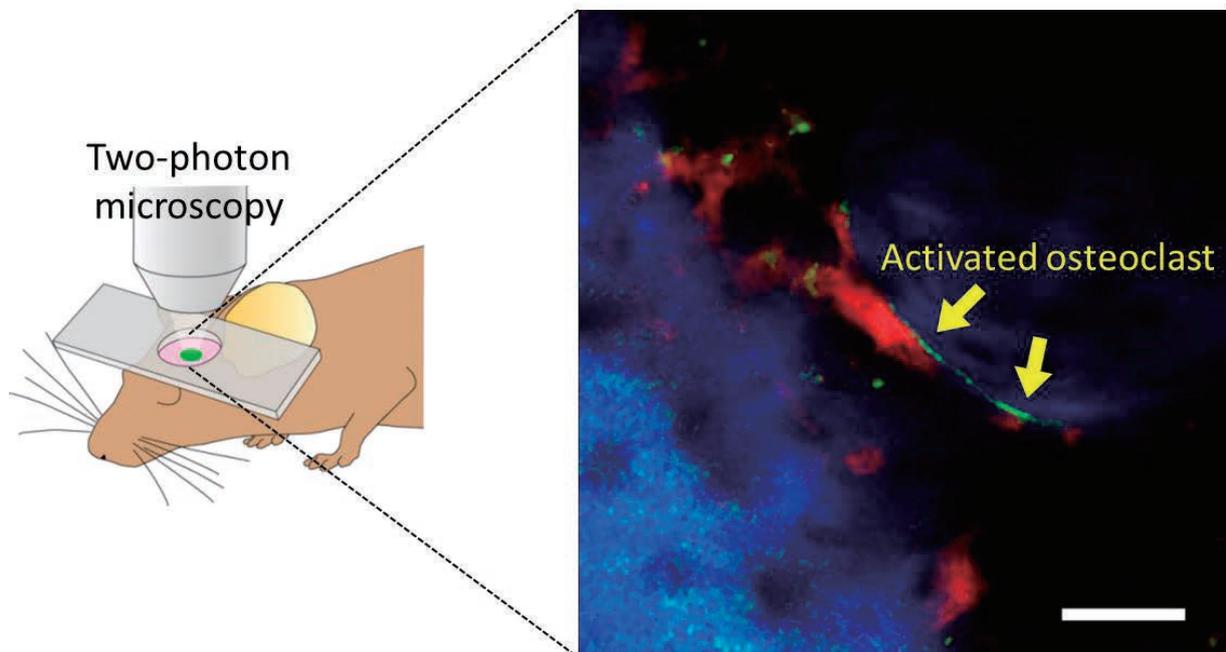
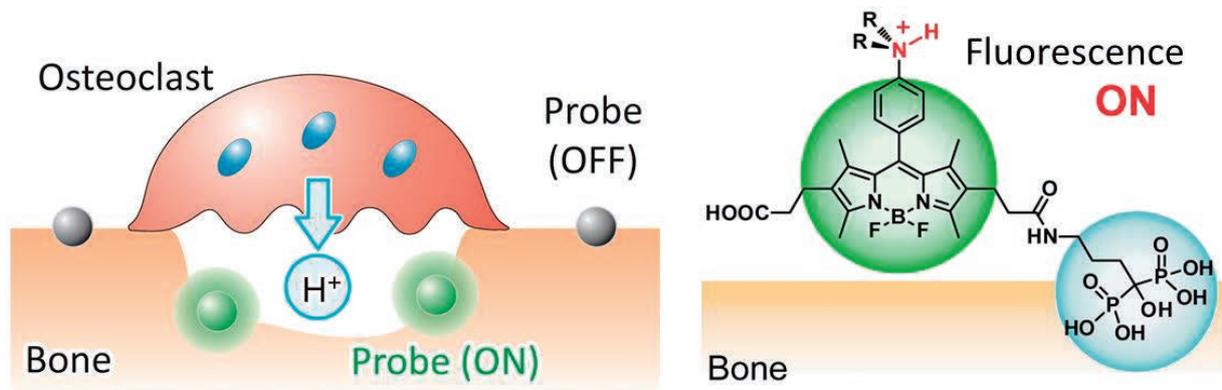


# バイオイメージング

(第23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・カールツァイス賞受賞)



「高い光安定性と pH 感受性を有する蛍光プローブを用いた  
生体内破骨細胞活性の二光子ライブイメージング」

## 目 次

表紙の図（第23回学術集会ベストイメージング賞受賞） 「高い光安定性とpH感受性を有する蛍光プローブを用いた 生体内破骨細胞活性の二光子ライブイメージング」 ..... 前田拓樹・小和田俊行・菊地和也 ... 表2
--

日本バイオイメージング学会公開講座のご案内..... 1
------------------------------

第24回日本バイオイメージング学会学術集会のお知らせ..... 2
-----------------------------------

### 論 文

「イネの生殖器官発達におけるオートファジーの新たな役割」 ..... 来須孝光・花俣 繁・小谷野智子・朽津和幸 ... 7
--

### 特集「顕微鏡で測る」(2)

「ルシフェラーゼを用いた細胞レベルの遺伝子発現動態解析」 ..... 今井章裕・村田 隆・長谷部光泰 ... 12
--

「光退色後蛍光回復法（FRAP）を用いたタンパク質動態解析の 実際と2光子励起法の利用」 ..... 村田 隆 ... 17
--

「蛍光寿命や近赤外光を応用したイメージング技術」 ..... 三輪佳宏・田中順子・千田直子・黒山喬允・逆井智貴・ 濱田理人・百武篤也・新井達郎・高橋 智 ... 22
---

投稿規定と協賛学会のお知らせ ..... 28
-------------------------

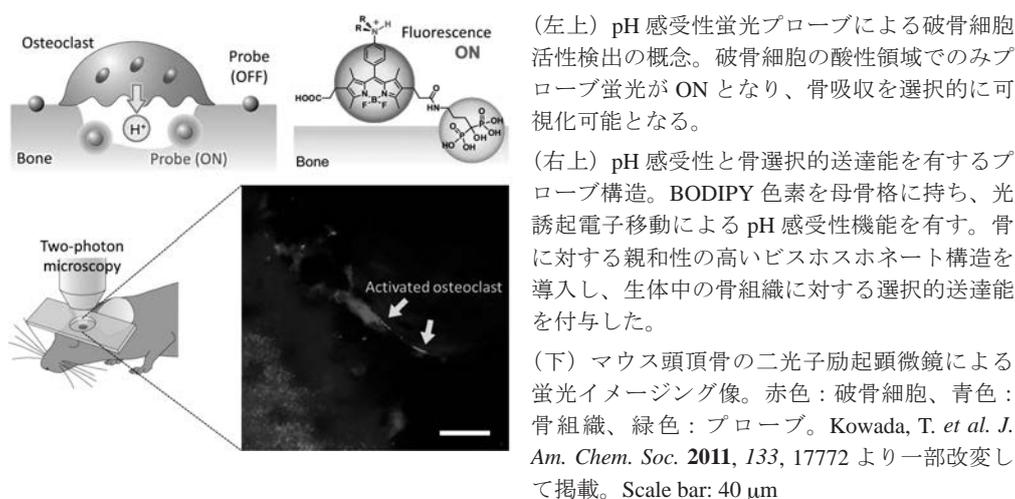
表紙の図：

「高い光安定性と pH 感受性を有する蛍光プローブを用いた  
生体内破骨細胞活性の二光子ライブイメージング」  
(第 23 回日本バイオイメーjing学会学術集会  
ベストイメーjing賞・カールツァイス賞受賞)

前田 拓樹<sup>1)</sup>、小和田 俊行<sup>2)</sup>、菊地 和也<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup>大阪大・院・工、<sup>2)</sup>大阪大・免疫学フロンティア研究センター

破骨細胞による骨吸収は、骨組織の成長や修復の際に、骨密度や形状を調節するために必要不可欠な生体機能である。その一方で、過剰な骨吸収は、骨粗しょう症や関節リウマチといった骨疾患を引き起こす。そのため、骨疾患に対する新薬開発や治療法を確立する上で、生体内における破骨細胞動態を解析可能な蛍光イメージング技術の開発が求められている。そこで我々は、活性化破骨細胞が骨表面上に酸性領域を形成することに着目し、①低 pH 環境下で蛍光が ON になる蛍光スイッチ機能と、②骨表面への選択的送達能を有する蛍光プローブを開発した。プローブを皮下注射によりマウスに投与し、骨組織を二光子励起顕微鏡により観察したところ、一部の破骨細胞直下からプローブ由来の蛍光シグナルが観察された。これは、開発したプローブが活性化破骨細胞により形成された酸性領域を選択的に可視化可能であることを示している。このように、本研究では、機能性蛍光プローブと二光子励起顕微鏡を組み合わせることによって、破骨細胞動態を詳細に解析可能であることを明らかにした。



# 第 24 回日本バイオイメーjing学会学術集会

## 「公開講座」並びに「学術講演会」のお知らせ

第 24 回日本バイオイメーjing学会学術集会・大会長  
朽津 和幸 (東京理科大学 理工学部 応用生物科学科 教授)

下記の通り「第 24 回日本バイオイメーjing学会学術集会」を開催いたします。多くの方々にご参加頂きたくご案内申し上げます。「全身・全脳透明化の先に見えるもの—生命の「時間」の理解に向けて—」と題した特別講演を東京大学/理化学研究所の上田泰己先生にお願いしています。また今回は特に、ジャズミュージシャンとしても高名な坂田明氏を始めとする多彩なゲストをお迎えして、会員の皆様にもお楽しみいただけるような公開講座を企画しております。学術集会はもちろんのこと、公開講座にも、学生さんや一般の方などお誘い合わせの上、奮ってご参加いただけますよう、お待ちしております。プログラム等の詳細につきましては下記学術集会 Web ページをご覧ください。

学術集会 Web ページ URL: <http://www.rs.tus.ac.jp/ambs15/index.html>

学術集会 Facebook ページ URL: <https://www.facebook.com/ambs15>



会期：平成 27 (2015) 年 9 月 26 日 (土) ～ 9 月 28 日 (月)

◆公開講座： 9 月 26 日 (土) 12:00 ～ 17:10 (懇談会～18:30)

◆学術講演会： 9 月 27 日 (日) 9:00 ～ 17:50 (懇親会～20:00)

9 月 28 日 (月) 9:00 ～ 17:20

会場：東京理科大学葛飾キャンパス図書館大ホール

(〒125-8585 東京都葛飾区新宿 6-3-1 地下鉄千代田線直通 JR 金町駅徒歩 8 分)

(会場案内 <http://www.tus.ac.jp/info/access/katcamp.html>)

主催：日本バイオイメーjing学会

共催：東京理科大学 研究推進機構 総合研究院 イメーjingフロンティア研究部門

協賛学会：決定し次第ホームページに掲載しますので、ご参照ください。

### ◎各種締切り期日

#### ◆講演受付・締切

○演題申込み・締切 平成 27 年 7 月 27 日 (月)

○抄録(和文または英文)原稿・締切 平成 27 年 7 月 27 日 (月)

◆学術集会参加登録・締切 平成 27 年 8 月 21 日 (金)

◆懇親会参加登録・締切 平成 27 年 8 月 21 日 (金)

### ◎各種申し込みの流れ

#### 1. 一般講演者

演題申込み・抄録提出 (同時) → 参加登録、懇親会参加登録 → 参加費・懇親会費振込

#### 2. 参加のみの場合

参加登録、懇親会参加登録 → 参加費・懇親会費振込

## ◎演題募集

一般講演（ポスターサマリー講演＋ポスター発表）の演題を募集します。代表して発表する著者は本学会の会員に限ります。入会がお済みでない方は、学会のホームページで入会申込書入手し、手続きしてください。学会ホームページ：<http://www0.nih.go.jp/niid/bioimaging/>

一般講演の申込手順は次の通りです。締切日を厳守して下さい。

### ◆申込方法

大会ホームページ（<http://www.rs.tus.ac.jp/ambs15/index.html>）より抄録のテンプレート(和文または英文のどちらか一方)をダウンロードし、抄録を作成してください。作成した抄録は、参加申込書と同時に [ambs15@rs.tus.ac.jp](mailto:ambs15@rs.tus.ac.jp) 宛に電子メールにて提出をお願いします。ポスターサマリー用パワーポイントファイルも、事務局 [ambs15@rs.tus.ac.jp](mailto:ambs15@rs.tus.ac.jp) 宛に電子メールで送付してください。

### ※トピカルセッションについて

今回の学術集会では、学際的な議論をこれまで以上に活発に行うことを目指して、通常のポスタープレゼンテーション(サマリー講演あり)に加えて、ポスター演題の中から実行委員会が選定した題目について、異分野の研究者に対して背景等を長目にわかりやすく御講演いただく「トピカルセッション」を設けます。ご協力のほどよろしく申し上げます。

◆演題申込み・抄録(和文または英文)提出： 平成 27 年 7 月 27 日（月）

◆ポスターサマリー用パワーポイントファイル提出：

（スライド 3 枚以内、ファイルサイズ 20 MB 以内） 平成 27 年 9 月 11 日（金）

## ◎事前参加登録

演題を出される方も参加のみの方も、いずれも事前参加登録をお済ませください。締切りは平成 27 年 8 月 21 日（金）です。懇親会の参加登録も平成 27 年 8 月 21 日（金）までにお済ませください。参加登録は大会ホームページより参加申し込み用のエクセルファイルをダウンロードし、記入後に [ambs15@rs.tus.ac.jp](mailto:ambs15@rs.tus.ac.jp) 宛てにお送りください。

## ◎参加費、懇親会費と支払い方法

事前参加登録頂きましたら、参加費と懇親会費の合計（懇親会に出席されない方は参加費のみ）を下記口座に平成 27 年 8 月 31 日（月）までにご入金ください。領収書は、学術集会受付にてネームカードと共にお渡しします。

### ◆参加費：

○公開講座：無料

○学術集会：

一般（会員・協賛学会員※：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）※

※学生の方は当日受付にて学生証をご提示ください。

協賛学会は決定し次第ホームページに掲載しますのでご参照ください。

○懇親会費：一般 5,000 円 / 学生：2,000 円

○振込先：振込および振替手数料は、ご負担いただきたくお願い申し上げます。）

銀行・支店名： みずほ銀行(0001)・金町(カナマチ)支店 (店番号 242)

口座番号： 普通預金 2271611

口座名称： 第 24 回日本バイオイメージング学会学術集会

## ◎公開講座「私たちのくらしとバイオイメーjing～見えるからわかるバイオの世界～」

<http://www.rs.tus.ac.jp/ambs15/os.html>

<http://www.rs.tus.ac.jp/ambs15/poster/150926.pdf> (ポスター・ダウンロード)

日時：2015年9月26日(土) 12:00-18:30

会場：東京理科大学葛飾校舎図書館大ホール及びホワイエ

(125-8585 東京都葛飾区新宿 6-3-1)

12:00-13:00 バイオイメーjing体験 (ホワイエで、実験を体験できます)

◆バイオイメーjing実験「自分のDNAを見てみよう！」

◆3D バイオイメーjing体験 他

◆特別展示：

イラストがいざなう科学の入り口 イラストレーター/神戸大学 ウチダヒロコ

◆協賛展示：

○バイオメディアアート展示

Metaphorest (早稲田大学先進理工学部・教授 岩崎 秀雄 他)

