

脳活動を観るための革新的技術開発

独立行政法人理化学研究所

脳科学総合研究センター副センター長

細胞機能探索技術開発チーム シニア・チームリーダー

光量子工学研究領域生命光学技術研究チーム チームリーダー

宮 脇 敦 史



理化学研究所の脳科学総合研究センターからやってまいりました宮脇と申します。その脳科学総合研究センターのセンター長は先ほど矢内さんのお話にあった利根川進先生で、私は副センター長を任されています。実は私、今日の聴衆は専門的な方々ばかりと思って、かなり気合いの入った専門的なものを用意してきていました。そうではないことが先ほどわかり、急いでスライドをわかりやすいように変更した次第です。脳研究に関連して私が行ってきた技術革新をさまざまな角度から紹介したいと思います。

脳の活動を観る実験の具体例を考えましょう。たとえばマウスの脳に青い光を当てて緑の蛍光を検出する実験です。蛍光現象においては、当てた光、すなわち励起光に比べてより長い波長の光が出てきます。私たちは今、たとえば、麻酔で眠っているマウスの脳全体の自発的神経活動を1秒間に45枚の画像を取ることによって解析しています。マウスの脳にはあらかじめカルシウムプローブが仕込まれています。体内に置かれたプローブは、特定の生命現象に応答してシグナルを体外へ送ってくれます。どういうプローブが必要か、どのようにシグナルを検出したらいいのか、そういうことを私たちはいつも考えています。

脳の内側を観るといときに、さまざまな要求があります（図1）。まず広く観たい。マウスの場合はこのくらいの小さい脳ですが、ヒトの場合にはもっと大きい。それから深く観たい。われわれはたいいてい可視光を使います。

可視光は、虹のようにわれわれが肉眼で観ることのできる光で、その波長はナノメートルの単位で言うと300後半から650nmぐらいの領域です。可視光は生体組織をなかなか直進しません。ですから、体表面から深いところが観にくいという問題をいつも抱えています。さらに、細かく観たいという要求もあります。広く深く細かくというのは空間的な事柄です。もちろん時間的な要求もあります。もっと速く、もっと長い時間にわたって観たいと。そうしていずれの場合でも、なるべく動物に侵襲を与えないで観ることが求められています。このような多彩な要求に応じていくことが、私たちの技術革新のメインストリームとなっています。

脳を観るための技術を革新するには、脳研究だけやってもだめです。植物や原生生物や細菌なども含めて、生命と光の相互作用を探究する必要があります。そういうわけで、今日はなるべく幅広く話をしていきたいと考えています。

脳の内側を観る

広く
深く
細かく
速く
長い時間
非侵襲的に

図1



GFP Green Fluorescent Protein

1962
下村脩
発見と精製

1992
Prasher
cDNA クローニング

図 2

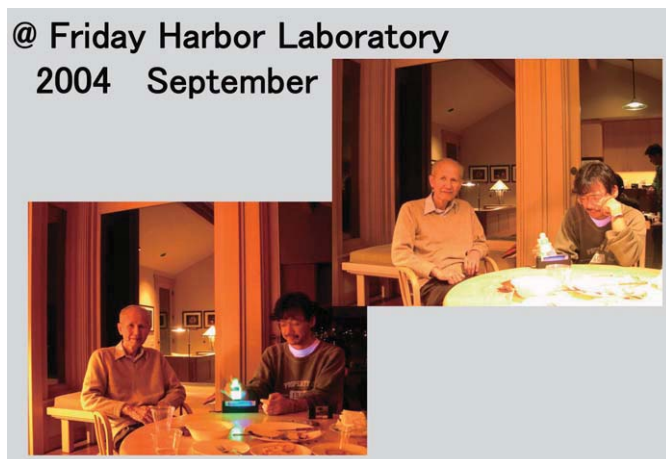


図 3

これまでに、われわれはたくさんのツールをつくってきました。ここで、聴衆の方々のバックグラウンドを知りたいのでお手伝いいただけませんか。理科系の方、手を挙げてください。文科系。両方（笑）。では、理科系の中でも生物分野の方、手を挙げていただけますか。物理。化学。化学が多いですね。地学。なるほど。では、化学の内容を中心に盛り込みながら、なるべく素人の方々にもわかるように努めます。まず蛍光タンパク質の話しましょう。

オワンクラゲのGFPは、2008年に一躍有名になりました。その年のノーベル化学賞の受

賞対象となったからです（図2）。1962年のこと、半世紀も昔のことですが、かの下村脩先生が、オワンクラゲの発光器官から緑色の蛍光を発するタンパク質、GFPを発見し精製されました。30年後の92年にその遺伝子がクローニングされました。クローニングとは、タンパク質をコードする遺伝子を手にすることです。

アメリカのワシントン州の田舎にフライデーハーバー研究所はあります。下村先生は、桟橋から海面に浮かぶクラゲをたくさん採集されました。当時はすごくたくさんのオワンクラゲがここに棲息していたそうです。島の人たちが、海面に浮かぶオワンクラゲの上を歩いていけるというくらいに多かったそうです。

2004年、そのフライデーハーバー研究所の100周年のイベントがあり私は参加してきました。下村先生も来られていました。下村先生のコテージで撮った写真です（図3）。

このボトルの中には、下村先生が40～50万匹のオワンクラゲから精製した

GFPが入っています。非常に貴重なサンプルです。そのとき私も数日間滞在してハーバーをうろろしたのですが、オワンクラゲには1匹も遭遇できませんでした。

1994年になって、コロンビア大学のマーチン・シャルフィーが、オワンクラゲ以外の生物でGFPの蛍光を光らせることに成功しました（図4）。これによって、その蛍光には、オワンクラゲに由来する分子がGFPのタンパク質以外に必要ないということが証明されました。

