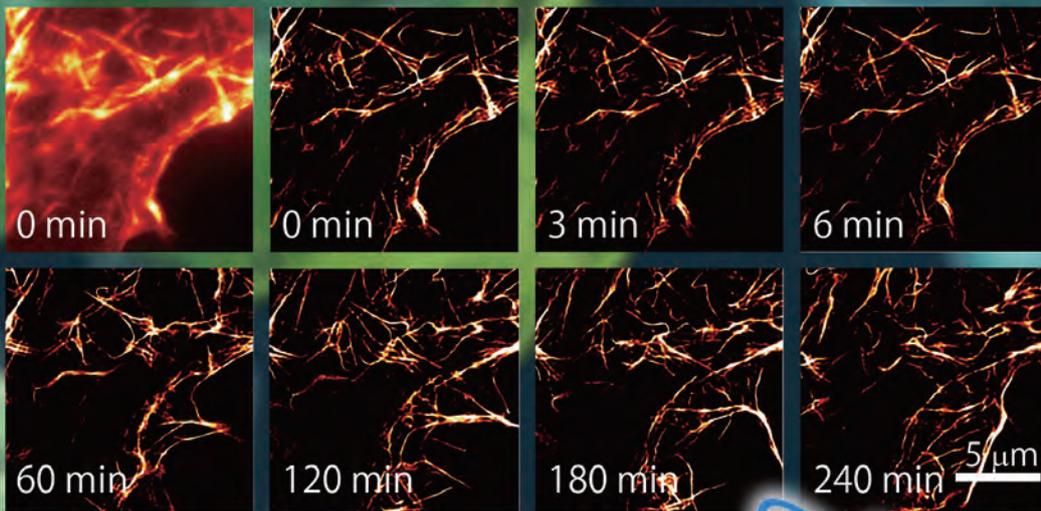


バイオイメージング

第29回学術集会ベストイメージング賞・ニコン賞

蛍光生画像

超解像画像 (SPoD-OnSPAN)



「光スイッチング蛍光タンパク質 (Kohinoor2.0) による、長時間・高速超解像イメージング」

表紙の図：

光スイッチング蛍光タンパク質（Kohinoor2.0）による、 長時間・高速超解像イメージング

○野間涼平¹、和沢鉄一¹、宇土周作¹、杉浦一徳¹、鷲尾隆^{1,2}、永井健治^{1,2}

¹産業科学研究所, 大阪大学、²超次元ライフイメージング研究部門, 大阪大学

E-mail: ng1@sanken.osaka-u.ac.jp

光スイッチング蛍光タンパク質(RSFP; reversibly photoswitchable fluorescent protein)は光照射により蛍光の明状態 (ON) と暗状態 (OFF) を可逆的に制御できる蛍光タンパク質であり、光の回折限界を超えた空間分解能を持つ超解像イメージング法などに応用されている。我々が以前開発した RSFP である Kohinoor は、405 nm の光照射により ON 状態から OFF 状態へ遷移し、488 nm の光照射により OFF 状態から ON 状態へ遷移と ON 状態の蛍光励起が起こりピーク波長 518 nm の蛍光を発する、ポジティブ型 RSFP である(Tiwari *et al.*, *Nat. Methods*, **12**, 515-518, 2015)。Kohinoor を用いて光毒性の低い超解像イメージング「SPoD-OnSPAN」に成功した(Wazawa *et al.*, *Microscopy*, **67**, 89-98, 2018)ものの、蛍光強度などの光特性が不十分であったため、長時間、もしくは高速超解像イメージングを行うことは困難であった。そこで本研究では、Kohinoor に改良を加え、変異体 Kohinoor2.0 の開発を行った。Kohinoor2.0 の光特性の評価を行った結果、Kohinoor2.0 は Kohinoor と比べて、2.6 倍高い蛍光強度、2.5 倍速い発色団形成速度、そして 1.5 倍速い OFF スwitching スピードを示した。さらに、Kohinoor2.0 を用いて COS7 細胞の SPoD-OnSPAN 超解像イメージングを行ったところ、4 時間に及ぶアクチンフィラメントの動態を捉えることに成功した。さらに、0.5 秒の時間分解能でミトコンドリアの超解像イメージングを行い、従来の蛍光顕微鏡では捉えられなかったミトコンドリアの融合、分裂などの動態の高解像観察に成功した(Wazawa *et al.*, *Microscopy*, in press)。Kohinoor2.0 は、細胞小器官や分子の微細な動態の可視化に有用であると期待される。

【図の説明】

上図：アクチンフィラメントの長時間 SPoD-OnSPAN 超解像イメージング

COS7 細胞に LifeAct-Kohinoor2.0 を発現させた後、3 分おき、4 時間にわたる SPoD-OnSPAN 超解像イメージングを行った。

下図：ミトコンドリアの高速 SPoD-OnSPAN 超解像イメージング

COS7 細胞に(COX8)x2-Kohinoor2.0 を発現させた後、時間分解能 0.5 秒で SPoD-OnSPAN 超解像イメージングを行った。上からミトコンドリアの融合、分裂、瞬間的な融合分裂、Nano tunneling の動態を高解像観察したものである。

■目次■

第 30 回日本バイオイメーjing学会学術集会	9
ご案内.....	11
第 30 回学術集会プログラム	17
要旨.....	27
発表者索引	97
総会資料.....	103
学会定款.....	114

■第 30 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

会期：2021年9月9日（木）～9月11日（土）

◆学術講演会：9月9日（木）～9月10日（金）

◆公開講座：9月11日（土）

開催方法：オンライン（Zoom）

大会長：田中 直子（大妻女子大学 家政学部 食物学科）

副大会長：細谷 夏実（大妻女子大学 社会情報学部 社会情報学科）

学術集会ホームページ：<https://30thbioimaging.wixsite.com/my-site-2>



参加費：公開講座（無料）

学術集会

一般（正会員：4,000円、非会員：6,000円）

大学院生および学部5年生以上（学生会員：3,000円、非会員：5,000円）

学部4年生以下：無料（発表する場合は大学院生に準ずる）

■第30回日本バイオイメージング学会学術集会運営委員会■

大会長：田中 直子（大妻女子大学 家政学部 食物学科）

副大会長：細谷 夏実（大妻女子大学 社会情報学部 社会情報学科）

運営委員

岡 浩太郎（慶應大学 理工学部 生命情報学科）

根本 知己（自然科学研究機構 生命創成探究センター・生理学研究所）

永井 健治（大阪大学 産業科学研究所）

太田 善浩（東京農工大学大学院工学研究院 生命機能科学部門）

加藤 薫（産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門）

樋口ゆり子（京都大学大学院 薬学研究科）

鈴木 亮（帝京大学 薬学部）

船津 高志（東京大学 薬学部）

加藤 晃一（自然科学研究機構 生命創成探究センター・分子科学研究所）

洲崎 悦子（就実大学 薬学部）

行方衣由紀（東邦大学 薬学部）

事務局：伊香賀 玲奈（大妻女子大学 短期大学部）

■ご案内■

1. 受付・参加費

(1) 本大会はオンライン開催のため、事前登録のみとさせていただきます。大会ホームページの「参加方法」をご覧ください、〆切までに参加登録をお願いします。

◆参加費

○公開講座：無料

○学術集会：一般（正会員：4,000円、非会員：6,000円）

大学院生および学部5年生以上（学生会員：3,000円、非会員：5,000円）

学部4年生以下：無料（発表する場合は大学院生に準ずる）

(2) 招待講演を除き、登壇者は日本バイオイメーjing学会会員に限ります。

(3) 事前参加登録をされた方には、8月下旬頃に参加IDを通知いたします。参加IDは、学会参加時に必要となりますので、紛失されないようお気を付けください。

(4) Zoom参加方法（Zoom操作手順）は、9月上旬にメールでご連絡します。

2. 発表者へのご案内

(1) シンポジウム、奨励賞受賞講演

講演時間は時間厳守にてお願いいたします。Zoomの画面共有にて発表していただきます。

(2) 一般演題（ポスター発表）

Zoomのブレイクアウトルームを使用し、参加者との画面共有により発表していただきます（一つの演題につき、一つのブレイクアウトルームを設定します）。発表資料作成方法につきましては、8月中旬以降メールでご連絡します。

接続テストを9月8日に予定しております。詳細は改めてご連絡します。

3. ベストイメーjing賞

・ポスター発表の中から決定いたします。

・ベストイメーjing・浜ホト賞（浜松ホトニクス株式会社提供）、ニコン賞（株式会社ニコンソリューションズ提供）、カールツァイス賞（カールツァイス株式会社提供）、OLYMPUS賞（オリンパス株式会社提供）の4つの賞が予定されています。