○サイエンスコミュニケーション展示

文部科学省科学研究費 新学術領域研究「植物細胞壁の情報処理システム」

○バイオイメーjing映像上映 グレンデル 他

13:00-13:10 1. はじめに

国立医薬品衛生研究所・所長 川西 徹

13:10-13:40 2. 「あきらめない雌しべ：秘められた花の力を映像で解き明かす」

名古屋大学大学院理学研究科・教授 東山 哲也

13:40-14:10 3. 「見えないものを見る：画像処理によるバイオイメーjingの展開」

理化学研究所光量子工学研究領域・チームリーダー 横田 秀夫

14:10-14:50 休憩 (バイオイメーjing実験体験、展示見学 等)

14:50-15:20 4. 「イラストがいざなう科学の入り口」

イラストレーター/神戸大学 ウチダ ヒロコ

15:20-15:50 5. 「生物発光が拓く未来の生活」

大阪大学産業科学研究所・教授 永井 健治

15:50-16:00 休憩

16:00-17:00 6. 「いのちが透けて見えるミジンコから思うこと」

ジャズミュージシャン/広島大学客員教授 坂田 明

17:00-17:10 7. おわりに

東京理科大学理工学部・教授 朽津 和幸

17:10-18:30 懇談会 (講演者への質問、進路相談など) ホワイエにて

(軽食や飲物を準備する予定です。)

◎学術講演会プログラム (予定; 実施スケジュールは変更の可能性があります。)

9月27日(日)

- 9:00 開会式  
 9:10-11:10 若手企画シンポジウム「NO DIVISION, NO LIFE」  
 11:10-12:40 ポスターサマリー講演 1  
 12:40-13:40 休憩  
 13:40-14:40 ポスター討論 1  
 14:40-16:40 シンポジウム「第2の生体の窓」  
 16:50-17:50 特別講演 「全身・全脳透明化の先に見えるもの—生命の「時間」の理解に向けて—」  
 東京大学大学院医学系研究科・教授/理化学研究所 上田 泰己  
 18:00-20:00 懇親会

9月28日(月)

- 9:00-11:00 トピカルセッション(講演)  
 11:00-12:30 ポスターサマリー講演 2  
 12:30-13:30 休憩  
 13:30-14:30 ポスター討論 2; ベストイメーjing賞投票締切  
 14:30-16:30 シンポジウム 「感染症を見る」  
 16:40-17:10 奨励賞受賞講演  
 17:10-17:20 閉会式(ベストイメーjing賞授賞式)

☆若手(2012年度・2013年度奨励賞受賞者)企画シンポジウム

「NO DIVISION, NO LIFE.~動物と植物の細胞分裂イメーjing最前線~」

オーガナイザー: 岡部弘基(東京大・院・薬), 桧垣匠(東京大・院・新領域)

細胞分裂は動植物を問わず生命の発生・維持にとって始原的意義を持つ基本的な生命現象である。本シンポジウムでは、動物分野と植物分野から2名ずつ、イメーjing技術を駆使する細胞分裂研究者が最新の研究成果を紹介する。全演題終了後に、簡単な総合討論の時間を設け、細胞分裂における動植物の多様性・共通性に関する知識の整理と議論を行う予定である。特に、今後どのようなバイオイメーjing技術が、分子(遺伝子)レベルでは大きく異なると考えられる動植物の細胞分裂の共通項を見出し、細胞分裂という生命の根源的現象を深く理解することができるか、議論を深めたい。

清光 智美(名古屋大学 大学院理学研究科)

板橋 岳志(早稲田大学 理工学術院)

村田 隆(基礎生物学研究所 生物進化研究部門)

笹部 美知子(弘前大学 農学生命科学部)

☆シンポジウム「第2の生体の窓~21世紀のバイオイメーjingの窓~」

オーガナイザー: 曾我 公平(東京理科大)、竹内 司(島津製作所)、  
 横田 秀夫(理化学研究所)、岸本 英博(琉球大)

1000 nm を超える近赤外波長域は「第2の生体の窓 Second Biological Window(SBW)」として近年世界的に話題を呼んでいる。これにはこの波長域におけるカメラなどの光学デバイスや蛍光材料などのアイテムを包括するシステムの発達が密接に関係する。このシンポジウムでは、世界に先行して日本で発達しつつある SBW におけるイメージングにフォーカスし、日本がこの波長域において世界をリードする地位を獲得することをめざし、SBW におけるバイオイメーjingの現状と課題について議論する。

1. SBW イメージングの現状と課題：曾我 公平(東京理科大)
2. SBW におけるスペクトルイメージング：演者未定 (住友電工)
3. カーボンナノチューブの SBW における蛍光：岡崎 俊也(産総研)
4. SBW におけるアニマルイメージングシステム：竹内 司(島津製作所)、  
渡邊 重明(住商ファーマ)
5. SBW の医療応用：金子 和弘(国立がん研究センター東病院)

### ★シンポジウム「感染症を見る」

オーガナイザー：鈴木 和男 (帝京大)、加藤 有介 (徳島大)

最近世界に脅威をもたらしているエボラ熱、インフルエンザなど感染症は、我々の免疫系・生体防御機能をくぐりぬけ、パンデミックとなったり重症化したりする。そして、感染微生物は、薬剤耐性を獲得してますます生体防御に対抗して感染拡大を示すため、その防御機能と薬剤耐性の機構解明が重要である。そうした感染症に対する機構解析には、分子・細胞レベルでの新しいイメージング手法が不可欠で、その最新アプローチを紹介する。

1. オーバービュー：鈴木 和男 (帝京大)
2. 生体と微生物のせめぎ合いのはざまを見る：Thomus Leto (NIIAD-NIH, USA)
3. インフルエンザの薬剤耐性を見る：鈴木 和男 (帝京大)、加藤 有介 (徳島大)
4. クライオ蛍光顕微鏡で見る数ケルビンの世界：藤芳 暁 (東工大・院理工)
5. 一般演題から関連演題を1件選択
6. まとめ：加藤 有介 (徳島大)

### ◎本学術集会についての問い合わせ先

第24回日本バイオイメーjing学会学術集会事務局

E-mail: [ambs15@rs.tus.ac.jp](mailto:ambs15@rs.tus.ac.jp)

(できるだけ電子メールでの連絡をお願い申し上げます。)

URL: <http://www.rs.tus.ac.jp/ambs15/index.html>

◆大会長：朽津 和幸

〒278-8510 千葉県野田市山崎 2641 東京理科大学工学部応用生物科学科

TEL: 04-7122-9404; FAX: 04-7123-9767

◆副大会長：曾我 公平

〒125-8585 東京都葛飾区新宿 6-3-1 東京理科大学基礎工学部材料工学科

TEL: 03-5876-1419; FAX: 03-3609-3866

## イネの生殖器官発達におけるオートファジーの新たな役割

来須 孝光<sup>1,2\*,†</sup>、花俣 繁<sup>1</sup>、小谷野 智子<sup>1</sup>、朽津 和幸<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 東京理科大学・理工学部・応用生物科学科、<sup>2</sup> 東京工科大学・応用生物学部

\*E-mail: kurusutkmt@stf.teu.ac.jp; kuchitsu@rs.noda.tus.ac.jp

### 要旨

オートファジーは、細胞質中に内膜系（オートファゴソーム）が生成され、液胞やリソソームと融合することにより、細胞成分が分解される自食作用であり、多くの真核生物の発生・分化や代謝の制御において重要な役割を果たす。一方、モデル双子葉植物シロイヌナズナのオートファジー欠損変異体は正常な生活環を示すと報告されており、植物の発生におけるオートファジーの役割は未解明な部分が多かった。我々は、単子葉植物イネにおいて、オートファジー可視化実験系を構築すると共に、オートファジー欠損変異株を複数同定した。変異体ホモ個体では、種子がほぼ全く稔らず、交雑検定の結果、雄性不稔形質を示した。変異株では、花粉が未成熟で発芽能も著しく低下していた。電子顕微鏡イメージング等により、花粉形成過程の葯の各組織のオートファジー動態を解析した結果、花粉への栄養や表面構造の材料供給組織を構成する葯の最内層のタペート細胞において、減数分裂期後にオートファジーが誘導されることを発見した。オートファジー欠損変異株では、タペート組織においてオートファジーが観察されず、同時に lipid body の分解が、野生型と比べて顕著に遅延していた。イネの雄性生殖器官の発生過程におけるオートファジーの生理学的役割について考察する。

### はじめに

オートファジーは、真核生物に普遍的な細胞内の分解機構であり、生体内の栄養のリサイクルに大きく寄与している。その実行に関与する ATG (Autophagy-related) 遺伝子群は、真核生物に広く保存されている[1]。一方、酵母、線虫、ショウジョウバエやマウス等の多様な生物において、オートファジーが発生・変態や分化において、栄養供給を含めて重要な役割を果たすことが知られている[2, 3]。しかし、モデル植物シロイヌナズナの対応する遺伝子の変異体は、正常に胚発生、発芽、子葉の発達、根の伸長、花芽形成、種子生産を遂行でき、正常な生活環を示すことが知られている。従って、植物の生殖、発生過程におけるオートファジーの生理的役割は殆ど解っていない[4]。唯一の例外として、*Atatg6* 変異体が不稔形質を示す[5]が、ATG6 は PI3K 複合体の一部であり、他の PI3K 変異体も、同様の不稔形質を示すことから[6]、シロイヌナズナにおいては、オートファジー欠損が不稔の直接の原因ではないと想定される。

### イネ培養細胞におけるオートファジー可視化系の確立

オートファジーの実行に関与する ATG 遺伝子群は、多くの

真核生物に保存され、共通の機能を果たしている[7]。中でも、ATG8 はオートファゴソームのマーカーとして、動物や微生物だけでなく、植物においても有用であり、緑色蛍光タンパク質 (GFP) やその改変タンパク質と ATG8 との融合タンパク質を発現させることにより、オートファジー動態の解析が進められて来た[8-10]。細胞内の分子動態の観察に適したタバコ培養細胞 BY-2 を用いて、オートファジーフラックスの簡便な定量解析系が構築されている[9, 10]。

植物の液胞内は、液胞膜に局在する V 型 H<sup>+</sup>-ATPase、H<sup>+</sup>輸送性 pyrophosphatase の 2 種のプロトンポンプの働きにより酸性に保たれている。GFP-AtATG8a を発現させたシロイヌナズナの根に、液胞膜 H<sup>+</sup>-ATPase 阻害剤 concanamycin A (ConcA) を処理すると、液胞内 pH が上昇し、その結果 GFP 蛍光を伴う小胞構造体（オートファジックボディ）が蓄積する[8]。

我々は、GFP-AtATG8a を発現させた形質転換イネを出し、オートファゴソームの可視化実験系の構築を試みた[11]。ショ糖欠乏培地にイネ培養細胞を移し、栄養欠乏によるオートファジーを誘導すると共に、ConcA を処理し、共焦点レーザー顕微鏡により、液胞内 GFP 蛍光を継時的に測定した。その結果、ConcA 処理により、液胞内の蛍光強度が時間依存的に増大し、GFP-ATG8 の液胞内への蓄積が確認された（図 1 下図 (Starvation + ConcA)）。

†2014 年度日本バイオイメージング学会奨励賞受賞者

一方、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて、シヨ糖欠乏時の細胞内構造体の変化を解析した。シヨ糖欠乏によりオートファジーが誘導された細胞では、特徴的な膜構造を持つオートファゴソーム及び、液胞内においてオートファジックボディ (細胞質成分であるミトコンドリアや色素体を含む構造体) が観察された (図 2)。これらの結果は、イネにおいて、オートファジーによりミトコンドリアや葉緑体が液胞に運ばれ、分解されることを示唆している。

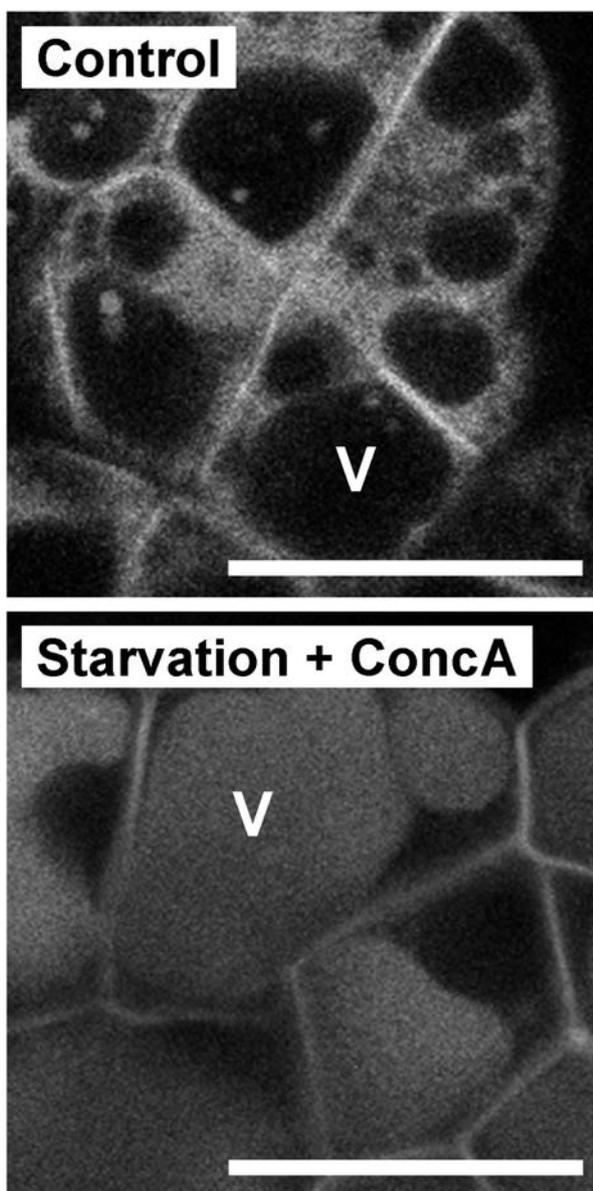


図 1. GFP-ATG8 を用いたイネ培養細胞におけるオートファジーの可視化。通常生育条件では GFP-ATG8 は細胞質と核に局在する (Control)。細胞をシヨ糖欠乏培地に移すと同時に ConcA を処理すると、液胞内 (V) に GFP 蛍光が蓄積した (Starvation + ConcA)。Bars = 20 μm

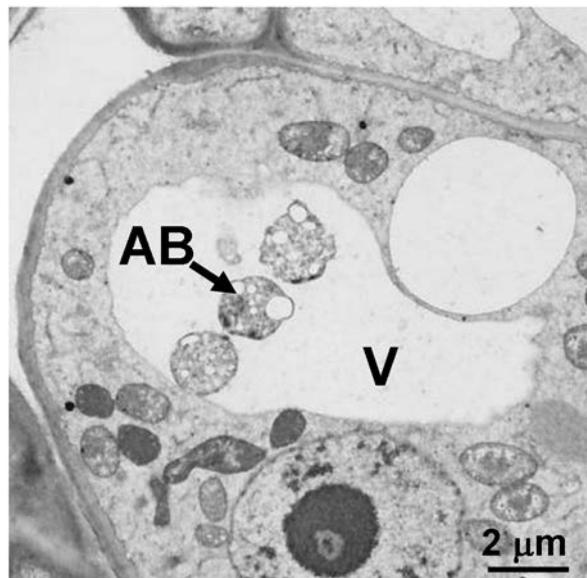


図 2. 透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いたイネ培養細胞におけるオートファジー動態の観察。液胞内 (V) において、細胞質成分を含むオートファジックボディ (AB) が観察された。

#### イネオートファジー欠損変異体の同定と表現型の解析

ATG7 は、オートファゴソームの形成に必須であり、ATG5-ATG12 結合体の形成において、E1 様酵素として働く [12]。イネにおいては、単一遺伝子としてゲノム上に存在しており、根や葉、そして生殖器官である穂、葯、雌しべ、種子等の、あらゆる組織で発現が見られる [11, 12]。