今日、私はたびたび発色団という言葉の口

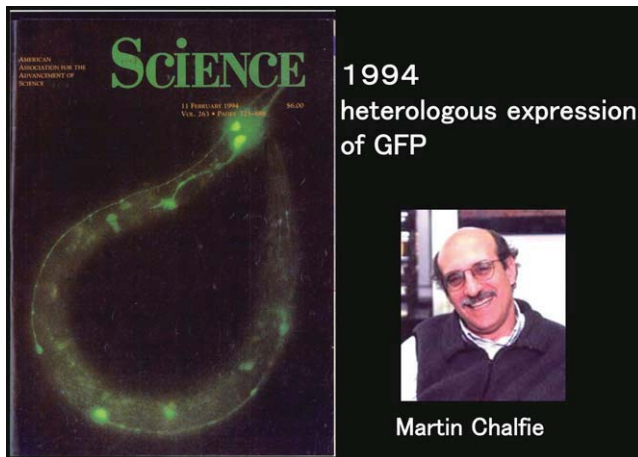


図 4

GFPの発色団

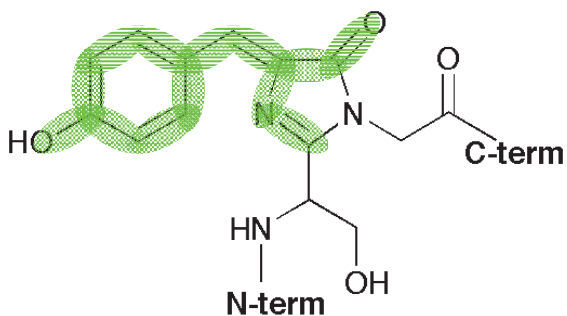


図 5



図 6

にします。発色団とは、可視光領域の光を吸収したり放出する構造単位と定義することにししましょう。

オワンクラゲのGFPは238個のアミノ酸からなるペプチドです。ここには可視光領域の光を吸収したり放出する構造は全くありません。しかし、このペプチドが折りたたまれるとき、セリン、チロシン、グリシン、この三つのアミノ酸を材料に環状化、脱水、酸化という3つの反応が起こり、ここに π 共役系ができあがります。一重結合と二重結合が交互に現れるこの部分で π 電子が非局在化され、可視光領域の光との相互作用が可能になります。これが青色の光を吸収し緑の蛍光を放出するGFPの発色団です(図5)。さらに、ペプチド全体から円柱状の β バレル(樽)構造(図6)ができ、その中に発色団が埋もれています。

また、発色団近傍のアミノ酸を変えることによって、すなわち π 電子にちょっかいを出すことによって、もっと明るいGFPや色の違う変異体、BFP(青)、CFP(青緑)、YFP(黄色)などを開発したのが、私の留学先の先生、ロジャー・ツェーンです(図7)。

私自身の昔話です。80年代、医学部の学生だった当時からタンパクとタンパクの相互作用に興味を持っていました。たとえば、遺伝子転写を行うRNAポリメラーゼとその遺伝子上流に結合して転写を制御するタンパク質が教科書的に知られており、この二つのタンパク質が直接に



図 7

相互作用することを証明したいと思いました。そのためにFRETという技術に興味を持ちました (図 8)。テオドール・フェルスターが1940年代にFRETを公式化していました。日本語では蛍光の共鳴のエネルギー移動と呼びます。ここにドナーという蛍光分子があって、これに光を当てて励起します。そうすると蛍光が出てくるのですが、このドナーの近いところにアクセプターがあって、そのアクセプターの吸収のスペクトルがドナーの蛍光のスペクトルに重なる場合、ドナーの励起エネルギー

ギーがアクセプターに移動するという現象です。このエネルギー移動が起こると、ドナーの蛍光は下がります。もしアクセプターが蛍光性なら、アクセプター固有の蛍光が出てきます。要するに、FRETをうまく使うと、生きた細胞の中でタンパクとタンパクの相互作用、くっついた離れた、タンパク質の構造変化、伸びた縮んだというのをリアルタイムに観察することができるのです。

私は青緑色のCFPと黄色のYFPに注目しました。CFPの蛍光のスペクトルとYFPの吸収のスペクトルは重なっていますから、それぞれ、エネルギー移動のドナーアクセプターとして使うことができます。カルシウムというイオンがわれわれの細胞の中で活発に働いていて、カルシウム濃度はふだんは低く保たれているのですが、いろいろな刺激が来るとバーンと上がります。それをモニターするためのカルシウムプローブをつくりました (図 9)。これにカメレオンという名前を付けました。

今日はたびたびゼブラフィッシュという実

FRET 蛍光の共鳴エネルギー移動

Fluorescence Resonance Energy Transfer

1. Spectral overlap
between D's emission & A's absorption
2. Distance between D and A (r)
3. Relative orientation
between two dipole moments of D and A

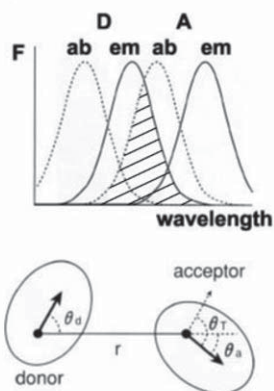


図 8

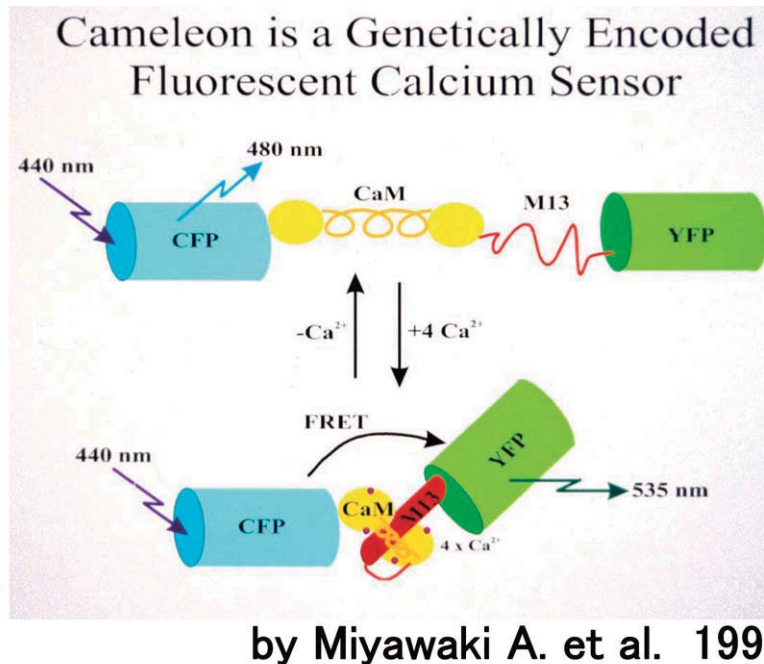


図9

験動物を登場させます。ゼブラフィッシュの胚は極めて透明です。ですから胚発生における生物現象を詳しく観ることができます。ゼブラフィッシュに、カメレオンの遺伝子を導入します。受精卵に遺伝子を入れてトランスジェニックゼブラフィッシュを作製すれば、すべての細胞でプローブをつくらせることができます。

まず受精卵です。赤いシグナルがカルシウム上昇を示します。受精後、2, 3回のカルシウム上昇が起こり、しばらく休止した後、再びカルシウムの波が現れてきます。そうして卵割期に突入します。皆さん小中学校のときに学ばれたと思いますが、受精卵は分裂を繰り返して細胞の数をどんどん増やしていきます。細胞がくびれるかなり前にカルシウム濃度は上がっていますね。細胞をギュッと絞って分けるというのはすごいことなのでしょう。前もってカルシウムに依存するいろいろな現象が起こらないと分裂は起こらないということなのでしょう。