・受賞演題は、参加者全員による投票で決定します。

投票方法：Googleフォームによる投票。URLは、学会開催中にお示しします。

投票期間：9月9日11:30～9月10日16:00

・受賞者の発表と表彰は、9月10日17:00～の懇親会において行います。

4. 総会

9月10日（金）15:30～16:00

5. 奨励賞受賞講演

9月10日（金）16:00～17:00

6. 懇親会

- ・学会に引き続き、Zoomを使ってオンライン懇親会を開催いたします。
シンポジウム／ポスターセッションのテーマや自由に語れるテーマを設定したブレイクアウトルームを作成し、バイオイメーjing学会の参加者同士が親睦を深められる場にしたいと思います。
- ・参加費無料
- ・懇親会内でベストイメーjing賞を発表いたしますので、ぜひご参加ください。

7. 禁止事項

- ・発表者の承諾無しに、発表内容を画面撮影（スクリーンショット含む）、録画、録音すること
- ・学会のミーティング ID やパスワードを他人と共有すること

8. 免責事項

回線・機器の状況によっては映像等の不具合が発生する場合がありますので、安定したネットワーク環境での参加をお勧めいたします。その他インターネットトラブルや Zoom 接続不良等につきましては、十分なサポートができない可能性があることをご了承下さい。

■企業セミナー・展示■

1. 企業セミナー

以下の企業に講演いただく予定です。

講演タイトルなど詳細は大会ホームページをご覧ください。

- ・ オックスフォード・インストゥルメンツ株式会社（アンドール・テクノロジー事業部）
- ・ 株式会社ニコンソリューションズ
- ・ カールツァイス株式会社
- ・ 浜松ホトニクス株式会社
- ・ 横河電機株式会社

（五十音順、敬称略）

2. 企業展示

ポスターセッションの時間に、ブレイクアウトルームを使って展示をしていただく予定です。参加企業および詳細は大会ホームページをご覧ください。

第 30 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メッセージ

OLYMPUS 賞

OLYMPUS

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ともに、最先端の科学技術の重要性を伝えてきました。優れた顕微鏡画像を通じ、新たな感動を与えてくださる研究者とその画像に対し、ニコン賞を贈呈いたします。

株式会社 **ニコン ソリューションズ**

カールツァイス 賞

カールツァイス株式会社

1846年にドイツで創業した弊社は、革新的な顕微鏡システムを世に送り出し続けています。それには研究者の方々の飽くなき探求心と情熱があるからこそです。本学会においては、次世代を担う若手研究者の方々に、ツァイス賞を贈呈したいと思います。



浜ホト賞

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 1 世紀。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30回日本バイオイメーシング学会学術集会 日程表

9月9日 (木)		9月10日 (金)		9月11日 (土)	
		9:00	シンポジウム 様々な手法で見る生体試料 (9:00-10:30)		
9:50	開会			10:00	
10:00	シンポジウム Cutting-edges for volumetric imaging of brain and neural activity (10:00-11:30)	10:30	ポスター-3 (10:30-11:30)		公開講座 味と匂いの バイオイメーシング (10:00-12:00)
11:30	ポスター-1 (11:30-12:30)	11:30	企業セミナー (11:30-12:30)	12:00	
12:30	企業セミナー (12:30-13:30)	12:30	休憩		
13:30	第30回記念シンポジウム バイオイメーシングの今、 そしてこれから (13:30-15:10)	13:00	シンポジウム 細胞内の非膜オルガネラをみる (13:00-14:30)		
15:00	休憩	14:30	ポスター-4 (14:30-15:30)		
15:30	ポスター-2 (15:30-16:30)	15:30	総会 (15:30-16:00)		
16:30	シンポジウム イメーシングと操作で見る ミトコンドリア機能 (16:30-18:00)	16:00	奨励賞受賞講演 (16:00-17:00)		
18:00		17:00	懇親会 (17:00-18:30)		
		18:30			

第30回日本バイオイメーキング学会学術集会プログラム

◎学術集会プログラム

日時：9月9日（木）9:50 ～ 9月10日（金）18:30 オンライン開催

9月9日（木）

9:50

【開会】

開会あいさつ：バイオイメーキング学会会長 岡浩太郎

会の進行について：第30回学術集会大会長 田中直子

10:00 ～ 11:30

【シンポジウム 1】 **Cutting-edges for volumetric imaging of brain and neural activity**

座長：根本知己（自然科学研究機構 生命創成探究センター・生理学研究所）

S1-1. CUBIC-HistoVIsion：臓器・全身をカバーする3次元組織学技術

○洲崎悦生^{1,2}

¹順天堂大・院医 生化学・生体システム医科学、²理研 BDR 合成生物学研究 T

S1-2. 自動球面収差補正による生体組織の屈折率推定

○毛内拓¹

¹お茶大・理

S1-3. High-speed volumetric imaging of brain

○Shi-Wei Chu^{1,2,3}

¹Department of Physics, National Taiwan University、²Molecular Imaging Center, National Taiwan University、³Brain Research Center, National Tsing Hua University

11:30 ～ 12:30

【ポスターセッション 1】

P1 植物の立体再構成システムを用いたミオシン XI 変異体草姿の定量解析

○吉田大一¹、國田樹²、戸田真志³、上田晴子⁴、檜垣匠⁵

¹熊本大・院・自然科学、²琉球大・工、³熊本大・総合情報統括センター、⁴甲南大・理工、⁵熊本大・国際先端科学技術研究機構

P2 微小管結合タンパク質 RIC1 過剰発現による子葉器官および表皮細胞の形態変化

○菊川琴美¹、曾我康一²、今村寿子³、檜垣匠⁴

¹熊本大・院・自然科学、²大阪市立大・院・理、³九州大・院・医、⁴熊本大・国際先端科学技術研究機構

P3 シロイヌナズナ子葉における表皮細胞の形態形成初期の超微細構造解析

○秋田佳恵¹、高木智子²、檜垣匠³、馳澤盛一郎⁴、永田典子¹

¹日本女子大・理、²日本女子大・電顕、³熊本大・IROAST、⁴法政大・生命科学

P4 画像解析による超解像法 SRRF の *in vivo* イメーキングへの適用

○堤元佐^{1,2}、高橋泰伽^{1,2,3}、小林健太郎⁴、根本知己^{1,2,3,4}

¹自然科学研究機構 生理学研究所、²自然科学研究機構 生命創成探究センター、³総合研究大学院大学 生理科学専攻、⁴北海道大学 電子科学研究所

- P5 多点走査型 2 光子顕微鏡を用いた生体脳のボリウム Ca^{2+} イメージング**
 ○安宅光倫^{1,2,3}、大友康平^{1,2,3}、榎木亮介^{1,2,3}、根本知己^{1,2,3}
¹総合研究大学院大学 生命科学研究科、²自然科学研究機構 生命創成探究センター、³自然科学研究機構 生理学研究所
- P6 リピッドバブルと超音波を利用したがん組織内血管透過性促進法の開発**
 ○鈴木亮^{1,2}、影山彩織¹、小俣大樹¹、宗像理紗¹、丸山一雄^{1,2}
¹帝京大 薬、²帝京大 先端総研
- P7 免疫賦活化核酸搭載脂質ナノ粒子の抗腫瘍効果および生体内分布の検討**
 ○宗像理紗¹、小俣大樹¹、小山正平^{2,3}、岡田欣晃⁴、吉岡靖雄^{4,8}、青枝大貴⁵、鈴木亮^{1,9}
¹帝京大 薬、²阪大院 医、³国立がん研七 先端医療開発セ、⁴阪大院 薬、⁵阪大微研、⁶阪大 先端、⁷阪大微研会、⁸阪大 MEI、⁹帝京大 先端総研
- P8 高速原子間力顕微鏡を用いた糖転移酵素の分子構造動態解析**
 ○矢木宏和¹、渡辺大輝²、Ganser Christian²、金 明美¹、吉田早希¹、佐藤匡史¹、梅澤美美子^{1,2}、
 柚木康弘³、守島 健³、杉山正明³、内橋貴之^{2,4}、加藤晃一^{1,2}
¹名古屋市立大学薬学部/大学院薬学研究科、²自然科学研究機構生命創成探究センター、³京都大学複合原子力科学研究所、⁴名古屋大学大学院理学研究科
- P9 物理化学的手法と分子動力学シミュレーションによるアガリクス由来 β グルカンの立体構造観測**
 ○松村義隆¹、井上広大¹、墨野倉誠¹、久保美香子¹、出村茉莉子¹、市岡隆幸¹、森本康幹¹、田代充²、
 石橋健一³、大野尚仁³、小島正樹¹
¹東薬大・生命、²明星大・理工、³東薬大・薬

