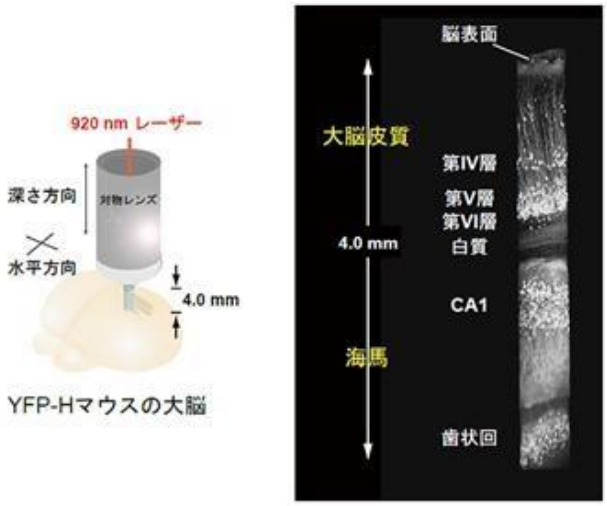


図 1-21　二光子励起顕微鏡で撮影した透明化したマウスの脳の内部[82)]
左図：YFP で蛍光標識した形質転換マウス(YFP-H マウス)をホルマリン固定し、その全脳を作動距離 4mm の対物レンズで観察。
右図：脳表面から大脳皮質、白質、海馬 CA1、歯状回まで高精密に確認。

神経細胞を蛍光タンパク質 YFP で標識したマウスの全脳を Sca*I*e で処理し、深部まで観察できるよう、新たに開発された作動距離が 4mm と長い対物レンズを使用した二光子励起顕微鏡で観察したところ、脳表面から、皮質、白質、海馬の歯状回にいたる神経回路が可視化され、その三次元構造の構築を行うことが可能になった(図 1-21)。

「Sca*I*e 技術の普及によって、実験動物、特に哺乳類動物の個体、器官、組織レベルでの蛍光イメージング技術が一段と進展することが期待できる」と理研からプレスリリースがあった[83)]。なお、本プロジェクト終了後も Sca*I*e 技術の改良研究は継続されている(2.2.2(1)② 参照)。

[81] ERATO「宮脇生命時空間情報プロジェクト」研究終了報告書
[82] ERATO「宮脇生命時空間情報プロジェクト」研究終了報告書
[83] 理研プレスリリース「生体をゼリーのように透明化する水溶性試薬「Sca*I*e」を開発」2011 年 8 月 30 日 http://www.riken.jp/pr/press/2011/20110830_3/

第 2 章　プロジェクト終了から現在に至る状況

2.1　各研究テーマの終了後の状況に関する基礎データ

2.1.1　調査方法

調査は、文献調査(プロジェクト報告書、解説、原著論文など)、インターネットによる調査、各種データベースによる業績(論文・特許・受賞他)の調査からなる基礎データ調査と、プロジェクト関係者や外部有識者へのインタビュー調査を行った。これに基づき、プロジェクト期間中の成果の調査時点での発展状況及び波及効果等についてまとめた。

(1)基礎データ調査の方法

基礎データ調査については、基本的にプロジェクトメンバーを対象として、プロジェクトの研究に関連した成果の発展状況について、文献による成果の把握と、論文や研究助成金の獲得状況等のデータ調査を行った。各項目について利用したデータベースと調査範囲等を下記に記す。

①論文

プロジェクト期間中の論文は、2006 年 10 月～2013 年 12 月に発表されたもの及びプロジェクトの終了報告書に成果論文としてリストアップされている論文とした。成果論文リストの中で in press、submitted 等と表記があり、その後発表されたものについても基本的には期間中の論文とした。

プロジェクト終了後の論文は、2014 年 1 月以降に発表され、かつ本プロジェクトメンバーが著者になっている論文を収集した(ただし、プロジェクト期間中の論文に含むものは除く)。収集した論文の中で、本プロジェクトとの関連を Abstract 等で確認し、関連のあるものを関連論文としてリストアップした。

データベースは、エルゼビア社の Scopus および、クラリベイト・アナリティクス社の Web of Science を利用した。

②競争的研究資金の獲得状況

プロジェクトメンバー全員を対象として、研究内容が本プロジェクトの研究内容に関連している研究課題について調べた。表 2-1 はその中で、競争的研究資金の総額が 1 千万円以上のものを抽出し示した。

データベースとしては、調査対象者の所属する研究室や本人の WEB サイト及び KAKEN 科学研究費助成事業データベース等の競争的研究資金に関する検索サイトと、補助的に Google 等の検索サイトを利用した。

③特許の出願・登録状況

プロジェクト期間中の特許は、プロジェクト終了報告書の成果リスト記載の特許とした。プロジェクト終了後の特許は 2013 年 4 月以降に出願された特許でかつ、プロジェクト関係

者が発明者に入っているものから、プロジェクトの成果と関連のある特許を収集した。

データベースは、主に PatentSquare（パナソニックソルーションテクノロジー(株)）を利用し、補助的に特許情報プラットフォームと Espacenet を利用した。

④招待講演

プロジェクト関係者の終了後の招待講演実績を調査対象者の所属する研究室や本人の WEB サイトの調査、Google 等の検索サイト、①で記述した文献データベースの会議録情報等を併せて収集し、かつインタビューの際に主な招待講演について確認した。

⑵インタビュー調査の方法

インタビュー調査は本プロジェクトメンバーと外部有識者(本プロジェクトと直接関係がないが、研究総括の研究をよく把握している研究者)数名について、実施した。プロジェクト関係者には、基礎調査で知り得た情報の本プロジェクトとの関連や、その後の展開等についての情報を収集した。外部有識者からは、本プロジェクトの成果及び、本プロジェクト外部から見た本プロジェクトの意義や、当該研究分野における波及効果等の意見を収集した。

2.1.2　競争的研究資金の獲得状況

本プロジェクト期間中から調査時点までのプロジェクトメンバーも含めた競争的資金の獲得状況を表 2-1 に示す。また、それぞれの概要を表 2-2 に記載した。

文部科学省研究事業「革新的細胞解析研究プログラム」(2009 年度～2013 年度)[84]、および科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「ズームイン(高細密)とズームアウト(広視野・深部)観察を可能にする革新技術の開発」(2010 年度～2014 年度)[85]において、バイオイメージング研究が継続された。

また、日本医療研究開発機構(AMED)戦略推進部(脳と心の研究課)「革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクト(Brain/minds 革新脳)」(2014 年度～2023 年度)で、宮脇はプロジェクトリーダーを務めている(図 2-1)。

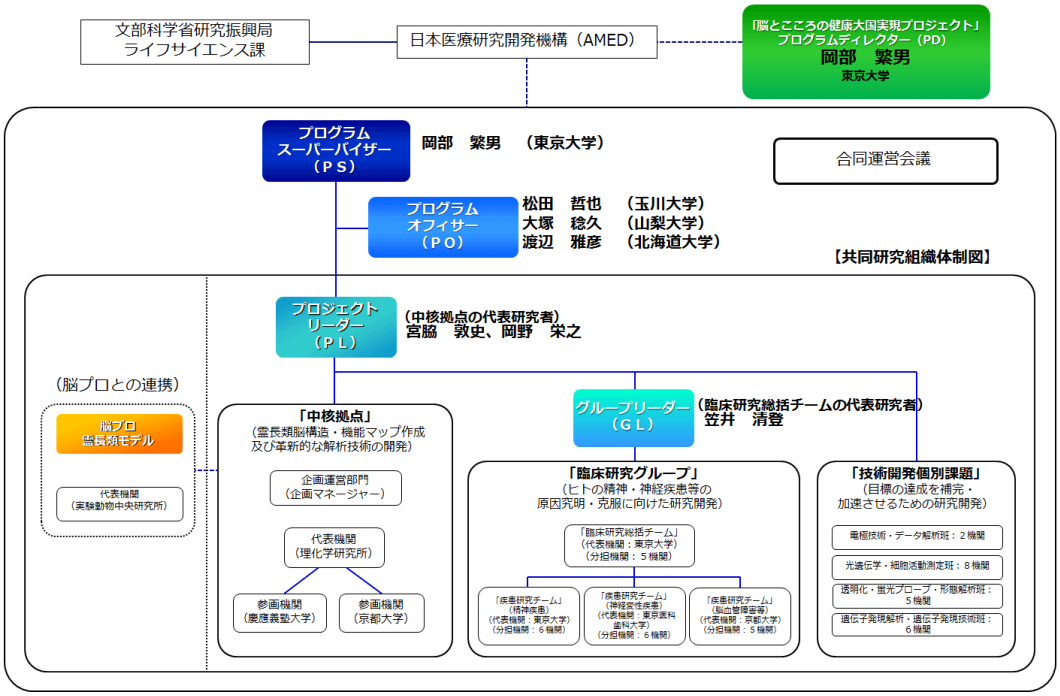


図 2-1 革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクト[86]

宮脇は、本プロジェクトの成果をさらに発展進化させる取り組みとして、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「共鳴誘導で革新するバイオイメージング」(2015～2019 年度)[87]

---

[84] 文部科学省研究事業革新的細胞解析研究プログラム(セルイノベーション)「細胞個別的シーケンス解析のための光学的サンプリング技術の開発」http://www.cell-innovation.org/html/program/theme_007_miyawaki.html

[85] 科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「ズームイン(高細密)とズームアウト(広視野・深部)観察を可能にする革新技術の開発」　https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PLANNED-22113003/

[86] AMED 脳科学研究戦略推進プログラム・革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクト http://www.amed.go.jp/program/list/01/04/012.html

[87] 科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「共鳴誘導で革新するバイオイメージング」 https://reso.m.ehime-u.ac.jp/

で領域代表者を務め、2 つの研究課題(「大規模生体バイオイメージングのための要素技術開発」[88]、および「レゾナンスバイオ国際活動支援」[89])に取組んでいる。

[88] https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PLANNED-15H05948/
[89] https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-INTERNATIONAL-15K21746/

表 2-1　競争的資金の獲得状況(2017 年 10 月末時点)[90)]

JST　科研費　AMED　文部科学省　その他

NO	研究期間(年度)	研究種目	研究課題	研究代表者	'05	'06	'07	'08	'09	'10	'11	'12	'13	'14	'15	'16	'17	'18	'19	'20	'21	'22	'23	予算額(億円)
	2006～2012	**ERATO**	**宮脇生命時空間情報**	宮脇 敦史																				**総額:12.13**
1	2015～2019	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)共鳴誘導で革新するバイオイメージング	レゾナンスバイオ国際活動支援	宮脇 敦史																				総額:0.64
2	2015～2019	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)共鳴誘導で革新するバイオイメージング	大規模生体バイオイメージングのための要素技術開発	宮脇 敦史																				総額:1.49
3	2015～2019	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)共鳴誘導で革新するバイオイメージング	共鳴誘導で革新するバイオイメージング	宮脇 敦史																				総額:0.59
4	2014～2023	日本医療研究開発機構 戦略推進部(脳と心の研究課)革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクト(Brain/minds 革新脳)	霊長類の脳構造・機能マップの作成に寄与する革新的な解析技術の開発等	宮脇 敦史																				総額:50.00
5	2014～2016	上原記念生命科学財団:特定研究助成金	バイオイメージングによる疾患メカニズムの多角的理解	宮脇 敦史																				総額:0.15
6	2012～2014	科研費 基盤研究A	生物構造の大規模かつ高精細3次元再構築技術の多面的開発研究	宮脇 敦史																				総額:0.47
7	2010～2014	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	造血細胞分化における染色体修飾と転写因子のクロストーク	北村 俊雄(連携研究者 宮脇 敦史)																				総額:2.85
8	2010～2014	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	ズームイン(高精細)とズームアウト(広視野・深部)観察を可能にする革新技術の開発	宮脇 敦史																				総額:1.56
9	2010～2015	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	細胞機能と分子活性の多次元蛍光生体イメージング	松田 道行(連携研究者 宮脇 敦史)																				総額:1.14
10	2009～2013	科研費 基盤研究S	電位センサードメイン蛋白群を基盤とする新たな膜電位シグナルの解明	岡村 康司(連携研究者 宮脇 敦史)																				総額:1.43
11	2009～2013	文部科学省研究事業 革新的細胞解析研究プログラム(セルイノベーション) 先導研究課題B	細胞個別的シーケンス解析のための光学的サンプリング技術の開発	宮脇 敦史																				総額:2.00
12	2007～2011	研究拠点形成費等補助金 グローバルCOEプログラム 生命科学	生命時空間ネットワーク進化型教育研究拠点	徳永 万喜洋(メンバー 宮脇 敦史)																				総額:17.49
13	2006～2007	科研費 基盤研究B	蛍光タンパク質におけるphoto-modulationの分子基盤と応用	宮脇 敦史																				総額:0.18
14	2005～2009	科研費 学術創成研究費	成体脳神経幹細胞の活性化とニューロン新生:その制御機構の解明と可視化技術の開発	岡野 栄之(研究分担者 宮脇 敦史)																				総額:5.68
15	2005～2009	科研費 特定領域	細胞内現象をリアルタイムに可視化する技術と光で操作する技術の開発	宮脇 敦史																				総額:0.55

[90] 予算額は総額。4 番は制度の最大助成金金額を示す。

表 2-2　競争的資金の概要(2017 年 10 月末時点)

No	概　　要
1	国内外の若手研究者達の意見交換の場を設けるため、3月に国際シンポジウム(@熱海)を行った。海外で活躍する若手研究者2名、Dr. Nam Young Kang (National University of Singapore)、Dr. Evan Miller (UC Berkeley) を招待した。Dr. Kangからは、組織幹細胞を蛍光化合物で特異的に標識する技術、Dr. Millerからは、膜電位を高感度、低侵襲的に可視化する技術について講演をしてもらった。国内からは各計画班の若手研究員が研究成果について発表を行った。宮脇班はレチノイン酸プローブの技術について、神谷班は超解像イメージングのための技術について、根本班はレーザー光技術を用いた新規バイオイメージング技術と偏光(偏向)レーザービームを用いたイメージングにおける解像度向上技術について、横田班はクラウド型情報処理システム技術とX線、ニュートロン、近赤外線によるCTイメージング技術について、今村班はがん転移研究のがんモデルメダカの開発とイメージング応用について、曽我班はSBWにおけるバイオフォトニクス技術について講演した。海外からの招待講演者からは多くの質問や意見があり、活発な議論の場になった。
2	「生体深部イメージング」「ストレスイメージング」「ズーミングインアウト」についてバイオイメージングの要素的技術を開発してきた。「生体深部イメージング」については、新しい生物発光システムの構築を目指し、計画研究分担者の牧らとともに、新しい発光基質・酵素の開発を行った。新基質のマウス個体における分布の時間変化および、新基質に対応する酵素の分子進化を精力的に進めている。新基質合成については計画研究班の松田グループの分担者である築地らとも共同研究を進めている。またレチノイン酸濃度を包括的にマッピングするプロジェクト”RAome”を発足し、計画研究班の横田グループの３次元顕微鏡を利用してGEPRA (Genetically Encoded Probe for Retinoic Acid) のFRETシグナルをマウス個体全体に渡って再構成する試みを行っている。心臓、胸腺、下垂体、副腎、嗅覚器におけるレチノイン酸濃度勾配を発見した。「ストレスイメージング」については、遺伝子でコードされる（タンパク質性の）酸化ストレスプローブ（Nrf2のデグロンを利用）を作製し、酸化ストレスが検出できるような細胞種、培養条件などの検討を行った。また細胞周期（Fucciで可視化）との関連を探ることを目的にマルチカラー化を図った。ストレスの多様性を鑑み、ほかのストレスプローブと比較しながら我々の酸化ストレスプローブの検出スペクトルを調べることを行っている。対照として計画研究班の神谷グループが開発したグルタチオン還元・酸化平衡センター化を利用している。「ズーミングインアウト」については、平成２７年度に発表した組織透明化試薬ScaleSの改良版であるScaleS+を作製し、透明度および蛍光シグナル保持の向上を達成した。
3	分子や光の間の相互作用を介して特徴的な振る舞いが観察対象に現われる。こうした現象を活用すれば、生命のシグナルを上手く引き出すことができる。「レゾナンスバイオ」は、分子をデザインする研究者と光をコントロールする研究者の集いを基本に、分子と光の間の相互作用を究めて革新的バイオイメージング技術を開発することを目的とする。「レゾナンスバイオ」は、色素、ハード、ソフト、サンプルの4つを頂点に据えたバイオイメージング三角錐を形作り、これを 様々に横断する多彩なアプローチを計画・実践していく。
4	「革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクト」は、神経細胞がどのように神経回路を形成し、どのように情報処理を行うことによって、全体性の高い脳の機能を実現しているかについて、我が国が強みを持つ技術を生かして、その全容を明らかにし、精神・神経疾患の克服につながるヒトの高次脳機能の解明のための基盤を構築することを目的として実施する。
5	バイオイメージングによる疾患メカニズムの多角的理解を目指して、生命現象の可視化・操作、病態の可視化および可視化技術の診断・治療応用について検討し、国際学会を開催した。
6	生体固定組織を透明にする試薬Sca*l*e技術を改良、改善、および多様化することを行ってきた。まず、新たなSca*l*e試薬を開発し、組織体積の不変、透明化スピードアップを達成した。また、組織を切らずに免疫組織染色および組織化学染色を可能にする技術Ab-Sca*l*e、Chem-Sca*l*eを開発し、たとえば、アルツハイマー病モデルマウスあるいは患者死後脳におけるアミロイドプラークの大規模3次元再構築を得ることに成功した。合わせて、3次元空間で距離、面性、体積、物体数などを定量する解析ソフトウエアを開発した。
7	本研究では、Hes1を過剰発現した造血前駆細胞を樹立後、IRES配列を有するレトロウイルスベクターを導入することによって、Hes1遺伝子をCreで除くと同時にC/EBPaなど細胞系譜特異的転写因子を発現させ、一定の方向に同時に分化を誘導する系を樹立する。この実験系により、大量の前駆細胞を同時に同一方向へ分化誘導し、分化に伴うヒストン修飾などの生化学的解析を行い細胞分化の分子機構を解明する。本実験系を利用して、研究代表者のグループはミエロイド(骨髄)系細胞の、また研究分担者の山本のグループは主に赤芽球系細胞の分化決定の分子機構を解明する。
8	個体、器官、組織内の個々の細胞について、その働きに関する時空間パターンを調べる技術を開発してきた。本研究では、細胞周期プローブFucciの開発とその発生、癌研究への応用、レチノイン酸プローブGEPRAの開発とその発生研究への応用、生体固定組織の透明化技術Sca*l*eの開発とその中枢変性疾患研究への応用などを行ってきた。技術間のcrossoverを図ることに努めた。たとえばFucci+Sca*l*eで、マウス胎仔における細胞の増殖と分化の協調パターンを包括的に可視化した。また、Fucci+GEPRAで、魚胚の体節形成における細胞周期とレチノイン酸濃度勾配との関係について理解することが出来た。
9	近年の蛍光生体イメージングの進歩は著しい。様々な蛍光特性を有する新規蛍光タンパク質やユニークな作動原理を有する蛍光プローブを用いると、細胞周期や情報伝達分子の活性など様々な細胞や分子機能が可視化することが可能となってきた。本研究ではこの蛍光生体イメージングをさらに発展させ、研究者が細胞、組織、動物を多次元で観察できるようにすることである。この目的のため、全班員が参加する研究会を毎年開催したほか、国際シンポジウムを3回にわたり組織し、国内外の研究者の情報交換を促した。さらに、若手研究者育成のためのヴィヴィッドワークショップを毎夏開催したほか、蛍光プローブを500件以上、国内外に配布した。
10	タンパク質モジュールとしての電位センサーに注目し、電位依存性ファオスファターゼや電位依存性プロトンチャンネルなどの電位センサードメインを含むシグナル複合体の動作原理を明らかにすると共に、ノックアウト動物を作製して解析を行う。また、電位センサードメインタンパク由来の電位プローブを作製して膜電位変化を計測し、膜電位シグナルをデコードする仕組みを解明する。
11	遺伝的に均一な細胞からなる社会においても、個々の細胞の細胞周期、日内周期、ストレスなどの状態は異なる。従って遺伝子発現のパターンも異なる。従来は、こうした異質性を無視して100万個以上の細胞を集め、遺伝子産物のシーケンスを行ってきた。しかし、特定の状態にある細胞の遺伝子発現を鋭敏に解析するためには、その状態の細胞だけを選別する技術が必要である。本課題では、細胞を個々の状態に応じてサンプリングする光学技術を開発する。
12	本グローバルCOE拠点では、分子認識に焦点を当てた21世紀COEの教育・研究基盤をさらに発展させ、分子間の分子認識にとどまらず、分子・細胞・組織・個体すべてのレベルにおいて、多分子がネットワークを構築し生命を維持するメカニズムの解明から、さらにこれを制御することによるバイオ・医療応用まで、基礎と応用を両立させた研究を推進し、産学に通用する人材を養成した。

