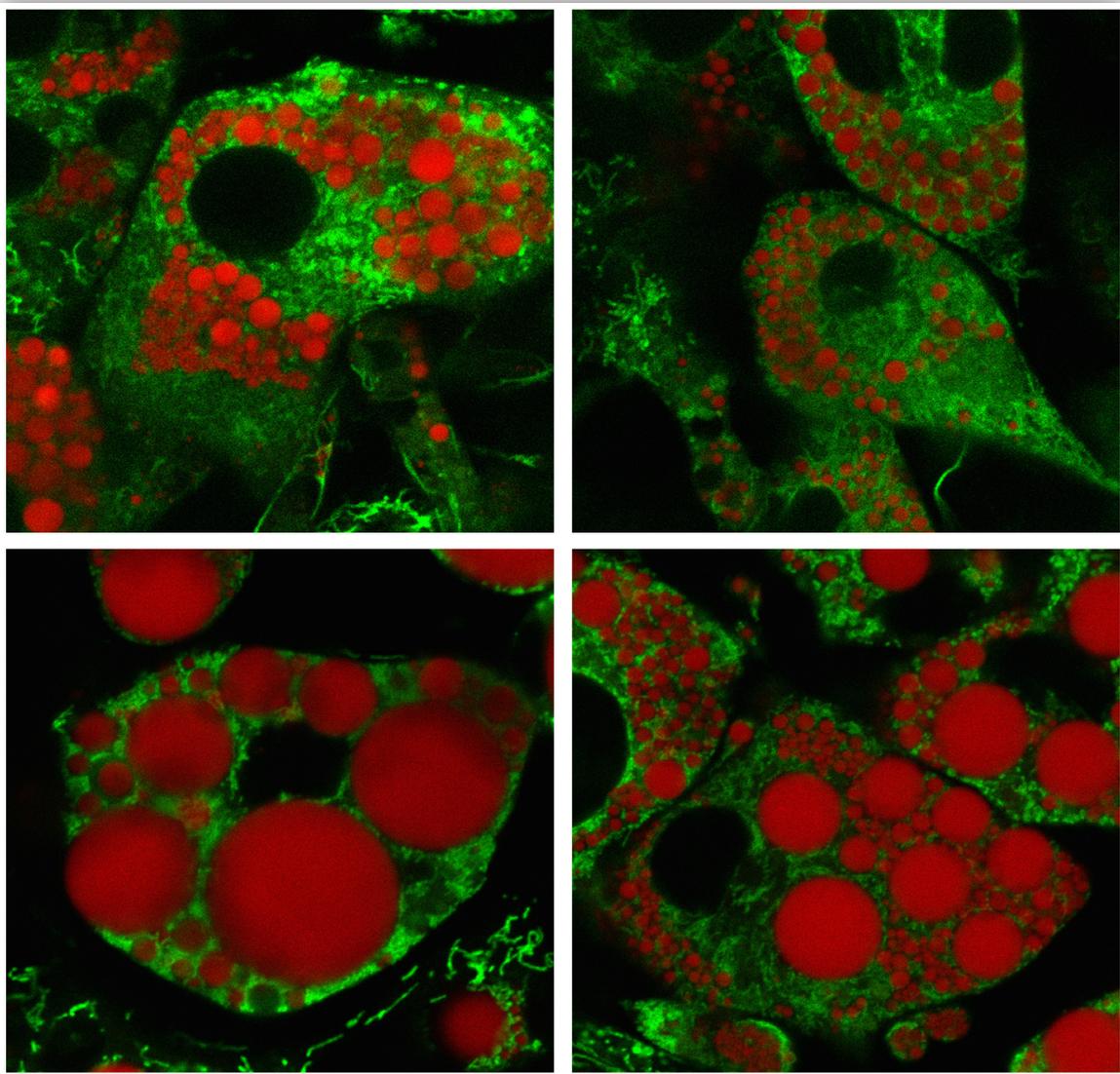


バイオイメージング

第24回学術集会ベストイメージング賞・カールツァイス賞受賞



「脂肪滴の成熟過程におけるミトコンドリアの役割:ペリリピンが与える影響」

表紙の図：

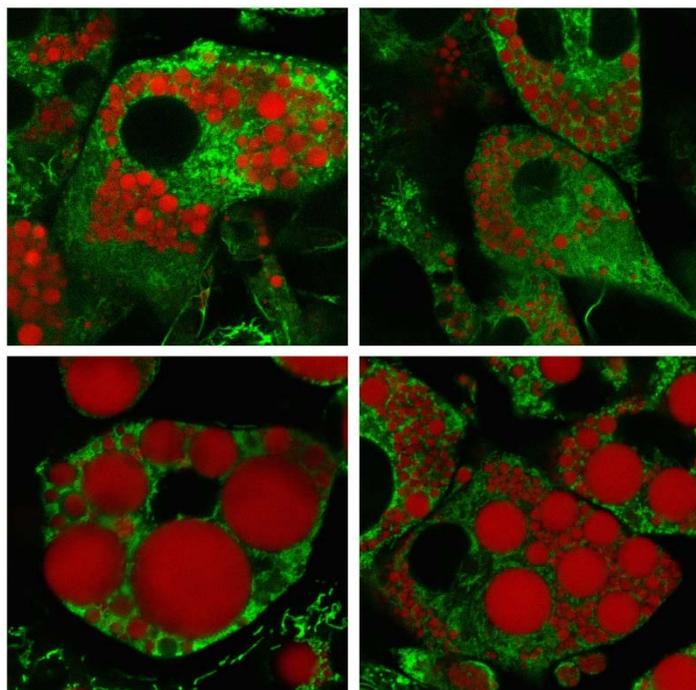
脂肪滴の成熟過程におけるミトコンドリアの役割：ペリリピンが与える影響

○長谷川千織¹⁾、伊香賀玲奈²⁾、田中光³⁾、田中直子¹⁾

¹⁾大妻女子大院・健康栄養、²⁾お茶女大院・理学、³⁾東邦大・薬

脂肪細胞が肥大化するとサイトカインの合成・分泌が促され、脂肪細胞の周辺に炎症を引き起こし、生活習慣病の原因になると言われている。ミトコンドリアについては近年活発に研究が進められ、周囲の状態に合わせて形態を変化させながら積極的に細胞内の機能をコントロールする細胞内小器官であることがわかってきているが、脂肪細胞においてどのような役割を担っているかについての研究はまだ非常に少ない。そこで本研究では脂肪細胞における脂肪滴とミトコンドリアの相互関係を明らかにする手がかりとして、脂肪滴表面に存在するペリリピンに着目した。表紙の図は、脂肪滴の成熟過程に関わりがあると考えられるペリリピン 4 をノックダウンした時の脂肪滴とミトコンドリアを観察したものである。

マウス線維芽細胞 3T3-L1 に、ペリリピン 4 に対する shRNA を導入後に G418 を用いてペリリピン 4 を定常的にノックダウンした細胞を選択し、これを shPLIN4 とした。shPLIN4 を脂肪細胞に分化させ、分化誘導後 8 日目、18 日目のミトコンドリアと脂肪滴の可視化を試みた。ミトコンドリアは形がよくわかるコントロールに対し、shPLIN4 では細くて鮮明でない様子が観察された。また、分化誘導後 18 日目ではコントロールの脂肪滴の周辺にミトコンドリアが集まる様子が観察されたが、shPLIN4 ではこのような傾向はみられなかった。脂肪滴は日数が経つと大きくなるコントロールに対し、shPLIN4 では大きな脂肪滴とともに多数の小さな脂肪滴が存在する様子が観察された。



(左上)分化後 8 日目のコントロール

(右上)分化後 8 日目の shPLIN4

(左下)分化後 18 日目のコントロール

(右下)分化後 18 日目の shPLIN4

ミトコンドリアは MitoTracker Deep Red、脂肪滴は Nile Red で染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。ミトコンドリアは形がはっきりとしているコントロールに対して shPLIN4 では細く、脂肪滴は日数が経つと大きくなるコントロールに対し、shPLIN4 では小さい脂肪滴が多数存在した。

■ 目 次 ■

第 25 回日本バイオイメージング学会学術集会	・・・・・・・・・・・・・・・・	4 1
ご案内	・・・・・・・・・・・・・・・・	4 3
第 25 回学術集会プログラム	・・・・・・・・・・・・・・・・	4 9
要旨	・・・・・・・・・・・・・・・・	6 0
発表者索引	・・・・・・・・・・・・・・・・	1 3 8
総会資料	・・・・・・・・・・・・・・・・	1 4 3
学会定款	・・・・・・・・・・・・・・・・	1 5 7

■第 25 回日本バイオイメーjing学会学術集会■

主催：日本バイオイメーjing学会
：名古屋市立大学大学院薬学研究科

共催：科学研究費補助金 新学術領域研究
「生命分子システムにおける動的秩序形成と高次機能発現」(代表：加藤晃一)

会期：平成 28 年 9 月 4 日 (日) ～ 9 月 6 日 (火)
◆公開講座：9 月 4 日 (日) 12:30 ～ 17:40
◆学術講演会：9 月 5 日 (月) 9:00 ～ 9 月 6 日 (火) 17:40

会場：名古屋市立大学薬学部 宮田専治記念ホール (名古屋市瑞穂区田辺通 3-1)
(<http://www.nagoya-cu.ac.jp/phar/access/index.html> を参照)

大会長：加藤 晃一 (自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター)

学術集会ホームページ：<http://www.nagoya-cu.ac.jp/bioimaging/index.html>

参加費：公開講座 (無料)
学術集会
一般 (会員・協賛学会員：6,000 円、非会員：8,000 円)
学生 (学部生無料、会員大学院生：1,000 円、非会員大学院生：3,000 円)

協賛学会 (五十音順)

応用物理学会	化学工学会	可視化情報学会
日本化学会	日本顕微鏡学会	日本磁気共鳴医学会
日本神経科学学会	日本生物物理学会	日本生理学会
日本組織細胞化学会	日本蛋白質科学会	日本物理学会
日本分光学会	日本分子イメーjing学会	日本分子生物学会
日本分析化学会	日本薬学会	

後援学会 (五十音順)

日本動物学会	日本免疫学会
--------	--------

■第 25 回日本バイオイメーjing学会学術集会運営委員会■

大会長：加藤 晃一（自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター）

副大会長：飯野 亮太（自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター）

運営委員（五十音順）

稲垣 直之（奈良先端科学技術大学院大学）

佐藤 匡史（名古屋市立大学大学院薬学研究科）

中川 秀彦（名古屋市立大学大学院薬学研究科）

平嶋 尚英（名古屋市立大学大学院薬学研究科）

古野 忠秀（愛知学院大学薬学部）

矢木 宏和（名古屋市立大学大学院薬学研究科）

矢木 真穂（自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター）

谷中 冴子（自然科学研究機構 分子科学研究所）

■ご案内■

1. 受付・参加費

(1) 大会受付にて、領収書とネームカードをお受け取りください。当日受付の方は参加費を納入の上、領収書とネームカードをお受け取りください。

◆参加費

○公開講座：無料

○学術集会：一般（会員・協賛学会員：6,000 円、非会員：8,000 円）
学生（学部生無料）

（会員大学院生：1,000 円、非会員大学院生：3,000 円）

○講演要旨集：2,000 円

(2) 学術集会会期中はネームカードを必ず着用してください。

(3) 依頼公演を除き、登壇者は日本バイオイメーjing学会会員に限ります。

(4) 9月5日（月）の受付は混雑が予想されますので、お早めに受付にお越しください。受付開始時間は8時30分です。

2. 発表者へのご案内

(1) 特別講演、シンポジウム

- ・講演時間は時間厳守にてお願いいたします。また演者の方は、発表30分前までにパソコンあるいはUSBメモリーを受付へご持参ください。バッテリー切れに備えて、電源アダプターをご持参ください。また、発表中はスクリーンセイバーや省電力モードにならないよう、設定をお願いします。
- ・口頭発表用には、Windows7、Microsoft Power Point 2013 搭載のノートパソコンを準備します。
- ・プロジェクタとパソコンとの接続は、D-sub15ピン端子（別名：アナログRGB端子・VGA端子）を使用します。別途コネクタが必要な場合がありますので、必ずご持参ください。

(2) ポスター討論

- ・ポスターサマリー発表は**1件2分**です。集会のスムーズな進行のため、**時間厳守**をお願いします。奇数番号のサマリー発表は9月5日（月）、偶数番号のサマリー発表は9月6日（火）です。
- ・ポスター討論は、奇数番号が9月5日（月）13:10～14:10、偶数番号が9月6日（火）13:40～14:40です。この60分間、発表者は必ずポスターの前にいてください。

- ・ポスターパネルは W80cm×H180cm の大きさです。各パネルの左肩に演題番号が貼ってありますので、所定のパネルに展示してください。貼り付けに必要な押しピンは、ポスター会場に用意しています。
- ・ポスターは9月5日（月）9:00以降、遅くともポスター討論に間に合うように掲示してください。
- ・ポスターの撤去は9月6日（火）14:40～17:40に行ってください。撤去時間を過ぎ、取り外されていないポスターは原則、廃棄しますのでご注意ください。

3. ベストイメージング賞

ベストイメージング・晝馬賞（浜松ホトニクス提供）、ニコン賞、ZEISS賞（カールツァイスマイクロコピー提供）、OLYMPUS賞の4つの賞が予定されています。参加者全員による投票により、ポスター発表の中から決定いたします。

- ・受付時に審査用紙をお渡しいたします。
- ・9月6日（火）14時50分までに投票をお願いいたします。
- ・受賞者の発表と表彰は9月6日（火）17時20分より閉会式会場にて行います。

4. 理事会、評議員会、総会

理事会	9月4日（日）10:00 - 12:00	OSCE1,2
評議員会	9月5日（月）12:10 - 13:10	OSCE1,2
総会	9月6日（火）13:00 - 13:40	ホール

5. 奨励賞受賞講演

9月6日（火）17:00 - 17:30 ホール

■会場のご案内■

名古屋市立大学薬学部へのアクセス

【地下鉄でのアクセス】

- ① 桜通線「瑞穂区役所」駅下車1番出口から徒歩15分



- ② 名城線「総合リハビリセンター」駅下車1番出口から徒歩15分



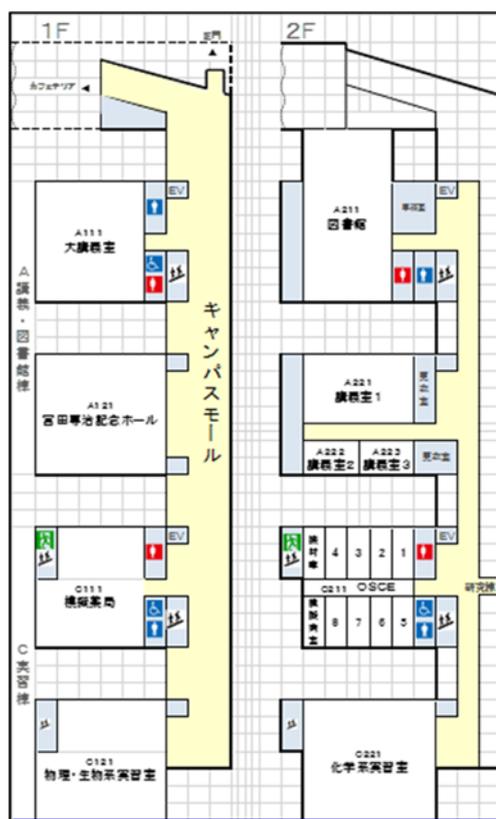
【市バスでのアクセス】

金山駅金山7番のりばより金山16「市大薬学部」下車
金山駅金山8番のりばより金山14「市大薬学部」下車

名古屋市立大学薬学部キャンパスマップ



講義・図書館棟、実習棟 配置図



- 特別講演・シンポジウム：宮田専治記念ホール（講義・図書館棟1階）
- ポスターサマリー：宮田専治記念ホール（講義・図書館棟1階）
- ポスター展示：キャンパスモール（講義・図書館棟・実習棟1階）
- 企業展示：キャンパスモール（講義・図書館棟・実習棟1階）
- 理事会・評議員会：OSCE室1,2（実習棟2階）

■展示企業一覧■

展示のご協力に厚く御礼を申し上げます

アンドール・テクノロジーLtd/オックスフォード・インストゥルメンツ株式会社

クロマテクノロジージャパン合同会社

株式会社生体分子計測研究所

株式会社東陽テクニカ

日本ウォーターズ株式会社

浜松ホトニクス株式会社

株式会社ビジコムジャパン

ラドデバイス株式会社

平成 28 年 7 月 29 日 現在

五十音順、敬称略

第25回日本バイオイメージング学会学術集会 ベストイメージング賞スポンサーよりのメッセージ

OLYMPUS 賞



オリンパス株式会社

オリンパス株式会社は日本で最初に顕微鏡を商品化した会社として、長年に渡ってバイオイメージングの研究を支えてきました。本学会におきましても、皆様のご研究を支えていくために、毎年OLYMPUS賞として賞品を提供しております。

ニコン賞



ニコンは、優れた顕微鏡画像を通じ人々に新鮮な驚きや感動を与えると同時に、最先端の科学技術の重要性を伝えてきました。新たな感動を与えてくださる研究者とその画像に対して、ニコン賞を贈呈いたします。

株式会社 **ニコン インステック**

ZEISS 賞

カールツァイスマイクロコピー株式会社

1846年に創業した弊社は、革新的な顕微鏡システムを世に送り出し続けてきました。そこには研究者の方々の飽くなき探求心と情熱があったからこそです。

本学会においては、次世代を担う若手研究者の方々に、ZEISS賞を贈呈したいと思います。



晝馬賞

浜松ホトニクス株式会社

世界で初めてテレビに「イ」の字が映し出されてから約80年。光技術は目覚ましく進歩し、21世紀を「光の世紀」と呼ばしめるまでになりました。これまで、そしてこれからも、浜松ホトニクスは光と共に人類未知未踏の技術を追い求めて発展を続けていきます。我々は“女神の前髪を掴む”様な研究を応援しています。

HAMAMATSU
PHOTON IS OUR BUSINESS

(掲載は順不同です)

■ プログラム ■

第25回日本バイオイメージング学会学術集会 日程表					
9月4日(日)		9月5日(月)		9月6日(火)	
		9:00	開会	9:00	シンポジウム3 「ナノバイオイメージング:1 分子から細胞までの先端手 法」
		9:10			
			シンポジウム1 「細胞レベルの分子ダイナミ クス」		
		11:10	ポスターサマリー講演1	11:00	ポスターサマリー講演2
12:00	受付	12:10	休憩	12:00	休憩
12:30	はじめに				
12:40	公開講座1 「化学の力で見えないがんを見つ ける」	13:10	ポスター討論1	13:00	総会
13:25	公開講座2 「Life is small-スマホ顕微鏡が 拓くミクロ世界」				
14:25	休憩&展示	14:10 14:20	休憩	13:40	ポスター討論2
14:55	公開講座3 「3Dプリンタが可能にする 『分子を見て、触って考える』 過程」		シンポジウム2 「分子から個体まで神経系を 見る」	14:40	
15:40	公開講座4 「3DCGが医療を変え…る？」				14:50
16:25	休憩&展示	16:20 16:30	休憩		
16:45	公開講座5 「コミュニケーション能力の神経 基盤:イメージング手法によるア プローチ」		特別講演 松田 道行(京大・医)	16:50	休憩
17:30	おわりに	17:30	休憩	17:00	
17:40		17:40	懇親会	17:30	閉会式・表彰式
		19:10			

第 25 回日本バイオイメーjing学会学術集会プログラム

◎公開講座プログラム

日時：9月4日（日）12:30～17:40（受付 12:00～12:30）

会場：名古屋市立大学薬学部 宮田専治記念ホール（名古屋市瑞穂区田辺通3-1）

「分子から心まで観るバイオイメーjing」

12:30～14:25

はじめに

川西 徹（国立医薬品食品衛生研究所 所長）

K-1. 化学の力で見えないがんを見つける

浦野 泰照

東京大学大学院薬学系研究科

K-2. Life is small—スマホ顕微鏡が拓くマイクロ世界—

永山 國昭

総合研究大学院大学

14:25～14:55 <休憩&展示>

14:55～16:25

K-3. 3Dプリンターが可能にする『分子を見て、触って考える』過程

川上 勝

山形大学理工学院

K-4. 3DCGが医療を変え…る？

瀬尾 拓史

株式会社サイアメント

16:25～16:45 <休憩&展示>

16:45～17:40

K-5. コミュニケーション能力の神経基盤：イメージング手法によるアプローチ

定籾 規弘

自然科学研究機構 生理学研究所

おわりに

加藤 晃一（自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター）

◎学術講演会プログラム

日時：9月5日（月）9:00～9月6日（火）17:40（受付 8:30～9:00）

会場：名古屋市立大学薬学部 宮田専治記念ホール（名古屋市瑞穂区田辺通3-1）

9月5日（月）

9:00

【開会】

会場：ホール

第25回学術集会大会長 加藤 晃一

9:10～11:10

【シンポジウム1】「細胞レベルの分子ダイナミクス」

会場：ホール

オーガナイザー：加藤晃一（自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター）

菊地和也（大阪大学大学院工学研究科）

S1-1. クロマチンイメージングより迫るリプログラミング機構

宮成悠介

自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター

S1-2. 細胞膜受容体の1分子可視化

佐甲靖志

理化学研究所 細胞情報研究室

S1-3. 新しい糖鎖プローブで追う脂質ラフトの実体

安藤弘宗

岐阜大学応用生物科学部、京都大学物質・細胞統合システム拠点

S1-4. GLUT4の糖鎖機能を追う蛋白質履歴追跡プローブ

○菊地和也^{1,2}、平山真也¹、堀 雄一郎^{1,2}

大阪大学¹大学院工学研究科、²免疫学フロンティア研究センター

11:10～12:10

【ポスターサマリー講演1】

P1. 蛍光プローブとDNAを用いたHDAC活性検出法の開発

○立松結花¹、蓑島維文^{1,2}、菊地和也^{1,2}

¹大阪大学大学院工学研究科、²阪大免疫学フロンティア研究センター

P3. 伸長する神経突起でのミトコンドリア輸送・膜電位・ATP同時イメージング

○鈴木李夏¹、堀田耕司¹、岡 浩太郎¹

¹慶應義塾大学大学院 理工学研究科 生命システム情報専修

P5. 金ナノプローブを用いたキチン加水分解酵素の1nmステップ運動解析

○中村彰彦^{1,2}、飯野亮太^{1,2,3}

¹岡崎統合バイオサイエンスセンター、²総合研究大学院大学、³分子科学研究所

P7. 構造情報に基づく4-HIL合成酵素の立体選択性の制御

石玄¹、○宮川拓也¹、中村 顕¹、侯峰¹、日比 慎²、小川 順²、田之倉 優¹

¹東京大学大学院農学生命科学研究科、²京都大学大学院農学研究科

P9. 高濃度アクチン繊維が引き起こす集団運動は表面形状で変化する

○瀬戸口裕二、埜森大空、星田政行、市瀬 悠、本多 元

長岡技術科学大学 大学院 生物機能工学専攻

- P11. **バクテリア由来セルラーゼ *Cellulomonas fimi* Cel6B とカビ由来セルラーゼ *Trichoderma reesei* Cel6A の構造と動態の相関解析**
 ○石渡大貴¹、中村彰彦^{1,2}、田崎智之³、Akasit Visootsat⁴、Maximilien Morice⁵、飯野亮太^{1,2,6}
¹総合研究大学院大学物理科学研究科、²岡崎統合バイオサイエンスセンター、³東京大工学系研究科、⁴カセサート大学理学部、⁵パリステック、⁶分子科学研究所
- P13. **炎症の誘導にともなう免疫炎症細胞集積のイメージング**
 ○長谷川明洋¹、荻野英賢¹、中山俊憲²
¹山口大学大学院医学系研究科、²千葉大学大学院医学研究院
- P15. **多点電位記録システムとレーザー共焦点カルシウムイメージングによるマウス海馬スライスにおける神経活動の同時測定**
 ○幅 菜摘¹、宇野祥規¹、濱崎雄太²、斎藤 稔^{1,2}
¹日本大学大学院・総合基礎科学研究科、²日本大学・文理学部
- P17. **マスト細胞分泌顆粒における炎症性メディエータ不均質性の研究**
 ○稲本奨平、千田知美、平嶋尚英、鈴木 亮
 名古屋市立大学大学院薬学研究科
- P19. **走査型電気化学顕微鏡を用いた心筋細胞の拍動解析**
 ○奥村 翔¹、平野 悠²、小松康雄²、牧与志幸¹
¹コスモ・バイオ株式会社、²国立研究開発法人 産業技術総合研究所
- P21. **生物発光イメージング法を用いた膵島 α 細胞からのグルカゴン分泌の解析**
 ○横川 慧^{1,2}、鈴木崇弘³、井上 敏⁴、伊納義和²、鈴木 亮¹、古野忠秀²、平嶋尚英¹
¹名古屋市立大学院・薬、²愛知学院大・薬、³愛知学院大・歯、⁴JNC (株)・横浜研
- P23. **All atom molecular dynamics simulations by AMBER of *Agaricus brasiliensis*-derived β -glucan**
 ○Yoshitaka Matsumura¹, Yasumasa Morimoto¹, Mariko Demura¹, Makoto Suminokura¹, Mikako Kubo¹, Kodai Inoue¹, Naohito Ohno², Mitsuru Tashiro³ and Masaki Kojima¹
¹School of Life Sciences, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences,
²School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences,
³Department of Chemistry, College of Science and Technology, Meisei University
- P25. **Ribonuclease T₁ のアミノ酸残基レベル粗視化構造の分子動力学シミュレーションによる構造精密化**
 ○市岡隆幸、森本康幹、松村義隆、小島正樹
 東京薬科大学生命科学研究科
- P27. **高速度画像記録装置の構築とバイオイメージングへの応用**
 ○藤原久志¹、洲崎悦子²
¹広島市立大学情報科学研究科、²就実大学薬学部

- P29. カルボキシ化ポリグリセロール修飾ナノダイヤモンドのワンポット合成法および、ピオチン-アビジンを用いた選択的分子標識システムの確立
○寺田大紀、外間進吾、五十嵐龍治、白川昌宏
京都大学工学研究科
- P31. 蛍光性ナノダイヤモンドを用いた細胞内磁場イメージング装置の開発
○田辺竜太郎¹、五十嵐龍治^{1,2}、白川昌宏¹
¹京都大学工学研究科、²JST
- P33. 細胞内グルタチオンの求核付加・解離平衡に基づく超解像蛍光イメージングプローブの開発
○両角明彦^{1,4}、神谷真子^{2,5}、宇野真之介¹、梅澤啓太郎¹、吉原利忠³、飛田成史³、浦野泰照^{1,2,4}
¹東大院薬、²東大院医、³群馬大院理工、⁴AMED CREST、⁵JST さきがけ
- P35. トリインフルエンザ劇症化における NS1 ダイマーの分子機構
加藤有介¹、福井 清¹、○鈴木和男²
¹徳島大学先端酵素学研究所、²帝京大学アジア国際感染症制御研究所
- P37. マウス大脳における神経細胞の空間分布と機能活動に関する定量解析
○武田寛史¹、田桑弘之²、季 斌²、佐原成彦²、富田 裕³、鈴木則宏³、菅野 巖²、須原哲也²、樋口真人²、正本和人^{1,2}
¹電気通信大学大学院情報理工学研究科、
²放射性医学総合研究所脳機能イメージング研究部、³慶應義塾大学医学部神経内科
- P39. 蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を基盤とするグルタチオン(GSH)濃度センサー分子による生細胞イメージングの検討
○谷原元大、宇高 光、福田武司、鈴木美穂
埼玉大学大学院理工学研究科
- P41. β -Sheet リッチタンパク質の蓄積した脳血管周辺領域における組織学的イメージング
○小野田淳人^{1,2,3}、川崎平康⁴、築山光一^{4,5}、武田 健²、梅澤雅和^{2,6}
¹東理大院・薬、²東理大・研究推進機構・総研院、³学振 DC、
⁴東理大・総研院・IR-FEL、⁵東理大・理・化学、⁶東理大・基礎工・材料工
- P43. 変異型 cryptogein を用いたタバコ培養細胞 BY-2 の二段階の免疫応答機構の解析
○花俣 繁¹、竹内希枝²、大島知樹²、吉田亜祐美²、瀬尾茂美³、光原一朗³、来須孝光^{1,4}、朽津和幸^{1,2}
¹東京理科大・イメージングフロンティアセンター、²東京理科大・理工・応用生物科学、
³農研機構・生物機能利用、⁴東京工科大・応用生物
- P45. 希土類添加 Y₂O₃ ナノ蛍光プローブの作製と NIR・CL 顕微鏡観察
○新岡宏彦¹、福島昌一郎¹、古川太一²、三宮 工³、三宅 淳¹、橋本 守¹
¹大阪大学基礎工学研究科、²大阪大学ナノセンター、³東京工業大学物質理工学院

P47. グルコース残基を目印とした糖タンパク質プロセッシング機構の構造基盤

○佐藤匡史^{1,2}、Tong Zhu^{1,3}、年森隆泰^{1,3}、Gengwei Yan^{1,3,4}、山口拓実^{1,3,5}、
上久保裕生⁶、内橋貴之⁷、加藤晃一^{1,3,4}

¹名市大・院薬、²JST・さきがけ、³自然科学研究機構・岡崎統合バイオ、
⁴総研大・物理科学、⁵北陸先端大・マテリアル、⁶奈良先端大・物質創成科学、
⁷金沢大・理工

P49. Amyloid fibril formation in giant vesicle

○Tong Zhu¹, Kensuke Kurihara^{1,2,3}

¹ Okazaki Institute for Integrative Bioscience, ² Institute for Molecular Science,
³ Research Center for Complex Systems Biology, The Univ. of Tokyo

12:10~13:10 <休憩>

13:10~14:10

【ポスター討論1】

会場：キャンパスモール

14:10~14:20 <休憩>

14:20~16:20

【シンポジウム2】「分子から個体まで神経系を見る」

会場：ホール

オーガナイザー：稲垣直之（奈良先端科学技術大学院大学）

渡邊直樹（京都大学大学院医学研究科）

S2-1. 分子の窓を通して覗いた細胞の構造としくみ

○渡邊直樹^{1,2}、木内 泰²、山城佐和子¹

¹京都大学大学院生命科学研究所、²京都大学大学院医学研究科

S2-2. 神経細胞内シグナル分子の時空間的な操作とイメージング

村越秀治

生理学研究所

S2-3. 光シート顕微鏡の改良と発生学・細胞生物学への応用

野中茂紀

基礎生物学研究所

S2-4. 蛍光ライブイメージングと牽引力顕微鏡による神経軸索ガイダンス機構の解析

稲垣直之

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科

16:20~16:30 <休憩>

16:30~17:30

【特別講演】

会場：ホール

シグナル伝達を可視化する蛍光タンパク質 FRET プローブの原理と応用

松田道行

京都大学大学院医学研究科

17:30~17:40 <休憩>

17:40~19:10

【懇親会】

会場：カフェテリア

9月6日(火)

9:00~11:00

【シンポジウム3】「ナノバイオイメーキング：1分子から細胞までの先端手法」 会場：ホール

オーガナイザー：飯野亮太（自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター）

内橋貴之（金沢大学自然科学研究科）

S3-1. 金ナノプローブで生体分子の速いダイナミクスを観る

飯野亮太

自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター・分子科学研究所、
総合研究大学院大学物理科学研究科 機能分子科学専攻

S3-2. クライオ電子顕微鏡によるタンパク質の単粒子構造解析

村田和義

自然科学研究機構 生理学研究所

S3-3. 高速 AFM による生体試料の動態イメージング

○内橋貴之^{1,2}、古寺哲幸²、柴田幹大^{1,2}、安藤敏夫²

¹金沢大学理工研究域数物科学系、²金沢大学理工研究域バイオ AFM 先端研究センター

S3-4. X線レーザーで生きた細胞を観る

○西野吉則¹、木村隆志¹、鈴木明大¹、城地保昌²、大島泰郎³、別所義隆⁴

¹北海道大学電子科学研究所、²高輝度光科学研究センター、

³共和化工(株)環境微生物学研究所、⁴台湾中央研究院生物化学研究所

11:00~12:00

【ポスターサマリー講演2】

会場：ホール

P2. PYP タグラベル化技術を応用したメチル化 DNA の発蛍光イメージング

○西田会友子¹、堀雄一郎^{1,2}、菊地和也^{1,2}

¹大阪大学大学院工学研究科、²大阪大学免疫学フロンティア研究センター

P4. High Density Localization Microscopy Using Exemplar Based Method

○Ka Pik Lee, Takashi Shibata, Atsushi Sato

Data Science Research Laboratories, NEC Corporation

P6. FRET センサーを用いた Rab11 のリサイクリング経路制御機構の検討

○照井 翔¹、石田彪馬¹、鯉沼真吾¹、和田直之²、福田光則³、中村岳史¹

¹東京理科大学生命医科学研究所、²東京理科大学理工学部、

³東北大学大学院生命科学研究科

P8. 細胞体におけるミトコンドリアダイナミクスの画像解析

○太田善浩、杉本雄生、チェヒョンジン

東京農工大学・大学院工学研究院・生命機能科学部門

P10. 単離脳標本系における匂い嫌悪条件付けによるナメクジの嗅覚系神経活動の匂い応答変化

○石田康平¹、橋口小春²、小松崎良将³、斎藤 稔¹

¹日本大学大学院・総合基礎科学研究科、²日本大学大学院・理工学研究科、

³日本大学・理工学部

- P12. すべり運動するアクチン繊維の集団運動により形成されるバンドパターン
○埤森大空、瀬戸口裕二、星田政行、市瀬 悠、本多 元
長岡技術科学大学大学院 工学研究科 生物機能工学専攻
- P14. マウス海馬スライスにおいてニューロステロイドが引き起こす神経活動変化のレーザー共焦点カルシウムイメージング
○岩田尚樹¹、濱崎雄太²、斎藤 稔^{1,2}
¹日本大学大学院総合基礎科学研究科、²日本大学文理学部
- P16. 統合失調症感受性遺伝子産物 G72 タンパク質の構造機能予測
○加藤有介、福井清
徳島大学先端酵素学研究所
- P18. 3次元培養過程のタイムラプス画像におけるスフェロイドの形態解析
○立野玲子^{1,2}、高橋大介¹、岡本教佳¹
¹関東学院大学、²(公財)東京都医学総合研究所
- P20. Micro-CT イメージングによるマウス胎生致死表現型解析- 軟組織高速・高解像度イメージング -
田村 勝
理化学研究所 バイオリソースセンター マウス表現型解析開発
- P22. ナノダイヤモンドによる細胞内タンパク質の一分子構造変化計測
○源城拓哉、五十嵐龍治、白川昌宏
京都大学工学研究科
- P24. ナノバブルを用いた超音波セラノスティクスの構築
○小田雄介¹、鈴木 亮¹、Unga Johan¹、小俣大樹^{1,2,3}、宇留賀仁史¹、杉井むつみ¹、宗像理紗¹、島 忠光¹、丸山一雄¹
¹帝京大学薬学部薬物送達学研究室、²ユトレヒト大学、³日本学術振興会特別研究員 PD
- P26. 可逆的細胞膜結合蛍光プローブ FM1-43 を用いたインスリン開口分泌の可視化
○川久保愛美¹、柴田みゆき²、長山恵理子²、伊香賀玲奈³、田中直子²
¹大妻女子大院・健康栄養、²大妻女子大・食物、³お茶女大院・理学
- P28. 三次元生体モデルイメージングに適した新規培養ウェルの開発
○東ヶ崎健、鈴木民恵、松熊祥子
株式会社ファンケル総合研究所
- P30. スクロース水浸処理したシロイヌナズナの葉における孔辺細胞の細胞生物学的解析
○秋田佳恵、桧垣 匠、馳澤盛一郎
東京大学大学院新領域創成科学研究科
- P32. 新規発光レシオメトリックプローブを用いた植物細胞内 Ca²⁺イメージングの試み
○永井寛子¹、新野祐介²、助川夏雄¹、北畑信隆^{1,3}、宮脇敦史²、朽津和幸^{1,3}
¹東京理科大・院・理工・応用生物科学、²理研・脳科学総合研究センター
³東京理科大・イメージングフロンティアセンター

- P34. **キャリア依存的な LewisX 糖鎖修飾を担う特異的なゴルジ体の局在**
 ○姫田美咲¹、柘植信吾¹、矢木宏和¹、加藤晃一^{1,2}
¹名古屋市立大学薬学部、²自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター
- P36. **Hippo シグナル依存性 Bmp4 転写調節による二次心臓領域 (SHF) 心房筋分化制御**
 ○福井 一¹、望月直樹^{1,2}
¹国立循環器病研究センター研究所 細胞生物学部、²AMED-CREST
- P38. **位相差顕微鏡像と畳み込みニューラルネットワークを用いた C2C12 細胞の分化識別**
 ○大東寛典、浅谷学嗣、吉村愛菜、田川聖一、新岡宏彦、三宅 淳
 大阪大学大学院礎工学研究科
- P40. **凝集誘起発光(AIE)体と蛍光タンパク質(FP)のミセルによる薬物送達イメージング**
 ○高野修杜、宇高 光、福田武司、幡野 健、鈴木美穂
 埼玉大学大学院理工学研究科
- P42. **イネのオートフジーのイメージングと発生・代謝制御における役割の解析**
 ○来須孝光^{1,2}、瀬良ゆり³、陶 文紀³、澤田隼平³、花俣 繁^{2,3}、坂本真吾⁴、
 小野聖二郎⁵、岡咲洋三⁶、徳永京也⁷、小嶋美紀子⁶、榊原均⁶、斉藤和季⁶、
 野々村賢一⁵、小関泰之⁷、光田展隆⁴、多田雄一¹、朽津和幸^{2,3}
¹東京工科大・応用生物、²東京理科大・イメージングフロンティアセンター、
³東京理科大・理工・応用生物科学、⁴産総研・生物プロセス、
⁵国立遺伝研・実験圃場、⁶理研・環境資源科学、⁷東京大・院・工・電気系
- P44. **カーボンナノチューブの近赤外蛍光を用いたマウス気道イメージング**
 ○梅澤雅和^{1,2}、関山翔太²、飯泉陽子³、上村真生^{1,2}、岡崎俊也³、曾我公平^{1,2}
¹東京理科大学研究推進機構総合研究院、²東京理科大学基礎工学部材料工学科、
³産業技術総合研究所ナノチューブ実用化研究センター
- P46. **Integrin α 4-CFP/integrin β 1-YFP における FRET 効率の改善**
 ○野村祥子、樋口ゆり子、杉原有香、山下富義、橋田 充
 京都大学大学院薬学研究科
- P48. **自己再生産する油滴システムを利用したベシクルの形成**
 ○栗原顕輔^{1,2,3}
¹岡崎統合バイオサイエンスセンター、²分子科学研究所、
³東京大学複雑系生命システム研究センター

12:00~13:00 <休憩>

13:00~13:40

【総会】

会場：ホール

13:40~14:40

【ポスター討論2】

会場：キャンパスモール

14:40~14:50 <休憩>

14:50~16:50

【シンポジウム4】「薬学とバイオイメージング」

会場：ホール

オーガナイザー：古野忠秀（愛知学院大学薬学部）

中川秀彦（名古屋市立大学大学院薬学研究科）

S4-1. 金属錯体型蛍光プローブの細胞イメージング応用

王子田彰夫

九州大学薬学研究院

S4-2. 生物分子モーターの一分子蛍光イメージング

角田 誠

東京大学大学院薬学系研究科

S4-3. 蛍光イメージングによる生体内の細胞・分子の挙動の評価

樋口ゆり子

京都大学大学院薬学研究科

S4-4. *in vivo* イメージングによるナノ DDS 製剤の評価

浅井知浩、奥 直人

静岡県立大学薬学部

16:50～17:00 <休憩>

17:00～17:30

【奨励賞受賞講演】

会場：ホール

蛍光相関解析技術を用いた生細胞内外来遺伝子分解過程の可視化

佐々木 章^{1,2}

¹産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門、²理化学研究所・生命システム研究センター

17:30～17:40

【表彰式・閉会式】

会場：ホール

◎本学術集会についての問い合わせ先

第 25 回日本バイオイメーjing学会学術集会事務局
名古屋市立大学大学院薬学研究科 生命分子構造学分野内
大会長 加藤 晃一

〒457-8603 名古屋市瑞穂区田辺通 3-1

TEL : 052-836-3447, FAX : 052-836-3450

E-mail : bioimage2016@phar.nagoya-cu.ac.jp

URL: <http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/bioimaging/>

■ 学術講演会要旨 ■

特別講演

奨励賞受賞講演

シンポジウム 1

「細胞レベルの分子ダイナミクス」

シンポジウム 2

「イメージング技術が明らかにする分子・細胞・組織の新たな動態」

シンポジウム 3

「ナノバイオイメージング：1分子から細胞までの先端手法」

シンポジウム 4

「薬学とバイオイメージング」

特別講演

シグナル伝達を可視化する蛍光タンパク質 FRET プロブの原理と応用 **The principle and application of fluorescent protein-based FRET probes for visualization of signal transduction**

○松田道行¹、青木一洋^{1,2}

¹京都大学大学院医学研究科、²岡崎統合バイオセンター

○Michiyuki Matsuda¹, Kazuhiro Aoki²

¹ Graduate School of Medicine, Kyoto University, ² Okazaki Institute for Integrative Bioscience

Genetically-encoded or GFP-based probes/biosensors based on the principle of Förster resonance energy transfer (FRET) are great tools to monitor the activity changes of signaling molecules in living cells. A number of intramolecular FRET biosensors, which comprise both the donor and the acceptor fluorophores within a single protein, have been developed to visualize signalling molecules such as Ca²⁺, phospholipids, small GTPases, protein kinases and so on. It is widely accepted that the intramolecular FRET biosensors enjoy higher sensitivity and easier loading to cells and mice as compared with intermolecular FRET biosensors, which consist of a pair of donor and acceptor fluorophores. A critical drawback of the intramolecular FRET biosensors is that conventional gene-delivery techniques including the transfection of linearized DNAs and viral vectors of Retroviridae often fail to generate stable cell lines expressing FRET biosensors. In many cases, the generated cell lines express only the donor or acceptor fluorescent protein. This phenomenon may be due to recombination between the donor and acceptor fluorescent proteins. We recently developed techniques to avoid this problem by using either transposon-mediated gene transfer or GFP proteins with minimal nucleotide sequence homology. Moreover, we have succeeded to generate transgenic mice stably-expressing such FRET biosensors by using the transposon-mediated gene transfer. We will show how the stable expression of FRET biosensors opens the way to reveal something that we have never known.