12:30 ~ 13:30

【企業セミナー】

13:30 ~ 15:10

【第 30 回記念シンポジウム】 バイオイメージングの今、そしてこれから

企 画：日本バイオイメージング学会企画委員会

委員長：鈴木亮（帝京大学 薬学部）

A-1. 未来の薬とバイオイメージング

○樋口ゆり子¹

¹京大・院 薬学研究科

A-2. ブラシノステロイド情報伝達の構造生物学と多階層アプローチへの展望

○宮川拓也¹

¹東京大学大学院農学生命科学研究科

A-3. 植物細胞生物学を起点とした画像の定量評価と機械学習

○檜垣匠¹

¹熊本大 国際先端科学技術研究機構

A-4. バイオイメージング研究の展開と本学会の取り組み～次の 30 年のさらなる飛躍に向けて～

○岡浩太郎¹

¹慶應義塾大学 理工学部

15:10 ~ 15:30 <休憩>

15:30 ~ 16:30

【ポスターセッション 2】

P10 遊離脂肪酸が膵臓 β 細胞のミトコンドリア膜電位に与える影響～トランス脂肪酸の影響～

齋藤喜久恵¹、○鈴木真理子²、永田莉子¹、川久保愛美²、田中直子^{1,2}

¹大妻女子大 家政、²大妻女子大・院 人間文化研究

- P11 大麦粉の腸内発酵による短鎖脂肪酸の増加は、L細胞に発現するGPR43を介してGLP-1分泌、細胞内Ca²⁺放出量を増加させる**
 ○三尾 建斗¹、田中 直子^{1,2}、青江 誠一郎^{1,2}
¹大妻女子大・院 人間文化研究、²大妻女子大 家政
- P12 メラノソーム分解の可視化システム**
 ○川口馨加¹、渡辺実夢¹、古川紗帆²、竹森洋^{1,2}、平田洋子^{1,2}、古田享史^{1,2}
¹岐阜大・院 自然科学技術、²岐阜大 工
- P13 MitoMM2によるマイトファジー検出法の開発**
 ○前田美和¹、鈴木麻由¹、今石潤²、竹森洋^{1,2}
¹岐阜大・院 自然科学、²岐阜大 化学生命
- P14 ATX-IIはNa⁺/Ca²⁺交換機構の逆方向回転モードの活性化を介して肺静脈心筋細胞の細胞内Na⁺及びCa²⁺濃度を上昇させる**
 ○斎藤太郎、大場亜衣子、高野裕大、濱口正悟、行方衣由紀、田中光
 東邦大 薬 薬物
- P15 試料表面の屈折率差が近赤外蛍光CTに及ぼす影響**
 ○竹松真歩¹、梅澤雅和¹、世良俊博²、横田秀夫³、大久保喬平¹、上村真生¹、曾我公平¹
¹東京理大・先進工・マテ工、²九大・工・機械工、²理研・光量子・画像情報処理
- P16 疎水性高分子の立体構造がOTN近赤外蛍光色素の内包特性に及ぼす影響**
 ○市橋理江¹、梅澤雅和¹、植屋佑一²、高本英司²、大久保喬平¹、上村真生¹、曾我公平¹
¹東京理大・先進工・マテ工、²JSR株式会社・筑波研究所
- P17 ライブセルイメージングを用いたレーザー光毒性の波長依存性**
 ○山口樹也¹、大坂昇¹、松山哲也¹、和田健司¹、岡本晃一¹、川喜多愛²、村田香織²、杉本憲治²
¹大阪府立大学工学研究科、²大阪府立大学生命環境科学研究科
- P18 赤色FRET型ATPプローブの開発とエネルギー代謝のDual-FRETイメージング**
 ○新藤豊¹、衛澤峰^{1,2}、堀田耕司¹、岡浩太郎^{1,2,3}
¹慶大 理工、²早大 理工、³高雄医大 医学

16:30 ~ 18:00

【シンポジウム2】イメージングと操作で見るミトコンドリア機能

座長：太田善浩（東京農工大学大学院 工学研究院 生命機能科学部門）
 田中直子（大妻女子大学 家政学部 食物学科）

S2-1. ミトコンドリア構造の動的制御とその生理的意義

○観音裕考¹、Pal Soumyadip¹、丸山翔太¹、石原孝也¹、○石原直忠¹
¹大阪大・院 理・生物科学

S2-2. イメージングで見つかったミトコンドリアの細胞保護機能

○太田善浩¹、アクリマ・ヤンナトゥル¹
¹東京農工大・院・生命工学専攻

S2-3. ミトコンドリア機能を操作する Drug Delivery System

○山田勇磨¹、原島秀吉¹
¹北大院 薬

9月10日（金）

9:00 ~ 10:30

【シンポジウム3】様々な手法で見る生体試料

座長：加藤薫（産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門）

S3-1. 走査電子顕微鏡の生物応用

○甲賀大輔¹
¹旭川医大 医 顕微解剖

S3-2. アポダイズド位相差顕微鏡による無染色・非侵襲での細胞内微細構造動態の観察

○島崎健太郎¹、加藤薫²、中村優子¹、齊藤恭子¹、深澤征義¹、花田賢太郎^{1,3}
¹感染研・細胞化学、²産総研・バイオメディカル、³感染研・品管

S3-3. 有機合成小分子を用いた超解像光学顕微鏡による生体試料の観察

○佐藤良勝^{1,2}
¹名古屋大 WPI-ITbM、²名古屋大・院 理学研究科

S3-4. 機械学習によって明視野細胞画像から遺伝子型の違いを判別できるか

鈴木吾大²、齋藤裕^{1,3,4}、○光山統泰¹
¹産業技術総合研究所 人工知能研究センター、²一般財団法人シネコカルチャー、³産総研・早大 生体システムビッグデータ解析 オープンイノベーションラボラトリ、⁴東京大学大学院新領域創成科学研究科

S3-5. 新規プローブの開発と応用による低分子量生体分子の可視化解析

○塗谷睦生^{1,2,3}
¹慶應義塾大 医学部、²横浜国大 環境情報、³JST さきがけ

S3-6. 高輝度蛍光ナノ粒子を用いた病理解析による乳癌内分泌療法への耐性予測

○権田幸祐¹、北村成史¹、石田孝宣²、多田寛²
¹東北大・院 医学系 医用物理学分野、²東北大・院 医学系 乳腺・内分泌外科学分野

10:30 ~ 11:30

【ポスターセッション 3】

P19 自発的 Ca²⁺ transient の発生における Na⁺/Ca²⁺ exchanger の役割

—モルモット洞房結節細胞での検討—

○尾高椋介、濱口正悟、行方衣由紀、田中光
東邦大 薬 薬物学

p20 ショウガ辛味成分ショウガオールが骨格筋の運動機能の質に与える影響

○栗山恵弥^{1,2}、深井梨沙¹、宮園佳歩¹、泉佐和¹、山口真由¹、田中光³、田中直子¹
¹大妻女子大・食物、²大妻女子大・院 人間文化研究、³東邦大・薬

P21 肺微小循環動態の高解像度かつ高フレームレート *in vivo* イメージング

○澤麻理恵¹、牛山明²、服部研之¹
¹明治薬科大学、²国立保健医療科学院

P22 劇症型急性肺炎モデルマウスにおける免疫炎症細胞浸潤のイメージング解析

○長谷川明洋¹、萩野英賢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

P23 生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) による高光度化バクテリアルシフェラーゼを用いた自発光イメージング

○加来友美、杉浦一徳、円谷徹之、長部謙二、永井健治
大阪大 産業科学研究科

P24 Heterogeneity and dynamics of the apoplasmic fluid pH in different root zones revealed by a bioluminescent ratiometric indicator

Quang Tran¹, Kenji Osabe^{1,2}, Tetsuyuki Entani², Tetsuichi Wazawa², Mitsuru Hattori^{1,2}, Takeharu Nagai^{1,2}
¹ Graduate School of Engineering, Osaka University, ² The Institute of Scientific and Industrial Research (SANKEN), Osaka University

P25 糖鎖リガンド sLeX mimic と小胞体局在シグナルペプチド KDEL を利用した小胞体へのタンパク質デリバリー

○内田結、森川知彦、樋口ゆり子、山下富義
京都大学大学院薬学研究科

P26 Development of an “OFF-ON-OFF” fluorescence switch for real-time visualization of degradation of short-lived proteins in living cells

○ Shahi Imam Reja¹, Yuichiro Hori^{1,2}, Kohei Yamasaki¹, Miyako Nishiura¹, Kazuya Kikuchi^{1,2,3}

¹Division of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, ²Immunology Frontier Research Center,

³Quantum Information and Quantum Biology Division, Osaka University, Osaka, Japan