我々は、イネのレトロトランスポゾン *Tos17* 挿入変異系統 35,000 ラインを探索し、第 1 エキソンに *Tos17* が挿入された *Osatg7* 変異株 (*Osatg7-1*) を同定した [11]。GFP-AtATG8a を用いたオートファジー動態のイメージング解析、TEM 解析、免疫ブロット法による ATG5-ATG12 結合体の生化学的解析等の結果、*Osatg7* 変異株では、オートファジーが完全に欠損していることが判明した [11]。

次に、オートファジー欠損が、イネの生長及び発生に与える影響を調べるために、*Osatg7* 変異株の表現型を、生活環を通して解析した。栄養生長期においては、野性型と *Osatg7* 変異株の間で大きな差は見られなかった。一方、生殖生長期に移行すると、野性型に比べて *Osatg7* 変異株では、出穂及び開花の遅延が観察されると共に、重篤な不稔形質を示し、変異体ホモ個体では、種子がほぼ全く稔らなかった (図 3) [11]。この結果は、オートファジーが、イネの生殖生長過程において重要な役割を担う可能性を示唆している。

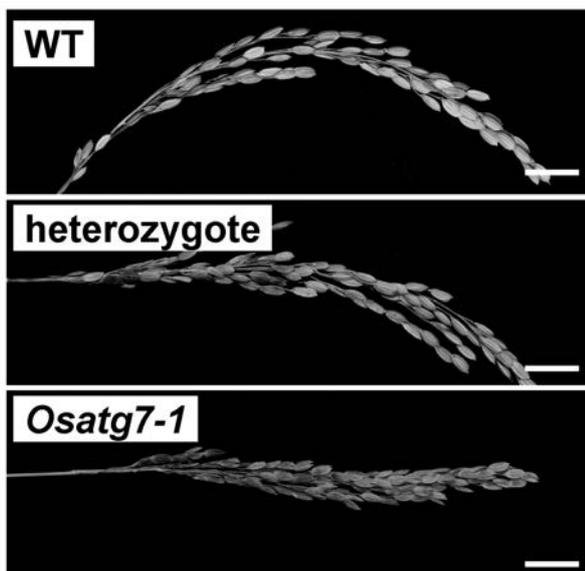


図3. イネのオートファジー欠損変異体の乾燥穂の形態。オートファジー欠損変異体のイネのホモ接合型 (*Osatg7-1*) は重篤な不稔形質を示した。写真は稔実期においても種子を形成せず、こうべを垂れていない様子を示している。Bar = 2 cm

#### イネオートファジー欠損変異体は雄性不稔形質を示す

*Osatg7* 変異株における不稔形質の原因を探る第一歩として、交雑検定を行った。*Osatg7* 変異株の雌しべに、野生型の花粉を受粉させたときには、種子が得られたのに対し、野生型の雌しべに、変異株の花粉を受粉させたときには、稔実種子は得られなかった[11]。これらの結果は、*Osatg7* 変異株の不稔形質は、雄性 (♂) 側の異常に起因することを示唆している。実際、成熟期の雌しべは、野生型株と *Osatg7* 変異株との間で、形態的差異は観察されなかった。また、この表現型は、*Osatg9* 変異株でも同様に観察された[11]ことから、イネのオートファジー欠損が、不稔の直接原因である可能性が強く示唆された。

イネのオートファジー変異株が雄性不稔であることから、雄性側の配偶子である花粉について解析を進めた。まず、野生型及び *Osatg7* 変異株の成熟葯内の花粉を観察した結果、野生型に比べ変異株の葯内には、未成熟な花粉が多く見られた。成熟花粉では、デンプンや lipid body (脂質顆粒/脂肪滴) が花粉内に蓄積しており[13]、花粉成熟度の一つの指標として用いられる。そこで、野生型及び *Osatg7* 変異株花粉のデンプンや脂質顆粒蓄積を解析したところ、野生型株に比べ、変異株では蓄積量が大幅に減少していた。

次に、受精過程に必須な、花粉管の発芽及び伸長を解析した。

成熟期の花粉を花粉発芽培地に散布し、花粉の発芽率を定量解析した。その結果、野生型の花粉の発芽率は 60 % 程度だったのに対して、*Osatg7* 変異株の花粉は、ほぼ全く発芽しなかった[11]。こうした解析結果から、*Osatg7* 変異株の花粉は未成熟であり、*Osatg7* 変異株においては、花粉成熟の過程に異常が生じていることが示唆された。

次に、花粉異常が配偶子由来なのか、親である配偶体由来なのかを調べるために、遺伝子型がヘテロである *Osatg7* 変異株と野生型の交配実験を行った。野生型の雌しべに、遺伝子型がヘテロの *Osatg7* 変異株花粉を受粉させたところ、次世代における遺伝子型の比は、野生型とヘテロが 1 対 1 であった [11]。この結果は、配偶子の遺伝子型が *Osatg7* 欠損になっても、花粉成熟に影響を与えないことを示唆している。つまり、*Osatg7* 変異株の花粉異常は、配偶子である花粉自体のオートファジー能欠損が原因ではなく、配偶体からのデンプンや脂質等の、物質・栄養供給異常に起因する可能性が高いことを示唆する。

#### タペート組織におけるオートファジーとプログラム細胞死

葯は 4 つの層から構成されており、その最内層はタペート層と呼ばれる。花粉発達の間、タペート細胞が花粉成熟に必要な物質の供給を担うと考えられている[14]。植物の花粉発生初期において、葯内の花粉母細胞から減数分裂により、将来の花粉である小孢子が生じる。1 つの花粉母細胞から減数分裂で生じた 4 つの小孢子をまとめて花粉四分体と呼ぶ[14]。花粉成熟期に移行すると、プログラム細胞死 (PCD) による、タペート細胞の分解が観察される。タペートの分解は高度に制御されており、細胞質の縮み、細胞壁からの分離、染色体凝縮、小胞体 (ER) の肥大といった PCD に見られる特徴が観察される [15]。

オートファジーがタペート細胞の分解・代謝に関与している可能性を検証するため、花粉の成熟ステージを追って、タペート細胞内を電子顕微鏡により観察した。その結果、野生型の一核期のタペート細胞において、オートファゴソーム様構造体が多数観察された。*Osatg7* 変異株のタペート細胞内では、そのような構造体は観察されなかった。さらに、野生型の一核期のタペート細胞内において液胞内に lipid body が取り込まれたものが多数観察された[11]。lipid body は花粉表面の外殻形成の材料として重要である[14]。これらの結果はオートファジーが一核期のタペート細胞内で誘導され、タペート細胞内の脂質等の代謝・分解に関与している可能性を示唆する。

花粉形成の過程で、タペート層は PCD により消失するが、*Osatg7* 変異株では、成熟葯においてもタペート層の一部が残存していた[11]。タペート細胞に誘導されるオートファジーは、PCD にも関与する可能性が示唆される。近年、動物においてオートファジーが関与するさまざまな PCD (オートファジー様細胞死) が報告されている[16-19]。

正常な花粉成熟には、タペート細胞の PCD が適切な時期に誘導されることが必要である。例えば *ms1* 変異体は、タペートの分解が遅れ、PCD による分解ではなく、ネクロシス様の分解に移行してしまうことが報告されている[20]。さらに、イネの変異体 *tapetal degeneration retardation (Ostr)* は、タペートの分解、PCD が著しく遅延し、結果として花粉に異常が生じる [21, 22]。タペートの PCD のタイミングを決定する機構は、四分子期から開始していると考えられている[23]。

*Osatg7* 変異株におけるタペート層の分解不全は、オートファジーという分解機構の欠損により、花粉の成熟に比べて、タペート細胞の分解が遅れたことを反映しているとも考えられる。一方、花粉の成熟には、タペート細胞分解の適切な時間的制御を必要とすることから、この分解の遅延が、花粉の未成熟につながった可能性も考えられる。

さらに、*Osatg7* 変異株では、葯からの花粉放出過程である、裂開能も低下していた[11]。葯の裂開には、植物ホルモンだけでなく、葯内の乾燥レベルも重要である。*Osatg7* 変異株では、葯のタペート層が残存しており、この残存したタペート層が、葯内の乾燥の妨げとなり、結果として、葯の不裂開を引き起こしている可能性も考えられる。

#### イネオートファジー欠損変異体の葯は脂質代謝異常を示す

*Osatg7* 変異株の成熟花粉において、lipid body の蓄積量が減少していたことから、野生型株及び *Osatg7* 変異株の成熟葯の脂質を網羅的に分析した。その結果、野生型株と比べて *Osatg7* 変異株では、トリアシルグリセロール (TAG) が減少していた [11]。TAG は lipid body の主成分であり、エネルギーの原料である [13]。この結果は、前述の lipid body の TEM 解析結果と一致する。加えて *Osatg7* 変異株では、ジアシルグリセロール (TAG 生合成の中間産物)、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルエタノールアミンの減少と、遊離脂肪酸の増加も観察された[11]。これらの結果から、タペート層及び花粉を含む葯内の脂質代謝にオートファジーが重要であり、*Osatg7* 変異株では、TAG 合成に必要な物質の供給に異常が生じた可

能性が考えられる。

#### 考察とまとめ

*Osatg7* 変異株等のイネのオートファジー欠損株は不稔形質を示す[11, 24]。一方、*Atatg7* 変異株等、シロイヌナズナのオートファジー欠損株は、正常な生長と発生を示す[25]。この相違の原因として、イネとシロイヌナズナの花粉形成過程におけるタペート層の分解様式の相違が考えられる。どちらも最終的にタペート細胞が PCD により消失することは同じだが、イネでは四分子期から徐々にタペート層が分解され、薄くなり、最終的に消失するのに対して、シロイヌナズナのタペート細胞は、一度肥大し、花粉成熟の最終段階においてはじけ、その内容物が花粉表面に付着する[14]。

シロイヌナズナの花粉成熟にオートファジーが必須でないとしても、タペート細胞においてオートファジーの誘導が起きている可能性はあり得る。実際、トマト等、複数の植物種のタペート細胞内において、オートファゴソーム様構造体が存在する可能性を示唆する知見もある[26, 27]。オートファジーによるタペート細胞分解という機構は、イネ以外の植物種でも広く保存されている可能性も考えられる。

タペート細胞におけるオートファジー動態のイメージング解析は、植物の生殖機構の解明と共に、穀物の種子形成等の応用面からも重要な課題である[28]。筆者らは現在、タペート細胞内のオートファジーや lipid body 等のオルガネラの動態を解析するための新たなイメージング技術の開発を進めている。

#### 引用文献

1. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y (2011) The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27: 107-132.
2. Tsukamoto S, Kuma A, Murakami M, Kishi C, Yamamoto A, Mizushima N (2008) Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos. *Science* 321: 117-120.
3. Melendez A, Levine B. (2009) "Autophagy in *C. elegans*" in *WormBook*, eds J. M. Kramer, DC Moerman, and The *C. elegans* Research Community. Available at: <http://www.wormbook.org/>
4. Yoshimoto K (2012) Beginning to understand autophagy, an intracellular self-degradation system in plants. *Plant Cell Physiol.* 53: 1355-1365.
5. Fujiki Y, Yoshimoto K, Ohsumi Y (2007) An Arabidopsis

- homolog of yeast ATG6/VPS30 is essential for pollen germination. *Plant Physiol.* 143: 1132-1139.
6. Lee Y, Kim ES, Choi Y, Hwang I, Staiger CJ, Chung YY, Lee Y (2008) The Arabidopsis phosphatidylinositol 3-kinase is important for pollen development. *Plant Physiol.* 147: 1886-1897.
  7. Mizushima N, Komatsu M (2011) Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 147: 728-741.
  8. Yoshimoto K, Hanaoka H, Sato S, Kato T, Tabata S, Noda T, Ohsumi Y (2004) Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy. *Plant Cell* 16: 2967-2983.
  9. Hanamata S, Kurusu T, Okada M, Suda A, Kawamura K, Tsukada E, Kuchitsu K (2013) *In vivo* imaging and quantitative monitoring of autophagic flux in tobacco BY-2 cells. *Plant Sig. Behav.* 8: e22510.
  10. 花俣 繁, 来須 孝光, 朽津 和幸 (2014) 植物のオートファジー動態の簡便な定量解析. *バイオイメージング* 23: 23-27.
  11. Kurusu T, Koyano T, Hanamata S, Kubo T, Noguchi Y, Yagi C, Nagata N, Yamamoto T, Ohnishi T, Okazaki Y, Kitahata N, Ando D, Ishikawa M, Wada S, Miyao A, Hirochika H, Shimada S, Makino A, Saito K, Ishida H, Kinoshita T, Kurata N, Kuchitsu K (2014) OsATG7 is required for autophagy-dependent lipid metabolism in rice postmeiotic anther development. *Autophagy* 10: 878-888.
  12. Li F, Vierstra RD (2012) Autophagy: a multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling. *Trends Plant Sci.* 17: 526-537.
  13. Kim HU, Hsieh K, Ratnayake C, Huang AH (2002) A novel group of oleosins is present inside the pollen of Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* 277: 22677-22684.
  14. Ariizumi T, Toriyama K (2011) Genetic regulation of sporopollenin synthesis and pollen exine development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62: 437-460.
  15. Papini A, Mosti S, Brighigna L (1999) Programmed-cell death events during tapetum development of angiosperms. *Protoplasma* 207: 213-221.
  16. Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB, Tsujimoto Y (2004) Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat. Cell Biol.* 6: 1221-1228.
  17. Tsujimoto Y, Shimizu S (2005) Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ.* 12: 1528-1534.
  18. Gump JM, Thorburn A (2011) Autophagy and apoptosis: what is the connection? *Trends Cell Biol.* 21: 387-392.
  19. Melendez A, Neufeld TP (2008) The cell biology of autophagy in metazoans: a developing story. *Development* 135: 2347-2360.
  20. Vizcay-Barrena G, Wilson ZA (2006) Altered tapetal PCD and pollen wall development in the Arabidopsis *ms1* mutant. *J. Exp. Bot.* 57: 2709-2717.
  21. Li N, Zhang DS, Liu HS, Yin CS, Li XX, Liang WQ, Yuan Z, Xu B, Chu HW, Wang J, Wen TQ, Huang H, Luo D, Ma H, Zhang DB (2006) The rice tapetum degeneration retardation gene is required for tapetum degradation and anther development. *Plant Cell* 18: 2999-3014.
  22. Zhang DS, Liang WQ, Yuan Z, Li N, Shi J, Wang J, Liu YM, Yu WJ, Zhang DB (2008) Tapetum degeneration retardation is critical for aliphatic metabolism and gene regulation during rice pollen development. *Mol. Plant* 1: 599-610.
  23. Kawanabe T, Ariizumi T, Kawai-Yamada M, Uchimiya H, Toriyama K (2006) Abolition of the tapetum suicide program ruins microsporogenesis. *Plant Cell Physiol.* 47: 784-787.
  24. Hanamata S, Kurusu T, Kuchitsu K (2014) Roles of autophagy in male reproductive development in plants. *Front Plant Sci.* 5: e457.
  25. Doelling JH, Walker JM, Friedman EM, Thompson AR, Vierstra RD (2002) The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 277: 33105-33114.
  26. Senatore A, Trobacher CP, Greenwood JS (2009) Ricinosomes predict programmed cell death leading to anther dehiscence in tomato. *Plant Physiol.* 149: 775-790.
  27. Papini A, Mosti S, van Doorn WG (2014) Classical macroautophagy in *Lobivia rauschii* (Cactaceae) and possible plastidial autophagy in *Tillandsia albida* (Bromeliaceae) tapetum cells. *Protoplasma* 251: 719-725.
  28. 来須 孝光, 朽津 和幸 (2014) 穀物の花粉・種子形成の新たな仕組み *理大科学フォーラム* 31: 26-29.