奨励賞受賞講演

蛍光相関解析技術を用いた生細胞内外来遺伝子分解過程の可視化

Fluorescence correlation analysis

for visualizing exogenous DNA degradation in living cells

○佐々木章^{1,2}

¹産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門、²理化学研究所・生命システム研究センター

○Akira Sasaki^{1,2}

¹ Biomedical Research Institute, AIST, ² QBiC, RIKEN

外来核酸を体内に導入し、欠損タンパク質を発現させたりターゲット遺伝子をノックダウンしたりする遺伝子治療・核酸医療は難治性疾患の治療法の1つとして期待されている。遺伝子導入効率や送達効率の向上は、遺伝子治療の実用化に向けて極めて重要な課題である。本来、外来遺伝子の発現は厳重に防御されるべきであり、細胞はバリアー機構として外来DNA分解活性を持つ。このような防御機構を理解し、発現効率を向上させるには生きた細胞内に導入された外来DNAの運命を定量化し、分子メカニズムに迫ることが不可欠である。しかしながら、生きた細胞の中で動き回る分子が分解される様子をモニターすることは容易でなかった。本研究では、生きた単一細胞内における外来DNAの分解をモニターする方法として、蛍光相関分光法（Fluorescence correlation spectroscopy; FCS）ならびに蛍光相互相関分光法（Fluorescence cross-correlation spectroscopy; FCCS）を用いた。その結果、COS7細胞の細胞質における外来DNA分解は1時間以内で（トランスフェクションから遺伝子発現の時間スケールに対して速やかに）進行していることが明らかになった、更に分解産物の拡散速度からこの分解はエキソヌクレアーゼによるものではないかと推測した[1]。一方で、FCSならびにFCCSは細胞内の1点のみを測定する手法であるため、外来DNAの局在や分解過程を時空間的かつ定量的にマッピングすることには限界があった。そこで、近年開発された画像ベースの相関解析法の一つ Raster image correlation spectroscopy (RICS) とその拡張法である Raster image cross-correlation spectroscopy (ccRICS) を適用した。我々は相互相関解析に最適な蛍光性 DNA プローブ並びに画像相関を解析するプログラムをそれぞれ独自に開発した。その結果、1細胞の蛍光画像に分子情報（外来DNA分子の分解度合）を重ねてマッピングし、外来DNA分解過程をタイムラプス動画として表現することに成功した。さらに、細胞株によって細胞質のDNA分解活性に顕著な差があることを初めて見出した[2]。これは細胞内に入った外来DNAの運命、ならびに細胞がもつ外来遺伝子の侵入に対する防御機構の解明に資する重要な新知見である。細胞生物学ではトランスフェクション技術が広く用いられているが、トランスフェクション効率の多寡が今回発見した細胞質内ヌクレアーゼ活性に左右されることを示唆する。これは測定が難しく今まであまり議論されて来なかった分子メカニズムであり、新しい遺伝子導入戦略の構築に寄与すると考えられる。また、バイオイメージングの分野においても、分子の局在に加えて、分子動態・分子間相互作用を可視化できる技術として貢献できると期待している。

[1] Sasaki A. et al., *Journal of Controlled Release* 143 (1), 104-111 (2010)

[2] Sasaki A. et al., *Scientific reports* 5 (2015)

クロマチンイメージングより迫るリプログラミング機構

Reprogramming and nuclear dynamics

○宮成 悠介

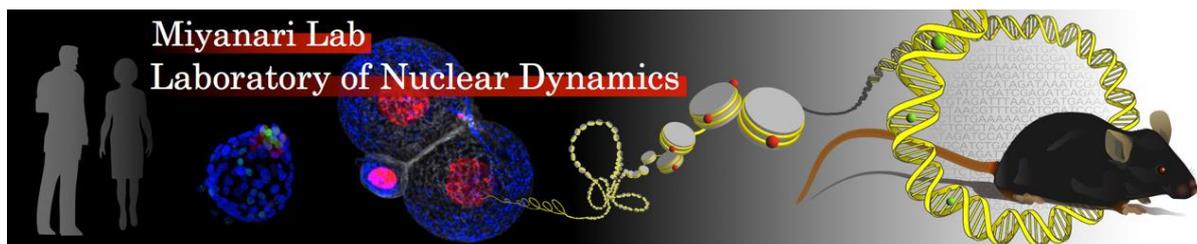
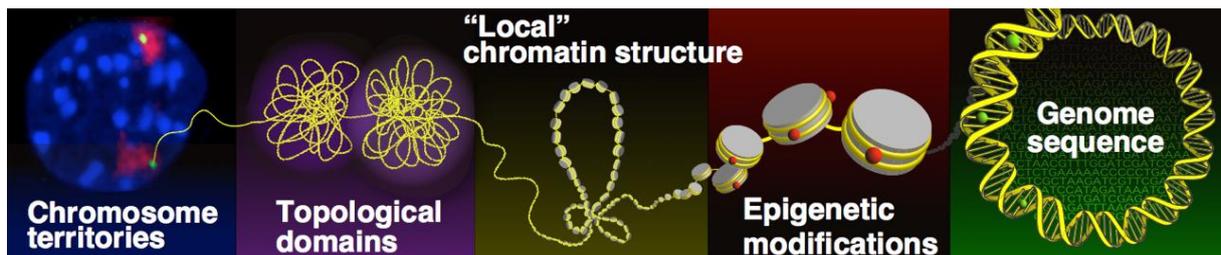
¹自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター、²核内ゲノム動態 研究部門

○Yusuke Miyanari

¹Okazaki Institute for Integrative Bioscience, ²Division of nuclear dynamics

ゲノムDNAはクロマチンとして折り畳まれ、直径数 μm の核内にコンパクトに収納されている。クロマチン繊維は核内でランダムに散在するのではなく、階層的に組織化された構造をとっている。その立体的なクロマチン高次構造(核内ゲノム構造)は様々な核内現象に深く関与している。顕微鏡で核を観察すると、一見動きの少ない構造体のように思えるが、その内部ではクロマチンがダイナミックに動いている。そのクロマチンの「動き」は転写などのゲノム機能に密接に関与していることが示唆されているが、その詳細は明らかになっていない。我々は人工DNA結合タンパク質TALEに蛍光タンパク質を融合させることによって、核内ゲノム動態を生きた細胞内でイメージングする技術を開発した(TGV法)。今回はこれまでの研究成果、特にマウス胚発生過程に観察されるリプログラミングに関する研究と新たに開発したクロマチンイメージング技術を紹介する。

Ref. Miyanari Y, Nature, 2012,
Miyanari Y, Nat.Str.Mol.Bio, 2013



細胞膜受容体の 1 分子可視化
Single-molecule imaging of cell surface receptors

○佐甲靖志

理化学研究所 細胞情報研究室

○Yasushi Sako

Cellular Informatics Laboratory, RIKEN

チロシンリン酸化酵素型受容体(Receptor tyrosine kinase: RTK)および3量体G蛋白質共役型受容体(G-protein coupled receptor: GPCR)は、2つの代表的な細胞膜受容体群であり、主要な薬剤標的でもある。本講演では、それぞれRTKとGPCRに属する2つの受容体分子、EGF受容体と代謝型グルタミン酸受容体の細胞膜における動態を蛍光1分子計測して得られた知見をご紹介します。それぞれの受容体分子を蛍光蛋白質標識して生細胞に発現させ、運動や会合状態、リガンドや細胞質蛋白質との相互作用などを蛍光顕微鏡下で計測することができる。リガンド結合したEGF受容体は2量体を形成して相互リン酸化で活性化することがよく知られているが、細胞膜上の受容体分子はリガンド結合以前から、単量体から4量体、さらにそれ以上の高次会合体を動的に形成・解消している。リガンド結合は、2量体だけでなく高次会合体の形成も促し、同時に受容体の運動性を低下させるが、その中間段階で一時的に運動領域が拡大し、それによって高次会合体が形成されていることが明らかになった。細胞質蛋白質との相互作用は、主として静止した3, 4量体で観察される。グルタミン酸受容体は、恒常的な2量体を形成しているが、4量体、8量体といった高次会合体も観察される。アゴニスト存在下では、高次会合体を形成して遅い運動をする受容体の割合が増加する。3量体G蛋白質と受容体はおそらくアゴニスト添加前から前会合しており、この状態の運動は速く、会合度は小さい。アゴニスト添加後、受容体は時として10分子以上の大きな集合体を形成して、被覆小窩から細胞内へ取り込まれる。以上のように、いずれの受容体の機能も、高次会合体形成による複雑な反応場形成に依存していることが示唆されてきた。

新しい糖鎖プローブで追う脂質ラフトの実体
Pursuing the real image of lipid raft with new glycan probes

○安藤弘宗^{1,2}

¹岐阜大学応用生物科学部、²京都大学物質-細胞統合システム拠点

○Hiromune Ando^{1,2}

¹ Department of Applied Bioorganic Chemistry, Gifu University, ² Institution for Integrated Cell-Material Sciences (WPI-iCeMS), Kyoto University

脂質ラフトとは、1997年に K. Simons らによって提唱された細胞膜成分の会合によって生じる機能性の微小領域のことである[1]。それまでの、いわゆる流動モザイク説によれば、細胞膜分子は自由に側方拡散し、その結果、見かけ上膜構成分子は均一に分布していると考えられていた。一方、脂質ラフトは、ある種の蛋白質受容体（代表的には、GPI アンカー型蛋白質受容体）、コレステロール、飽和リン脂質、スフィンゴ糖脂質から成る不均一な構造体であり、シグナル伝達や膜輸送における重要な役割を担うとされている。しかし、その存否を巡っては、今なおも議論が続くところであり、脂質ラフトは細胞膜に存在する「鵞（ぬえ）」のような存在とよびよい。

我々の共同研究者である楠見、鈴木ら（京都大 iCeMS）は、独自の 1 分子追跡法を駆使して、GPI アンカー型受容体に細胞外シグナル分子が結合すると、その結果誘起された GPI アンカー型受容体クラスターに細胞質側のシグナル分子が会合し、シグナル伝達が進行することを初めて捉えた[2]。また、さらなる解析により、GPI アンカー型受容体は定常状態の細胞膜中で、コレステロール依存的にホモ二量体を頻繁に形成しており、これがラフト構造の核となる最小の構造単位であることを明らかにした[3]。しかしながら、脂質ラフトの構成分子として重要とされるスフィンゴ糖脂質の細胞膜での動態やラフト形成への関与の仕組みは未だに明らかでなく、脂質ラフトの存在証明、機能解明において、スフィンゴ糖脂質は残された最後の分子となった。これは、細胞膜中で天然のスフィンゴ糖脂質と同様に振舞うことの出来る蛍光標識したアナログが存在しないことが要因である。

本講演では、楠見、鈴木らと共同して開発した 1 分子追跡に適したスフィンゴ糖脂質の蛍光プローブについて紹介するとともに、1 分子追跡によって明らかとなった細胞膜中でのスフィンゴ糖脂質（特にシアル酸という糖残基を有するガングリオシドとよばれる分子群）の動態、ラフト分子との相互作用について述べさせていただく[4]。

参考文献

- [1] K. Simons, E. Ikonen, *Nature* **1997**, 387, 569-572.
 [2] K. G. N. Suzuki *et al.* *J. Cell. Biol.* **2007**, 177, 717-730; K. G. N. Suzuki *et al.* *J. Cell. Biol.* **2007**, 177, 731-742.
 [3] K. G. N. Suzuki *et al.* *Nat. Chem. Biol.* **2012**, 8, 774-783.
 [4] N. Komura *et al.* *Nat. Chem. Biol.* **2016**, 12, 402-410.

GLUT4 の糖鎖機能を追う蛋白質履歴追跡プローブ

Fluorogenic Probes Designed for Multicolor Live-Cell Imaging Reveal Role of GLUT4 N-Glycosylation in Intracellular Trafficking○菊地和也^{1,2}、平山真也¹、堀雄一郎^{1,2}大阪大学¹大学院工学研究科、²免疫学フロンティア研究センター○Kazuya Kikuchi¹, Shinya Hirayama^{1,2}, Yuichiro Hori^{1,2}¹ Graduate School of Engineering, ² Immunology Frontier Research Center, Osaka University

蛋白質の動態は、細胞の生理機能の制御において極めて重要な役割を果たしている。Glucose transporter 4 (GLUT4) も細胞内動態が生体のホメオスタシスの維持に必須の蛋白質の一つである。GLUT4 は、N 結合型糖鎖を持つ膜蛋白質であり、インスリン刺激により、細胞膜に移行しグルコースを取り込むことが知られている。その細胞内動態の異常は2型糖尿病の原因となることから、動態機構の解明は生命科学・医学分野における大きな課題となっている。しかしながら、GLUT4 の N 結合型糖鎖は、細胞内動態への役割に関しては論争があり、明確に解明されていない。そこで、演者らが開発した蛋白質ラベル化法である PYP (Photoactive yellow protein) タグを用いたイメージング技術を応用して、GLUT4 の動態を可視化するとともに、N 結合型糖鎖の役割を調べた。

PYP は、紅色硫黄細菌由来の 125 アミノ酸からなる小蛋白質であり、桂皮酸/クマリン誘導体と特異的に共有結合することが知られている。これまでの研究において、PYP タグと目的蛋白質の融合蛋白質を細胞内に発現させ、PYP タグを介して目的蛋白質を特異的に蛍光標識しイメージングする技術を開発してきた。特に、遊離状態では非蛍光性で、PYP タグとの標識反応に伴い蛍光強度を上昇させる「発蛍光プローブ」を開発し、迅速かつ高い S/N 比で生細胞内の蛋白質を可視化することに成功している。本研究では、異なる波長の蛍光を発する複数の発蛍光プローブを用いることで、GLUT4 の動態の時空間イメージング技術の開発を行った。この技術を応用し、糖鎖形成阻害剤と GLUT4 糖鎖欠失変異体を用い可視化解析することで、GLUT4 の N 結合型糖鎖の細胞内動態における機能を明らかにした。

Ref. S. Hirayama, Y. Hori, Z. Benedek, T. Suzuki & K. Kikuchi, "Fluorogenic Probes Reveal a Role of GLUT4 N-Glycosylation in Intracellular Trafficking", *Nature Chem. Biol.*, 12, in press (2016).

分子の窓を通して覗いた細胞の構造としくみ

Visualizing cell architecture and function through the window of single-molecule

○渡邊直樹^{1,2}、木内泰²、山城佐和子¹¹京都大学大学院生命科学研究科、²京都大学大学院医学研究科○Naoki Watanabe^{1,2}, Tai Kiuchi, Sawako Yamashiro¹¹ Kyoto University Graduate School of Biostudies² Kyoto University Graduate School of Medicine

生体分子は、分子複合体を形成しつつ生命機能を支える。われわれは、高密度標識による精細な多重染色を実現する超解像蛍光顕微鏡 IRIS を開発した (Kiuchi *et al. Nature Methods* 12: 743-6, 2015)。これは、2014 年のノーベル賞受賞対象である超解像顕微鏡の技術的問題を克服するアプローチとして注目されている。既存の超解像顕微鏡では、蛍光抗体や蛍光タンパク質を用いて標的を標識する。その場合、12 nm 程の抗体のサイズや導入可能な蛍光タンパク質の密度から、原理的におよそ 20 nm 以下のスケールでの分子分布パターンの捕捉は困難であり、実際の画像にもムラが生じる問題が、ここ数年クローズアップされてきた。分解能が向上したことで明らかとなった「超解像ジレンマ」ともいうべき課題である。この問題に対し、われわれは、迅速に結合解離を繰り返す蛍光プローブを用いたローカリゼーション法によって標的分子位置を捕捉するアイデアにより、従来法にない高密度標識を実現する手法を見出した。さらに、プローブを洗い流しつつ順次異なるプローブに交換することで、上限のない数の複数種のタンパク質を同一標本内で観察することが可能となった。この IRIS は、狭い領域における複数分子の配置や三次元の超解像撮影の拡張性など様々な利点をもっており、その応用が広がることが期待されている。

また、われわれは、電気穿孔法による高効率の標識分子導入を実現した細胞分子イメージング法 eSiMS 顕微鏡を開発した (Yamashiro *et al. MBoC* 25, 1010-24, 2014; *Meth. Cell Biol.* 125, 43-59, 2015)。同法は、初代培養の細胞系にも分子イメージングを適応せしめるため、今回、高速細胞運動のモデル細胞系であるキンギョのケラトサイトに応用することで、アクチン線維の収縮力がアクチン線維の重合・脱重合に与える影響について検証を進めた。結果は、Wilson ら (*Nature* 465, 373-7, 2010) が同じ細胞系を用いた解析から提唱した「ミオシン II ATPase がアクチン線維の崩壊を促進する」という仮説とは正反対の性質を明らかにした (投稿中)。興味深いことに、eSiMS 法による葉状仮足内のアクチン線維の脱重合速度は、ケージ化アクチンプローブを用いた Theriot と Mitchison の有名なフォトアクティベーション (PAF) スタディーでの測定値 (*Nature* 352, 126-31, 1991) より、倍近く速いものであった。この明らかな相違は、PAF やフォトブリーチング実験に起こる、Tardy ら (*Biophys. J.* 69, 1674-82, 1995) が示した標識の局所再取り込みによる誤差に起因する。分子の直接可視化を利用したこれらの手法は、以上のような様々なメリットをもって、生体分子の働きを正確に捕捉することへの鮮明なビジョンを提示する。

神経細胞内シグナル分子の時空間的な操作とイメージング

Spatiotemporal manipulation and imaging of signaling molecules in neuron

○村越秀治¹

¹生理学研究所

○Hideji Murakoshi¹

¹ National Institute for Physiological Sciences

Ca²⁺/Calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) is one of the most important signaling molecules for long-term potentiation and associated spine enlargement underlying learning and memory. Here, to understand the function of CaMKII for synaptic plasticity, we developed genetically encoded light-inducible CaMKII inhibitor and photo-activatable CaMKII by using LOV2 derived from phototropin1. We applied these newly developed optogenetic tools for the study of structural plasticity of single dendritic spines by using 2-photon fluorescence microscope and glutamate uncaging, and found that 1) ~60 s of CaMKII activation is sufficient for inducing transient and sustained spine enlargement, 2) CaMKII activation alone is sufficient for triggering structural plasticity. In addition, using 2-photon fluorescence lifetime imaging microscopy, we visualized the activity of potential CaMKII downstream molecules (Cdc42 and RhoA) to understand the spatiotemporal dynamics of these molecules during structural plasticity induced by caged-glutamate stimulation. We found that Cdc42 and RhoA were rapidly activated in the stimulated spine, and were then followed by a phase of persistent activation lasting more than 30 min. Furthermore, the inhibition of the RhoA pathway preferentially inhibited the initial spine growth, whereas the inhibition of the Cdc42 pathway blocked the maintenance of sustained structural plasticity. Thus, RhoA and Cdc42 relay transient CaMKII activation to synapse-specific, long-term signaling required for spine structural plasticity.

光シート顕微鏡の改良と発生学・細胞生物学への応用

Light-sheet microscopy: technical development and applications for developmental and cell biology

○野中茂紀

¹ 基礎生物学研究所○Shigenori Nonaka¹¹ National Institute for Basic Biology

光シート顕微鏡とは、側方から薄いシート状に整形した励起光を照射することで光学切片を得る顕微鏡の方法論である。この目的に広く使われている共焦点顕微鏡にくらべ光シート顕微鏡は圧倒的な褪色・光毒性の少なさと高速性が大きな長所であり、発生現象や細胞運動を3次元的に可視化する上で非常に強力なツールである。一方、試料マウントに特別な工夫を必要とする、光シートが試料内部で崩れることで画質を劣化させるなど、独特の問題点も抱えている。

私達は自身の生物学的興味であるマウス胚発生の可視化にこれを応用する一方、大学共同利用機関である所属機関のミッションとして様々な共同利用研究を行う中で、顕微鏡自体をより使えるものに改良する試みも行ってきた。オオアメーバ (*Amoeba proteus*) の立体像を超高速で捉える顕微鏡、2光子化によって深部観察能を向上させつつ従来は不可能だった広い視野を両立させ大きな生物個体にも適用できるようにした顕微鏡、等を紹介する。

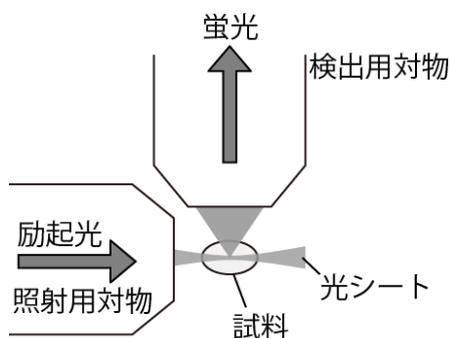
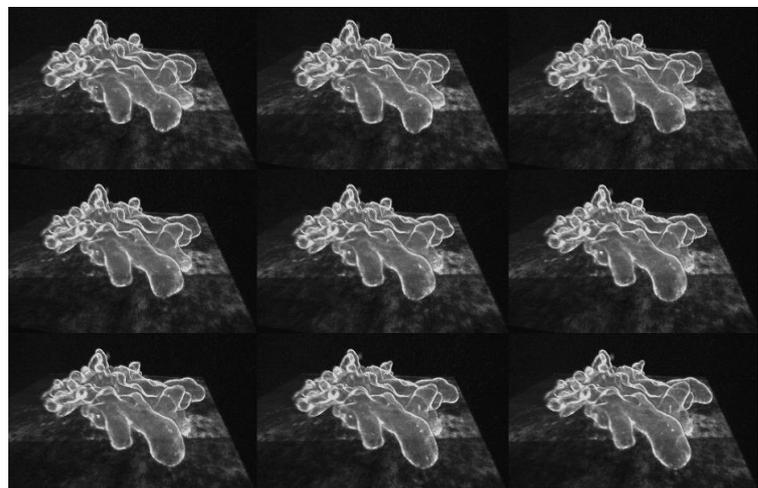


図1. 光シート顕微鏡の基本原理

図2. 0.5秒ごとに立体撮影したオオアメーバの運動
(手前の仮足の膨張に注目)

S2-4

< 蛍光ライブイメージングと牽引力顕微鏡による神経軸索ガイダンス機構の解析 > < Analysis of Axon Guidance Mechanism by Fluorescent Live-cell Imaging and Traction Force Microscopy >

○稲垣直之

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科

○Naoyuki Inagaki

Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology

Neurons extend axons to the right destinations, and form complicated networks in the brain. Axonal outgrowth can be navigated by extracellular chemical cues such as soluble chemicals (chemotaxis) and substrate-bound chemicals (haptotaxis); they are called axon guidance molecules. Actin filaments (F-actins) polymerize at the leading edge of axon (growth cone) and depolymerize proximally; this, with myosin II activity, induces retrograde flow of F-actins. It has been proposed that the forces underlying axon outgrowth and guidance may be regulated by the modulation of coupling efficiency between F-actin flow and the extracellular substrate via linker “clutch” molecules. However, how cell signaling controls the coupling efficiency remains unknown.

We recently identified a protein shootin1, and are analyzing the molecular mechanisms for axon outgrowth and guidance, using fluorescent live-cell imaging, traction force microscopy and molecular loss-of-function manipulation. We show that shootin1 functions as a clutch molecule that couples F-actin retrograde flow and the substrate at axonal growth cones to promote axon outgrowth. A soluble axon guidance molecule netrin-1 positively regulates forces at axonal growth cones via Pak1-mediated shootin1 phosphorylation. This phosphorylation enhanced the interaction between shootin1 and F-actin retrograde flow and the interaction between shootin1 and a cell adhesion molecule L1-CAM, thereby promoting F-actin-substrate coupling, force generation, and axon outgrowth. These results suggest that shootin1 is located at a critical interface, transducing a signal of netrin-1 into the forces for axon guidance. We also report that shootin1 is involved in the axon guidance mediated by a substrate-bound axon guidance molecule laminin

金ナノプローブで生体分子の速いダイナミクスを観る
Watching fast dynamics of biomolecules with gold nanoprobes

○飯野亮太^{1,2}

¹自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター・分子科学研究所

²総合研究大学院大学物理科学研究科 機能分子科学専攻

○Ryota Iino^{1,2}

¹ Okazaki Institute for Integrative Bioscience and Institute for Molecular Science
National Institutes of Natural Sciences, ² Department of Functional Molecular Science, School of
Physical Sciences, The Graduate University for Advanced Studies (SOKENDAI)

我々は、金ナノ粒子や金ナノロッドを可視化プローブとして用いた高速散乱イメージングで[1, 2]、生体分子モーターの運動素過程や構成サブユニットの構造変化のダイナミクスを1分子計測している。サイズが数10 nmの金ナノ粒子や金ナノロッドの散乱像は非常に高いシグナルが得られるため、観察の時間分解能をマイクロ秒まで上げることが可能である。さらに得られるシグナルが安定でシグナル/ノイズ比も高いため、金ナノ粒子の観察では1 nmの位置決定精度、金ナノロッドの観察では1°の角度（配向）決定精度を達成可能である。さらに金ナノロッドのフォーカス像を用いると、位置と配向を同時に高精度に決定することも可能である。これらの金ナノプローブはサイズが数nm~10 nm程度の分子モーターよりも大きいのが、結合させる場所をきちんと選べば、機能発現に伴う本来の動きを阻害することなくモニターすることができる。

本発表では、回転分子モーターであるV-ATPase [3, 4, 5]、リニア分子モーターであるキネシン[5]およびキチナーゼの1分子計測で明らかとなった運動素過程、および一方向性の運動を達成する作動メカニズムについて紹介する。

[1] Ueno H, et al., *Biophys. J.* 2010. 98: 2014-2023.

[2] Enoki S, et al., *Anal. Chem.* 2015 87: 2079-2086.

[3] Minagawa Y, et al., *J. Biol. Chem.* 2013 288: 32700-32707.

[4] Ueno H, et al., *J. Biol. Chem.* 2014 289: 31212-31223.

[5] Iino R, et al., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2015. 31: 49-56

[6] Isojima H, et al., *Nat. Chem. Biol.* 2016 12: 290-297.

クライオ電子顕微鏡によるタンパク質の単粒子構造解析
Single particle analysis of proteins by cryo-electron microscopy

村田和義

自然科学研究機構生理学研究所

Kazuyoshi Murata

National Institute for physiological Sciences

近年、クライオ電子顕微鏡によるタンパク質の単粒子構造解析は、さまざまな技術革新により大きな進歩を遂げている。本手法は、タンパク質の画像を電子顕微鏡で撮影して画像解析することにより、その分子構造を明らかにする。本講演では、最先端のこれらの手法を解説するとともに、特に我々のグループが独自に進めている電子直接検出カメラを組み合わせた Zernike 位相差クライオ電子顕微鏡法について紹介する。

ここ数年クライオ電子顕微鏡単粒子解析の分解能が飛躍的に向上した理由には大きく分けて2つの要因がある。一つは、二次元検出器（いわゆるカメラ）の性能向上であり、もう一つは、解析手法における技術革新である。近年、電子顕微鏡用カメラとして使われるようになった電子直接検出カメラ（電顕用 CMOS カメラ）は、電子を半導体素子上で直接カウントするため、連続して高速に画像を記録することができる。このことにより、ボケの少ない画像の取得が可能で、像のブレも後で修正することができる。画像解析手法としては、ベイズ統計を用いた最尤推定法（maximum-likelihood algorithm）を用いることにより、精度の高い画像の分類と平均化が行えるようになり、タンパク質のわずかな構造変化も分類して解析できるようになった。

さらに、我々のグループでは、電子顕微鏡画像の撮影に Zernike 位相板を用いることにより、界面活性剤を含んでバックグラインドの高い試料からでも粒子像を抽出できるようにし、その電顕像を電子直接検出カメラに数ミリ秒ごとのフレームとして記録し、画像として有効なフレームのみを選択することによって、分解能の高い Zernike 位相差像を作成して構造解析できるようにした。また、このような位相板を用いた単粒子解析は、これまで不可能であった比較的低分子量のタンパク質 (<400kDa) の構造解析も可能にすることが報告されている (Khoshouei *et al.*, *Nat. Commun.* 2015)。

クライオ電子顕微鏡単粒子構造解析では、従来の手法に加えて試料ごとに種々の工夫を施すことによって、解析可能なタンパク質の種類も日に日に増えている。まだまだ開発途上の技術ではあるが、着実に一般的な解析手法としての技術的な向上がなされており、さらなる発展のためには、今後、関連分野との連携を強めていくとともに、多くの研究者のこの分野への参入を期待したい。

高速 AFM による生体試料の動態イメージング

Imaging of Dynamic Behaviors of Biological Samples by High-Speed AFM

○内橋貴之^{1,2}、古寺哲幸²、柴田幹大^{1,2}、安藤敏夫²¹ 金沢大学理工研究域数物科学系、² 金沢大学理工研究域バイオ AFM 先端研究センター○Takayuki Uchihashi^{1,2}, Noriyuki Kodera², Mikihiro Shibata^{1,2}, Toshio Ando²¹ Sch. Math. & Phys., Kanazawa Univ., ² Bio-AFM FRC, Kanazawa Univ.

タンパク質が機能する仕組みを理解するには、どのような形態・構造の変化が個々のタンパク質分子に起こっているかを知ることは極めて重要であり、様々な技術（電子顕微鏡、NMR、蛍光エネルギー移動、蛍光偏光など）を駆使してその姿を捉えようとする研究が行われている。しかし、時間とともに変化するタンパク質の姿、すなわち動態を直接捉えることは困難であり、得られる情報は限られたものとなる。例えば X 線結晶構造解析や電子顕微鏡法は、タンパク質の構造・形態の精緻な情報を与えるが、それがどのように時間発展するかを直接的に示すことは困難である。他方、光学的な手法は個々のタンパク質分子の時間的変化を追跡することができるが、タンパク質に付与されたラベルの動きとして間接的にしか捉えることができない。

原子間力顕微鏡(AFM)は液中環境下でナノスケールでの構造を直接可視化できる数少ないツールの一つである。これまでに、タンパク質、有機分子膜、高分子などの様々なソフト材料の表面構造解析に適用され、ナノサイエンスの強力なツールであることが示されてきた。しかしながら、通常の AFM では 1 画像を得るのに分オーダーの時間が必要であり、動的過程はもちろん基板に強く吸着した試料しか観察できなかった。

我々のグループでは、様々な要素技術開発を経て 2001 年に初めてタンパク質の動態を 80ms/frame のイメージングレートで観察することに成功した。その後も現在に至るまで様々な技術開発を継続し、現在ではタンパク質の機能や構造を乱すことなく、タンパク質の機能動態をイメージングできるようになってきている。本講演では、これまでに成功したいくつかのタンパク質観察例をとりあげ、高速 AFM によるイメージングで何がどこまで観察できるのかを紹介し、イメージング技術が一分子のダイナミックな振る舞いを理解するのにいかに有効かを議論する。さらに、生きた細胞の動態観察、蛍光一分子顕微鏡との同視野・同時観察など、高速 AFM の機能拡張に向けた取り組みについても紹介したい。

X線レーザーで生きた細胞を観る

Observing Live Cells Using X-ray Lasers

○西野吉則¹、木村隆志¹、鈴木明大¹、城地保昌²、大島泰郎³、別所義隆⁴

¹北海道大学電子科学研究所、²高輝度光科学研究センター、

³共和化工（株）環境微生物学研究所、⁴台湾中央研究院生物化学研究所

○Yoshinori Nishino¹, Takashi Kimura¹, Akihiro Suzuki¹, Yasumasa Joti²,

Tairo Oshima³, Yoshitaka Bessho⁴

¹ Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University,

² Japan Synchrotron Radiation Research Institute (JASRI)/SPRING-8,

³ Institute of Environmental Microbiology, Kyowa-kako Co. Ltd.,

⁴ Academia Sinica, Institute of Biological Chemistry

X線回折に基づく結晶構造解析は、現代の科学技術において無くてはならないツールである。位相の揃ったコヒーレントX線を用いると、コヒーレント回折イメージング（CDI）という手法により、X線回折データから結晶以外の試料のナノイメージングも可能となる。CDIは、位相を定量的にイメージングできるため、無染色の生物試料などX線にとって透明な試料も、高コントラストで観察できる。

さらに、フェムト秒オーダーのパルス幅をもつX線自由電子レーザー（XFEL）を用いると、放射線損傷が顕著になる前に、X線と試料との相互作用が完了する。この「破壊前の回折」のコンセプトにより、XFELは放射線損傷の問題を根源的に解決する道を開いた。我々は、「破壊前の回折」のコンセプトをさらに推し進め、溶液中の自然な状態にある生物試料等を、XFELを用いてCDIにより放射線損傷なくナノイメージングするパルス状コヒーレントX線溶液散乱（PCXSS）と名付けた手法を独自に考案した [1,2]。日本のXFEL施設SACLAを用いて、PCXSSにより、世界初の生きた細胞のX線ナノイメージング [2] や、溶液中でのみ構造を保ち機能を発揮する物質材料のナノイメージング [3,4] を行った。我々はまた、PCXSSによる、XFELの産業利用の推進にも取り組んでいる [5]。

[1] J. Pérez and Y. Nishino, “Advances in X-ray scattering: from solution SAXS to achievements with coherent beams”, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 22, 670 (2012).

[2] T. Kimura *et al.*, “Imaging live cell in micro-liquid enclosure by X-ray laser diffraction”, *Nature Commun.* 5, 3052 (2014).

[3] R. Iida *et al.*, “Synthesis of Janus-Like Gold Nanoparticles with Hydrophilic/Hydrophobic Faces by Surface Ligand Exchange and Their Self-Assemblies in Water”, *Langmuir* 31, 4054 (2015).

[4] J. Wei *et al.*, “Yolk/Shell Assembly of Gold Nanoparticles by Size Segregation in Solution”, *J. Am. Chem. Soc.* 138, 3274 (2016).

[5] R. Yoshida *et al.*, “Extending the potential of x-ray free-electron lasers to industrial applications – an initiatory attempt at coherent diffractive imaging on car-related nanomaterials”, *J. Phys. B* 48, 244008 (2015).