P27 微小血管を可視化する造影剤の開発

○田邊瑠里子^{1,2}、澁谷仁寿²、後藤拓¹、田村勝²、野村慎太郎^{1,2}

¹長浜バイオ大学 アニマルバイオサイエンス学科、²理化学研究所 バイオリソース研究センター

11:30 ~ 12:30

【企業セミナー】

12:30 ~ 13:00 <休憩>

13:00 ~ 14:30

【シンポジウム 4】細胞内の非膜オルガネラをみる

座長：樋口ゆり子（京都大学大学院 薬学研究科）

S4-1. 細胞内の水の測定から細胞内夾雑環境・液-液相分離を探る

○中林孝和¹

¹東北大院薬

S4-2. 非膜オルガネラでの転写制御の解明

○井手聖^{1,2}、今井亮輔^{1,2}、大地弘子¹、前島一博^{1,2}

¹遺伝研・遺伝メカニズム、²総研大・生命科学

S4-3. 生きた細胞内で非膜オルガネラを「操る」合成生物学技術の開発

○中村秀樹^{1,2}

¹京都大学 工 合成・生物化学、²JST ERATO 浜地ニューロ分子技術

14:30 ~ 15:30

【ポスターセッション 4】

P28 複数の精神・神経疾患に関わる Rab39B の細胞内局在の解析

○宮地美沙^{1,2}、間裕太郎²、鯉沼真吾²、中村岳史²

¹東京理科大 薬、²東京理科大 生命研

P29 複数の神経・精神疾患に関わる Rab39B の FRET バイオセンサーの開発

○鯉沼真吾¹、間裕太郎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

P30 Ca²⁺, ROS を介したゼニゴケの迅速なストレス応答性長距離シグナル伝達機構の解析

○渡邊健志郎¹、長谷川晃汰^{1,2}、進藤大輝^{1,2}、橋本研志^{1,2}、朽津和幸^{1,2}

¹東京理科大・院・理工・応用生物科学、²東京理科大・院・理工・農理工学際連携

**P31 ゼニゴケの細胞分裂組織における Ca²⁺ 動態の時空間パターンの解析：
自発的 Ca²⁺ スパイクの発見**

○吉沢優花^{1,2}、橋本研志^{1,2}、萩原雄樹^{1,2}、山下優音¹、朽津和幸^{1,2}

¹東京理科大・院・理工・応用生物科学、²東京理科大・院・理工・農理工学際連携

P32 タンパク質結合性を有する新規水溶性蛍光材料の開発

○竹腰 和馬¹、矢下 亜紀良¹、川上 隼人¹、河合 功治¹、村井 利昭²

¹ミヨシ油脂株式会社、²岐阜大学

P33 ウイルスの変異を考慮した COVID-19 治療薬の *in silico* 設計

○椎野颯真¹、五味晶彦¹、星まどか¹、今野翔²、林良雄²、小島正樹¹

¹東京薬科大 生命科学、²東京薬科大 薬学

P34 広視野型 2 光子励起ライトシート顕微鏡の開発

○齋藤卓^{1,2}、今村健志^{1,2}

¹愛媛大・院 医学系研究科、²愛媛大・附属病院 先端医療創生センター

P35 ADMET 特性を考慮した COVID-19 治療薬の *in silico* 設計

○五味晶彦¹、坂田喬亮¹、星まどか¹、椎野颯真¹、今野翔²、林良雄²、小島正樹¹

¹東京薬科大学・生命科学部、²薬学部

P36 シンクロトロン X 線 μ CT 法によるラット大腿骨内に高濃集するウラン分布の可視化

○大澤大輔¹、上原章寛²、小西輝昭¹、寺田靖子³、星野真人³、上杉健太郎³、武田志乃²

¹量研機構 量子生命科学研究所、²量研機構 放射線医学研究所、³高輝度光科学研究センター

P37 A highly-sensitive genetically encoded temperature indicator exploiting a temperature-responsive elastin-like polypeptide

○ Cong Quang Vu^{1,2}, Shun-ichi Fukushima², Tetsuichi Wazawa², and Takeharu Nagai^{1,2}

¹ Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University, ² SANKEN (The Institute of Scientific and Industrial Research), Osaka University

15:30 ~ 16:00

【総会】

16:00 ~ 17:00

【奨励賞受賞講演】

座長：賞選考委員会

L-1. 超音波とマイクロバブルを用いたイメージング・治療システムの開発

○小俣大樹¹

¹帝京大学 薬学部 薬物送達学研究室

L-2. 蛍光ゆらぎ解析による細胞およびソフトマター内分子動態解析

○山本条太郎¹

¹産総研 健康医工学研究部門 バイオイメージング研究グループ

17:00 ~ 18:30

【懇親会】 オンライン開催

ベストイメージング賞発表

9 月 11 日 (土)

◎公開講座プログラム「味と匂いのバイオイメージング」 (参加無料)

日時：9 月 11 日 (土) 10:00 ~ 12:00 オンライン開催

10:00 ~ 12:00

【開会】

開会あいさつ：バイオイメージング学会副会長 洲崎悦子

会の進行について：第 30 回学術集会大会長 田中直子

座長：田中直子

O-1. 脳活動と行動実験からみたヒトの味嗅覚の知覚システム

○小早川達¹

¹国立研究開発法人 産業技術総合研究所 人間情報インタラクション研究部門

O-2. オルガノイド培養法を用いた消化管味センサー細胞の機能解析

○岩槻健¹

¹東京農業大学 応用生物科学部 食品安全健康学科

O-3. 味やニオイの刺激で変わる！動物の脳活動

○溝口尚子¹

¹明海大 歯学部 生理学分野

【閉会】

閉会あいさつ：第30回学術集会大会長 田中直子

◎本学術集会についての問い合わせ先

第30回日本バイオイメーjing学会学術集会事務局

E-mail: 30th.bioimaging@gmail.com

(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 : <https://30thbioimaging.wixsite.com/my-site-2>

〒102-0075 東京都千代田区三番町12

大妻女子大学家政学部食物学科 内

田中直子 方

TEL: 03-5275-6138

■ 学術講演会要旨 ■

第30回 記念シンポジウム
「バイオイメージングの今、そしてこれから」

奨励賞受賞講演

シンポジウム 1
「Cutting-edges for volumetric imaging of brain and neural activity」

シンポジウム 2
「イメージングと操作で見るミトコンドリア機能」

シンポジウム 3
「様々な手法で見る生体試料」

シンポジウム 4
「細胞内の非膜オルガネラをみる」

未来の薬とバイオイメージング
Bioimaging and next generation therapeutics

○樋口ゆり子

京大・院 薬学研究科

○Yuriko Higuchi

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

バイオイメージング学会の 30 回目学術集会での記念シンポジウムにおいて講演の機会を頂いたことに感謝申し上げますと共に、これまで本学会を支えて来られた先生方、関係者の方に感謝と敬意の念を示したいと思えます。

本学会の魅力は、バイオイメージングというキーワードで接点として、標識、検出、解析などイメージング技術を開発する研究者からイメージングを利用した生命現象の解明や評価をおこなう研究者まで、多様な研究および研究者に出会えることです。この学会に参加するようになって、私も多くを学び、視野を広げることができました。

私は、薬物を適切なタイミングで適切な場所に送達して最大の治療効果を得るためのドラッグデリバリーシステム開発を専門としており、薬物の細胞内または生体内の分布の可視化、薬理効果およびそのメカニズムの可視化でバイオイメージングに興味を持つようになりました。例えば、抗体は、特定の分子に結合して治療効果を発揮する分子標的医薬として期待されています。しかし、細胞膜をほとんど透過しないため、創薬ターゲットは細胞膜または細胞外の分子に限られています。したがって、抗体を細胞内に送達することができれば、細胞内の分子をターゲットとした治療が可能になり、抗体医薬の応用が一気に広がることが期待できます。私たちも投与部位から細胞内の標的部位までシームレスに抗体を送達する仕組みを開発しています。ここでは、投与後の抗体の生体内および細胞内分布の評価においてイメージングが効力を発揮します。さらに、標的分子に結合した後の転写活性、酵素活性など治療効果に直結する細胞内の分子機構を同一個体において経時的に評価を行う場合にイメージングが有効です。また、私たちは、細胞治療において、生体内に投与した細胞の体内動態制御法の開発も行っています。この研究においても、治療細胞の体内分布だけでなく、治療細胞内の分子シグナルの評価においてイメージングが極めて重要な役割を果たします。現在、バイオ医薬品の開発が進み、承認も急速に増えています。また、低分子化合物でも特定の分子や核酸配列に作用する医薬品も開発されています。そのような中で、今後バイオイメージング技術への期待も高くなり、重要なポジションを占めていくと思われれます。

本講演では、薬学研究の視点から、バイオイメージングの今、そしてこれからについて話題を提供し、みなさんとディスカッションしたいと考えています。

ブラシノステロイド情報伝達の構造生物学と多階層アプローチへの展望
Structural biology of brassinosteroid signaling and the future prospects for multiscale approaches

○宮川拓也

東京大学大学院農学生命科学研究科

○Takuya Miyakawa

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

構造生物学はタンパク質や核酸、それらに結合して機能する多様な生体分子や薬剤などの構造を 10^{-10} m オーダーの高分解能で可視化し、生命現象を構築する化学反応と分子間相互作用、さらにそのダイナミクスを理解する上で重要な役割を果たしている。我々は、小分子化合物が制御する細胞応答機構について、植物自身がつくり出し生理活性物質として機能する「植物ホルモン」のシグナル伝達経路を中心に、構造生物学を基軸とした解析を進めている。