No	概　　要
13	我々が独自に開発しphoto-modulationを示す3つの蛍光タンパク質、Kaede、KikGR、Dronpaについて、基礎的および応用研究を行った。Kaede、KikGRは、紫(外)光で緑から赤へ色を変換する蛍光タンパク質である。緑と赤の状態でX線結晶構造解析と分光学的解析を行い、photo-conversionの分子機構の理解を深めた。KaedeとKikGRのデータの比較から、光吸収によって起こる脱離反応の詳細な機構に関して新しいモデルを提唱するに至った。フォトクロミック蛍光タンパク質Dronpaの明と暗、両状態の構造を解明し、フォトクロミズム現象に関する、タンパク質独特のメカニズムを新たに提示した。Dronpaにおいては、青色と紫(外)色の光を当てることで明(蛍光)状態と暗(無蛍光)状態を制御することができる。これまで世界の数箇所の研究室でDronpaのX線構造解析が試みられてきたが、明状態に比べて暗状態の構造決定が難しく、このタンパク質のフォトクロミズムのメカニズムは未詳であった。今回核磁気共鳴法(NMR)解析を試み、暗状態の動的構造の決定に成功した。蛍光タンパク質特有のバレル構造は固いという通説に反し、Dronpaの暗状態では、バレル構造の一部および発色団が極端に柔らかく動きやすくなっており、その結果蛍光効率が下がるものと結論された。発色団の柔軟性・可動性の程度によって、明暗すなわち蛍光性が決定されるという見解を支持するデータが得られた。
14	成体哺乳類の脳における神経新生の発見は、神経幹細胞の神経系の再生医療への応用の可能性を示した。本研究において私たちは、神経幹細胞の制御因子として同定した2つの蛋白、すなわち、RNA結合蛋白Musashi-1及び糖鎖結合性分泌蛋白Galectin-1の成体脳における生理機能を解析した。また、神経分化を蛍光によって可視化するための『ColorTimer』マウスシステムを構築した。
15	細胞周期をリアルタイムにモニタする蛍光プローブFucciを開発し、動物個体発生における細胞周期の時空間パターンを解析した。珊瑚類からクローニングした蛍光タンパク質のペアにFRETを応用して膜電位プローブMermaidを開発した。大きなストークスシフトを示す蛍光タンパク質Keimaを開発し、一本のレーザー発振線で行う蛍光相互相関分光法やデュアルカラー2光子励起顕微鏡観察を提案した。

2.1.3　論文の発表状況

(1) プロジェクト期間中の成果論文

本プロジェクト期間中の成果論文のうち、Scopus で検索でき、かつドキュメントタイプが Article 及び Review の 43 報の被引用数の累積と論文の発表数の推移を図 2-2 に示した。図 2-3 に成果論文の被引用数の上位 5 件（図中の 1、2、3、4、5 は、それぞれ 1 位～5 位の成果論文を示す）の年次推移を示し、表 2-3 にそれら 5 件の概要を記載した。

被引用数 1 位、2 位および 5 位の 3 件(表 2-3)は、細胞周期可視化プローブ Fucci、組織透明化技術 Sca*l*e、およびオートファジー・マイトファジー活性プローブについての論文である。3 位と 4 位の 2 件は、それぞれ、間葉系幹細胞とグリア細胞に関する共同研究成果である。本プロジェクトの直接の成果である Fucci および Sca*l*e については、被引用数が着実に増加している。特に、Fucci 論文は年度毎の引用件数が減少することなく増加しており、そのインパクトの高さが窺える。この論文を引用し、著名雑誌に掲載された研究成果の例を表 3-1(3.1.1)に詳述した。

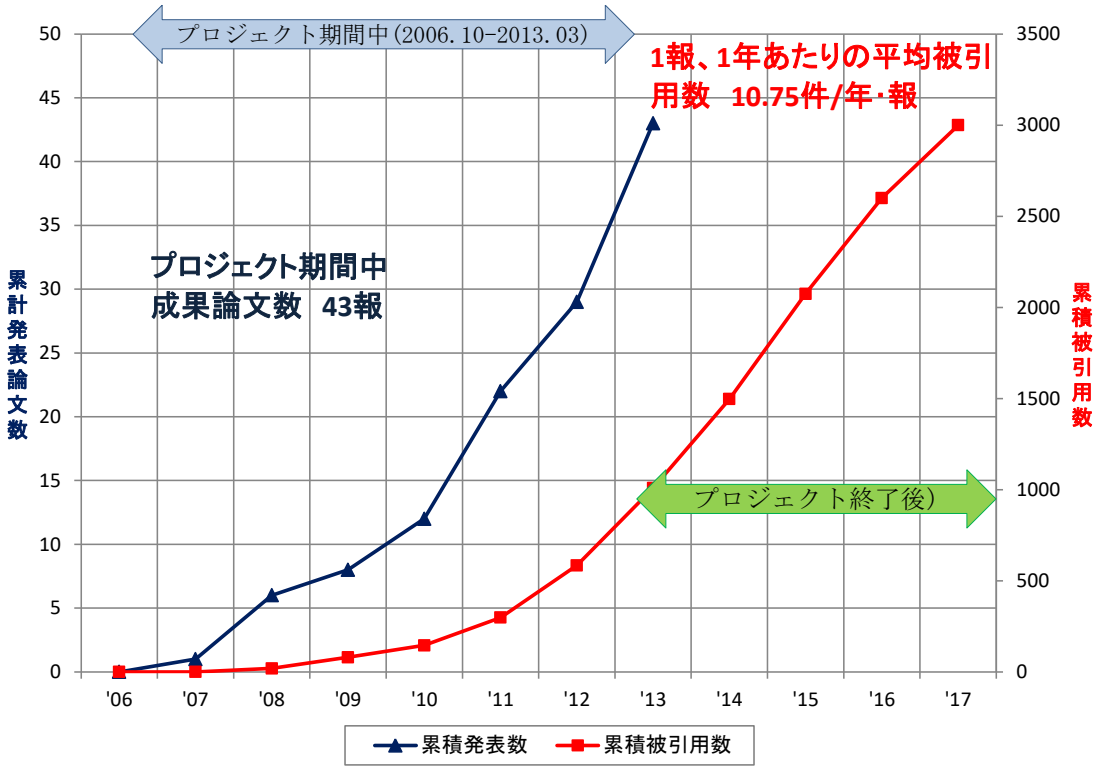


図 2-2　プロジェクト期間中の成果論文の発表数と被引用数の推移
(検索 DB:Scopus 検索日 2017 年 11 月 2 日)

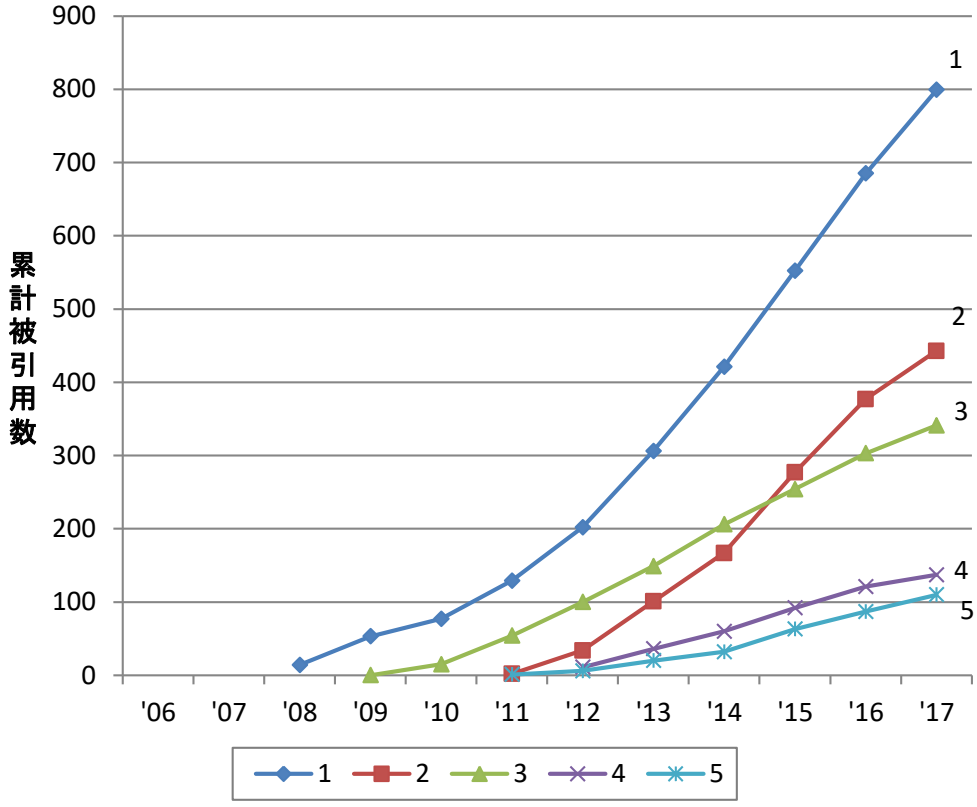


図 2-3　プロジェクト期間中の成果論文の内、被引用数が上位 5 件の被引用数の推移
(検索 DB:Scopus 検索日 2017 年 11 月 2 日)
図中の番号 1～5 は表 2-3 の論文番号に対応する

表 2-3　プロジェクト期間中の成果論文の内、被引用上位 5 件の論文概要

No	タイトル	著者	掲載誌	巻	号	ページ	発行年	被引用数	IF
1	Visualizing Spatiotemporal Dynamics of Multicellular Cell-Cycle Progression	Sakaue-Sawano A., Kurokawa H., Morimura T., Hanyu A., Hama H., Osawa H., Kashiwagi S., Fukami K., Miyata T., Miyoshi H., Imamura T., Ogawa M., Masai H., Miyawaki A.	Cell	132	3	487-498	2008	802	30.410
	概要：細胞周期プローブを開発するために、G1期に特異的に発現するCdt1にmKO2(赤色蛍光タンパク質)、S/G2/M期に特異的なGemininにmAG(緑色蛍光タンパク質)をそれぞれCdt1とGeminininの分解に関わる領域に結合させた。HeLa細胞やヌードマウス血管に移植し解析した。また、トランスジェニックマウスを作製し、神経系の発達に伴う細胞周期の進行をリアルタイムに観察することができた。								
2	Sca*l*e: A chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain	Hama H., Kurokawa H., Kawano H., Ando R., Shimogori T., Noda H., Fukami K., Sakaue-Sawano A., Miyawaki A.	Nature Neuroscience	14	11	1481-1488	2011	444	17.839
	概要：固定した生体組織を透明にする尿素主体の試薬Sca*l*eを開発し、組織を破壊すること無く表面から数mmの深部を高詳細に観察する技術を確立した。神経細胞をYFPで標識したマウスの全脳をSca*l*eで処理し、二光子励起顕微鏡で観察した。脳表面から皮質、白質、海馬の歯状回にいたる神経回路を可視化し、その三次元構築を行った。								
3	Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow	Morikawa S., Mabuchi Y., Kubota Y., Nagai Y., Niibe K., Hiratsu E., Suzuki S., Miyauchi-Hara C., Nagoshi N., Sunabori T., Shimmura S., Miyawaki A., Nakagawa T., Suda T., Okano H., Matsuzaki Y.	Journal of Experimental Medicine	206	11	2483-2496	2009	341	11.991
	概要：間葉系幹細胞(MSC)は、複数の間葉系統を生じさせることができる細胞として定義される。MSCは培養中の組織から単離されているだけなので、同等の細胞はインビボで同定されておらず、生理学的役割またはそれらの正確な組織位置さえもほとんど知られていない。この研究では、表現型、形態学的および機能的基準を使用して、成体マウス骨髄由来のMSCのサブセット(PDGFRα+ Sca-1 + CD45-TER119-)を同定し単離した。個々のMSCは、高い頻度でコロニーを生成し、インビボ移植後に造血ニッチ細胞、骨芽細胞、および脂肪細胞に分化することができた。								
4	Local generation of glia is a major astrocyte source in postnatal cortex	Ge W.-P., Miyawaki A., Gage F.H., Jan Y.N., Jan L.Y.	Nature	484	7394	376-380	2012	137	40.137
	概要：グリア細胞は、ヒトの脳の細胞のほぼ50%を構成する。最も大きなグリアの集団を構成する星状細胞は、出生後の発生の間のシナプス結合の調節に重要である。星状細胞生成の欠陥は脳腫瘍などの重度の神経疾患に関連するため、星状細胞の産生の仕方を理解することが重要である。星状細胞は、2つの情報源、すなわち、心室領域の放射状グリアと脳室領域の前駆細胞から生じ、各領域の寄与は時間とともにシフトすると報告されている。出生後の発生の最初の3週間において、主に星状細胞を含むグリア細胞集団は、げっ歯類の脳において6～8倍に拡大する。この拡張の根底にあるメカニズムについてはほとんど知られていない。ここでは、マウスの出生後皮質におけるグリアの主要な供給源が、分化した星状細胞の局所増殖であることを示した。								

No	タイトル	著者	掲載誌	巻	号	ページ	発行年	被引用数	IF
5	A sensitive and quantitative technique for detecting autophagic events based on lysosomal delivery	Katayama H., Kogure T., Mizushima N., Yoshimori T., Miyawaki A.	Chemistry and Biology	18	8	1042-1052	2011	110	6.743
	概要：全てのオートファジー系に共通して、分解されるタンパク質は酸性pHのリソソームに取り込まれる。リソソーム内の分解酵素や酸性に耐性なコモンサンゴ由来のmKeimaをマウス胎児線維芽細胞に発現させ、オートファジー活性を測定することに成功した。また、オルガネラを選択的に分解するオートファジー活性を検出するために、ミトコンドリアに局在するmt-mKeimaを開発した。マイトファジーは神経変性疾患への関与が示唆されており、創薬分野への応用が期待される。								

(2) プロジェクト終了後の発表論文

本プロジェクト終了後の論文について、累積発表論文数と累積被引用数の推移を図 2-4、図 2-5、被引用数上位 5 件の論文の概要は表 2-4 に示した。終了後の発表論文数は 30 報で、被引用数上位 5 件の論文には、Cell や Nature 姉妹誌が含まれている。被引用数上位の 2 報は組織透明化技術に関する論文で、ともに 1 年あたりの被引用数が 30 件以上であり、注目度の高さが窺える。3 位は蛍光タンパク質技術の最近の進歩を解説した総説である。4 位は Fucci マウスを用いて記憶 T 細胞の細胞分化を調べたもので、5 位は細胞周期の G0 期を可視化できるプローブ開発に関するもので、共に共同研究の成果である。

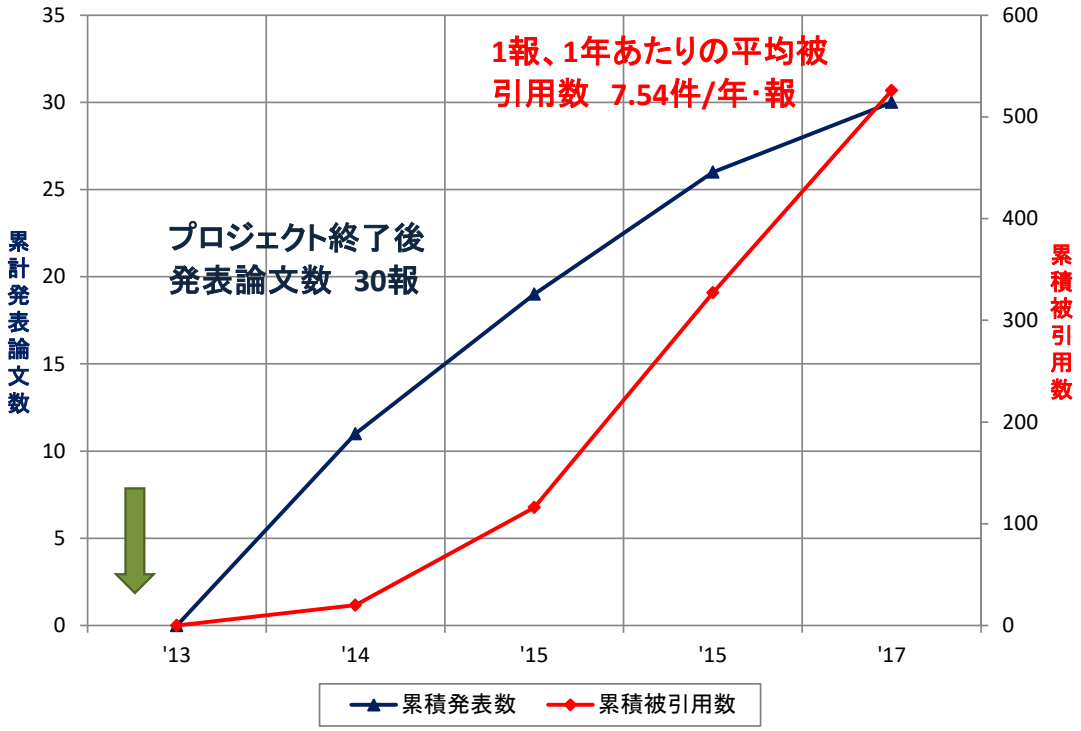


図 2-4 プロジェクト終了後の発表論文の発表数と被引用数の推移
（検索 DB:Scopus 検索日 2017 年 11 月 9 日）

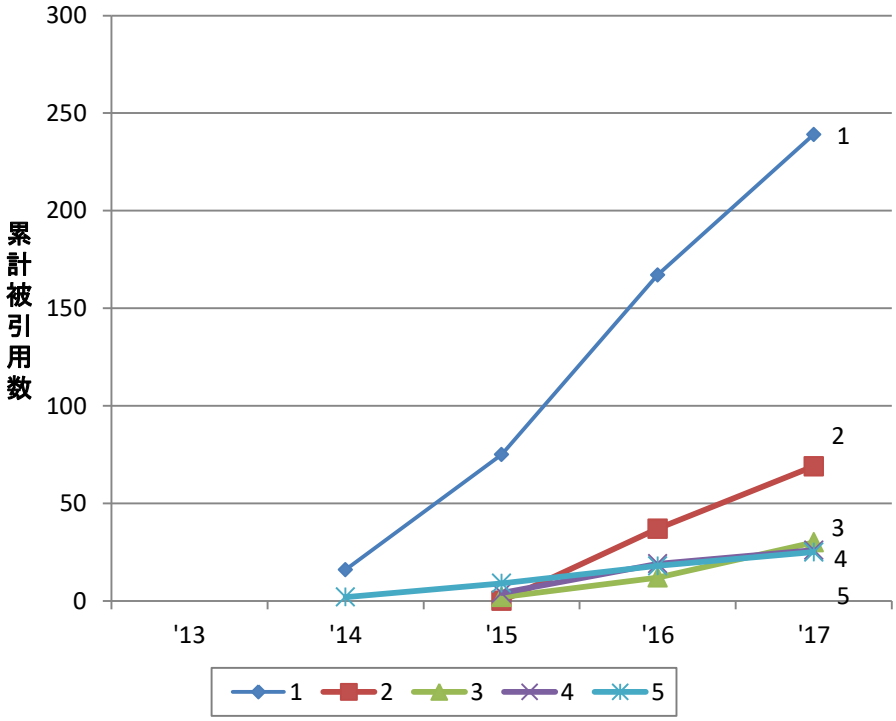


図 2-5 プロジェクト終了後の被引用数が上位 5 件の被引用数の推移
（検索 DB:Scopus 検索日 2017 年 11 月 9 日）
図中の番号 1～5 は表 2-4 の論文番号に対応する