金属錯体型蛍光プローブの細胞イメージング応用

Applications of Metal-Ion Containing Fluorescent Probes for Cell Bioimaging

王子田 彰夫

九州大学薬学研究院

Akio Ojida

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University,

金属-配位子間の相互作用、いわゆる配位結合は水中で強く働くことのできる分子間相互作用であるため、生体分子と結合する蛍光プローブをデザインする上で有用である。また、遷移金属イオンは、配位子交換、重原子効果、酸化還元特性など他の元素にはない特性を持つため、これらを蛍光プローブの蛍光 OFF-ON や波長変化などのセンシング機構に応用することも可能である。これまでに我々は、これらの金属イオンの持つ特性をうまく利用した蛍光プローブをデザインして様々な生理活性小分子やタンパク質の細胞イメージングへと応用してきた。本講演では、それらの研究について紹介を行う。

(1) 新しいセンシングメカニズムを利用した生理活性小分子の蛍光イメージング

PET, ICT などこれまでに確立されたセンシングメカニズムとは異なる新しいメカニズムを取り入れて蛍光プローブをデザインすれば、高精度な蛍光センシングや、これまでに検出できていない生体分子のイメージングが期待できる。この考えに基づいて、近年、我々は、金属イオンと蛍光団がファンデルワールス半径内で接触することで蛍光波長がレッドシフトする AM コンタクト機構(arene-metal ion contact)を利用した蛍光プローブの開発を進めている。これまでに、この機構を応用した蛍光プローブや、**そのカドミウム錯体**を用いることで、細胞内のカドミウムイオンや硫化水素(H₂S)のレシオセンシングに成功している(ChemEuroJ 2014, ChemBioChem2015)。一方で、金属イオンの持つ強い蛍光消光能を利用することで、蛍光プローブから金属イオンが脱離することに伴う蛍光 OFF-ON センシングが可能となる。このタイプのセンシング機構は古くより知られているが、細胞イメージングに実際に応用できた例は少ない。最近、我々は、この金属イオン脱離の蛍光センシング機構を応用した蛍光プローブ **3** をデザインし、刺激に伴って肥満細胞から遊離するヒスタミンのリアルタイムの蛍光センシングに成功した(AnalChem2016)。

(1) 金属錯体とペプチドタグの相互作用を利用したタンパク質イメージング

金属イオン錯体とタンパク質との相互作用を利用することで特定のタンパク質の細胞系での蛍光イメージングが可能となる。これまでに我々は、多核の亜鉛錯体型蛍光プローブとアスパラギン酸リッチな特殊なペプチドタグ配列との強い相互作用を利用したタンパク質の特異的ラベル化法(リアクティブタグ法)の開発を進めてきた(JACS2010, InorgChem 2014)。本講演では、このリアクティブタグ法を利用したタンパク質の共有結合ラベル化による細胞表面 GPCR タンパク質の蛍光イメージングや金ナノ粒子でのラベル化を応用した電子顕微鏡イメージングへの応用について紹介する。

生物分子モーターの一分子蛍光イメージング
Single-molecule fluorescence imaging of molecular motors

○角田 誠

東京大学大学院薬学系研究科

○Makoto Tsunoda

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo

細胞の生存や成長には、細胞内で合成された種々の膜小器官やタンパク質などが適切な場所へ運ばなければならない。キネシンは、この細胞内物質輸送を能動的に行う生物分子モーターで、頭部と呼ばれる N 末端領域にヌクレオチド結合部位と微小管結合部位を有し、ATP を加水分解して得たエネルギーを利用して微小管上を連続的に移動する。キネシンは、1985 年に神経軸索における輸送を担うタンパク質として、*in vitro* 滑り運動アッセイ系によるイメージング技術を用いて精製・同定された。その後、キネシンの運動を直接観察することが可能なイメージング技術、特に、1 分子蛍光イメージング法、の発展により、キネシンの詳細な働きが明らかにされてきた。

本講演では、我々が 1 分子蛍光イメージング法を用いて行っている以下の 2 つの研究について紹介する。

1. 微小管の脱チロシン化がキネシンの運動特性に与える影響の解明

微小管を構成するチューブリンにはいくつかの翻訳後修飾が知られており、微小管の安定性や生物分子モーターの運動などを制御している。本研究では、翻訳後修飾の一つである微小管の脱チロシン化が、キネシンの速度などの運動特性に影響を与えているか否かについて検討した。

2. キネシンの運動メカニズムの解明

キネシンの運動モデルとして **hand-over-hand** モデルが提唱されている。これは 2 つの頭部が協同的に ATP の加水分解を繰り返し、他方のヌクレオチド状態と対応しながら前進する運動モデルである。しかしながら、このキネシンの協同的な運動メカニズムは直接明らかにされていない。そこで、キネシンの運動と ATP の結合状態の 1 分子レベルでの同時観測を行うことで、キネシンの運動メカニズムの解明を試みた。

蛍光イメージングによる生体内の細胞・分子の挙動の評価

Visualization of dynamics of cells and molecules *in vivo* by fluorescence imaging

○樋口ゆり子

京都大学大学院薬学研究科

○Yuriko Higuchi

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

医薬品の治療効果を最大限に引き出すためには、薬物を治療の標的部位へ送達し、必要な時間、必要な量を作用させる Drug Delivery System が有効な方法となる。医薬品に使用される分子は、低分子化合物から核酸まで多種多様であり、それぞれの分子の特性に合わせた DDS が開発されている。近年は、細胞を投与・移植して治療を行う細胞治療に期待が寄せられているが、この治療法においても、投与・移植された細胞がどこで、いつ、どの様な機能を発揮するかが、治療効果を決定する重要な要素であると考えられる。細胞を治療に用いる場合は、低分子化合物やタンパク質を医薬品として用いる場合と異なり、タンパク質の発現、細胞の分化などの細胞の挙動を評価することが必要となる。

これまで、麻酔下で臓器や組織に対物レンズを押しつけたり、貼りつけたりすることにより、生きたマウスの組織内を観察することが可能であったが、耳、脳、固形腫瘍などの呼吸や消化に起因する臓器運動の影響を受けない一部の組織に限られていた。そこで、我々は、生きたマウスの体内の一細胞を蛍光顕微鏡で撮影するための組織吸引固定デバイス（第 5930364 号）を開発した。本デバイスは、微弱な吸引力でマウスの組織を固定できるため、マウスの腹部に小さな開口部を作成するだけで、ほぼ全ての臓器を低侵襲に固定して観察することが可能である。さらに、吸引による固定・解除により組織の観察部位を自由に何度でも変更できる点も本デバイスのメリットである。蛍光標識したリポソームや間葉系幹細胞をマウスの尾静脈から投与した後、このデバイスを用いて、肝臓や腸などの血管内を移動する細胞を撮影し、移動速度の算出を行った。また、マウスの肝臓にカルシウムセンサーを発現させ、FRET によりカルシウムオシレーションを観察することもできた。

一方、我々は、細胞を特定の場所へ集積させることを目的に、リガンドを結合させた PEG 脂質を用いて、細胞膜表面へリガンドを導入する方法の開発も行っている。その一例として、炎症部位の血管内皮細胞に高発現する ICAM1 に結合するペプチドリガンドを細胞膜表面に導入することにより、標的となる細胞との接着を向上させることができた。近年は、より特異的にまたは強固に結合させるためには、タンパク質を利用する方が多彩な設計が可能になると考え、非天然アミノ酸であるアジドフェニルアラニン (AzF) を挿入することにより、タンパク質の構造や機能に影響を与えない箇所を選択して PEG-DSPE と結合させたタンパク質-PEG 脂質を合成し、細胞の表面にタンパク質を導入することにも成功した。

本講演では、生きたマウスにおける分子や細胞の *in vivo* リアルタイムイメージングに関する我々の最近の知見を紹介するとともに、薬学分野への応用の一例として生体内における細胞挙動の制御を目指した研究についても少し触れる予定である。

in vivo イメージングによるナノ DDS 製剤の評価
Evaluation of Nano-DDS by *in vivo* Imaging

○浅井知浩、奥 直人

静岡県立大学薬学部

○Tomohiro Asai, Naoto Oku

University of Shizuoka School of Pharmaceutical Sciences

我々は、がんや脳梗塞などアンメットメディカルニーズの高い疾患に対する治療法の開発を目指し、ナノ DDS 製剤の研究に取り組んできた。その中で、疾患モデルの評価、薬物動態の解析、病態の診断、および治療効果の判定などにイメージング技術を活用してきた。本講では、ナノ DDS 製剤の評価におけるイメージング技術の応用に焦点をあて、最近の我々の研究成果を紹介する。

以前に我々は、脳梗塞モデルラットを用いた検討において、脳虚血時には一過性かつ局所的に血管透過性が亢進し、粒子径約 100 nm の蛍光標識ナノ粒子が虚血部位に集積することを *in vivo* imaging system を用いた解析で明らかにした。そこで、脳梗塞治療に向けたナノ化脳保護薬の創製を目指し、脳保護作用を有する FK506 を封入したリポソーム製剤 (FK-Lip) を開発した。脳梗塞モデルラットにおいて FK-Lip の脳保護効果を評価したところ、FK506 をリポソーム化することで、脳細胞死の抑制効果や運動機能低下の改善効果が有意に向上することが示された。この FK-Lip の脳保護効果を positron emission tomography (PET) で評価することを試みた。mitochondrial complex I に特異的な結合性を示すプローブ 2-tert-butyl-4-chloro-5-{6-[2-(2-¹⁸F-fluoroethoxy)-ethoxy]-pyridin-3-ylmethoxy}-2H-pyridazin-3-one ([¹⁸F] BCPP-EF) を用いた PET 測定によって FK-Lip の薬効を評価したところ、FK-Lip の脳保護効果を可視化できることが明らかになった。 [¹⁸F] BCPP-EF を用いた PET 解析法は、脳保護薬の開発に有用であることが示唆された。

我々は small interfering RNA (siRNA) の実用化を目指したナノ DDS 製剤の開発においてもイメージング技術を活用してきた。siRNA を高効率に細胞に導入するための脂質ナノ粒子を開発し、siRNA の細胞内動態や生体内動態をイメージングによって解析してきた。最近では我々が開発した dioleoylphosphate-diethylenetriamine 誘導体を主成分とする脂質ナノ粒子の有用性を検討するため、蛍光標識 siRNA の細胞内動態を共焦点レーザー顕微鏡観察によって解析した。タイムラプス撮影によってトランスフェクション過程を可視化したところ、siRNA ががん細胞の細胞質全体に分布する様子を捉えることに成功した。固定した細胞で観察される静止画像とはまた異なる情報が得られ、タイムラプス撮影が siRNA 製剤の有効性評価に有用であることが示唆された。また我々は、siRNA の体内動態を PET 解析することを目的とし、¹⁸F で標識した siRNA を合成した。¹⁸F 標識 siRNA を脂質ナノ粒子化し、マウスにおいて siRNA の *in vivo* イメージングを行った。その結果、遊離の siRNA が速やかに分解・排泄される一方で、ナノ粒子化 siRNA が安定的に体内を循環する様子を捉えることに成功した。PET はマイクロドーズ試験に応用されているモダリティであり、我々が構築した ¹⁸F 標識 siRNA を用いた評価系は臨床においても有用な可能性がある。

近年は、ナノ DDS 製剤の実用化研究が盛んになってきており、その有効性評価においてイメージング技術は有用なツールになりうると思われる。

■ 一般演題（ポスター） ■

蛍光プローブと DNA を用いた HDAC 活性検出法の開発 Development of HDAC detection method using fluorescent probe and DNA

○立松結花¹、蓑島維文^{1,2}、菊地和也^{1,2}

¹大阪大学大学院工学研究科、²阪大免疫学フロンティア研究センター

○Yuka Tatematsu¹, Masafumi Minoshima^{1,2}, Kazuya Kikuchi^{1,2}

¹ Graduate School of Engineering, ² Immunology Frontier Research Center, Osaka University

ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) はヒストンを化学修飾する酵素の一つであり、クロマチン構造や転写の活性を制御する働きをもつ。HDAC はエピジェネティックな遺伝子制御因子としてだけでなく、生理現象やがん・精神疾患などに関与していることから、薬剤の標的としても注目されている。HDAC の活性検出法はいくつか報告されているが、いずれも二段階以上の操作を必要とするため、リアルタイムでの検出が困難であり、簡便で迅速な HDAC 活性検出法が求められている。

そこでわれわれは、蛍光プローブと DNA を用いて HDAC 活性を一段階の操作で検出できる、新規 HDAC 活性検出法を開発した。本検出法では、リジンの脱アセチル化による電荷状態の変化によって、DNA-ヒストン間の相互作用が増大することに着目した。蛍光プローブは HDAC 基質と DNA に結合することで蛍光を発する DNA 結合色素から構成されている。HDAC 反応後のプローブが DNA と強く結合する設計となっており、DNA 結合色素由来の蛍光強度が上昇すると考えた。(図 1) また、この検出法における蛍光の OFF/ON 比の向上をねらい、基質ペプチド配列のアセチルリジン残基を複数個導入したプローブも設計した。

蛍光プローブの DNA 融解温度測定により、プローブと DNA の結合能を評価した。また、酵素反応後の蛍光強度の経時変化を測定することで、HDAC 酵素反応をリアルタイムで評価した。アセチルリジン残基が複数導入されたプローブは、1つ導入されたプローブと比較して、酵素反応後の蛍光の OFF/ON 比が大幅に向上した。加えて、本プローブを用いることで、迅速に HDAC 阻害剤を評価できることを示した。

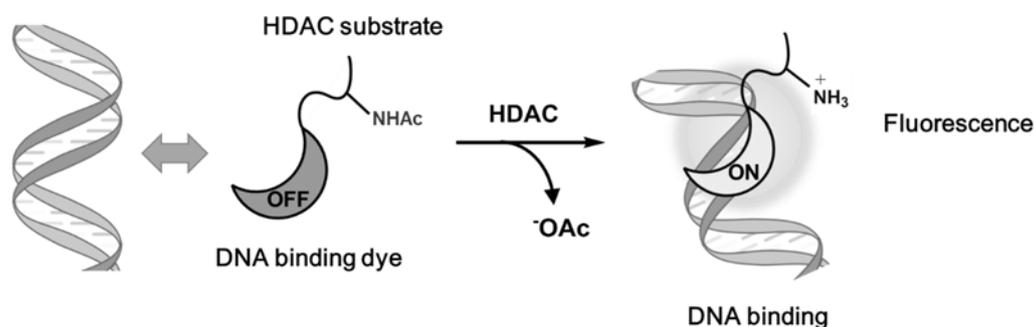


図 1. 本手法における HDAC 検出原理

1) Minoshima, M.; Matsumoto, T.; Kikuchi, K. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 7925.

PYP タグラベル化技術を応用したメチル化 DNA の発蛍光イメージング
Fluorogenic imaging of DNA methylation utilizing PYP-tag labeling system

○西田会友子¹、堀雄一郎^{1,2}、菊地和也^{1,2}

¹大阪大学大学院工学研究科、²大阪大学免疫学フロンティア研究センター

○Ayuko Nishida¹, Yuichiro Hori^{1,2}, Kazuya Kikuchi^{1,2}

¹ Graduate School of Engineering, Osaka University, ² IFRc, Osaka University

エピジェネティクスは、DNA の塩基配列によらずに遺伝子発現を制御する機構を指す。DNA のメチル化は、この制御機構において重要な役割を果たしている。DNA のメチル化は、DNA の核酸塩基の一つであるシトシンの5位の炭素が DNA methyl transferase (DNMT)の働きによりメチル化を受けるという現象である。このメチル化模様は塩基配列にコードされない遺伝情報として、細胞分裂後も維持・継承され、細胞の生理機能維持のために外部環境の変化に応じて変化することが知られている。また、DNA メチル化修飾の異常は、細胞のガン化や精神疾患といった疾病の原因となるため、近年新たな創薬ターゲットとして注目を集めている。そのため、このメカニズムの解明は生命科学分野のみならず、医学・創薬の分野でも極めて重要とされており、生細胞におけるメチル化 DNA の検出、可視化技術の開発は非常に有用なものである。これまでに報告されている生細胞での DNA メチル化検出技術としては、蛍光タンパク質を用いた手法がある。この手法では、メチル化 DNA に結合するタンパク質である MBD と蛍光タンパク質からなる融合タンパク質のメチル化 DNA への局在を可視化することが可能であるが、メチル化 DNA に結合していない遊離のタンパク質からも蛍光が観察されるという問題点があった。本研究では、この問題点を克服するためにタグタンパク質と蛍光プローブによるタンパク質蛍光標識法を応用することで、メチル化 DNA を特異的に可視化することのできる技術の開発に取り組んだ。

演者らのグループは Photoactive Yellow Protein (PYP) を新規タグタンパク質として蛍光プローブを設計し、標的タンパク質を蛍光ラベル化する手法を開発してきた。PYP は紅色硫黄細菌由来の125アミノ酸からなる小さなタンパク質であり、その69番目のCysが桂皮酸やクマリンのチオエステル誘導体と特異的に共有結合することが知られている。本研究では、この技術を応用することで小分子と蛋白質からなるハイブリッドプローブの開発を行い、ハイブリッドプローブがメチル化 DNA に結合し蛍光強度を上昇させることを示した。さらに、生細胞で遊離のハイブリッドプローブの蛍光を抑制し、DNA メチル化部位のみを蛍光イメージングすることに成功した。また、DNA メチル化阻害剤である 5-azadC の濃度変化とハイブリッドプローブの蛍光強度変化の相関関係について調べたので、その詳細について報告する。

伸長する神経突起でのミトコンドリア輸送・膜電位・ATP 同時イメージング Simultaneous imaging of mitochondrial membrane potential, ATP and transport in extending neurites

○鈴木 李夏¹、堀田 耕司¹、岡 浩太郎¹

¹慶應義塾大学大学院 理工学研究科 生命システム情報専修

○Rika Suzuki¹, Kohji Hotta¹, Kotaro Oka¹

¹ Center for Biosciences and Informatics, Graduate School of Science and Technology, Keio Univ.

【背景】 ミトコンドリアは生物の主なエネルギー源である ATP を生産する細胞内小器官である。神経細胞においてミトコンドリアは突起内を双方向に輸送されており、これにより機能低下したミトコンドリアを細胞体へ回収し、新しく健康なミトコンドリアを神経突起へ供給していると考えられている。さらに細胞局所へと係留されたミトコンドリアは ATP 産生を介した神経形態変化などへの関与が示唆されている。しかしながらミトコンドリア輸送・活性（ミトコンドリア内膜電位）・ATP 産生と神経突起動態の関連が生理的条件下で直接示されたことはなかった。

本研究では、生理的条件下の神経突起において、ミトコンドリアの輸送・膜電位・ATP と神経突起伸長の同時観察を行い、これらの関係性を評価した。

【方法】 ラット胎児より単離した後根神経節神経細胞にミトコンドリア ATP センサー mitAT1.03 を導入し播種した。6~24 時間後、ミトコンドリア膜電位感受性色素 TMRE で染色し、経時観察した。その後画像処理を行い、ミトコンドリア輸送・膜電位・ATP レベルと突起伸長を定量した。

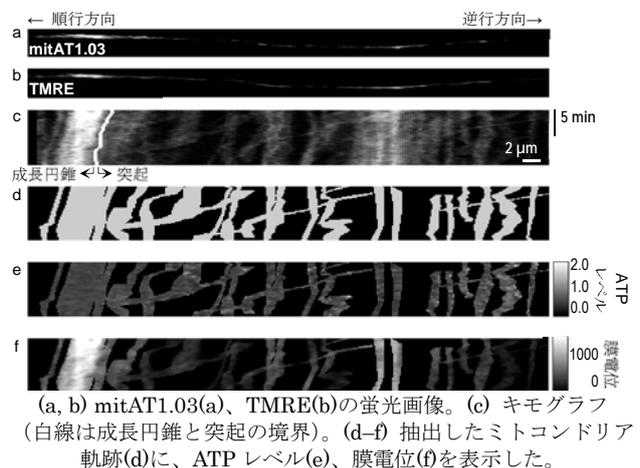
【結果】 突起内での活発なミトコンドリア輸送や、神経突起の伸展が見られた。

各々のミトコンドリアにおいて膜電位と ATP レベルには正の相関があった。また ATP レベルは順行性のミトコンドリアで高く、膜電位は逆行性のミトコンドリアで低かった。

突起先端の成長円錐に着目すると、成長円錐内ミトコンドリアの膜電位は突起内のものより高かった。ミトコンドリア ATP レベルは成長円錐内の方が低かったが、ミトコンドリア密度は成長円錐の方が高かったため、総 ATP 産生量では成長円錐内が突起内を上回った。

さらに、脱共役剤 FCCP によりミトコンドリア膜電位は低下したが ATP レベルは有意には低下せず、この時突起の退縮は $1.2 \pm 0.4 \mu\text{m}$ だった。一方、ATP 合成酵素阻害剤 Oligomycin で処理すると、ミトコンドリアの膜電位・ATP レベルは共に低下し、突起は $4.1 \pm 1.5 \mu\text{m}$ 退縮した。

以上より、高活性なミトコンドリアは突起先端へと輸送され、そこでの ATP 産生は突起伸長と関連することがわかった。



High Density Localization Microscopy Using Exemplar Based Method

○Ka Pik Lee, Takashi Shibata, Atsushi Sato

Data Science Research Laboratories, NEC Corporation

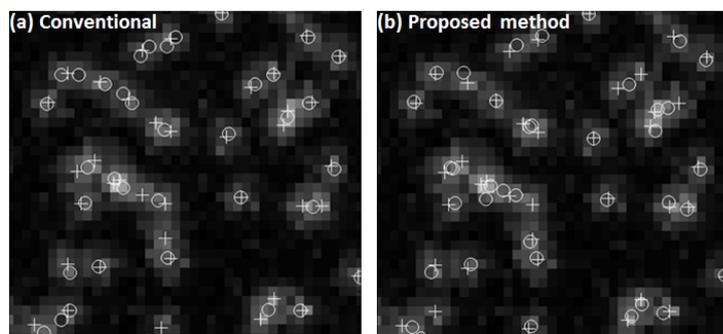


Figure 1 Crosses indicate ground truth positions, while circles indicate estimated positions.

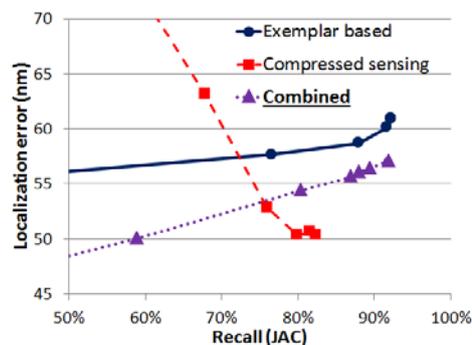


Figure 2 Compressed sensing method alone compared with the combined method.

In localization microscopy, to achieve a spatial resolution of 50 – 70 nm with a small number of images, one can increase the density of activated fluorescent protein particles in each frame. For high density localization microscopy, conventional methods are limited in localization accuracy at ~60 nm and recall at less than 64%. To improve the recall without decreasing the localization accuracy, a novel method which combines an exemplar based method and a compressed sensing method (Faster STORM) [1] is proposed.

Method

Exemplar based method has an advantage of returning high recall for overlapping particles, while the compressed sensing method gives high localization accuracy for non-overlapping particles. The two methods are combined to achieve high localization accuracy and high recall. The proposed method first divides the observed image into particle clusters by considering adjacent pixels with intensity higher than threshold as a cluster. By matching each cluster with cluster images stored in the dictionary of the exemplar based method, the number of particles in each cluster is determined. If the cluster is determined to contain multiple particles, the positions are determined by template matching with the dictionary images in the exemplar based method, if the cluster is determined to contain one particle, the particle position is determined by the compressed sensing method.

Fig. 1 shows the positions estimated by (a) conventional method (compressed sensing) alone and (b) the proposed method. The localization error of the proposed method is stable between 50 – 57 nm with significantly higher recall (> 90%) than the conventional method alone, as shown in Fig. 2. Further studies e.g. increasing the exemplar dictionary size will be carried out to improve the localization accuracy.

Acknowledgements

The authors thank Yasushi Okada, Koichi Takahashi and Masaki Watabe of RIKEN Quantitative Biology Center for generously providing the simulation images of microscopic fluorescent particles.

[1] L. Zhu, W. Zhang, D. Elnatan & B. Huang, *Faster STORM Using Compressed Sensing*. Nat. Methods 9.7, 72-723 (2012).

金ナノプローブを用いたキチン加水分解酵素の 1 nm ステップ運動解析

1 nm step analysis of chitinase with gold nano particle

○中村彰彦^{1,2}、飯野亮太^{1,2,3}¹ 岡崎統合バイオサイエンスセンター、² 総合研究大学院大学、³ 分子科学研究所○Akihiko Nakamura^{1,2}, Ryota Iino^{1,2,3}¹ Okazaki Institute for Integrative Bioscience, ² The Graduate University for Advanced Studies (SOKENDAI), ³ Institute for Molecular Science

キチンやセルロースはそれぞれ N-アセチルグルコサミンとグルコースが β -1,4 結合で直鎖状に繋がった多糖類である。これらの多糖はカニやエビ、昆虫などの外骨格や植物の細胞壁の主成分であり、地球上に多量に存在している。即ち燃料や化学物質の素とする再生可能な生物由来資源として非常に有望である。しかし結晶構造をとることにより物理的・化学的に非常に安定であり、分解と変換が難しいという問題も有る。一方でバクテリアやキノコ等が生産する加水分解酵素は、結晶性多糖上を一方向に運動しながら連続的に分解反応を行うプロセッシブ反応により結晶性多糖を効率的に分解できる。特に霊菌 *Serratia marcescens* 由来キチン加水分解酵素 *SmChiA* については、高速 AFM を用いた観測によりリニア分子モーターである事が確認されている。しかし主要生成物であるキトビオースの長さは約 1 nm である事から、詳細な運動特性の解析には非常に高い位置決定精度での観察が必要である。そこで金ナノコロイドをプローブとした全反射暗視野顕微鏡での一分子観察により *SmChiA* のステップサイズの決定を行った。

まず金コロイドのキチンに対する非特異吸着を押さえる為に、表面を PEG ポリマーで修飾した。その後 PEG 末端のビオチンを更にストレプトアビジンで修飾し金ナノプローブとした。*SmChiA* はキチンへの吸着面の反対側で、 α ヘリックス上に存在し溶媒に露出している 2 つのアミノ酸残基をシステイン残基に変えた変異体を作成した。変異体のシステイン残基にマレイミド基を介してビオチンを付加し、ストレプトアビジン修飾した金コロイドと混合する事で標識した。スライドガラス上に結晶性キチンをスピンコートし、全反射暗視野顕微鏡を用いて運動の観察を行った。ステップの検出はキネシンの解析に使われているアルゴリズムを用いた。また *SmChiA* の生成物は MALDI-TOF Mass を用いて確認した。

調製したプローブと変異体の組み合わせで金コロイドの揺らぎを 1 nm 以下に押さえる事ができ、ステップを検出する事ができた。統計解析の結果 *SmChiA* は 1.1 nm のフォワードステップと 1.2 nm のバックステップをしている事が分かった。その比は 18:1 であり 2 状態間のエネルギー差は $2.9 k_B T$ と見積もられた。この結果から *SmChiA* は一方向に進む様に平衡状態が片寄っている事が分かった。またマイナーピークとして 2.3 nm のフォワードステップも観測された。そこで結晶性キチンからの生成物を確認した所、アセチル基が一つ脱離したキトテトラオースに相当する物質が検出された。*SmChiA* は N-アセチルグルコサミンの 1 位側の結合しか切端する事ができない。即ちキトビオース単位を一つ飛ばしている運動に相当すると考えられた。停止時間の分布は単純な指数関数的減衰で回帰する事ができ、時定数は 28.6 msec と見積もられた。このことから、停止中の化学反応素過程 (脱結晶化、結合開裂、生成物解離) のいずれか一つが律速だと推定された。

FRET センサーを用いた Rab11 のリサイクリング経路制御機構の検討
**The analysis of Rab11 which mainly controls endocytic recycling pathway
by FRET biosensor**

○照井翔¹、石田彪馬¹、鯉沼真吾¹、和田直之²、福田光則³、中村岳史¹

¹東京理科大学生命医科学研究所、²東京理科大学理工学部、³東北大学大学院生命科学研究科

○Sho Terui¹, Hyoma Ishida¹, Shingo Koinuma¹, Naoyuki Wada², Mitsunori Fukuda³, Takeshi Nakamura¹

¹RIBS, Tokyo Univ. of Sci., ² Faculty of Sci. and Tech., Tokyo Univ. of Sci.,

³Grad. Sch. Life Sci., Tohoku Univ.

多様な細胞内輸送のうち、リサイクリング経路は、エンドサイトーシスされた膜タンパク質や新規に合成されたタンパク質の細胞膜への輸送を行う。神経細胞の突起伸展には、このリサイクリング経路による膜の付加が必要である。G タンパク質である Rab11 はリサイクリング経路の制御において中心的な役割を担う。また神経突起伸展時においても Rab11 が多様なエフェクターを介して小胞輸送や膜付加に働くと考えられているが、その詳細は明らかになっていない。本研究では、Rab11 の時空間的な活性変化を可視化する FRET センサーを作製し、神経突起伸展での Rab11 の働きを知る手がかりを得ようと試みた。多数のセンサー候補を検討した結果、最も高い性能を示した Raichu-A658 センサーを選択して、そのセンサーを神経細胞株に発現させて FRET イメージングを行った。現時点では、神経突起内を移動する小胞の Rab11 活性が、止まっている小胞に比べて低い傾向にある可能性が出てきている。

Rab11 の活性と機能の関係を別の角度から検討するため、我々は発色団補助光不活性化法 (Chromophore-assisted light inactivation ; CALI) により、任意の場所で小胞上の Rab11 を不活性化し、その小胞の移動度に変化が出るかどうかを検討した。SuperNova は、KillerRed を改良することで作られた ROS 産生能をもつ単量体型の光増感性の蛍光タンパク質である。SuperNova と Rab11 を結合させた分子を神経細胞株に発現させ、CALI による Rab11 の不活性化の前後で、小胞移動の違いが出るかどうかを検証した。

また、我々は Rab11 の不活性化因子 GAP である Evi5 を利用し、Evi5 の GAP ドメインをリサイクリング小胞に特異的に発現させて小胞上の Rab11 を不活性化させることを試みた。この手法により Rab11 の活性状態と小胞移動度の相関を調べた結果について報告する。

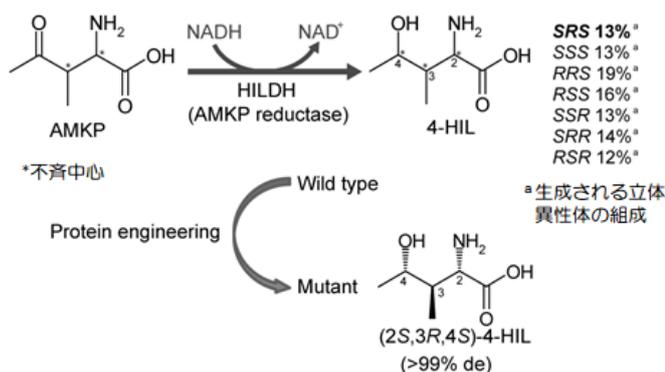
構造情報に基づく 4-HIL 合成酵素の立体選択性の制御

Structure-guided optimization of stereoselectivity of 4-HIL synthase

石玄¹、○宮川拓也¹、中村颯¹、侯峰¹、日比慎²、小川順²、田之倉優¹¹ 東京大学大学院農学生命科学研究科、² 京都大学大学院農学研究科Xuan Shi¹, ○Takuya Miyakawa¹, Akira Nakamura¹, Feng Hou¹, Makoto Hibi², Jun Ogawa²,
Masaru Tanokura¹¹ Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, ² Graduate School of
Agriculture, Kyoto University

4-hydroxyisoleucin (4-HIL) は天然アミノ酸の一種であり、分子内に3つの不斉中心をもつことから8種類の立体異性体をとる。香辛料として利用されているフェヌグreekの種子から4-HILの2種類の異性体が単離され、その一方の2*S*,3*R*,4*S*体はヒトやラットにおいて膵臓を刺激してインスリン分泌活性を示すことが見出されている。また、(2*S*,3*R*,4*S*)-4-HILは骨格筋や肝臓におけるインスリン抵抗性を改善する効果も認められ、その機構としてAMPキナーゼの活性化を介した経路が報告されている。経口糖尿病治療薬として期待される(2*S*,3*R*,4*S*)-4-HILはフェヌグreek種子にわずか0.5 wt%しか含まれておらず、産業利用のために多様な合成法がこれまで検討されてきた。しかしながら、最も効率的な合成法でも立体選択性の厳密な制御は達成されておらず、最終的に他の立体異性体とのキラル分割が必要となる。最近、2-bromo-3-butanoneとdiethyl acetamidomalonateの縮合反応で容易に合成される2-amino-3-methyl-4-keto pentanoic acid (AMKP)のラセミ体を還元し、(2*S*,3*R*,4*S*)-4-HILを生成する酵素として*Bacillus thuringiensis* 2e2由来AMKP還元酵素HILDHが同定された。本酵素はNADHを補酵素とする還元反応により2*S*,3*R*,4*S*体を生成するが、その純度は13% deであり、他に6種類の立体異性体が同時に生成する。

本研究では、(2*S*,3*R*,4*S*)-4-HILの効率合成を目的として、HILDHの構造情報に基づいた酵素改変により、AMKPラセミ体から(2*S*,3*R*,4*S*)-4-HILを高純度で生成する人工酵素の創出を試みた。HILDHと補酵素NADH、さらに基質アナログとしてコハク酸との複合体を結晶化し、X線結晶構造解析により2.35 Å分解能で結晶構造を決定した。コハク酸の結合様式と(2*S*,3*R*,4*S*)-4-HILのドッキングシミュレーションにより、4*R*体と4*S*体の立体選択性が1位のカルボキシル基を認識するアミノ酸残基の違いに起因することを推定した。さらに、(2*S*,3*R*,4*S*)-4-HILが触媒部位に結合した際に、3位のアミノ基の配向を固定するための変異導入位置を推定した。これらの構造情報に基づいて各種の変異導入を行い、最終的に2か所のアミノ酸残基の変異により、AMKPラセミ体から(2*S*,3*R*,4*S*)-4-HILを純度>99% deで生成するHILDH改変体を創出することに成功した。これは、3つの不斉炭素を厳密に制御してカルボニル還元反応を触媒する酵素を人工合成した初めての例である。



細胞体におけるミトコンドリアダイナミクスの画像解析 Image Analysis of Mitochondrial Dynamics in Cell Body

○太田善浩、杉本雄生、チェヒョンジン

東京農工大学・大学院工学研究院・生命機能科学部門

○Yoshihiro Ohta, Yuki Sugimoto, Hyunjin Choi

Division of Biotechnology and Life Sciences, Tokyo University of Agriculture and Technology

【目的・背景】 ミトコンドリアのダイナミクスは、細胞の機能にとって重要であると考えられている。しかし、細胞体ではダイナミクスを定量的に評価する手法が存在しないため、細胞体でのミトコンドリアダイナミクスが細胞機能に及ぼす影響を、正確に検出することはできなかった。そこで本研究では、細胞体におけるミトコンドリア移動を定量化する手法の開発を目的とした。現在、ミトコンドリア移動が盛んに研究されている突起部位ではミトコンドリアの重なりが少なく、移動方向も限られているという特徴があり、ミトコンドリア移動の解析法も確立されている。しかし、ミトコンドリアの重なりが多く、多方向への移動が見られる細胞体では、上述の解析法によるミトコンドリア移動の測定ができず、研究が進んでいなかった。

【方法】 MitoTracker Red で染色した細胞内ミトコンドリアを蛍光顕微鏡で3秒おきに撮影し、取得した連続画像間で算出した輝度の差に着目し、ミトコンドリア移動を評価した。次に、温度やATP合成阻害剤、ホスファターゼ阻害剤がミトコンドリア移動に及ぼす影響を調べた。さらに、同様の手法で核とエンドソームの動きを計測し、ホスファターゼが及ぼす影響について調べた。核はHoechst 33342で染色を行い、エンドソームは蛍光標識したBSAを細胞に取り込ませ、蛍光顕微鏡で観察した。

【結果】 37°Cと25°Cにおけるミトコンドリア移動を比較すると、37°Cの方がミトコンドリアは高い移動度を示した。ATP合成阻害剤であるNaFとKCNを同時に作用させるとミトコンドリア移動量は著しく低下した。また、Ser/Thrホスファターゼ阻害剤であるオカダ酸を作用させるとミトコンドリア移動量が増加するのに対し、酸性・アルカリホスファターゼやTyrホスファターゼ阻害剤であるNa₃VO₄を作用させるとミトコンドリア移動量は減少した。さらに、核の移動量はオカダ酸を作用させたときだけ増加が見られたのに対し、エンドソームはNa₃VO₄を作用させると細胞末端に蓄積し、移動が大きく抑制された。

【考察】 本研究の結果から、本研究で開発した評価法により、ミトコンドリア移動に対する温度の影響、ATP合成阻害剤の影響、ホスファターゼ阻害剤の影響を示すことができた。また、ホスファターゼ阻害剤による核やエンドソームの移動への影響も評価することもできた。

高濃度アクチン繊維が引き起こす集団運動は表面形状で変化する
 The collective movement of actin filaments is affected by surface factors.