(2015年5月5日受付; 2015年5月11日受理)

## 特集「顕微鏡で測る」(2)

## ルシフェラーゼを用いた細胞レベルの遺伝子発現動態解析

今井 章裕<sup>1\*</sup>、村田 隆<sup>1,2</sup>、長谷部 光泰<sup>1,2</sup><sup>1</sup>自然科学研究機構・基礎生物学研究所・生物進化研究部門、<sup>2</sup>総合研究大学院大学・生命科学研究科

\*E-mail: aimai@nibb.ac.jp

## 要旨

多細胞生物の発生や環境応答の過程では、遺伝子発現が細胞ごとに異なる動態を示すことがある。遺伝子発現の動態を詳細に知るためには、生体内でレポータータンパク質を発現させ、そのシグナルの時空間変化を調べる必要がある。これまでの遺伝子発現の動態解析では、シグナルが強く、かつ多色イメージングが可能である蛍光タンパク質が、レポータータンパク質として主に用いられてきた。しかしながら、蛍光の検出には励起光の照射が必須であるため、それが引き起こす細胞へのダメージや自家蛍光の発生といった問題に常に注意しなくてはならない。一方で、ルシフェラーゼを用いた発光イメージングは、励起光を使用しないためこれらの問題を回避できる反面、シグナルが微弱で検出が困難であるという問題があった。近年、発光検出器の感度の向上に伴い、このルシフェラーゼの短所は克服されてきている。本稿では、発光イメージングの近年の進歩を概説し、筆者らが開発した細胞レベル発光イメージング系を紹介する。

## はじめに

ホタルなどの発光生物は、自ら光を生成するしくみを持ち、生存戦略のひとつとして「発光」を利用している。この「発光」は、ルシフェリンを基質としたルシフェラーゼによる酵素反応の結果、化学エネルギーが光エネルギーへと変換することで生ずる[1]。ルシフェラーゼ遺伝子は、細菌・昆虫・海産無脊椎動物といった様々な生物からこれまでに単離・同定されており、注目する遺伝子のプロモーター配列と融合させ、生体内に導入することで、遺伝子発現の変動を推測するレポーターとして用いられてきた。発光は、ルミノメーターによって検出されることが多いが、ルミノメーターは溶液試料中の発光量を測定する機器であるため、「どこで発光しているか」という空間情報を得ることができない。空間情報を得るためには、ルシフェラーゼは発光が微弱であるため検出が困難であった。しかし、近年の検出カメラの感度の向上によって、発光シグナルを画像として取得することが可能になり、これによってルシフェラーゼは遺伝子発現の時空間変化を解析するツールとして、さまざまな分野において選択されるようになってきている。

本稿ではルシフェラーゼをレポータータンパク質として用いた発光イメージング系の概要と、蛍光イメージング

と比較した際の利点について述べる。また、筆者らが行っている細胞レベル発光イメージング系を用いた遺伝子発現解析の例を紹介する。

## ルシフェラーゼによる発光反応

ルシフェラーゼは発光反応を触媒する酵素の総称であり、その立体構造や、反応基質、反応様式は生物種によって大きく異なることが多い[1]。これまで同定されたルシフェラーゼの中で最もその反応機構がよく調べられているのはホタル (*Photinus pyralis*) ルシフェラーゼであり、レポータータンパク質として多くの研究で使用されている。ホタルルシフェラーゼは、ATP およびマグネシウムイオンの存在下で、ホタルルシフェリンの酸化を触媒し、その結果生じる励起状態のオキシルルシフェリンが基底状態へ戻る際に、黄緑色 (最大発光波長 562 nm) の光を生じる (図1)。ウミシイタケ (*Renilla reniformis*) ルシフェラーゼは、カルシウムイオンの結合によって活性化され、基質であるセレンテラジン (ウミシイタケルシフェリン) の酸化を触媒する。放出される光は青緑色 (最大発光波長 480 nm) である。発光細菌 (*Vibrio harveyi*) ルシフェラーゼは、細菌における遺伝子発現の検出に用いられ、還元型フラビンモノヌクレオチドの酸化反応を触媒し、結果とし

て青緑色の光（最大発光波長 490 nm）が生じる。

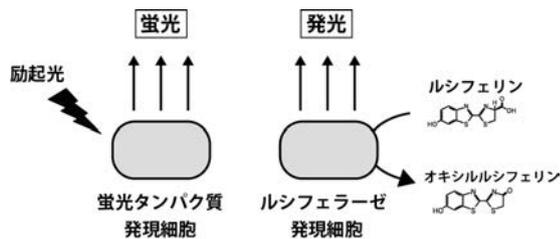


図1 蛍光タンパク質発現細胞とルシフェラーゼ発現細胞の発光様式の違い。ここではホタルルシフェラーゼの触媒反応例を示す。

### 発光イメージングに用いる検出装置

発光イメージングでは、シグナルを検出する機器として電子増倍型 CCD（Electron Multiplying -CCD: EM-CCD）カメラが用いられる。EM-CCD カメラは、通常の CCD カメラと異なり、受光部で発生した電荷をデジタル信号に変換する前に、高電圧をかけて電荷を増幅させることができる[2]。EM-CCD カメラの登場により、発光シグナルを検出する感度が飛躍的に上昇し、解析できる対象が広がった。

発光検出装置は、「暗箱一体型」と、「顕微鏡-カメラ独立型」に分けられる。「暗箱一体型」は、カメラ、レンズが遮光性の高い暗箱に内蔵されており、暗箱内部の生きたままの小動物、植物、寒天培地上の微生物などからの発光を検出することができる。「顕微鏡-カメラ独立型」は、EM-CCD カメラを顕微鏡に接続する形式で構成される。その場合には、顕微鏡本体を暗幕で覆い、入念に遮光する必要がある。蛍光顕微鏡の使用に求められる暗条件とは異なり、わずかな光の漏れがノイズとして映り込んでしまうため、可能であるならば暗室内に顕微鏡システム一式を設置するのが望ましい。「顕微鏡-カメラ独立型」は、「暗箱一体型」と異なり、顕微鏡システムの構成や解析ソフトウェアが自由に選べることに加え、照明や温度制御など観察時における試料の培養条件に柔軟に対応できるというメリットがある。

### 発光イメージングの利点

遺伝子の発現動態を調べる目的で生体イメージングを行う場合には、レポータータンパク質の選択肢として、蛍光タンパク質とルシフェラーゼが挙げられる。どちらも観察目的によって得手/不得手な側面がある。この項では、蛍光イメージングと比べた際の、発光イメージングの利点

について述べる。

蛍光タンパク質の検出には、生体試料に励起光を照射する必要がある。励起光は蛍光タンパク質以外の生体物質にも吸収され、自家蛍光が発生する。蛍光タンパク質のシグナル値が低い場合には、この自家蛍光は不規則な背景光として無視できない割合となり、シグナル値の信頼性が低下する。一方、励起光を必要としない発光イメージングでは、自家蛍光が発生しないことから、背景光を極めて低いレベルに抑えることができる。したがって、蛍光イメージングに比べ、シグナル値の信頼度が高く、定量性に優れると期待される。

また、励起光は、熱や活性酸素の発生、DNA 損傷などを引き起こし、生体にダメージを与える。発光イメージングでは、励起光によるダメージがないため、生体試料の長期的な経時観察をより低い侵襲性で行うことができる。

レポーターシグナルを安定に検出できることも発光イメージングの利点と考えられる。励起光照射は蛍光タンパク質特有の退色現象を引き起こすが、発光イメージングにおいては、この問題を回避し、長時間かつ安定的なシグナルの検出が可能である。ただし、基質の減少によるシグナルの低下には注意が必要であり、この点については後の項で詳しく述べる。

ルシフェラーゼによる発光シグナルは、プロモーター活性の経時変動に対し、より高い時間的正確度で応答すると期待される。蛍光タンパク質は、翻訳後すぐにはレポータータンパク質として機能せず、アミノ酸残基間の環化・酸化反応によって起きる発色団の形成が必要である。蛍光タンパク質種によるが、シグナルとプロモーター活性の間に、長ければ数時間の時間的ずれが生じることもある [3]。ルシフェラーゼの機能に発色団の形成は必要なく、翻訳後すぐに機能することができる分、シグナル検出開始に至る時間が短くなると期待される。また、ルシフェラーゼの方が、概してタンパク質寿命が短い傾向にある。たとえば、野生型ホタルルシフェラーゼの半減期が約 2 時間であるのに対し、野生型 GFP は約 26 時間である[4][5]。このため、野生型ホタルルシフェラーゼの方が野生型 GFP に比べ、プロモーター活性の減衰に対してより時間的なずれが少なく応答できると考えられる。ただし、発色団形成時間およびタンパク質寿命に関しては、近年多数の改良型蛍光タンパク質が開発されており、蛍光タンパク質の時間的正確度

に関する短所は補われつつある[6]。

### ルシフェラーゼの改良

前項で、蛍光イメージングに対する発光イメージングの利点を述べたが、発光イメージングにもいくつかの改善すべき点がある。

遺伝子の発現解析を行う際、複数遺伝子の発現変動パターンを同時に比較する実験や、遺伝子発現量の標準化が必要な場合がある。生体イメージングにおいてこれらを行うには、複数種のレポーターを用いた多色アッセイを用いる必要がある。これは、異なる蛍光波長を発する蛍光タンパク質あるいは蛍光色素を用いて、波長フィルタによって各々のシグナルを分離し、異なるレポーターのシグナルを独立に検出する手法である。かつてのルシフェラーゼを用いた研究では、いずれのルシフェラーゼ種でも最大発光波長が青緑色付近に近接していたため多色アッセイが難しかった。しかし、現在では赤色や橙色発光型のルシフェラーゼが単離および開発されており、同一の試料において複数種のルシフェラーゼの発光シグナルを独立に測定することが可能になってきた。

発光イメージングのもう一つの問題点はシグナルが微弱なことである。短時間に変動する遺伝子発現を観察する場合には、露光時間を長くすることができない。そこで、シグナル強度の乏しさを、ルシフェラーゼと蛍光タンパク質の融合タンパク質を作ることによって改善する方法が考案された[7][8]。これは生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) の原理に基づいており、発光基質が光を放出するエネルギーを、近傍の蛍光タンパク質に転移させる。すると、蛍光タンパク質の光エネルギー変換効率がより高い場合に、発光量が増えることになる。励起光を使わずに、

より明るいシグナルの観察を可能にする画期的な方法である。

### 発光イメージングを行う際の留意点

この項では、実際に発光イメージングを行う場合に特に注意を要する点について述べる。

第一の注意点は、基質の投与方法である。観察対象が培養細胞や植物体の場合は、基質の培地への添加や噴射投与、あるいはマウスなどの小動物の場合には、静脈/腹腔内注射による投与が一般的であるが、基質が解析対象の組織や細胞に到達しているかを、恒常的発現を示す遺伝子プロモーターを利用して確認する必要がある。

第二の注意点は、基質の安定性である。ウミシイタケルシフェラーゼを用いる場合、基質であるセレンテラジンは培地中で非常に不安定であることが多い[9]。長時間におよぶ生体イメージングでは、基質の追加投与を検討するか、保護基を付加することによって安定化させたセレンテラジンをを用いる必要がある[10]。

### 細胞レベル発光イメージングの実際

この項では、ルシフェラーゼを用いた遺伝子発現動態解析の例として、筆者らが開発した細胞レベル発光イメージング系について述べる。

筆者らは、コケ植物のヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) を研究材料にして、分化体細胞の幹細胞化の分子メカニズムの解明を目指している。ヒメツリガネゴケの葉を切断し、培地中で生育させると、切断箇所面に葉細胞が幹細胞へと変化する[11]。幹細胞への運命転換が起こったことは、先端成長と細胞分裂が起こることによって判別でき、切断後24時間から36時間のあいだに観察される(図2)。

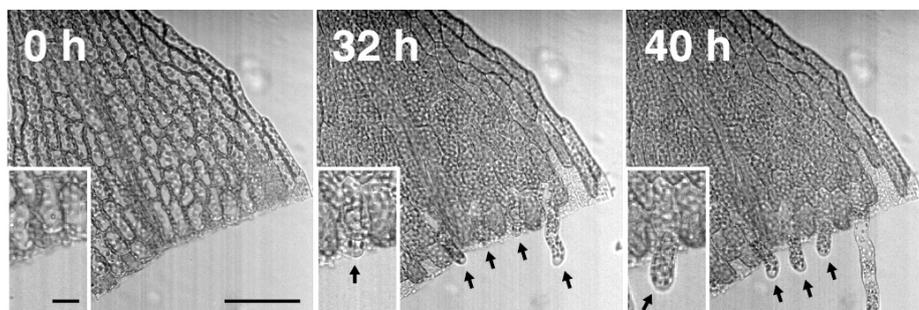


図2 ヒメツリガネゴケの幹細胞発現系。葉の切断によって、切り口の葉細胞が幹細胞化する。幹細胞は、先端成長をしながら細胞分裂を繰り返す。写真は切断後0、32、40時間目 (h) の葉。矢印は幹細胞を指す。写真中のスケールバーは100 $\mu$ m (図中枠内は20 $\mu$ m) を示す。

この幹細胞化は、光を完全に遮断した暗条件下では誘導されず、光シグナルが必要であることが分かっている。

筆者らの研究室では、これまでに複数の幹細胞化を制御する遺伝子を同定してきた。それらは幹細胞化過程において、自己フィードバック制御を含む遺伝子ネットワークを形成すると考えられている。各々の遺伝子の制御関係を明らかにするために、野生型と変異体間における遺伝子発現の比較解析を行う必要があるが、それには発現変化量を正確にモニターできる高い定量性をもった解析系が適している。また、幹細胞化までの24~36時間という比較的短時間に変動する遺伝子発現を、時間的なずれを少なくして検出する必要がある。さらに、幹細胞と非幹細胞は隣り合っているため、それらを区分して独立に遺伝子発現を測定したい。そこで筆者らは、ヒメツリガネゴケの幹細胞誘導系において、「高い定量性」かつ「高い時間的正確度」で、「細胞ごと」に遺伝子発現量を測定する系の確立を目指し、細胞レベル発光イメージング系を独自に開発した。

発光検出装置は「顕微鏡-カメラ独立型」を採用し、倒立顕微鏡やEM-CCDカメラなどから構成される顕微鏡解析システム一式を、温度制御可能な暗室内に設置した。次に、幹細胞誘導には光が必要であるが、一方で発光検出時には完全な暗条件である必要がある。この障害を乗り越えるため、「顕微鏡-カメラ独立型」システムの利点を活かし、別途LED照明装置とプログラムタイマーを導入し、明暗サイクルを作り出した(図3A)。ホタルルシフェリンは、葉に接する寒天培地にあらかじめ添加した。解析対象遺伝子のプロモーター配列とホタルルシフェラーゼ遺伝子の融合遺伝子を導入した安定形質転換体を作成し観察試料とした。

実際の例として、ルシフェラーゼを用いて行った、幹細胞化を促進するRNA結合タンパク質遺伝子のプロモーター活性の解析画像を示す(図3B)。本プロモーターレポーターラインの切断した葉の各細胞から、発光反応に由来するシグナルが検出された。このように、背景光と明確に区