表 2-4 プロジェクト終了後の発表論文の内、被引用上位 5 件の論文概要

No	タイトル	著者	掲載誌	巻	号	ページ	発行年	被引用数	IF
1	Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis	Susaki E.A., Tainaka K., Perrin D., Kishino F., Tawara T., Watanabe T.M., Yokoyama C., Onoe H., Eguchi M., Yamaguchi S., Abe T., Kiyonari H., Shimizu Y., Miyawaki A., Yokota H., Ueda H.R.	Cell	157	3	726-739	2014	240	30.410
	概要：脳における細胞回路の同定および分析には、単一細胞の分解能を有する全脳イメージングの開発が必要となる。この目的のために、CUBICと名付けた全脳透明化技術およびイメージング法を開発した。CUBICは、アミノアルコールを含む化学混合物に脳サンプルを浸すことを含む単純かつ効率的な方法であり、単一光子励起顕微鏡法による迅速な全脳撮像を可能にする。CUBICは、成人の脳における蛍光タンパク質または免疫染色されたサンプルの多色イメージングに適用可能であり、霊長類の脳から細胞内構造に拡張可能である。								

No	タイトル	著者	掲載誌	巻	号	ページ	発行年	被引用数	IF
2	ScaleS: An optical clearing palette for biological imaging	Hama H., Hioki H., Namiki K., Hoshida T., Kurokawa H., Ishidate F., Kaneko T., Akagi T., Saito T., Saido T., Miyawaki A.	Nature Neuroscience	18	10	1518-1529	2015	70	17.839
	概要：光学的な透明化法は、光散乱を緩和することによって生物個体組織の深部イメージングを容易にする。既存の組織透明化試薬は、組織構造を損なう可能性のある化学成分を含み、再現性のある解剖学的および蛍光シグナル安定性を妨げるため、免疫化学的ラベリングが可能で且つ安定した組織保存を提供するソルビトールベースの光学的透明化法であるSca*l*eSを開発した。Sca*l*eSは、アミロイド斑、ニューロンおよびミクログリアの3Dネットワークのマッピング、および連続蛍光および電子顕微鏡による単一プラークのマルチスケール追跡を含む、アルツハイマー病モデルにおける高齢および罹患脳の光学再構成を可能にした。								
3	Molecular Spies for Bioimaging-Fluorescent Protein-Based Probes	Miyawaki A., Niino Y.	Molecular Cell	58	4	632-643	2015	30	14.714
	概要：光学イメージングと遺伝子組み換え技術の進歩は、新しいバイオイメージング技術の開発に拍車をかけている。バイオイメージング技術は、蛍光タンパク質を特定の組織、細胞、細胞小器官に分子スパイとして導入し、細胞内の特定のイオンや分子、酵素の活性を可視化するものである。本総説では、蛍光共鳴エネルギー移動などを活用して、タンパク質の構造変化を1つの蛍光タンパク質で可視化する技術の現状を解説する。								
4	Real-time tracking of cell cycle progression during CD8⁺effector and memory T-cell differentiation	Kinjyo I., Qin J., Tan S.-Y., Wellard C.J., Mrass P., Ritchie W., Doi A., Cavanagh L.L., Tomura M., Sakaue-Sawano A., Kanagawa O., Miyawaki A., Hodgkin P.D., Weninger W.	Nature Communications	6		6301	2015	27	12.124
	概要：記憶T細胞における細胞分化の正確な機構は未だ不明な点が多い。Fucciマウスを用いて、ナイーブT細胞が抗原出現後に激しく増殖し9回以上の分裂後に、比較的細胞増殖周期の遅い亜集団が生じる様子を観察した。記憶T細胞が分化経路を多様化するために、細胞の増殖活性を本質的に調節していると考えられた。								
5	A novel cell-cycle-indicator, mVenus-p27K -, identifies quiescent cells and visualizes G0-G1 transition	Oki T., Nishimura K., Kitaura J., Togami K., Maehara A., Izawa K., Sakaue-Sawano A., Niida A., Miyano S., Aburatani H., Kiyonari H., Miyawaki A., Kitamura T.	Scientific Reports	4		4012	2014	26	4.259
	概要：細胞周期を停止した状態にあるG0期とG1期とを区別できるプローブを開発した。サイクリン依存性キナーゼの阻害剤であるp27タンパク質の阻害活性欠損変異体(p27K$^-$)と、蛍光タンパク質mVenusとの融合タンパク質(p27K-mVenus)を作製し、NIH3T3細胞に導入した。p27K-mVenusは細胞周期に入っていないG0期の細胞で主に発現しており、G0期からG1期に移行する時に分解されることから、G0マーカーとして有用であることが示された。								

2.1.4　特許の出願・登録状況

本プロジェクト期間中から調査時点に至るまでの特許出願状況を表 2-5(期間中)および表 2-6(終了後)に示す。

国内出願 12 件の内、酸化ストレスプローブ、オートファジー活性プローブおよびタンパク質分解活性プローブの 3 件が登録され、権利有の状況である。なお、JST が特許出願人となっていないが、本プロジェクトの研究成果が特許出願されたものも表 2-5 と表 2-6 に記載した(期間中の細胞周期可視化プローブ特許、ならびに終了後の特許出願)。

表 2-5　プロジェクトの特許出願状況[期間中](検索 DB:PatentSquare 検索日：2017 年 11 月 20 日)

NO	出願番号	公開・公表番号	審査状況	登録番号	発明者名	出願人・権利者名	発明の名称	国際出願番号	国際公開番号	海外の登録特許	備考
1	特願2007-340652	特開2009-162901	未審査請求によるみなし取下		宮脇　敦史,平野　雅彦	国立研究開発法人科学技術振興機構,国立研究開発法人理化学研究所	ミラーボトムチャンバー	-	-	-	海外出願なし 終了報告書に記載
2	特願2007-340973	特開2009-162578	未審査請求によるみなし取下		宮脇　敦史,平野　雅彦	国立研究開発法人科学技術振興機構,国立研究開発法人理化学研究所	細胞間相互作用を測定するための方法及び装置	-	-	-	海外出願なし 終了報告書に記載
3	特願2008-176138	特開2010-11814	拒絶査定(1年経過)		宮脇　敦史,星田　哲志,平野雅彦	国立研究開発法人科学技術振興機構	培養細胞観察用チャンバー及びその使用	-	-	-	海外出願なし 終了報告書に記載
4	特願2008-333720	特開2009-175728	未審査請求によるみなし取下		宮脇　敦史,平野　雅彦	国立研究開発法人科学技術振興機構,国立研究開発法人理化学研究所	光学フィルターボトムチャンバー	-	-	-	海外出願なし 終了報告書に記載
5	特願2010-500805	再表2009/107876	登録(権利有)	特許第5344407号	宮脇　敦史,佐々木　和樹	国立研究開発法人理化学研究所	酸化ストレスを測定するためのプローブ試薬(Probe Reagent for Measuring Oxidative Stress)	PCT/JP2009/054236	WO2009/107876	US8865124(B2)	終了報告書に記載
6	特願2011-526793	再表2011/019082	登録(権利有)	特許第5339387号	宮脇　敦史,片山　博幸	国立研究開発法人科学技術振興機構	オートファジーの測定方法(Method for Measuring Autophagy)	PCT/JP2010/063787	WO2011/019082	EP2466294(B1)	終了報告書に記載
7	特願2011-550970	再表2011/090159	登録(権利有)	特許第5954728号	宮脇　敦史,平野　雅彦	国立研究開発法人科学技術振興機構,国立研究開発法人理化学研究所	蛋白質の分解活性を測定するためのプローブ試薬(Probe Reagent for Measurement of Proteclytic Activity)	PCT/JP2011/051089	WO2011/090159	EP2527434(B1) US9249449(B2)	終了報告書に記載

表 2-6　プロジェクトの特許出願状況[終了後](検索 DB:PatentSquare 検索日：2017 年 11 月 20 日)

NO	出願番号	公開・公表番号	審査状況	登録番号	発明者名	出願人・権利者名	発明の名称	国際出願番号	国際公開番号	海外の登録特許	備考
8	特願2015-503061	再表2014/133158	通常審査中		宮脇　敦史,熊谷　安希子	国立研究開発法人理化学研究所	蛍光特性を示す新規なポリペプチド、およびその利用(Polypeptide Exhibiting Fluorescent Properties, and Utilization of Same)	PCT/JP2014/055160	WO2014/133158	-	UnaG関係
9	特願2015-532919	再表2015/025959	審査請求無し		宮脇　敦史,安藤　亮子	国立研究開発法人理化学研究所	蛍光特性を示すポリペプチド、およびその利用(Polypeptide Exhibiting Fluorescent Properties, and Utilization of Same)	PCT/JP2014/072039	WO2015/025959	-	UnaG関係
10	特願2016-570685	再表2016/117614	審査請求無し		宮脇　敦史,濱裕	国立研究開発法人理化学研究所,宮脇　敦史,濱　裕	生物材料用透明化試薬、システム及びその利用(BIOLOGICAL-SPECIMEN TRANSPARENTIZING AGENT, SYSTEM, AND USE THEREFOR)	PCT/JP2016/051599	WO2016/117614	-	Sca/eS関係
11	PCT/JP2016/060327	WO2016/159050	国際公開		岩谷　壮太,森岡　一朗,中村　肇,宮脇　敦史,熊谷　安希子	国立大学法人神戸大学,国立研究開発法人理化学研究所,岩谷　壮太,森岡　一朗,中村　肇,宮脇　敦史,熊谷　安希子	血液試料中のアンバウンドビリルビンの測定方法(Measurement Method for Unbound Bilirubin in Blood Sample)	PCT/JP2016/060327	WO2016/159050	-	UnaG・ビリルビンセンサー関係
12	PCT/JP2016/068189	WO2016/204296	国際公開		宮脇　敦史,片山　博幸	国立研究開発法人理化学研究所,宮脇　敦史,片山　博幸	pH応答性のタンパク質分解プローブ(pH-Responsive Proteolysis Probe)	PCT/JP2016/068189	WO2016/204296	-	マイトファジープローブ関係

2.1.5　招待講演

宮脇および本プロジェクトメンバーは国内外でバイオイメージングに関する招待講演を行った(2013 年 3 月以降に国外 31 件、国内 77 件)。国際学会では、神経化学学会(The 58th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry)、オートファジー国際学会(8th International Symposium on Autophagy(ISA))や細胞周期に関するワークショップ(EMBO Cell Cycle Workshop 2015)などで、本プロジェクトの成果が発表された。また、国内でも幅広い分野の学会(がん学会～顕微鏡学会)で講演した。星田研究員は組織透明化技術について、第 32 回日本 DDS 学会学術集会で招待講演しており、本プロジェクトの成果が創薬の分野でも注目されていることが窺える。

2.2　各研究テーマの進展状況

2.2.1　生物個体ライブイメージングのためのプローブ開発と応用展開

(1)細胞周期プローブ Fucci の応用展開

新たに血球性細胞で Fucci を発現するトランスジェニックマウスが作製され、血球性細胞の細胞周期進行が FACS[91]解析により詳細に調べられた。その結果、細胞周期を停止した G0 期にある細胞の核は強赤色となり、G0 期と G1 期とが赤色蛍光の強度によって識別できることが示された(図 2-6)。また、リンパ球が G0 期と細胞周期活性化状態との間を往復する様子が観察された[12]。

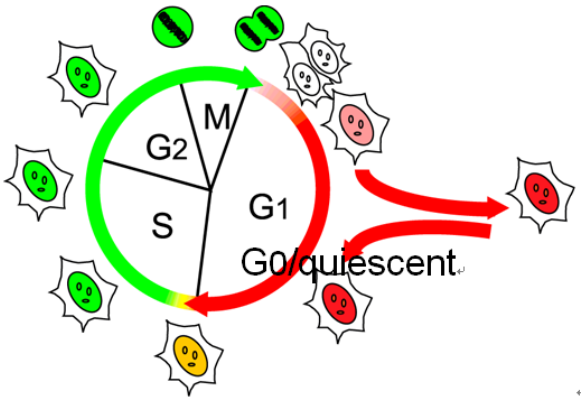


図 2-6　Fucci が描出する細胞周期[92]
Fucci は細胞周期を停止した G0/quiescent 期にある細胞の核を強赤色に、G1 期の核を赤色に、G1/S 遷移期にある核を赤色と緑色の混合の結果として黄色に描出する。

東京大学・医科学研究所との共同研究で、細胞周期を停止した状態にある G0 期と G1 期とを区別できるプローブが開発された。サイクリン依存性キナーゼの阻害剤である p27 タンパク質の阻害活性欠損変異体(p27K⁻)と、蛍光タンパク質 mVenus との融合タンパク質(p27K-mVenus)を作製し NIH3T3[93]細胞に導入したところ、p27K-mVenus は細胞周期に入っていない G0 期の細胞で主に発現しており、G0 期から G1 期に移行する時に分解されることから、G0 マーカーとして有用であることが示された[13]。

また、細胞周期の全てを個別に識別できる Fucci の開発研究が進められ、G1･S･G2 期を 3 色で識別できる細胞周期可視化プローブ Fucci(CA)が作製された。Fucci は、2 種類の E3 ユビキチンリガーゼ SCF^{Skp2} と APC^{Cdh1} により、それぞれの基質である hCdt1 と hGem が細胞周期

[91] FACS：(fluorescence activated cell sorting)、レーザー光線を使って、液体中に懸濁された細胞、個体およびその他の生物粒子の粒子数、個々の粒子の物理的・化学的・生物学的性状を計測する技術(岩波生物学辞典、第 5 版、2013)
[92] Tomura M, et al., *PLos ONE*, 2013 の Fig.2 を改変
[93] NIH3T3：マウスの胎児皮膚から分離した培養細胞株
(ウィキペディア、https://ja.wikipedia.org/wiki/NIH3T3)

依存的にユビキチン化され分解されることを利用していたが、新たに赤色蛍光タンパク質に融合する hCdt1 の標的部位を改変することで、hCdt1 が SCF^{Skp2} ではなく、別の E3 ユビキチンリガーゼである $CUL4^{Ddb1}$ によってユビキチン化されるように、分子設計と実証実験が繰り返されて Fucci(CA)が完成した(CA は $CUL4^{Ddb1}$ と APC^{Cdh1} の頭文字)[14]。Fucci(CA)プローブは、細胞周期の間期(G1 期、S 期、G2 期)を赤・緑・黄の 3 色で識別することができる。さらに M 期の始まりと終わりは、核膜の崩壊(NEB)と新生(NER)で決定することができ、それぞれ、黄色蛍光の核から細胞全体への広がりと赤色蛍光の細胞全体から核への局在化で同定することができる(図 2-7 右)。すなわち、Fucci(CA)と通常の蛍光顕微鏡を使うことで、全細胞周期(G1 期、S 期、G2 期、M 期)を識別することが可能となった。なお、従来の Fucci は、SCF^{Skp2} と APC^{Cdh1} の頭文字をとって Fucci(SA)と命名された(図 2-7 左)。

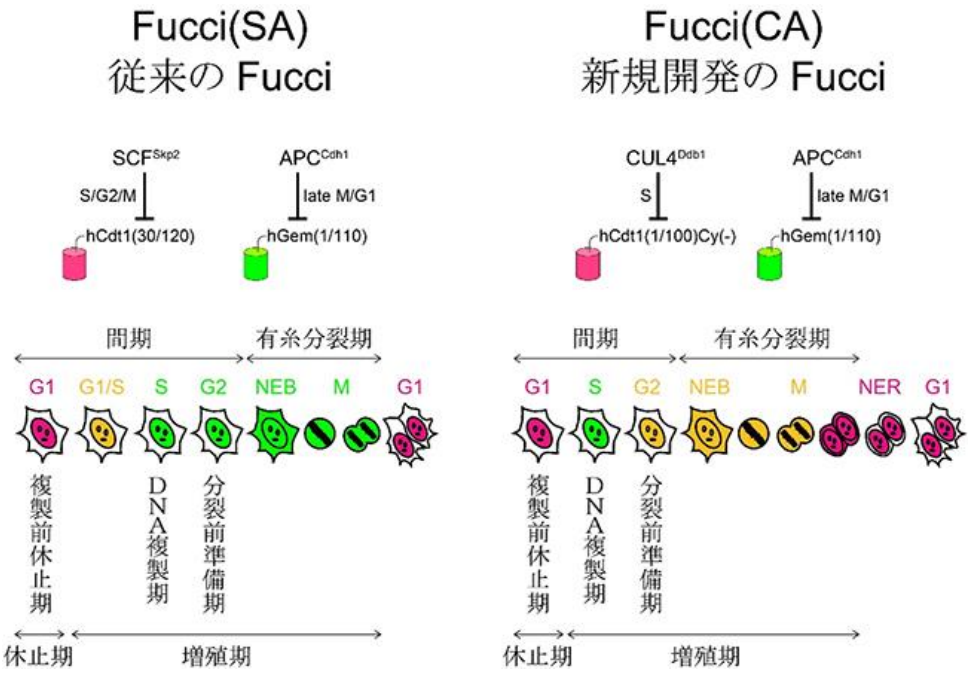


図 2-7　細胞周期を可視化する Fucci 技術[94)]

左： 従来の Fucci である Fucci(SA)は、休止期(G1)を赤色蛍光で、増殖期(S, G2, M)を緑色蛍光で識別する。また G1 期から S 期への移行(G1/S)、すなわち「休止」モードから「増殖」モードへ移行しつつある細胞の核を黄色でハイライトする。

右： 新しい Fucci(CA)は、G1, S, G2 期から成る“間期”について、G1 期(赤色蛍光)、S 期(緑色蛍光)、G2 期(黄色蛍光)と個別に色分けすることができる。

これまで、S 期と G2 期における細胞状態の違いについての知見は乏しかったが、宮脇らは Fucci(CA)を使うことで、DNA 複製の最中である S 期において UV 感受性が最も高いことを見出した。また、Fucci(CA)の遺伝子を導入したマウス ES 細胞の未分化性を保ちつつ細胞周期を観察したところ、分裂直後に一過的に赤色蛍光で標識される様子が確認され、統計的に G1 期はわずか 1 時間ほどであることが示された(図 2-8 右)。従来の Fucci(SA)を使う

[94] 理研プレスリリース「細胞周期の間期(G1・S・G2)を 3 色で識別する技術の開発」2017 年 10 月 27 日 http://www.riken.jp/pr/press/2017/20171027_1/

と、1 時間ほどの G1 期を検出することができず、細胞の追跡が途切れていたが、Fucci(CA)を使うことで分裂直後を継続的に蛍光標識でき、3 次元空間におけるマウス ES 細胞(mESC)の完全追跡が可能となった(図 2-8 左)[14]。

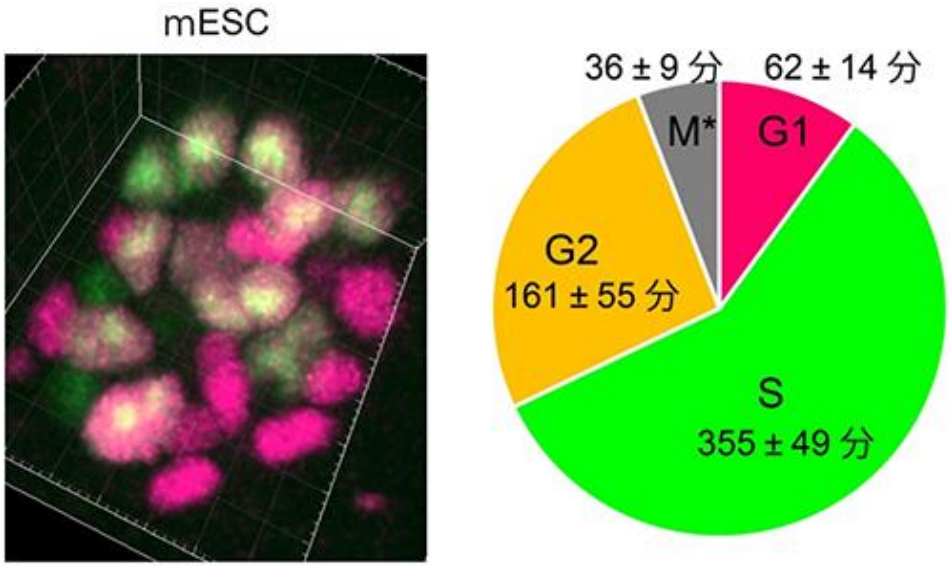


図 2-8　未分化性を維持したマウス胚性幹細胞(ES 細胞)の細胞周期[95)]
左: 未分化性のマウス ES 細胞(mESC)塊における Fucci(CA)蛍光の 3 次元画像。赤は G1 期、緑は S 期、黄は G2 期を示す。培養液には LIF(白血病阻止因子：ES 細胞の未分化性を維持する機能がある)が含まれている。
右： 未分化性のマウス ES 細胞の細胞周期は極めて短く、1 サイクルが 11 時間程度であることが知られている。Fucci(CA)を用いることで、マウス ES 細胞の G1 期がおよそ 1 時間程度であることが初めて確認された。