○瀬戸口裕二、埤森大空、星田政行、市瀬悠、本多元
 長岡技術科学大学 大学院 生物機能工学専攻

○Yuuji Setoguchi, Hiroataka Taomori, Masayuki Hoshida, Yu Ichinose, Hajime Honda

Department of Bioengineering, Nagaoka University of Technology

ガラス表面のミオシンによって動かされるアクチン繊維は、濃度の高いとき集団的運動を起こす。これはガラス表面のミオシン分子によって誘引される流体力学的効果によるとされている。

我々は、この集団運動の結果、アクチン繊維が一定の幅を持ったベルト状の領域に限定されるようになることを見つけた。ベルト状の領域は数ミリにわたって網目状に広がり、ATP を消費するまでそのパターンを維持した。集団運動によって形成されるこのパターンは、何によって決定されているのか。ガラス表面、顕微鏡観察用チャンバーの形状に着目した。

繊維の 3.3 秒間の移動方向を $\pm 90^\circ$ の範囲で 5° 毎に測定し、ピークに含まれる繊維数の過剰率で集団運動の方向の偏りを定量した。この結果、集団運動の方向の偏りはアクチンの濃度変化に対して協同的に変化した。これはパターン形成がアクチン繊維間の協同現象であることを示している。

アクチン濃度が 0.3 mg/mL のとき、チャンバーの流路を 3.5 mm 以下にすると、ベルト状パターンは一本に限定され、その中で双方向に運動する繊維が観察された。また、カッターでガラス表面に直線の傷をつけたところ、アクチン繊維は傷に沿って運動を起こした(図 1)。これは、HMM が付着しているガラスの凹凸によって集団運動が変化することを示している。さらに、溝幅 3.5 μm 、深さ約 1.0 μm の周期的な凹凸を作成したところ、凹凸に沿ったパターンの形成が観察できた。

本研究により、高濃度のアクチン繊維は、引き起こされた集団運動により、境界面の形状に影響を受けた固有の幅を持ったベルト状のパターンを形成することがわかった。さらに、このパターンは溶液に一定以上の空間的な広がりがないと形成されない可能性がある。

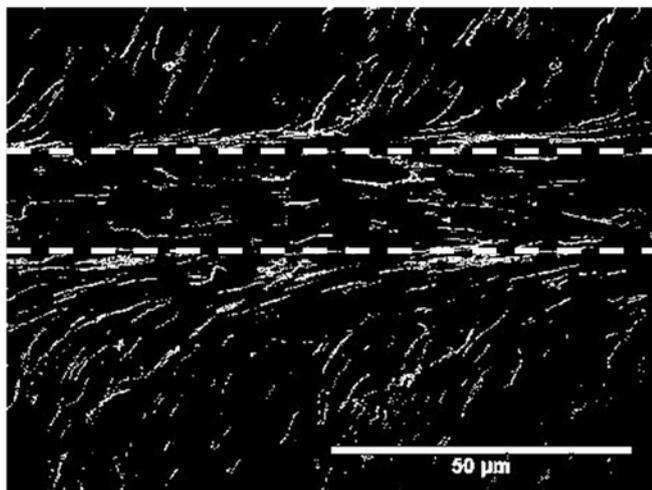


Fig1. カッター溝による集団運動の変化。

NIKON ECLIPSE TE2000-U、Hitachi Kokusai Electric KP-E500、NIKON Plan Apo VC 60x/1.40 oil、THE IMAGING SOURCE DFG/SV1、IC Capture、30fps AVI 形式で 3.3 秒間撮影、多重露光処理。

単離脳標本系における匂い嫌悪条件付けによるナメクジの
嗅覚系神経活動の匂い応答変化

Changes in odor responses of olfactory neural activities of the land slug
induced by in vitro odor-aversion conditioning

○石田康平¹、橋口小春²、小松崎良将³、斎藤稔¹

¹ 日本大学大学院・総合基礎科学研究科、² 日本大学大学院・理工学研究科、
³ 日本大学・理工学部

○Kohei Ishida¹, Koharu Hashiguchi², Yoshimasa Komatsuzaki³, Minoru Saito¹

¹Graduate School of Integrated Basic Sciences, Nihon University,

²Graduate School of Sciences and Technology, Nihon University,

³College of Sciences and Technology, Nihon University

ナメクジ (*Limax valentianus*) の前脳葉 (procerebrum: PC) は匂い情報処理と学習の中枢である。PC では約 0.7 Hz の局所場電位 (local field potential: LFP) 振動が見られ、先端部から基部の領域に向けて神経活動が伝搬している。これまでの研究では、忌避性の匂い物質によって LFP 振動の周波数と神経活動の伝搬速度が増加した。一方、誘因性の匂い物質に対してはあまり変化が見られなかった。本研究では、匂い嫌悪条件付けによって PC の神経活動の匂い応答がどのように変化するかを調べた。PC の LFP は細胞外電位記録法で測定し、時空間神経活動は膜電位イメージング法で測定した。大・小触覚を繋げたまま PC を単離し、膜電位感受性色素 (Di-4-ANEPPS) で染色した。LED 光源 (530 nm; LEX2-G, Brain Vision) を用いて染色された標本に励起光を照射し、705 nm の蛍光画像を sCMOS カメラ (Zyla, Andor) を通して取得した (図 1)。匂い嫌悪条件付けには、ナメクジにとって元々誘因性であるニンジンの匂いを条件刺激 (conditioned stimulus: CS) として使用した。匂い刺激は大触覚の片方に空気と共に与えた。無条件刺激 (unconditioned stimulus: UCS) として、味覚受容器の神経線維をガラス電極内に引き込み、電気刺激 (3 V, 1 ms) を行った。このような CS と UCS を同時に標本に与えた。条件付けの 1 時間後、CS によって LFP 振動の周波数と神経活動の伝搬速度が増加した (図 2)。この神経活動の変化は、ナメクジにとって元々忌避性である匂い物質に対するものと類似している。一方で、条件付けされていない他の誘因性の匂い (キュウリ) に対しては神経活動に大きな変化は見られなかった。

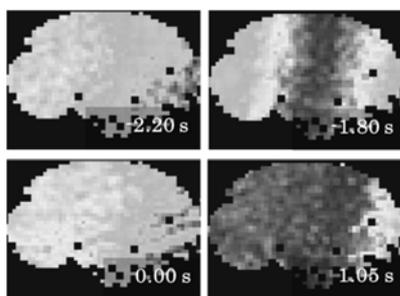


図 1 ナメクジ前脳葉の神経活動の擬似カラー。
0.00 秒で忌避性の匂い刺激を行った。

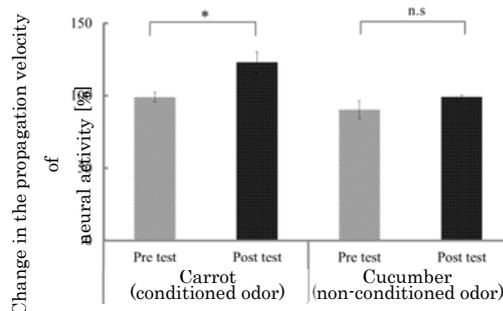


図 2 前脳葉における神経活動の伝搬速度変化率

バクテリア由来セルラーゼ *Cellulomonas fimi* Cel6B とカビ由来セルラーゼ
Trichoderma reesei Cel6A の構造と動態の相関解析

**Correlation analysis of structure and reaction dynamics of bacterial cellulase
Cellulomonas fimi Cel6B and fungal cellulase *Trichoderma reesei* Cel6A**

○石渡大貴¹、中村彰彦^{1,2}、田崎智之³、Akasit Visootsat⁴、Maximilien Morice⁵、飯野亮太^{1,2,6}

¹総合研究大学院大学物理科学研究科、²岡崎統合バイオサイエンスセンター、

³東京大工学系研究科、⁴カセサート大学理学部、⁵パリステック、⁶分子科学研究所

○Daiki Ishiwata¹, Akihiko Nakamura^{1,2}, Tomoyuki Tasaki³, Akasit Visootsat⁴, Maximilien Morice⁵,
Ryota Iino^{1,2,6}

¹Sch. of Phys. Sci., SOKENDAI, ²Okazaki Institute for Integrative Bioscience, ³Sch. of Engi., The Univ. of Tokyo, ⁴Fac. of Sci., Kasetsart Univ., ⁵Chimie ParisTech, ⁶Institute for Molecular Science

エキソ型セルラーゼは結晶性セルロース上を一方向に進みながら連続的に加水分解するリニア分子モーターである。セルラーゼは化学的・物理的に安定なセルロースを温和な条件で分解することができるため産業面での有用性は高い。しかし運動の素過程や律速課程の詳細は明らかになっていない。加水分解を伴う並進運動は高速原子間力顕微鏡(AFM)で1分子観察されているが、高速 AFM では並進運動が観察できないセルラーゼが存在する。これは高速 AFM の探針によりセルラーゼが外力を受けることが原因と考えられている。一方、全反射蛍光顕微鏡(TIRFM)は外力を与えずに1分子観察できるという利点がある。本研究では TIRFM を用いた1分子計測により、構造の異なる2種類のセルラーゼ、バクテリア *Cellulomonas fimi* 由来 CfCel6B とカビ *Trichoderma reesei* 由来 TrCel6A の動態を観察し、運動パラメータ(結合速度定数 k_{on} 、並進運動速度定数 k_{tr} 、解離速度定数 k_{off})の解析を行った。

光学顕微鏡の空間分解能は250 nm程度であり、タンパク質同士が近くに存在すると識別ができなくなってしまうため、観察は分子同士が十分に離れている低濃度の条件で行った(図 1a)。高濃度の酵素によってセルロース繊維を確認することができ(図 1b)、これら2つの画像を重ね合わせることでセルロースへ特異的に結合した分子のみを解析することができる(図 1c)。解析した k_{on} を比較すると TrCel6A は CfCel6B の1.8倍であった。さらに k_{off} の解析より TrCel6A は CfCel6B に比べてセルロースへの結合時間が短いことが分かった。これらの結果より TrCel6A は CfCel6B に比べて、セルロースへ結合しやすいが結合時間は短いと言える。また k_{tr} も TrCel6A と CfCel6B では異なり、それぞれ 8.8 nm/sec, 11.6 nm/sec であった。さらに分解の連続性を表すプロセスビティはそれぞれ 67.7、50.4 であった。セルラーゼの構造における極性アミノ酸残基やループ構造の有無がこれらのパラメータに影響を与えていると考えられる。

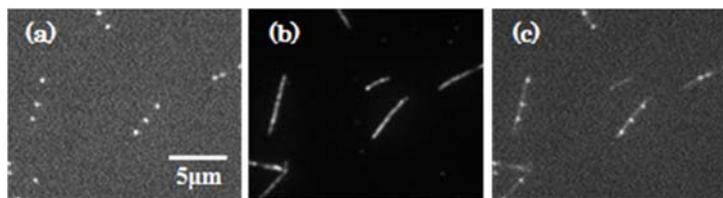


図 1. CfCel6B の一分子観察。酵素濃度はそれぞれ、(a)50 pM, (b)10 nM, (c) a と b の重ね合わせ

すべり運動するアクチン繊維の集団運動により形成されるバンドパターン
Band pattern formation of sliding actin filaments driven by HMM on glass surface

○埴森大空, 瀬戸口裕二, 星田政行, 市瀬悠, 本多元
 長岡技術科学大学大学院 工学研究科 生物機能工学専攻

○Hiroataka Taomori, Yuuji Setoguchi, Masayuki Hoshida, Yu Ichinose, Hajime Honda
 Department of Bioengineering, Nagaoka University of Technology

ガラス表面に固定されたミオシン頭部(HMM)によって駆動されるアクチン繊維は、その濃度が高いとき集団運動を起こす。これはHMMによる流体力学的効果であるとされている[1]。

蛍光標識したアクチン 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と、未標識のアクチン 0.5 mg/mL ~1 mg/mL を 2 mM Mg-ATP と共にかん流し、アクチン繊維の HMM への結合と運動を同時に観察した。はじめはランダムな方向に運動していたアクチン繊維は、しだいに双方向に運動の向きがそろっていき(図 1b)。ところが集団運動が形成される前に、HMM 上を運動するアクチン繊維密度が上昇することがわかった。

アクチン濃度が 0.9 mg/mL では、アクチン繊維は 100 μm \times 80 μm の視野内で運動方向が一様にそろっていき、さらに 10~50 μm 程度の帯のようなパターンを形成された(図 1c)。またアクチン濃度 2.0 mg/mL では、アクチン繊維は視野内で帯状パターンは形成されず、一様に運動方向がそろった状態になった。一方 0.5 mg/mL アクチン溶液に 0.5%メチルセルロースを加えると繊維の向きはそろったが帯状パターンは形成されなかった。

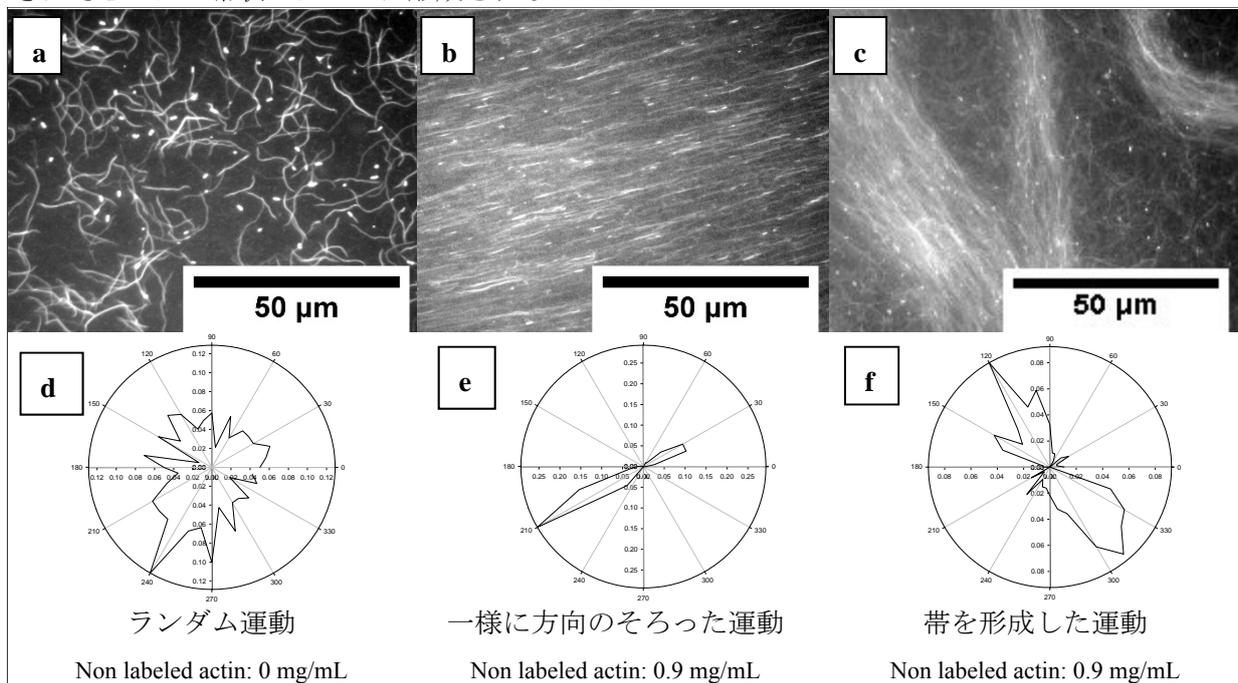


図 1. アクチン繊維のすべり運動とその角度

蛍光標識したアクチン 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 5 秒間のオーバーレイ画像によるアクチン繊維のすべり運動の軌跡(a~c)と 1 秒間のトラッキングによる運動角度をヒストグラムで示した(e~f)。

[1] T. Butt, et. al., J. Biol. Chem. 285(2010) 4964-4974

炎症の誘導にともなう免疫炎症細胞集積のイメージング

Color-coded cellular imaging of lymphocyte accumulation in a mouse asthma model

○長谷川明洋¹、荻野英賢¹、中山俊憲²

¹山口大学大学院医学系研究科、²千葉大学大学院医学研究院

○Akihiro Hasegawa¹, Hidetaka Ogino¹, Toshinori Nakayama²

¹ Yamaguchi University Graduate School of Medicine, ² Graduate School of Medicine, Chiba University

アレルギー性炎症疾患は、抗原感作により抗原特異的機能型ヘルパーT(Th)細胞が誘導され、再び抗原に暴露されることにより炎症反応が誘導される。アレルギー反応の誘導においては特に Th2 細胞が深く関与していることが知られているが、実際の炎症の場でどのような機序で炎症誘導における重要な役割を果たしているのかほとんどわかっていない。本研究では GFP または RFP トランスジェニックマウスの T 細胞や抗原特異的 Th 細胞を移入してリアルタイムで観察するシステムを構築し、アレルギー性喘息モデルを用いて抗原吸入後の肺への T 細胞浸潤の様式をイメージング解析した。そして抗原分子を吸入した後起こる機能的 T 細胞サブセットの浸潤様式の時間的定量的な解析を行った。また抗原吸入後の肺への抗原特異的 Th2 細胞の集積に関与する分子の検討を行った。

マウスでのアレルギー性喘息モデルとして、卵白アルブミン(OVA)を吸入させて気道炎症を誘導する系を用いた。OVA 免疫した GFP または RFP トランスジェニックマウスから CD4⁺T 細胞を個別に単離して同系統の野生型マウスに移入したり、*in vitro* で分化誘導して作製した抗原特異的 Th 細胞を同系統の野生型マウスに移入した後、OVA を吸入暴露してアレルギー性喘息を誘導した。喘息誘導後、肺に浸潤、集積する T 細胞の動態を蛍光顕微鏡を用いて観察した。

抗原特異的 Th 細胞は OVA 吸入後に肺への集積が観察され、OVA 吸入前や OVA を吸入させなかった場合に比べて 8~20 倍に増加した。肺への CD4⁺T 細胞の集積は、OVA 吸入 12 時間後から顕著となり、18~36 時間後に最大となった。またこの T 細胞集積はステロイドを投与することにより抑制された。さらに OVA 特異的な各 Th 細胞サブセットを移入して抗原吸入後の肺への集積を解析したところ、それぞれの Th 細胞サブセットによって異なる細胞集積様式を示した。特に OVA 吸入後に肺に集積してきた Th2 細胞は肺組織内で寄り集まって focus を形成し、その後に誘導される炎症巣の形成場所を制御していると考えられた。私たちはこれまでに CD69 ノックアウト(KO)マウスではアレルギー性喘息が抑制されることを見出してきたが、リアルタイムイメージングシステムを用いて CD69KO マウスの Th2 細胞の肺への集積を調べたところ、細胞数や focus 形成が抑制されることが明らかとなった。

イメージングの手法を用いて明らかになったこれらの結果は、抗原感作を受けた T 細胞がその後の抗原吸入にともなって実際に肺に浸潤・集積すること、その集積が他の炎症細胞の浸潤よりも早い段階で起こること、そして肺組織内で focus を形成することにより好酸球などの炎症細胞が浸潤して形成される炎症巣の場所を制御していることなどを示している。また、CD69KO マウスでみられたアレルギー性喘息抑制のメカニズムの少なくとも一部は肺への抗原特異的 Th2 細胞集積の抑制によるものであると考えられた。今後、この実験系を用いて他のノックアウトマウスやトランスジェニックマウスを解析することにより、アレルギー性喘息の発症におけるターゲット分子の役割や機能を解析できると考えられる。

マウス海馬スライスにおいてニューロステロイドが引き起こす神経活動変化の レーザー共焦点カルシウムイメージング

Laser confocal calcium imaging of neurosteroid-modulated neural activities in mouse hippocampal slices

○岩田尚樹¹、濱崎雄太²、斎藤稔^{1,2}

¹ 日本大学大学院総合基礎科学研究科、² 日本大学文理学部

○Naoki Iwata¹, Yuuta Hamasaki², Minoru Saito^{1,2}

¹ Graduate School of Integrated Basic Sciences, Nihon University,

² College of Humanities and Sciences, Nihon University

近年、ステロイドが脳内にも存在することが知られている。これらのニューロステロイドは海馬の神経活動に対して急性作用を示す。例えば、女性ホルモンのエストラジオール、ストレスホルモンであるコルチコステロンは NMDA 受容体を介する Ca^{2+} 流入を急性的に変化させ、それによって海馬における神経興奮性や LTP 誘導を変化させる。本研究では、マウス海馬スライスにおいてニューロステロイドが引き起こす神経活動変化を、レーザー共焦点カルシウムイメージングを用いて調べた。1 週齢のオスの ddY マウスから厚さ 350 μm の海馬スライスを作製し、カルシウム感受性蛍光色素 Cal-520 で染色した。Cal-520 は最近開発された色素で、大きな蛍光変化を示す。染色したスライスはエストラジオール溶液 (10 nM) あるいはコルチコステロン溶液 (10 μM) で 1 時間インキュベーションした。その後、倒立顕微鏡 (TE 300, Nikon) のステージ上にあるチャンパーにスライスを移動し、固体レーザー (488 nm; 85-BCD-050-100, Melles Griot) で励起光を照射した。そして、ニポウ共焦点ユニット (CSU-10, Yokogawa) を通し、520 nm の蛍光画像を CCD カメラ (iXon X3 897, Andor) で取得した。その際、測定開始 600 秒後から、スライスを 1 mM NMDA で刺激した。その結果、NMDA 刺激によって CA1 領域で多数の神経細胞にカルシウム信号が見られた (図 1)。このようなカルシウム信号は、エストラジオールでインキュベーションしたスライスではコントロールとあまり変化がなかったが、コルチコステロンでインキュベーションした場合はコントロールより多くの細胞で見られるようになった。さらに、個々のカルシウム信号に着目すると、コルチコステロンでインキュベーションしたスライスではカルシウム信号の持続時間が長くなった (図 2)。この結果は川戸らによって海馬の培養神経細胞で得られた結果 (J. Neurochem.83(2002)1441) と一致する。以上のようなニューロステロイドによるカルシウム信号の変化から、ニューロステロイドは LTP 誘導にも影響を及ぼすことが示唆される。

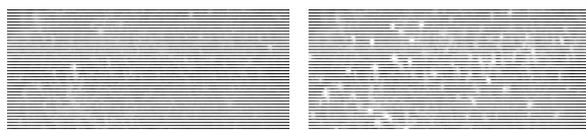


図 1 得られた蛍光画像の一例。左側が NMDA 刺激前、右側が NMDA 刺激。

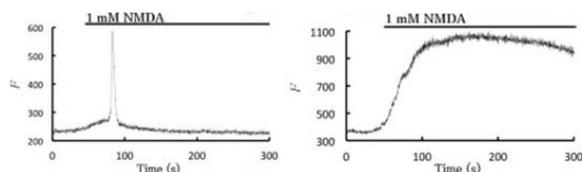


図 2 カルシウム信号 (蛍光強度変化) の一例。左がコントロール、右がコルチコステロンでインキュベーションしたスライス。

多点電位記録システムとレーザー共焦点カルシウムイメージングによる
マウス海馬スライスにおける神経活動の同時測定

Simultaneous measurement of neural activities in mouse hippocampal slices using multi-electrode array system and laser confocal calcium imaging

○幅菜摘¹、宇野祥規¹、濱崎雄太²、斎藤稔^{1,2}

¹ 日本大学大学院・総合基礎科学研究科、² 日本大学・文理学部

○Natsumi Haba¹, Yoshiki Uno¹, Yuuta Hamasaki², Minoru Saito^{1,2}

¹ Graduate School of Integrated Basic Sciences, Nihon University,

² College of Humanities and Sciences, Nihon University

脳機能は電氣的な神経活動、細胞内カルシウム信号、細胞間情報伝達などが複雑な相互作用して発現する。したがって、脳機能を明らかにするにはこれらを同時測定することが必要となる。本研究では、多点電位記録 (multi-electrode array; MEA) システムとレーザー共焦点カルシウムイメージングによってマウスの海馬スライスにおける神経活動の同時測定を試みた (図 1)。スライス (350 μm) は 1 週齢の雄の ddY マウスを用いて作製し、カルシウム感受性蛍光色素で染色した。染色したスライスは 64 個の電極 (50 \times 50 μm) が 150 μm 間隔で配置された MEA ガラスチップ (MED-P515A, Alpha MED Science) の上に置き、これを正立顕微鏡 (E600FN, Nikon) あるいは倒立顕微鏡 (TE300, Nikon) のステージ上においた。倒立顕微鏡を用いた場合には、蛍光はガラス基板を通して検出することになる。したがって、カルシウム感受性蛍光色素としては最近開発され、大きな蛍光変化を示す Cal-520 (AAT Bioquest) を使用した。励起光源には固体レーザー (488 nm; 85-BCD-050-100, Melles Griot) を用い、520 nm の蛍光画像をニポウ共焦点ユニット (CSU-10, Yokogawa) と CCD カメラ (iXon X3 897, Andor) を通して取得した。結果として、CA1、CA3、歯状回領域における電氣的な神経活動と CA1 領域における多数の神経細胞のカルシウム信号を同時測定することができた。また、MEA チップの電極を電気刺激のために用い、シャーフアー側枝に θ バースト刺激した際に生じる CA1 領域の細胞内カルシウム信号を測定することができた。

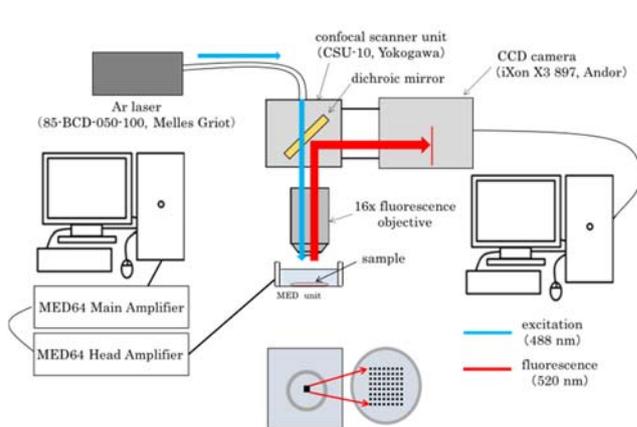


図 1 実験系の模式図

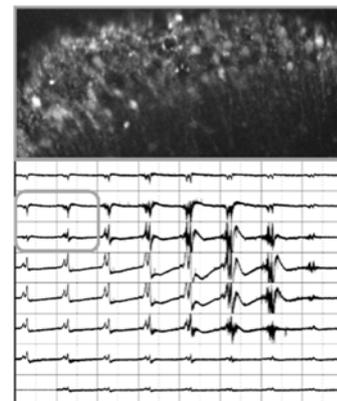


図 2 レーザー共焦点カルシウムイメージング (上) と多点電位記録システム (下) による神経活動の同時測定の例. 上図は下図の四角で囲った範囲のカルシウムイメージング.

統合失調症感受性遺伝子産物 G72 タンパク質の構造機能予測
Structure and function prediction of the G72 protein

○加藤有介¹、福井清¹

¹徳島大学先端酵素学研究所

○Yusuke Kato¹, Kiyoshi Fukui¹

¹ The Institute for Enzyme Research, Tokushima University

統合失調症には、陽性症状、陰性症状、認知機能障害が認められるが、陽性症状に対する治療薬が多種開発され、顕著な効果を示してきたことに対して、それ以外の症状に対する既存の治療薬の効果は、非常に限定的である。陰性症状や認知機能障害は、NMDA 型グルタミン酸受容体の機能不全が原因であることが強く示唆されているが、この受容体に直接あるいは間接的に作用する治療薬は、未だ開発されていない。

一方、統合失調症の連鎖領域のうち、特に染色体 13q32-33 における SCZD7 領域は非常に重要である。この領域には、G30 および G72 という 2 個の遺伝子が重複してコードされている。GWAS 解析により、統合失調症におけるこの遺伝子領域の多型の関連は、 $p < 0.00002$ という極めて小さな値を示した。G72 遺伝子は、霊長類に特有の遺伝子である。G72 トランスジェニックマウスによる解析では、G72 の導入により、精神疾患様の行動を示した。G72 タンパク質は、細胞内で D-アミノ酸酸化酵素と相互作用し、その活性を制御するとされている。また一方で、ミトコンドリアの断片化と樹状突起の分枝を制御する、とも報告されている。こうした働きにより、G72 は、間接的に NMDA 型受容体の働きに影響を与えていることが示唆されている。したがって、このタンパク質の詳細な機能と動作機構の解析が、病態生理、創薬の両面から非常に重要であるが、現在のところ、ほとんど分かっていない。その主な理由は、G72 タンパク質の立体構造が未解明なことによる。G72 のホモログは、霊長類以外では見つかっておらず、特に、153 残基長のバリエーションは、ヒト特有である。そのためホモロジーモデリングによる構造予測は難しい。

そこで私たちは、153 残基長のバリエーションを 2 個のドメインに分割し、新規の構造予測法であるハイブリッド *ab initio* 法を開発、適用した。G72 タンパク質の N 末端ドメインと C 末端ドメインは、それぞれ α ヘリックスを豊富に含む構造であることが予測された。さらに、ハイブリッド *ab initio* 法で予測されたタンパク質構造がどの程度正しい構造を示すのか、という検証を、いくつかの既知構造を用いて行った。その結果、3 Å 台の平均精度を示すことが明らかとなった。これは、1 アミノ酸残基のサイズ程度の精度である。予測された構造を初期構造とした分子動力学計算により、その物理化学的安定性が示唆された。そこで機能予測のために、構造データベースの検索を実行し、既知のタンパク質構造に類似した部分がないか検討した。その結果、N 末端ドメインは、膜タンパク質や核酸と結合するタンパク質の一部との構造類似性が示唆され、C 末端ドメインは、G タンパク質結合タンパク質や、RH bundle subdomain と類似することが明らかとなった。以上のことから、G72 タンパク質がミトコンドリアなどの膜上に局在し、D-アミノ酸酸化酵素やそのほかのタンパク質と相互作用するアダプタータンパク質として機能する可能性が示唆された。

マスト細胞分泌顆粒における炎症性メディエータ不均質性の研究
Heterogeneity within the Secretory Granule Population in Mast Cells

○稲本奨平¹、千田知美¹、平嶋尚英¹、鈴木 亮¹

¹名古屋市立大学薬学研究科

○Shohei Inamoto¹, Tomomi Senda¹, Naohide Hirashima¹, Ryo Suzuki¹

¹ Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University

【目的】マスト細胞は、アレルギー反応に中心的な役割を果たす細胞である。マスト細胞は、アレルギーによって活性化され、ヒスタミンを始めとした顆粒内炎症性メディエータを放出する。我々は、抗原親和性の違いが、サイトカイン (TNF α) やケモカイン (CCL2) など、放出するメディエータの種類や量を制御していることを明らかにした[Suzuki, R. et al., *Science*, (2014)]。そこで本研究では、個々の分泌顆粒における炎症性メディエータと分泌機能蛋白質の局在解析によって、炎症性メディエータ放出機構を追究した。

【方法】マスト細胞には、マウス骨髄細胞を IL-3 と SCF の存在下で培養し、骨髄細胞から分化したマウス骨髄由来マスト細胞 (BMDCs: Bone Marrow-derived Mast Cells) を用いた。また、細胞内への外来発現遺伝子の導入には、Amaxa Nucleofection を用いて行った。マスト細胞の単 1 顆粒レベルでの分泌顆粒解析には共焦点レーザー顕微鏡を用い、取得した画像は ImageJ、MIPAV を用いて解析した。

【結果と考察】はじめに、TNF α と CCL2 と各種蛍光蛋白質のキメラ遺伝子の作製を行い、個々の分泌顆粒に含まれる炎症性メディエータについて単一分泌顆粒レベルでイメージング解析を行った。その結果、TNF α と CCL2 は、細胞内で異なる分泌顆粒に独立して存在している様子が数多く観察された。さらに、TNF α を含む分泌顆粒は、CCL2 が含まれる分泌顆粒と比較して、顆粒サイズが有意に大きいことが明らかになった。さらに、TNF α や CCL2 に対する免疫染色を行った場合にも同様の結果が得られたことから、マスト細胞の分泌顆粒には個々の顆粒で選択的な炎症性メディエータが存在しており、細胞内の分泌顆粒には不均質性が存在していることが示唆された。これまでの研究から、マスト細胞の分泌反応は、エキソサイトーシス (開口放出) によって行われていることが既に分かっており、これらエキソサイトーシスには、分泌機能蛋白質 SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors) が関与していることが明らかになっている。そこで、TNF α や CCL2 が含有している個々の分泌顆粒において、それぞれ異なる分泌機能蛋白質が存在しているのではないかと考え、個々の分泌顆粒における SNARE 蛋白質の局在解析を行った。その結果、TNF α や CCL2 を含有する分泌顆粒には、SNARE 蛋白質である VAMP (Vesicle Associated Membrane Protein) の異なるアイソタイプが、それぞれ局在していることが分かった。このことから、マスト細胞では、炎症性メディエータが分泌顆粒に不均質に存在し、それぞれの分泌顆粒に局在する分泌機能蛋白質にも違いがあることが明らかになった。そして、マスト細胞の刺激応答に伴う分泌反応が、単 1 分泌顆粒レベルで制御されていることが示唆された。

3次元培養過程のタイムラプス画像におけるスフェロイドの形態解析

Morphological analysis with time-lapse images of spheroids in a 3D cell culture system○立野玲子^{1,2}、高橋大介¹、岡本教佳¹¹関東学院大学、²(公財)東京都医学総合研究所○Reiko Minamikawa-Tachino^{1,2}, Daisuke Takahashi¹, Noriyoshi Okamoto¹¹ Kanto Gakuin University, ² Tokyo Metropolitan Institute of Medical Sciences

がん、再生医療、毒性研究をはじめとする様々な基礎研究において、3次元培養で形成されるスフェロイドは、生体に近い細胞機能が解析できる *in vitro* 実験系として期待されている。現在、スフェロイドは共焦点顕微鏡による光学的3次元像として観察され、立体構造を分解させ分離した細胞で、その特性が解析されている。しかし、スフェロイドの空間構造を踏まえた個々の細胞特性の定量的解析には、未だ解決すべき多くの問題が残されている。

そこで、培養過程のタイムラプス記録画像の解析結果をもとにスフェロイド形成シミュレーションを構築し、計算空間内のスフェロイドを用いて現実のスフェロイドの細胞特性を推定評価するためのプラットフォームの構築をめざし、3次元仮想培養系を検討している。

これまででは、初期段階として、増殖だけでスフェロイドを形成する軟寒天培地の系を対象としてきたが、より生存能の高い細胞を用いてスフェロイドを形成する系への拡張を検討する。この系では従来の単層培養に比べ細胞と基板との接着が微弱なため、細胞はランダムかつダイナミックに遊走し、細胞同士が接触と接着を繰り返しながら増殖し、スフェロイドを形成する。また、この系は、対照実験と本実験での化合物濃度を変化させて作用させる条件比較が容易であり、抗がん剤候補物質などのスクリーニングに向いている。

今回は、予備的検討として、HT29細胞を用いた7日間の抗がん剤5-FU作用試験を2時間毎に記録したタイムラプス画像から抗がん作用を解析した。解析対象は、抗がん作用が判定できる程度までスフェロイドが形成された培養4日目直前から、抗がん剤の投与後4日間のタイムラプス画像とした。培養過程は1細胞から記録されているが、培養初期は、遊走・接着を伴う増殖によって細胞の動きが激しいため、今回の解析対象からは除外した。それぞれの画像からスフェロイド領域を抽出し、スフェロイドの個数、面積、さらに周囲長などを計測し、抗がん剤の作用によってスフェロイド表面から細胞が剥離する程度などの特徴量を算出した。今回の解析によって、対照実験・本実験の最終記録画像でのスフェロイド数に大差はないが、接着・融合による個数の減少過程が異なっていた。また、対照実験では増殖と接着・融合によってスフェロイドは肥大化した。本実験では肥大化は濃度依存的に抑制され、剥離する程度は濃度依存的に増加した。タイムラプス画像の観察によって捉えられる抗がん作用と同様の解析結果が得られた。

今後は、タイムラプス画像においてスフェロイドを追跡解析して、この系に特徴的なスフェロイドの接着・融合の頻度、スフェロイドの移動速度などを解析し、接着・融合への抗がん作用の影響についても調査する予定である。このような解析を通じて、仮想培養系構築の可能性を検討する計画である。

謝辞：画像を提供いただきましたORGANOGENIX株式会社に感謝申し上げます。

走査型電気化学顕微鏡を用いた心筋細胞の拍動解析

Analyses of Beating Cardiomyocytes by using Scanning Electrochemical Microscopy

○奥村翔¹、平野悠²、小松康雄²、牧与志幸¹¹コスモ・バイオ株式会社、²国立研究開発法人 産業技術総合研究所○Sho Okumura¹, Yu Hirano², Yasuo Komatsu², Yoshiyuki Maki¹¹ Cosmo Bio Co., Ltd., ² National Institute of Advanced Industrial Science and Technology(AIST)

医薬品候補の安全性評価には心筋細胞を用いた試験が義務付けられており、その評価は活動電位変化を測定するマイクロ電極アレイ (MEA) 法などが用いられている。しかしながら MEA 法による活動電位変化は実際の心筋細胞の拍動変化を表していない場合があり、「動き」という心筋細胞の最終的な活性表現を評価出来ない。また測定データは多数の心筋細胞の平均値であり、単一細胞の変化を捉えることは困難である。

走査型電気化学顕微鏡 (SECM) は対象物の形状や表面反応を非接触で測定可能である。我々はこれまでに、SECM を応用した心筋細胞の拍動・酸素消費測定技術[1]および標的細胞選択的に薬剤溶液を投与する技術[2]を報告している。今回我々はこれら技術を組み合わせたシステムが、心筋細胞の薬剤応答性を「動き」として評価することが可能かどうかを検証した (図 1)。

心筋細胞の拍動を亢進させることが知られている ATP を、ラット心筋細胞選択的にマイクロキャピラリーより投与した。ATP 投与中は拍動回数が増加したが、投与の中断によって元の拍動回数に復帰する様子が確認された。続いて心毒性 (QT 延長) を誘発することが知られている Astemizole についても同様に心筋細胞に添加し、拍動の弛緩時間の延長を確認した (図 2)。また、ヒト iPS 心筋細胞を用いて、アドレナリンβ受容体刺激剤である Isoproterenol を標的細胞選択的に投与したところ、拍動が亢進することを確認した。また興味深いことに、ヒト iPS 心筋細胞は平面培養環境下においてラット心筋細胞とは異なり、様々な軸方向の合わさった複雑な動きをしていることも明らかとなった。

以上より本技術は、標的の心筋細胞への選択的かつ定量的な薬剤投与と、それに続く標的細胞の経時的変化を測定可能な技術になりえることを明らかにした。

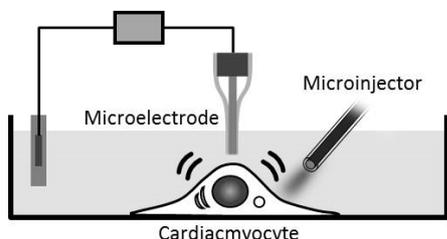


図 1 SECMによる心筋細胞の拍動測定

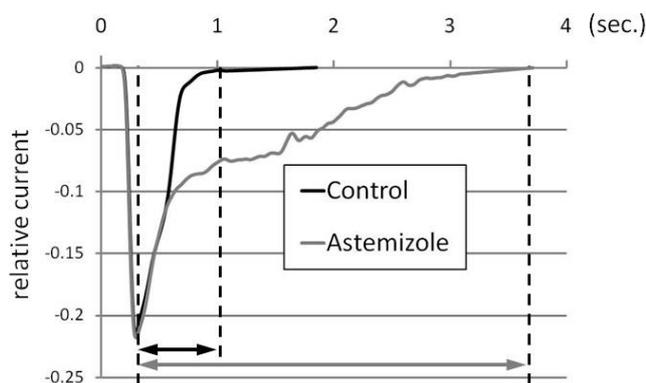


図 2 Astemizole 添加に伴う拍動変化

[1] Y. Hirano *et al.*, *Anal. Biochem.*, **447C**, 39-42 (2014)[2] Y. Hirano *et al.*, *Bioelectrochemistry*, **92C**, 1-5 (2013)

**Micro-CT イメージングによるマウス胎生致死表現型解析
- 軟組織高速・高解像度イメージング -**

Micro-CT imaging for embryonic lethal phenotyping of mice: high-resolution and high-throughput imaging of non-mineralization soft tissues.

○田村 勝¹

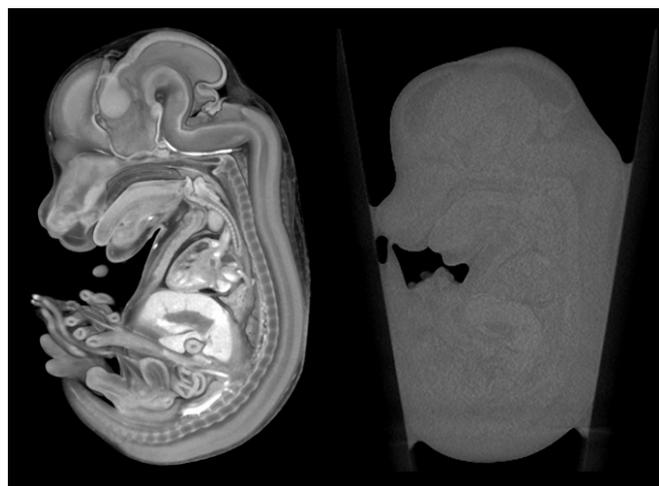
¹理化学研究所 バイオリソースセンター マウス表現型解析開発

○Masaru Tamura¹

¹Technology and Development Team for Mouse Phenotyping Analysis, RIKEN BioResource Center

マウスにおいては、国際共同研究プロジェクト、International Knockout Mouse Consortium (IKMC) によりマウスゲノム上の全タンパク質コード遺伝子に対する遺伝子欠損胚性幹 (ES) 細胞が作製された。その後、International Mouse Phenotyping Consortium (IMPC)において、当該 ES 細胞から遺伝子欠損 (KO) マウスが作製され、その表現型の大規模な網羅的解析が進行中である。また、それら ES 細胞や KO マウスは、各国のバイオリソース機関から広く研究者に分譲されている。即ち、現在では誰もが解析目的遺伝子の KO マウスを簡単に入手可能な状況にある。更に、昨今の CRISPR/Cas9 system などゲノム改変技術の発展は、マウスのみならず様々な生物の遺伝子改変を容易にし、遺伝子機能解析における律速段階を遺伝子改変動物作製から表現型解析へ完全に移行させた。この様な状況下において、高速、且つ詳細に表現型解析を行う手法の開発が切望されている。

遺伝子改変生物の形態学的な表現型を解析する上で、Magnetic Resonance Imaging (MRI)や Optical Projection Tomography (OPT)などのイメージング解析法は非常にパワフルである。我々は、多くのイメージング手法の中でも X 線を用いてサンプル内部の非侵襲的な解析が可能な X 線 micro-Computed Tomography (micro-CT)に注目し、マウス表現型解析、とりわけ胎生致死表現型解析に応用する為の技術開発を行ってきた。マウス表現型解析において、これまでも micro-CT は骨や脂肪組織の解析に威力を発揮してきた。しかし、マウス胎仔のような軟組織に関しては、濃度分解能が低い為に画像化が困難であるという弱点があった。我々は、この問題点をヨウ素やリンタングステン酸等を造影剤に用いることにより解決すると共に、サンプルへの影響の少ない造影手法の開発に成功した。今回の発表では、micro-CT イメージングの表現型解析における有用性やその応用性に関して報告すると共に、今後のイメージングデータと画像解析技術を組み合わせた自動表現型解析法の開発など、その発展性について議論した。



micro-CT による E14.5 マウス胎仔イメージング

左: 造影 micro-CT 像; 右: 単純 micro-CT 像

生物発光イメージング法を用いた膵島 α 細胞からのグルカゴン分泌の解析

Bioluminescence imaging of Glucagon secretion from pancreatic alpha cells

○横川慧^{1,2}、鈴木崇弘³、井上敏⁴、伊納義和²、鈴木亮¹、古野忠秀²、平嶋尚英¹

¹名古屋市立大学院・薬、²愛知学院大・薬、³愛知学院大・歯、⁴JNC (株)・横浜研
○Satoru Yokawa^{1,2}, Takahiro Suzuki³, Satoshi Inouye⁴, Yoshikazu Inoh², Ryo Suzuki¹, Tadahide Furuno²,
Naohide Hirashima¹

¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, ²School of Pharmacy, Aichi Gakuin University, ³School of Dentistry, Aichi Gakuin University, ⁴Yokohama Research Center, JNC Co.