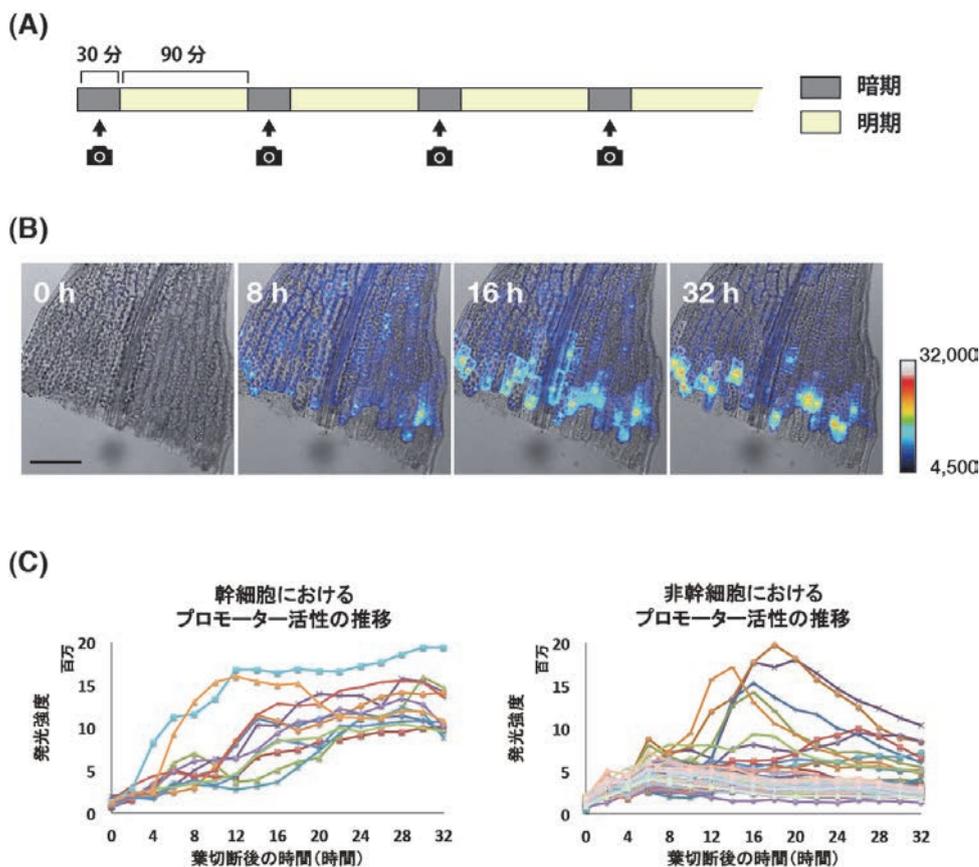


図3 幹細胞化を促進するRNA結合タンパク質遺伝子のプロモーター活性レポーターラインを用いた、幹細胞誘導時における発光強度の推移の定量解析。(A) 発光シグナルの検出スケジュール。30分間の暗期にEM-CCDカメラによる発光シグナルの検出を行う。(B) 葉切断後0、8、16、32時間目(h)のプロモーター活性(疑似カラー)と明視野の重ねあわせ画像。1回の撮影あたりの露光時間は2分間で行った。写真中のスケールバーは100 μmを示す。(C) 葉切断後32時間目までの幹細胞(左)および非幹細胞(右)の発光強度の推移。それぞれのプロットは細胞ごとの発光強度の変化を示す。

別できる発光シグナルが検出されれば、画像解析ソフトウェアを用いて、発光強度の時間推移を細胞ごとに区分化して定量解析することができる。図3Cは、画像中の全細胞を「幹細胞」と「非幹細胞」にグループ分けし、発光強度の時間推移を細胞ごとにプロットしたグラフである。これを見ると、個々の細胞における本遺伝子のプロモーター活性の動態は、特に「非幹細胞」グループ内において多様であり、それらは決して同一のアイデンティティーをもった細胞集団ではないことが分かる。

同一の培養条件で生育させ、外見上は同じ状態にある細胞の集団であっても、細胞ごとのばらつきや遺伝子発現のゆらぎが観察される [12]。それらを計測するには、遺伝子発現の変化を“同一の細胞”で追跡する必要があり、それはシングルセルトランスクリプトームのような一点のみの解析系では困難である。細胞レベル発光イメージング系は、幹細胞化過程における遺伝子発現の微細なゆらぎや細胞間のばらつきを検出し、細胞ごとの発現動態を比較するのに適した解析系である。

#### おわりに

本稿で述べたように、発光イメージングには多くの利点があり、これまで見えなかった生命現象を発見し、新たな研究展開を導く可能性を含むツールである。今後、新しい技術開発とともに、より幅広い解析対象において活用が進むことが期待できる。

#### 謝辞

原稿に有益なコメントをいただいた森下美生、越水静両氏に感謝する。本稿で述べた研究結果は、日本学術振興会「頭脳循環を加速する若手研究者戦略的海外派遣プログラム」における、Philip N. Benfey 教授（デューク大学、米国）との共同研究による成果を含む。

#### 引用文献

1. 今井一洋, 近江谷克裕 (2006) バイオ・ケミルミネセンス ハンドブック 丸善株式会社
2. 最上秀夫 (2006) 染色・バイオイメーjing実験ハンドブック第8章, 高感度 CCD カメラとイメージングテンシファイアー 羊土社
3. Evdokimov AG, Pokross ME, Egorov NS, Zaraisky AG,

- Yampolsky IV, Merzlyak EM, Shkoporov AN, Sander I, Lukyanov KA, Chudakov DM (2006) Structural basis for the fast maturation of Arthropoda green fluorescent protein. *EMBO Rep.* 7: 1006-1012.
4. Ignowski JM, Schaffer DV (2004) Kinetic analysis and modeling of firefly luciferase as a quantitative reporter gene in live mammalian cells. *Biotechnol. Bioeng.* 86: 827-834.
  5. Corish P, Tyler-Smith C (1999) Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells. *Protein Eng.* 12: 1035-1040.
  6. 永井健治 (2007) 生細胞蛍光イメージング第8章 変型蛍光タンパク質の利用 共立出版
  7. Hoshino H, Nakajima Y, Ohmiya Y (2007) Luciferase-YFP fusion tag with enhanced emission for single-cell luminescence imaging. *Nat. Methods* 4: 637-639.
  8. Saito K, Chang YF, Horikawa K, Hatsugai N, Higuchi Y, Hashida M, Yoshida Y, Matsuda T, Arai Y, Nagai T (2012) Luminescent proteins for high-speed single-cell and whole-body imaging. *Nat. Commun.* 3: 1262.
  9. Close DM, Xu T, Saylor GS, Ripp S (2011) In vivo bioluminescent imaging (BLI): Noninvasive visualization and interrogation of biological processes in living animals. *Sensors* 11: 180-206.
  10. Hawkins E, Unch J, Murphy N, Vidugiriene J, Scurria M, Klaubert DH, Wood KV (2005) Measuring *Renilla* luciferase luminescence in living cells. *Promega Notes* 90: 10-14.
  11. Ishikawa M, Murata T, Sato Y, Nishiyama T, Hiwatashi Y, Imai A, Kimura M, Sugimoto N, Akita A, Oguri Y, Friedman WE, Hasebe M, Kubo M (2011) Physcomitrella cyclin-dependent kinase A links cell cycle reactivation to other cellular changes during reprogramming of leaf cells. *Plant Cell* 23: 2924-2938.
  12. Elowitz MB, Levine AJ, Siggia ED, Swain PS (2002) Stochastic gene expression in a single cell. *Science* 297: 1183-1186.

(2014年7月19日受付; 2014年7月25日受理)

## 光退色後蛍光回復法 (FRAP) を用いたタンパク質動態解析の実際と 2 光子励起法の利用

村田 隆<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>基礎生物学研究所・生物進化研究部門、<sup>2</sup>総合研究大学院大学・生命科学研究科・基礎生物学専攻

\* E-mail: tkmurata@nibb.ac.jp

## はじめに

細胞内のタンパク質はその機能に応じて特定の場所に局在する。定常状態の細胞では、タンパク質は一定の場所に留まって動かないように見える。しかしながら、一見すると動かないように見えるタンパク質も常に結合と解離を繰り返している場合が多い。結合と解離は、タンパク質の交換に働き、タンパク質が局在変化をする時の原動力となると考えられる。これらの動態を解析することは、細胞の構造と機能をタンパク質レベルで理解する上で重要と思われる。

細胞内のタンパク質動態を可視化するには幾つかの方法がある。光退色後蛍光回復法 (FRAP) は比較的遅いタンパク質の動きを解析するのに適した方法である。この方法では、共焦点顕微鏡で細胞内の注目する領域の部分照射を行って蛍光分子を光退色させ、その後の回復速度を解析する。FRAP の他にも、光っていない蛍光タンパク質を光活性化するフォトアクティベーション法、1つの蛍光タンパク質の動きを直接検出する 1 分子観察法も有用な方法である。また、着目する焦点領域の蛍光変動を解析する蛍光相関分光法 (FCS) も細胞内蛍光分子の動態を解析する方法である。

蛍光相関分光法が溶液中で早く拡散する分子を対象にするのに対し、FRAP など他の方法は、対象とするタンパク質が細胞内の構造上に結合し、移動や交換反応が数百ミリ秒から数十分程度の間にかかる現象を解析する方法である。これらは顕微鏡の画像取得を伴う方法であるため、画像取得時間より速く動く分子の動態を捉えることはできない。FRAP の場合は、画像取得・解析を 1 次元の線に限定するなどの方法で高速化が可能だが、この場合でも、蛍光分子の光退色に必要な光量の光が解析領域に照射されるより速く動く分子の動態を解析するのは不可能である。逆に、FCS は着目する焦点領域中に入出入りする分子数の変動を解析するため、動きの遅い分子は解析が難しい。そのため、研究目的に応じて使い分けられている[1]。本稿

では実際に FRAP を行う場合の注意点、蛍光標識タンパク質の量が細胞内で変動する場合の内部標準の利用、対象とする構造体が立体的な時の 2 光子励起法の利用について議論する。

## FRAP の基本原理

FRAP では、解析対象のタンパク質と蛍光タンパク質との融合タンパク質を細胞内に発現させる[1]。化学的に蛍光標識したタンパク質を細胞内に導入する方法もある[2]。次に、細胞内の特定部位に局在した融合タンパク質に強い光を当てて蛍光を退色させる。もしも退色した融合タンパク質が他の領域にある退色していないタンパク質と交換するならば、退色領域の蛍光は回復するはずである (図 1)。この回復時間を解析することによりタンパク質動態を知ることができる。現在市販されているポイントスキャン式の共焦点顕微鏡は、スキャンパターンをコンピューターで制御するため、視野中の狭い領域に励起光をパターン照射することは容易である。

FRAP (Fluorescent Recovery After Photobleaching)

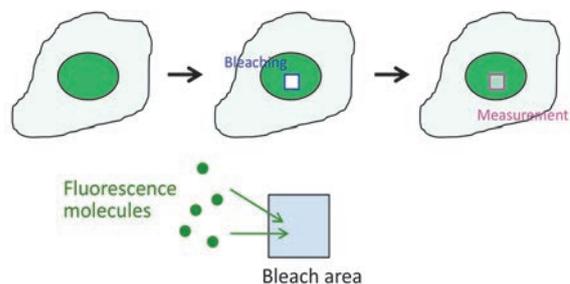


図 1 光退色後蛍光回復法 (FRAP) の原理。細胞内の特定の領域に局在するタンパク質を蛍光標識し (図では緑色で示す)、一部の領域を光退色させる (中央)。退色領域と周囲の間で蛍光分子の交換が起こる場合、退色領域への蛍光分子の侵入が起こり (下)、時間とともに蛍光は回復する (右)。

FRAPは、対象とするタンパク質が方向性を持って移動する場合にも有力な解析手段となる。もしも対象とするタンパク質が方向性を持って移動するならば、退色によって生じた暗い領域はタンパク質の移動とともに動くはずである(図2)。蛍光回復速度の解析による交換速度の定量化の他に、タンパク質の移動方向についての情報が得られることがFRAPの利点である。

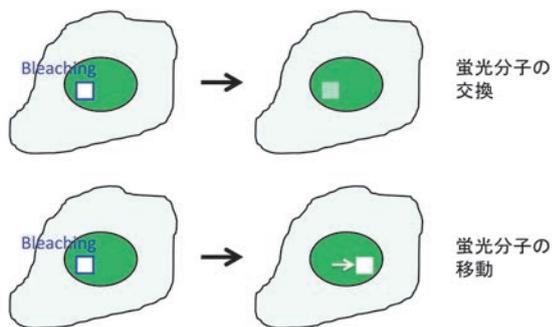


図2 退色した蛍光標識タンパク質が退色領域外のタンパク質と交換する場合、蛍光は時間とともに回復するが、標識したタンパク質が一定方向(この場合は右)に移動する場合、退色した領域は時間とともに移動する。

**蛍光回復曲線の解釈**

FRAPは、蛍光タンパク質を融合させた対象タンパク質を発現する細胞と共焦点顕微鏡があればできる方法なので、1分子解析やFCSなど他の方法に比べて手軽に行える。その一方で、実験結果の解釈には注意する必要がある。

退色後の蛍光回復曲線の一例を図3に示す。この例では、退色後、蛍光は急速に回復し、最終的には定常状態に達するが、初期値までは回復しない。この場合、対象とするタンパク質には細胞内の他の分子と交換するもの他に、対象領域にとどまり交換しないものが存在すると解釈できる[1]。これらの構成成分の交換速度と割合は、計算により求めることが可能である。また、より複雑な3成分以上の系であっても、カーブフィッティングは可能と考えられるが、その場合は結果の解釈をより慎重に行うべきと思われる。

分子生物学においては、野生型と突然変異体でタンパク質の交換速度を比較する実験がよく行われる。このような

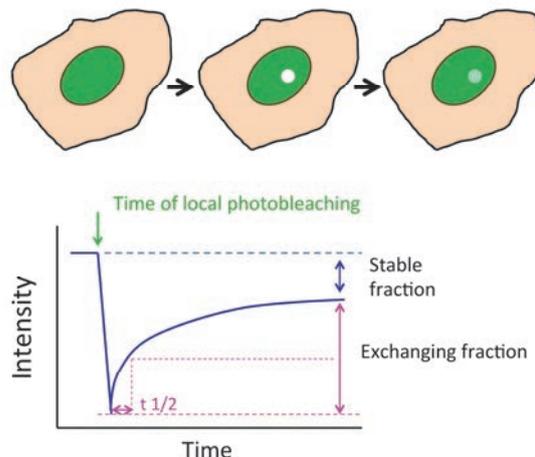


図3 蛍光回復曲線の一例。退色領域の蛍光輝度を縦軸、時間を横軸にプロットした。t1/2は自由に移動する蛍光分子の半分が交換した時間で、タンパク質移動速度の指標になる。一方、時間が経っても輝度が回復しない割合は移動しないタンパク質の存在比率の指標となる。

場合、退色後の一定時間後の回復率を求め、棒グラフで表示することが多い。一定時間後の回復率を求める場合、回復曲線のどの時点で回復率を求めるか、回復曲線を参照して決める必要がある。回復が定常状態になった時点で回復率を求めれば動かない成分の割合、回復初期なら交換速度を反映した数値になる。

**退色範囲、画像取得条件の設定**

実際に退色実験を行う場合、細胞内のどの領域をどの程度の広さで退色させるか決める必要がある。退色領域は解析する蛍光分子が局在する領域に比べて十分に狭いことが望ましい。もしも退色領域が広いと、細胞内の全蛍光分子に対して無視できない量の蛍光タンパク質が退色してしまい、見かけ上交換しない分子が増えた回復曲線になる(図4)。退色領域で退色した分子の量を計算に組み込んだ解析も行われているが[3]、実際に照射領域のどの範囲が退色したかを厳密に決定することは難しい(後述、図5参照)。また、図2下のように蛍光分子が方向性を持って移動するなど、退色した分子が自由拡散と異なる挙動をする場合には正しく計算できない。