「Fucci(CA)は哺乳類動物を扱うあらゆる生命科学分野で応用が可能であり、がん、発生・再生研究だけでなく、動物脳における神経新生の検出、あるいは宇宙空間における細胞増殖の観察などにも適用が予定されている。今後、ヒトの ES 細胞(胚性幹細胞)や iPS 細胞を用いた再生医療および薬剤スクリーニングにおいての活躍も期待できる」とプレスリリースがあった[96)]。

なお、Bajar BT らは 4 つの細胞周期を個別に識別できるプローブ Fucci4 を開発したと報告したが[97)]、宮脇はその再現性等に問題があると考えている[98)]。

本プロジェクト期間中に作製された Fucci マウスには、導入遺伝子の不活性化や発現レベルの変動など、いくつかの問題点が見られた。これらの問題点は、Fucci システムを形成する G1 期特異的 Cdt1-蛍光タンパク質と S/G2/M 期特異的 Geminin-蛍光タンパク質が、それぞれ別々にマウスに導入されていることに起因すると考えられた。そこで、エジンバラ大

[95] 理研プレスリリース「細胞周期の間期(G1・S・G2)を 3 色で識別する技術の開発」2017 年 10 月 27 日 http://www.riken.jp/pr/press/2017/20171027_1/
[96] 理研プレスリリース「細胞周期の間期(G1・S・G2)を 3 色で識別する技術の開発」2017 年 10 月 27 日 http://www.riken.jp/pr/press/2017/20171027_1/
[97] Bajar BT, et al., *Nat Methods*, 13, 993-996, 2016
[98] 宮脇のコメントによる

学との共同研究で、*Thesea asigna* ウイルス 2A の自己切断ペプチド配列を用いて、Cdt1-mCherry と Geminin-mVenus の融合遺伝子が作製され、バイシストロン性の細胞周期プローブ Fucci2a が新たに開発された[15]。

また、Fucci を恒常的に発現しているトランスジェニックマウスから、造血幹細胞画分および胎盤形成細胞画分が調製され、独自に開発した長時間細胞培養装置や Sca*I*eA2 による組織透明化技術を活用して、細胞分化と endoreplication(細胞分裂をスキップして核 DNA 量が指数関数的に増大する現象)との連関を観察することに成功した[16]。

雄性生殖細胞の RacGTP アーゼ活性化タンパク質(MgcRacGAP)は、細胞骨格形成の制御に関与する Rho ファミリーG タンパク質の重要な調節因子であり、細胞質分裂や細胞周期の進行に不可欠であることから、東京大学・医科学研究所との共同研究で、Fucci2 を用い、細胞周期依存的に MgcRacGAP の発現が厳密に制御されているメカニズムが検討された[17]。

記憶 T 細胞における細胞分化の正確な機構は未だ不明な点が多く、オーストラリア・Newton 大学と共同で、ナイーブ T 細胞[99]が抗原出現後に激しく増殖して 9 回以上の分裂後に比較的細胞増殖周期の遅い亜集団が生じる様子が、Fucci マウスを用いて観察され、記憶 T 細胞が分化経路を多様化するために、細胞の増殖活性を本質的に調節していると考えられた[18]。

アポトーシスを生じないマウス胎児(アポトーシス欠損胎児)で見られる外脳症の原因は細胞数の増加ではなく、神経管閉鎖の不全であることを明らかにするに当たり、問題の細胞の細胞周期が G1 ではなく G0 であることが Fucci により検証された(東京大学薬学系研究科と宮脇らとの共同研究)[19]。

また、東京工業大学との共同研究で、人工的に構築された細胞外マトリックスを用い、Fucci2 ノックインマウス[100]から調製されたマウス幹細胞の細胞周期が効率よく可視化できることが示された[20]。

さらに、筑波大学生命環境群と共同で、Fucci マウスを用いて蛍光強度を指標に造血幹細胞を濃縮精製することに成功した[21]。

骨量は、破骨細胞により吸収された骨部分に、骨芽細胞が移動して新しい骨を再生することで、その恒常性が維持されている。これまで、骨芽細胞の移動と細胞周期との動的関係を調べることは技術的に困難であったが、東京医科歯科大学との共同研究で、頭蓋冠骨芽細胞に Fucci を導入し、S/G2/M 期の細胞は G1 期細胞よりも速く移動すること、ならびに細胞の移動速度が機械的な刺激や甲状腺ホルモンによる化学的な刺激の制御下にあることが見出された[22]。また、交感神経の緊張が、細胞周期移行と関連して骨芽細胞の移動を調節していることが発見された[23]。

破骨細胞の分化は、骨芽細胞が表出する receptor activator of NF-κB ligand

---

[99] ナイーブ T 細胞：胸腺で分化成熟し抗原と一度も遭遇したことのない未熟な T 細胞(岩波生物学辞典、第 5 版、2013)

[100] ノックインマウス：ノックイン(gene knock-in)は、生物の染色体の特定の遺伝子座にタンパク質をコードする相補的 DNA 配列を挿入する遺伝子工学的手法、この技術がより進んでいること、また胚性幹細胞が扱いやすいことから、通常はマウスに対して行われる(ウィキペディア、https://ja.wikipedia.org/wiki/ノックイン)

(RANKL)[101] によって誘導されるが、同時に RANKL が持つ増殖抑制活性との関連で制御されている。国立長寿医療研究センターとの共同研究で、Fucci を発現した破骨細胞を用いて、マクロファージコロニー刺激因子[102]の存在下で RANKL が初期の細胞増殖を刺激し、後半(48～96 時間)では増殖抑制活性を示すことが明らかになった[24]。また、ペンシルバニア大学と共同で、Fucci マウス由来の破骨細胞が、RANKL によって不完全な細胞質分裂および細胞融合を誘導され、倍数性を獲得することが明らかになった[25]。

また、慶應義塾大学医学部と共同で、哺乳動物の心筋細胞の発生過程における細胞周期の挙動を Fucci を用いてイメージングし、発生中の心筋細胞では S/G2/M 期が徐々に長くなっていることが示された[26]。また、ネズミ心筋細胞は増殖中は心臓内で移動せず、細胞周期に入った後もその場に留まることが示された[27]。

カリフォルニア大学との共同研究で、レンチウイルスベクターを用いてバイシストロン性の細胞周期プローブ Fucci2BL を作製し、骨髄性白血病前駆細胞と正常細胞における細胞周期調節遺伝子の発現の違いが特定された[28]。また、愛媛大学プロテオサイエンスセンターと共同で、ゼブラフィッシュの発生過程を対象に、zFucci による蛍光ライブイメージングと数理モデルを組み合わせた手法で、生体組織形成時の周期的な調節過程が明らかにされた[29]。愛媛大学から「この手法を発展させることで、がん細胞の特性や抗がん剤の効果判定に新たな解析法を提案できると期待される」とプレスリリースがあった[103]。

脊椎動物の胚の発生過程で最初に起こる血管構造の形成は、内皮細胞(EC)の厳密に制御された増殖を必要とするが、EC の細胞周期を分析する方法が欠如しており、血管形成中に EC の増殖がどのように調整されているかはほとんど知られていなかった。そこで、国立循環器病研究センター研究所と共同で、EC において zFucci を特異的に発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを作製し、血管発生中の EC の細胞周期進行を観察することに成功した[30]。

(2) レチノイン酸可視化プローブ GEPRA

ゼブラフィッシュの胚を用いて、ビタミン A 誘導体であるレチノイン酸を可視化するプローブが開発され、その濃度勾配が動物の体を形作るのに重要な役割を担うことが証明された[31]。

レチノイン酸は脊椎動物が発生する過程で細胞の運命を決定づけるモルフォゲン[104]分子の 1 種で、脊椎動物胚の前後軸に沿う空間情報を与え、後脳(小脳や延髄)の形成や体節形成に必須であると考えられている。ゼブラフィッシュを用いた発生遺伝実験では、受精後 14 時間の胚では、レチノイン酸合成酵素は胚の真ん中で発現し、一方、レチノイン酸分解酵素

---

[101] RANKL：骨を破壊する作用を持つ細胞(破骨細胞)の形成に関わる物質。RANKL と、その受容体である RANK が結合して、破骨細胞が作られる(新語時事用語辞典、https://www.weblio.jp/content/RANKL)

[102] マクロファージコロニー刺激因子：骨芽細胞により分泌されるマクロファージ成長因子 (ウィキペディア、破骨細胞　https://ja.wikipedia.org/wiki/破骨細胞)

[103] 愛媛大学トピックス「プロテオサイエンスセンター・バイオイメージング部門の飯村忠浩教授らの共同研究チームが生体組織の成長リズムを探索する新技術を開発しました」2015 年 12 月 4 日 https://www.ehime-u.ac.jp/post-25532/

[104] モルフォゲン：多細胞動物のパターン形成において、細胞に位置情報を与える機能を持つ物質の総称(岩波生物学辞典、第 5 版、2013)

は頭と尾に発現していた(図 2-9)。従って、胚の真ん中から両端に向かってレチノイン酸の濃度勾配があると推測されていたが、これまでは、個体内のレチノイン酸を直接定量できる方法がなく、レチノイン酸の濃度勾配が本当に存在するのか否か、存在するとして勾配は直線的(線形的)か非直線的(非線形的)か、という問題は未解決のままであった。

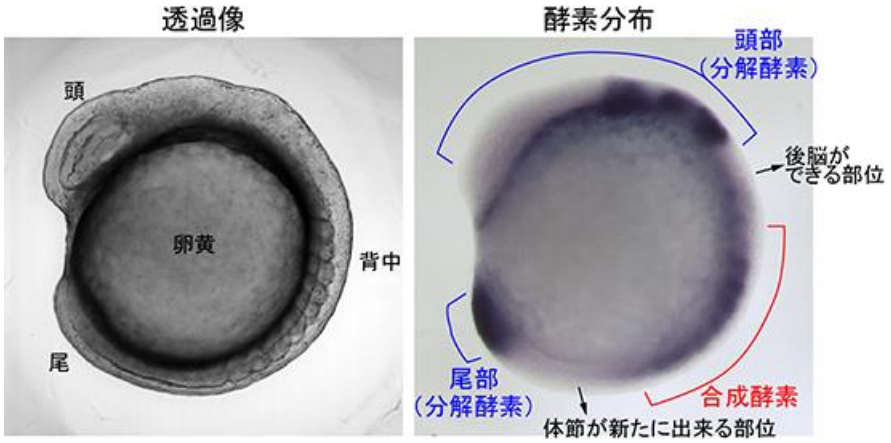


図 2-9　受精後約 14 時間のゼブラフィッシュ胚の様子[105)]
左図：ゼブラフィッシュ胚の形態写真
右図：レチノイン酸合成酵素(赤)とレチノイン酸分解酵素(青)の分布。黒い部分が酵素の発現箇所。

そこで、レチノイン酸の濃度を可視化するために、レチノイン酸が結合するレチノイン酸受容体に着目し、受容体の中からレチノイン酸が結合する主領域(ドメイン)だけを取り出し、ドメインの両端にシアン色の蛍光タンパク質(CFP)と黄色の蛍光タンパク質(YFP)を連結させ、レチノイン酸の結合に伴うドメインの構造変化により、蛍光タンパク質間のエネルギー移動の量が変化するように、レチノイン酸の濃度に応じて蛍光色が変わるプローブ GEPRA が作製された(図 2-10)。レチノイン酸に対する親和性が異なる複数の GEPRA が作製され、これらを組み込んだゼブラフィッシュ個体内のレチノイン酸濃度を定量的に解析することに成功した。

[105] 理研プレスリリース「動物の体作りに重要なレチノイン酸の可視化に成功」2013 年 4 月 8 日
http://www.riken.jp/pr/press/2013/20130408_1/

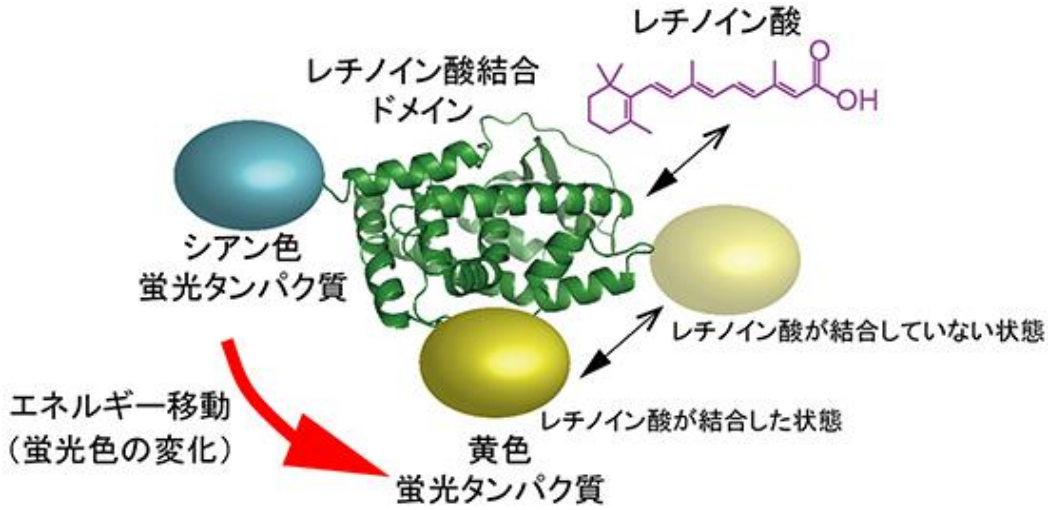


図 2-10　レチノイン酸可視化プローブ GEPRA の概念図[106)]
レチノイン酸(紫)が結合ドメイン(緑)に結合すると、シアン色と黄色の蛍光タンパク質が離れてエネルギー移動が起こりにくくなり、黄色に比べてシアン色の蛍光が強くなる。

実際に顕微鏡下で、生きたゼブラフィッシュの胚全体にわたって GEPRA の蛍光シグナルが観察され、定量的に解析した結果、ゼブラフィッシュの真ん中から頭と尾に向かってほぼ直線的にレチノイン酸の濃度が低くなることが確認された(図 2-11)。ゼブラフィッシュ胚の大きさを考慮しながらコンピュータシミュレーションを行ったところ、レチノイン酸が胚全体に素早く拡散することが示唆された。

[106] 理研プレスリリース「動物の体作りに重要なレチノイン酸の可視化に成功」2013 年 4 月 8 日 http://www.riken.jp/pr/press/2013/20130408_1/

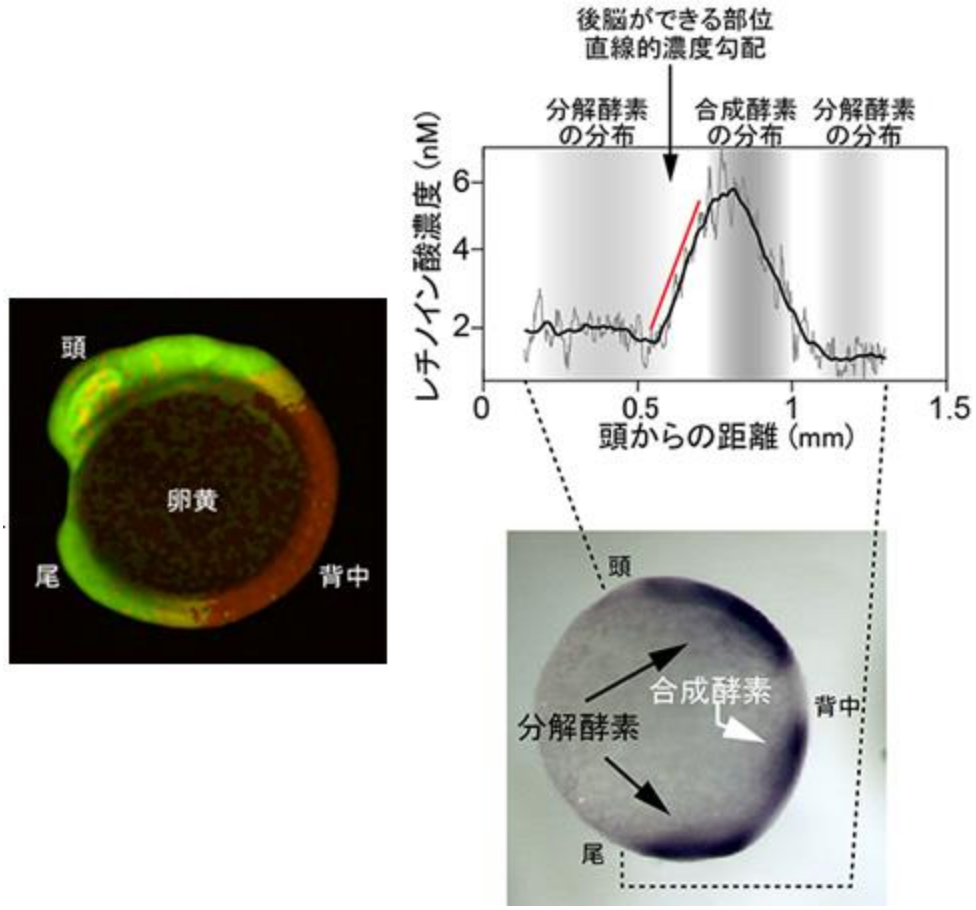


図 2-11　可視化されたレチノイン酸濃度(左図)と胚におけるレチノイン酸濃度勾配(右図)[107)]
左図：レチノイン酸の濃度が高いほど赤く(実際は、シアン色の蛍光が強い)、低いほど緑(実際は、黄色の蛍光が強い)で表示される。
右図：レチノイン酸は、合成部位(胚の真ん中)と胚の両端(分解部位)に挟まれた部分で直線的な濃度勾配を形成。

これまで、ゼブラフィッシュの後脳(将来の小脳および延髄)の形成には、脳後方部位でレチノイン酸濃度が適切な勾配を持つことが必須であると考えられてきた。一方、レチノイン酸合成を阻害したゼブラフィッシュの胚をレチノイン酸溶液に浸し、一様にレチノイン酸を投与した場合でも後脳が正しく形成されるという薬理学的実験結果にもとづいて、レチノイン酸濃度勾配の不要説も提出されていた。GEPRA を発現するゼブラフィッシュ胚で再試された結果、レチノイン酸溶液に浸しても、頭部でレチノイン酸が盛んに分解されて、後脳形成領域でレチノイン酸の濃度勾配が形成されていることが証明された。なお、蛍光観察を行った GEPRA 発現個体の全てが、その後も順調に成長して子孫を残したことから、GEPRA の発現がゼブラフィッシュの発生に影響を与える可能性は低いと考えられた。

本研究成果について、「レチノイン酸の可視化に成功」と報じられた[108)]。

---

[107] 理研プレスリリース「動物の体作りに重要なレチノイン酸の可視化に成功」2013 年 4 月 8 日 http://www.riken.jp/pr/press/2013/20130408_1/

[108] 朝日新聞「レチノイン酸、見えた　理研、可視化する技術を開発」2013 年 4 月 29 日、科学新聞「レチノイン酸の可視化に成功」2013 年 4 月 26 日、日経産業新聞「ビタミン A の適切な利用可能に、理

(3) タンパク質間相互作用可視化プローブ Fluoppi の開発

タンパク質とタンパク質の相互作用(Protein-Protein Interaction：PPI)は細胞機能の根幹であり、異常な PPI は様々な病気の原因となることから、新規薬剤スクリーニングの重要なターゲットとなっている。これまで、蛍光タンパク質を利用した生体内の PPI イメージング法として、蛍光共鳴エネルギー移動(Fluorescence Resonance Energy Transfer: FRET)、蛍光タンパク質再構成法(Bimolecular Fluorescence Complementation：BiFC)、および二量化依存性蛍光タンパク質(dimerization-dependent Fluorescent Protein:ddFP)が知られているが、再現性や定量性の面で問題があるといわれている。

そこで、多量体を形成して蛍光を発する蛍光タンパク質と多量体形成能を有するタンパク質をタグ化し、それぞれに相互作用を調べたいタンパク質を連結することで、細胞内の PPI を蛍光輝点として検出する新規な PPI 可視化プローブ Fluoppi(Fluorescent based technology detecting Protein-Protein Interactions)が開発された[32]。