グルカゴンは、膵臓ランゲルハンス島(膵島) α 細胞から分泌される血糖上昇ホルモンであり、膵島 β 細胞から分泌されるインスリンと拮抗的に作用することで生体内の血糖恒常性を維持している。近年、グルカゴンの過剰分泌が糖尿病の発症に深く関与することが明らかになってきた。最近我々は、グルカゴン分泌顆粒動態における細胞接着因子 CADMI の重要性を報告しているが^[1]、グルカゴン分泌機構の多くは未だ不明である。今回我々は、ヒトプログルカゴン (PGCG) とガウシアルシフェラーゼ (*Gaussia luciferase*, GLase) の融合タンパク質 (PGCG-GLase) を用いて、「分泌型タンパク質のビデオレート生物発光イメージング法」^[2]によるグルカゴン分泌の定量解析を行った。本手法は、細胞外に分泌された GLase と培養液に添加した発光基質セレンテラジンの発光酵素反応を高感度な水冷 EM-CCD カメラで捉えることにより、生細胞で開口分泌(エキソサイトシス)された GLase 融合タンパク質を可視化する。その特長として、発光強度による分泌の定量解析、全細胞表面の解析、およびビデオレート (0.5 秒/フレーム以内) での 30 分以上の連続的な画像取得が可能である。一方、ルシフェラーゼの微弱な発光酵素反応を検出する生物発光イメージング法では、外因性のルシフェラーゼ遺伝子を高発現させることが有効となる。本研究では、ヒトで使用頻度が高いコドンのみを選択する、簡便なコドン最適化法 (preferred human codon-optimized method; Preferred 法)^[3]の PGCG-GLase 融合タンパク質発現における有効性についても解析を行った。

はじめに、Preferred 法で人工遺伝子合成を行ったヒトプログルカゴン遺伝子 (pPGCG) および GLase 遺伝子 (pGLuc) と、野生型ヒトプログルカゴン遺伝子 (hPGCG) と汎用のヒト最適化 GLase 遺伝子 (hGLuc) を用いて、4 種の PGCG-GLase 発現遺伝子 (hPGCG-hGLuc, hPGCG-pGLuc, pPGCG-hGLuc, pPGCG-pGLuc) を有するベクターを作製し、マウス膵島 α 細胞株 (α TC6 細胞) に導入してルミノメーターにより発光活性を測定した。その結果、pPGCG-pGLuc は、hPGCG-hGLuc よりも約 2 倍高い発光活性を示した。次に pPGCG-pGLuc ベクターを用いて PGCG-GLase 安定発現細胞株 α TC6^{PGCG-GLase} 細胞を作製し、ビデオレート生物発光イメージングを行った。その結果、50 mM KCl 脱分極刺激による分泌量の増大を可視化することに成功した。

以上により、膵島 α 細胞におけるプログルカゴン融合 GLase タンパク質の効率的な発現に Preferred 法で作製した人工遺伝子が有効であり、これを用いた生物発光イメージング法は、グルカゴン分泌の分子機構を解析する上で有用であると考えられた。

<参考文献>

- [1] Yokawa et al. Cell Biochem Biophys (2016) in press.
[2] Suzuki et al. Method Mol Biol (2014) 1098: 71-83.
[3] Inouye et al. Protein Expr Purif. (2015) 109:47-54.

ナノダイヤモンドによる細胞内タンパク質の一分子構造変化計測

Measurement of a single protein structural change in live cell using nanodiamond

○源城拓哉¹、五十嵐龍治¹、白川昌宏¹¹京都大学工学研究科○Takuya Genjo¹, Ryuji Igarashi¹, Masahiro Shirakawa¹¹ Graduate School of Engineering, Kyoto University

近年、細胞が受ける物理的な刺激が、すでに解明された様々なシグナル伝達経路の下流に影響していることが明らかになった。このような物理的な刺激により開始される新たなシグナル伝達は、物質ではなく、タンパク質の構造変化によって媒介されると考えられている。しかし、細胞内環境で、微小な構造変化を検出する技術はほとんどなく、三次元の構造変化を一分子レベルで検出する技術の開発が必要である。そこで我々は、タンパク質の構造変化の際の角度変化に着目し、その変化を検出するため、ナノダイヤモンドがもつ量子情報を用いた一分子角度計測技術の確立を目指す。本報告では、実際に我々の技術を用いて、タンパク質一分子の構造変化を計測した結果を報告する。

細胞が外部からの物理的な刺激を感知し、生理応答を誘導する過程は「メカノトランスダクション」と呼ばれる。メカノトランスダクションは細胞の恒常性の維持、細胞移動、分化など重要な生命現象に関与していることが明らかになった。現在、細胞骨格タンパク質のアクチンフィラメント、細胞接着斑を形成するインテグリン、および機械刺激感受性のイオンチャネルなどがメカノトランスダクションに関与しており、刺激に応じて構造変化が誘導されることが示唆されている。しかし、生体環境下で、ナノスケールの三次元変化を検出するのは困難であるため、これらのタンパク質の機能と構造変化を直接結びつけることはできていない。そこで我々は、タンパク質一分子の構造変化を検出できるプローブとして、ナノダイヤモンドに注目した。ナノダイヤモンドは生体への毒性が極めて低いため、生体計測プローブとして用いることが可能である。また、ダイヤモンド表面を容易に化学修飾することができるため、プローブとして使用するために必要な標的タンパク質への標識ができる。さらに、ナノダイヤモンドの格子欠陥である、窒素空孔中心（NVC: nitrogen vacancy center）が発する蛍光は明滅、褪色を示さないだけでなく、量子情報を与える。すなわち、三重項電子を持つNVCの蛍光はスピン状態に応じて異なる蛍光強度を示す。我々は、これらの性質を利用し、電子スピン共鳴や適切な磁場の照射と組み合わせ、蛍光強度を操作することによって、ダイヤモンドの姿勢を決定する技術を開発した。本報告では、本技術の紹介と実際に1分子のタンパク質に対して本技術を応用した実験を報告する。

All atom molecular dynamics simulations by AMBER of *Agaricus brasiliensis*-derived β -glucan

○Yoshitaka Matsumura¹, Yasumasa Morimoto¹, Mariko Demura¹, Makoto Suminokura¹, Mikako Kubo¹,
Kodai Inoue¹, Naohito Ohno², Mitsuru Tashiro³ and Masaki Kojima¹

¹School of Life Sciences, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, 1432-1 Horinouchi,
Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan

²School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, 1432-1 Horinouchi, Hachioji,
Tokyo 192-0392, Japan

³Department of Chemistry, College of Science and Technology, Meisei University, 2-1-1 Hodokubo,
Hino, Tokyo 191-8506, Japan

It is known that *Agaricus brasiliensis*-derived β -glucan has multi-function [1-3]. Among the multi-function, anti-tumor and immunostimulatory are noteworthy [1-3]. Actually, the β -glucan induces cytokine production in both murine splenocytes and bone marrow-derived dendritic cells in the presence of recombinant mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor [2]. In mice study, it was found that leukocyte-enhancing, hepatopathy-alleviating and endotoxin shock-alleviating effects. Besides, the decrease of level of the percentage body fat, percentage visceral fat, blood cholesterol level and blood glucose, the increase of natural killer cell activity were observed in the human study [3]. In spite of these effects, the structural information of the *Agaricus brasiliensis*-derived β -glucan is still well unknown. Previously, we measured the β -glucan by nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectroscopy. From the results, it is indicated that the primary structure of the β -glucan was mainly composed of β -1,6 glycosidic linkage. However, the native structure of the β -glucan is not resolved. This is why that it is very hard to crystallize polysaccharide due to the large fluctuations.

So, we have performed all atom molecular dynamics simulations by AMBER of the β -glucan in order to observe the native structure. The analyzed results indicated that obtained ensemble by the molecular dynamics simulations was not random coil, and the structure was curve as a circle and helix partially or overall. We discuss in more detail in the poster.

[1] Ohno, N. *et al.* (2001) Biol. Pharm. Bull. 24, 820-828.

[2] Yamanaka, D. *et al.* (2012) Int. Immunopharmacol. 14, 311-319.

[3] Liu, Y. *et al.* (2008) eCAM. 5, 205-219.

ナノバブルを用いた超音波セラノスティクスの構築

Development of Ultrasound Mediated Theranostics with Nanobubbles

○小田雄介¹、鈴木 亮¹、Unga Johan¹、小俣大樹^{1,2,3}、宇留賀仁史¹、杉井むつみ¹、宗像理紗¹、島 忠光¹、丸山一雄¹

¹ 帝京大学薬学部薬物送達学研究室、² ユトレヒト大学、³ 日本学術振興会特別研究員 PD

○Yusuke Oda¹, Ryo Suzuki¹, Johan Unga¹, Daiki Omata^{1,2,3}, Hitoshi Uruga¹, Mutsumi Sugii¹,
Lisa Munakata¹, Tadamitsu Shima¹, Kazuo Maruyama¹

¹ Laboratory of Drug Delivery System, Faculty of Pharma-Sciences, Teikyo University,

² Utrecht University

³ JSPS Research Fellow

【背景・目的】セラノスティクスは診断と治療を一体的に遂行する医療システムを指し、診断・治療の両者に共通して利用可能な超音波によるセラノスティクス構築が注目されている。近年、超音波造影剤であるマイクロバブルに治療用超音波を照射することで薬物送達効率が亢進することが報告され、マイクロバブルと超音波を利用したセラノスティクスの構築に関する研究が盛んになされている。しかし、超音波造影剤として開発されたマイクロバブルを流用しているのが現状であり、超音波セラノスティクスを目的としたマイクロバブルは未だ存在しない。このような背景のもと、これまでに我々は超音波セラノスティクスの構築を目的とした新規ナノバブルを開発してきた。そこで、本研究ではナノバブルと超音波を用いたセラノスティクスの可能性について検討した。

【方法】超音波薬物デリバリー Colon-26 担がんマウスに腫瘍移植後 8 日目と 11 日目にナノバブルとオキサリプラチンの混合液 (25 μ L) を腫瘍内投与し、腫瘍組織に向けて治療用超音波を照射した。その後、腫瘍体積を指標に抗腫瘍効果を評価した。

超音波造影 Colon-26 担がんマウスの腫瘍組織を超音波造影 (VEVO2100 コントラストモード) しつつ、ナノバブル (100 μ L) を尾静脈内投与した。さらに腫瘍組織に向けて、超音波ガイド下穿刺により、ナノバブル (25 μ L) を腫瘍組織に局所投与した。次に、超音波造影像をもとに治療用超音波照射部位を決定し、治療用超音波 (1 MHz, 0.7 W/cm², 10 %, 60 秒) を照射した。

【結果・考察】ナノバブルと超音波を用いた薬物デリバリーによるオキサリプラチンの抗腫瘍効果増強について評価した結果、無処置の群と比較して、ナノバブルと超音波を用いてオキサリプラチンをデリバリーした群において、効果的な抗腫瘍効果が認められた。このことから、ナノバブルと超音波を用いることで、オキサリプラチンのがん細胞内デリバリーが可能であり、効果的な抗腫瘍効果が得られたと考えられた。次に、超音波造影を行った結果、ナノバブルを投与することで腫瘍組織の超音波造影が可能であった。さらに、超音波ガイド下穿刺によるナノバブルの局所投与、治療用超音波照射プローブの位置決め、治療用超音波照射後の超音波造影が可能であった。これらのことから、ナノバブルを用いた超音波造影下において、腫瘍組織にナノバブルと薬剤の混合液を投与し、治療用超音波照射することで、ナノバブルを用いた超音波セラノスティクスを構築可能と期待された。

Ribonuclease T₁のアミノ酸残基レベル粗視化構造の分子動力学シミュレーションによる構造精密化

Refinement of amino acid residue coarse structure of Ribonuclease T₁
using molecular dynamics simulation

○市岡隆幸、森本康幹、松村義隆、小島正樹
東京薬科大学生命科学研究科

Takayuki Ichioka, Yasumasa Morimoto, Yoshitaka Matsumura, Masaki Kojima
Graduate School of Life Sciences, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

バイオインフォマティクスにおいて、実験的手法に依らずコンピューターによる計算だけでアミノ酸配列からタンパク質立体構造を予測する研究が行われている。その予測は2年に一度世界的に行われているThe Critical Assessment of protein Structure Prediction (CASP) で評価されている。2014年CASP11において、その予測精度は立体構造の類似性を示すRoot Mean Square Deviation (RMSD) で、実験で決定された構造に対して1-12 Åであった [Yang, J. *et al.* 2015]。これは68個のタンパク質構造に対する結果で、その中の多くの例がRMSDで2~4 Å程度であり、アミノ酸残基間の距離と同程度に離れた (アミノ酸残基レベル) 構造であった。また、これまでの予測結果はアミノ酸残基レベルの精度が実質的に予測の限界であることが多く、2002年CASP5以降2012年CASP10まで実験で決定された構造と予測された構造の差は、その精度においてあまり変化がないことが知られている [Kryshtafovych, A. *et al.* 2014]。よって、計算手法によるタンパク質立体構造予測ではアミノ酸残基レベル以上の精度で構造を得ることが難しく、実験により個々の原子の座標まで決定した (原子レベル) 立体構造を登録しているProtein Data Bank (PDB) のものと等価にするためには、予測した構造を別の手法で精密化させる必要があると考えられる。

そこで最近では、その予測された構造を精密化する手段として分子動力学シミュレーション (MDシミュレーション) が用いられている [Mirjalili, V. *et al.* 2014]。実際に、2012年CASP10で行われた計算において、ほぼ全てのタンパク質で、CASP10で与えられた構造から実験で決定された構造に近づく方向へ精密化された。しかしながら、その精密化はPDBに登録されてある原子レベルまでの精度にはいたらず、むしろ精密化をより悪化させている報告もある [Nugent, T. *et al.* 2014]。これは、構造の精密化が困難であることを示している。

以前我々はX線溶液散乱 (SAXS) と核磁気共鳴 (NMR) の二次構造情報とバイオインフォマティクスにより、タンパク質の立体構造をアミノ酸残基レベルまで構築する手法を開発した。よって本研究では、アミノ酸残基レベルの粗視化構造をMDシミュレーションにより原子レベルまで精密化させることを目的とした。本研究の目的が達成されれば、SAXSと二次構造情報とバイオインフォマティクスにより構築したアミノ酸残基レベル構造が原子レベル構造まで精密化されるので、PDBの構造と等価になり、その後の様々な理論シミュレーションや創薬開発やタンパク質同士の相互作用のドッキングシミュレーション等の研究に使用されることが期待される。今回はNMRで決定したRibonuclease T₁の構造に対してMDシミュレーションを行った。その結果についてはポスターで議論する。

可逆的細胞膜結合蛍光プローブ FM1-43 を用いたインスリン開口分泌の可視化
Visualization of insulin secretion by using FM1-43 membrane probe.

○川久保愛美¹、柴田みゆき²、長山恵理子²、伊香賀玲奈³、田中直子²

¹大妻女子大院・健康栄養、²大妻女子大・食物、³お茶女大院・理学、

○Megumi Kawakubo¹, Miyuki Sibata², Eriko Nagayama², Reina Ikaga³, Naoko Iida-Tanaka²

¹Dept. Health and Nutrition., Otsuma Women's Univ., ²Dept. Food Sci., Otsuma Women's Univ.,

³Dept. Advanced Biosci., Graduate Sch. Human and Sci., Ochanomizu Univ.

【目的】膵臓β細胞からのインスリン分泌の蛍光観察については、蛍光タンパク質で標識したインスリンを遺伝子導入する方法やインスリン顆粒を特異的に蛍光標識する方法など、さまざまな方法が提案されてきた。本研究では、より簡便でかつ個々の細胞の状態変化を他のパラメーターと同時観察するのに適した方法を開発することを目的とし、可逆的に細胞膜に結合する蛍光色素 FM1-43 を用いて、開口放出を観察することで間接的にインスリンの分泌を捉える方法を検討した。

【方法】ラット膵臓β細胞株 INS-1 細胞を、2μM の蛍光色素 FM1-43 を含む KRBH 中で蛍光観察し、インスリンの開口放出に伴って細胞内に増加する蛍光小胞を細胞内蛍光強度の変化とした。温度、蛍光照射の Interval、カルシウム濃度などの条件検討を行い、最終的に、蛍光観察を行いながら 1 分毎に採取した細胞外液中のインスリン濃度と蛍光強度変化との相関を検討した。

【結果および考察】細胞外液中の FM1-43 は細胞膜と可逆的に結合して蛍光を示すが、細胞内には取り込まれない。しかし、インスリンを含む小胞は分泌時にいったん細胞膜と融合して、その後細胞内に回収されるため、開口放出後の小胞は FM1-43 を含む。そのため、蛍光を発する細胞内小胞の増加は、インスリン分泌量と相関することが期待された。

実際、グルコース刺激後に細胞内の蛍光小胞の数は徐々に増加していく様子が観察された。その変化率を経時的に見ると、グルコース刺激直後に大きく増加し、いったん変化しなくなった後、25 分以降に再び増加が観察され、間欠的かつ二層性の分泌様式は、細胞外液のインスリン定量から得られたパターンと良く一致した。この方法を用いることによって、個々の細胞の分泌リズムを捉えることができ、またインスリンの分泌と他の細胞内パラメーターなどとの同時観察も可能になると期待される。

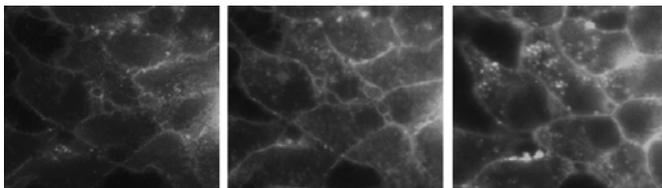


図 1.細胞内蛍光小胞の経時的变化
 (Glc 投与前、Glc 投与後 19 分、Glc 投与後 39 分)

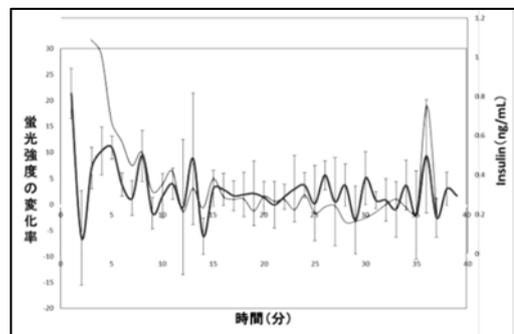


図 2.蛍光強度の変化率とインスリン分泌量
 黒：細胞内蛍光強度の経時的变化率
 灰：細胞外液中のインスリン分泌量

高速度画像記録装置の構築とバイオイメージングへの応用

Construction of a high-speed image recording system and its application to bioimaging

○藤原久志¹、洲崎悦子²¹広島市立大学情報科学研究科、²就実大学薬学部○Hisashi Fujiwara¹, Etsuko Suzaki²¹ Grad. Sch. of Info. Sci., Hiroshima City Univ., ² School of Pharmacy, Shujitsu University

【緒言】

我々は「情報科学の理学および医学研究への応用」を念頭に置き、産業用カメラとパーソナルコンピュータ（PC）の組み合わせによる高速度画像記録装置を開発してきた。本研究では、一連の開発を通して得られた装置構成および構築の要点を総括する。そして、高速度画像記録装置のバイオイメージングへの応用について検討・報告する。

【高速度画像記録装置の構成・構築の要点】

これまで開発してきた高速度画像記録装置では、産業用高速カメラの撮像データをカメラ外部のPCに内蔵されたハードディスク（HDD）に記録している。このような高速カメラとPCとのデータ転送には、CameraLink や Gigabit Ethernet などのインタフェースが用いられる。現在、我々が用いている最速のカメラ（機種）は Photonfocus 社の MV2-D1280-640-CL であり、1280×1024 画素（白黒 8 ビット/画素）で最大撮像速度 488 枚/秒である（データ生成速度：610 MB/s）。より高速な機種も登場しており、たとえば Optronis 社の CP70-HD-M-900 の場合、その性能は 1920×1080 画素（白黒 8 ビット/画素）で最大撮像速度 908 枚/秒である（データ生成速度：1.75 GB/s）。

画像記録用 PC では、内部で大量かつ高速なデータ転送が生じるので、チップセット（CPU とグラフィックス・HDD などとのデータ入出力を調整する部品）の選定が重要となる。さらに、データの記録では、通常複数の HDD に対して並列でデータ書き込みを行う RAID0（冗長性なし）を用いるので、応じて HDD と RAID カードの選定が重要となる。近年、HDD に替わる記録媒体として、より高速な Solid State Drive（SSD）が登場している。HDD または SSD の選択では、費用対効果とデータ記録の繰り返し回数について検討を行うと良い。画像記録用ソフトウェアに関しては、自作または既製品（たとえば Norpix 社の StreamPix）の利用の双方の選択が可能である。

開発した高速度画像記録装置には、頻度は少ないものの「コマ落ち」が生じることを見出ししており、その詳細や原因については調査・検討中である。

【高速度画像記録装置のバイオイメージングへの応用】

本装置は、トリガーをかけられない高速現象（例えば、長時間に亘って非定期的に生ずる高速現象）全般の観測に有用と考えられる。また、一般に高速カメラと位相差あるいは微分干渉顕微鏡は相性が良い。すなわち、これらの顕微鏡の理想的な観測対象は「位相物体（吸収を持たない）」であり、従って高速撮像（応じた短時間露光）に必要な高強度の照明光を用いても、試料の光損傷は少ないと考えられる。このような観点から、ザイモサン（パン酵母抽出物）を貪食する好中球における開口放出（ビデオ速度では詳細を捉えきれない高速現象）を位相差顕微鏡と高速度画像記録装置の組み合わせで記録・解析した事例について報告する。

三次元生体モデルイメージングに適した新規培養ウェルの開発 Development of novel cell culture well for 3D biological model imaging

○東ヶ崎健¹、鈴木民恵¹、松熊祥子¹

¹株式会社ファンケル総合研究所

○Takeshi Tohgasaki¹, Tamie Suzuki¹, Shoko Mastukuma¹

¹ FANCL Corporation Research Institute

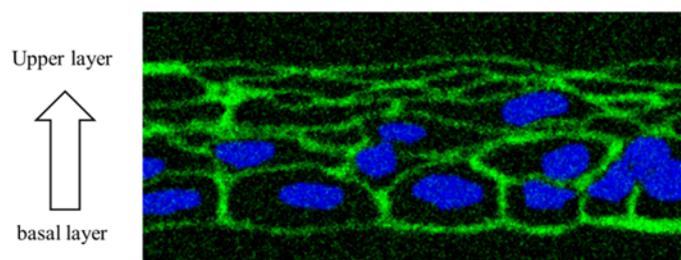
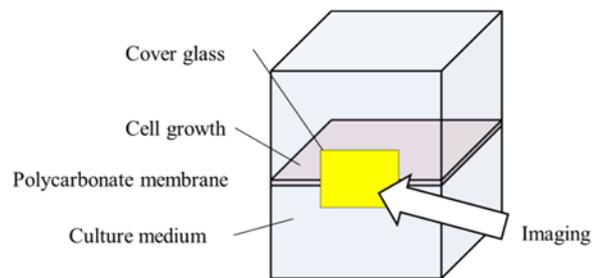
ヒト皮膚表皮は、基底層の表皮角化細胞が表層へ向けて、組織内の分子的極性や空気接触により分化し、基底層、有棘層、顆粒層、角層の4層の層状構造を形成し、各層がそれぞれ異なる形態的パターンや細胞生理学的特徴を有している。このことから、医薬品および化粧品の安全性・有効性評価を行う際には、単層の細胞だけの評価では不十分と考えられ、ヒト表皮角化細胞を三次元的に積層化培養し、表皮層状構造を構築形成させた生体モデルが用いられている。

我々は、薬物や種々のストレス応答時の細胞間および層間の分子的相互作用を表皮角化細胞の角化過程においてリアルタイムに観察・評価することを目的として、細胞接着面と直交した面にカバーガラスを配置させた新規三次元培養ウェルを開発した(右図上段)。同ウェルにヒト表皮正常角化細胞を播種し、7日間の三次元積層化培養により表皮層状構造を構築し、

層状構造内における皮膚の分化現象に着目して2日間の観察を行った。観察の際には、細胞核、細胞膜を蛍光標識し、共焦点レーザー顕微鏡を用い、40xのレンズを用いて4hour/frameの速度で48時間の長期タイムラプス蛍光観察を行った。その結果、表皮層状構造内の角化細胞の動態観察に成功し(右図下段)、皮膚深部における細胞分裂、組織内での細胞遊走、角化による核消失および角層剥離など角化細胞の分化過程における現象を観察した。

本研究で開発した新規三次元培養ウェルにより、従来の細胞接着面側であるX-Y面の観察に対して、細胞の側面方向であるX-Z面の解像度に重点を置いた長期間培養観察が可能であると考えられた。

今後、表皮の層状構造における遺伝的応答性、形態変化、細胞間相互作用の経時的変化をとらえるなど、医薬品および化粧品の安全性・有効性評価、角化細胞の分化機構の研究に応用可能と考えられる。さらに、皮膚での観察だけに留まらず、血管、気管支、胃や腸などの層状構造を形成する組織の観察や、人工多能性幹細胞(iPS細胞)を用いた正常および様々な疾患のヒト細胞を三次元的に構築させる技術と組み合わせることにより、疾患メカニズム解明にも利用が期待できる。



カルボキシ化ポリグリセロール修飾ナノダイヤモンドのワンポット合成法および、
ビオチン-アビジンを用いた選択的分子標識システムの確立

**One-step synthesis of COOH-terminated hyper-branched polyglycerol on a
nanodiamond surface and its bioapplication through biotin-avidin interaction**

○寺田 大紀¹、外間 進吾¹、五十嵐 龍治¹、白川 昌宏¹

¹京都大学工学研究科

○Daiki Terada¹, Shingo Sotoma¹, Ryuji Igarashi¹, Masahiro Shirakawa¹

¹ Graduate School of Engineering, Kyoto University,

<背景・目的>

ナノダイヤモンド (ND) 中に存在する窒素と空孔が形成する NVC(nitrogen-vacancy center)は、きわめて安定な蛍光を発する。加えて、その蛍光は、電子スピンの情報を含むため、磁気共技術と組み合わせることで、ナノ空間における電場や磁場の大きさ、温度などの様々な情報を取得することが可能である。そのため、従来の蛍光プローブでは不可能な、ナノ空間の物理パラメータの取得、可視化する技術の開発が進められている。その足掛かりとして、ND を生体分子に特異的にターゲティングする表面修飾技術が必要とされたため急速な発展を遂げた。例えば、ND を強い酸化条件で処理をすることで、ND 表面にカルボキシ基を導入する方法がある。カルボキシ化ナノダイヤモンド (ND-COOH) は、定法の合成法により生体分子のタンパク質に結合させることが出来る。しかしながら、ND の表面の疎水性部位への非特異的なタンパク質の吸着、ND 同士の凝集といった問題があり、イメージングの信頼性を著しく低下させる。そこで、本研究では、カルボキシ化ナノダイヤモンド (ND-COOH) をカルボキシ化ポリグリセロールで表面修飾する方法 (ND-HPGCOOH) に着目し、非特異的なタンパク質の吸着を起さずに選択的に標的分子のみを ND で標識するシステムの開発を行った。その結果、(1) 短時間かつ有機溶剤を使用しない ND-HPGCOOH ワンポット合成法と、(2) ND-HPGCOOH を使い、ビオチン-アビジンの系に応用することで、非特異的なタンパク質の吸着がない選択的分子標識システムを確立した。

<実験・考察>

(1)ND-HPGCOOH のワンポット合成法の確立

本合成法は短時間かつ有機溶剤を使用しないため、簡便に ND-HPGCOOH を合成することができることが特徴である。合成の確認は、フーリエ変換赤外分光法、熱重量測定を用いて解析を行った。その結果から表面修飾されている官能基及び、78wt%の HPGCOOH の担持量を確認した。

(2)ビオチン-アビジンを用いた選択的分子標識システムの開発

ND-HPGCOOH をビオチン化 (ND-HPG-biotin) し、ビオチンとアビジンの特異的な結合を利用して、アビジン化した標的分子を標識した。標識の確認は、アビジン化したフルオレセイン (蛍光分子) を ND-HPG-biotin と反応させ、フルオレセインの蛍光を測定することで行った。また、同様の方法で HPG 修飾を行っていない ND と比較することにより、特異的なタンパク質の吸着の有無を確認した。

以上の結果から非特異的なタンパク質の吸着なしに標的分子を ND で標識するシステムの開発に成功した。

スクロース水浸処理したシロイヌナズナの葉における孔辺細胞の細胞生物学的解析
Cell biological analysis of Arabidopsis cotyledon surfaces immersed in sucrose solution

○秋田佳恵、桧垣匠、馳澤盛一郎

東京大学大学院新領域創成科学研究科

○Kae Akita, Takumi Higaki, Seichiro Hasezawa

The Univ. Tokyo GSFS

気孔は蒸散やガス交換を担うため、植物の生長にとって欠かすことのできない重要な器官である。気孔は一对の孔辺細胞により形成される小孔であり、葉や茎の表面に存在する。多くの双子葉植物では、孔辺細胞どうしが隣接しないように分布しており、この気孔配置の規則は **one-cell spacing rule** と呼ばれている。従来の研究から **one-cell spacing rule** を制御する遺伝子が複数同定されており、その制御機構は明らかになりつつあるが、その制御機構が環境要因によって攪乱されることは殆ど知られていなかった。我々はスクロース水溶液に水浸処理したシロイヌナズナの子葉において、孔辺細胞どうしが隣接した気孔クラスターが形成されることを見出した (Akita et al. 2013)。この状況下においては明らかに **one-cell spacing rule** が破綻しているものの、孔辺細胞のマーカー遺伝子は通常通りに発現しており、クラスターを形成する孔辺細胞の遺伝学的性質はほぼ正常であることが示唆された。

次に、葉組織構造および細胞内構造に着目して、スクロース水浸処理が及ぼす影響を形態学的に解析した。その結果、スクロース水浸処理によって葉の厚さと細胞体積が増加し、気孔クラスター直下の気孔腔が拡大することが判明した。また、透過型電子顕微鏡観察により、デンプン粒を過剰に蓄積した葉緑体が観察された。その一方、気孔クラスターを構成する孔辺細胞では、気孔開閉への寄与が示唆されている孔辺細胞腹側の厚い細胞壁構造は保たれており、表層微小管が腹側から背側へと放射状に伸長することに関しても、コントロール区と比較して顕著な変化は認められなかった (図)。さらに気孔開口能を検証するため、フシコクシンによる気孔開口誘導を試みた。その結果、気孔クラスターを形成していても、孔辺細胞はフシコクシンに応答して気孔開度は増加することが判明した。以上の結果から、スクロース水浸処理は気孔分布を乱してクラスター化させるが、気孔開口に寄与する孔辺細胞の細胞内構造は保持されることが明らかとなった。

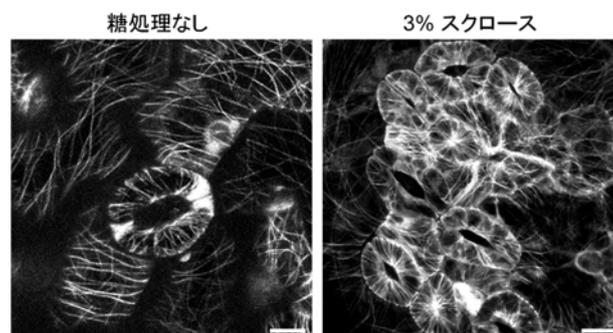


図. GFP-tubulin β 発現シロイヌナズナの子葉表皮組織。
 表層微小管は放射状に配向していた。Bars = 10 μ m。

蛍光性ナノダイヤモンドを用いた細胞内磁場イメージング装置の開発
The development of an apparatus for imaging the magnetic field in cell using
fluorescent nanodiamonds

○田辺竜太郎¹、五十嵐龍治^{1,2}、白川昌宏¹

¹京都大学工学研究科、²JST

○Ryotaro Tanabe¹, Ryuji Igarashi^{1,2}, Masahiro Shirakawa¹

¹Graduate School of Engineering, Kyoto University, ²JST

生体内の磁場は、電氣的、磁氣的変化を伴う生命現象の影響を常に受けている。例えば、神経伝達における膜電位の変化は、周辺の磁場に影響を与えることが古くから知られており、SQUIDを用いた脳磁計は研究、医療の分野で利用されている。また、常磁性スピンの持つ活性酸素種はエネルギー代謝の副産物や細胞内シグナル伝達を担う分子として知られており、これらも細胞内の磁場環境に影響を与える。しかし、いずれも単一細胞内におけるその動態は未だ明らかにされておらず、細胞内ナノ空間での磁気パラメータを精度よく定量できる細胞イメージングツールが待望されている。

こうした細胞内磁気パラメータを定量するためのイメージングプローブとして近年注目されているのが、蛍光性ナノダイヤモンド(FND)の窒素-空孔中心(NVC)である。NVCは常温で安定な三重項電子に由来した蛍光を発生し、その蛍光現象は電子スピン状態と共役していることが知られている。このためNVCの磁気共鳴現象は光の検出によって高感度で計測可能である(光検出磁気共鳴:ODMR)。FND周辺の磁気パラメータはNVCの電子スピン状態に影響を与えるのでODMRによる定量が可能である。

本研究では細胞内磁場動態イメージングを目的としたODMR測定装置の開発を行い、ダイヤモンドのリアルタイム蛍光イメージングと同時に磁気パラメータを反映したODMRスペクトルを検出したので報告する。また、蛍光性ダイヤモンドのバイオイメージングへの応用性についても議論する予定である。

新規発光レシオメトリックプローブを用いた植物細胞内 Ca^{2+} イメージングの試み
Imaging cytosolic Ca^{2+} concentration at a single cell level in plants
by a novel bioluminescent ratiometric Ca^{2+} probe

○永井寛子¹、新野祐介²、助川夏雄¹、北畑信隆^{1,3}、宮脇敦史²、朽津和幸^{1,3}

¹東京理科大・院・理工・応用生物科学、²理研・脳科学総合研究センター

³東京理科大・イメージングフロンティアセンター

○Hiroko Nagai¹, Yusuke Niino², Natsuo Sukegawa¹, Nobutaka Kitahata^{1,3},
 Atsushi Miyawaki², Kazuyuki Kuchitsu^{1,3}

¹Dept of Appl. Biol. Sci., Tokyo Univ. of Science, ²RIKEN Brain Sci. Inst.,

³Imaging Frontier Center, Tokyo Univ. of Science

Ca^{2+} は、あらゆる細胞種において基本的な細胞内情報伝達因子として働いており、その細胞質内濃度($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$)変化の時空間パターンを様々な規模で解析することの重要性は論を俟たない。数多くの蛍光性 Ca^{2+} プローブが開発されているが、特に植物では、測定時の励起光照射により、光感受性の細胞で応答が誘導されること、光合成色素等による自家蛍光が蛍光イメージングの障害となることなどが大きな問題となる。一方で、既存の発光性 Ca^{2+} プローブには、レシオメトリックな測定や、1細胞レベルのイメージングが困難という問題点があった。これらの問題点を解決する一つの方法として、 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ を2チャンネル・レシオメトリックに測定できる発光・蛍光 Ca^{2+} プローブ OC の開発が進められている。OC は発光と蛍光の両モードで $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ を測定可能である。発光モードは光励起を必要としないため、例えば蛍光データと比較することで $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 動態に対する光照射の影響を評価することができる。我々は、カリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーター下で OC を恒常的に発現させたシロイヌナズナの形質転換体を作成し、この形質転換体を用いた蛍光・発光イメージングを試みた。

根の細胞、葉の気孔孔辺細胞等において、蛍光モードで $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 変化をイメージングする実験系を構築した。次に、根と葉を発光基質で処理し、発光モードで観察したところ、蛍光モードと同程度の分解能で根の細胞、および孔辺細胞を観察できた(図 1, 2)。発光モードにおける高分解能の Ca^{2+} イメージング実験系の構築を試みている。

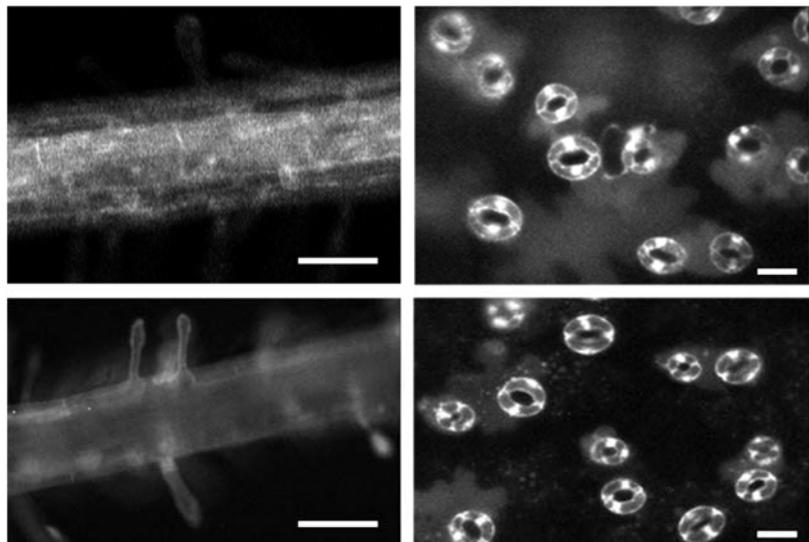


図 1. 根の蛍光像(上)、
 および発光像(下)

scale bar = 100 μm .

図 2. 葉の表皮・気孔孔辺細胞
 の蛍光像(上)、および発光像(下)

scale bar = 20 μm .