卵割期の後、胞胚期になると、カルシウム変化は個体の表面に限られて起こります。さらに時間がたち、体節形成期になると、脊索と神経管の間に位置するフロアプレートという器官で起こるカルシウム振動を長時間にわたって観察することができます。このカルシウム振動の生成のメカニズムや生理的な意義はまったくわかっておりません。

このように、オワンクラゲGFPの変異体を使ったカルシウムイメージングを紹介してきましたが、次に、オワンクラゲ以外の動物に由来する蛍光タンパクの話をしたいと思います。下村脩先生は、オワンクラゲの発光器官においてGFPを発見されましたが、同時にイクオリンという蛍光タンパクを見つけられました。ところで、同じ刺胞動物の仲間ですが、サンゴやイソギンチャクも蛍光タンパク質をつくります。たとえば、スナギンチャクからロシアのグループが遺伝子クローニングしたDsRedという蛍光タンパク質は赤色の蛍光を発することで注目されました。DsRedでは、

赤色蛍光タンパク質の発色団

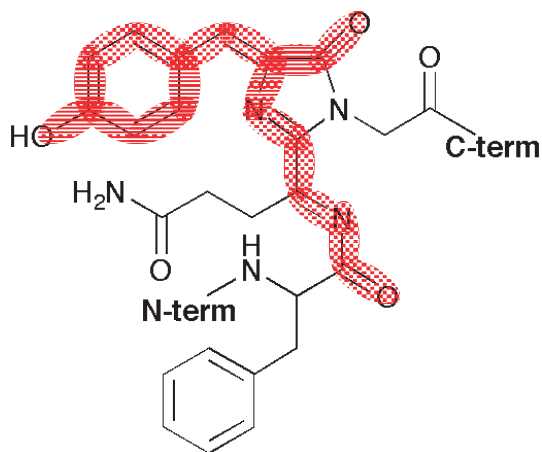


図10

例の3つのアミノ酸から環状化、脱水、酸化反応が起こるとともに、もうひとつ酸化反応が起こって二重結合が増え、 π 共役系が拡張されることがわかっています（図10）。 π 電子が動き回れる空間が広ければ広いほど長波長になるので赤色の発色団ができます。

私は98年にアメリカから帰ってきて、99年に理研の脳センターに研究室を立ち上げました。当時から、特に沖縄あたりの亜熱帯地方の豊富な生物多様性に注目していました。日本の生物資源を活用したいと思い採集活動を始めました（図11）。いろいろな海洋生物から新しい蛍光タンパク質の遺伝子をクローニングすることをやってきました。採集サンプルは、まず77Kの液体窒素の中に放り込んで凍らせます。そして乳鉢で粉々にします。そこからmRNAを精製します。普通のアルコール沈殿を行うと塩がどんどん析出します。何度も塩を洗い流し、最終的に精製したmRNAをcDNAに変えて、大腸菌に放り込んでライブラリーを作製します。大腸菌を直径10cmのプレートにまき、

大腸菌コロニーにいろいろな色の光を当てて明るくおもしろく光ってくるものが得られればクローニング成功ということになります。私たちは、この10数年の間に、新しい国産の蛍光タンパク質の遺伝子をどんどんクローニングしてきました。

刺胞動物



図11

1. Brightness
2. Fluctuation
3. Color (spectrum)
4. Fluorescence resonance energy transfer
5. Life time of the excited state
6. Anisotropy (polarization)
7. Photoconversion
8. Photochromism
9. Photobleaching
10. Quenching

図12

蛍光にはどんな物理特性があるかを示すスライドです（図12）。色だけではなく、励起状態の寿命、FRET、anisotropy（偏光）など。これらを最大限に活用して、新しいバイオイメージングのモダリティを提案するのがわれわれの使命だと思っています。

フォトコンバージョンという特性について紹介します。実は、サンゴは都会でも入手できます。浅草に存在したマリンブルーという、いまは閉店しましたが、ペットショップでヒ

ユサンゴというイシサンゴを購入しました。ちょうどヒトの拳ぐらいの大きさに2,500円しました。水槽のタンク越しに撮った写真（図13）ですが、これを観たとき、このサンゴからは2、3種類の違う蛍光タンパク質の遺伝子が取れるかなと思いました。単純に、非常にカラフルだったからです。しかし私の予想は間違っていました。

安藤さんというテクニシャンがそれをすりつぶして遺伝子クローニングしたところ、数種類の蛍光タンパク質が取れました。大腸菌でつくらせたタンパク質サンプルは全部が緑でした。ところがそれをラボベンチの上に放ったままにして、昼間ずっと、太陽光に曝してしまった。翌日来てみると真っ赤なチューブが鎮座していた、でも自分はこんな真っ赤なタンパク質を扱った覚えがないと…そうこうするうちに謎が解けました。太陽の光の中の紫の光が犯人でした。

紫の光が当たると、この蛍光タンパク質は緑から赤へ蛍光の色が変わります。フォトコンバージョンと呼ばれる現象です。この蛍光タンパク質をカエデと命名しました。

ここに、ラットの海馬に由来する培養神経細胞があります。いずれもカエデ遺伝子が導入されています。しかしすべてが緑色に標識されて、どの突起がどの細胞体に由来するかが全くわかりません。このような入り組んだ神経回路網をどうしたら解きほぐすことができるのでしょうか。ここで緑に光っているのはカエデですから、405nmの紫色半導体レーザーをこれら2つの細胞体に0.5秒、0.25秒

ヒユサンゴ



図13

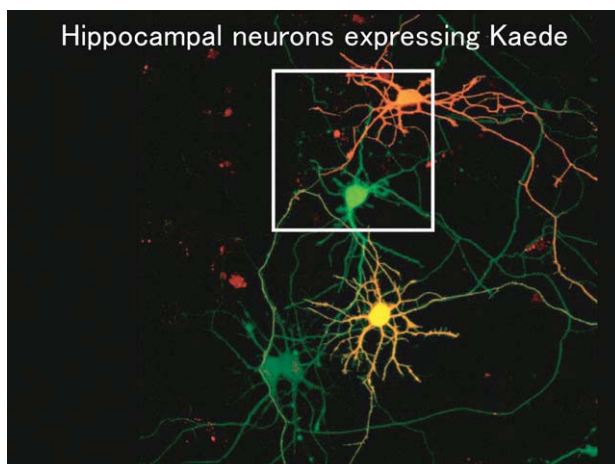


図14

Chromophore structure of Kaede

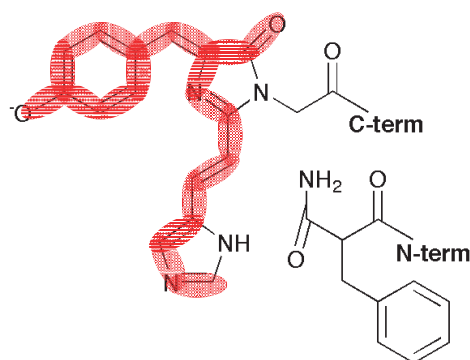


図15

ポンポンと当ててみます。するとどうでしょう、赤色とオレンジ色でそれぞれの神経細胞の全体像を浮かび上がらせることができます(図14)。カエデを使う一つの大きなメリットです。