ブラシノステロイド (BR) は植物のステロイドホルモンの一種で、暗所において種子胚から発生した胚軸の伸長を促進する。BR の合成またはシグナル伝達経路を欠損させると、暗所での黄化成長が抑制され、重度の矮小化やストレス耐性の低下などが見られることから、BR は植物の成長と発達の制御において中心的な役割を担っている。BR の情報伝達を司る鍵転写因子は BZR ファミリー転写因子の BIL1/BZR1 であり、BR 応答遺伝子を正または負に制御する。我々は BIL1/BZR1 と標的 DNA の複合体構造を解明し、BZR ファミリー転写因子に特有の二量体形成と DNA 認識機構を明らかにした。BIL1/BZR1 の DNA 結合ドメインは bHLH ファミリー転写因子と同じ DNA 認識ヘリックスと塩基認識残基をもち、G-box 配列 (CACGTG) に結合する。一方、BIL1/BZR1 は特有の β ヘアピン構造を用いて bHLH ファミリー転写因子とは異なる二量体形成様式をとり、その結果として DNA 認識ヘリックス間の傾きが約 20° 広がることにより、G-box 配列の 5'側の CA と塩基認識残基との相互作用が弱まる。これは BIL1/BZR1 の配列認識が bHLH ファミリー転写因子よりも緩いことを示唆するが、実際には BIL1/BZR1 が制御する遺伝子は限定的である。そこで我々は、BR 及び BIL1/BZR1 依存的な遺伝子発現解析と DAP-seq データの比較解析を行い、抑制される遺伝子のプロモーターには BIL1/BZR1 が強く結合する nnCGTG 配列 (nn が CA の場合には G-box 配列) が存在し、この配列への結合能が配列の両側に隣接する 2 塩基の影響を強く受けることを見出した。さらに X 線結晶構造解析と変異体解析により、BIL1/BZR1 の隣接塩基に対する結合選択性は、BIL1/BZR1 に特有の DNA 主鎖リン酸基との相互作用を介した DNA の形状認識が基盤であることが示唆された。BR は環境ストレスや病害虫への応答なども広く制御することから、遺伝子の BR 応答性の調節に関する本研究の知見は、BR 情報伝達の選択的制御による有用植物の創出へと応用が期待される。

本講演では、以上の BR 情報伝達の転写制御機構に関する我々の研究紹介に加え、従来の試験管内で再構成された生体分子の解析に留まらず、細胞・組織・個体といった多階層にわたる高分解能分子イメージングへの構造生物学の展望について議論したい。

植物細胞生物学を起点とした画像の定量評価と機械学習

Quantitative evaluation and machine learning of bioimages based on plant cell biology

○檜垣匠¹¹熊本大 国際先端科学技術研究機構○Takumi Higaki¹¹ International Research Organization for Advanced Science and Technology, Kumamoto University

細胞生物学分野において顕微鏡画像の評価は基本的かつ重要な研究手段である。これまでの顕微鏡画像の評価においては研究者の目視に基づく定性的な解釈に留まることが一般的であった。しかし、このような従来法は客観性に欠けるだけでなく、評価すべき画像の枚数が増えれば増えるほど人的コストも膨大になるという問題点があった。我々はこれらの問題を解決すべく、植物細胞生物学分野の研究現場の立場から、画像解析と機械学習の技術を活用して、細胞の特徴を定量評価・分類するシステムの開発に取り組んできた。

例えば、気孔開閉運動における細胞骨格構造の多面的な構造変化を捉えるために、配向、束化、密度を定量評価する数値指標（特徴量）を画像解析によって計測し、これら3種の特徴量の計測値に基づいた画像クラスタリングを行うことで、新奇の細胞骨格動態を見出した。細胞生物学研究の現場においては、多量の顕微鏡画像データが存在していても、その中に含まれる生物学的知見を十分に抽出できていない場合も多い。この状況を打破するために、主要な構造特徴を表す画像特徴量を計測して、その計測値に基づく教師なし学習によって特徴的な集団を見出す研究アプローチは有用と考えられる。

一方、既知のグループを画像計測によって再現性良く自動的に分類したいというニーズも多い。しかし、一般的には高精度な画像分類を達成するためには、専門家が画像特徴量を入念に検討して分類に適したものを選抜する必要がある。当然ながら、正確な分類に適う画像特徴量セットの構築には多大な労力を要する。しかし、仮に顕微鏡の種類や分類項目が変更されてしまうと全く使いものにならなくなるという場合も多い。また、分類の手本となる情報を専門家が多量に示す必要もあるが、やはり画像の性質や分類目的が変われば改めて情報を付し直す必要がある。このように従来の教師つき学習の枠組みで作成された画像分類ソフトウェアには、開発コストが高い割には汎用性が低いという問題点があった。特に基礎生物学研究の現場においては同じ撮像機器のみを用いて同じ材料のみを延々と撮影し続けるという実験系が組まれることはむしろ稀で、コストベネフィットの観点から画像分類の自動化は遅々として進まない状況であった。このような問題を克服すべく、我々は Clustering-Aided Rapid Training Agent (CARTA) と名付けた画像解析フレームワークを開発した。CARTA は、開発コストを劇的に抑えつつも高精度かつ多目的な分類を他種多様な画像で実現することが可能とする。例えば、蛍光顕微鏡による細胞周期判定、明視野顕微鏡画像による気孔開閉状態の判別、電子顕微鏡画像による色素体変異体の分類、核磁気共鳴画像によるがん種の判別、など多種多様な分類が高精度に実現された。さらに本手法を応用して、広域の顕微鏡画像から任意の細胞内構造を検索するシステムも提案した。本発表ではこれらの技術を概説するとともに、今後の研究展開についても議論したい。

バイオイメージング研究の展開と本学会の取り組み ～次の30年のさらなる飛躍に向けて～

○岡浩太郎¹

¹ 慶應義塾大学 理工学部

バイオイメージング学会が活動を始めてはや30年。今年30年記念の年会を開くことができたのは、大きな喜びです。私がイメージング研究を始めたきっかけは著名な理論物理学者シュレーディンガー (Erwin Schrödinger) の有名な本にあります。1943年に出版された "What is Life?" (生命とは何か) のイントロには、"How can the events in space and time which take place within the spatial boundary of a living organism be accounted for by physics and chemistry?" と書かれていて、「生命現象は時空間的なパターンである」ということを明確に述べています。時間空間的なパターンを調べるのであればイメージングは最強のツールです。この本が、私の「生命現象をイメージングで調べる研究」の動機付となっています。

さて私の研究室では様々な神経活動や発生過程における細胞動態を主に蛍光イメージングを利用して可視化・解析することを進めてきました。これまでに細胞内で情報伝達を担っているカルシウムやマグネシウムイオン、サイクリックヌクレオチド類、そのシグナル下流の様々な酵素群のリン酸化、細胞内のエネルギー代謝を担うアデノシン三リン酸 (ATP)、乳酸、ピルビン酸、など「もの」の変化を調べてきました。一方で細胞骨格の動態、神経細胞やミトコンドリアの膜電位、さらには細胞の温度などの「こと」についても調べる機会が増えてきています。これらの研究では、蛍光色素と蛍光タンパク質を様々に変えることで、例えばミトコンドリア膜電位、細胞内マグネシウムイオン、ATP など複数の細胞内シグナルを同時に取得することもできるようになりました。それら複数シグナルの相関を解析し、細胞内シグナルの「絡み」を調べています。

リアルタイムに変わる生命現象をイメージングで調べる研究をこれまで進めてきて満足しているかという点と然にみならず、ここまで研究を続けてきて、イメージング研究の難しさを一層感じ不満だらけです。どんなに頑張っても今までのアプローチでは細胞内の全ての「もの」や「こと」を調べることはできないでしょう。「調べる方法がたまたまあるからそれを調べている」と言われても反論できません。一方であらゆる「もの」と「こと」を調べる方法が将来できたとしても、時事刻々変わる多種類のデータを読み解いて、それらの複雑な「絡み」を調べる方法がありません。単に相関を調べるだけでなく、因果を決める方法や、ビッグデータ解析など、他の分野で開発された手法を取り入れてゆくことが大切だと思います。

本講演ではバイオイメージング研究について感じている私見を、これまでの研究経験からお話をさせてもらいますとともに、次の30年の課題について皆さんと議論できたらと思っています。

超音波とマイクロバブルを用いたイメージング・治療システムの開発
Development of imaging and therapeutic system using ultrasound and microbubbles

○小俣 大樹

帝京大学 薬学部 薬物送達学研究室

○Daiki Omata

Laboratory of Drug and Gene Delivery Research, Faculty of Pharma-Science, Teikyo University