細胞内グルタチオンの求核付加・解離平衡に基づく
超解像蛍光イメージングプローブの開発

Development of spontaneously blinking fluorophores

based on nucleophilic addition of intracellular glutathione for super-resolution imaging

○両角明彦^{1,4}、神谷真子^{2,5}、宇野真之介¹、梅澤啓太郎¹、吉原利忠³、飛田成史³、
浦野泰照^{1,2,4}

¹東大院薬、²東大院医、³群馬大院理工、⁴AMED CREST、⁵JST さきがけ

○Akihico Morozumi^{1,4}, Mako Kamiya^{2,5}, Shin-nosuke Uno¹, Keitaro Umezawa¹,
Toshitada Yoshihara³, Seiji Tobita³, Yasuteru Urano^{1,2,4}

¹Grad. Sch. of Pharm. Sci., The Univ. of Tokyo, ²Grad. Sch. of Med., The Univ. of Tokyo,

³Grad. Sch. Sci. Tech., Gunma Univ., ⁴AMED CREST, ⁵JST PRESTO

【背景・目的】

超解像蛍光イメージング法は、光学顕微鏡の空間分解能の限界を超えた画期的なイメージング技法であり、その1つに、蛍光プローブを確率的に明滅させて1分子ずつ高精度に位置決定することで超解像画像を構築する single-molecule localization microscopy (SMLM) という手法がある。しかしながら、市販の一般的な色素を明滅させるには添加物や強いレーザー光照射が必要であり、細胞毒性や蛍光色素の光褪色が懸念される。そこで当研究グループでは、ローダミン色素の分子内スピロ環化平衡を蛍光明滅の原理として利用することで、添加物や高強度レーザーによらず自発的に明滅し、温和な条件下で使用できる SMLM 用赤色蛍光プローブを開発した(*Nature Chem.* **6**, 681–689 (2014))。しかしながら、分子内スピロ環化平衡に基づく分子設計法のみでは実現しうる光特性に限界があり、多色化や蛍光明滅特性のバリエーションの充実といった今後求められる幅広い特性に対応することが難しい。そこで本研究では、望みの光特性を示す SMLM 用蛍光プローブを柔軟かつ効率的に開発するため、上記の分子設計法を拡張した新たな設計法の確立を試みた。具体的には、より単純な分子構造を有する蛍光色素と細胞内に存在する求核種との「分子間反応」を利用することで、新たな蛍光明滅原理に基づく SMLM 用プローブの開発を目指した。

【方法・結果】

新たな蛍光明滅原理として、ピロニン類等のキサンテン系色素に対して細胞内求核種であるグルタチオン (GSH) が可逆的な求核付加・解離平衡を示し、それに伴い可視光領域の吸収および蛍光が劇的に変化する現象に着目した。そこでまず、明滅特性が生細胞内環境下での SMLM に適するよう、色素分子構造の最適化を図った。平衡状態における蛍光性状態分子の割合は GSH との解離定数から、蛍光性状態の持続時間は laser flash photolysis による過渡吸収減衰からそれぞれ算出・評価した。その結果、生理的 GSH 濃度下で大部分が無蛍光性の求核付加体として存在し、かつミリ秒の蛍光性状態持続時間を示す2色のピロニン誘導体 SiP650 および CP550 を見出した。次に、全反射顕微鏡下での1分子イメージングにより SiP650, CP550 の明滅特性を評価したところ、いずれの色素についても、生理的 GSH 濃度下で大部分の分子が無蛍光性状態として存在し、かつ高強度のレーザー光照射や他の添加物を要せずに SMLM に適した蛍光明滅を示すこと、明滅に伴い放出される光子数および1分子の位置決定精度の観点からも SMLM に有用であることを確認した。そこで、本色素を固定細胞系における SMLM に適用した結果、生理的濃度の GSH 存在下で強いレーザー光照射によらず超解像画像の構築に成功し、2色の色素を同時に用いた dual-colour SMLM も達成した。さらに最近、添加物を用いない生理的条件下での生細胞の SMLM にも成功しており、本年会ではその結果についても報告する。

キャリア依存的な LewisX 糖鎖修飾を担う特異的なゴルジ体の局在

A functional zone of the Golgi apparatus responsible for career-specific LewisX modification○姫田美咲¹、柘植信吾¹、矢木宏和¹、加藤晃一^{1,2}¹名古屋市立大学薬学部、²自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター○Misaki Himeda¹, Shingo Tsuge¹, Hirokazu Yagi¹, Koichi Kato^{1,2}¹ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, ² Okazaki Institute for Integrative Bioscience, National Institutes of Natural Sciences

我々はこれまでに、神経幹細胞において、LewisX[Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc]糖鎖が幹細胞性の維持過程を制御していることを明らかにしてきた。その過程で、本糖鎖が特定のタンパク質にのみ発現していることを見出している。神経幹細胞の LewisX 糖鎖の生合成はフコース転移酵素 9 (FUT9) によって担われており、本酵素は *In vitro* 反応において糖鎖の非還元末端に存在する N-アセチルラクトサミン構造に対してフコース残基の転移能を有する。したがって細胞内では FUT9 により、多くの糖タンパク質上に LewisX 糖鎖の修飾が起き得るものと予想される。それに反して、特定のタンパク質にのみ LewisX 糖鎖修飾を受けるという事実は極めて興味深い。そこで本研究では、FUT9 が他の糖転移酵素と異なるゴルジ体内の空間に局在し、LewisX 糖鎖修飾が行われているという仮説のもとに、FUT9 による限定的な糖鎖修飾機構の解明を目指している。

COS7 細胞をはじめとする株化細胞内で FUT9 を過剰に発現させたところ、特定のタンパク質のみに LewisX 構造を含む糖鎖修飾が認められた。その主要なキャリアタンパク質は、我々が神経幹細胞において LewisX 糖鎖発現タンパク質として同定した lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1) であることが判明した。LAMP1 発現プラスミドを外部遺伝子として FUT9 過剰発現細胞内に導入したところ、外来性の LAMP1 上にも特異的に LewisX 糖鎖による修飾が認められた。つまり、FUT9 による限定的な糖鎖修飾は、神経幹細胞だけではなく、FUT9 が発現する哺乳細胞に共通して認められる現象であることが予想される。

次に蛍光顕微鏡利用して FUT9 の細胞内局在を調べたところ、一般的にゴルジ体マーカーとして利用されているガラクトース転移酵素 I (GalT-I) の膜貫通部位 (TM) と緑色蛍光タンパク質 (GFP) の融合タンパク質 (GFP-GalT-I-TM) とは異なる局在を示した。さらに、FUT9 の TM と蛍光タンパク質 DsRed を融合したタンパク質の局在も、GFP-GalT-I-TM と異なる局在を示すことを明らかにした。これまでに、GalT-I および FUT9 はともにトランス、メディアルゴルジ体に局在することが報告されている。本研究で見出した GalT-I と FUT9 とのゴルジ体内の局在の違いは、LAMP1 のような特定のタンパク質に対して LewisX 糖鎖を付与する特別なゴルジ体内の空間が存在する可能性を示すものである。

トリインフルエンザ劇症化における NS1 ダイマーの分子機構
Mechanism of NS1 dimer of highly pathogenic avian influenza

加藤有介¹、福井清¹、○鈴木和男²

¹徳島大学先端酵素学研究所、²帝京大学アジア国際感染症制御研究所

Yusuke Kato¹, Kiyoshi Fukui¹, ○Kazuo Suzuki²

¹ The Institute for Enzyme Research, Tokushima University, ² Asia International Institute of Infectious Disease Control, Teikyo University

高病原性トリインフルエンザ (A/H5N1 型) 感染患者では劇症型肺炎を伴い、死亡率は約 60% に達する (Kawachi et al. 2009)。その要因として、サイトカインストームを伴う急速な呼吸不全が挙げられる (Liem et al. 2008)。その呼吸不全治療に免疫グロブリンの有効性も検討されている (Kawachi et al., 2016, in press)。サイトカインストームを誘発する劇症化因子は、インフルエンザウイルス遺伝子中にコードされている non-structural protein (NS1) であることが、これまでの報告で示唆されている (Phung et al. 2011)。A/H5N1 型の 2 つのサブタイプ (DK/12 と DK/27) で、病原性の程度に大きな違いが見られたことが、近年報告された (Jiao et al. 2008)。DK/27 に感染させたマウスの場合には、8 日以内にすべての個体が死亡したことに對して、DK/12 の場合には 9 日目の時点ですべての個体の生存が示された。こうした病原性の違いは、NS1 遺伝子上の単一のアミノ酸残基の置換によるものである。DK/12 の場合には 42 番目の残基がプロリンであることに對して、DK/27 ではセリンに置き換わっている。

NS1 には 2 個の構造ドメインが定義されているが、42 番目の残基は RNA 結合ドメイン (RBD) 上に存在する。こうした置換が RBD の性質にどのような影響を及ぼすかを明らかにするために、42 番目のアミノ酸が異なる 2 種類の RBD を調製し、円偏光二色性測定とゲル濾過クロマトグラフィーで比較したところ、両者の全体構造が非常によく似ていることが示唆された。一方で、ゲルシフトアッセイによれば、Pro42 型と Ser42 型の RNA 結合能は顕著に異なることが示された。全体構造に大きな違いが見られないため、42 番目の残基の違いが RNA 結合能に影響を与える機構が不明である。そこで我々は、これらの分子のダイマー構造モデルを作成し、構造の違いを検討した。その結果、Ser42 型と Pro42 型とでは、RBD のヘリックス 2 の構造が変化することが示された。ヘリックス 2 は、RNA 結合に重要な働きを示す α -ヘリックスである。Ser42 型と Pro42 型では、ダイマー中におけるヘリックス 2 の相対的な位置関係が異なっていた。こうしたことから、Pro42 型では RNA 結合に関わるほとんどのアミノ酸残基の位置が変化してしまい、2 本鎖 RNA と適切な水素結合を形成することが出来なくなってしまう。このような構造変化が 2 種類のサブタイプの病原性の程度の差を導いたことが示唆された。

Kato YS, Fukui K, Suzuki K. *Protein Pept Lett.* 2016;23(4):372-8.

Phung TT et al., Suzuki K. *Microbiol Immunol.* 2011 Dec;55(12):874-84.

Kawachi S et al., Suzuki K. *J Infect Dis.* 2009 Aug 15;200(4):510-5.

Jiao P et al., *J Virol.* 2008 Feb;82(3):1146-54.

Liem NT et al., Suzuki K. *Jpn J Infect Dis.* 2008 Mar;61(2):157-60.

Kawachi et al., 2016, *ADC Lett*, in press).

Hippo シグナル依存性 Bmp4 転写調節による二次心臓領域 (SHF) 心房筋分化制御

Hippo signal-dependent Bmp4 expression is essential for atrial cardiomyocyte differentiation in the SHF

○福井 一¹、望月 直樹^{1,2}

¹ 国立循環器病研究センター研究所 細胞生物学部、² AMED-CREST

○Hajime Fukui¹, Naoki Mochizuki^{1,2}

¹ Department of Cell Biology, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute, ² AMED-CREST

Cardiac growth is defined by both cell size and number of cardiomyocytes (CMs) derived from the first heart field (FHF) and the second heart field (SHF). During heart development, CMs precursor cells emerge in both fields according to genetically programmed transcription factor-regulated signals. CMs in each field are distinguished by their emergence of spatiotemporal patterns and their contributions to the parts of the heart. In zebrafish, the FHF cells and the SHF cells differentiate into atrial/ventricular CMs and into outflow/inflow tract cells, respectively. Hippo signal has been recently reported to be important for determination of the heart size. However, it remains elusive how Hippo signal regulates the formation of the FHF and SHF. In the present study, we aimed at investigating the role for Lats kinases, negative regulators of Yap1/Wtr1-dependent transcription, in the formation of both fields by using zebrafish.

The embryos in which the expression of Lats1/2 was reduced exhibited an increase of *hand2* mRNA expression in the anterior lateral plate mesoderm. *Hand2* promoter activity monitoring fish embryos showed an emergence of *hand2* promoter-active atrial CMs constituting inflow tract cells. Consistently, *lats1/2* morphants exhibited an increase in the number of atrial but not ventricular CMs. Some *hand2* promoter-active inflow tract cells were positive for *Isl1*, which is regarded as the marker for the SHF. These data suggest that Hippo signal is involved in SHF formation.

We found that Bmp4 was increased by reduction of Lats1/2 kinases in the embryos. Furthermore, phosphorylated Smad1/5/9 positive cells were increased in the *hand2* promoter-active inflow tract in these embryos. These results prompted us to test the hypothesis that Bmp4 might activate Smad signaling in the SHF. Indeed, inhibition of Bmp signaling by DMH1 resulted in the reduction of *hand2* promoter-active and *Isl1*-positive SHF CMs. Smads are known to promote *hand2* expression. Collectively, Lats1/2 kinases negatively regulate Bmp4 expression that activate Smad signaling required for increasing the number of CMs in the SHF.

マウス大脳における神経細胞の空間分布と機能活動に関する定量解析
Quantitative analysis of spatial distribution and functional activity of neurons in the mouse cerebral cortex

○武田寛史¹、田桑弘之²、季 斌²、佐原成彦²、冨田 裕³、鈴木則宏³、
菅野 巖²、須原哲也²、樋口真人²、正本和人^{1,2}

¹電気通信大学大学院情報理工学研究科、²放射性医学総合研究所脳機能イメージング研究部、
³慶應義塾大学医学部神経内科

○Hiroshi Takeda¹, Hiroyuki Takuwa², Bin Ji², Naruhiko Sahara², Yutaka Tomita³, Norihiro Suzuki³,
Iwao Kanno², Tetsuya Suhara², Makoto Higuchi², Kazuto Masamoto^{1,2}

¹Graduate School of Informatics and Engineering, University of Electro-Communications,

²Department of Brain Functional Imaging Research, National Institute of Radiological Sciences,

³Department of Neurology, Keio University School of Medicine

本研究ではカルシウムセンサー蛍光タンパク質 GCaMP3 を発現させたマウス大脳における神経活動を二光子顕微鏡法で 3 次元的に撮像し、その活動頻度と活動した神経細胞の空間分布を同時に取得するための解析手法の構築を目的とした。実験には、イソフルラン麻酔 (2%) 下で左側頭頂に閉鎖頭窓 (Tomita-Seylaz 法) を施工した遺伝子改変マウス (Cre-CaMKII/GCaMP3, 18~29 g, N = 6) を用いた。脳血管を可視化するために顕微鏡観察の直前に Sulforhodamine 101 (SR101; 10 mM in saline) をマウスの腹腔に 0.1 mL 投与した。神経細胞の空間分布を取得するため二光子顕微鏡を用いて、0.25 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ の解像度で平面方向に 258 $\mu\text{m} \times 258 \mu\text{m}$ の領域を脳表からの深さが 50~320 μm の領域において深さ方向に 0.8 μm 間隔で 255~318 枚撮像した。つぎに、体性感覚刺激に対する神経活動を計測するため右側ほほ髭に空気刺激 (4Hz もしくは 1Hz) を 20 秒間与え、ピクセル解像度 1 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ 、深さ方向に 0.8 もしくは 1.6 μm の間隔で 3 次元的に機能活動を撮像した。無刺激の状態 (Rest) も含めて同様の撮像を一つの刺激条件に対して 8~20 回、20 秒の間隔で連続的に繰り返し撮像を行った。これらの実験はすべて覚醒下で行った。得られた画像に対して自作の Matlab ソフトウェアを用いて、まず XYZ 方向の解像度を全て 0.8 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ に内挿し、ガウシアンフィルターを用いて画像全体の輝度分布を平滑化し、さらにシェーディング補正によって XY 平面内の明暗のムラを補正処理した。つぎに GCaMP3 の蛍光を発する神経細胞の形態画像と SR101 で標識された血管画像にそれぞれ二値化処理を行い、細胞分布と血管構造に関する 3 次元再構成画像を得た。一方、神経細胞の機能活動を評価するため、それぞれの撮像のセッションで取得した 3 次元再構成画像内において GCaMP3 の蛍光を発した細胞の重心位置を算出しラベリング処理を施した。さらに、異なる撮像セッション間において抽出された細胞の重心が 10 μm 以内の距離に位置する細胞を同一細胞とみなし、各細胞と血管からの最短距離についてユークリッド距離法を用いて定義した。脳表から深さ 100~300 μm において活動が計測された神経細胞 19 個に対し血管からの距離は平均で $11 \pm 5 \mu\text{m}$ であった。このとき、神経細胞の活動は 4Hz の刺激に対して Rest の 2.6 倍、また 1Hz の刺激に対しては 1.7 倍活動頻度の有意な上昇 ($P < 0.05$) がそれぞれ認められた。一方、活動頻度と血管からの距離との間には有意な相関は認められなかった。

位相差顕微鏡像と畳み込みニューラルネットワークを用いた C2C12 細胞の分化識別 Recognition of differentiation of C2C12 cells by using phase-contrast images and convolutional neural network (CNN)

○大東 寛典、浅谷 学嗣、吉村 愛菜、田川 聖一、新岡 宏彦、三宅 淳

大阪大学大学院礎工学研究科

○Hironori Ohigashi, Satoshi Asatani, Aina Yoshimura, Seiichi Tagawa, Hirohiko Niioka, Jun Miyake

Osaka University, Graduate School of Engineering Science

近年 iPS 細胞を用いた再生医療への期待が高まっている。現在の細胞培養技術では目的の細胞を高純度で得ることが難しく、さらに正常に分化しなかった細胞は癌化の原因となる恐れもある。不適切な細胞は除去しなければならず、細胞の状態を識別する必要がある。識別する方法として、DNA や RNA の解析や蛍光染色等が挙げられるが、これらの方法では細胞にダメージを与えてしまうため、再生医療応用において適しているとは言えない。また、再生医療において移植組織には大量の細胞が必要とされるため、識別を自動で行う方法も求められている。本研究では位相差顕微鏡を用いて培養組織を撮影し、細胞の形態的特長を畳み込みニューラルネットワークにより捉え、分類することで細胞の識別を非侵襲的かつ自動的に行う手法を提案する。

C2C12 細胞 (マウス筋芽細胞) に対し分化誘導を開始した日を Day0 とし、Day0 から 3 日目、6 日目をそれぞれ Day3, Day6 とする。Day0, Day3, Day6 の細胞を位相差顕微鏡で撮影し、位相差像を 200x200 ピクセルに分割したものを 1 データとして、畳み込みニューラルネットワークの入力とし分化の識別を行った (図 1)。このネットワークは学習を繰り返していくことで各分化状態の特徴を獲得し、最終的に 3 つの分類の正答率はおおよそ 83.8%まで上昇した。

今後、本研究で扱った位相差像に加え、他の非侵襲的な手法を組み合わせることで細胞の特徴を多角的に捉えることでより高精度な識別が可能となるものと考えられる。また、本手法のような非侵襲的かつ自動的な細胞識別方法はレーザーによる細胞除去技術と組み合わせることで、不適切な細胞の自動的除去が可能になると考える。

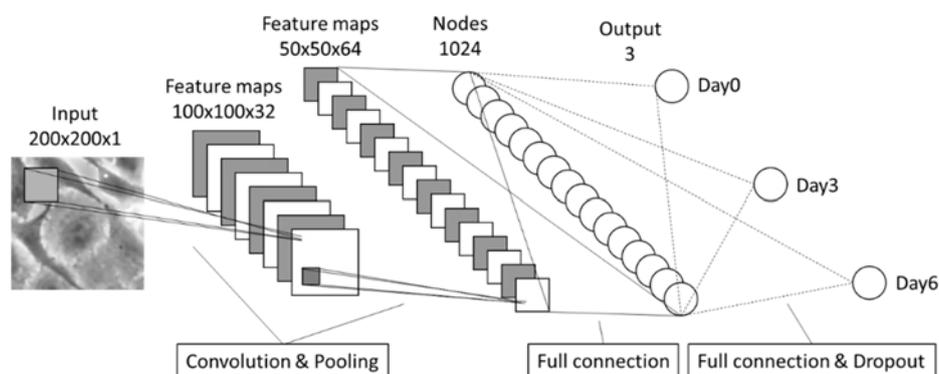


図 1 畳み込みニューラルネットワーク (CNN) の構造。CNN は生物の脳の視覚野を元にしており、畳み込み層、プーリング層、全結合層から構成される。

蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を基盤とするグルタチオン(GSH)濃度センサー分子による生細胞イメージングの検討

Live cell imaging with FRET-based bioprobe for Glutathione (GSH)

○谷原 元大、宇高 光、福田 武司、鈴木 美穂

埼玉大学大学院理工学研究科

○Gendai Tanihara, Hikaru Udaka, Takeshi Fukuda, Miho Suzuki

Graduate School of Science and Engineering, Saitama University

【緒言】生体内の活性酸素は主に、スーパーオキシド、ヒドロキシルラジカル、過酸化水素、一重項酸素である。これはミトコンドリアにおける電子伝達系が ATP 生産の際消費される酵素に由来する。活性酸素・フリーラジカルは様々な物質に対して非特異的な化学反応をもたらし、細胞に損傷を与えてしまうためそれを防ぐための抗酸化酵素が存在する。これらの酵素の活性に不可欠な電子供与体がグルタチオン(GSH)である。グルタチオンが直接反応し除去する活性酸素もある。グルタチオンはグルタミン酸、システイン、グリシンの三つのアミノ酸からなるトリペプチドである。酸化型である GSSG と還元型である GSH が存在し、酸化型、還元型を合わせた細胞内の濃度はおよそ 0.5~10 mM でそのうち 98%が還元型として存在することが知られている。また細胞内のグルタチオン濃度は極めて厳密に保たれている。その一方自身のチオールに毒物や伝達物質を結合させ細胞外に排出することで細胞を解毒する役割も担っている。疾病によってこの状態が変化するため生細胞内の GSH 濃度を測定することは疾病の基礎研究や早期診断、創薬の道を切り拓くことが期待される。

【実験方法】 GSH センサー分子、bioprobe は GSH 濃度依存的に FRET 効率が変化する蛍光色素と赤色蛍光タンパク質 Red Fluorescent Protein (RFP)の複合体を作製する事で得た(図 1)。 *In vitro* にてセンサー能の確認を行った後、タンパク質導入試薬を用いて、ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 (A549 細胞)への取り込みを行い、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

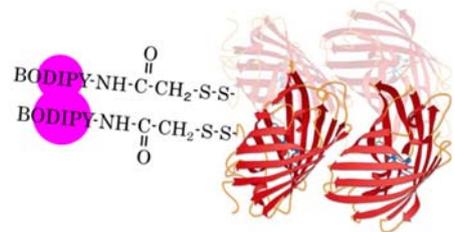


図 1 蛍光色素-RFP 複合体

【結果】 bioprobe のセンサー能に必要なと思われる量の A549 細胞への導入が確認された。

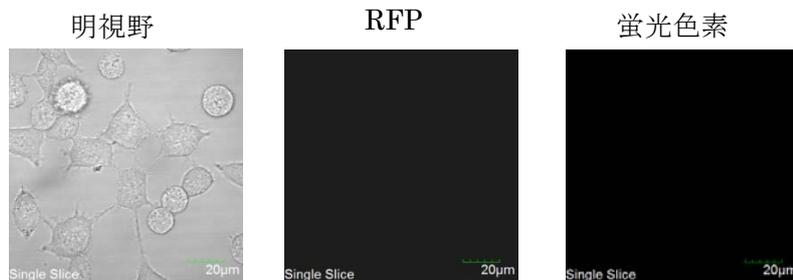


図 2 未導入細胞

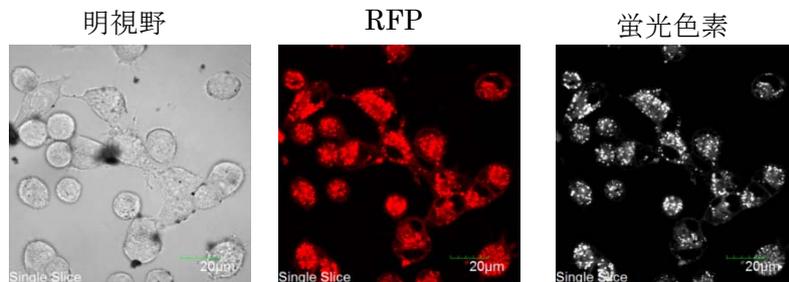


図 3 bioprobe 導入細胞

凝集誘起発光(AIE)体と蛍光タンパク質(FP)のミセルによる薬物送達イメージング Drug delivery imaging with micelles of aggregation-induced emission (AIE) compound and fluorescent protein (FP)

○高野 修杜、宇高 光、福田 武司、幡野 健、鈴木 美穂

埼玉大学大学院理工学研究科

○Shuto Kono, Hikari Udaka, Takesi Fukuda, Ken Hatano, Miho Suzuki

Graduate School of Science and Engineering, Saitama University

【諸言】近年、効率的で副作用の少ない医薬品投与を目指した、薬物送達システム (Drug Delivery System:DDS) の開発が盛んに行われている。DDS にはミセル型、ベジクル型、ナノクリスタル型など形状も素材も様々なものが試行されている。この際、薬剤の安定した内包と生体内での保持が重要な物性となる。多くは疎水部と親水部を持った構造が会合した化合物である。これまで、我々の研究室では疎水部にテトラフェニルシロール dendrimer (Tetraphenylsilole(TPS) Dendrimer) 図 1、親水部に緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein:GFP) 図 2 を持つミセルを作製してきた。会合は生理食塩水中で進み、TPS は凝集誘起発光体(Aggregation-induced emission compounds:AIE compounds)であるためミセルを形成すると発光し、さらに、GFP との間に蛍光共鳴エネルギー移動(Fluorescence Resonance Energy Transfer : FRET)が観察された。粒度分布計測や SEM による観察でミセルの粒径はおおよそ 100 nm であり、これは EPR 効果(enhanced permeability and retention effect)も期待できた。この生理食塩水中におけるミセル形成能と蛍光特性を応用し、追跡可能な抗体・核酸医薬品等の DDS の開発を目指している。そこで細胞標的性のために細胞膜上の受容体に特異的に結合しエンドサイトーシスを誘発するペプチド配列を導入した GFP 変異体を作製し、これを用いてミセル形成、細胞取込み評価を行う事とした。

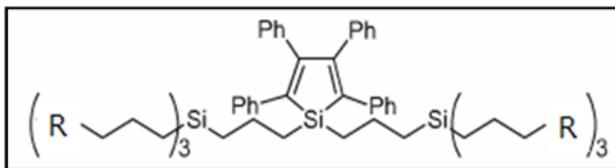


図 1.テトラフェニルシロール dendrimer
(Tetraphenylsilole(TPS) Dendrimer)

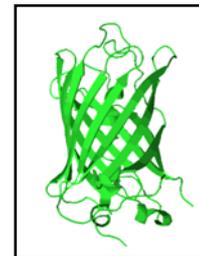


図 2.緑色蛍光タンパク質
(Green Fluorescent Protein:GFP)

【実験方法】 エンドサイトーシス促進ペプチド融合 GFP 変異体を親水部に持つミセルを作製、ヒト乳癌由来細胞 MCF-7 に添加後 3h と 24h で共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。ペプチド未融合の GFP によるミセルをコントロールとした。

【結果】 図 3 に示す通り、標的型ミセルを添加した細胞に優位な取り込みが見られた。このことから、標的への特異的な薬物輸送の可能性が示唆された。

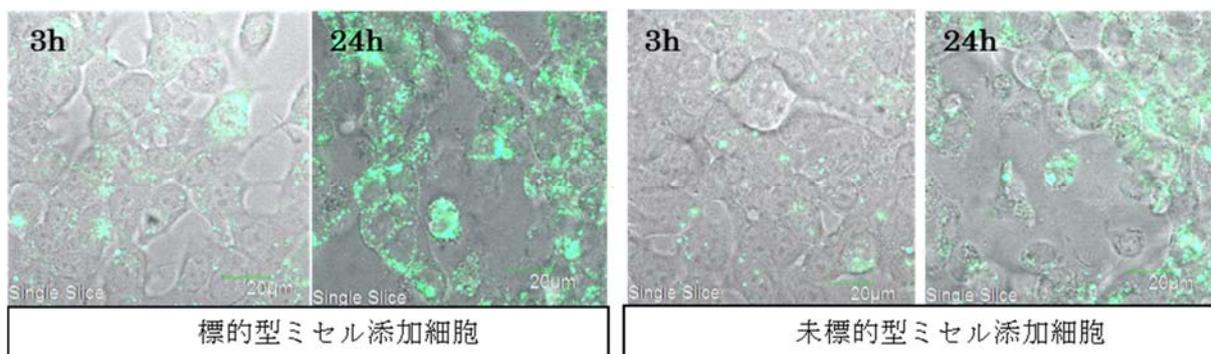


図 3.ミセル添加細胞の共焦点レーザー顕微鏡像

β-Sheet リッチタンパク質の蓄積した脳血管周辺領域における組織学的イメージング Histological imaging around brain blood vessel accumulated β-Sheet rich proteins

○小野田淳人^{1,2,3}、川崎平康⁴、築山光一^{4,5}、武田健²、梅澤雅和^{2,6}

(¹東理大院・薬、²東理大・研究推進機構・総研院、³学振 DC

⁴東理大・総研院・IR-FEL、⁵東理大・理・化学、⁶東理大・基礎工・材料工)

○Atsuto Onoda^{1,2,3}, Takayasu Kawasaki⁴, Koichi Tsukiyama^{4,5}, Ken Takeda², Masakazu Umezawa^{2,6}

(¹Pharm. Sci., Tokyo Univ. Sci., ²RIST, Org. Res. Adv., Tokyo Univ. Sci., ³JSPS Res. Fel., ⁴IR-FEL., Org.

Res. Adv., Tokyo Univ. Sci., ⁵Chem., Sci., Tokyo Univ. Sci., ⁶Mater. Sci., Ind. Sci. Tech., Tokyo Univ. Sci.)

大気中微小粒子 PM_{2.5} の一部を構成するナノ粒子は妊娠母体に曝露すると、胎児の脳に到達し、出生後も残留することが明らかになっている。そのため、ナノ粒子の胎児期曝露による次世代中枢神経系への影響を解明することが求められている。先行研究により、ナノ粒子の胎児期曝露は、産児の脳血管周囲細胞群に組織学的異常を引き起こすことに加え、脳血管周囲に β-Sheet 構造を多く含むタンパク質を蓄積することが示された。本研究は、脳組織の連続切片を作成し、赤外顕微分析と特殊染色および免疫染色を組み合わせることにより、脳血管周辺における β-Sheet リッチタンパク質の集積と脳血管周囲細胞群の組織学的変化との関わりを明らかにすることを目的とした。

炭素ナノ粒子 (CB-NP) 懸濁液を ICR 系マウスの妊娠 5, 9 日目に点鼻投与 (95 μg/kg) した。6 週齢児から全脳を摘出し、連続切片を作製して赤外顕微分析を行った。その切片と隣接した切片に PAS 染色と免疫染色 (Gfap, Aqp4) を施した。赤外顕微分析では、(株) 日本分光の IRT-7000 を用いて血管を中心に 7×7 区画 (1 区画: 30×30 μm²) の赤外吸収スペクトルを測定し、血管からの距離に応じて 4 つの組に分けて、タンパク質二次構造の定量解析とマッピング解析を行った。

赤外顕微分析の結果、CB-NP 曝露群において血管に近い領域ほど α-helix 構造の割合は低く、β-sheet 構造の割合は高いことが示された。とくに、CB-NP の曝露によって、アストロサイトの Gfap と Aqp4 の発現亢進が認められた血管周辺での β-sheet 構造は 27±2%、脳血管周囲マクロファージ (PVM) の変性が認められた血管周辺での β-sheet 構造は 22±1%であり、対照群の 15±1%に対して有意に増加した。一方で、CB-NP の胎児期曝露群において組織学的変化が認められない脳血管周辺では、β-sheet 構造は 18±2%であった。脳血管周辺における β-sheet 構造の増加は、産児脳での老廃物生成の亢進、または分解や排出の抑制が慢性的に起こっている可能性を示している。本研究により、その変化はアストロサイトの Gfap と Aqp4 の発現が亢進した血管周辺で顕著であることが明らかになった。水チャネルである Aqp4 は脳実質から血管周囲空間への老廃物の排出を担っており、CB-NP 曝露群における Aqp4 の発現亢進は蓄積した老廃物の排出を促進するためにアストロサイトが活性化したことを示唆している。裏付けるように、アストロサイト活性化マーカーである Gfap の発現亢進と Aqp4 の発現亢進はその局在が一致する。また、PVM は脳実質組織から排出された老廃物の除去を担う。PVM の変性が認められた血管周辺での β-sheet 構造の増加は、PVM の変性によって老廃物の除去が滞っている可能性を示唆している。本研究により、ナノ粒子の胎児期曝露が産児の脳血管周辺に誘起する β-sheet 構造の増加と血管周囲細胞の組織学的変化との間に強い相関があることが示された。ナノ粒子胎児期曝露によって血管周辺に蓄積する老廃物を同定することで、産児脳で認められる異常のメカニズムや疾患との関連性が明らかになると期待される。

イネのオートファジーのイメージングと発生・代謝制御における役割の解析

Imaging and roles of autophagy in reproductive development and metabolism in rice

○来須孝光^{1,2}、瀬良ゆり³、陶文紀³、澤田隼平³、花俣繁^{2,3}、坂本真吾⁴、小野聖二郎⁵、
岡咲洋三⁶、徳永京也⁷、小嶋美紀子⁶、榊原均⁶、斉藤和季⁶、野々村賢一⁵、小関泰之⁷、
光田展隆⁴、多田雄一¹、朽津和幸^{2,3}

¹東京工科大・応用生物、²東京理科大・イメージングフロンティアセンター、

³東京理科大・理工・応用生物科学、⁴産総研・生物プロセス、

⁵国立遺伝研・実験圃場、⁶理研・環境資源科学、⁷東京大・院・工・電気系

○Takamitsu Kurusu^{1,2}, Yuri Sera³, Bunki Toh³, Jumpei Sawada³, Shigeru Hanamata^{2,3}, Shingo Sakamoto⁴,
Seijiro Ono⁵, Yozo Okazaki⁶, Kyoya Tokunaga⁷, Mikiko Kojima⁶, Hitoshi Sakakibara⁶, Kazuki Saito⁶,
Kenichi Nonomura⁵, Yasuyuki Ozeki⁷, Nobutaka Mitsuda⁴, Yuichi Tada¹, Kazuyuki Kuchitsu^{2,3}

¹Sch. of Biosci. Biotech., Tokyo Univ. Tech., ²Imaging Frontier Center, Tokyo Univ. Sci.,

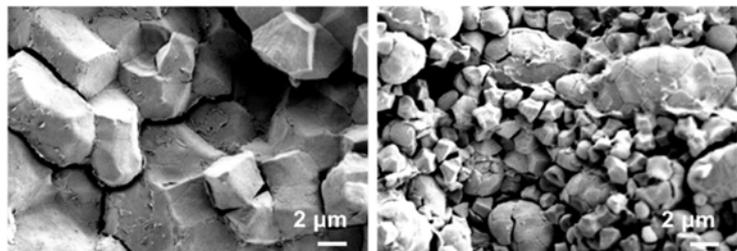
³Dept. of Appl. Biol. Sci., Tokyo Univ. Sci., ⁴Bioproduction Research Inst., NAIST,

⁵Experimental Farm, NIG, ⁶Center for Sustainable Resource Science, RIKEN,

⁷Sch. of Eng., Univ. of Tokyo

オートファジーによる細胞質成分の分解は、真核生物の発生・分化やプログラム細胞死(PCD)に重要な役割を果たす。葯のタペート細胞は花粉への脂質を含めた栄養供給を担う組織で、花粉成熟期に PCD により消失する。イネの小孢子一核期(PCD 開始期)のタペート細胞においてオートファジーが誘導される。またイネのオートファジー欠損変異株(*Osatg7-1*)では、タペート細胞の PCD が抑制され花粉形成不良による重篤な雄性不稔形質を示す(Kurusu *et al.*, 2014 *Autophagy*; Hanamata *et al.*, 2014 *Front. Plant Sci.*; Kurusu *et al.*, 2016 *Bioimages*)。一方、*Osatg7-1* において低頻度で稔実した種子は白濁し、澱粉蓄積に異常を示すくず米様の表現型を示したことから、オートファジーは、受精後のイネ登熟過程における栄養供給にも関与する可能性が考えられる。

本研究では、組織特異的プロモーターと GFP-ATG8 オートファジー可視化マーカータンパク質を組み合わせた定量的蛍光イメージング実験系及び誘導ラマン散乱顕微鏡イメージング実験系を構築し、花粉発達期におけるタペート細胞内のオートファジーや脂質動態を詳細に解析した。また、葯のトランスクリプトームや PCD 変異体による遺伝子発現解析の結果や、タペート細胞の PCD 制御におけるオートファジー誘導、活性酸素(ROS)シグナル、転写ネットワークの相互関連性について報告する。併せて、葉や登熟種子等の各器官・発達ステージの脂質成分や植物ホルモン、糖成分の解析結果についても報告し、糖(澱粉)・脂質代謝制御や、種子登熟等のイネ生活環全般におけるオートファジーの生理学的役割についても議論する。



図：イネ登熟種子の胚乳断面の SEM 解析。

オートファジー欠損変異株 *Osatg7-1*(右)では、野生型株(左)に比べて澱粉粒の微細化が観察される。

変異型 cryptogein を用いたタバコ培養細胞 BY-2 の二段階の免疫応答機構の解析
**Analyzing the interrelationship between the two layers of defense responses
 using a mutant cryptogein in tobacco BY-2 cells**

○花俣 繁¹、竹内 希枝²、大島 知樹²、吉田 亜祐美²、瀬尾 茂美³、光原 一朗³、
 来須 孝光^{1,4}、朽津 和幸^{1,2}

¹東京理科大・イメージングフロンティアセンター、²東京理科大・理工・応用生物学、
³農研機構・生物機能利用、⁴東京工科大・応用生物

○Shigeru Hanamata¹, Kie Takeuchi², Tomoki Oshima², Ayumi Yoshida², Shigemi Seo³, Ichiro Mitsuhashi³,
 Kurusu Takamitsu^{1,4}, and Kazuyuki Kuchitsu^{1,2}

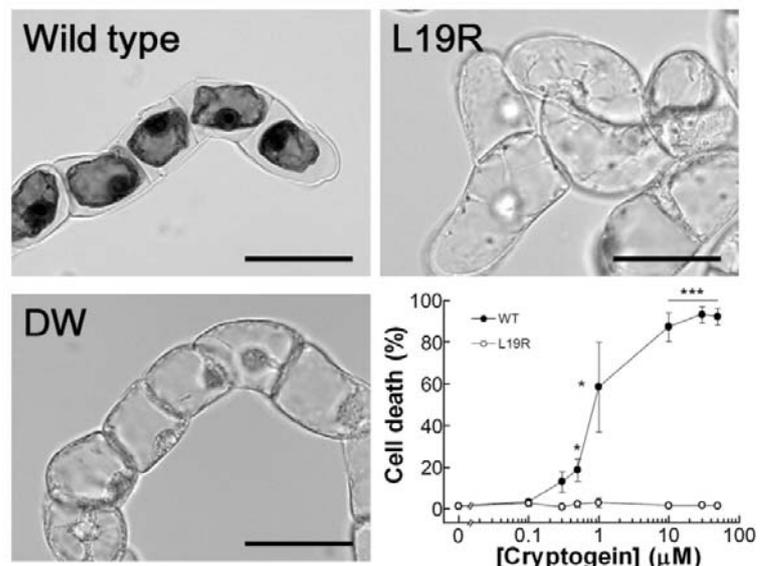
¹Imaging Frontier Center, Tokyo Univ. Sci., ²Dept. of Appl. Biol. Sci., Tokyo Univ. Sci.,

³National Institute of Agrobiological Sci., ⁴Sch. of Biosci. Biotech., Tokyo Univ. Tech.