カエデを全身に発現するトランスジェニックゼブラフィッシュです。自分の好きなパターンで紫の光を当てて赤色にしておいて、そこでラベルされた細胞が将来、胚のどこに到達するかを調べる解析ができます。細胞の系譜を追うべき発生学や再生医療などで活躍します。

ここでは、カエデが緑から赤に色が変わる仕組みを、化学者の方々、おそらくオーディ

エンスの半分の方々に説明したいと思います。カエデの場合、発色団の材料となる三つのアミノ酸のうち最初のアミノ酸がヒスチジンであることが必須になります。ヒスチジンの側鎖はイミダゾール環です。オワンクラゲGFPと同じように、タンパク全体が折りたたまれると同時に環状化、脱水、酸化反応が起こり、まず緑の発色団ができます。ここにUVや紫の光が当たると、いくつか電荷分布の変化が起こりペプチド主鎖が切れます。これは β 脱離反応です。脱離基はカルボキサミドです。さらに、ここのプロトン

が抜かれて二重結合が導入されると、ヒスチジンのイミダゾール環がもともとの緑の発色団にカップルします。 π 共役系が拡張するのが明らかです。これで赤色発色団の完成です(図15)。

生化学の分野で、ペプチドの主鎖の切断を議論することがありますが、その場合の切断は必ず加水分解によってペプチド結合で起こります。一方、カエデにおける光による切断はペプチド結合で起こりません。その隣にあるC α とimino-nitrogenの間の共有結合が切れてしまうのです。この共有結合は非常に安定で、これを切るためにはすごい活性化エネルギーが必要です。でも、カエデタンパク質全体が触媒機能を発揮することによって、その活性化エネルギーを減らすように働くのです。その触媒はカエデの発色団が紫の光を吸収することによってトリガーされるのです。実におもしろい分子マシナリーだと思います。こうした仕組みを応用して、われわれは新しい光材料の開発を企てています。

カエデのフォトコンバージョンは不可逆的です。緑から赤になると元に戻ることはできません。で、今度は可逆的な話です。フォトクロミズムについて話をします。材料は、沖縄の阿嘉島で採集したアナキッカサングでし

Pectiniidae アナキッカサンゴ

沖縄阿嘉島で採集



図16

た(図16)。カエデをクローニングした安藤さんが、アナキッカサンゴを持ってきたとき、私はあまりいい顔をしませんでした。カエデのヒュサンゴと比べるとあまりにもみすぼらしかったからです。ところが、みすぼらしいアナキッカサンゴから、彼女は非常に明るい緑の蛍光タンパク質の遺伝子をクローニングしました。さらに、そこに遺伝子変異を加えることによって、フォトクロミズムを示す蛍光タンパク質を創り上げました。紫と青色の光を当てることによって明暗をコントロールできます(図17)。これをドロンパと命名しました。ドロンと消えてパッと現れるという理由からです。

大腸菌でつくらせたドロンパタンパク質をカバーガラスに塗ると、普通の共焦点レーザー顕微鏡を使って、書き換え可能のメモリー素子をつくることができます。ある情報を書いて、読んで、消して…そしてこの操作を何回も繰り返すことができます。

この研究の過程でとて

も大切な教訓を2つ得ることができました。まず Don't judge a coral by its appearance! 研究材料としてのサンゴは見かけで選んではいけないのです。次に Even if a wild-type fluorescent protein is dim or boring, don't throw it away! 野生型の蛍光タンパク質が暗くても面白くなくても捨てないこと。そこに遺伝子変異—ミューテーションを入れることによって明るく面白く化けさせることをすればよい。すなわち長い進化の過程で、サンゴ、イソギンチャク、クラゲが作りあげてきた産物以上のモノを、われわれは試験管の中

でわずか数日あるいは数時間で作ってしまうことができるのです。

カエデやドロンパのように、光を当てることによって色や明暗をコントロールすることができるタンパク質を使って、現在、世界的に超解像光学顕微鏡が非常にはやっています。光をレンズで絞っても、光の波動性によって点にはなりません。集光はある広がりを持ってしまう。この広がりが空間分解能を決めます。空間分解能というのは、2点を2点とし

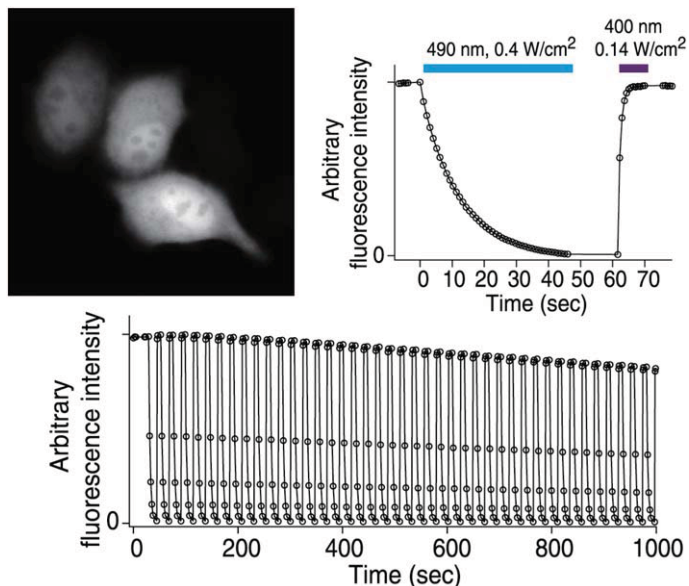


図17

て識別できる能力です。いくらどんなにいい対物レンズを使っても、可視光を使う限り、空間分解能は200nmぐらいです。200nmよりも小さいものは分けることができません。そういうときは電子顕微鏡に頼ることになります。電子線は波動性が少ないからです。しかしながら、電子顕微鏡で生きたサンプルを観ることは難しいです。ということで、光学顕微鏡の分解能をどんどん上げる技術開発を世界中の研究者が躍起になってやっているのです。

