

研究課題別評価

1 研究課題名：色素タンパク質による生体機能の時空間的な不活性化法の確立

2 研究者氏名：永井 健治

3 研究の狙い：

光増感物質は特定波長の光をあてると酸素の存在下で反応性の高い活性酸素を産生する。本研究は、cDNA にコードされた光増感物質を開発し、細胞内小器官やある組織中の任意の細胞種に特異的に発現させ、光照射によりそれらを破壊することにより、細胞内小器官や細胞の役割を調べる方法を開発することが狙いである。

4 研究成果：

特定の外界刺激に応じて、細胞内では特定のシグナル伝達反応が起こり、細胞の分化、形態変化、分裂、死などの現象が誘起される。こうした細胞内の情報伝達に関わる分子群とそれらの相互作用に関する知見は我々の頭では記憶できないほど蓄積している。ある分子種を過剰発現させたり、あるいは欠失させる実験により、どの分子がどの現象に関与しているのかも明らかになってきた。しかし、これらの知見からは生物の持つ“やわらかさ”や“堅牢さ”を理解することは難しい。情報伝達が時空間的にどのように広がっていくのか？、その過程で恣意的な摂動を加えたとき、細胞はどのように反応するのか？等々の知見を蓄積していくことにより、より包括的な生理現象への理解に踏み込むことができるであろう。細胞内の情報伝達がいつ、どこで、どの程度起きるのかを把握できる可視化技術が近年目覚しく発展しつつある。その一方で、ある分子を任意の時間と場所で思い通りに欠失させたり、過剰発現させる技術は未だ発展途上と言わざるを得ない。顕微観察装置(光技術)の発展もさることながら、蛍光タンパク質という、蛍光性が“遺伝子”にすべて書き込まれている分子の登場が可視化技術の発展に欠かせない1つの要因であった。ならば、ある分子の時空間的な生理機能も“遺伝子”と光の技術で操作することはできないであろうか？

蛍光物質は光のエネルギーを吸収し、そのエネルギーを蛍光というエネルギーの形で放出する。もし光のエネルギーを吸収するが、蛍光を出さなくなったら吸収したエネルギーはどうやって放出されるのであろうか？1つには熱として放出する場合が考えられる。あるいは光増感とよばれる過程により活性酸素などのラジカルを産生するエネルギーに使われる場合もありうる。活性酸素はその反応性の高さゆえ、それが発生した近傍の分子のみを破壊するに違いない。この発想に基づき、Daniel Jay は 1988 年に CALI(chromophore-assisted laser inactivation)法を開発した。CALI 法は 628nm に極大吸収をもつ無蛍光性のマラカイトグリーン色素を抗体に標識し、その抗体による特異的結合で標的分子を特定化し、その上で強光を照射すると色素から活性酸素が生じて標的分子を機能的に破壊するというものである。本方法を利用して、これまでいくつかの分子機能解析が行われてきた。しかしながら、標的分子の機能を阻害しない抗体を使用しなければならない、色素標識抗体をマイクロインジェクションにより細胞に導入しなければならない、出力の大きなレーザーを用いなければならない等々の制約があり、誰もが容易に使える技術にはなっていない。もしマラカイトグリーン色素と同等の能力を有する分子を遺伝子的に作成できれば、少なくとも上記制約の前2者は解決され、生物学研究の様々な分野で利用されるようになると期待される。このような背景から「吸光性は有るが蛍光性の無い“色素タンパク質”で尚且つ光増感活性(活性酸素産生能)を持つものを作成することにより光照射依存的に特異的生理機能を不活性化できる新技術を開発することができるかもしれない」と考えた。先ず無蛍光性変異体を得るためにオワンクラゲ由来緑色蛍光タンパク質およびその蛍光色変異体にランダム変異や点変異または円順列変異を導入した。その結果モル吸光係数の大幅な低下をもたらすことなく蛍光量子収率を減少さ

せることができた。特に、黄色蛍光タンパク質に円順列変異と幾つかの点変異を導入したものはモル吸光係数が約 $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 、蛍光量子収率が 0.1 以下となり、希望に近い特性をもつものとなった。ところが、これらの蛍光・色素タンパク質が光照射依存的に活性酸素を産生するかどうか調べたところ、有意に産生するものは得られなかった。その理由は、産生した活性酸素のほぼ全てが自らの破壊に使われる、より詳しくは、使用した蛍光タンパク質の構造上(光吸収する色素団がタンパク質の中心にある)発生した活性酸素が色素団の破壊に使われ、タンパク質の外側に出て行かなかったからであると推測された。

しかしながら、この研究過程で作成した円順列変異蛍光タンパク質を含む多くの蛍光・色素タンパク質を捨ててしまうのはあまりにも忍びないため、何か他に用途はないものかと思案に明け暮れた。元来、私は蛍光タンパク質を用いた生理機能の可視化を専門としていたのだが、そのような技術の一つである FRET(蛍光のエネルギー移動)を用いた機能指示薬の作成に利用できるのではないかと考えた。その結果、シグナル変化量が極めて大きな GFP 間 FRET ベースのカルシウムセンサーを開発することができた。本方法は積極的にドナーとアクセプターの相対的角度を変える方法であり、FRET を利用したバイオセンサー開発にとって必須の方法論になるものと期待される。(Nagai et al., PNAS 2004)。本技術は原理的に蛍光タンパク質間の FRET を利用したあらゆる機能指示薬の開発に応用可能である。