コンピュータ断層撮影、磁気共鳴画像、陽電子放出断層撮影、術中蛍光診断や超音波造影は、臨床における適切な診断に欠かせないイメージング技術である。なかでも、超音波は安全性が高く長年にわたり診断に用いられてきた。近年では、超音波造影剤（マイクロバブル）を組み合わせた血流イメージングなどを用いて、より精度の高い超音波診断が行われている。さらに、超音波とマイクロバブルの治療への応用が期待され、活発に研究が進められている。しかしながら、診断や治療において重要な役割を果たすマイクロバブルの開発は十分に進められていない。正確な診断や高い治療効果を得るためには、マイクロバブルが体内で安定に存在し、血中を循環することが重要となる。マイクロバブルは、難溶性気体をタンパク質や脂質などで覆うことで、気体の溶出を抑え安定化されている。そこで、演者は診断治療に適した安定性の高いマイクロバブルの開発に向けて、外殻成分の最適化を行った。超音波イメージングを用いて、マイクロバブルの超音波造影剤としての機能を評価し、高い安定性、血中滞留性を示すマイクロバブルの開発に成功した (*J. Liposome Res.*, 2019, *Int. J. Pharm.*, 2020, PCTJP2016002810)。

超音波照射によってマイクロバブルの振動や圧壊現象が誘導される。この現象を血管内で誘導すると、超音波照射部位に薬物や遺伝子を効率よく送達可能になる。そこで、新規マイクロバブルと超音波を使用した薬物送達システムの開発を行った。まず、超音波イメージングの利点であるリアルタイムでの観察に着目し、リアルタイムでの超音波イメージング下で、目的の臓器へのプラスミド DNA を導入する遺伝子導入法の構築を行った (*J. Drug Target.*, *in press*)。さらに、血液脳関門の存在により薬物移行が困難である脳を標的として、マイクロバブルと経頭蓋超音波照射を用いた薬物送達法の開発を試みた。低侵襲的な脳内薬物送達に適した超音波照射条件やマイクロバブルの物性を見出し、脳内へ送達可能な物質の分子量については共焦点レーザー顕微鏡、*in vivo* 蛍光・発光イメージングシステムを用いて明らかにした (*J. Control. Release*, 2019, *J. Pharm. Sci.*, 2020)。また、本システムを用いた抗がん剤デリバリーによる脳腫瘍モデル動物に対する治療効果の増強を確認した。

本講演では、イメージング手法を活用した新規マイクロバブルの開発および超音波イメージングと治療への展開に関する研究成果を紹介する。

謝辞：本研究の遂行にあたり、終始ご指導いただきました帝京大学 薬学部 薬物送達学研究室 鈴木 亮 教授をはじめ、帝京大学 薬学部 セラノスティクス学講座 丸山一雄 特任教授、研究室のスタッフ、卒業生、大学院生、共同研究者の先生方に心より感謝申し上げます。

蛍光ゆらぎ解析による細胞およびソフトマター内分子動態解析

Fluorescence fluctuation analysis in cells and soft matters

○山本条太郎¹

¹産総研, 健康医工学研究部門, バイオイメーjing研究グループ

○Johtaro Yamamoto¹

¹ Bioimaging research group, Health and Medical Research Institute, AIST

蛍光強度のゆらぎ信号の解析により蛍光分子の動態計測を行う方法として、蛍光相関分光法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS) がある。FCS では、試料中に回折限界程度まで励起光を集光した微小領域 (0.2 fL 程度) を測定領域とする。蛍光分子あるいは蛍光標識した標的分子は、ランダムな並進拡散 (ブラウン運動) によって測定領域を出入りするため、検出される蛍光強度は時間的にゆらぐ。この蛍光強度信号のゆらぎは並進拡散の速さ (拡散係数) を反映するため、結果として標的分子の流体力学的半径や粘度の情報が得られる。また同時に、平均蛍光強度と蛍光強度信号の振れ幅から、標的分子の数 (濃度) を求めることが可能である。

多くの場合、FCS では上述のような並進拡散運動による蛍光強度信号のゆらぎの解析を行うが、検出される蛍光強度ゆらぎは並進拡散以外の原因によっても生じ得る。例えば、励起された蛍光分子が一時的に蛍光を発しない励起三重項状態等の暗状態へ遷移したり、標的分子の構造変化や分子間相互作用によって消光や蛍光共鳴エネルギー移動が断続的に起きたり、あるいはピコ~ナノ秒程度の時間スケールでは、蛍光分子は励起と脱励起を繰り返し明滅している。また励起光と蛍光を直線偏光とする光学系を用いると、分子がランダムに回転 (回転拡散) することによっても蛍光強度信号は揺らぐ。このような蛍光強度ゆらぎに対して適切なモデルを立てることで、FCS では分子動態だけにとどまらない様々な測定を実現できる。

蛍光ゆらぎ信号を取得する方法も共焦点蛍光検出系による 1 点計測だけにとどまらない。多点同時集光や全反射照明、ライトシート照明による同時多点測定によって分子動態のマッピング解析を行う試みも多くなされている。また、レーザー走査型顕微鏡 (LSM) により得られた画像やそのスタックを解析することによって、分子動態や濃度、分子間相互作用、多量体形成のマッピング解析を行う手法もいくつか提案されている。

発表者はこれまで、ホログラフィ技術を導入した多点 FCS、分子の回転拡散を測定できる偏光 FCS、ピンホール調整が不要になった光ファイバ型 FCS 等の装置や、LSM 画像の解析に基づいたラスタ画像相関分光法 (RICS) や Number and Brightness analysis (N&B) の関連技術の開発を行ってきた。最近では、偏光 FCS を用いることで、細胞やゲル等のソフトマター内の蛍光分子の回転拡散と並進拡散を測定し、これによって高分子混雑の状態を評価できる可能性を見出した。

発表では、発表者が開発してきたいくつかの装置やそれらによって得られた知見についてご紹介する。

CUBIC-HistoVIsion : 臓器・全身をカバーする 3 次元組織学技術
CUBIC-HistoVIsion realizes whole-organ/body three-dimensional histology

○洲崎悦生^{1,2}

¹順天堂大・院医 生化学・生体システム医科学、²理研 BDR 合成生物学研究 T

○Etsuo A. Susaki^{1,2}

¹Dept. Biochem & Systems Biomed., Juntendo Univ. Grad. Sch. Med.

²Laboratory for Synthetic Biol. RIKEN BDR

近年のさまざまな組織透明化および 3 次元イメージング法の発展により、細胞解像度以上で臓器や全身を包括的に観察することが可能となった。本講演では、我々が開発するセルオミクスフレームワーク「CUBIC」[1-2]をベースにした、全臓器染色およびイメージングのための最新の手法を紹介する [3]。大型組織サンプルの 3 次元染色は、染色プローブの適切な浸透の困難さから、組織学の長い歴史の中でもなかなか実現されてこなかった。我々は 3 次元染色系の複雑な物理化学的環境を明らかにするために、最初に電解質ゲルとしての生体組織の正確な特性評価を実施した。次に、単純化された組織模倣人工電解質ゲルを使用して、様々な 3 次元染色条件を実験的に評価した。これらの必須条件の組み合わせにより、我々は高効率な 3D 染色プロトコル「CUBIC-HistoVIsion」をボトムアップに設計することに成功した。CUBIC-HistoVIsion は、成体マウスの全脳、生体マーマセット半球、成人の死後小脳の約 1 cm³ の組織ブロック、および乳児のマーマセット全身を均一に標識できた。我々は CUBIC-HistoVIsion によるマウス全脳の血管染色に成功し、疾患や老化に関連すると考えられる局所血管異常の探索を開始している。CUBIC および CUBIC-HistoVIsion は、多細胞系の臓器および全身スケールの組織学的分析を行うための高度な技術基盤として機能する。

参考文献:

1. Susaki et al. Cell 157: 726-739 (2014)
2. Susaki et al. Nature Protocols 10: 1709-1727 (2015)
3. Susaki et al. Nature Communications 11: 1982 (2020)

自動球面収差補正による生体組織の屈折率推定
**Refractive indexes estimation of living tissues
using automated spherical aberration correction**

○毛内 拡¹

¹ お茶大・理

○Hiromu Monai¹

¹ Department of Biology, Faculty of Science, Ochanomizu University

An objective lens with a larger numerical aperture (NA) enables us to acquire higher resolution images. Such high NA objectives, however, can induce the well-known optical error, spherical aberration. This type of aberration is due to the mismatching of refractive indexes (RIs) between immersion media, a cover glass, and thick samples like biological tissue. Aberrated images look vertically elongated, which results in making observe fine structures blurred on the focal plane. High NA objectives usually equip rotating mechanics, the correction collar to compensate for the spherical aberrations by adjusting the inner optical path. The correction collar has been designed to adjust the thinner samples, like a sliced brain tissue just under the cover slip, for example, a standard water immersion lens shows the best resolution with a sample that approximate to have a refractive index of 1.33, and a cover glass that has a thickness of 0.17 millimeters. On the other hand, in the thick biological tissue, however, it is almost impossible to manually find the optimum position because there is no quantitative index of the correction collar's optimum position. To solve this issue, we have developed the fully automated spherical aberration correction system, TruResolution (Olympus, Japan), which has a motorized collection collar, and an algorithm to calculate the best adjustment based on the contrast of taken images. Taking advantage of TruResolution, in this study, we further developed a method for RIs estimation of biological tissues. RIs of the samples can be inversely estimated from a gradient between the optimum correction collar position at the two different focal planes. We verified that the RIs of the RI-known samples were correctly estimated, and we tried to estimate RIs of the transparent brain and living brains. Using this method, it is expected to be able to estimate the RIs of any biological tissues in a non-invasive manner.