蛍光タンパク質として 4 量体の Azami-Green(AG)、多量体形成タンパク質として多機能タンパク質の 1 種である p62/SQSTM1 の Phox and Bem1p(PB1)ドメインが使われた。PB1 ドメインは、一端に酸性アミノ酸残基と他端に塩基性アミノ酸残基を持っており、これらの残基を介して細胞内で多量体を形成する。PB1 ドメインに結合した X タンパク質と AG に結合した Y タンパク質との間に PPI が存在しないときは、AG の蛍光は細胞内に広く検出されるが、X と Y が PPI を起こすと、PB1 ドメインを介した AG の凝集が起こり、PPI が蛍光輝点として検出される(図 2-12 a)。この方法により、ラパマイシン[109]存在下で、ラパマイシン結合タンパク質 FKBP12(FKBP)とラパマイシン標的分子(mTOR)の FRB ドメインとの PPI が、引き起こされることが確認された(図 2-12 b)。また、がん抑制に関わる p53 タンパク質と、その発現を調節する MDM2 タンパク質との PPI が、MDM2 特異的阻害剤である Nutlin-3 により解消される様子が観測された(図 2-12 c)。さらに、2 量体でオレンジの蛍光を発する Kusabira-Orange(KO)の系でも PPI を秒単位で観測できることが示された(図 2-12 d)。

研、誘導体の濃度観察、人工たんぱく活用、新手法」2013 年 4 月 8 日

[109] ラパマイシン：微生物 *Streptomyces hygroscopicus* によって生産されるマクロライド化合物の一つで、移植臓器拒絶の予防のため、リンパ脈管筋腫症の治療のために医学分野で使われている(ウィキペディア、https://ja.wikipedia.org/wiki/ラパマイシン)

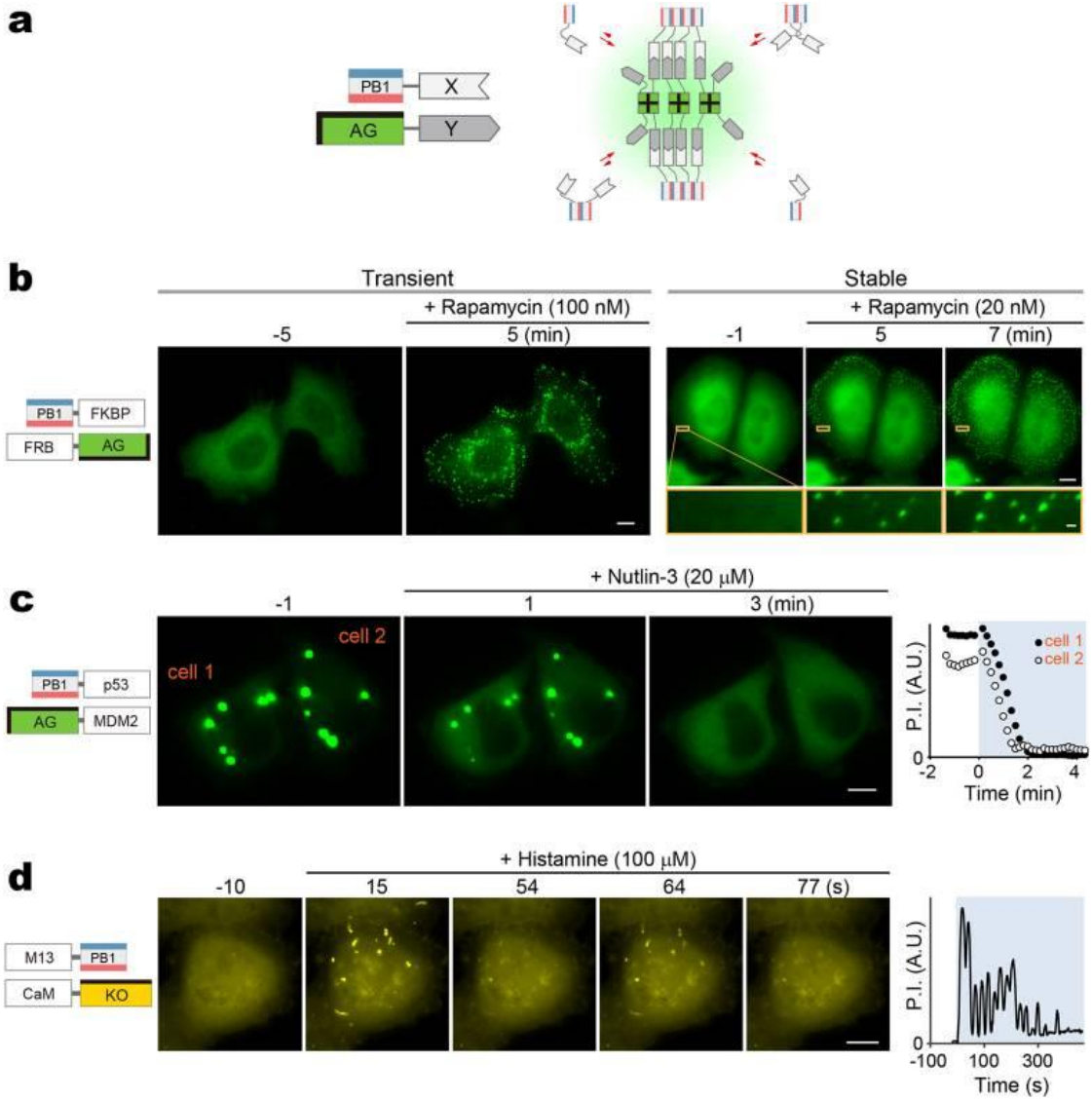


図 2-12　Fluoppi のデザインと検証実験[32]

(a) Fluoppi の原理図：PB1 に結合した X と AG に結合した Y との PPI により、蛍光輝点が生じる。
(b) FKBP と FRB に適用。Fluoppi を一時的に発現させた細胞(左)と安定発現させた細胞(右)で共に、ラパマイシン添加により、蛍光輝点が観測された。
(c) p53 と MDM2 に適用。蛍光輝点(P.I)が Nutlin-3 の添加により消失した。右図は蛍光輝点の数の経時変化を示す。
(d) 蛍光タンパク質として 2 量体の KO を使用。ヒスタミン添加により、Calmodulin(CaM)とそのターゲットペプチド(M13)との PPI が、振動発生する様子を示す。

(4)その他のプローブ開発等

細胞内の cAMP(サイクリックアデノシン 3',5'-一リン酸)を検出できる蛍光プローブ Flamindo が開発された。Flamindo は黄色蛍光タンパク質である YFP に、cAMP 依存性グアニジン交換因子であるマウス Epac1 の cAMP 結合配列が挿入されている(図 2-13)。cAMP 存在下では Epac1 部位の構造変化が起こり、YFP の蛍光強度が変化することを利用して cAMP 濃度を測定する。Flamindo を用いて、アデニル酸シクラーゼ活性が脾臓 β 細胞の cAMP 恒常性およびインスリン分泌の制御に重要な役割を果たしていることが判明した[33]。

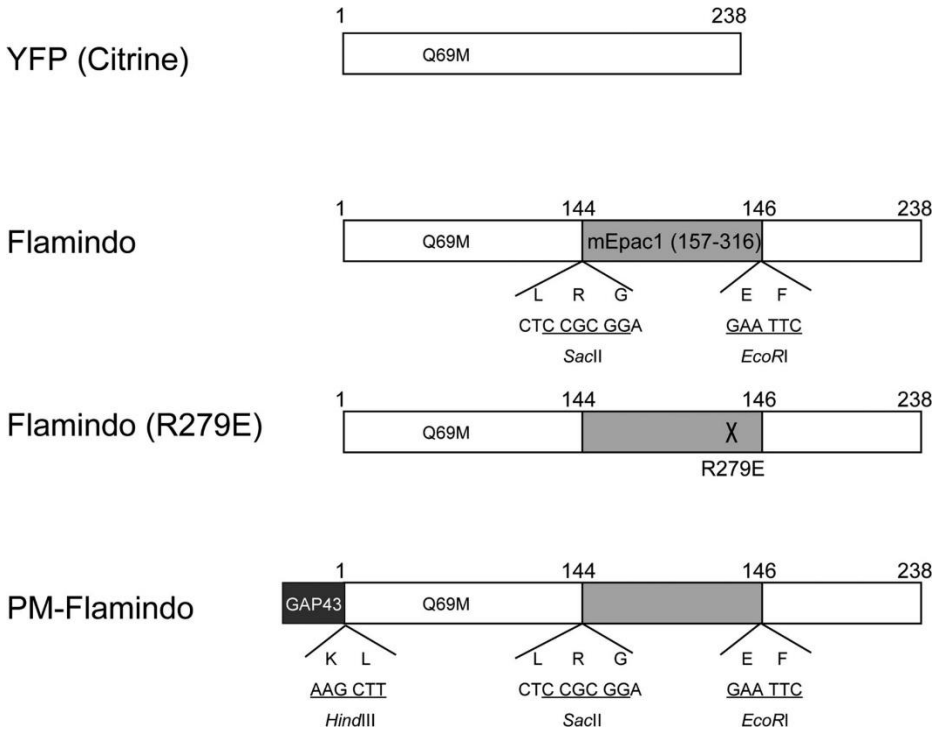


図 2-13　Flamindo の模式図[33]

Flamindo は、YFP にマウス Epac1 の cAMP 結合部位を挿入して作製された。
Flamindo(R279E)は、cAMP 結合能を失った変異体である。PM-Flamindo は細胞膜の cAMP を測定するために、Flamindo の N 末端に GAP43(成長関連タンパク質 43)配列が付加されている。

緑色蛍光タンパク質 KikG の変異体として取得していた光変換性(photoconvertible)蛍光タンパク質 KikGR[a110]を用いて、皮膚由来樹状細胞の生体内移動をイメージングすることに成功した。KikGR を発現するノックインマウスを作製し、紫外線照射することで、赤色化された KikGR 標識皮膚由来樹状細胞が数時間でマウス全身を巡ることが示された[34]。

神戸大学医学研究科小児科科学分野と共同で、新生児 92 例から得られた血清 140 検体について検証し、現行の測定法である酵素法と UnaG で測定したビリルビン値は極めて良好な相関が見られ（図 2-14）、UnaG によるビリルビン測定が新生児黄疸の管理に応用できることが臨床的に証明された[35]。

[110] Tsutsui H., et al., *EMBO Rep*, 6, 232, 2005

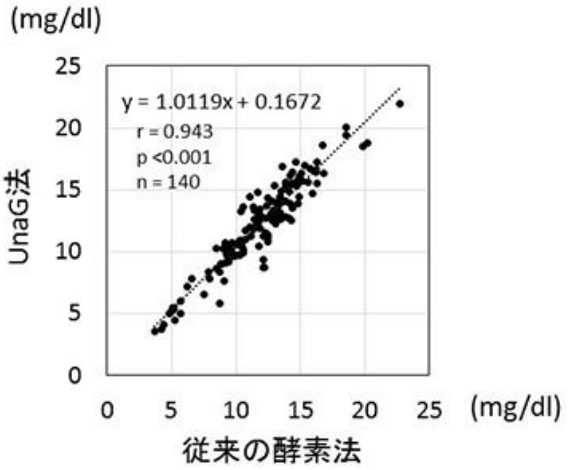


図 2-14　従来の酵素法と新たな UnaG 法で測定したビリルビン値の相関[111)]
新生児の血清 140 検体の測定値をプロットした。

大阪大学工学研究科との共同研究で、海洋性発光タンパク質ルシフェラーゼの発光基質であるセレンテラジンから、細胞膜を透過しない誘導体を合成し、細胞膜開口をイメージングしうる発光プローブが開発された[36]。また、β-ガラクトシダーゼ活性を検出するための新規なセレンテラジン誘導体も開発された[37]。

本プロジェクト期間中に開発されたオートファジー活性可視化プローブ(1.5.1(2)①参照)は、pH 変化に伴う mKeima の蛍光変化が可逆的なため、組織固定化などの処理でリソソームの pH 勾配が消失したサンプルではそのシグナルが失われてしまう。この点について本プロジェクト終了後も研究が継続され、「シグナル残存型蛍光オートファジープローブ」が作製された。このプローブをマウスに一過性に発現させて、飢餓処理後に固定された幹細胞を観察し、個体内でのオートファジーを検出できることが明らかになった[112)](未発表)。

ミトコンドリア恒常性のためのマイトファジーによる調節は、様々な炎症性疾患において重要であるが、マイトファジーが活性化される正確な機構は知られていない。ストレス誘導性タンパク質である SESN2(sestrin2)がマイトファジーの誘導に関与することを示した研究で、mt-mKeima がマイトファジー活性の定量分析に使用された(延世大学医学部と宮脇の共同研究)[38]。

家族性パーキンソン病(PARK2)患者由来の iPS 細胞から誘導された神経細胞では、酸化ストレスが増強されてミトコンドリアに機能異常が生じている事が知られていたが[113)]、慶応義塾大学医学部と共同で、新たに mt-mKeima による分析で実際にマイトファジー活性が損なわれていることが明確に示された[39]。

---

111 神戸大学研究ニュース「ニホンウナギの光るたんぱく質 UnaG によるビリルビン測定-赤ちゃんの黄疸管理の改善へ」2016 年 6 月 21 日 http://www.kobe-u.ac.jp/NEWS/research/2016_06_21_02.html

112 科研費若手研究(B)「新規オートファジープローブによりパーキンソン病でのマイトファジーの働きを解明する」2013 年度～2015 年度　研究成果報告書 https://kaken.nii.ac.jp/ja/file/KAKENHI-PROJECT-25830043/25830043seika.pdf

113 Imaizumi Y., et al., *Mol Brain*, 5, 35, 2012

2.2.2 光学システム開発

(1) 組織透明化試薬

①CUBIC 技術

理研生命システム開発センターと共同で、マウス脳だけではなく小型の猿の脳にも適用可能な組織透明化技術 CUBIC(Clear, Unobstructed Brain Imaging Cocktails and Computational analysis)が開発された。CUBIC 技術は、Sca*I*e 技術(1.5.3(6)参照)による生体脳の透明化をさらに促進するために、Sca*I*e 試薬に新たに有機溶媒のアミノアルコールを付加したものであり、全脳イメージングに最適化したシート照明顕微鏡[114]を用いることで、マウス全脳イメージを 1 時間程度で取得することに成功した(図 2-15)[40]。

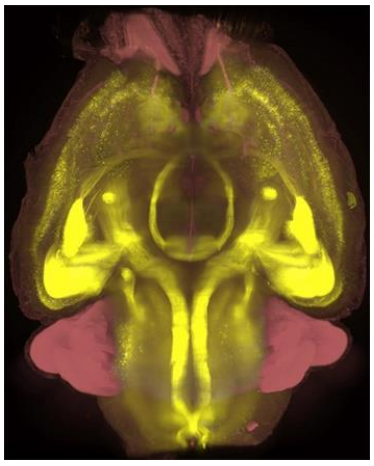


図 2-15 シート照明顕微鏡を用いた成体マウス脳の 3 次元イメージング[115]
神経細胞に黄色の蛍光タンパク質(YFP)が発現している成体マウス脳を、細胞核が染まる蛍光色素(Propidium iodide)で染色し、2 色の全脳イメージングを行った。

②Sca*I*eS の開発

本プロジェクト期間中に開発された尿素含有試薬 Sca*I*eA2 は、処理時間が長く組織が膨潤してしまうなどの問題点があった。そこで、他の透明化技術との比較検討を重ねながら、透明化する能力と蛍光シグナルを含む組織構造を保持する能力との間にあるトレードオフに留意して、新たな組織透明化試薬 Sca*I*eS が作製された[41]。Sca*I*eS には尿素に加えソルビトールが配合されており、尿素とソルビトールとの相乗効果で透明化能力の向上が図られた。同時に、有機溶媒や高濃度の界面活性剤を添加しないことで、蛍光シグナルの消失や組

[114] シート照明顕微鏡：レーザー光をシート上に広げてサンプルの横から照射し、上から撮影することで、サンプル内のある平面を 1 回で撮影することができる顕微鏡。シートまたはサンプルを Z 方向に動かして平面を重ねることで、高速に 3 次元画像を取得することができる(理研プレスリリース「成体の脳を透明化し 1 細胞解像度で観察する新技術を開発」2014 年 4 月 18 日 http://www.riken.jp/pr/press/2014/20140418_1/)

[115] 理研プレスリリース「成体の脳を透明化し 1 細胞解像度で観察する新技術を開発」2014 年 4 月 18 日 http://www.riken.jp/pr/press/2014/20140418_1/

織構造の破壊を防ぐように工夫された。図 2-16 は透明化能力と蛍光シグナル強度について、Sca*I*eS 法と他の透明化法(CUBIC[40]、3DISCO[116]、SeeDB[117]、PACT[118])とを比較したものである。Sca*I*eS 法の透明化能力は CUBIC 法や 3DISCO 法には劣るが、蛍光シグナルの保持力は格段に優れていることが示された[41]。

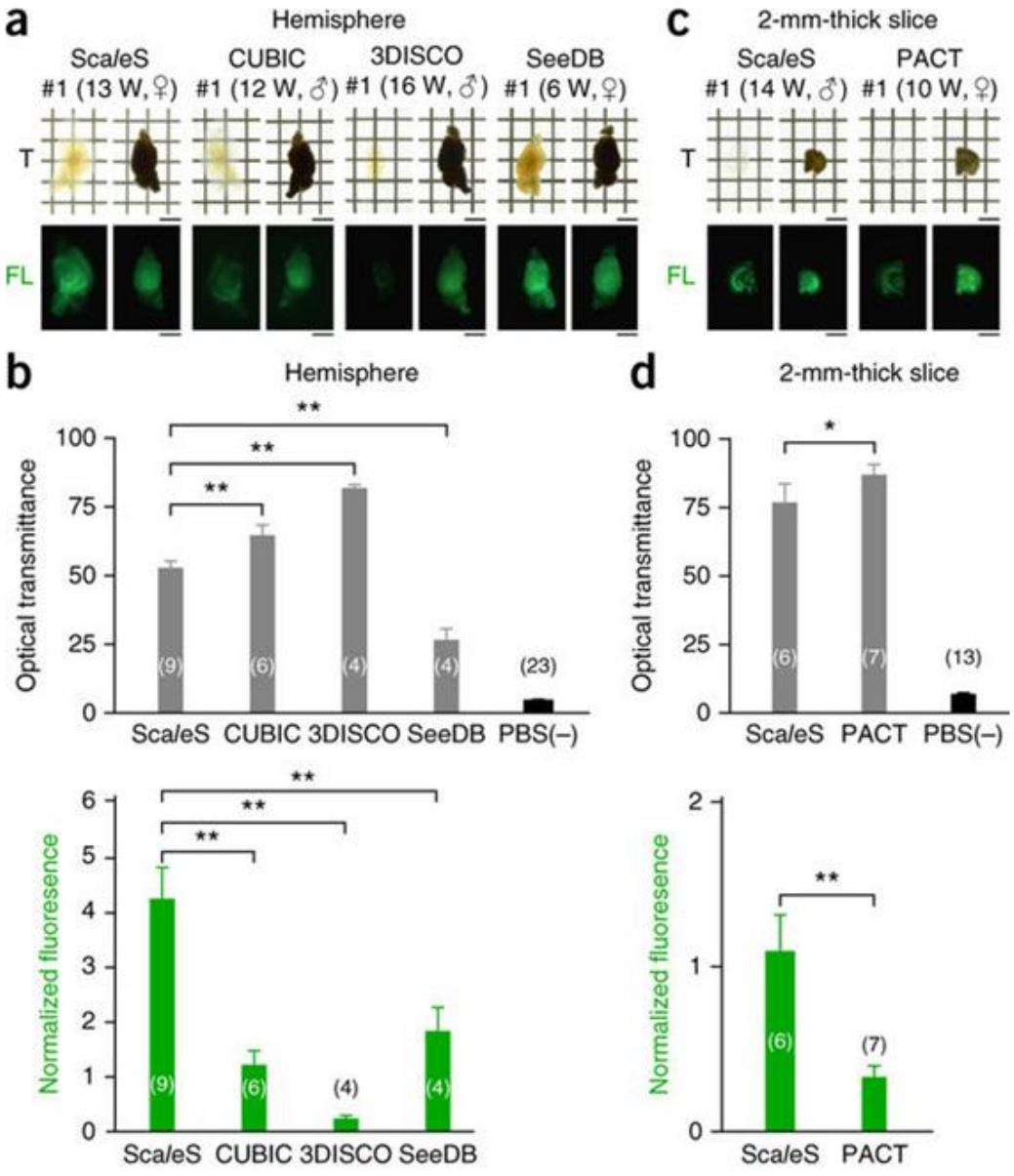


図 2-16　透明化処理後の蛍光シグナル[41]