例えばドイツのマックス・プランク研究所の研究者が開発したSTED顕微鏡は、励起領域に誘導放出を起こすレーザービームをドーナツ状に当てることによって、蛍光の広がりを物理的に小さくし分解能を高めることを達成しています。またアメリカで開発された方法でPALM, STORMというものがあります。蛍光分子を明滅させることにより、重なり合う輝点を時間的に分離しています。PALMを使って観察したアクチン線維の画像をお見せします。アクチン線維は細胞骨格の一種です。1本1本の線維がきれいに分けて見えるようになってきました。従来は、アクチン線維の束をぼんやりとしか見るができなかったのですから、大きな進歩です。

脳の中にはたくさんの神経があるのですが、神経同士のコネクションはシナプスによって成り立っています。こちらがプレシナプス、こちらがポストシナプスです。プレシナプスの中には小胞、すなわち小さな袋がいっぱいあって、この中に神経伝達物質がたまっています。刺激が来ると、小胞がはじけて、シナプスの伝達物質がシナプス間隙へ放出されます。この小胞はどのくらいの大きさかという、直径が約50nmなのです。シミュレーションをしてみますと、普通の光学顕微鏡で蛍光ラベルされた小胞を観るとこんなふうにはぼんやりとしてしまいます。われわれは個々の小胞を分けて観たいわけで、例えば20nmの分解能を実現すると何とかそれが実現できる。光学顕微鏡を使って、こういうシナプス小胞

の動的構造を観察したいとわれわれは願っています。

これまで、空間的に非常に細かいものを扱ってきました。今度はもっと大きなものを観ていきましょう。個体レベルの話です。

増殖する細胞は細胞周期を回しています。普段はG1期で落ち着いているのですが、分裂しようと決心すると、S期に突入しDNAを複製して核DNA量を2倍に増やします。そしてG2期という間期を経てM期で分裂します。これを繰り返すことによって、細胞は増え続けます。G1期からS期への移行が、細胞の分裂へ向かう意思決定がなされる瞬間に相当します。こうした意思決定のタイミングを観たいとわれわれは考えてきました。

細胞内でタンパク質の分解を見事に制御するメカニズムがあります。その解明でノーベル化学賞が2004年に授賞されています。一例ですが、細胞周期の進行と同時に、ある二つのタンパク質が交互に分解されることがわかっています。私たちはこの現象を使って細胞周期を色付けする蛍光プローブを開発しました。G1期にある細胞の核を赤で、S/G2/M期にある細胞、すなわち増殖に向かって突進する細胞の核を緑でラベルします（図18）。Fucciと名前を付けました。

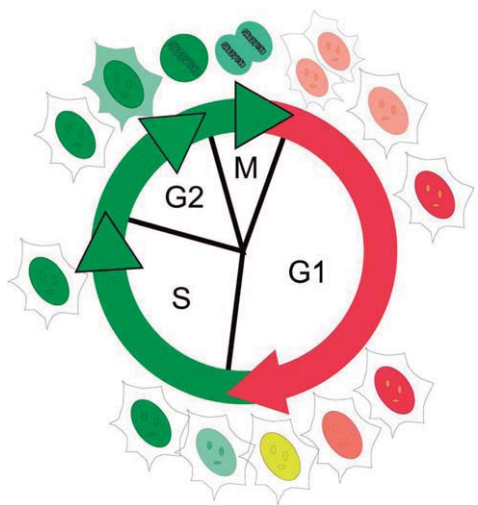


図18

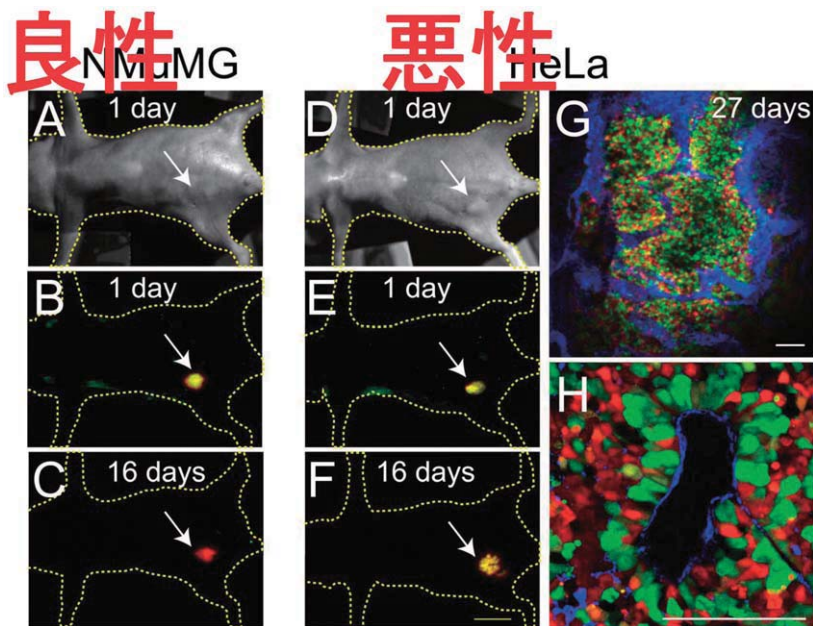


図19

HeLa細胞は、子宮頸癌から樹立された株です。FucciをHeLa細胞に導入すると、ちょうどG1からS期への移行、細胞が分裂しようと意思決定しDNA複製を始めるタイミングを、赤から緑への変換で知ることができます。子宮頸癌由来ですから、HeLa細胞は悪性化しています。増殖を抑制するメカニズムが壊れてしまっています。

一方、良性の細胞株にFucciを導入してみるとどうでしょう。ここに示すのは上皮系の細胞なのですが、培養皿の上で増殖して高密度に達するとG1期で細胞周期の進行を止めてしまいます。そういう増殖抑制の様子が、培養皿全体が真っ赤になることで簡単にわかります。これをG1アレスト状態と呼ぶことがあります。この状態で部分的に細胞を引き剥がすと、その後一部の細胞がG1期からS期に移行し、つまり細胞周期を回して増殖モードに入っていく様子を観ることができます。これは創傷治癒のモデルになっています。

このような良性と悪性との鑑別は、

細胞をヌードマウスに移植する実験でも簡単に行うことができます。良性細胞から成る腫瘍塊は赤色を呈し、一方悪性細胞から成る腫瘍塊は黄色を呈するのです(図19)。

またFucciプロローブを全身に発現する形質転換マウスをつくりました。体中の細胞1個1個について、細胞周期のどこにあるかが色でわかります(図20)。簡単に言うと、緑の蛍光を観たら細胞の増殖が盛んだと思ってい