タバコ培養細胞 BY-2 に卵菌由来のタンパク質 cryptogein を処理する植物免疫応答のモデル実験系において、処理後数分で細胞質の Ca^{2+} 濃度上昇等の種々のイオンフラックスや一過的な活性酸素種(ROS)の生成等の初期応答が誘導され、その後持続的な ROS の生成・防御関連遺伝子の発現・細胞周期停止を含む強い感染防御応答(後期応答)や過敏反応様のプログラム細胞死(PCD)が誘導される。後期応答や PCD は初期応答と異なり、細胞周期依存的で、cryptogein の継続的な処理を必要とする (Kadota *et al.* Plant J. 2004; Plant Cell Physiol. 2004, 2005, 2006)。植物免疫応答や PCD 誘導機構の解明を目指して、変異型 cryptogein L19R (L19R)を用いて、cryptogein 誘導性の一連の応答を野生型 cryptogein (WT)と比較解析した。L19R は、初期の細胞内 Ca^{2+} 濃度、pH 変化や一過的な ROS 生成、一過的な MAP kinase (MAPK)の活性化を誘導したが、持続的な細胞内外の pH 変化、ROS の生成、MAPK の活性化、WRKY 転写因子と防御関連遺伝子の発現、細胞周期の停止、PCD(下図参照)を誘導しなかった。一連の後期応答は高濃度の L19R 処理でも誘導されなかったが、細胞内膜交通系の制御に参与する PI3 キナーゼ阻害剤を前処理すると、L19R でも誘導が見られた。

以上から、PCD の誘導には一過的な ROS の生成や MAPK の活性化等の初期応答だけでは不十分であり、応答の持続性を担保する二段階目のシグナル伝達系の活性化が必要なこと、この活性化には細胞内膜交通系が重要な役割を果たす可能性が示唆された。cryptogein の細胞内動態のイメージング解析を進めている。

図： cryptogein 処理後 24 時間のタバコ BY-2 細胞を Evans Blue により染色。Scale bars = 50 mm.



カーボンナノチューブの近赤外蛍光を用いたマウス気道イメージング
Mouseairway imaging by using near-infrared fluorescent carbon nanotube

○梅澤雅和^{1,2}、関山翔太²、飯泉陽子³、上村真生^{1,2}、岡崎俊也³、曾我公平^{1,2}

¹東京理科大学研究推進機構総合研究院、²東京理科大学基礎工学部材料工学科、

³産業技術総合研究所ナノチューブ実用化研究センター

○Masakazu Umezawa^{1,2}, Shota Sekiyama², Yoko Iizumi³, Masao Kamimura^{1,2},

Toshiya Okazaki³, Kohei Soga^{1,2}

¹RIST, Organ. Res. Adv., Tokyo Univ. Sci., ²Dep. Mater. Sci. Technol., Fac. Ind. Sci. Technol.,

Tokyo Univ. Sci., ³CNT-Appl. Res. Cent., AIST

本研究では、生体深部のイメージングに有効である近赤外蛍光体としてカーボンナノチューブ (CNT) を用いたマウスの気道イメージングを試みた。気道は鼻腔、咽頭、気管支及び肺胞などからなり、呼吸器としての役割を担う生体器官である。胸部の非侵襲的イメージングは、X線レントゲン撮像による肺結核の検出や、核磁気共鳴画像法 (MRI) 及び陽電子断層撮影法 (PET) による肺がんの検出に例があるが、いずれも気道内を撮像するものではない。肺外から気道を可視化する技術は、慢性閉塞性肺疾患のように気道が閉塞する呼吸器疾患の診断や治療を前進させると期待される。しかし、胸骨に囲まれ複雑な肺胞領域を持つ気道は光損失が起りやすく、先行研究においてその非侵襲的画像解析は困難であった。本研究では、近赤外蛍光強度の高いエポキシド型酸素ドーブ単層 CNT (*Iizumiet al. 2016) の気道イメージングへの適用性を検証した。

カイラル指数 (6,5) の単層 CNT (Cat. No. 704148; Sigma-Aldrich) を、紫外線照射下でオゾンと反応させ酸化した。これをsodium dodecylbenzenesulfonate(SDBS) 水溶液に分散させ、超遠心分離により凝集体を除いた。CNTの生体適合性を向上させるために、複数回のスピнкаラム洗浄により SDBS を N-(Carbonyl-methoxypolyethyleneglycol 2000)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DSPE-PEG2k) に置換し、PEG化CNT (CNT-PEG) を得た。体毛を除いたマウス成獣の鼻腔内もしくは静脈内に CNT-PEG 分散液を投与し、その気道への移行を可搬型*in vivo*近赤外蛍光イメージングシステム SAI-1000 (島津製作所) により検出し、撮像した。また、マウスの気管に非開胸下でカニューレを挿入し、気管に満たした CNT-PEG 分散液の体外からの可視性を検証した。

CNT-PEG は波長 980 nm の光による励起により、1050~1300 nm の蛍光を示した。カニューレを通してマウスの気管に投与した CNT-PEG の近赤外蛍光は、体外から SAI-1000 にて検出可能であった。CNT-PEG をマウスの鼻腔内に投与すると、その鼻腔及び気管への移行が近赤外蛍光により非侵襲的に観察された。CNT-PEG をマウスの静脈内に投与した場合には、これが 50 分間以内に肺の毛細血管に集積した。ただし、いずれにおいても CNT-PEG の近赤外蛍光を胸骨を通して観察することはできなかった。また、CNT-PEG は DSPE-PEG_{2k} 水溶液もしくは蒸留水中では良好な分散状態を保った一方で、生理食塩水中では凝集体を形成した。以上、気道全体のイメージングならびに蛍光体の等張液中分散が課題であるが、本研究では蛍光強度の大きい CNT-PEG によるマウス気道の非侵襲的イメージングに成功した。

*Y. Iizumiet al. Abstracts of The 50th Fullerenes-Nanotubes-Graphene General Symposium (2016) p.22

希土類添加 Y₂O₃ ナノ蛍光プローブの作製と NIR・CL 顕微鏡観察Synthesis of rare-earth doped Y₂O₃ nano-probes for NIR and CL bio-imaging○新岡 宏彦¹、福島 昌一郎¹、古川 太一²、三宮 工³、三宅 淳¹、橋本 守¹¹大阪大学基礎工学研究科、²大阪大学ナノセンター、³東京工業大学物質理工学院○H. Niioka¹, S. Fukushima¹, T. Furukawa², T. Sannomiya³, J. Miyake¹ and M. Hashimoto¹¹Osaka University, Graduate School of Engineering Science, ²Osaka University, Institute for NanoScience Design, ³Tokyo Institute of Technology, School of Materials and Chemical Technology

光・電子相関顕微鏡法(CLEM)は、同一の試料を光学顕微鏡と電子顕微鏡で観察し、どちらか一方の顕微鏡を用いた場合よりもより多くの情報を得ることが可能な方法である。我々は、電子線照射によって発光(CL:Cathodoluminescence)を呈し、近赤外(NIR)光照射によって近赤外領域の発光を呈する蛍光プローブの作製を行った[1]。これにより、電子顕微鏡像を蛍光顕微鏡のようにカラーにし、近赤外光を用いることで生体深部観察が可能になり、CLEM のような相関顕微鏡法への応用も可能であると考えられる。

粒径約 50 nm の Y₂O₃:Tm,Yb 及び Y₂O₃:Er,Yb ナノ蛍光プローブを均一沈殿法により作製した。それぞれ、980 nm レーザー励起により 800 nm 及び 1540 nm 付近の発光を呈した。Y₂O₃:Tm,Yb を導入した HeLa 細胞を、生体模倣材料(2% intralipid)を通して顕微鏡観察したところ、1.5 mm 深部イメージングに成功した(図 1)。また、Y₂O₃:Tm,Yb 及び Y₂O₃:Er,Yb ナノ蛍光体は、電子線照射により、それぞれ 460 nm 及び 660 nm 付近の CL 発光を呈した。STEM-CL によるイメージングデータを図 2 に示す。STEM 像と比べて、CL 像においても同様の空間分解能でプローブが観察されている。さらに、細胞内に導入したナノ粒子のマルチカラーSTEM-CL イメージングに成功した。

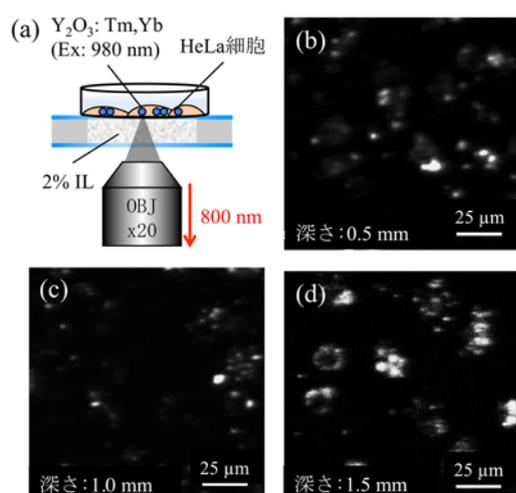


図 1 (a)生体模倣材料を通した細胞の観察(b)-(d)深さ 0.5-1.5 mm における細胞の蛍光像

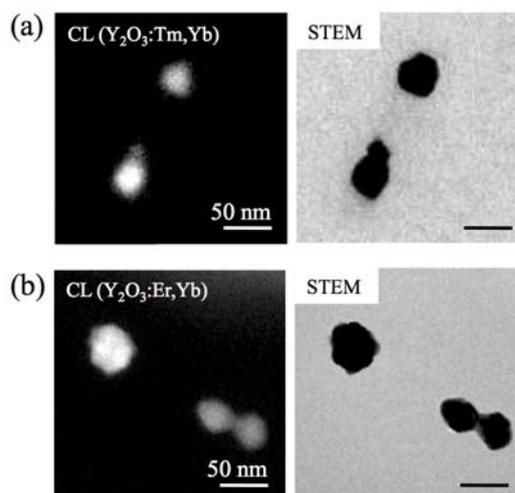


図 2 (a)Y₂O₃:Tm,Yb の CL 及び STEM 像(b)Y₂O₃:Er,Yb の CL 及び STEM 像

参考文献

[1] S.Fukushima *et al.*, *Optical Materials Express*, **6**, 831-843 (2016)

Integrin α_4 -CFP/integrin β_1 -YFP における FRET 効率の改善Improvement of FRET efficiency between integrin α_4 -CFP and integrin β_1 -YFP

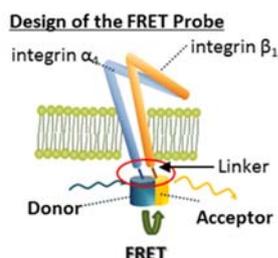
○野村祥子、樋口ゆり子、杉原有香、山下富義、橋田充

京都大学大学院薬学研究科

○Shoko Nomura, Yuriko Higuchi, Yuka Sugihara, Fumiyoshi Yamashita, Mitsuru Hashida

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

【目的】インテグリン α_4 及び β_1 の二量体である VLA-4 は、血管内皮に発現する VCAM1 と結合すると、bent 型から extended 型に立体構造が変化する。その結果、bent 型と比べて extended 型の方が、細胞内においてインテグリンの各 C 末の距離が離れる。この分子間の構造変化を利用して、インテグリン α_4 及び β_1 の C 末端にそれぞれ CFP または YFP を結合すると、VCAM1 の結合により FRET が解消する (J Immunol. 183, 359-369, 2009)。本研究では、円順列変異を導入した YFP や硬さの異なるリンカーを導入し、インテグリン α_4 -CFP/インテグリン β_1 -YFP における FRET 効率を比較した。



(表 1)

Integrin	CFP or YFP	Linker
integrin α_4	mTurquoise (Tq)	polyproline helix (22aa)
		(GGGGS) ₃ (BSC)
integrin β_1	mVenus	polyproline helix (22aa)
		(GGGGS) ₃ (BSC)
	cp173mVenus	polyproline helix (22aa)
		(GGGGS) ₃ (BSC)

【方法】インテグリン α_4 の N 末端に CFP (mTurquoise (Tq)) を、 β_1 の N 末端に YFP (mVenus 又は円順列変異を導入した cp173mVenus) を融合したタンパク質を発現させるベクターを作製した。インテグリンと α_4 または β_1 の間に polyproline helix (22aa または 15aa) または、(GGGGS)₃ (BSC) の硬さの異なるリンカーを挿入した。colon-26 細胞にインテグリン α_4 -CFP/インテグリン β_1 -YFP を発現させ、VLA4 のリガンドである VCAM-1 添加前後の CFP および YFP の蛍光を蛍光顕微鏡 (ECLIPSE Ti, Nikon; ORCA-D2, 浜松ホトニクス) で撮影し、3 フィルター法で FRET 効率を算出した。

【結果・考察】インテグリン α_4 -22a-Tq/インテグリン β_1 -15aa-mVenus とインテグリン α_4 -22a-Tq/インテグリン β_1 -15aa-cp173mVenus を比較すると、後者において FRET 効率が高かった。分子内 FRET プロブにおいて、円順列変異の導入により、単量体化のために CFP および YFP に導入されたりジン間における静電的反発を回避できる可能性が示されており (ACS Chem Biol. 5, 215-222, 2010)、本分子間 FRET においても同様の現象により FRET 効率が改善された可能性が考えられる。一方、cp173mVenus をアクセプターとして硬さの異なるリンカーの各組み合わせ (表 1) における FRET 効率を比較すると、BSC と 22aa または BSC と 15aa の場合に最も FRET 効率が高く、次に 22aa と 15aa の場合、最後に BSC と BSC の場合は最も効率が低かった。以上、インテグリン α_4 -CFP/インテグリン β_1 -YFP の FRET 効率の改善において、円順列変異の導入および、CFP と YFP 間のある程度の自由度を与えることが有効であることが明らかとなった。

グルコース残基を目印とした糖タンパク質プロセッシング機構の構造基盤
Structural basis of glycoprotein processing mechanisms mediated by glucose tagging

○佐藤匡史^{1,2}, Tong Zhu^{1,3}, 年森隆泰^{1,3}, Gengwei Yan^{1,3,4}, 山口拓実^{1,3,5},
 上久保裕生⁶, 内橋貴之⁷, 加藤晃一^{1,3,4}

¹名市大・院薬, ²JST・さきがけ, ³自然科学研究機構・岡崎統合バイオ, ⁴総研大・物理科学,
⁵北陸先端大・マテリアル, ⁶奈良先端大・物質創成科学, ⁷金沢大・理工

○Tadashi Satoh^{1,2}, Tong Zhu^{1,3}, Takayasu Toshimori^{1,3}, Gengwei Yan^{1,3,4}, Takumi Yamaguchi^{1,3,5},
 Hironari Kamikubo⁶, Takayuki Uchihashi⁷, Koichi Kato^{1,3,4}

¹ Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya City Univ, ²JST, PRESTO, ³Okazaki Inst. Integ. Biosci.,
 NINS, ⁴Sch. Phys. Sci., SOKENDAI, ⁵Sch. Mater., Sci., JAIST, ⁶Grad. Sch. Mater., Sci., NAIST,
⁷Dep., Phys., Kanazawa Univ.

アスパラギン結合型糖鎖（以下、N型糖鎖と表記する）は、細胞内におけるタンパク質の品質を管理する目印として働いている。すなわち、糖タンパク質の細胞内運命は、一連の糖転移および糖加水分解酵素によって生み出される様々な糖鎖プロセッシング中間体と、それらを見分ける様々な細胞内レクチンとの相互作用を通じて決定されている。とりわけ小胞体におけるタンパク質の品質管理においては、新生タンパク質に結合したN型糖鎖の末端に付加されるわずか1残基のグルコース残基の有無を目印として、タンパク質の品質が見分けられている。

本研究では、小胞体品質管理機構において中心的な役割を担う2つの鍵酵素、すなわちN型糖鎖のグルコース残基の付加を触媒するUDP-グルコース糖タンパク質糖転移酵素（UGGT）と、グルコース残基の切除を触媒するグルコシダーゼIIを主な対象として、X線結晶構造解析、NMR解析、X線小角散乱、高速原子間力顕微鏡（AFM）解析を縦横に活用した関連構造解析を行った。その結果、グルコシダーゼIIでは、触媒サブユニットと2つの異なるグルコシル化糖鎖の複合体の結晶構造を決定することに成功した。これにより、触媒サブユニットの活性部位は2つのサブサイトを含む瓢箪型の深いポケットから構成されていることが判明し、2段階の脱グルコシル化反応は連続して起こらないことが示された。一方、X線小角散乱と高速AFMを組み合わせた解析を通じて、UGGTは大きなフォールディングセンサー領域と小さな触媒ドメインが柔軟なリンカーを介して繋がれた構造の描像を捉えた。また、バイオインフォマティクスおよびX線結晶構造解析などの結果から、フォールディングセンサー領域はチオレドキシリン様ドメインが3つタンデムに繋がったマルチドメイン構造を形成していることを見出した。

以上本研究を通じて、小胞体品質管理機構において新生糖タンパク質のN型糖鎖のグルコース残基の付加と切除を行う2つの鍵酵素の作動機構を明らかにした。すなわち、グルコシダーゼIIは特徴的な基質結合ポケットを介して、糖タンパク質がモノグルコシル化糖鎖を認識するシャペロンと相互作用するための猶予時間を与えているものと推測された。また、UGGTは幅広い疎水性パッチを持つ柔軟なマルチドメイン構造を介して、疎水性コアを露出した変性糖タンパク質を認識するメカニズムを見出した。

自己再生産する油滴システムを利用したベシクルの形成
Formation of vesicles using self-reproducing oil droplet system

○栗原顕輔^{1,2,3}

¹ 岡崎統合バイオサイエンスセンター、² 分子科学研究所、³ 東京大学複雑系生命システム研究センター

○Kensuke Kurihara^{1,2,3}

¹ Okazaki Institute for Integrative Bioscience, ² Institute for Molecular Science, ³ Research Center for Complex Systems Biology, The Univ. of Tokyo

イミダゾール塩酸塩を担持したアルデヒドの分散液とオクチルアニリンを混合すると、径 10 μ m 程度の油滴が自発的に形成した。この油滴は、アニリンと触媒性アルデヒドの脱水縮合によりイミンを生成し、その生成したイミンがさらに脱水縮合を触媒する自己触媒油滴システムであり、この油滴は触媒性アルデヒドを取り込みながら第三世代ほど自己再生産したことがわかった。次に、この自己触媒油滴システムに、オクチルアニリンとはあまり反応しない非触媒性アルデヒド分子を添加した。その結果、油滴内で合成された触媒分子がオクチルアニリンと非触媒性アルデヒドの脱水縮合を促進させて、イミン結合を持つ両親媒性分子を分子集合体内部で合成した。この両親媒性分子は、油滴中のオクチルアニリンと徐々に置き換わることで、水中で速やかに自己集合しジャイアントベシクルを形成した。

本研究では、自己触媒油滴システムに非触媒性アルデヒド分子を添加することで、随意に三成分ベシクルを構築できるというベシクル調製法だけでなく、既存の自触媒自己再生産油滴システムを「足場」とし、よりロバスタな自己再生産するベシクルシステムを構築できることから、新規のプロセスにより境界を構築するプロトセルモデルを提案できたと見えよう。

Amyloid fibril formation in giant vesicle

○Tong Zhu¹, Kensuke Kurihara^{1,2,3}

¹ Okazaki Institute for Integrative Bioscience, ² Institute for Molecular Science, ³ Research Center for Complex Systems Biology, The Univ. of Tokyo

To explore the boundary between living and non-living matters, the constructive biology approach is fascinating nowadays. By means of extracting the minimum factors of a certain cellular phenomenon into the cell-mimicking giant vesicles so that the universal principle of life could be inspected. In this study we focused on the actin filaments, which is one of the three cell skeleton components and allows the cells to adopt different shapes and perform different functions. Since the amyloid beta peptides tend to form fibril that is similar to actin filaments in terms of structures and sizes, herein we attempted to use amyloid beta peptide as a model for studying the influence of the fibril formation on giant vesicles.

■ 公開講座 ■

「分子から心まで観るバイオイメージング」

化学の力で見えないがんを見つける

Finding out tumor regions with novel chemistry-based tools

浦野泰照^{1,2,3}¹ 東京大学大学院薬学系研究科、² 東京大学大学院医学系研究科、³ AMED CREST

「モノを見る」。これは科学の最も基本的な観察作業の一つです。皆さんも小さな頃から理科の授業で、様々な観察対象試料（動物や植物など）の特徴を見て、スケッチをした経験があると思います。でも、この観察には大きな前提条件があります。それは観察対象に色が付いていて、目で見て見えることです。

例えば、ここに砂糖水と食塩水があるとします。これを目で見て区別することが出来るでしょうか？ もちろん答えは NO です。両方ともに全くの無色透明な液体なので、見てこれを区別することは出来ません。

では目で直に見るのではなく、ものすごく高倍率に拡大して観察することが出来る、最新鋭の光学顕微鏡を使ったら見えるでしょうか？ 例えば仮に、原子レベルの大きさの粒子が見える顕微鏡があったとしたら、この二つの溶液を顕微鏡で区別できるでしょうか？ 答えはやはり NO です。砂糖水に含まれるショ糖、食塩水に含まれる塩化ナトリウムは、いずれも無色透明な物質なので、どんなにこれを拡大しても顕微鏡で見ることが出来ません。（結局、この二つの溶液を区別したければ、一番確実な方法は舐めてみることでしょう。）

ところが、オレンジジュースと食塩水は誰でも区別が出来ます。またオレンジジュースとトマトジュースも簡単に誰でも区別が出来ます。これはオレンジジュースにはβ-クリプトキサンチンという黄色の物質が、トマトジュースにはリコピンという赤色の物質が含まれているからです。このように、様々な観測対象試料の特徴を知ったり、区別したりするためには、色が付いていることが非常に重要になります。

それでは色が付いていない観測対象試料を観察することは出来ないのでしょうか？ これももちろん答えは NO で、例えば電子顕微鏡や原子間力顕微鏡を使えば、色が無い物質であってもこれを観察すること可能です。ただしこれらの顕微鏡で観察するためには、観測対象試料を真空中に置くなどの操作が必要で、医学・生物学研究で重要となる「生きている」状態の試料をそのまま観測することは出来ません。そこで次なるやり方として、「無色透明の観測対象物質であっても、これに色を付けることができれば観察できるようになるのでは？」というアイデアが出てきます。例えば上記の砂糖水の例で言えば、ショ糖に選択的に結合する色素を開発できれば、無色透明なショ糖を観察できるようになるのではないかと、ということです。

ここからは、具体的にがん細胞を検出する話を進めていきたいと思えます。先ほどの砂糖水と食塩水の例は、正常細胞とがん細胞の例えとして出しています。つまり全ての細胞は、その構成する物質（核酸、タンパク質、脂質、糖類、イオンなど）はほとんど無色透明なので、細胞自身も無色透明です。よって患者さんの体内で、がん細胞を生きている状態で発見するためには、がん細胞にだけ色を付ける必要が出てきます。

これまでは色を付けるという話をしてきましたが、実際には通常の色ではなく、蛍光色を付け

ます。これは、蛍光は蛍光ペンの例でも実感できるように、ただの色よりも目立つ＝高感度な観測が出来るためです。(原理的には、約10万倍高感度になります。) あとは、がん細胞に蛍光色を付ければ良いだけなので、例えばがん細胞に集まりやすい物質に蛍光色素を結合させた物質(=診断薬)を開発すれば、がんのイメージングは達成できると考えがちですが、実はこれではがん細胞を正常細胞

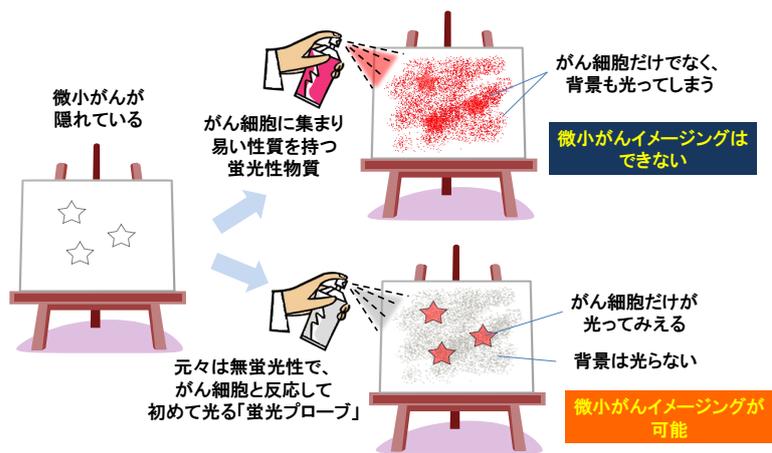


図1:がん細胞に集まりやすい性質を持つ蛍光色素では、がんイメージングはできない → 「蛍光プローブ」の重要性

と区別して観察することは出来ません。図1上の例を見ると分かるように、この診断薬は確かにがんだけに集まる性質を持っていても、体内に注射などで入れた診断薬の全てががんにも集まるわけではなく、血中や細胞間隙などにも分布してしまいます。よって診断薬が最初から蛍光性であると、がん以外の部分からも強い蛍光が観測されてしまい、特にmmオーダーの微小がんの検出は極めて困難です。

ここでさらに一段高機能化した分子として、最初は無蛍光性で、これががん細胞に特徴的な環境に出会うと蛍光性へと変化する「蛍光プローブ」という物質を開発すれば、微小がんのイメージングが達成できます(図1下)。この実現には、がん選択性と蛍光特性の変化という二つの要件を満たすように、蛍光プローブを精密に設計する必要があります。我々は蛍光特性の精密制御を実現する様々な分子設計法をこれまでに確立し、がん細胞で活性が高くなっているγ-グルタミルトランスぺプチダーゼ(GGT)という酵素に出会うことで初めて蛍光性を発揮する、gGlu-HMRG という蛍光プローブの開発に成功しました(図2a)。これを活用することで、がんが疑われる部位にこの蛍光プローブを噴霧するだけで、1mm以下の微小がんであってもこれを明確に検出できることが明らかとなりました(図2b,c)。

本市民講演会ではプローブ設計法の概略から、マウスモデルや臨床検体でのがんイメージングの具体例を、わかりやすく解説します。

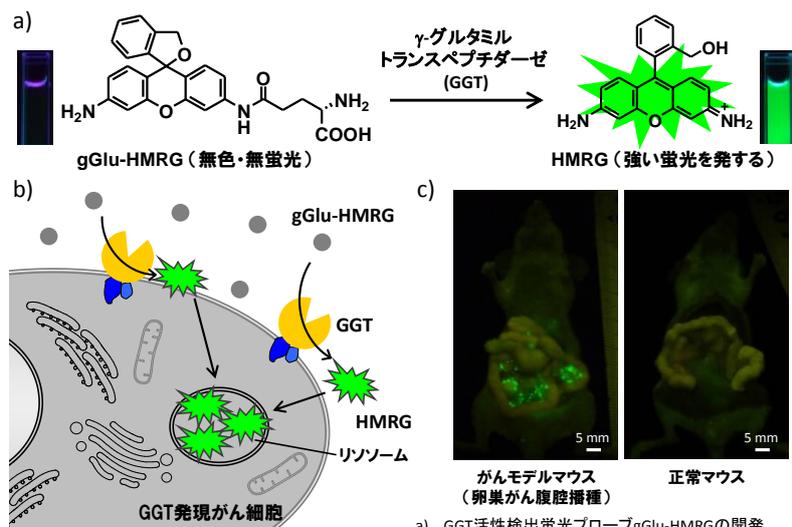


図2:新規GGT活性検出蛍光プローブの開発による、微小がんのin vivo迅速検出の実現

a) GGT活性検出蛍光プローブgGlu-HMRGの開発
 b) gGlu-HMRGによるGGT発現がん細胞検出機構
 c) gGlu-HMRG水溶液を腹腔内投与し、10分後に開腹し、フィルターを装着した市販のデジカメラで撮像した蛍光像。左: 卵巣がん腹腔播種モデルマウス 右: がんのない正常マウス
 Urano Y, et al., Sci. Transl. Med., 2011, 3, 110ra119.

Life is smallースマホ顕微鏡が拓くマイクロ世界ー
 Life is smallーA microworld opened by smartphone microscopyー

永山國昭

総合研究大学院大学 理事

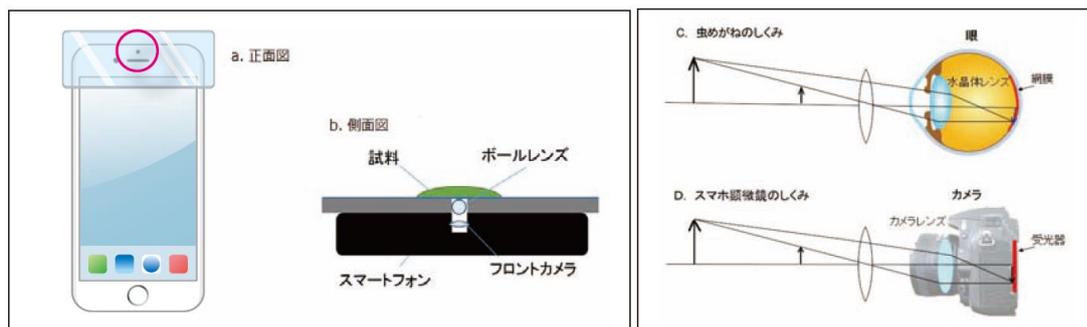
スマホ顕微鏡はマイクロ世界への窓です。350年前の世界最初の虫メガネ型顕微鏡と世界最先端機器スマートフォンのハッピーな出会いからイノベーション「スマホ顕微鏡」が最近生まれました。スマホ顕微鏡は、薄くて小さなデバイスですが、スマホの協力を得てマイクロ世界に息づく小さな生き物や微粒子を身近にする力を秘めています。Life is small. この深奥なマイクロ世界の探検をいつでも、どこでも、だれにでも手軽にできるようにしたのがスマホ顕微鏡です。スマホ顕微鏡の応用として精子チェッカーが販売されるというニュースも最近聞かれました。本講演では、実演をまじえスマホ顕微鏡が拓くマイクロ世界についてご案内いたします。

スマホ顕微鏡の開発

いわゆる顕微鏡は、イギリスのロバート・フックにより約350年前に世に広まりました。そのロバート・フックと同時代オランダのアントニー・レーウエンフックは、微小レンズ（1～3mm）の拡大作用を用いてマイクロの世界を観察していました。私はアウトリーチ活動として2001年より小、中、高校での出前授業を行ってきましたが、子供達に手頃な顕微鏡を与え、自らの手で観察できないかと考え、このレーウエンフックの顕微鏡を現代風にモデルチェンジし、用いました。

既に述べましたが、人間は極めて大きな生物です。実に99%以上の生物種は人間より小さい、すなわち「生物は小さい」のです。顕微鏡は、小さな生物を見るために発明されました。このことを実感させるツールが出前授業用レーウエンフック型顕微鏡でした。出前授業をする中で「この性能と楽しさを万人に伝えたい」と思い始めました。そのためにはレーウエンフック型がロバート・フック型に敗れ、絶滅に至った理由「不便で難しい操作」を克服しなければなりません。人間の目をカメラに変えれば良いと考え、携帯電話との一体化を試みましたが、10年以上成功しませんでした。しかしスマートフォンの普及が進むのを見てこれを使えば良いのではと思い至り、共同開発者の伊藤さんと知恵を絞った結果、スマホへの付加レンズの位置をメインカメラ（背面）からインカメラ（前面）に変えることで使い勝手の良いスマホ顕微鏡が3年前に開発されました。

図1 スマホ顕微鏡の概観と仕組み（永山、寺田、長澤、竹下、佐藤「スマホ&タブレット顕微鏡を活用しよう！」



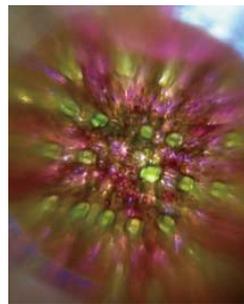
大日本
 図書よ
 り)

スマホ顕微鏡は透過型

スマホ顕微鏡は試料と対物レンズ間距離が1mm以下なので、カメラ側からの照明は困難です。照明光はむしろ試料の背後すなわちスマホの上方に位置したLEDライトにより与えられます。そのため光は試料を透過した後にカメラにとらえられることとなります。このタイプの採光を使用する顕微鏡は透過型顕微鏡と呼ばれます。これはモノの表面反射光をとらえる実体顕微鏡などとは全く異なる採光法です。具体例をいくつか例示します。

図2 スマホ顕微鏡像例 (永山、寺田、長澤、竹下、佐藤「スマホ&タブレット顕微鏡を活用しよう！」大日本図書より)

- a. ダンゴムシの頭 b. ダンゴムシの神経系 c. ムラサキゴテンの気孔 d. 大ミジンコ頭部



スマホ顕微鏡の広がり

2014年4月のスマホ顕微鏡Leyeの販売開始以来、スマホ顕微鏡は急速に普及しています。特にLife is smallグループをFacebook上に立ち上げて以来、多くの方がスマホ顕微鏡を楽しむようになりました(600人弱のメンバーが4000枚以上の顕微鏡写真を投稿中)。またLife is smallグループの中心的メンバーで構成されるLife is small Project (LISP)も昨年4月にスタート種々の活動をしています。さらに合同会社Life is small. Company (LisCo、リスコ)を今年7月に立ち上がり事業展開を図っています。現在ネット上に見られるスマホ顕微鏡関連サイトは下記のものがあります。皆さんの訪問をお待ちしています。

- Life is small (Facebookグループ)

<https://www.facebook.com/groups/life.is.small> ※アカウント登録が必要です

- Life is small Project (LISP)

Life is small の事業プロジェクト (非公開)

E-mail: life.is.small.project@gmail.com

- Life is small ホームページ

<http://www.life-is-small.com/>

- Life is small. Company (LisCo) ホームページ

<http://lifeissmall-company.tumblr.com/>

- 製品:Leye (<http://www.leye.jp>)、Leye mini (「スマホでカンタン顕微鏡」小学館ムック)

Leye mini キット(<http://lifeissmall-company.tumblr.com/>)

「3Dプリンターが可能にする『分子を見て、触って考える』過程」
3D printing technology brings seeing and tactile thinking of molecule of interest

○川上勝¹、中村昇太²、古川英光¹

¹山形大学理工学院 機械システム研究科、²株式会社スタジオミダス

我々の体を構成し、体の中で起る様々な化学反応を起こして生命活動を維持しているのは、タンパク質という分子です。生物学の究極の課題は、このタンパク質分子が、「どのような形をして」「どのように形をふるまうのか」を解明することです。これらを知ることで、我々は自分たちの体の仕組みを理解し、病気を治す治療法を開発したり、新しい機能をもった材料を開発したりすることができます。

タンパク質は、大きさが数ナノメートル（百万分の1ミリ）という、とても小さな分子で、その形を直接目や普通の顕微鏡で見ることにはできません。そこで研究者は、いろいろな方法を使って、分子の形を見る手法を開発してきました。現在では、分子を形成している原子一個ずつの情報までも詳細に知ることができるようになりました。

しかしながらタンパク質は、おびただしい数の原子で構成されていて、その構造は複雑に入り組んでいます。コンピュータグラフィックや、バーチャルリアリティ技術の発展によって、我々はタンパク質分子の形を「見る」ことが可能になってきましたが、それでも我々の頭脳では、複雑なタンパク質の構造を画像だけから深く理解することは非常に難しいことです。

そこで分子模型の出番です。模型は、実際に手に取り、触り、動かすことで、分子の形を直感的に知ることが可能です。現在の化学の授業ではこの分子模型が頻繁に使われています。また生物学史上、大発見の一つであるDNAの二重らせん構造の解明には、大きな分子模型を用いた議論がおおいに役立ったということです。これまでは、タンパク質の分子模型を作ろうとすると、タンパク質は膨大な原子からできていて、非常に複雑なことから、模型の製作はとんでもなく難しく、人手とお金がかかるものでした。

ところが近年、どんなに複雑な形状でも、一発で造形ができる、という夢のような装置、3Dプリンターが登場したことで、タンパク質の模型の製作は、容易に、安価になってきています。タンパク質分子模型を作り、手にすることが容易にできるようになることで、研究者は、自分の研究対象とする分子の模型を「見て」「触って」理解することで、その構造をより深く理解でき、研究を進めるうえで大変に役立つことでしょう。また、その研究を他の人に伝えるときには、3Dプリンターで制作した分子模型が大いに役立つことでしょう。大学の講義でも、3Dプリンターを用いて製作された模型は、タンパク質の構造を知らない学生にとって、理解をおおいに助けるよい教材となることでしょう。

講演では、3Dプリンターとはどのような機械なのか、また、実際に3Dプリンターを使ってタンパク質の分子模型を製作するようすや、実際に出来上がった分子模型がどのような場所で、どのように用いられているのか、そして、分子模型以外にも、義手や、人間の臓器の模型など、3Dプリンターの模型が科学や医学、生活の質の向上に役に立っている様子をお伝えします。

3DCG が医療を変え…る？

3DCG innovates medicine..., wait, is that true?