High-speed volumetric imaging of brain

Shi-Wei Chu^{1,2,3}

¹Department of Physics, National Taiwan University, 1, Sec 4, Roosevelt Rd., Taipei 10617, Taiwan

²Molecular Imaging Center, National Taiwan University, 1, Sec 4, Roosevelt Rd., Taipei 10617, Taiwan

³Brain Research Center, National Tsing Hua University, 101, Sec 2, Guangfu Road, Hsinchu 30013, Taiwan

Understanding how the brain functions is one of the grand challenges in modern scientific research. Similar to a computer, a functional brain is composed of hardware and software. The major bottleneck lies in the difficulty to directly observe the brain “software”, i.e. the rule and operating information used by the brain, that might emerge from pan-neuron/synapse connectome. A recognized strategy for probing functional connectome is to perform volumetric imaging in brains with high spatiotemporal resolution and deep brain penetration. The underlying bottleneck, in my perspective, is that brain is composed of thousands to millions of densely interconnected neurons, spanning millimeter to centimeter with continuous spiking activities, and no suitable tool is able to study neural connections and activities *in vivo* with 3D subcellular resolution in any location of a living brain. The challenges include not only penetration depth but also imaging speed of neural networks.

For thick-tissue cellular observation in neuroscience, two-photon microscopy (2PM) has become a mainstream imaging technique. Here we report our recent progresses in enhancing volumetric imaging speed of 2PM [1], with a model animal *Drosophila*, which offers a small brain with sophisticated function and genetic control capabilities. By incorporating optogenetic stimulation tools and an independent optical stimulation path, we demonstrated all-optical physiology in the visual pathway of *Drosophila* [2]. Furthermore, to allow volume imaging deep inside a mammal brain, which is typically centimeter in scale, we develop two-photon volumetric endoscopy [3] by integrating two gradient index lenses, allowing *in vivo* imaging of neural circuits in centimeter-depth brain regions with high-contrast and sub-second volume rate. If time allows, I would like to introduce our very recent results on upgrading the volumetric speed to be larger than 500-volumes/second over $10^7 \mu\text{m}^3$ size, via combination of 32-beam parallel lateral-scanning, a ~ 100 -kHz axial-scanning acoustic lens, and a 32-channel photodetector, enabling data rate above 10 GHz.

[1] K.-J. Hsu *et al.*, *Opt. Lett.* **44**, 3190 (2019).

[2] C. Huang *et al.*, *iScience* **22**, 133 (2019).

[3] Y.-F. Chien, *et al.*, *Biomed. Opt. Exp.* **12**, 162 (2021).

E-mail address : swchu@phys.ntu.edu.tw

ミトコンドリア構造の動的制御とその生理的意義

観音裕考¹、Pal Soumyadip¹、丸山翔太¹、石原孝也¹、○石原直忠¹¹大阪大・院 理・生物科学

ミトコンドリアは2重膜構造からなる細胞内オルガネラであり、酸素呼吸によるエネルギー生産のみならず、リン脂質・ステロイドホルモン・ヘム等の様々な物質の合成と代謝、また酸化ストレス・アポトーシスやカルシウム制御等の細胞応答などの多彩な機能を持っている。ミトコンドリアの機能低下は神経変性疾患・心機能不全・代謝疾患等の様々な病態で観察され、幅広い研究領域においてミトコンドリアの研究が進められている。これらの病態において、しばしばミトコンドリアの形態変化が見出されるが、その病態における意義はまだ多くは理解されないまま残されている。

哺乳動物細胞の生細胞観察を行うと、ミトコンドリアは細胞内で移動しまた融合と分裂を活発に繰り返しながら形態を変化させる様子を観察することができる。このミトコンドリアの融合と分裂によるダイナミックな構造制御には局在の異なる GTPase タンパク質群（外膜融合：Mfn1, Mfn2、内膜融合：OPA1、分裂：Drp1）が重要な機能を担っている。私達の研究グループはミトコンドリアの形態とその動的特性に着目し、GTPase 群の分子機構の詳細とその制御に関する研究を進めている。また関連因子を培養細胞およびマウスで抑制・欠損させ、細胞応答や分化、また個体内での発生・病態・老化等における意義の解析を進めている。

ミトコンドリアは内部に自身の DNA (mtDNA) を保持している。mtDNA への変異の導入および蓄積はミトコンドリア機能低下、さらにはミトコンドリア病の原因となることが知られている。私達は近年、ミトコンドリアの融合と分裂を介した2重膜のダイナミクスが、mtDNA の分布・配置に重要な役割を持つこと、またこの現象がミトコンドリアの機能制御に関与することを見出している。mtDNA の細胞内分布の制御に関わる分子の同定を進めることで、様々な細胞応答経路がミトコンドリア機能制御に関与することを見出しつつある。このようにミトコンドリアのダイナミックな特性に着目することで、新視点からのミトコンドリア制御機構の解明を目指して研究を進めている。

イメージングで見つかったミトコンドリアの細胞保護機能
Mitochondrial self-preservation mechanism found with bioimaging

○太田善浩、アクリマ・ヤンナトゥル

¹東京農工大・院・生命工学専攻

○Yoshihiro Ohta¹, Aklima Jannatul^{1,2}

Department of Life Science and biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology

ミトコンドリアは、細胞の活動に必要なエネルギーを作ると同時に、過剰に存在すると有害な活性酸素種を発生させる細胞内器官である。多くの疾病で、細胞内で活性酸素種が過剰に発生した状態（酸化ストレス）が観察されており、ミトコンドリアにおける活性酸素種発生の適切な抑制は極めて大切だと考えられ、研究されてきた。現在までに、発生した活性酸素種を除去する仕組みは見つかっているが、発生を抑制する仕組みはよくわかっていない。

ミトコンドリアは内膜を挟んだプロトン駆動力により ATP を合成している。プロトン駆動力の成分である膜電位を観察すると、一定ではなく図 1 のように変動することが、植物から哺乳類まで広範囲な生物で認められる。しかし、そのメカニズムや、細胞への影響をば不明であった。本研究では、ミトコンドリアで自発的に生じる一時的な膜電位の消失が、どのように起こるのか、ミトコンドリアにどのような影響をもたらすのかを、イメージングの技法を用いて調べた結果を報告する。

最初に、細胞からミトコンドリアを単離し、ミトコンドリア周囲の環境を操作してミトコンドリアが自発的な膜電位変動を起こしやすい条件を調べ、細胞内で変動を起こしやすい条件と比較した。その結果、ミトコンドリア内部の pH が高い時に、一時的な膜電位の消失の頻度が増加し、また、活性酸素種の発生量が増えることが分かった。加えて、一時的な膜電位変動を止めると、ミトコンドリア内部の pH 上昇し、活性酸素種の発生量が増加した。このことから、一時的な膜電位変動は、活性酸素種の発生を抑制するメカニズムであるとみなすことができる。シンポジウムでは、詳細を説明したい。

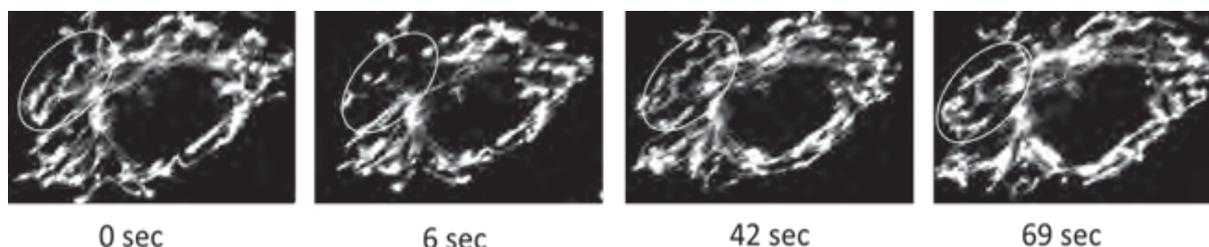


図 1 細胞内ミトコンドリアの状態変化

白く見えているのがミトコンドリア。時刻 6 秒で急激な水素イオンの流入が起き、42 秒で水素イオン移動のバランスが戻っている。

ミトコンドリア機能を操作する Drug Delivery System Drug delivery system to control mitochondrial function