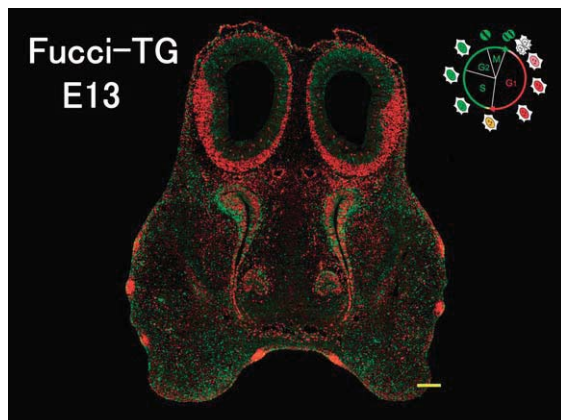


図20

いし、赤の蛍光を観たら増殖が終わっている
いろいろな分化状態に向かっている細胞だと思っ
ていいのです。胎生8.5日、9.5日、11.5日の
データを見せていますが、発生が進むにつれ
てFucciの蛍光が緑から赤へ色が変わってい
くことがわかります。増殖優位から分化優位
にシフトしていくわけです。出生後の組織を
観ると、Fucciの蛍光シグナルはほとんど真
っ赤です。しかし、その中に緑の細胞がぽつ
りぽつりとあります。そういう細胞は組織幹
細胞に相当します。いま再生医療で非常に注
目されている細胞です。

Fucciを全身に発現する形質転換ゼブラフ
ィッシュの胚を横から見たムービーです。透
明なので、全身からくまなくFucciのシグナ
ルを取ることができます。やはり、時間とと
もに緑から赤に色が変わっていきますが、網
膜、脳など増殖の盛んなところはいつまでも
緑のシグナルが残ることがわかります。網膜
をズームインしてみましょう。網膜の神経上
皮細胞において核が移動するのですが、移動
の向きが細部周期によって変化します。この
現象はエレベーター運動と呼ばれています。

ゼブラフィッシュの胚は透明なので、この
ように蛍光のイメージが大変にやりやすいの
ですが、一方、哺乳類の体は不透明です。ど
うして不透明かというと、体の中において光
の散乱が非常に強いからです。われわれが開
発したScaleというテクノロジーは、大
きな哺乳類動物個体を丸ごと大規模に、
しかも高精細に3次元再構築をすること
を可能にする技術です。3次元再構築
をするためにはセクショニング（切
片化）という作業が必要ですが、われ
われは従来のような機械的に切片をつ
くる方法ではなく、光学的に切片を作
る方法を採用しました。でもそのため
には生体組織を透明にすることが必要
で、ScaleA2という水溶性溶液を開発
しました。ScaleA2は尿素をベースに
非常に単純な組成になっております。

ScaleA2に浸すと、ホルマリン固定

したマウスが透明になります（図21）。光の
散乱を抑えることによって透明化しているの
です。光の吸収には影響を与えないので、例
えば胆汁や眼の色は保存されます。ここでは
マウスの脳を透明化しています。ポインター
からの緑色のレーザービームがほとんど直進
するのがよくわかります。ScaleA2技術によ
って、「森も木も見る」ことができます。こ
れはマウスの海馬です。海馬の約3分の1の
領域を透明化しています。その領域にある神
経細胞や神経線維から成る回路網をいろい
ろな角度から観ることができます。さらに、脳
表面からとても深いところまでを観ることが
できます。作動距離の長い対物レンズを使う
と、脳の皮質から白質、海馬、視床までダイ
ブするように観察できます。

先ほど紹介したFucci技術とScale技術を組
み合わせることによって、発生中の胎児の中
で、分化が盛んな領域と増殖が盛んな領域に
関して3次元的情報を得ることができます。
いろいろな意味で、広く深く観るという技術
が発達してきました。

ホルマリン固定した脳組織に関しては透明
化ができるのですが、今後は生きた脳でも同
じようなことができないかと考えています。
散乱をある程度減らすことによって、脳の表
面から皮質の下にある海馬、視床、扁桃体な
どの機能を追跡したいと思っています。

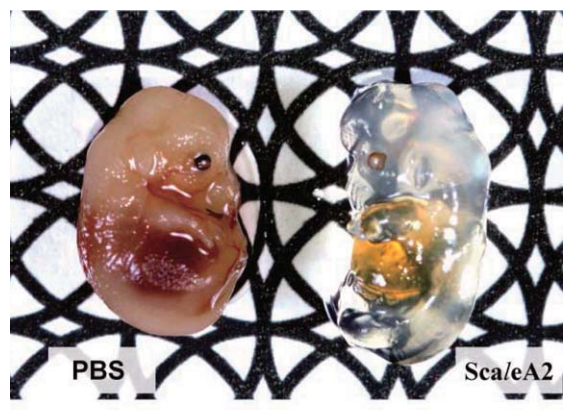


図21

生きた状態で大脳皮質の活動を観るということで、一つの実験例を示します。私が冒頭で紹介したカメレオンの最新バージョンを使っているのですが、マウスの大脳の興奮性細胞に発現させ、頭部に励起光を当てて脳全体にわたって発生する神経発火の波を解析しています。いろいろな周波数の波があるのですが、一番有力なのは1Hzで振動するようです。

今後はこういう実験中のマウスにいろいろな刺激を与えていきたい。次演者の坂野先生からは匂いに関しておもしろい話をいただけますが、匂いを与えるとどういう神経発火の波が出現するか。匂い以外にも、ものを見させたり、音を聞かせたりしてみたいと思います。

われわれ動物の知覚はパターン認識によっています。すごくたくさんの並列処理を一度にやってしまいます。今わたしは、この演台の上のペットボトルを見て一瞬で「水」と認識できますが、いったいどんな神経発火の時間パターンが私の脳に提示されているのでしょうか。そしてそのパターンをどんな仕組みで読み取っているのでしょうか。脳の中の神経細胞は興奮性のものだけではありません。抑制性細胞もあります。抑制性細胞にカメレオンを導入した実験のデータもお見せすることができます。興奮性細胞と抑制性細胞がどうお互いに相互作用しあっているかを調べていきたいと考えています。

最後に酸化ストレスに関する話をします。今日ここには年配の方が多く来られているようですね。どうか皆さん、酸化ストレスとうまく付き合い除去していきましょうという話ができればと思います。

われわれは酸化ストレスをセンスするプローブを作りました。時間の都合上、詳しい原理は言いませんが、ストレス刺激を与えると光ってきま

す。ストレス刺激を洗い流すと消えます。酸化ストレスは、癌をはじめさまざまな成人病、変性疾患の原因として注目されています。一方で、酸化ストレスはある程度必要で、学習や脳の働きに重要であることもわかっています。

先ほどから登場している蛍光タンパクはすべて β 樽構造(図6)を共有しています。また自分自身のペプチドから発色団を作り上げることができるという特性も共有しています。

ところで、最近、新しいタイプの蛍光タンパク質が出現してきました。天然に在る色素リガンドを取り込み、それを発色団として使うタンパク質です。その中に、ビリルンを取り込むものがあります。ビリルンというのは四つのピロール環が直線上に連なった化合物です。