瀬尾 拓史

株式会社サイアメント

3D プリンタを使ってヒトの臓器の 3D モデルを出力したり、ヘッドマウントディスプレイを顔に装着して自分が身体の中にいるような感覚になっていたりする姿を、ニュースや雑誌などで見たことのある方も多いと思います。

何だか格好良いし、凄そうだし、時代の最先端っぽいし、メチャクチャ役に立っていそうですね。

でも、ちょっと冷静に考えてみましょう。

お医者さんは、「格好良いから」3D プリンタで臓器 3D モデルを出力するわけではありません。

手術や治療などで役に立ちそうだと思うのであれば、いくら格好良くても意味がありません。

また、もし役に立ちそうでも、作るのにあまりにも手間がかかったり、装置を揃えるのがとても大変だとしたら、広く色々なところで使われるのはなかなか難しいでしょう。

問題なく実用化出来そうなのか、何かまだ課題が残っているのか、そのあたりを一步引いて考えてみませんか？

3D プリンタの性能が上がれば、より精度の高い臓器出力を行うことが出来、ヘッドマウントディスプレイの性能が上がれば、より詳細な部分まで 3D 臓器をあらゆる角度から確認することが可能となる…わけでは全くありません。

3D プリンタ出力するための、或いはヘッドマウントディスプレイを通じてあらゆる角度から確認するための人体・臓器の 3DCG データそのものの精度が上がらない限り、どれだけ装置・デバイスの性能が上がったところで、実用的なものは生まれません。

印刷機の性能が上がったからと言って、優れた小説が自動的に生まれやすくなるわけでは全くないですね。3D プリンタの優れた性能を活かすためには、そもそも 3D プリントするためのデータがしっかりしていなければいけないのです。

「最新の技術を使おう！」と意気込むのではなく、ある問題に対して最適な解決方法を色々吟味した結果、やはり最新の技術を使うことが最も良さそうだ、と思えたときに初めて、最新の技術は使われるべきなのです。

街中でもテレビでも、今や日常に溢れかえっている 3DCG。3D プリンタ出力もヘッドマウントディスプレイの利用も、3DCG を基にした取り組みです。では、3DCG は医療に本当に役立つのでしょうか？本講演では様々な具体例を出しながら、どのようなときに 3DCG が役に立つのか、或いは役に立たないのか、というようなことを、出来るだけわかりやすく、楽しくお話ししたいと思います。

コミュニケーション能力の神経基盤：イメージング手法によるアプローチ
Neural basis of social cognition: an imaging approach

定藤規弘

自然科学研究機構 生理学研究所

「私たち」がどのようにコミュニケーションを取りつつ人間の仲間入りを果たすのか、という問いは、急激な少子化、学級崩壊、引きこもり多発などから、大きな社会的関心を集めています。様々な社会的行動特性の脳内基盤は、機能的磁気共鳴画像（機能的 MRI）による非侵襲的脳機能画像を用いた研究の展開によって明らかになりつつあります。しかしそれらの研究の多くは、個人が単独で特定の課題を行っている時の活動を計測するものであり（I-mode）、コミュニケーションの特徴である「双方向性」(We-mode)の神経活動を計測するものではありませんでした。生理学研究所では、2台の MRI を用いて、コミュニケーションをとっている2名の神経活動を同時に計測することに成功しました。従前の1名を対象とする機能的 MRI ではわからなかった、「私たち」の脳科学(We-mode neuroscience)をご紹介します。

■ 発表者索引 ■

あ

青木一洋	特別講演
秋田佳恵	P-30
浅井知浩	S4-4
浅谷学嗣	P-38
安藤敏夫	S3-3
安藤弘宗	S1-3

い

飯泉陽子	P-44
飯野亮太	S3-1, P-5, P-11
伊香賀玲奈	P-26
五十嵐龍治	P-22, P-29, P-31
石田康平	P-10
石田彪馬	P-6
石渡大貴	P-11
市岡隆幸	P-25
市瀬悠	P-9, P-12
稲垣直之	S2-4
稲本奨平	P-17
井上敏	P-21
伊納義和	P-21
岩田尚樹	P-14

う

宇高 光	P-39, P-40
内橋貴之	S3-3, P-47
宇野真之介	P-33
宇野祥規	P-15
梅澤啓太郎	P-33
梅澤雅和	P-41, P-44
浦野泰照	K1, P-33
宇留賀仁史	P-24

お

王子田彰夫	S4-1
大島泰郎	S3-4
大島知樹	P-43
太田善浩	P-8
大東寛典	P-38
岡浩太郎	P-3
岡崎俊也	P-44
岡咲洋三	P-42
岡本教佳	P-18
小川順	P-7
荻野英賢	P-13
奥直人	S4-4
奥村翔	P-19
小関泰之	P-42
小田雄介	P-24
小野聖二郎	P-42
小野田淳人	P-41

か

加藤晃一	P-34, P-47
加藤有介	P-16, P-35
上久保裕生	P-47
上村真生	P-44
神谷真子	P-33
川上勝	K3
川久保愛美	P-26
川崎平康	P-41
菅野 巖	P-37

き

木内泰	S2-1
菊地和也	S1-4, P-1, P-2
北畑信隆	P-32

木村隆志	S3-4	柴田幹大	S3-3
		柴田みゆき	P-26
く		季 斌	P-37
朽津和幸	P-32, P-42, P-43	島 忠光	P-24
栗原顕輔	P-48	城地保昌	S3-4
来須孝光	P-42, P-43	白川昌宏	P-22, P-29, P-31
け		す	
源城拓哉	P-22	杉井むつみ	P-24
		杉原有香	P-46
こ		杉本雄生	P-8
鯉沼真吾	P-6	助川夏雄	P-32
高野修杜	P-40	洲崎悦子	P-27
侯峰	P-7	鈴木明大	S3-4
小島正樹	P-25	鈴木和男	P-35
小嶋美紀子	P-42	鈴木崇弘	P-21
古寺哲幸	S3-3	鈴木民恵	P-28
小俣大樹	P-24	鈴木則宏	P-37
小松崎良将	P-10	鈴木美穂	P-39, P-40
小松康雄	P-19	鈴木李夏	P-3
		鈴木亮	P-17, P-21, P-24
さ		須原哲也	P-37
斉藤和季	P-42	せ	
斎藤稔	P-10, P-14, P-15	瀬尾茂美	P-43
榊原均	P-42	瀬尾拡史	K4
坂本真吾	P-42	関山翔太	P-44
佐甲靖志	S1-2	瀬戸口裕二	P-9, P-12
佐々木章	奨励賞受賞講演	瀬良ゆり	P-42
定藤規弘	K5	千田知美	P-17
佐藤匡史	P-47		
佐原成彦	P-37	そ	
澤田隼平	P-42	曾我公平	P-44
三宮 工	P-45	外間進吾	P-29
し			
石玄	P-7		

た		富田裕	P-37
埜森大空	P-9,P-12	な	
高橋大輔	P-18	永井寛子	P-32
田川 聖一	P-38	中村彰彦	P-5, P-11
田桑弘之	P-37	中村顕	P-7
竹内希枝	P-43	中村昇太	K3
武田健	P-41	中村岳史	P-6
武田寛史	P-37	中山俊憲	P-13
田崎智之	P-11	長山恵理子	P-26
多田雄一	P-42	永山國昭	K2
立野玲子	P-18		
立松結花	P-1	に	
田中直子	P-26	新岡宏彦	P-38, P-45
田辺竜太郎	P-31	新野祐介	P-32
谷原元大	P-39	西田会友子	P-2
田之倉優	P-7	西野吉則	S3-4
田村勝	P-20		
		の	
ち		野中茂紀	S2-3
チェヒョンジン	P-8	野々村賢一	P-42
		野村祥子	P-46
つ			
築山光一	P-41	は	
柘植信吾	P-34	橋口小春	P-10
角田誠	S4-2	橋田充	P-46
		橋本守	P-45
て		長谷川明洋	P-13
寺田大紀	P-29	馳澤盛一郎	P-30
照井翔	P-6	幡野健	P-40
		花俣繁	P-42, P-43
と		幅菜摘	P-15
東ヶ崎健	P-28	濱崎雄太	P-14, P-15
陶文紀	P-42		
徳永京也	P-42	ひ	
年森隆泰	P-47	桧垣匠	P-30
飛田成史	P-33	樋口真人	P-37

樋口ゆり子	S4-3, P-46	光田展隆	P-42
日比慎	P-7	光原一朗	P-43
姫田美咲	P-34	蓑島維文	P-1
平嶋尚英	P-17, P-21	宮川拓也	P-7
平野悠	P-19	三宅淳	P-38, P-45
平山真也	S1-4	宮成 悠介	S1-1
		宮脇敦史	P-32
ふ			
福井清	P-16, P-35	む	
福井一	P-36	宗像理紗	P-24
福島昌一郎	P-45	村越秀治	S2-2
福田武司	P-39, P-40	村田和義	S3-2
福田光則	P-6	も	
藤原久志	P-27	望月 直樹	P-36
古川太一	P-45	森本康幹	P-25
古川英光	K3	両角明彦	P-33
古野忠秀	P-21	や	
へ			
別所義隆	S3-4	矢木宏和	P-34
ほ			
星田政行	P-9, P-12	山口拓実	P-47
堀田耕司	P-3	山下富義	P-46
堀雄一郎	S1-4, P-2	山城佐和子	S2-1
本多元	P-9, P-12	よ	
ま			
牧与志幸	P-19	横川慧	P-21
正本和人	P-37	吉田亜祐美	P-43
松熊祥子	P-28	吉原利忠	P-33
松田道行	特別講演	吉村愛菜	P-38
松村義隆	P-25	わ	
丸山一雄	P-24	和田直之	P-6
		渡邊直樹	S2-1
D			
み		Demura Mariko	P-23

I		Z	
Kodai Inoue	P-23	ZHU Tong	P-47
K			
Mikako Kubo	P-23		
Masaki Kojima	P-23		
L			
Ka Pik Lee	P-4		
M			
Maximilien Morice	P-11		
Yasumasa Morimoto	P-23		
Yoshitaka Matsumura	P-23		
O			
Naohito Ohno	P-23		
S			
Atsushi Sato	P-4		
Takashi Shibata	P-4		
Makoto Suminokura	P-23		
T			
Mitsuru Tashiro	P-23		
U			
Unga Johan	P-24		
V			
Akasit Visootsat	P-11		
Y			
YAN Gengwei	P-47		

■ 総会資料 ■

2016 年度 日本バイオイメーjing学会

総会資料

2016 年 9 月 6 日

日本バイオイメーjing学会

会長 川西 徹

会場： 名古屋市立大学薬学部 宮田専治記念ホールおよびキャンパスモール

議題： 2015 年度事業報告、2016 年度事業経過報告および 2017 年度事業計画

総会議案

各委員会より報告

1. 庶務報告
2. 財務報告
3. 会計監査
4. 企画委員会
5. 広報委員会「バイオイメーjing」
6. 編集委員会「Bioimages」
7. 集会委員会
8. 賞選考委員会
9. 研究助成選考委員会
10. 講習会委員会
11. 国際交流委員会
12. 新技術情報委員会
13. 男女共同参画委員会
14. 人事
15. その他

各委員会資料

1. 庶務報告(船津)

15 年度事業報告

- 1) 公開シンポジウム準備(第 24 回大会長と協力)
- 2) 会報などを各委員会と協力して発送
- 3) 公開講座、科学研究費補助金(研究成果公開促進費)15 年度申請(採択)
- 4) 会員情報の管理・更新

5) その他

16 年度事業経過報告

- 1) 会報などを各委員会と協力して発送
- 2) 会員情報の管理・更新
- 3) その他

17 年度事業計画

- 1) 会報などを各委員会と協力して発送
- 2) 講習会への協力
- 3) 公開講座、科学研究費補助金（研究成果公開促進費）17 年度申請
- 4) 会員情報の管理・更新
- 5) その他

2. 財務報告（岡）

15 年度財務報告

- 1) 収支のまとめ
- 2) 会員への会費振込依頼、入金確認等
- 3) 学術集会会場での会費徴収

16 年度財務経過報告

- 1) 収支のまとめ
- 2) 会員への会費振込依頼、入金確認等
- 3) 学術集会会場での会費徴収

17 年度財務計画

- 1) 収支のまとめ
- 2) 会員への会費振込依頼、入金確認等
- 3) 学術集会会場での会費徴収

3. 監査（大塩、大幡）

- 1) 監査結果の報告

4. 企画委員会（太田）

15 年度事業報告

- 1) 賛助会員への勧誘
- 2) 会報「バイオイメーキング」への広告勧誘（エーイー企画との連携）
- 3) エーイー企画（広告代理店）と連携し集会の展示、広告を担当

16 年度事業経過報告

- 1) 賛助会員への勧誘
- 2) 会報「バイオイメーキング」への広告勧誘（エーイー企画との連携）
- 3) エーイー企画（広告代理店）と連携し集会の展示、広告を担当

17 年度事業計画

- 1) 賛助会員への勧誘
- 2) 会報「バイオイメーキング」への広告勧誘（エーイー企画との連携）
- 3) エーイー企画（広告代理店）と連携し集会の展示、広告を担当

5. 広報委員会（朽津）

15 年度事業報告

- 1) 会報発行
和文誌「バイオイメーキング」第 24 巻 2 号まで発行
2 号：第 24 回学術集会のお知らせ
- 2) 和文誌「バイオイメーキング」の Web-site での公開
- 3) 投稿呼びかけ、各種公募、特集記事の充実

16 年度事業経過報告

- 1) 会報発行
和文誌「バイオイメーキング」第 25 巻 2 号まで発行
- 2) 和文誌「バイオイメーキング」の Web-site での公開
- 3) 和文誌「バイオイメーキング」の J-STAGE 掲載申請準備
- 4) 投稿（総説・解説、原著論文、研究室紹介等）呼びかけ、特集記事の充実

17 年度事業計画

- 1) 和文誌「バイオイメーキング」第 26 巻発行
- 2) 和文誌「バイオイメーキング」の Web-site での公開、和文誌ホームページの充実
- 3) 投稿呼びかけ（総説・解説、原著論文、研究室紹介等）、特集記事の充実

6. 編集委員会（小島）

15 年度事業報告

- 1) Bioimages Vol. 23 までの論文のアップロード完了
- 2) 英文誌「Bioimages」のホームページの改定

16 年度事業経過報告

- 1) Bioimages Vol. 24 の論文のアップロード準備中

17 年度事業計画

- 1) Bioimages Vol.25 の論文のアップロード
- 2) Bioimages Vol.9 (2001)以前のバックナンバーのオンライン化を継続
- 3) 編集・査読体制の充実
- 4) 投稿呼びかけ、奨励賞受賞者に対する総説依頼

7. 集会委員会（高松）

15 年度事業報告

第 24 回大会

日程：2015年9月26日（土）～28日（月）

会場：東京理科大学葛飾キャンパス

大会長：朽津 和幸（東京理科大学・理工学部）

- ・参加費： 一般(正会員：5,000 円、非会員：8,000 円)

学生(学部学生無料、会員大学院生 1,000 円、非会員大学院生 3,000 円)

- ・公開講座：(科学研究費補助金（研究成果公開促進費）)

「私たちの暮らしとバイオイメージング ～見えるからわかるバイオの世界～」

- ・参加費：（無料）

・会期：2015年9月26日(土) 12:00～17:10

- ・会場：東京理科大学葛飾キャンパス 図書館ホール及びホワイエ

16 年度事業経過報告

第 25 回大会

日程：2016年9月4日（日）～6日（火）

会場：名古屋市立大学薬学部 宮田専治記念ホールおよびキャンパスモール

大会長：加藤 晃一（(自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター、
名古屋市立大学・大学院薬学研究科)

- ・参加費： 一般(正会員：6,000 円、非会員：8,000 円)

学生(学部学生無料、会員大学院生 1,000 円、非会員大学院生 3,000 円)

- ・公開講座：「分子から心まで観るバイオイメージング」

主催：日本バイオイメージング学会、名古屋市立大学薬学研究科

共催：科学研究費補助金新学術領域研究「生命システムにおける動的秩序と高次機能」

- ・参加費：（無料）

・会期：2016年9月4日(日) 12:30～17:40

・会場：名古屋市立大学薬学部 宮田専治記念ホール

17 年度事業計画

第 26 回大会

日程：2017年 会期は未定

会場：未定（東京薬科大学キャンパスまたは周辺の会場を予定）

大会長：小島 正樹（東京薬科大学・生命科学部）

8. 賞選考委員会(浜口)

15年度事業報告

- 1) 奨励賞：新藤 豊（慶應義塾大学）

16年度事業経過報告

- 1) 奨励賞：佐々木 章（国立研究開発法人産業技術総合研究所）

17年度事業計画

- 1) 奨励賞：学会ホームページと和文誌「バイオイメージング」に、推薦のお願いを掲載予定

9. 研究助成選考委員会（新井）

特になし

10. 講習会委員会（加藤 薫）

15年度事業報告

- 1) 超解像イメージング講習会 2015

日時：2015年9月26日（土）

場所：筑波大学東京キャンパス文教校舎、東京大学医科学研究所、顕微鏡メーカーシヨールームなど

16年度事業経過報告

- 1) 特になし

17年度事業計画

- 1) 超解像イメージング講習会 2017（企画中）

場所：産総研（つくば）。1-2日の講習会を検討

11. 国際交流委員会（鈴木）

15年度事業報告

- 1) 特になし

16年度事業経過報告

- 1) 特になし

17年度事業計画

- 1) 特になし

1 2. 新技術情報委員会（小島 清嗣）

15 年度事業報告

- 1) 特になし

16 年度事業経過報告

- 1) 特になし

17 年度事業計画

- 1) 特になし

1 3. 男女共同参画委員会（洲崎）

15 年度事業報告

- 1) 男女共同参画学協会連絡会 13 期運営委員会に出席
- 2) 内閣府理工チャレンジ～女子学生・生徒の理工系分野への選択～ リコチャレ応援団体として参加
- 3) 第 24 回学術集会において「女子中高校生夏の学校での活動報告」をポスター発表
- 4) 女子中高校生夏の学校(8 月 6-8 日)、協賛及びポスター参加

16 年度事業経過報告

- 1) 男女共同参画学協会連絡会 14 期運営委員会に出席
- 2) 内閣府理工チャレンジ～女子学生・生徒の理工系分野への選択～ リコチャレ応援団体として参加、理工系女子応援ネットワークに参加
- 3) 女子中高校生夏の学校(8 月 6-8 日)、協賛

17 年度事業計画

同様の活動を継続予定

1 4. 人事

1 5. その他

審議事項：

- 1) 第 26 回学術集会の準備について
- 2) 役員の変更、名誉会員について
- 3) その他

2016年度の各委員会：名簿

○：委員長、Editor-in-Chief

1. 会 長 : 川西 徹
2. 副 会 長 : 浜口 幸久、船津 高志
3. 庶 務 : ○船津 高志
4. 財 務 : ○岡 浩太郎
5. 企 画 : ○太田 善浩、加藤 晃一、木原 裕、楠見 明弘、西村 智
* 公開講座の企画を含む（学術集会付設の公開講座は大会長が企画）
6. 広 報 : 池水信二、菊地 和也、○朽津 和幸、洲崎 悦子、曾我 公平、桧垣 匠、古野 忠秀
7. 編 集 : 大幡 久之、朽津 和幸、小島 清嗣、○小島 正樹、斎野 朝幸、洲崎 悦子、寺川 進
8. 集 会 : 岡 浩太郎、加藤 薫、○高松 哲郎
9. 賞 選 考 : 大塩 力、楠見 明弘、鈴木 和男、高松 哲郎、田之倉 優、寺川 進、○浜口 幸久
10. 研究助成選考 : ○新井 孝夫、川西 徹、鈴木 和男、船津 高志
11. 講 習 会 : 新井 孝夫、○加藤 薫、櫻井 孝司、企業から（カールツァイス、ニコン）
12. 国 際 交 流 : 朽津 和幸、木原 裕、○鈴木 和男
アドバイザー : A. Wheatley, J. Girkin, F. Maxfield, R. Hoffmann, N. Demarex, Lowrel Bolin, D. Ehrhardt, M. E. P. Murphy, W. Dawson, M. Jaconi
* 国際バイオイメーキング学会の対応を含む
13. 新技術情報 : 加藤 薫、○小島 清嗣、後藤 英一、鶴旨 篤司、晝馬 亨
14. 男女共同参画 : 朽津 和幸、○洲崎 悦子、田中 直子、橋本 香保子

【付属資料】

1. 役員

1) 評議員 (2018. 12. 31まで)

新井 孝夫、池水 信二、太田 善浩、岡 浩太郎、加藤 薫、加藤 晃一、加藤 有介、川西 徹、菊地 和也、木原 裕、楠見 明弘、朽津 和幸、小島 清嗣、小島 正樹、後藤 英一、齋野 朝幸、櫻井 孝司、末松 誠、洲崎 悦子、鈴木 和男、鈴木 亮、曾我 公平、高松 哲郎、竹本 邦子、立野 玲子、田中 直子、田之倉 優、鶴旨 篤司、寺川 進、冨田 光子、永井 健治、中村 岳史、中山 俊憲、西村 智、橋本香保子、長谷川 明洋、浜口 幸久、樋口 ゆり子、晝馬 亨、船津 高志、古野 忠秀、南谷 晴之、宮川 拓也

2) 監 事 (2名: 2016. 12. 31まで)

大塩 力、大幡 久之

3) 理 事 (16名: 4年任期、2年毎半数改選、評議員により互選)

2016. 12. 31まで

太田 善浩、岡 浩太郎、加藤 薫、加藤晃一、小島 正樹、中山 俊憲、浜口 幸久、船津高志

2018. 12. 31まで

川西 徹、菊地 和也、木原 裕、朽津 和幸、洲崎 悦子、鈴木 和男、高松 哲郎、寺川 進

4) 特任理事 (2年任期)

2016. 12. 31まで

新井 孝夫、田之倉 優

5) 会長、副会長、庶務担当、財務担当 (理事により互選: 2年任期)

会 長: 2016. 12. 31まで: 川西 徹

副 会 長: 2016. 12. 31まで: 浜口 幸久、船津 高志

庶務担当理事: 2016. 12. 31まで: 船津 高志

財務担当理事: 2016. 12. 31まで: 岡 浩太郎

2. 名誉会員 (非役員)

荒田 洋治、石村 巽、大木 和夫、柏木 浩、関塚 永一、脊山 洋右、中西 守、眞島 利和、南谷晴之、安岡 則武

2015年度決算書（2015年1月1日～2015年12月31日）

日本バイオイメージング学会

会長 川西 徹 印

理事(財務担当) 岡 浩太郎 印

一般会計

収入

2014年より繰越	3,722,253
利息	248
会費	1,117,000
第24回学術集会余剰金	381,185
懇親会費	51,000
許諾抄録利用料	864
瓶代回収費	60
収入計	5,272,610

支出

バイオイメージング印刷費	247,072
ジャパンメディカル英文校正	13,357
通信・郵送費	29,180
謝金・人件費	221,506
男女共同参画	5,000
奨励賞	100,000
会議費	122,221
振込手数料	3,132
第24回学術集会準備金	300,000
雑費	71,356
会費返金（超過払込分）	30,000

小計 1,142,824

2016年度へ繰越 4,129,786

支出計 5,272,610

特別会計

収入

2014年度より繰越 5,000,000

収入計 5,000,000

支出

2016年度への繰越 5,000,000

支出計 5,000,000

監査 2016年 4月 25日

監事 大塩 力 印

監事 大幡 久之 印

2017年度予算案(2017年1月1日～2017年12月31日)

一般会計

収入

繰り越し	4,129,786
会費	1,100,000
広告	30,000
<hr/>	
収入計	5,259,786

支出

バイオイメージング印刷費	400,000
Bioimages 発行費	300,000
謝金・人件費	250,000
英文校閲費	80,000
会議費	120,000
通信・郵送費	100,000
奨励賞・研究助成	100,000
男女共同参画(分担金 他)	7,000
学術集会準備金	300,000
雑費	30,000
予備費	2,572,786
<hr/>	
国際学会準備金積立	1,000,000
支出計	5,259,786

特別会計

収入

繰り越し	6,000,000
国際学会準備金積立	1,000,000
<hr/>	
収入計	7,000,000

支出

2018年度への繰越	7,000,000
<hr/>	
支出計	7,000,000

日本バイオイメーjing学会入会のお願ひ

日本バイオイメーjing学会では会員の募集を致しております。会員の方の周囲に画像に関心のある方がおられましたら入会されるようご勧誘をお願い致します。入会される方は、本誌末の入会申込書をご利用ください。

正会員： 5,000円
学生会員： 2,000円
団体会員： 10,000円（図書館対象）
賛助会員：一口 100,000円
評議員会費： 8,000円

申込先

学会事務局

〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1
東京大学大学院薬学系研究科生体分析化学教室内
日本バイオイメーjing学会事務局
TEL: 03-5841-4760
FAX: 03-5802-3339
E-mail: bioimage@nih.go.jp
郵便振替:00130-3-73565
名 義:日本バイオイメーjing学会事務局

日本バイオイメーjing学会賛助会員入会のお願ひ

本学会は、画像解析技術を基に生命原理を解明し、人類の福祉に貢献することを目的としております。つきましてはこの趣旨に御賛同いただき御機関に賛助会員として参加いただければありがたいと思ひます。日本における基礎生命科学と応用開発研究との有機的結合実現のためぜひ御協力ください。

賛助会員入会御承諾の場合は下記口座への会費の振込とともに、本誌末の入会申込書(学会入会申込書と同じ)に必要事項を御記入の上、返送をお願い致します。

賛助会員 会費:一口 年10万円
会費振込先: 郵便振替:00130-3-73565
日本バイオイメーjing学会事務局

特 典:展示会での優先展示、学会誌、広報誌、学会要旨集への広告優先権

問合せ先 〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1
東京大学大学院薬学系研究科生体分析教室内
日本バイオイメーjing学会事務局
TEL: 03-5841-4760 FAX: 03-5802-3339
E-mail: bioimage@nih.go.jp

会費納入のお願い

日本バイオイメーjing学会学会費の納入をお願いいたします。

すみやかな納入をお願いいたします。

正会員： 5,000円

学生会員： 2,000円

団体会員： 10,000円(図書館対象)

賛助会員：一口100,000円

評議員会費 8,000円

会費振込先：郵便振替：00130-3-73565

日本バイオイメーjing学会事務局

学会のホームページは以下の通りです。ご利用ください。

<http://www0.nih.go.jp/niid/bioimaging/>

入会申込書 (FAX / e-mail でも可)

20__年__月__日

日本バイオイメーjing学会定款を認め、日本バイオイメーjing学会に入会いたします。

(○をつけてください)

1. 正会員 : 5,000 円
 学生 : 2,000 円
 団体 (図書館) : 10,000 円
 賛助会員 : 100,000 円 (1口)
2. 入会に際しては予め送金してください

送金金額 : ¥____, _____

但し _____ として郵便振替にて送りました

ふりがな :

氏名 :

(賛助会員の場合連絡者)

所属 : 機関名 :

身分 :

部科名 :

(学生の場合 : 学年)

住所 : 〒

電話 :

ファックス :

e-mail :

賛助会員の場合口数 : __ 口

3. 学生会員の場合のみ、ご記入ください

指導教員の氏名 :

指導教員の e-mail :

4. 研究分野 : (○をつけてください、複数可)

- | | |
|------------|------------------------|
| 1. 分子生物・生化 | 5. 分子構造・分子モデル・ドラッグデザイン |
| 2. 生物物理 | 6. コンピューターソフトウェア |
| 3. 細胞生物 | 7. コンピュータハード・機器開発 |
| 4. 医学・生理 | 8. その他 (具体的に記入してください) |

申込先 : 日本バイオイメーjing学会事務局

E-mail: bioimage@nih.go.jp

郵送、FAX :

〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

東京大学大学院薬学系研究科

生体分析化学教室 内

Tel: 03-5841-4760, Fax: 03-5802-3339

会費振り込み先

郵便振替 : 00130-3-73565 (料金振込人払い)

名義人名 : 日本バイオイメーjing学会事務局

日本バイオイメーシング学会定款

第1章 総 則

- 第1条 この学会は、日本バイオイメーシング学会という。
- 第2条 この学会は、事務所を庶務担当理事の勤務先におく。
- 第3条 この学会は、評議員会の議決を経て必要の地に支部をおくことができる。

第2章 目的および事業

- 第4条 この学会は、会員の研究発表、知識の交換ならびに会員相互および関連学（協）会との連絡提携の場となり、バイオイメーシング学の進歩普及をはかり、もって学術、文化の発展に寄与することを目的とする。
- 第5条 この学会は、前条の目的を達成するために次の事業を行う。
- 1 研究発表会および講演会の開催
 - 2 会誌、研究報告および資料の刊行
 - 3 内外の関連学（協）会との連絡および協力
 - 4 研究の奨励および研究業績の表彰
 - 5 研究および調査
 - 6 その他目的を達成するために必要な事業

第3章 会 員

- 第6条 この学会の会員は、次のとおりとする。
- 1 正会員 バイオイメーシング学に関する学識または経験を有する個人であって、この学会の目的に賛同し、別に定められた年会費を納める者
 - 2 学生会員 大学またはこれに準ずる学校に在籍し、バイオイメーシング学に関係のある学科を納める学生であって、この学会の目的に賛同し、別に定められた年会費を納める者
 - 3 団体会員 この学会の目的に賛同し、別に定められた年会費を納める団体
 - 4 賛助会員 この学会の事業を後援し、別に定められた年会費1口以上を納める者または法人
 - 5 名誉会員 バイオイメーシング学と本学会の発展に大いに貢献した個人で、評議員会の認めた者
- 第7条 会員になろうとする者は、会費を添えて入会申込書を提出し、理事会の承認を受けなければならない。
- 第8条 会員は、この学会が刊行する機関誌および図書の優先的配布を受けることができる。
- 第9条 会員は、次の事由によって資格を喪失する。
- 1 退会
 - 2 禁治産および準禁治産の宣告
 - 3 死亡、失踪宣告
 - 4 除名
- 第10条 会員で退会しようとする者は、理由を付して退会届を提出しなければならない。

第11条 会員が次の各号の一に該当するときは、評議員会の議決を経て、会長がこれを除名することができる。

- 1 会費を滞納したとき
- 2 この学会の会員としての義務に違反したとき
- 3 この学会の名誉を傷つけ、あるいはこの学会の目的に反する行為をしたとき

第12条 既納の会費は、いかなる理由があってもこれを返還しない。

第4章 役員、評議員および職員

第13条 この学会には、次の役員をおく。

理事 12名以上16名以内（うち会長1名、副会長2名）

特任理事 6名以内

監事 2名

評議員 全会員の10%程度

第14条 1 評議員と監事は、正会員より総会で選出し、理事および特任理事は、評議員より評議員会で選出する。

- 2 理事は、互選で会長1名、副会長2名、庶務担当理事1名、財務担当理事1名、国際交流委員長1名を定め、常務理事とする。

第15条 1 会長はこの学会の業務を総理し、この学会を代表する。

2 副会長は会長を補佐し、会長に事故ある時は会長業務を代行する。

3 庶務担当理事、財務担当理事は、会長を補佐し、理事会の決定事項に基づき事務を行う。

4 国際交流委員長は、理事会の決定事項に基づき、諸外国とのバイオイメージング研究の学術的交流と連携を図り、国際バイオイメージング会議を推進する。

第16条 1 理事は、理事会を組織し、この学会の運営上重要な事項について決定し、執行する。

2 常務理事は常務理事会を組織し、必要な事項について協議し、理事会に諮る。

3 特任理事は、理事会の決定事項に基づき、特定の重要事項を担当する。

第17条 監事は民法第59条の職務を行う。

第18条 評議員は評議員会を組織して、この学会の運営上の重要事項にかかわる理事会の決定事項に関し、議事を開き議決する。

第19条 1 会長、副会長、庶務担当理事、財務担当理事、監事の任期は2年とする。

2 理事の任期は4年とし、2年毎に半数を改選する。

3 特任理事の任期は2年とする。但し、再任を妨げない。

4 評議員の任期は4年とする。但し、再任を妨げない。

5 補欠または増員による役員の任期は、前任者の残任期間とする。

6 役員は、その任期満了後でも後任者が就任するまでは、なお、その職務を行う。

7 役員は、この学会の役員としてふさわしくない行為のあった場合、または特別の事情のある場合には、その任期中であっても評議員会の議決により、会長が任を解くことができる。

第20条 役員は交通費、連絡費、日当の支給を受けることができる。

第21条 1 この学会の事務を処理するため、書記等の職員をおくことができる。

- 2 職員は、会長が任免する。
- 3 職員は、有給とする。

第5章 会 議

- 第22条 1 通常総会は、毎年1回議長が召集する。
2 臨時総会は、理事会または監事が必要と認めるとき、いつでも召集することができる。
- 第23条 会長は、会員現在数の5分の1以上から会議に付議すべき事項を示して総会の召集を請求された場合には、その請求のあった日から20日以内に臨時総会を召集しなければならない。
- 第24条 通常総会の議長は、会長とし、臨時総会の議長は会議のつど会員の互選で定める。
- 第25条 総会の召集は、少なくとも10日以前に、その会議に付議すべき事項、日時および場所を記載した書面または会誌の公告をもって通知する。
- 第26条 次の事項は、通常総会に提出してその承認を受けなければならない。
1 事業計画および収支予算についての事項
2 事業報告および収支決算についての事項
3 財産目録
4 その他理事会において必要と認めた事項
- 第27条 総会は、会員現在数の5分の1以上出席しなければ、その議事を開き議決をすることができない。ただし、当該議事につき書面をもってあらかじめ意志表示した者は、出席者とみなす。
- 第28条 総会の議事はこの定款に別段の定めがある場合を除くほか、出席者の過半数をもって決し、可否同数の時は、議長の決するところによる。
- 第29条 総会の議事の要項および議決した事項は、会員に通知する。
- 第30条 1 評議員会は随時会長が召集する。
2 評議員会の議長は、会長がこれに当たる。
- 第31条 評議員会は評議員数現在数の5分の1以上出席しなければ議事を議決することができない。
- 第32条 評議員会は、この定款に別段の定めがある場合を除くほか、出席者の過半数をもって決し、可否同数のときは議長の決するところによる。
- 第33条 理事会は、毎年2回会長が召集する。ただし、会長が必要と認めた場合、または、理事現在数の3分の1以上から会議の目的たる事情を示して請求のあったときには、会長は臨時理事会を召集しなければならない。
- 第34条 1 理事会は理事現在数の3分の2以上出席しなければ議事を開き議決することができない。ただし、当該議事につき書面をもってあらかじめ意志を表示したものは、出席者とみなす。
2 理事会の議事は、この定款に別段の定めがある場合を除くほか、出席理事の過半数をもって決し、可否同数のときは、議長の決するところによる。
3 特任理事は理事会には参考人として出席できる。
- 第35条 総会、評議員会および理事会の議事録は、議長が作成し、議長および出席者代表2名以上が署名押印の上、これを保存する。

第6章 資産および会計

- 第36条 この学会の資産は、次のとおりとする。
- 1 この学会設立当初画像解析シンポジウムから継承した別紙財産目記載の財産
 - 2 会費
 - 3 事業に伴う収入
 - 4 資産から生じる果実
 - 5 寄付金品
 - 6 その他の収入
- 第37条 1 この学会の資産を分けて、基本財産および運用財産の2種とする。
2 基本財産は、別紙財産目録のうち、基本財産の部に記載する資産および将来基本財産に編入される資産で構成する。
3 運用財産は、基本財産以外の資産とする。
4 寄付金品であって、寄付者の指定のあるものは、その指定にしたがう。
- 第38条 この学会の基本財産のうち現金は、理事会の決定によって定期郵便貯金とするか、もしくは定期預金として、会長が保管する。
- 第39条 基本財産は、処分し、または担保に供してはならない。ただし、この学会の事業遂行上やむを得ない理由があるときは、評議員会および総会の議決を経、その一部に限り処分し、または担保の供することができる。
- 第40条 この学会の事業遂行に要する費用は、会費、事業に伴う収入および資産から生ずる果実等の運用をもって支弁する。
- 第41条 学会の事業計画およびこれに伴う収支予算は、評議員会で議決しなければならない。
- 第42条 1 この学会の収支決算は、毎回、財産目録、事業報告書および会員の移動状況書とともに監事の意見をつけ、評議員会および総会の承認を受けなければならない。
2 この学会の収支決算に剰余金があるときには、評議員会の議決および総会の承認をうけて、その一部もしくは全部を基本財産に編入し、または翌年度に繰り越すものとする。
- 第43条 収支予算で定めるものを除くほか、新たに義務の負担をし、または権利の放棄をしようとするときは、評議員会および総会の議決を受けなければならない。借入金（その会計年度内の収入をもって償還する一時借入金を除く）についても同様とする。
- 第44条 この学会の会計年度は、毎年1月1日に始まり12月31日に終る。

第7章 定款の変更ならびに解散

- 第45条 この定款は、評議員会および総会においておのおのの4分の3以上の議決を経なければ変更することができない。
- 第46条 この学会の解散は、評議員会および総会においておのおのの4分の3以上の議決を経なければならない。
- 第47条 この学会の解散に伴う残余財産は、評議員会および総会においておのおのの4分の3以上の議決を経て、この学会の目的に類似の目的を有する公益事業に寄付するものとする。

第8章 補 則

- 第48条 1. この定款施行についての細則は、評議員会の議決を経て別に定める。
2. 本定款は1991年10月18日より実施する
 3. 事業年度の初年度は本会設立の日をもってはじまる
 4. 初年度は半期役員は互選で決定する

付 則

本定款は、2011年1月1日より実施する。

細 則

1. この細則は、日本バイオイメーシング学会定款48条の1により、定めたものである。
2. 本学会の事務所を、庶務担当理事の勤務先（〒113-0033 東京都文京区本郷7丁目3番1号 東京大学大学院薬学系研究科生体分析化学教室）におく。
3. 年会費は正会員5,000円、学生会員2,000円、団体会員10,000円、賛助会員1口100,000円とする。ただし、評議員の年会費は8,000円とする。また、賛助会員の企業は、若干名を会員として登録することができる（これを登録会員という）。登録会員は、評議員会の議決をもって承認される。
4. 第14条で定める評議員（評議員という）のほかに、任期2年（再任を妨げない）の企業評議員をおくことができる。企業評議員は、本学会の活動に協力的な企業に属する正会員および賛助会員企業の登録会員より選出し、評議員会で承認する。ただし、企業評議員の人数は評議員の20%以内とし、評議員の年会費を納める必要はない。
5. 定款第16条2の常務理事会は、常務理事と広報委員会委員長、編集委員会委員長より構成する。
6. 副会長は、会長以外の常務理事と併任することができる。
7. 定款第5条に定めた事業を行うため、企画、広報、編集、集会、賞選考、研究助成選考、講習会、国際交流、新技術情報、男女共同参画の各委員会を置く。各委員会には、必ず理事が属し、委員長は原則として理事がつとめる。ただし、特別の事情があるときは、評議員が委員長をつとめることができる。また、必要に応じて、これらの委員会のほかに、特別委員会を設けることができる。特別委員会には、必ず理事が複数名加わるとともに、理事が委員長をつとめる。
8. 本細則の変更については、評議員会の議決と総会の承認を必要とする。

付 則

本細則は、2013年1月1日より実施する。

年会費

会員は次の会費年額を支払うこととする。

1. 評議員 年額8,000円
2. 正会員 年額5,000円
3. 学生会員 年額2,000円
4. 団体会員 年額10,000円
5. 賛助会員 年額1口100,000円

附則

1. 企業評議員は、個人正会員については会費年額5,000円、賛助会員を代表して評議員となる場合には賛助会費のみとする。

◆ 協賛企業一覧 ◆

本学術集会の開催に当たり下記の団体および企業からご援助をいただきました。

ここに厚く御礼申し上げます。

平成 28 年 7 月 29 日現在

アンドール・テクノロジーLtd / オックスフォード・インスツルメンツ株式会社

株式会社医学生物学研究所

株式会社池田理化

株式会社エルエイシステムズ

株式会社オプトサイエンス

株式会社カーク

株式会社キーエンス

株式会社生体分子計測研究所

株式会社東陽テクニカ

株式会社ビジコムジャパン

株式会社矢沢科学

株式会社羊土社

クロマテクノロジージャパン合同会社

コヒレント・ジャパン株式会社

住商ファーマインターナショナル株式会社

ソーラボジャパン株式会社

大陽日酸株式会社

東京化成工業株式会社

日本ウォーターズ株式会社

浜松ホトニクス株式会社

ハヤシ化成株式会社

ラドデバイス株式会社

理科研株式会社

※五十音順、敬称略

バイオイメーキング 第25巻第2号

平成28年8月22日

発行所：日本バイオイメーキング学会

〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1

東京大学大学院薬学系研究科 生体分析化学教室内

電話：03-5841-4760, FAX：03-5802-3339

E-mail: bioimage@nih.go.jp

URL: <http://www0.nih.go.jp/niid/bioimaging/>

第 25 回日本バイオイメージング学会学術集会 講演要旨集

広告掲載企業 一覧

表 4	ソーラボジャパン株式会社
表 2	住商ファーマインターナショナル株式会社
表 3	株式会社オプトサイエンス
後付	アンドール・テクノロジーLtd/オックスフォード・インストゥルメンツ株式会社 株式会社医学生物学研究所 株式会社池田理化 株式会社エルエイシステムズ 株式会社カーク 株式会社キーエンス クロマテクノロジージャパン合同会社 コヒレント・ジャパン株式会社 株式会社生体分子計測研究所 大陽日酸株式会社 東京化成工業株式会社 株式会社東陽テクニカ 日本ウォーターズ株式会社 浜松ホトニクス株式会社 ハヤシ化成株式会社 株式会社ビジコムジャパン 株式会社矢沢科学 株式会社羊土社 ラドデバイス株式会社 理科研株式会社

順不同、敬称略