(a、b)神経細胞が蛍光タンパク質 Yellow Fluorescent Protein (YFP)を発現する遺伝子改変マウス(YFP-H)の脳半球を Sca*I*eS 法、CUBIC 法、3DISCO 法、SeeDB 法で透明化し、透明度と蛍光シグナルを解析した。(c、d)YFP-H マウスの脳から厚さ 2mm のスライスを作製した後、Sca*I*eS 法、PACT 法で透明化を行った。上段は実際の画像で、中段は透明度、下段は蛍光強度をそれぞれ定量比較したものである。スケールバーは 5mm。PBS(-)はリン酸バッファー処理。

[116] 3DISCO：有機溶媒を用いる透明化法：Erturk A, et al., *Nat Protoc*, 7, 1983, 2012
[117] SeeDB：高濃度のフルクトースを用いる透明化法：Ke MT,et al., *Nat Neurosci*, 16, 1154, 2013
[118] PACT：高濃度の界面活性剤 SDS を用いる透明化法：Yang B, et al., *Cell*, 158, 945, 2014

Sca*I*e 技術によってサンプルが抗体などの生体高分子を取り込みやすくなる現象が発見され、脳サンプルの内部構造を丸ごと抗体および色素で染色する「AbSca*I*e」と「ChemSca*I*e」が開発された。Sca*I*eS に AbSca*I*e や ChemSca*I*e を組み合わせることで、アルツハイマー病モデルマウスの加齢脳(図 2-17)やアルツハイマー病患者の死後脳における組織病変をさまざまな空間解像度で定量的に解析し、アルツハイマー病の早期に生じるアミロイド斑の炎症性の特徴が明らかになった[41]。

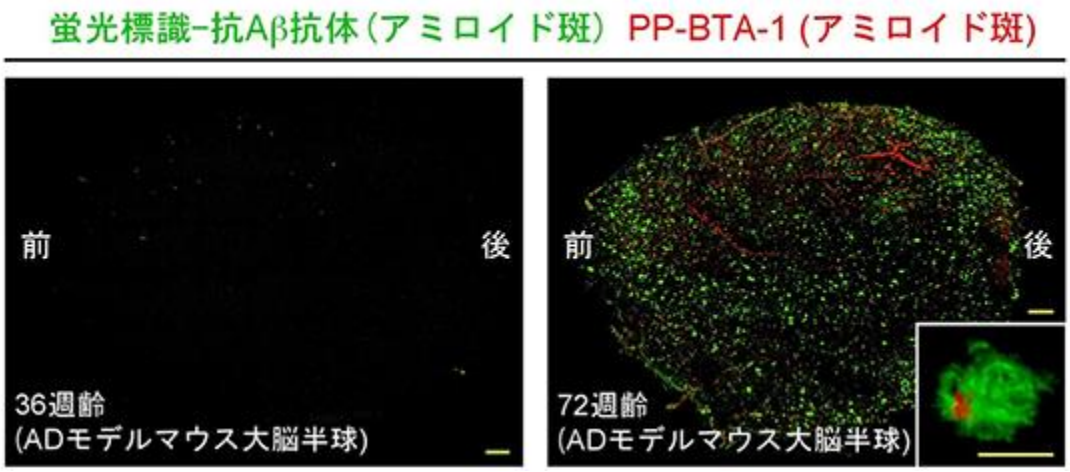


図 2-17 アルツハイマー病モデルマウスの脳で観察されるアミロイド斑[119)]
36 週齢(左)、72 週齢(右)のモデルマウスの大脳半球を対象に、抗アミロイド抗体(抗 Aβ抗体;緑色蛍光標識)を使って AbSca*I*e 法を行いアミロイド斑の局在を調べた。アミロイド斑は 36 週齢サンプルではほとんど検出されないが、72 週齢サンプルでは皮質層のほぼ全体に観察された。サンプルをアミロイド斑に特異的に結合する蛍光色素(PP-BTA-1)で染色したところ、72 週齢の脳の大血管に沿って局所的に拡がる血管炎が描出された。

Sca*I*eS 法が「アルツハイマー病発症前の早期診断法の開発につながる可能性がある」とし、一方で、「生体組織の透明化には様々な技術上のトレードオフが存在するため、他の透明化技術を同時に比較試行することが重要である」と、理研からプレスリリースがあった[120)]。

アルツハイマー病と、アクチンネットワークの安定性を制御する Myristoylated Alanine-rich Ckinase Substrate (MARCKS) タンパク質、および MARCKS のリン酸化に関与する核内 DNA 結合タンパク質 High Mobility Group Box 1 (HMGB1)との相関を示した研究において、アルツハイマー病モデルマウスの脳の透明化に Sca*I*eS が活用された(東京医科歯科大学と宮脇の共同研究)[42]。「本研究成果は、アルツハイマー病治療に直接役立つ可能性があり、今後は HMGB1 抗体の実用化に向けてヒト患者に使用可能な製剤化を行い、さらに臨床試験を行うことを目指す」とプレスリリースがあった[121)]。

---

[119] 理研プレスリリース「アルツハイマー病の組織病変をズームイン」2015 年 9 月 15 日 http://www.riken.jp/pr/press/2015/20150915_1/

[120] 理研プレスリリース「アルツハイマー病の組織病変をズームイン」2015 年 9 月 15 日 http://www.riken.jp/pr/press/2015/20150915_1/

[121] 国立研究開発法人日本医療開発研究機構　お知らせ「アルツハイマー病の新たな抗体治療に道をひら

(2)その他

本プロジェクト期間中に、生体の深部組織を観察するために、1,600nm の赤外波長でイメージングが行える赤外顕微鏡が開発されたが、本プロジェクト終了後も、赤外光と微分干渉顕微鏡[122] との組み合わせで、無染色個体の深部を可視化できる技術開発が継続されている[123]。

2.2.3 その他の研究成果

緑色蛍光タンパク質 KiKG の遺伝子改変により得られたフォトコンバージョン型の KiKGR をさらに改変する過程で、細胞の中で結晶を形成する変異体 Xpa が取得された。Xpa を材料にタンパク質が細胞内で結晶化する過程(図 2-18)や、その後に分解されていく過程が解析され、結晶がリソソームの膜で覆われていることを見出された。Xpa のような大きなタンパク質結晶体の場合、大規模かつ非選択的に分解する「非選択的オートファジー」により処理されると思われたが、不要の目印をつけて分解システムに持ち込む「選択的オートファジー」によって処理されることが判明した[43]。

「タンパク質結晶に対する細胞の応答に関して新しい知見が得られた」と報じられた[124]。

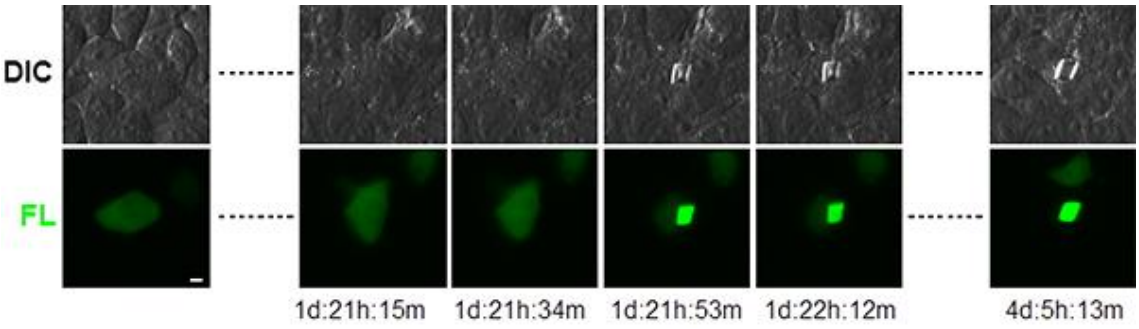


図 2-18 Xpa タンパク質を発現する HEK293 細胞のタイムラプスイメージング[125]
細胞質全体に広がる緑色蛍光が瞬時に集まって結晶に成長する様子が分かる。スケールバーは 5μm。
DIC：微分干渉画像、FL：蛍光画像。最下段に観察時間を「日：時：分」で表す。

く―アミロイド凝集前の病態シグナルを治療の分子標的に―」2016 年 8 月 25 日 http://www.amed.go.jp/news/release_20160825.html

122 微分干渉顕微鏡：(Differential interference contrast microscope; DIC)試料の厚みや屈折率の差を、偏光板と特殊なプリズムを用いて明暗のコントラストとして見えるようにした顕微鏡(岩波生物学辞典、第 5 版、2013)

123 宮脇のコメントによる

124 理研プレスリリース「細胞内巨大プロテインクリスタルの運命」2015 年 3 月 13 日

125 理研プレスリリース「細胞内巨大プロテインクリスタルの運命」2015 年 3 月 13 日

2.3 プロジェクト参加研究員の活動状況

宮脇は、蛍光タンパク質を使って生命活動を調べる手法「革新的バイオイメージング技術の開発研究」の業績で、第 54 回藤原賞(2013 年度)を受賞した[126]。また、「新しい蛍光タンパク質の創造による生命メカニズムの解明研究」の業績で、第 35 回島津賞(2015 年度)を受賞した。島津科学技術振興財団は、その受賞理由として、「下村脩博士(2008 年ノーベル化学賞)が発見したオワンクラゲ GFP に加え、自ら日本近海生息の生物から遺伝子クローニングした多くの蛍光タンパク質を改変・活用して、カルシウム、細胞周期、代謝、自食作用など基本的生命現象を可視化する様々なセンサーを世界に先駆けて開発したこと、その成果物の普及は学術分野に留まらず、医療、創薬などの産業分野にも着実に拡がっており、たとえば、がん、アルツハイマー病などの変性疾患、先天奇形、黄疸などの診断技術に活用されつつあること、ならびに、光照射によって蛍光の色や明滅が変わる特性の発見は、蛍光標識密度を制御する技術に発展し、超解像光学顕微鏡(2014 年ノーベル化学賞)の開発に著しい貢献を果たしたこと」を挙げている[127]。

宮脇は、さらに 2017 年秋の紫綬褒章を受章し、「生物物理学分野におけるバイオイメージング技術開発において先駆的な発見を重ねた業績が評価された」と報じられた[128]。

本プロジェクトに参加した研究員の多くが、プロジェクト終了後もバイオイメージング研究分野で活躍している。

阪上朝子研究員は、科研費基盤研究(C)「デグロンを利用した蛍光性プローブによる細胞運命決定の可視化」(2013 年度～2015 年度)[129]、および科研費新学術領域研究(研究提案型)「疑似宇宙環境における基本的生命現象の可視化」(2016 年度～2017 年度)[130]で研究代表者を務め、Fucci の発展研究に貢献した。

北口哲也研究員は、早稲田大学・重点領域研究機構・主任研究員(研究院准教授)に就任し、科研費基盤研究(C)「グルコース非依存的エネルギー産生機構による細胞生理機能の解明」(2013 年度～2016 年度) [131]、および科研費基盤研究(C)「細胞内シグナルの多次元情報を獲得するマルチカラーバイオセンサー」(2016 年度～2018 年度) [132]の研究代表者を務めた。

佐々木和樹研究員は、JST さきがけ「エピジェネティクスの制御と生命機能」研究領域でさきがけ研究員となり、「ヒストン修飾の動態を可視化検出するための系の確立」研究(2011 年度～2013 年度)[133]に従事した。

木下暢暁研究員は、科研費挑戦的萌芽研究「新規神経ネットワーク形成標識法の開発とそ

---

126 理研トピックス「宮脇敦史副センター長と香取秀俊主任研究員が第 54 回藤原賞を受賞」2013 年 6 月 3 日 http://www.riken.jp/pr/topics/2013/20130603_1/

127 島津科学技術振興財団お知らせ「平成 27 年島津賞受賞者決定」2015 年 12 月 9 日 http://www.shimadzu.co.jp/ssf/news151209.html

128 理研トピックス 2017「宮脇敦史副センター長が紫綬褒章を受章」2017 年 11 月 2 日 http://www.riken.jp/pr/topics/2017/20171102_1/

129 https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-25440095/

130 https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PUBLICLY-16H01653/

131 https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-25350970/

132 https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-16K01922/

133 JST さきがけ「エピジェネティクスの制御と生命機能」研究課題一覧 http://www.jst.go.jp/presto/epigenetics/theme01.html

の応用」(2015 年度～2016 年度)[134]の代表研究者を務めた。

片山博幸研究員は、科研費若手研究(B)「新規オートファジープローブによりパーキンソン病でのマイトファジーの働きを解明する」(2013 年度～2015 年度)[135]、および科研費基盤研究(C)「新規シグナル蓄積型マイトファジープローブ発現マウスでパーキンソン病発症機構に迫る」(2016 年度～2018 年度)[136]で研究代表者を務め、オートファジー活性可視化プローブの改良研究に取組んだ。

本プロジェクト期間中に、飯村忠浩研究員は愛媛大学医学部付属病院先端研究・学術推進機構プロテオサイエンスセンター・バイオイメージング部門の教授(部門長兼)に就任した。飯村は、科研費基盤研究(B)「3 次元蛍光イメージングによる骨細胞機能ダイナミズムの可視化と骨の生理・病態解析」(2011 年度～2013 年度) [137]、および科研費基盤研究(B)「イメージング・シミュレーション・オミクスによる骨格形成機構の多角的解析」(2014 年度～2016 年度)[138]の研究代表者を務め、顕微鏡技術革新とその生物医学的応用展開を目指した研究を進めた。

沼野利佳研究員と杉村薫研究員は本プロジェクト期間中に、それぞれ、豊橋技術科学大学環境・生物工学系准教授、および京都大学物質細胞統合システム拠点(iCeMS)特定拠点准教授に就任した。沼野は、科研費基盤研究(C)「中枢時計の概日リズム発振の時空間的機能マップの作成とその制御」(2012 年度～2014 年度)[139]、および JST 産学連携・技術移転事業・マッチングプランナープログラム探索試験「並列的なゲノム編集を実現する次世代エレクトポレーション装置の開発」 (2015 年度) [140]の研究代表者を務めた。また、杉村は、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「外力が駆動する細胞集団運動が支えるアクチン細胞骨格制御の解明」(2015 年度～2016 年度) [141]、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「細胞競合力学制御の解明のための力推定法の開発と応用」(2017 年度～2018 年度)[142]、および科研費若手研究(B)「細胞配置換えの速度と方向を決定する分子・力学メカニズムの解明」(2017 年度～2018 年度)[143]の研究代表者を務めている。

2.4 第 2 章まとめ

本プロジェクト終了後、大型の研究助成金が獲得されて、バイオイメージング技術の開発研究が継続、発展した。細胞周期プローブについては、多くの共同研究で Fucci の実用展開が図られると共に、新たに S 期と G2 期とを識別できる Fucci(CA)が開発された。また、レチノイン酸可視化プローブ GEPRA や、PPI を高感度で測定できる Fluoppi などの開発に成功した。さらに、組織透明化試薬 Sca*l*eA2 を改良し、抗体染色や化学染色の適用も

[134] https://kaken.nii.ac.jp/grant/KAKENHI-PROJECT-15K14329/
[135] https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-25830043/
[136] https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-16K07046/
[137] https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PUBLICLY-23113523/
[138] https://kaken.nii.ac.jp/grant/KAKENHI-PROJECT-26293392/
[139] https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-24590350/
[140] http://www.jst.go.jp/mp/kadai02.html
[141] https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PUBLICLY-15H01321/
[142] https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PUBLICLY-17H05617/
[143] https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-17K15125/

可能なScaleS法が作製された。これらの成果の多くが特許出願された(表2-6)。

先駆的なバイオイメージング技術の開発研究が評価されて、宮脇は藤原賞と島津賞を受賞し、紫綬褒章を受章した。本プロジェクトの研究員の多くが科研費などの助成金を得て、公的研究機関でバイオイメージング研究が継続されている。

表 2-7　プロジェクトの成果と競合技術との比較表

項目			プロジェクト成果	従来の技術・知見	備考
蛍光タンパク質プローブ	1	細胞周期可視化プローブ	Fucci：Cdt1(G1期特異的）にmKO2(赤）、Geminin(S/G2/M期特異的）にmAG(緑）をそれぞれタンパク質の分解に関わる領域に結合させた。トランスジェニックマウスを作製し、神経系の発達に伴う細胞周期の進行をリアルタイム観察。	DNA合成阻害剤を使用する生化学的手法のみで、1細胞の細胞周期を可視化する手段はなかった。	1.5.1(1)
			核だけではなく、細胞全体で蛍光を発するFucciを開発。		1.5.1(1)
			Fucci(CA)：Cdt1を別のE3ユビキチンリガーゼの基質となるように改変し、G1・S・G2を赤・緑・黄の3色で識別することに成功。		2.2.1(1)
			zFucci：ゼブラフィッシュのCdt1とGeminiを用いて、魚類に対応した細胞周期プローブを作製。		1.5.1(1)
	2	オートファジー活性プローブ	mKeima：リソソーム内の酸性pHや分解酵素に耐性なmKeimaを使い、全てのオートファジー活性の測定に成功。	酵母のオートファジー関連遺伝子にGFPを連結したプローブがあったが、蛍光シグナルの持続性がなかった。また、全てのオートファジー活性は見れなかった。	1.5.1(2)①
			mt-mKeima：ミトコンドリアに局在するmt-mKeimaを開発し、ミトコンドリアを選択的に分解するマイトファジー活性を測定。		
	3	タンパク質分解活性プローブ	タンパク質の分解活性が高まると1色のみの発色となる2色蛍光タンパク質プローブを作製し、ユビキチンープロテアソーム系による蛋白質分解活性測定に成功。	ユビキチンープロテアソーム系による蛋白質分解活性を測定できるプローブはなかった。	1.5.1(2)②
	4	酸化ストレスプローブ	ユビキチンープロテアソーム系による蛋白質分解系を応用して、酸化ストレス誘導剤の存在下でのみ蛍光が観察されるプローブを開発。	酸化ストレスを対象としたプローブはなかった。	1.5.1(3)
	5	ビリルビンセンサー	UnaG：シラスウナギから取得した蛍光タンパク質が、その蛍光発色に内在性のリガンドであるビリルビンを必要とすることを発見し、黄疸原因物質であるビリルビンの高感度測定センサーを開発。	生化学検査の対象であるビリルビンの測定法は、検出感度の低い化学法だけであった。	1.5.1(4)

項目			プロジェクト成果	従来の技術・知見	備考
蛍光タンパク質プローブ	6	レチノイン酸可視化プローブ	GEPRA：レチノイン酸とそれの核内受容体との結合する部位を利用し、FRET原理でレチノイン酸濃度を検出できるプローブを作製。	非タンパク質性のモルフォゲンであるレチノイン酸の濃度を測定する手法はなかった。	2.2.1(2)
	7	タンパク質間相互作用可視化プローブ	Fluoppi：多量体で発色する蛍光タンパク質と、多量体形成能を有するタンパク質との、凝集による蛍光輝点形成を活用したPPI可視化プローブを作製。	FRET、BiFC、ddFPsなどを利用したプローブがあるが、再現性や定量性に問題があった。	2.2.1(3)
光学システム開発	8	多光子励起顕微鏡技術開発	流鏑馬システム：波長が変更されてもレーザービームが最適な角度で入射されるように、光軸を自動補正するシステムを開発。	励起波長の変更に伴う光軸のずれを自動で調整するシステムはなかった。	1.5.3(1)
	9		マルチカラーイメージング：ストークシフトが大きいmKeimaを利用し、1つの励起波長で同時に2色の蛍光イメージングに成功。	1励起波長で同時に2色蛍光イメージングの例はなかった。	1.5.3(2)
	10	細胞培養デバイス開発	長時間の培養細胞観察を可能にする、シリコン樹脂の特性を活かした簡易型CO_2チャンバーを作製。	長時間にわたり、CO_2を供給できる簡易型の培養装置はなかった。	1.5.3(5)
	11	生体組織深部観察技術	赤外顕微鏡：赤外波長域の輝度が高いハロゲンランプと、1,000nm以上の光の透過性を高めたレンズ類を開発し、1,600nmの波長で深部観察ができる赤外顕微鏡を作製。	深部観察で多用されていた波長域は700～900nmであった。	1.5.3(4)
	12		生体組織透明化試薬Sca*l*eA2：蛍光シグナルや超微細構造などを保持させて、マウス脳を透明化する尿素主体の試薬を初めて開発。	透明化度と構造保持力の両者のバランスを重視した透明化法は例がなかった。	1.5.3(6)
	13		生体組織透明化試薬Sca*l*eS：尿素にソルビトールを加えてSca*l*eA2の欠点を改良した試薬を作製し、且つ抗体染色や化学色素染色が可能な透明化技術を開発。		2.2.2(1)②