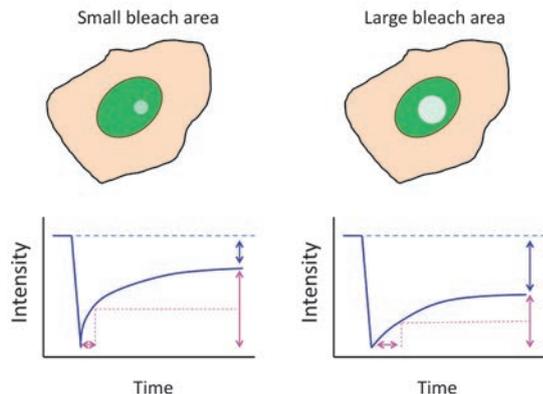


図4 退色領域が広すぎる場合に予想される回復曲線。退色した蛍光分子どうしの交換により、退色領域が十分に狭い場合（左）に比べて、動かない蛍光分子の画分が見かけ上増える。

FRAP において回復曲線を高時間分解能で得るためには、短い時間間隔で対象の画像を取得しなければならない。短時間で多数の蛍光タンパク質画像を取得する時に問題になるのが、蛍光タンパク質の光退色である。多くの解析では、退色領域以外の輝度を計測し、その輝度減少をもとに退色を補正することが行われている。画像解析プログラム ImageJ のプラグイン (FRAP Analysis) [4]にも組み込まれているが、退色の起こるような画像取得条件では光障害のリスクもあるため、可能な限り退色の起こらない画像取得条件を設定することが望ましい。対象とする細胞構造の識別が可能な程度に解像度を下げることによって、画像取得時の照射光量を下げ、退色を軽減することは可能である。1枚の美しい画像を撮影する条件と、光回復の定量に用いるデータを取得する条件は異なることに留意する必要がある。

#### タンパク質の量が変動する場合の解析

上記のように退色条件と画像取得条件に注意しても、回復曲線の解析が困難な場合がある。対象とする構造物上の蛍光融合タンパク質の総量が変動する場合である。FRAP による定量解析は、基本的には対象領域におけるタンパク質の交換反応が平衡状態であることを前提としている。蛍光融合タンパク質の量が変動している場合、本来は蛍光が100%回復する条件であっても、見かけの回復率は100%に届かなかったり、逆に100%を越えた回復になったりする。このような場合、単純に回復曲線を計測するだけでは定量

的解析は難しい。しかしながら、タンパク質の総量を見積もる内部標準マーカーを用いることにより、交換率を見積もることは可能である。測定対象のタンパク質に2色の異なる蛍光タンパク質を融合させた融合タンパク質を設計し、2色の融合タンパク質を同時に発現させる。このようにして作成した2色発現細胞を用い、1色のみを退色させ、もう1色は内部標準として用いる。内部標準との比率を計算することにより、タンパク質の総量が変動する条件下での動態を見積もることができる[5, 6]。

#### 2光子励起法との組み合わせ

先述のように、FRAP による光退色の範囲は対象物に対して十分に狭いことが望ましい。しかしながら、解析対象が立体的な場合、退色範囲を限定することは難しい。共焦点顕微鏡の励起光は対物レンズから円錐状に照射されて焦点を結ぶため、非焦点面では励起光が広範囲に照射される。光子密度は焦点面ほど高くないものの、非焦点面においても退色は起こる (図5)。そのため、狭い範囲に励起光をパターン照射した場合でも、無視できない量の蛍光タンパク質が退色することは起こりえる。このような場合、2光子励起法を用いて退色させることが有効である[7, 8]。

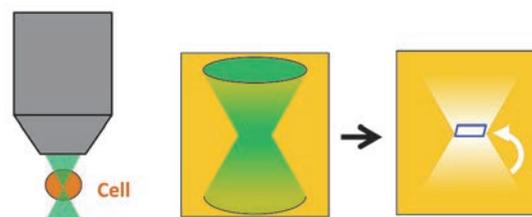


図5 1光子励起における退色領域の立体的広がり の概念図。退色領域は焦点面から上下に立体的に広がる。実際の退色領域は蛍光分子の退色しやすさやレーザー強度、対物レンズの開口数等の条件によって異なる。右図中の矢印は非焦点面で退色した蛍光分子の焦点面への流入を示す。

2光子励起現象は、1つの蛍光分子に2つの光子が同時に吸収された時に起こる現象である。たとえば、488 nm で励起される緑色蛍光タンパク質 (GFP) の場合、約2倍の波長である 950 nm の光子2個によっても励起できる[9]。2つの光子が1つの蛍光分子に同時に吸収される確率は

光強度の2乗に比例するため、2光子励起は顕微鏡の焦点付近のみで起こり、非焦点面で起こる確率は実質上ゼロである。そのため、2光子励起法を用いれば、蛍光タンパク質を焦点面でのみ退色させ、非焦点面では退色させないことが可能である。最新の2光子顕微鏡では共焦点顕微鏡観察と2光子励起を電動制御で素早く切り替えることが可能なため、共焦点顕微鏡観察で退色前の画像を撮影し、2光子励起で焦点面のみを退色させ、ただちに共焦点顕微鏡観察で画像取得することが可能になった。

2光子励起を用いれば焦点面のみを退色させることが可能だが、2光子励起特有の注意点もある。第一に、励起される分子の量が励起光量の増加に対して非線形で上昇するため、焦点面に励起光を当てすぎないように注意する必要がある。もしも励起光が強すぎると、試料の破壊につながる危険性がある。第二は励起波長の設定である。2光子励起は1光子励起に比べて広い波長範囲の蛍光色素を単一の波長で励起することができる[10]。しかしながら、このことは、単一波長の励起光で非特異的にさまざまな吸収波長の蛍光タンパク質が退色されてしまう可能性を意味する。内部標準を用いた多色標識の解析では、単一の蛍光タンパク質のみを退色させることが望ましいため、多重標識試料の2光子励起FRAPは、退色に用いる波長を慎重に選ぶ必要がある。

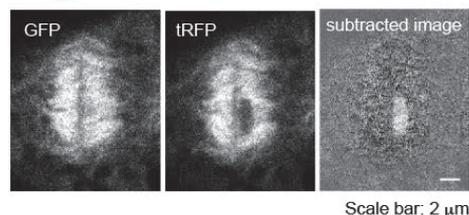
### 植物の微小管動態解析における内部標準の利用と2光子FRAP

一般に、動物の培養細胞はガラス表面に平たく伸展するものが多いが、植物の細胞は液体培地中で懸濁され、細胞は円筒状など厚みを持った形状になる。厚みを持った細胞の場合、非焦点面の退色についてより注意する必要がある。著者らはタバコ培養細胞の細胞質分裂における微小管動態の解析に2光子励起FRAPを利用した[11]。植物細胞の細胞質分裂においては、隔膜形成体と呼ばれる分裂装置が形成され、この中で細胞板が作られる。隔膜形成体は微小管を多く含む構造だが、その微小管動態には謎が多かった。隔膜形成体は細胞質分裂の進行とともに拡大し、局所的な微小管の増加と減少が起こる動的な構造体である。著者らは隔膜形成体の微小管動態を解析するため、TagRFPチューブリンとGFPチューブリンを同時に発現するタバコ培養細胞を作成した。次にTagRFPチューブリンを2光子励

起で退色させ、その後の回復を測定した。微小管の絶対量の増減を見積もるため、GFPチューブリンを内部標準として用いた。

TagRFPは赤色の蛍光タンパク質だが、他の多くの赤色蛍光タンパク質同様、約700-800nmの遠赤色光によっても2光子励起が起こる。さらに、赤色蛍光タンパク質の中で、この短波長側の2光子励起の励起効率が低いことが報告されている[12]。一方、GFPは約1000nmより短い広い波長範囲で2光子励起されるが、700-800nmでの励起効率は低い[12]。そこで、760nmの励起光を用いてレーザー出力を調整することにより、GFPはほとんど退色しないがTagRFPは退色する条件を得た。この条件でTagRFPチューブリンを退色させ、その後の回復を定量解析した。隔膜形成体の形状は時間とともに変わるため、退色領域の長時

### Images



### Quantification

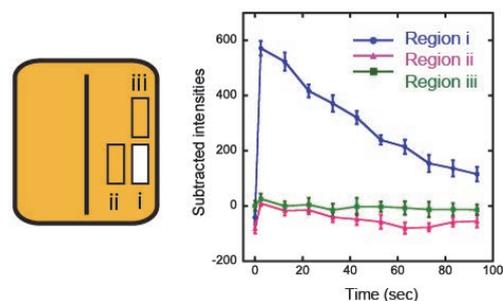


図6 タバコ培養細胞の隔膜形成体における2光子FRAPの解析例。文献11より改変。GFPチューブリンとTagRFPチューブリンで2重標識した隔膜形成体のTagRFPを退色させ、その後の輝度変化を追跡した。GFPとTagRFPの輝度値を標準化し、差分を演算して差分画像を得た(上右)。差分画像を用いて退色域(Region i)と隣接する領域(Region ii, Region iii)の輝度値を計測した。退色したTagRFPの輝度は時間とともに回復するが、測定時間内では完全には回復しないことがわかる。

間観察は難しかったが、交換の遅い微小管と早い微小管が共存していることを示唆する結果を得た (図6)。この結果は微小管重合阻害剤処理による観察や GFP チューブリン低発現株の解析による蛍光チューブリン分子の移動の観察結果と一致していた。このように、2光子励起による FRAP はタンパク質動態の解析に適した方法と考えられる。

### おわりに

本稿においては FRAP の基礎知識と立体的な試料における問題点を解説し、その解決法として2光子励起と FRAP を組み合わせた方法を紹介した。2光子励起を用いた退色法は立体的な組織や細胞を解析する場合は有力な方法と考えられるが、常に光障害のリスクがある。PA-GFP などの光活性化タンパク質や、Dendra2 などの光変換タンパク質を利用することが可能なら、蛍光タンパク質を退色させる方法に比べて励起光を弱くすることが可能と思われるが、2光子吸収現象を用いた光変換タンパク質の変換はほとんど例がない。今後の条件検討と、2光子吸収による変換に適した光変換タンパク質の開発が待たれる。

### 謝辞

本稿の執筆にあたりご助言いただいた野中茂紀博士 (基礎生物学研究所) に感謝いたします。本総説で紹介した2光子 FRAP の解析は、植物科学最先端研究拠点ネットワークの支援を受け、名古屋大学にて行われました。研究支援に感謝いたします。

### 引用文献

1. Lippincott-Schwartz J, Snapp E, Kenworthy A (2001) Studying protein dynamics in living cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 444-456.
2. Wang YL (1985) Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: possible role of treadmilling. *J. Cell Biol.* 101: 597-602.
3. Mueller F, Wach P, McNally JG (2008) Evidence for a common mode of transcription factor interaction with chromatin as revealed by improved quantitative fluorescence recovery after photobleaching. *Biophys. J.* 94: 3323-3339.
4. ImageJ plugin FRAP Analysis: [http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=plugin:analysis:frap\\_analysis:start](http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=plugin:analysis:frap_analysis:start)
5. Zicha D, Dobbie IM, Holt MR, Monypenny J, Soong DYH, Gray C, Dunn GA (2003) Rapid actin transport during cell protrusion. *Science* 300: 142-145.
6. Smith M B, Kiuchi T, Watanabe N, Vavylonis D (2013) Distributed actin turnover in the lamellipodium and FRAP kinetics. *Biophys. J.* 104: 247-257.
7. Brown EB, Wu ES, Webb WW (1999) Measurement of molecular diffusion in solution by multiphoton fluorescence photobleaching recovery. *Biophys. J.* 77: 2837-2849.
8. Waharte F, Brown CM, Coscoy S, Coudrier E, Amblard F (2005) A two-photon FRAP analysis of the cytoskeleton dynamics in the microvilli of intestinal cells. *Biophys. J.* 88: 1467-1478.
9. Zipfel WR, Williams RM, Webb WW (2003) Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat. Biotech.* 21: 1369-1377.
10. Xu C, Zipfel W, Shear JB, Williams RM, Webb WW (1996) Multiphoton fluorescence excitation: new spectral windows for biological nonlinear microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 10763-10768.
11. Murata T, Sano T, Sasabe M, Nonaka S, Higashiyama T, Hasezawa S, Machida Y, Hasebe M (2013) Mechanism of microtubule array expansion in the cytokinetic phragmoplast. *Nat. Commun.* 4: 1967.
12. Drobizhev M, Makarov NS, Tillo SE, Hughes TE, Rebane A (2011) Two-photon absorption properties of fluorescent proteins. *Nat. Methods* 8: 393-399.

(2015年4月29日受付; 2015年5月7日受理)

## 蛍光寿命や近赤外光を応用したイメージング技術

三輪 佳宏<sup>1\*</sup>、田中 順子<sup>1</sup>、千田 直子<sup>2</sup>、黒山 喬允<sup>3</sup>、逆井 智貴<sup>3</sup>、濱田 理人<sup>1</sup>、百武 篤也<sup>4</sup>、新井 達郎<sup>4</sup>、高橋 智<sup>1</sup>

<sup>1</sup>筑波大学・医学医療系、<sup>2</sup>株式会社日立製作所・研究開発、<sup>3</sup>筑波大学大学院・人間総合科学研究科、<sup>4</sup>筑波大学・化学系

\* E-mail: ymiwa@md.tsukuba.ac.jp

### 要旨

定量的な蛍光イメージングに向けて、様々な新しい計測の可能性について研究が進められている。その中で本稿では2つの取り組みを紹介する。これまでに数々の報告例がある分子内 FRET プローブに対して、2分子間のタンパク質間相互作用を FRET で検出したい場合には、蛍光寿命計測によるドナー蛍光の蛍光寿命短縮を計測することが有効な手段となる。この計測の精度を高めるために、我々は長蛍光寿命の蛍光色素である Tsukuba Green の応用を進めている。もう一つの新しい技術として、哺乳動物組織での吸収が少なく、深部イメージングに適している近赤外蛍光を用いるイメージング手法がある。この技術が進展することで、マウス体内の非侵襲3次元イメージングが可能になると期待される。

### はじめに

生命科学研究における蛍光計測の重要性については、もはや言及の必要すらないと思われる。しかし、可視域の蛍光強度を計測する以外にも、蛍光寿命を計測したり、近赤外光の性質を利用したイメージングなどの手法も存在している。これらを実用化することができれば、蛍光計測の可能性を一層拡大し、光をとおして生命を見ることで明らかにできる範囲が広がると期待される。そこで本稿では、蛍光寿命計測と近赤外蛍光の2つについて、我々の取り組みと、今後の可能性について紹介する。

### 蛍光寿命計測の応用

蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) によるタンパク質間相互作用の検出方法は、非常に強力な解析手法であり、カルモジュリンと M13 のカルシウム依存性の結合を利用した細胞内カルシウムの検出を初めとして、様々な成功例が報告されている[1, 2]。これらのうちの多くの蛍光プローブは、分子内 FRET すなわち、ドナーとアクセプターとなる2種類の蛍光タンパク質を一つながりのポリペプチドとして融合させたものが用いられている。こうすることで、細胞内のあらゆる局所において、ドナーとアクセプターの蛍光タンパク質の存在比を一定にすることができることから、蛍光強度比を捉えることで FRET 効率の変化を算出することが可能となる。FRET が起こっている場所では、エネルギーを失うドナーの蛍光強度が減弱し、エネルギー