このスライドはヘム代謝を概観しています(図22)。赤血球が壊れると、ヘモグロビンがグロビンとヘムに分解されます。これがヘムでポルフィリン環から成ります。環のここが切れると、四つのピロール環が直線上に並んでビリベルジンになります。ビリベルジンが還元されてビリルビンになります。ビリルビンが肝臓でグルクロン酸抱合されて胆汁に排泄されます。この代謝を頭の中に入れていただけますか。

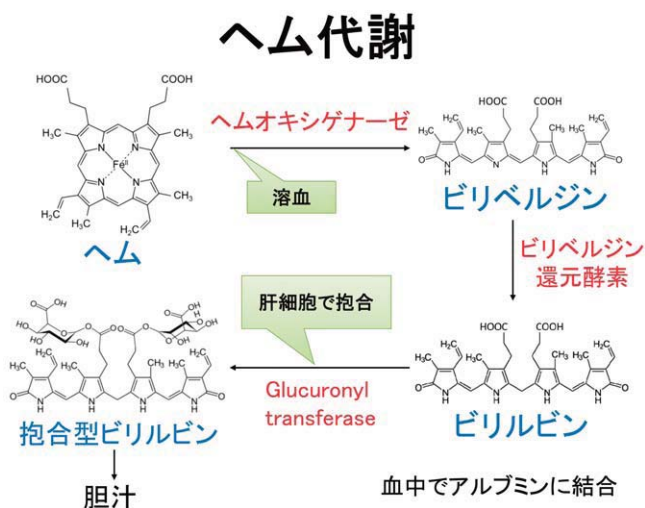


図22



図23



図24

ビリベルジンは π 共役系が分子全体に広がっているので、とても長い波長の光すなわち赤色の光を吸収します。補色として青色を呈します。こういうビリリンを取り込んで発色団として使い色を吸収したり蛍光を放出するタンパク質はいろいろあります。例えば植物、菌類、細菌で活躍する光受容タンパク質のフィトクロム、それから光合成色素のフィコビリリンなどがあります。いずれも、植物、菌類、原生生物、細菌など、動物以外の生物に由来

するものです。

最近、われわれはウナギから、ビリリンを発色団にする蛍光タンパク質をクローニングしたので、その話をして終わりたいと思います。ニホンウナギは蛍光を出します。これは体長約5cmのシラスウナギです。青い光を当てるとみごとに緑に光ります（図23）。ニホンウナギは降流性回遊を行います。通常は淡水の湖や川に棲息します。成熟するとマリアナ海溝の近くのスルガ海山まで泳いできます。そこで産卵します。孵化した稚魚は海流に乗って日本にやってきます。シラスウナギといわれる段階で河口に来て、川を遡上していく。サケの遡河性回遊と全く逆ですね。

シラスウナギをもらって、青い光を当ててみました。見事に緑に光っています。この1匹をホルマリンで固定し、胴体を輪切りにした切片をお見せします（図24）。脊髄や脊索の周りに筋肉層がありますが、筋肉の中でも特に細い筋肉繊維にもものにすごく強い緑の蛍光が観られました。

2009年、鹿児島大学の林先生のグループが、ウナギの筋肉から緑の蛍光タンパク質の精製を報告されました。この情報を基にわれわれはその緑色蛍光タンパク質の遺伝子を取ることに成功しました。UnaGと名前を付けました。

タンパク質分子はいろいろなファミリーをつくることが多いです。脂肪酸結合タンパク質ファミリーというのがあって、UnaGはそのファミリーに属することがわかりました。脂肪酸結合タンパク質は名前のとおり、脂肪酸のような脂溶性分子を貯蔵あるいは運搬するタンパク質です。略称はFABPです。

われわれはUnaGの遺伝子は大腸菌に放り込みました。全く光りませんでした。ところが、HeLa細胞に放り込んだところ、すごく

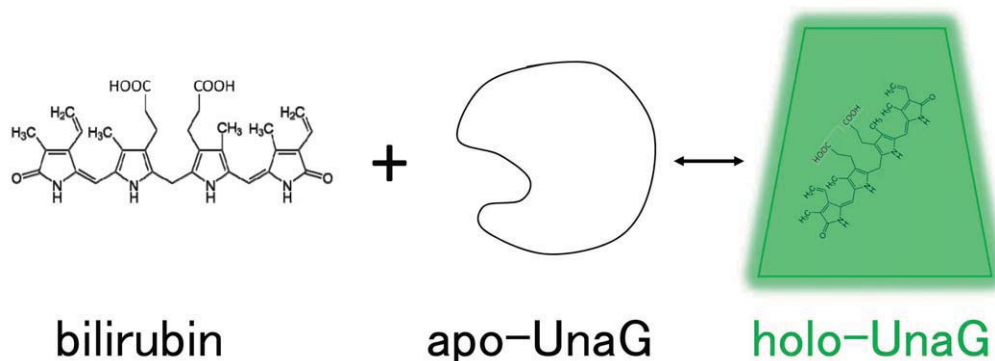


図25

きれいな緑の蛍光が出てきました。よって、リガンド色素は大腸菌に無くヒトや哺乳類の細胞に在る。そのリガンドが遺伝子がつくるアポUnaGにくっついてホロUnaGになって光るのだらうと予想されました。このリガンドを何とかして探そうと努力しました。すごく苦労した結果、最終的に、リガンドはビリルビンであるという結論に到達しました（図25）。アポUnaGタンパクとビリルビンを混ぜ合わせます。そうすると、あっという間に蛍光が出てきます。

ヘムの代謝の復習です。ヘム、ビリベルジン、ビリルビン、抱合型ビリルビンというふうに代謝されていきます。ビリベルジンの真ん中の部分が還元されてビリルビンとなります。二重結合が一重結合になる結果、例の共役系が真ん中で二分されます。そうすると π 共役系が短くなってより短波長の青色の光を吸収します。青色の光を吸収するビリルビンは補色の黄色を呈するわけです。

これはビリルビンがくっついた状態のホロUnaGタンパク質の結晶構造です（図26）。四つのピロール環A, B, C, D環のうち、B環とC環の間で大きく屈曲しています。ただA/B環、C/D環はそれぞれ平面上に並んでいる。経験的に言っていかに高い蛍光性を示唆する構造と言えそうです。

ビリルビンは脂溶性です。水にほとんど溶けません。もし皆さんの体の中で溶血が起こるとします。または肝炎などが起こって肝臓機能が低下するとします。いずれの場合でも、血中のビリルビンが増えます。その程度がひどくなるとビリルビンが血中から漏れ、血管外の組織にどんどん沈着して、黄疸という現象が起こってきます。ビリルビンというのは皆さん本当はすでになじみが深いのです。毎年の血液生化学検査で、ビリルビン測定的项目は必ずあります。