第 3 章　プロジェクト成果の波及と展望

3.1　科学技術への波及と展望

3.1.1　学術的な新発見や発明による科学技術への波及

宮脇は、2014 年のノーベル化学賞受賞対象となった「超解像蛍光顕微鏡の開発」に不可欠な蛍光タンパク質 Kaede や Dronpa を開発するなどの業績で、本プロジェクト開始前から蛍光タンパク質分野のトップランナーであった[144]が、本プロジェクトでも数多くの蛍光プローブが開発された。中でも細胞周期を可視化するタンパク質プローブ Fucci については、事後評価(最終評価)報告書で、「細胞および個体レベルで細胞周期が解析できる系の構築に成功したことは、生物学の基礎研究として極めてレベルの高い成果であり、創薬や医療などの他分野への波及効果も大きい革新的な技術である」[145]と高く評価された。

Fucci の開発に当たり、蛍光タンパク質の導入が細胞や個体の生理機能に何ら影響を与えないことを第一義にして、目的タンパク質とシグナル蛍光タンパク質との連結法が精査され、さらには Fucci が導入されたトランスジェニックマウスが本来の寿命を全うすること、および、正常な子孫を残せることまでを確認の上で論文が発表された[146]。その結果、従来は煩雑な実験系を構築しても精度が低かった細胞周期検出法に、簡便でかつ正確な手法を提供することが可能となった[147]。バイオイメージングのプローブとして、Fucci の汎用性の高さは注目される[148]。

実際、多くの研究者が、細胞周期と種々の生命現象との関連を解明するために Fucci を活用している。抗がん剤および診断薬の研究・開発・販売を目的としたバイオベンチャーであるアンチキャンサージャパン㈱[149]代表者の RM.Hoffman は、Fucci を用いて、がん細胞の細胞周期と化学療法剤に対する感受性との関連を調べ、臨床投与されている抗がん剤の多くが S/G2/M 期でのみ有効であることを示し、G0 期に有効な抗がん剤開発の必要性を論じている[150]。また、湿潤がん細胞ではその細胞周期のほとんどが G0/G1 期で占められているために、薬剤耐性となっていることを示している[151]。

京都大学医学研究科の松田らは、細胞の増殖や分化に関わる Extracellular signal-Regulated Kinase (ERK)の活性を可視化できるマウスを開発し、その活性が表皮細胞間で同心円状に広がる現象を発見し Spatial Propagation of Radial ERK Activity Distribution (SPREAD)と命名したが、Fucci マウスとの掛け合わせにより、SPREAD が細胞

---

144 事後評価(最終評価)報告書
http://www.jst.go.jp/erato/evaluation/posteriori/E_miyawaki_houkoku.pdf
145 事後評価(最終評価)報告書
http://www.jst.go.jp/erato/evaluation/posteriori/E_miyawaki_houkoku.pdf
146 宮脇と阪上のコメントによる
147 外部有識者のコメントによる
148 外部有識者のコメントによる
149 アンチキャンサージャパン株式会社・会社案内
http://www.anticancerjapan.com/company/overview/index.html
150 Yano S, et al., *Cell Cycle*, 13, 2110-2119, 2014
151 Yano S, et al., *Cell Cycle*, 13, 953-960, 2014

周期の G2/M 期に進行することを明らかにした[152](図 3-1)。

また、N. Zielke と BA. Edgar は Fucci 技術に関する総説を発表し、Fucci 技術が植物を含むモデル生物全般に適用され、形態形成・細胞分化・増殖・細胞移動・細胞死など様々な生命現象を研究する科学者達に強力な解析手法を提供したと論じた[153]。表 3-1 にこの総説に取り上げられたものも含め、主要な科学雑誌に掲載された Fucci 利用論文を例示した。細胞周期研究だけではなく、がん化や DNA 損傷応答、幹細胞分化、増殖、概日時計、さらには免疫に関する研究に Fucci 技術が活用されていることがわかる。

「Cell cycle」に関する Wikipedia の記述には、Fluorescence imaging of the cell cycle の項目が設けられ、宮脇らの Fucci 技術が Pioneering work として紹介されている[154]。

本プロジェクト終了後に開発された S 期と G2 期と区分けできる Fucci(CA)は、細胞の状態が DNA 複製の前と真ん中と後でどう変わるかという基本問題に対して明快な回答を与える手段であり[155]、今後の科学技術への波及効果が期待される。

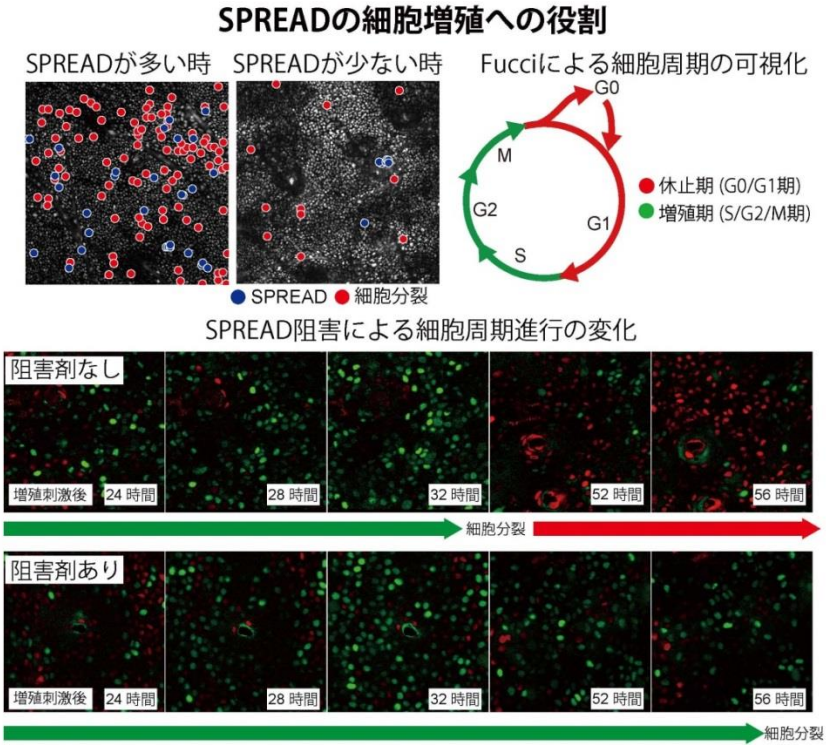


図 3-1　SPREAD の細胞増殖への役割[156]

上：SPREAD が頻繁に見られた時間、場所において細胞分裂も多く見られた。
下：Fucci マウスを用い、SPREAD の細胞周期への役割を調べた。細胞の増殖刺激剤で細胞周期を進行させた状態で SPREAD を阻害剤で抑制したところ、G1 期から S 期への移行には変化が見られなかったが、G2 期から M 期への移行が約 10 時間遅くなることがわかった。

---

[152] Hiratsuka T., et al., *eLife*, 4, e05178, 2015

[153] Zielke N. & Edgar B.A., *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 4, 469-487, 2015

[154] Wikipedia「Cell cycle」 https://en.wikipedia.org/wiki/Cell_cycle

[155] 理研プレスリリース「細胞周期の間期(G1・S・G2)を 3 色で識別する技術の開発」2017 年 10 月 27 日 http://www.riken.jp/pr/press/2017/20171027_1/

[156] 松田研究室ホームページ・研究概要「細胞増殖シグナルは、花火のように伝搬する」 http://www.fret.lif.kyoto-u.ac.jp/rab/hiratsuka.html

表 3-1 細胞周期プローブ Fucci を引用した研究例

著者	掲載雑誌	概要
Santos, SDM, et al.,	Cell, 149, 1500-1513, 2012	G2期からM期移行に必要なCdk1-cyclinB1複合体の詳細な活性化機構を検討する際に、Fucciを利用した。
Johmura Y, et al	Mol Cell, 55, 73-84, 2014	老化誘発剤で処理された正常ヒト二倍体線維芽細胞が、有糸分裂をスキップすることをFucciで実証。
Krenning L, et al	Mol Cell, 55, 59-72, 2014	DNA損傷を受けた網膜色素上皮細胞の細胞周期がG2期で停止することをFucciを用いて観察。
Cappell S., et al	Cell, 166, 167-180, 2016	E3ユビキチンリガーゼAPCCdh1の不活化が、静止期(G0期)からの細胞周期に戻ることに必要なことをFucciで検証。
Davoli T, et al	Cell, 141, 81-93, 2010	p53欠損細胞においてガン化に至る4倍体誘導のメカニズムをFucciを用いて検証。
Mosammaparast N, et al	J Cell Biol, 203, 457-470, 2013	DNA損傷応答におけるヒストンメチラーゼLSD1の役割を検討し、Fucciを用いて、H3K4me2の脱メチル化がDNA損傷部位で細胞周期依存的に起こることを実証。
Karanam K, et al	Mol Cell, 47, 320-329, 2012	二本鎖DNAの損傷は、非相同末端結合(NHEJ)または相同組換え(HR)で修復されるが、各細胞周期におけるNHEJとHRとの相対的寄与度をFucciを用いて定量。
Olcina MM, et al	Mol Vell, 52, 758-766, 2013	DNA損傷応答タンパク質53BP1の低酸素下での損傷部位への集積は、S期に起こることをFucciで観察。
Paul MK, et al	Cell Stem Cell, 15, 199-214, 2014	低濃度の活性酸素による気道基底幹細胞の自己再生促進は、G1期からS期への移行時に高まることをFucciで観察。
Coronado D, et al	Stem Cell Res, 10, 118-131, 2013	Fucciを用いて、マウス胚性幹細胞の分化はS期やG2期の細胞よりもG1期の細胞で盛んなことを実証。
Lee DH, et al	Mol Cell, 54, 512-525, 2013	二重鎖DNA損傷部位への脱リン酸化された53BP1の集積は、G1期であることをFucciで観察。
Calder A, et al	Stem Cell Dev, 22, 279-295	ヒト胚性幹細胞のG1期の長さの変化は、細胞分化の指標となるが、分化への移行の機構解明にFucciが有用であることを提示。
Shaltiel IA, et al	Proc Natl Acad Sci USA, 111, 7313-7318, 2014	不死化網膜色素上皮細胞を用い、DNA損傷によりG2期で停止した細胞は増殖性を喪失するが、G1期で停止した細胞は増殖性を回復することをFucciで観察。
Tkáč J., et al	Mol Cell, 61, 405-418, 2016	Fucciで識別されたS期細胞を用いて、二重鎖DNA損傷修復におけるDNAヘリカーゼBの役割を検討。
Xiang Y., et al	Nature, 543, 573-576, 2017	DNA損傷修復前に細胞周期を移行させない機構として、RNAのメチル化が含まれることを、G1期細胞(Fucci観察)ではUV照射でRNAメチル化が起こらないことなどから提示。
Singh AM, et al	Stem Cell Rep, 1, 532-544, 2013	多能性幹細胞の細胞周期と細胞分化の関係をFucciで検証。
Pauklin, S & Vallier, L	Cell, 155, 135-147, 2013	ヒト胚性幹細胞で、細胞分化のしやすさと細胞周期との関係をFucciで検証。
Gonzales K.A.U., et al	Cell, 162, 564-579, 2015	ヒト胚性幹細胞が分化に移行する際に、多能性を制御する調節機構と細胞周期との相関をFucciを用いて検証。

著者	掲載雑誌	概要
Batsivari A., et al	Stem Cell Rep, 8, 1549-1562, 2017	Fucciマウスを用いて、大動脈・性腺・中胚葉での造血幹細胞の成熟過程における細胞周期を観察。
Kawaguchi K., et al	Nature, 545, 327-331	神経幹細胞の集団に、液晶や磁性体などで知られる『トポロジカル欠陥』が形成されることを示した研究で、神経幹細胞が細胞周期進行に伴って示す頂端方向(G2期)および基底方向(G1期)への核移動の様子をFucciで観察。
Kafri et al	Nature, 493, 480-483, 2013	哺乳類動物細胞のサイズを制御する機構を研究する手段としてFucci技術を取り込んだ方法を提示。
Son S, et al	Nat Methods, 9, 910-912, 2012	マウスリンパ球芽球の各細胞周期における増殖速度をFucciを用いて測定。
Tylon DR, et al	Nat Methods, 9, 923-928, 2012	細胞増殖のダイナミクス(分裂・静止・死)を定量化する手段としてFucci技術を取り込んだ方法を提示。
Kind J., et al	Cell, 163, 134-147, 2015	ヒト骨髄性白血病細胞のS期細胞をFucciにより選別し、クロマチン構造の解析に利用。
Cervenka I., et al	Proc Natl Acad Sci USA, 113, 9304-9309, 2016	Fucciで各細胞周期ごとに選別されたHeLa細胞を用いて、微小管形成中心(centrosome)と、胚発生とガンに関連するタンパク質のネットワークであるWntシグナル経路との関連を検討。
Gitlin A.D., et al	Science, 349, 643-646, 2015	ヘルパーT細胞が、B細胞を高親和性抗体産生細胞に分化させる機構として、S期の短縮化にあることをFucciで検証。
Wang Y., et al	Nat Immunol, 18, 921-930, 2017	メモリーB細胞がいかに形成されるかを知るために、新たにユビキチンCのプロモーター下で発現するバイシストロニックFucciマウスを作製し、胚中心に存在する前駆B細胞が細胞周期を停止しG0期に移行することを実証。
Wei K., et al	Nature, 525, 479-485, 2015	心臓の心外膜が分泌する因子が、哺乳類の成人心筋再生に関与することを示す研究でFucciを使用。
Edgar R.S., et al	Proc Natl Acad Sci USA, 113, 10085-10090, 2016	マウスを用い、概日時計によるウイルス感染の自律的調節をFucciで観察される細胞周期と絡めて検討。
Matsu-ura T., et al	Mol Cell, 64, 900-912, 2016	マウス腸オルガノイドを用い、Fucciで観察された細胞周期と概日時計リズムとの相関を検討。
Thul PJ., et al	Science, 356, 820, 2017	12,003個のヒトタンパク質の細胞内での局在性を網羅するプロテオソーム研究で、細胞周期とタンパク質局在性との関係を調べるためにFucciを活用。

本プロジェクトで開発された他のプローブもそれぞれ医学研究への貢献が期待されている。マイトファジー可視化プローブの mt-mKeima はパーキンソン病の研究に使用されている(2.2.1(4))。また、レチノイン酸可視化プローブ GEPRA について、今後の期待として、「GEPRA を哺乳類動物に適用することで、妊婦のビタミン A 過剰摂取による胎児催奇形成のメカニズム解析や、リンパ球が体を巡ってリンパ組織に戻るホーミング現象、神経シナプスの可塑性などにおけるレチノイン酸の動きを解析できると期待される。また、レチノイン酸は細胞の分化を促す作用をもつため、皮膚病やがんの治療、iPS 細胞技術を中心とした再生

医療分野でも重要であり、GEPRA は、その適用範囲をますます拡大していく可能性を秘めている。」と理研からプレスリリースされた[157]。

組織透明化技術である Sca*I*e および Sca*I*eS は、アルツハイマー病などの脳疾患以外に、がん細胞の転移や浸潤、がん幹細胞の局在を探るための有効なツールに発展すると期待される[158]。また、再生医学研究において ES 細胞や iPS 細胞から分化誘導した神経細胞の、移植後の細胞の正着の様子や挙動を追跡する際にも有用である[159]。一方で、透明化技術の開発は、光学顕微鏡技術開発をも誘発している。実際、観察深度は対物レンズの作動距離に依存して制限を受けるため、顕微鏡メーカーは、開口数を高く維持しながら対物レンズの作動距離を長くする技術開発に取組み、観察深度限界を飛躍的に拡大させた[160]。

3.1.2 新たな研究領域や研究の潮流の形成

本プロジェクトの基本理念は、細胞を可視化するプローブと、生物個体の観察を可能にするための光学機器システムとを双方向的に開発展開することで、生物個体を扱うバイオイメージングの新たな潮流を開花させることであったが(図 1-1)、Sca*I*e 技術はこの双方向性の実現に大きく貢献した。一方で、Sca*I*e 技術は、画像処理を含めたバイオイメージング技術の課題を改めて提示したと考えられる[161]。これを受けて、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「共鳴誘導で革新するバイオイメージング」が立ち上がった[162]。

本研究領域の具体的な研究テーマとして、「超解像イメージング」、「生体深部イメージング」、「ストレスイメージング」、および「ズーミングインアウト」が設定され、「バイオイメージングに関する基本的な問題・課題を領域内で共有しながら、色素、光学顕微鏡、イメージングソフトウエア、サンプル調製を包括する技術革新の渦を広げる」ことが目標に掲げられている。平成 27 年度新学術領域研究(研究領域提案型)審査結果の所見は、「本研究領域は、生命科学の発展に必須なバイオイメージング技術について、より適用範囲の広い革新的なバイオイメージング技術の実用化を目指すものである。本研究領域により開発されるイメージング技術は、医学・生物学等の研究分野への波及効果も期待できる」と述べている[163]。

宮脇らが培ったバイオイメージング技術は、日本医療研究開発機構(AMED)戦略推進部(脳と心の研究課)「革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクト(Brain/minds 革新脳)」(2014 年度～2023 年度)[164]に活かされている。AMED はこのプロジェクトの目的を、霊長類マーモセットを題材に、「欧米が相次いで脳科学研究の大型プロジェクトを立ち上げる中、オールジャパン体制で脳科学研究を加速させることにより、世界に先

---

157 理研プレスリリース「動物の体作りに重要なレチノイン酸の可視化に成功」2013 年 4 月 8 日
http://www.riken.jp/pr/press/2013/20130408_1/

158 生体の科学、64, 595-601, 2013

159 生体の科学、64, 595-601, 2013

160 生体の科学、64, 595-601, 2013

161 宮脇のコメントによる

162 科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「共鳴誘導で革新するバイオイメージング」
https://reso.m.ehime-u.ac.jp/

163 https://kaken.nii.ac.jp/ja/file/KAKENHI-AREA-3704/3704_saitaku_shoken_ja.pdf

164 AMED 脳科学研究戦略推進プログラム・革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクト
http://www.amed.go.jp/program/list/01/04/012.html

駆けた精神・神経疾患の克服や情報処理理論の高度化につなげるための基盤を構築する」こととしている。大阪読売新聞は、EU ではマウスやヒトで神経細胞のつながり方や脳情報の収集、米国では線虫やショウジョウバエなどの脳の活動情報を示す脳機能地図の作成を目指しているとし、AMED のプロジェクトで、宮脇が、マーモセットが行動する際に脳のどの部分が興奮するかなどを計測、記録するための技術開発を担当すると報じた[165)]。

3.1.3 科学技術への波及のまとめと展望

本プロジェクトで開発された機能プローブ類や組織透明化技術は、がん、パーキンソン病、黄疸、アルツハイマー病などの病態解明に幅広く利用されており、本プロジェクトの研究成果が、「機能プローブ開発と光学システム開発とを双方向的に展開することで、バイオイメージング技術を発生学、遺伝学、医学などの分野に普及させる」という本プロジェクトの目標の達成に向け、着実に進展していることが窺える。

一方で、広範囲の研究者がバイオイメージング技術を自身の研究に取り込むには、多くの解決すべき課題があることも事実である。蛍光顕微鏡や多光子励起蛍光顕微鏡は非常に高価で、かつ専門のオペレーターの育成が必要である。また、得られた膨大なデータを処理するソフトウエアの整備にも多大な費用が必要であり、これらは通常の科研費枠で賄えるものではない[166)]。このことに関連して、日本学術会議は 2017 年に、「生命科学の発展を加速する次世代バイオイメージング科学の推進」を発表し、「光学ライブイメージング技術を中核にオミックス技術・データ解析技術を集積・統合することで、遺伝情報発現の動的状態推定など新しい技術開発が可能になる。クライオ電子顕微鏡等によるタンパク質の精密な構造多型データやプローブを用いた動的計測結果を大規模な分子シミュレーションによって動的に結合することにより、タンパク質の構造動態を解明し創薬等の基盤とすることも可能になる。こうした技術は生命科学・医療・創薬の様々な分野で利用可能な基盤技術であり、その社会的影響は極めて大きい。ただし、その実現には膨大な数の試料のハイスループット計測を可能にする実験オートメーションや、莫大量の計測データを処理しモードの異なるデータを関連づける機械学習・人工知能など最先端応用情報技術の進化が必須であるため、このような基盤技術の開発を全国規模で統括し推進するハブ研究拠点の設立が必要不可欠である。」と、提言している[167)]。