を受けとるアクセプターの蛍光強度が増加するため、比が変化するからである。一方、ドナーとアクセプターの蛍光タンパク質を別々のタンパク質に独立して融合させ、2種類の融合タンパク質の間での結合を検出する2分子間 FRET を蛍光強度比で計測することは困難である。細胞内のあらゆる局所において、ドナーの融合タンパク質とアクセプターの融合タンパク質の存在比を一定にすることは困難なので、蛍光強度比は最初から一定にはならないからである。だが、細胞への刺激によって、ダイナミックに細胞内局在が変化するタンパク質は多く、異なる局在変化するタンパク質どうしの出会いを捉えるには、どうしても別々のポリペプチドとして独立に細胞内に存在させた上で、FRET を観察する技術が必要となる。このような場合に用いられるのが蛍光寿命というパラメーターである。蛍光寿命はそれぞれの蛍光物質に固有の値であるが、同時に環境の影響も受ける。FRET がおこると、そのドナー蛍光の蛍光寿命は、FRET の効率に応じて短縮する。この短縮を検出することができれば、ドナーとアクセプターの蛍光タンパク質がどのような存在比であろうとも、すなわち蛍光強度比がどれだけバラついていようとも、2分子間 FRET の計測が可能となる[3, 4]。

では、そもそも蛍光寿命とはどのくらいの値で、どうすれば検出できるのだろうか。通常の緑の蛍光色素では2~4 ns (ナノ秒) 程度の値を示すものが多い。また、FRET 効率すなわち、ドナー蛍光色素が吸収したエネルギーのう

ちアクセプターに移動するエネルギーの割合を  $E$ 、ドナー色素の本来の蛍光寿命を  $\tau_D$ 、FRET 時の蛍光寿命を  $\tau_{DA}$  とすると  $E=1-\tau_{DA}/\tau_D$  の式で表される。ということは、例えば 20% の FRET 効率であれば蛍光寿命が 2.0 ns から 1.6 ns に短縮し、これを測定しようとするれば、サブナノ秒のオーダーが正確に計測できる手法や特別な装置が必要となる。一般にこの計測は、蛍光寿命イメージング顕微鏡 (FLIM) を用いて行われる。FLIM では、細胞内の局所における FRET も検出できる反面、細胞間でのバラつきを検討するために多数の細胞のデータを取得して統計的に処理したいような場合には、データの取得に多くの時間がかかり大変である。そこで我々はこれまでに、三井造船株式会社との共同研究で、蛍光寿命計測できる時間分解フローサイトメーター Flicyme をセットアップしてきた[5]。この方法であれば、多数の細胞のデータを容易に取得できるが、一方で細胞内の局所でしか FRET が起こっていない場合でも、細胞全体の平均的な蛍光寿命の値を得ることとなる。したがって、変化率はさらに小さくなることが予想され、いっそう高い精度での蛍光寿命計測が要求されてしまう。

では、より正確に蛍光寿命の短縮を計測するにはどのような解決策があるだろうか。そこで我々は幸いにも、緑の蛍光色素でありながら、蛍光寿命が長い新規蛍光色素を得ることに成功し Tsukuba Green (TG) と名付けた[6]。図 1 に TG と N-メチル体の構造を示す。

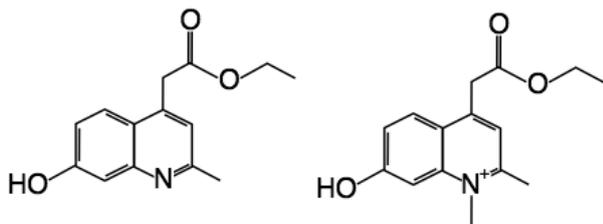


図 1 Tsukuba Green (左) と N-メチル体 (右) の構造

TG そのものも 4.9 ns と比較的長い蛍光寿命を示すが、N-メチル体になると 9.5 ns という非常に長い蛍光寿命を示す。これを FRET のドナーとして用いると、上記のように FRET 効率が 20% の場合、9.5 ns から 7.6 ns への約 2 ns の短縮を捉えることとなり、2.0 ns から 1.6 ns への 0.4 ns の短縮をとらえなくてはならない場合にくらべて、かなり計測が楽になる。しかし TG を用いて FRET プローブをデザインしようとする場合、一つ問題がある。蛍光タンパク質

どうしであれば、それぞれの融合遺伝子をデザインして細胞に発現させればよいが、TG は有機系の色素であるため、なんとかしてタンパク質に結合させなければならない。特定のタンパク質に共有結合で特定の分子を安定に結合できる確立されたツールとして、HaloTag[7]、SNAP[8]、CLIP[9]をはじめとする技術が開発されてきている。これらはいずれも、細胞に発現させた標的タンパク質に対して、後から添加した蛍光色素を共有結合で安定にラベルすることが可能である。そこで我々は、これらのうち HaloTag のシステムを採用し、HaloTag タンパク質を発現するヒト HEp-2 細胞に HaloTagTG リガンドを添加することでラベルできることを確認した (図 2A)。ただし、フローサイトメーターでの計測では、細胞内に存在する自家蛍光由来の極めて短い蛍光寿命成分も平均値に加味されるため、実際には 10 ns よりも短い 5.0 ns 程度の計測値になってしまう。それでも、一般的な蛍光色素よりは蛍光寿命が長い、自家蛍光成分を補正する方法については、今後の重要な検討課題である。

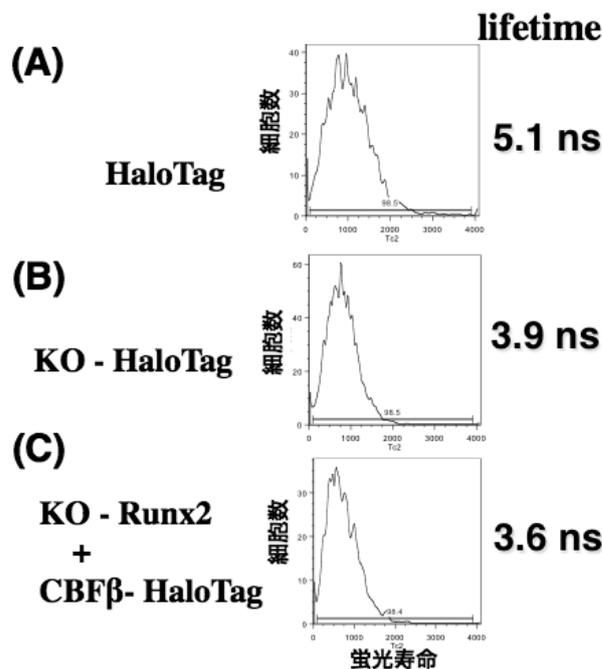


図 2. HaloTag Tsukuba Green リガンドを用いて標識した細胞での Tsukuba Green の蛍光寿命測定結果。(A) HaloTag タンパク質を単独で発現。(B) Kusabira Orange と HaloTag タンパク質の融合タンパク質を発現。(C) Kusabira Orange と Runx2 の融合タンパク質、および CBF1 と HaloTag タンパク質の融合タンパク質の両方を同時に発現。

次に、HaloTag タンパク質を蛍光タンパク質の Kusabira Orange (KO) と融合させて、分子内 FRET を起こす状態にして計測してみると、3.9 ns まで短縮することがわかった (図 2 B)。さらに、1 対 1 で結合することが知られている転写因子の Runx2-CBF $\beta$  のペアのそれぞれに KO と HaloTag タンパク質を融合して、KO-Runx2 および CBF $\beta$ -HaloTag をデザインし、これらを簡便に多重遺伝子導入ができるエピゾーマルベクターの EBV-based ベクター[10]をもちいて同時に細胞内に発現させた状態にして蛍光寿命を計測した (図 2 C)。すると、KO と HaloTag を直接融合させた場合と同様に蛍光寿命の短縮が起こっており、2 分子間 FRET を検出できていることが示唆された。

以上のように、もともとの蛍光寿命が長い TG をドナーに用いることで、1 ns 以上の短縮として FRET を捉えることができた。一般的な蛍光タンパク質を用いた以前の計測では[5]、非常に FRET 効率を高めた分子内 FRET のプローブでも 2.0 ns $\rightarrow$ 1.3 ns であり、これをさらに分子間 FRET にすると計測が困難であった。このことから、長蛍光寿命であることの有利さがわかる。しかしながら、もともとの TG の蛍光寿命が本来の寿命の半分程度としてしか捉えられないままでは、性能を十分に発揮できているとはいえない。今後、時間分解フローサイトメーターでの計測法そのものについても詳細な検討を加えて、自家蛍光の影響を補正する方法を確立する必要がある。

### 近赤外蛍光を応用した非侵襲イメージング

もう一つ、これから発展と応用が期待される技術に近赤外光を使った *in vivo* イメージングがある。哺乳動物の体は不透明であり可視光は透過できないが、これは全ての細胞中に存在するヘムによって、650 nm 以下の波長の光が強く吸収されてしまうことが原因である。ところが、650 nm を超える近赤外の波長の光はこの吸収が小さいため、体内に深く浸透できることが知られている。650 nm $\sim$ 900 nm の光は、生体の光学的窓 (optical window) とよばれ、哺乳動物の体内に深く浸透することができる[11]。図 3 にマウス新生仔の腹部で非侵襲に腸内の母乳の自家蛍光を撮影した例を示す。母乳中には様々な波長成分の自家蛍光が含まれているため、オレンジの波長も近赤外の波長も蛍光を発している。

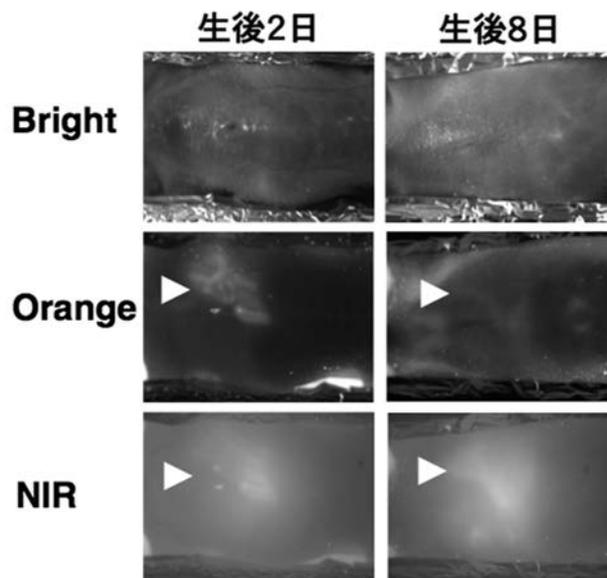


図 3. マウス新生仔腹部で皮膚越しに母乳自家蛍光検出

生後 2 日目の新生仔では皮膚が非常に薄いため、どちらの蛍光も皮膚越しに容易に検出できる。ただし近赤外光はより深部の光も検出されるため、ボケた画像になる。ところがそれから 1 週間が経過して生後 8 日目になると、皮膚の厚みはわずかにコンマ数ミリしか厚くなっていないが、その厚みでオレンジの光はかなり遮断されてしまうのに対して、近赤外光はまったく問題なく透過して検出される。この図からも、近赤外光と可視光の透過度が圧倒的に違うことが容易に理解していただけると思う。

近赤外光は、身体の断面の直径が 1 $\sim$ 2 cm のマウスであれば、体内を貫通して 3 次元にイメージングできると考えられている。ただし哺乳動物の組織には、吸収の他にも散乱の問題がある。このため光が深くまで入るといっても、1 点から入射したレーザー光ですら、散乱によりまさに濃度勾配を作るかのように体内全体に広がってしまう。したがって、空気中や水中のように光の直進性に基づいて 2 次元の画像から蛍光体の位置を特定することは難しい。そこで、多数のデータに基づいてコンピュータに計算をさせ、その結果として蛍光体の位置を割り出す特殊な撮影技術が必要となってくる。この目的のために、パーキンエルマー社の IVIS Spectrum や VMT などの装置が市販されている。我々が用いている IVIS Spectrum の場合には、マウスの下部の 1 点から絞込んだ励起ビームを入射して、体の上部に抜けて来る蛍光情報をカメラで取得する。次に励起ビームの入射位置を次々と変更しながら、様々な変化する蛍光パ

ターンを取得し、それらをもとに体の吸収・散乱の光学係数に基づいてコンピュータで計算し、蛍光体の位置を3次元的に割り出すことでイメージングする。

では次に、近赤外で使える蛍光プローブにはどのようなものがあるのか。臨床で肝機能の検査のために用いるインドシアニンググリーン (ICG) など、有機化合物の色素には、励起も蛍光も近赤外の条件をみたすものが存在する。しかしながら、様々な生命科学の現象を捉えるには、GFPの発見によって蛍光イメージングが普及したように、遺伝子として導入・発現させることができ、トランスジェニックマウスやノックインマウスで使える蛍光タンパク質プローブが必要である。従来のGFPの仲間の蛍光タンパク質も、長波長化を狙った開発がずいぶん展開されたが、基本的に長波長になるためには発色団の $\pi$ 電子の共役領域が広がる必要があり、平面構造が大きくなる必要がある。しかし、蛍光タンパク質の基本構造として、11本の $\beta$ シートが筒状になっている $\beta$  can構造は共通しているために、その内腔のサイズにはある程度限界があり、蛍光最大強度波長は650 nmまで達してはいるものの、600 nmより長波長の光で励起できるものは、なかなか出てこなかった。そこで、下村脩先生と同時にノーベル賞を受賞したTsienのグループでは、まったく別のタンパク質を元に人工的により長波長の蛍光タンパク質を開発し報告した[12]。バクテリオフィトクロムはヘムの代謝物であるビリベルジンを取り込む性質をもつ色素タンパク質であるが[13]、これに変異を導入し、哺乳動物の細胞中に存在するビリベルジンを発色団として取り込むことで、近赤外の励起と蛍光を満たす蛍光タンパク質IFP1.4が開発された。しかし、ただタンパク質を発現させただけでは十分な成熟が起らず、蛍光は弱いものであったため、*in vivo*イメージングに利用するにはかなり困難であった。ところが、2011年になって、Verkhushaのグループから大幅に改良されたiRFPが報告された[14]。iRFPは、ビリベルジンに対するアフィニティーが圧倒的に高いため、そのまま細胞に発現させただけでも細胞内のビリベルジン濃度で十分に成熟が可能で強い近赤外蛍光を発する。このiRFPを用いれば、感覚的には従来のGFP様蛍光タンパク質の場合と同じ実験手法で発現・イメージング実験が可能になった。

生きたマウス体内の近赤外蛍光イメージングを実施する際に、どうしても解決しておかなければならない問題が

あった。動物に普段食べさせている飼料中には、通常アルファルファが混ぜてあるが、植物成分中にはビリベルジンとよく似たテトラピロール環をもつ近赤外蛍光物質であるクロロフィルが大量に含まれている。これではエサの強烈な蛍光ばかりが検出されてしまい、目的の蛍光イメージングが実施できない。また、アルファルファを抜いた飼料も市販されてはいるが、実際に計測してみると、かなりの近赤外蛍光を発していた。そこで我々は、オリエンタル酵母工業株式会社の協力を得て、まず第1段階として、ICGの検出を可能にする波長域 (Ex: 780, Em: 820) の自家蛍光を低減したiVid#1を、次いで、iRFPの検出も邪魔をしないように、iRFPの波長域 (Ex: 675, Em: 720) での自家蛍光まで低減させたiVid#2を開発してきた[15]。これを使うとiRFPも十分に3次元イメージングすることができ、マウス体内の深部まで検出することが可能になった。iRFPを発現させた細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定しチューブに詰めたものと、ICGを固定したチューブを同時に生きたマウスの腹腔内に留置し、X線CTおよびIVIS Spectrumで解析した例を示す (図4)。