さて、本業の光照射依存的な生理機能破壊については、アプローチの仕方を変え「強力な光増感活性を持つ有機化合物の探索と、その化合物を蛍光タンパク質に標識することにより複数種の生理機能の個別的破壊を“遺伝子的”に行う」技術の開発に専心した。その結果、現在 CALI 法における色素増感物質として頻用されている fluorescein よりも効率よく活性酸素(一重項酸素)を光照射により産生する色素として 5-bromo-fluorescein を見出した。さらに、緑色蛍光蛋白質(GFP)から光増感物質への蛍光エネルギー移動を利用して、光増感物質の最適波長とは異なる波長で励起させることにより活性酸素を産生し、複数種の標的生理機能を不活性化する技術ならびに GFP の N 末側と遺伝的に連結した任意の標的蛋白質を発現する細胞に、光増感物質標識した GFP の C 末側を導入することで、GFP の構造を回復させ、GFP から光増感物質への蛍光エネルギー移動を利用して、光増感物質より活性酸素を産生させ、任意の標的蛋白質やオルガネラを不活性化させる方法を確立することができた(論文投稿準備中)。

5 自己評価:

申請時に提案した課題は方法論的には上手く行かなかったが、様々な試行錯誤を経て当初の目的になかった技術を開発することができた。さらに、その試行錯誤の過程で作成した蛍光タンパク質を利用することによって、GFP 間 FRET を利用した高性能バイオセンサーの作成技術を開発できた。何れの技術も汎用性の高い技術であり、多くの研究者が利用するものと思われる。

6 研究総括の見解:

当初は、狙い通りに中々進まず苦しい時期を経験したが、発想を転換して高感度の機能指示薬を開発し数件の特許出願に結びつけた。また色々試行錯誤して狙いの不活性化を達成するなど粘り強さは評価できる。領域会議やシンポジウムでも積極的に発言し後続の研究者にも良い影響を与えた。

7 主な論文等:

論文

- 1.Nagai T, Yamada S, Tominaga, T, Ichikawa M & Miyawaki A. Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca^{2+} by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 10554-10559, 2004
- 2.Okamoto K, Nagai T, Miyawaki A & Hayashi Y. Rapid and persistent modulation of actin dynamics

regulates postsynaptic reorganization underlying bi-directional plasticity. *Nat. Neurosci.* 7: 1104-1112, 2004

3. Nagai T & Miyawaki A. A high-throughput method for development of FRET-based indicators for proteolysis.

Biochem Biophys Res Commun. 319: 72-77, 2004

4. Takemoto K, Nagai T, Miyawaki A & Miura M. Spatio-temporal activation of caspase revealed by indicator that is insensitive to environmental effects. *J. Cell Biol.* 160: 235-243, 2003

5. Rekas A, Alattia JR, Nagai T, Miyawaki A & Ikura M. Crystal structure of Venus, a yellow fluorescent protein with improved maturation and reduced environmental sensitivity. *J. Biol. Chem.* 277: 50573-50578, 2003

6. Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K & Miyawaki A. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat. Biotechnol.* 20: 87-90, 2002

他 8 報

出版物

1. 永井健治、宮脇敦史 "GFP を利用した蛍光バイオセンサーの作成法と生体機能の可視化" 遺伝子医学 MOOK 別冊、Medical Do、印刷中

2. Miyawaki A, Nagai T & Mizuno H. Genetic Probes for Calcium Dynamics. Yeste et al. eds. *Imaging Neurons-A Laboratory Manual-*, CSHL PRESS, in press

3. Nagai T & Miyawaki A. Application of Green Fluorescent Proteins in Cell Biology. *Cytometry Research*, 13, 1-10, 2003

他 7 報

特許

1. 特開2004-347430 標的物質の生理的機能を解析する方法

発明者: 永井健治、宮脇敦史 出願人: 科学技術振興機構・理化学研究所
外国出願済

2. 特開2004-340663 光共焦点スキャナ

発明者: 永井健治、宮脇敦史・御厨健太、田名網健雄、関直樹
出願人: 科学技術振興機構・理化学研究所・横河電機
外国出願済

3. 特開2004-187544 FRETを利用した蛍光指示薬

発明者: 永井健治、宮脇敦史 出願人: 科学技術振興機構・理化学研究所
外国出願済

他、4 件

招待講演

1. Nagai T. Fluorescence imaging technologies for visualizing biological functions. The symposium on Imaging Technologies of Live Cells and Animals. Helsinki, Finland (2004.11)

2. Nagai T. Opening new windows for future biology by using GFP technologies. Blue Seminar at EMBL, Heidelberg, Germany (2003.8)

3. 永井健治 "GFPを用いた細胞機能のライブイメージング" 第25回日本分子生物学会ワークショップ、横浜、2002年12月

国際: 他 2 件

国内: 他 2 2 件