3.2 社会経済への波及と展望

3.2.1 医療・創薬・健康分野への応用

本プロジェクトで開発された蛍光タンパク質プローブや組織透明化技術は、医療・創薬・健康分野への展開が図られている。2015 年度島津賞の受賞理由として、島津科学技術振興

---

165 大阪読売新聞 2014 年 6 月 16 日朝刊「人に近い霊長類　マーモセット　病気治療モデルに　脳解明国の研究スタート

166 外部有識者のコメントによる

167 日本学術会議 基礎生物学委員会・統合生物学委員会合同 生物物理学分科会　提言「生命科学の発展を加速する次世代統合バイオイメージング科学の研究推進」2017 年 9 月 20 日 http://www.scj.go.jp/ja/info/kohyo/pdf/kohyo-23-t250-5.pdf

財団は「その成果物の普及は学術分野に留まらず、医療、創薬などの産業分野にも着実に拡がっており、たとえば、がん、アルツハイマー病などの変性疾患、先天奇形、黄疸などの診断技術に活用されつつあること」としたが(2.3 参照)、細胞周期可視化プローブ Fucci(がん領域)、マイトファジー活性プローブ mt-mKeima(パーキンソン病)、ビリルビンセンサー UnaG(黄疸、特に新生児黄疸)、Sca*I*eS(アルツハイマー病)などがこれに該当する。

創薬への応用についても、多くのプローブで製薬会社との共同研究が進行している(非公開情報)[168]。タンパク質間相互作用(PPI)可視化プローブ Fluoppi を共同で開発した MBL は、プレスリリースで、「タンパク質間相互作用を標的とした革新的な創薬探索技術の確立を目指して p53 Laboratory(A*STAR, Biomedical Science Institutes)との共同研究を開始」と報じた[169]。共同研究の概要は、「Fluoppi を用いて、p53 Laboratory が保有する細胞内 PPI を標的とした医薬候補ペプチドの細胞質透過性と PPI 阻害効果を同時に検証するプロジェクトを実施し、近年注目を集める PPI 標的薬・ペプチド医薬分野の創薬を加速する技術の確立を目指す」こととしている。

健康診断生化学検査の 1 項目となっているビリルビンは、黄疸の原因物質であるが、一方で、細胞膜で機能する抗酸化物質としても注目されており[170]、血清中の濃度が適正値であれば健康増進につながる可能性がある。血清ビリルビン濃度を持続的に測定し、ヒト体内のビリルビン動態についての理解を深めることで、ビリルビンセンサーUnaG を黄疸診断だけでなく、一般人の日々の体調管理やスポーツ選手のピーク時管理にも応用できると期待される[171]。

なお、開発されたプローブ類の多くは主に MBL が研究用として市販している[172]。また、Sca*I*eA2 は、富士フイルム和光純薬(株)が試薬販売している[173]。

3.2.2 社会への貢献

小中学生を含む一般人にバイオイメージング技術を平易に解説するアウトリーチ活動に積極的に取組んでいる。公益財団法人テルモ生命科学技術財団が発信している「中高生といのちの不思議を考える」シリーズで、GFP 発見に始まる蛍光タンパク質の歴史や Fucci、Sca*I*e 技術について解説が行われた[174]。また、領域代表者を務める科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「共鳴誘導で革新するバイオイメージング」の主催または共催で、サイエンスカ

---

168 宮脇のコメントによる

169 MBL プレスリリース「タンパク質間相互作用を標的とした革新的な創薬探索技術の確立を目指して p53 Laboratory(A*STAR, Biomedical Science Institutes)との共同研究を開始」2017 年 5 月 22 日 http://v4.eir-parts.net/v4Contents/View.aspx?cat=tdnet&sid=1476771

170 ウィキペディア「ビリルビン」 https://ja.wikipedia.org/wiki/%E3%83%93%E3%83%AA%E3%83%AB%E3%83%93%E3%83%B3

171 理研プレスリリース「ニホンウナギから人類初のビリルビンセンサー」2013 年 6 月 14 日 http://www.riken.jp/pr/press/2013/20130614_1/

172 MBL 蛍光タンパク質 http://ruo.mbl.co.jp/bio/product/flprotein/

173 富士フイルム和光純薬株式会社 試薬ホーム http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/SCALEVIEW/index.htm

174 テルモ生命科学芸術財団 中高生といのちの不思議を考える 生命科学 DOKIDOKI 研究室 今注目の最先端研究・技術探検！第 14 回「蛍光タンパク質を使って生きた細胞の活動をリアルタイムに観察」 https://www.terumozaidan.or.jp/labo/technology/14/index.html

フェ[175)176)]、展示会[177)]、研究室見学会[178)]などが開催された。

3.2.3 メディアを介した研究成果の発信

本プロジェクト終了後の研究成果の多くが、専門紙だけではなく、一般紙にも取り上げられており(表 3-2)、バイオイメージング技術に対する一般の関心が高いことが窺える。

表 3-2 研究成果等の報道実績

項目	報道した新聞社
レチノイン酸可視化プローブ GEPRA	朝日新聞、科学新聞、日経産業新聞
ビリルビンセンサーUnaG	毎日新聞、東京読売新聞、日本経済新聞、産経新聞、科学新聞、化学工業日報
組織透明化技術 Sca*l*eS	科学新聞
結晶蛍光タンパク質 Xpa	日刊工業新聞
AMED「革新脳」	大阪読売新聞、日刊工業新聞
島津賞受賞	大阪読売新聞、日本経済新聞、科学新聞、日経産業新聞、日刊工業新聞、化学工業日報

3.2.4 社会経済への波及のまとめと展望

本プロジェクトの研究成果の多くが特許出願され、創薬や健康分野での応用展開が進展している。また、開発された機能プローブ類や透明化技術は、がんやアルツハイマー病、あるいは iPS 細胞などの医療研究に活用されつつあり、将来的に国民生活への貢献にも繋がることが期待される、と多くの新聞で報じられている。

[175] サイエンスカフェ ～発光生物を使う科学～@福生アメリカンハウス 2017 年 10 月 7 日 https://reso.m.ehime-u.ac.jp/post-1339/

[176] 代官山 蔦屋書店で つながる∞脳科学 2017 年 4 月 14 日 共催 http://www.riken-bsi20.jp/article2034

[177] 展示「発光と蛍光」 in 第 29 回福生インターナショナルフェア 2017 年 10 月 14 日～15 日 https://reso.m.ehime-u.ac.jp/post-1381/

[178] 四天王寺中学校 研究室訪問 2017 年 8 月 21 日 https://reso.m.ehime-u.ac.jp/post-1283/

【引用文献】

[1] Sakaue-Sawano A., Kurokawa H., Morimura T., Hanyu A., Hama H., Osawa H., Kashiwagi S., Fukami K., Miyata T., Miyoshi H., Imamura T., Ogawa M., Masai H., Miyawaki A, “Visualizing Spatiotemporal Dynamics of Multicellular Cell-Cycle Progression”, *Cell*, 132,487-498, 2008

[2] Sakaue-Sawano A., Kobayashi T., Ohtawa K., Miyawaki A, “Drug-induced cell cycle modulation leading to cell-cycle arrest, nuclear mis-segregation, or endoreplication”, *BMC Cell Biol*, 13, 12:2, 2011

[3] Sakaue-Sawano A., Ohtawa K., Hama H., Kawano M., Ogawa M., Miyawaki A, “Tracing the Silhouette of Individual Cells in S/G2/M Phases with Fluorescence”, *Chem Biol*, 15, 1243-1248, 2008

[4] Sugiyama M., Sakaue-Sawano A., Iimura T., Fukami K., Kitaguchi T., Kawakami K., Okamoto H., Higashijima S.-I., Miyawaki A, “Illuminating cell-cycle progression in the developing zebrafish embryo”, *Proc Natl Acad Sci USA*, 106, 20812-20817, 2009

[5] Katayama H., Kogure T., Mizushima N., Yoshimori T., Miyawaki A, “A sensitive and quantitative technique for detecting autophagic events based on lysosomal delivery”, *Chem Biol*, 18, 1042-1042, 2011

[6] Kumagai A., Ando R., Miyatake H., Greimel P., Kobayashi T., Hirabayashi Y., Shimogori T., Miyawaki A, “A bilirubin-inducible fluorescent protein from eel muscle”, *Cell*, 153, 1602-1611, 2013

[7] Hara-Miyauchi C., Tsuji O., Hanyu A., Okada S., Yasuda A., Fukano T., Akazawa C., Nakamura M., Imamura T., Matsuzaki Y., Okano H.J., Miyawaki A., Okano H, “Bioluminescent system for dynamic imaging of cell and animal behavior”, *Biochem Biophys Res Commun*, 419, 188-193, 2012

[8] Kawano H., Kogure T., Abe Y., Mizuno H., Miyawaki A, “Two-photon dual-color imaging using fluorescent proteins”, *Nat Methods*, 5, 373-374, 2008

[9] Kogure T., Kawano H., Abe Y., Miyawaki A, “Fluorescence imaging using a fluorescent protein with a large Stokes shift”, *Methods*, 45, 223-226, 2008

[10] Hirano M., Hoshida T., Sakaue-Sawano A., Miyawaki A, “A poly(dimethylsiloxane)-based device enabling time-lapse imaging with high spatial resolution”, *Biochem Biophys Res Commun*, 392, 307-310, 2010

[11] Hama H., Kurokawa H., Kawano H., Ando R., Shimogori T., Noda H., Fukami K., Sakaue-Sawano A., Miyawaki A, “Scale: A chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain”, *Nat Neurosci*, 14, 1481-1488, 2011

[12] Tomura M., Sakaue-Sawano A., Mori Y., Takase-Utsugi M., Hata A., Ohtawa K., Kanagawa O., Miyawaki A, “Contrasting Quiescent G0 Phase with Mitotic Cell Cycling in the Mouse Immune System”, *PLoS ONE*, 8, e73801, 2013

[13] Oki T., Nishimura K., Kitaura J., Togami K., Maehara A., Izawa K., Sakaue-Sawano A., Niida A., Miyano S., Aburatani H., Kiyonari H., Miyawaki A., Kitamura T, “A novel cell-cycle-indicator, mVenus-p27K -, identifies quiescent cells and visualizes G0-G1 transition”, *Sci Rep*, 4, 4012, 2014

[14] Sakaue-Sawano A., Yo M., Komatsu N., Hiratsuka T., Kogure T.,Hoshida T., Goshima N., Matsuda M., Miyoshi H., and Miyawaki A., “Genetically-Encoded Tools for Optical Dissection of the Mammalian Cell Cycle.”, *Mol Cell*, doi: 10.1016/j.molcel.2017.10.001, 2017

[15] Mort R.L., Ford M.J., Sakaue-Sawano A., Lindstrom N.O., Casadio A., Douglas A.T., Keighren M.A., Hohenstein P., Miyawaki A., Jackson I.J, “Fucci2a: A bicistronic cell cycle reporter that allows Cre mediated tissue specific expression in mice”, *Cell Cycle*, 13, 2681-2696, 2014

[16] Sakaue-Sawano A., Hoshida T., Yo M., Takahashi R., Ohtawa K., Arai T., Takahashi E., Noda S., Miyoshi H., Miyawaki A, “Visualizing developmentally programmed endoreplication in mammals using ubiquitin oscillators”, *Development (Cambridge)*, 140, 4624-4632, 2013

[17] Nishimura K., Oki T., Kitaura J., Kuninaka S., Saya H., Sakaue-Sawano A., Miyawaki A., Kitamura T, “APCCDH1 Targets MgcRacGAP for Destruction in the Late M Phase”, *PLoS ONE*, 8, e63001, 2013

[18] Kinjyo I., Qin J., Tan S.-Y., Wellard C.J., Mrass P., Ritchie W., Doi A., Cavanagh L.L., Tomura M., Sakaue-Sawano A., Kanagawa O., Miyawaki A., Hodgkin P.D., Weninger W, “Real-time tracking of cell cycle progression during CD8+ effector and memory T-cell differentiation2, *Nat Commun*, 6, 6301, 2015

[19] Nonomura K., Yamaguchi Y., Hamachi M., Koike M., Uchiyama Y., Nakazato K., Mochizuki A., Sakaue-Sawano A., Miyawaki A., Yoshida H., Kuida K., Miura M, “Local apoptosis modulates early mammalian brain development through the elimination of morphogen-producing cells”, *Dev Cell*, 27, 621-634, 2013

[20] Jovic D., Sakaue-Sawano A., Abe T., Cho C.-S., Nagaoka M., Miyawaki A., Akaike T, “Direct observation of cell cycle progression in living mouse embryonic stem cells on an extracellular matrix of E-cadherin”, *SpringerPlus*, 2, 2013

[21] Yo M., Sakaue-Sawano A., Noda S., Miyawaki A., Miyoshi H, “Fucci-guided purification of hematopoietic stem cells with high repopulating activity”, *Biochem Biophys Res Commun*, 457, 7-11, 2015

[22] Shirakawa J., Ezura Y., Moriya S., Kawasaki M., Yamada T., Notomi T., Nakamoto T., Hayata T., Miyawaki A., Omura K., Noda M, “Migration linked to FUCCI-indicated cell cycle is controlled by PTH and mechanical stress”, *J Cell Phys*, 229, 1353-1358, 2014

[23] Katsumura S., Ezura Y., Izu Y., Shirakawa J., Miyawaki A., Harada K., Noda M, “Beta Adrenergic Receptor Stimulation Suppresses Cell Migration in Association with Cell Cycle Transition in Osteoblasts-Live Imaging Analyses Based on FUCCI System”, *J Cell Phys*, 231, 496-504, 2016

[24] Motiur Rahman M., Takeshita S., Matsuoka K., Kaneko K., Naoe Y., Sakaue-Sawano A., Miyawaki A., Ikeda K, “Proliferation-coupled osteoclast differentiation by RANKL: Cell density as a determinant of osteoclast formation”, *Bone*, 81, 392-299, 2015

[25] Takegahara N., Kim H., Mizuno H., Sakaue-Sawano A., Miyawaki A., Tomura M., Kanagawa O., Ishii M., Choi Y, “Involvement of receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL)-induced incomplete cytokinesis in the polyploidization of osteoclasts”, *J Biol Chem*, 291, 3439-3454, 2016

[26] Hashimoto H., Yuasa S., Tabata H., Tohyama S., Hayashiji N., Hattori F., Muraoka N., Egashira T., Okata S., Yae K., Seki T., Nishiyama T., Nakajima K., Sakaue-Sawano A., Miyawaki A., Fukuda K, “Time-lapse imaging of cell cycle dynamics during development in living cardiomyocyte”, *J Mol Cell Cardiol*, 72, 241-249, 2014

[27] Hashimoto H., Yuasa S., Tabata H., Tohyama S., Seki T., Egashira T., Hayashiji N., Hattori F., Kusumoto D., Kunitomi A., Takei M., Kashimura S., Yozu G., Shimojima M., Motoda C., Muraoka N., Nakajima K., Sakaue-Sawano A., Miyawaki A., Fukuda K, “Analysis of cardiomyocyte movement in the developing murine heart”, *Biochem Biophys Res Commun*, 464, 1000-1007, 2015

[28] Pineda G., Lennon K.M., Delos Santos N.P., Lambert-Fliszar F., Riso G.L., Lazzari E., Marra M.A., Morris S., Sakaue-Sawano A., Miyawaki A., Jamieson C.H.M, “Tracking of Normal and Malignant Progenitor Cell Cycle Transit in a Defined Niche”, *Sci Rep*, 6, 23885, 2016

[29] Sugiyama M., Saitou T., Kurokawa H., Sakaue-Sawano A., Imamura T., Miyawaki A., Iimura T, “Live Imaging-Based Model Selection Reveals Periodic Regulation of the Stochastic G1/S Phase Transition in Vertebrate Axial Development”, *PLoS Comp Biol*, 10, 16, 2014

[30] Fukuhara S., Zhang J., Yuge S., Ando K., Wakayama Y., Sakaue-Sawano A., Miyawaki A., Mochizuki N, “Visualizing the cell-cycle progression of endothelial cells in zebrafish”, *Dev Biol*, 393, 10-23, 2014

[31] Shimozono S., Iimura T., Kitaguchi T., Higashijima S.-I., Miyawaki A, “Visualization of an endogenous retinoic acid gradient across embryonic development”, *Nature*, 496, 363-366, 2013

[32] Watanabe T., Seki T., Fukano T., Sakaue-Sawano A., Karasawa S., Kubota M., Kurokawa H., Inoue K., Akatsuka J., Miyawaki A, “Genetic visualization of protein interactions harnessing liquid phase transitions”, *Sci Rep*, 7, 46380, 2017

[33] Kitaguchi T., Oya M., Wada Y., Tsuboi T., Miyawaki A, “Extracellular calcium influx activates adenylate cyclase 1 and potentiates insulin secretion in MIN6 cells”, *Biochem J*, 450, 365-373, 2013

[34] Tomura M., Hata A., Matsuoka S., Shand F.H.W., Nakanishi Y., Ikebuchi R., Ueha S., Tsutsui H., Inaba K., Matsushima K., Miyawaki A., Kabashima K., Watanabe T., Kanagawa O, “Tracking and quantification of dendritic cell migration and antigen trafficking between the skin and lymph nodes”, *Sci Rep*, 4, 6030, 2014

[35] Iwatani S., Nakamura H., Kurokawa D., Yamana K., Nishida K., Fukushima S., Koda T., Nishimura N., Nishio H., Iijima K., Miyawaki A., Morioka I, “Fluorescent protein-based detection of unconjugated bilirubin in newborn serum”, *Sci Rep*, 6, 28489, 2016

[36] Lindberg E., Mizukami S., Ibata K., Fukano T., Miyawaki A., Kikuchi K, “Development of cell-impermeable coelenterazine derivatives”, *Chem Sci*, 4, 4395-4400, 2013

[37] Lindberg E., Mizukami S., Ibata K., Miyawaki A., Kikuchi K, “Development of luminescent coelenterazine derivatives activatable by β-galactosidase for monitoring dual gene expression”, *Chemistry - A European J*, 19, 14970-14976, 2013

[38] Kim M.-J., Bae S.H., Ryu J.-C., Kwon Y., Oh J.-H., Kwon J., Moon J.-S., Kim K., Miyawaki A., Lee M.G., Shin J., Kim Y.S., Kim C.-H., Ryter S.W., Choi A.M.K., Rhee S.G., Ryu J.-H., Yoon J.-H, “SESN2/sestrin2 suppresses sepsis by inducing mitophagy and inhibiting NLRP3 activation in macrophages”, *Autophagy*, 12, 1272-1291, 2016

[39] Suzuki S., Akamatsu W., Kisa F., Sone T., Ishikawa K.-I., Kuzumaki N., Katayama H., Miyawaki A., Hattori N., Okano H, “Efficient induction of dopaminergic neuron differentiation from induced pluripotent stem cells reveals impaired mitophagy in PARK2 neurons”, *Biochem Biophys Res Commun*, 483, 88-93, 2017

[40] Susaki E.A., Tainaka K., Perrin D., Kishino F., Tawara T., Watanabe T.M., Yokoyama C., Onoe H., Eguchi M., Yamaguchi S., Abe T., Kiyonari H., Shimizu Y., Miyawaki A., Yokota H., Ueda H.R, “Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis”, *Cell*, 157, 726-739, 2014

[41] Hama H., Hioki H., Namiki K., Hoshida T., Kurokawa H., Ishidate F., Kaneko T., Akagi T., Saito T., Saido T., Miyawaki A, “ScaleS: An optical clearing palette for biological imaging”, *Nat Neurosci*, 18, 1518-1529, 2015

[42] Fujita K., Motoki K., Tagawa K., Chen X., Hama H., Nakajima K., Homma H., Tamura T., Watanabe H., Katsuno M., Matsumi C., Kajikawa M., Saito T., Saido T., Sobue G., Miyawaki A., Okazawa H, “HMGB1, a pathogenic molecule that induces neurite degeneration via TLR4-MARCKS, is a potential therapeutic target for Alzheimer's disease”, *Sci Rep*, 6, 31895, 2016

[43] Tsutsui H., Jinno Y., Shoda K., Tomita A., Matsuda M., Yamashita E., Katayama H., Nakagawa A., Miyawaki A, “A diffraction-quality protein crystal processed as an autophagic cargo”, *Mol Cell*, 58, 186-193, 2015