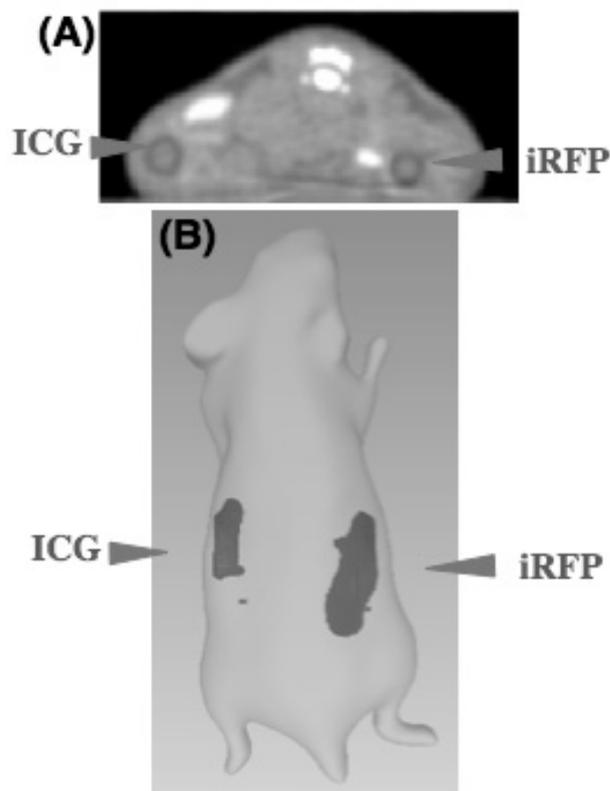


図4. iVid#2で飼育したマウス体内のiRFP発現細胞と固定ICGチューブの非侵襲3次元イメージング

X線CT画像 (図 4 A) から、うつぶせのマウスの腹腔内の腹側に 2 本のチューブが存在していることが確認できる。このように非常に深い部位に蛍光体が存在していても、上述したような手法で IVIS Spectrum を用いて多数のデータを取得し、これらに基づいて計算をすると、蛍光体の 3 次元的位置が算出されてくる (図 4 B)。ICG を固化したチューブは iRFP の波長域にも蛍光を持つため、この図では両方のチューブが描出されている。しかも iVid#2 であれば、近赤外蛍光撮影を邪魔していないことがわかる。

iRFP を大量に細胞に発現させた場合に、上述したように、ヘムの代謝物であるビリルジンが iRFP にトラップされて大量に細胞内に蓄積した状態になるが、これがヘムの代謝そのものに影響したり、それ以外にも何らかの細胞毒性を示したり、マウスのいずれかの臓器で機能不全を起こさないかどうかは、今後の応用の上で非常に重要である。そこで我々は、iRFP を全身で発現するトランスジェニックマウスを樹立し、長期間の飼育を行い、発現そのものの維持とマウスの健康状態をモニターした [16]。

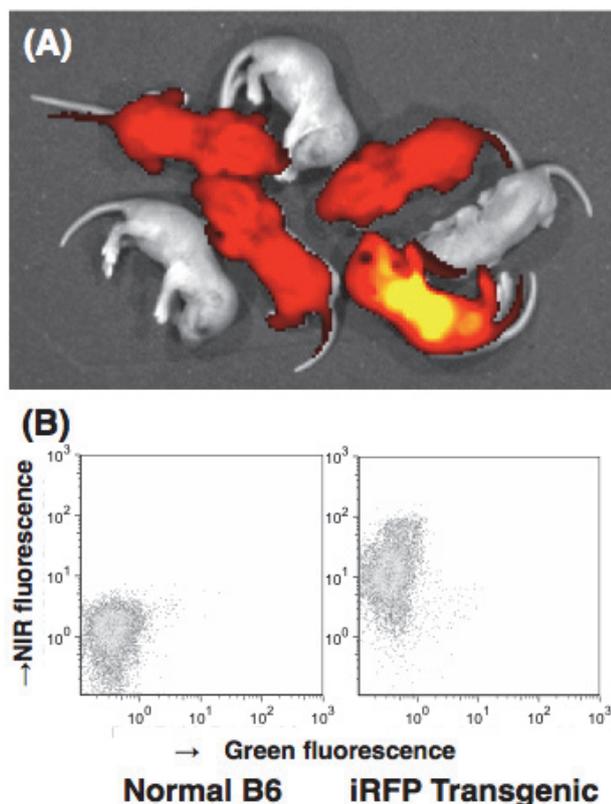


図 5. iRFP トランスジェニックマウスの近赤外蛍光検出  
(A) 新生仔の全身像 (B) 白血球細胞の FACS 解析

iRFP の発現について、図 5 に示すように、全血球で近赤外蛍光が検出され (図 5 B)、他のほとんどの臓器でも強い蛍光が検出された。また 1 年にわたって飼育を継続したが、特徴的な異常はいまのところ見いだされていない。このことから、iRFP の発現そのものが何らかの異常を引き起こす可能性は低く、一般的な体内イメージングに利用できるものと考えている。

今後、この iRFP トランスジェニックマウスをドナーとしてさまざまな移植実験により体内イメージングに応用できると考えている。例えば、骨髄移植の系であれば、血球のみが近赤外に光っているマウスを作出できるので、炎症を初め、様々な疾患の病態を検出できる可能性がある。また、通常は iRFP を発現しないが、cre による組換えが起こるとプロモーター配列と iRFP 遺伝子が連結される iRFP flox マウスを樹立すれば、特定の細胞・組織依存的に cre を発現するマウスと交配させることで、体内の狙った臓器でだけ iRFP を発現させて、生きたままでまったく非侵襲に、かつ継続的に長期観察することが実現できると期待される。これは様々な疾患の発症や病態の進行をライブ観察することを可能にし、創薬や治療法開発のためのモデル系として大きな貢献が可能だと考えている。

もちろん単純に、従来型の蛍光タンパク質のどの波長とも重ならずにさらに組み合わせできるマルチカラー化ツールとしても、非常に強力である。Verkhusha の研究室からは、すでに iRFP670、iRFP682、iRFP702、iRFP713 (最初に開発されたもの)、iRFP720 の 5 色の iRFP 変異体を開発したことが報告されており [17]、これらを従来型の蛍光タンパク質と組み合わせると、いっしょに組み合わせ可能な蛍光タンパク質の種類が増えることになる。例えば、スペクトル撮影を行って unmix 機能を使えば、10 色以上の組み合わせも可能になると期待される。近赤外蛍光検出を狙った装置も続々と開発・販売されており、今後は安価なものもかなり出回ってくると期待される。また、これらの近赤外蛍光タンパク質は、蛍光を検出するのみでなく、パルスレーザーを色素に照射した際に発生する超音波をとらえてイメージングする光音響イメージングのプロブとしての可能性も高い。これを通常の超音波画像と組み合わせたイメージングは、臓器との位置関係をより詳細に解析でき、強力な解析手段になると期待される。非侵襲イメージング技術は、現在世界的に非常に扱いが厳しくなってい

る実験動物愛護の観点からも重要である。今後、多くの研究者の参入を期待したい。

### 謝辞

本研究を遂行するにあたり、文部科学省科学研究費補助金（25113702、26102712、26221004、15H04281）による助成を受けました。ここに感謝の意を記します。

### 引用文献

- Miyawaki A, Lloplis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY (1997) Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388: 882-887.
- Miyawaki A (2011) Development of probes for cellular functions using fluorescent proteins and fluorescence resonance energy transfer. *Annu Rev Biochem.* 80: 357-373.
- Lakowicz JR (1999) Principles of Fluorescence Spectroscopy edn 2 Plenum Press.
- Yasuda R (2006) Imaging spatiotemporal dynamics of neuronal signaling using fluorescence resonance energy transfer and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Curr Opin Neurobiol.* 16: 551-561.
- 戸村道夫、田中順子、金川修身、三輪佳宏 (2009) 蛍光タンパク質を用いた分子内スイッチ機能を応用するイメージング方の開発. *分析化学* 58: 447-460.
- Senda N, Miwa Y, Tanaka J, Momotake A, Arai T (2010) Tsukuba-green: A fluorescent dye that emits Green fluorescence useful for live-cell imaging. *Chem. Lett.* 39: 308-310.
- Los GV, Encell LP, McDougall MG, Hartzell DD, Karassina N, Zimprich C, Wood MG, Learish R, Ohane RF, Urh M, Simpson D, Mendez J, Zimmerman K, Otto P, Vidugiris G, Zhu J, Darzins A, Klaubert DH, Bulleit RF, Wood KV (2008) HaloTag: a novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis. *ACS Chem Biol.* 3: 373-382.
- Kepler A, Gendreizig S, Pick H, Vogel H, Johnsson K (2003) A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules *in vivo*. *Nat. Biotechnol.* 21: 86-89.
- Gautier A, Juillerat A, Heinis C, Correa Jr, IR, Kindermann M, Beaufils F, Johnsson K (2008) An engineered protein tag for multiprotein labeling in living cells. *Chem. Biol.* 15: 128-136.
- Tanaka J, Miwa Y, Miyoshi K, Ueno A, Inoue H (1999) Construction of Epstein-Barr Virus-based expression vector containing mini-oriP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264: 938-943.
- Weissleder R (2001) A clearer vision for *in vivo* imaging. *Nat. Biotechnol.* 19: 316-317.
- Shu X, Royant A, Lin MZ, Aguilera TA, Lev-Ram V, Steinbach PA, Tsien RY (2009) Mammalian expression of infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome. *Science* 324: 804-807.
- Wagner JR, Brunzelle JS, Forest KT, Vierstra RD (2005) A light-sensing knot revealed by the structure of the chromophore-binding domain of phytochrome. *Nature* 438: 325-331.
- Filonov GS, Piatkevich KD, Ting LM, Zhang J, Kim K, Verkhusha VV (2011) Bright and stable near-infrared fluorescent protein for *in vivo* imaging. *Nat. Biotechnol.* 29: 757-761.
- 三輪佳宏、田中順子 (2013) 生きたマウス体内の多次元蛍光生体イメージング *The Lipid* 24: 4-10.
- Tran TNM, Tanaka J, Hamada M, Sugiyama Y, Sakaguchi S, Nakamura M, Takahashi S, and Miwa Y (2014) *In vivo* image analysis using iRFP transgenic mice. *Exp. Anim.* 63: 311-319.
- Shcherbakova DM, Verkhusha VV (2013) Near-infrared fluorescent proteins for multicolor *in vivo* imaging. *Nat. Methods* 10: 751-754.

(2015年5月7日受付; 2015年5月19日受理)

### 「バイオイメーjing」投稿のお誘い

和文誌「バイオイメーjing」は、全文がインターネット上で公開され、多くの方にお読みいただいています。シンポジウム等に基づく特集記事も歓迎致します。下記の要領で、投稿をお待ちしています。

「バイオイメーjing」ホームページ(暫定): <https://sites.google.com/site/bioimagingmag/>

1. 本誌は、本学会の高い学際性に基づき、バイオイメーjing及び関連領域に関する、広範な専門分野の研究者や学生が理解しやすい和文の原著論文、総説、解説等を掲載する。また、会員が所属する研究室や研究機関の紹介記事等を掲載する。論文等は、編集委員と当該分野の専門家が審査を行い、編集委員会が採否を決定する。本誌に掲載された著作物の著作権は、日本バイオイメーjing学会に帰属することを前提とする。
2. 他の雑誌・書籍等にすでに掲載された内容を含む原稿や、他の雑誌等に投稿中の原稿は、原著論文として投稿できない。総説、解説等において、図・表・文章など出版済みの内容を転載する場合は、投稿前に著作権所持者の許可を取る。これらの規定に反した場合、また、データの捏造や他の著作物からの盗用など、科学的ないし社会的倫理に反する行為が判明した場合には、編集委員会は掲載決定後あるいは掲載後においてもその原稿の掲載取り消しを行うことができる。
3. 投稿原稿の体裁は次のとおりとする。
  - (1) テキストは原則として MS-Word 形式のファイルとする。
  - (2) 原稿の最初に、表題、著者氏名、所属先、電子メールアドレスを記載する。
  - (3) A4 版で 6 ページ以内を標準とする。原則として和文フォントは MS 明朝、英文は Times New Roman または Times。余白：上下 25 mm、左右 20 mm、タイトル・著者氏名・所属・要旨は全段、本文は 2 段組として、40 行/ページ、行送り 17.5pt。タイトルは 12 ポイント、執筆者氏名・所属・本文は 9 ポイント。図表等は、必要に応じて 2 段組にせず、全段で掲載することも可能。図・写真・表・図の説明文は、ファイル本文中の希望箇所に挿入する。
4. 投稿にあたっては、投稿原稿のファイル(MS-Word 形式と pdf 形式の双方; 図、写真の元データファイル(300 dpi 以上の解像度)を含む)を日本バイオイメーjing学会「バイオイメーjing」編集長宛に、電子データとして送付する。
5. 校正は、著者の責任において行う。
6. 著者の希望によりカラー印刷する場合の別途費用は、著者負担とする。別刷を 50 部単位で購入することができる。

原稿投稿先：「バイオイメーjing」編集委員長 朽津 和幸

〒278-8510 千葉県野田市山崎 2641 東京理科大学理工学部応用生物科学科

E-mail: [kuchitsu@rs.noda.tus.ac.jp](mailto:kuchitsu@rs.noda.tus.ac.jp); FAX: 04-7123-9767

日本バイオイメーjing学会が協賛する学会の御案内

2015 年 11 月 24-27 日 The 2<sup>nd</sup> East-Asia Microscopy Conference (EAMC-2)

<http://www.eamc2.org/>

The Himeji Chamber of Commerce and Industry (HCCI), Himeji, Hyogo, JAPAN

Abstract due: July 31, 2015; Author notification of acceptance: September 1, 2015

Early registration: September 30, 2015

Contact: E-mail: [eamc2@microscopy.or.jp](mailto:eamc2@microscopy.or.jp); phone: +81(3)5389-6640; fax: +81(3)3368-2822

## 編集後記

「バイオイメージング」への皆様の御投稿をお待ちしております。「バイオイメージング」のホームページも是非御活用下さい。

現在、第24回日本バイオイメージング学会公開講座・学術集会の準備が進められています。今回は、2013年にできたばかりの東京理科大学葛飾キャンパスのコンサートホールが会場です。公開講座も、会員の皆様方にお楽しみいただけるよう、さまざまな展示や実験を含む多彩なプログラムを準備しています。バイオイメージングをテーマにした、年に一度の異分野交流の機会をお楽しみいただければ幸いです。学術集会ホームページの他に、学術集会 Facebook ページ (<https://www.facebook.com/ambs15>) を通じた情報発信も進めて行く予定です。ので、皆様の「いいね！」をよろしくお願いします。

本誌の校了直前に、本学会名誉会員の奥山 典生 先生の訃報を受けました。謹んで御冥福をお祈り申し上げます。(K. K.)

## 「バイオイメージング」 編集委員会

池水信二 (熊本大学大学院生命科学研究部)

菊地和也 (大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻)

○朽津和幸 (東京理科大学理工学部応用生物科学科)

洲崎悦子 (就実大学薬学部)

曾我公平 (東京理科大学基礎工学部材料工学科)

桧垣 匠 (東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻)

古野忠秀 (愛知学院大学薬学部)

(○：編集委員長)

## バイオイメージング 第24巻第1号

2015年6月24日発行

発行所：日本バイオイメージング学会

〒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](mailto:bioimage@nih.go.jp)

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