しかしながら、ビリルビンの定量法はまだ進化しておりません。1916年に初めて開発さ

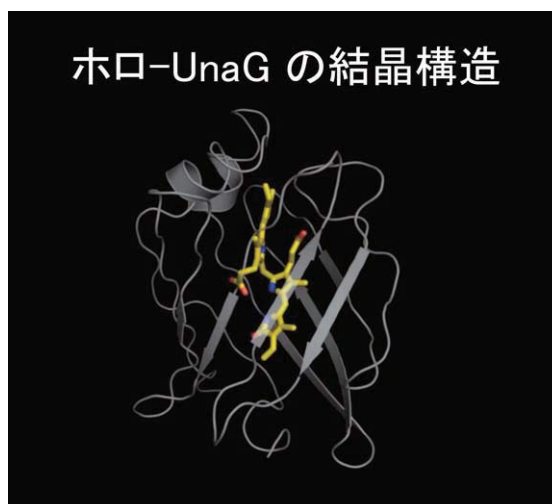


図26

アポUnaGを用いた ビリルビン蛍光測定法

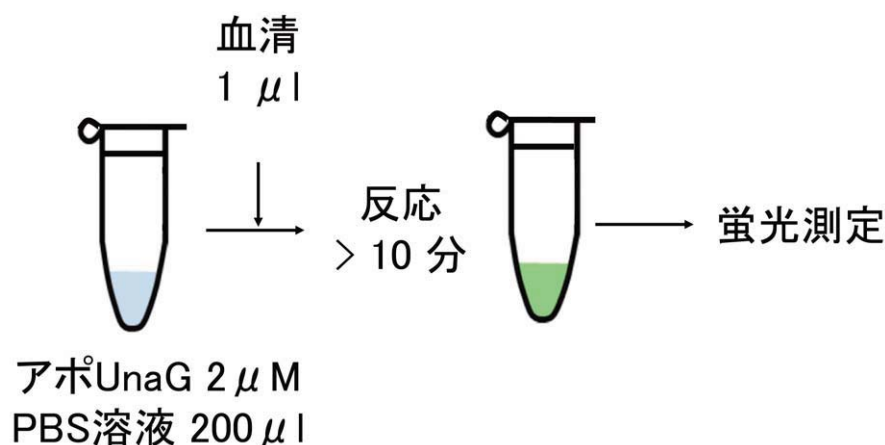


図27

れたのですが、感度は悪く、あまり正確であるとは言えません。そこで、われわれはアポUnaGを使って、わずかな血清を入れて蛍光を測ればビリルビンを直接定量できるキットをつくりました（図27）。非常に高感度で1 μ Lの血清で十分です。有効数字は3桁保証できます。簡単かつ迅速ということで、特に周産期医療、新生児の医療に活躍すると思われます。

新生児黄疸は生理的な現象ですが、程度がひどくなると核黄疸が起こります。ビリルビンが脳基底核に沈着し後遺症が残ってしまいます。それをビリルビン脳症といいます。特に出生時体重が1,000gまたは500g未満の未熟児で、ビリルビンは必ずモニターしなければいけない。しかし小さい赤ん坊から多くの血清を採取するのは大変なことです。より高感度の測定法が求められるのです。

ところで、ビリルビンはすごい抗酸化作用をもつ分子であるということを付け加えたいと思います。ビリルビンは容易に酸化されてビリベルジンになります。酸化されるということは抗酸化作用を持つということです。一

方、組織の中にはビリベルジン還元酵素が豊富にあって速やかにビリルビンに戻ります。こうした酸化と還元のカイクリングが非常に活発に起きているようです。これが起こっているからこそ、私たちの体の中では、抗酸化物質ビリルビンが常に供給され、さまざまな酸化ストレスが除去されると考えられています。ビリルビンは、特に脂質の酸化を防ぐ力が強いことが示されています。

臨床的に、血清ビリルビン濃度が軽度が高いと、酸化ストレス関連疾患の糖尿病、心疾患、動脈硬化、神経変性疾患などにかかりにくいという統計的なデータが出てきています。適度に血清ビリルビン濃度が高いほうが体調がよいとも言えそうです。私も学生時代に医学部の授業でビリルビンは悪玉として教えられましたが、実は善玉でもあるわけです。ただ、ものごとはすべてそうだと思いますが、過剰にあるとよくないのでしょう。

さて、ニホンウナギにおける、ビリルビンの結合や緑色の蛍光の意味はよくわかりません。さきほどお見せしたスライドですが、非常に細い筋繊維に緑の蛍光がかなり濃縮して

いることを示す画像です。ウナギはマグロと同じく大型魚類です。魚は卵の大きさはほとんどどれも一緒ですが、成魚の大きさは違います。大型魚類においては、こうした細い筋繊維が肥大することによって全体のサイズが大きくなります。筋肉の肥大にUnaGが関係しているかもしれません。

もちろん、ウナギの回遊に関係する可能性は大いにあるでしょう。ウナギの種は、現在19種類が報告されていますが、その中でも、ヨーロッパウナギ、アメリカウナギ、ニホンウナギなどが長距離を回遊する種として有名です。彼らは何も食べないですごく長い距離を回遊するそうです。回遊中の筋肉で生じる酸化ストレスを除去するために、大量のビリルビンを貯蔵し、少しずつ放出する可能性が示唆されます。

ニホンウナギは謎に満ちた生き物です。経済的にも重大な生き物ですし、生態学的には絶滅危惧種に認定されるかもしれない生き物です。そんなニホンウナギを対象に研究を続けながら、酸化ストレスとうまく付き合いこれを除去する術が得られたらと考えております。

「脳の内側を観る」と大仰なことを言って話を進めてきました。でも、観るための技術開発の経緯をたどると、源は植物にあったり、藻類にあたり、細菌にあたり、哺乳類以外のものが多いのです。光と生命との相互作用を究めていくことが必要なのだと思います。今日はクラゲやサンゴなど光るものが登場してきましたが、地球上の生物の中で、われわれ人類が知識として持っているもの、実際に手にしたことがあるものはほんのわずかでしょう。先ほどのニホンウナギの話も実は非常に身近な生き物がビリルビンセンサーを人類に授けてくれたことを伝えたかったからした次第です。

もちろん、光と物質との相互作用も究めなければなりません。とくに、発色団を動き回る π 電子の心をつかむための研究を続けていきたいと考えています。蛍光タンパク質を材

料に、いろいろな境界領域を創っていくような研究の発展を心がけたいと思っています。これで私の話を終わります。種々雑多な内容になってしまいましたが、何かしら刺激になるような題材があれば幸いです。