○山田勇磨¹、原島秀吉¹

¹北大院 薬

○Yuma Yamada¹, Hideyoshi Harashima¹

¹ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University

多彩な機能を有するミトコンドリアは様々な分野から注目されており、疾患治療、美容・健康の維持、ライフサイエンスの発展に大きく貢献するオルガネラとして脚光を浴びている。そのため、ミトコンドリアへ目的分子を送達する Drug Delivery System (DDS)は、様々な分野の研究に大きく貢献すると期待されている。これまでに、ミトコンドリアを標的とした Drug Delivery System (DDS)がいくつか報告されてきたが、送達分子の物性やサイズを制限するため、タンパク質や核酸などの高次構造分子のミトコンドリアへの送達は困難であった [1]。我々は、ミトコンドリアが細胞内で活発に融合・分裂を繰り返し、相互に生体分子(核酸、タンパク質、など)を共有している点に着目し、ミトコンドリアと膜融合可能なナノカプセル型 DDS・MITO-Porter を考案した。本戦略は、「膜融合を介して内封分子をミトコンドリアへ送達する」ため、送達分子の物性やサイズを制限しない。ミトコンドリアと融合性の高い脂質膜組成の探索を行い、100 種以上の組成の中からミトコンドリア高融合性リポソーム (MITO-Porter)を同定する事に成功した [2]。これまでに、タンパク質、核酸、超分子、難水溶性分子などの様々な分子を MITO-Porter に内封し、培養細胞ミトコンドリアへの分子送達に成功している [1]。

現在は、MITO-Porter の開発研究で培ったミトコンドリア分子送達技術を基盤とし、異分野研究者・臨床家とともに『病態モデルにおける治療効果の検証』を中心とした共同研究を展開している。本講演では、「ミトコンドリアを標的とした癌治療戦略」[3]、「虚血性疾患に対するミトコンドリア治療戦略」について紹介する。また、ミトコンドリア病患者細胞を対象とし、独自に設計した治療用核酸・遺伝子をミトコンドリア送達し、治療効果を評価する自主臨床研究を精力的に進めている。その成果として、『変異ミトコンドリアを標的とした治療用核酸送達療法』の研究を進め、治療用 RNA を MITO-Porter システムを用いて送達する事により、ミトコンドリア病患者細胞の RNA 変異率を低下させ、ミトコンドリア呼吸能を回復させる事に成功した。これまでに tRNA [4]、mRNA [5]、rRNA [6]に本戦略が適用可能である事を報告しており、本講演ではこれらの成果をミトコンドリアを標的とした遺伝子機能制御の実施例として紹介したい。

本講演では、我々の研究成果を中心にミトコンドリア DDS を概説するとともに、ミトコンドリア DDS が『バイオイメージング研究』にどのように貢献できるのかも含め議論したい。

- [1] Yamada Y. et al, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 154-155: 187-209 (2020).
- [2] Yamada Y. et al, *Biochim. Biophys. Acta* 1778: 423-432 (2008).
- [3] Satrialdi et al, *Chem. Commun.* 56: 1145-1148 (2020).
- [4] Kawamura E. et al, *Mol. Ther. Nucleic Acids* 20: 687-698 (2020).
- [5] Yamada Y. et al, *Sci. Rep.* 10: 7511 (2020).
- [6] Yamada Y. et al, *Mitochondrion* 55: 134-144 (2020).

走査電子顕微鏡の生物応用

Application of scanning electron microscopy in biology

○甲賀 大輔

旭川医大 医 顕微解剖

○Daisuke Koga

Department of Microscopic Anatomy and Cell Biology, Asahikawa Medical University

【はじめに】

生物学分野における走査電子顕微鏡(SEM)は、これまで組織・細胞表面の立体(3D)形状解析に広く利用されてきたが、近年の装置開発に伴い、その応用が大きく変わってきている。そこで本講演では、「SEMの生物応用」について、私たちと関係が深い技法を中心に紹介する。

【SEMの信号】

SEMは電子銃から発生する電子線を試料に当て、そこから発生する様々な信号(二次電子(secondary electron; SE)や反射電子(backscattered electron; BSE)、陰極蛍光(cathodoluminescence; CL)、X線など)を検出することで、試料表面の3D形状や組成像をイメージすることができる。生物学分野では、主にSEとBSEの2つの信号を用いている。

【SE信号を用いた試料作製法】

SEの特徴は、試料の突起部分やエッジ部分からより強い信号が得られるため(エッジ効果・傾斜角効果)、一枚の画から立体感のある像を取得できることである(試料の表面3D構造解析には、SEの信号を用いる)。SE信号を使ったSEM試料観察法の特徴は、「みえないものをみえるようにする」であり、透過電子顕微鏡(TEM)に比べると多様で、目的に応じて工夫を凝らす必要がある点が面白い。ここでは、特殊試料作製法として、細胞内微細構造観察法(オスミウム浸軟法)について紹介する。

【BSE信号を用いた試料作製法】

BSEモードでは、試料を構成する平均原子番号に依存したコントラスト像(組成コントラスト)を取得することができる。つまり、細胞の固定や染色に用いるオスミウムやウラン、鉛などの重金属からは、強いコントラスト(明るく観察される)が得られ、試料の組成像がコントラストに反映される。近年の装置開発に伴い、樹脂に包埋した組織ブロック面の観察(ブロックフェイスイメージング)や樹脂包埋組織切片の観察(セクションフェイスイメージング)が可能となり、これらの技術が最新の3D-SEM技術(FIB-SEM、SBF-SEM、連続切片SEM法)の基盤となっている。ここでは、私たちと関りが深い「連続切片SEM法」を中心に紹介したいと思う。

【おわりに】

近年、SEMの生物応用は主にBSE信号を利用した3D-SEM法が主流となりつつあるが、SE信号を利用した様々な技法も、私たちに貴重な情報を与えてくれることを忘れてはならない。今後、SEMのバイオ領域における可能性を追求していきたいと考えている。

アポダイズド位相差顕微鏡による無染色・非侵襲での細胞内微細構造動態の観察
**Observation of the dynamics of subcellular structures in living unstained cells by
apodized phase-contrast microscopy**

○島崎健太朗¹、加藤薫²、中村優子¹、齊藤恭子¹、深澤征義¹、花田賢太郎^{1,3}

¹ 感染研・細胞化学、² 産総研・バイオメディカル、³ 感染研・品管

○Kentaro Shimasaki¹, Kaoru Katoh², Yuko Nakamura¹, Kyoko Saito¹,
Masayoshi Fukasawa¹, Kentaro Hanada^{1,3}

¹ Department of Biochemistry and Cell Biology, NIID

² Biomedical Research Institute, AIST

³ Department of Quality Assurance and Radiological Protection, NIID

アポダイズド位相差法は、位相差に特有のハロ（細胞などの周囲が白く光る光学ノイズ）を減弱し、微細な構造を可視化する位相差法である。原理の開発から20年あまり経過した現在、アポダイズド位相差の設計自体は同じだが、カメラの高感度化や顕微鏡本体、並びに対物レンズの光学精度の向上に伴い、画質の改善が顕著である。国立感染症研究所に新たに導入された、最新の機器を用いたアポダイズド位相差顕微鏡システムによるライブセルイメージングを実施したところ、大小様々な顆粒構造や糸状構造体などの微細な構造体が細胞内を動く様子が、無染色・非侵襲で観察できた。観察された構造体がどのオルガネラに相当するのかを検証するため、蛍光オルガネラマーカを導入した細胞を複数樹立し観察したところ、いくつかのオルガネラはコントラストの強度や分布にユニークな特徴を有していることが明らかとなった。今回の発表では、位相差＋蛍光のライブセルイメージング観察例をいくつか紹介したい。また我々は、病原体感染に伴う細胞内動態変化を検出・観察する手段としての当該顕微鏡の有用性にも着目している。そこでまず、複製複合体（Replication Complex: RC）を形成することが知られるプラス鎖RNAウイルスをモデルとした感染細胞の観察に着手している。本発表においては、日本脳炎ウイルスを感染させた細胞におけるRCや、ウイルスタンパク質の局在をアポダイズド位相差顕微鏡で観察したデータについても紹介し、感染症研究への発展応用の可能性について言及したい。

有機合成小分子を用いた超解像光学顕微鏡による生体試料の観察
Live cell super-resolution imaging using organic small molecules

○佐藤良勝^{1,2}

¹名古屋大 WPI-ITbM、²名古屋大・院 理学研究科

○Yoshikatsu Sato^{1,2}

¹ Institute of Transformative Bio-molecules

² Graduate School of Science, Nagoya University

光の回折限界を超える超解像顕微鏡の登場により、蛍光イメージングの需要はますます大きくなっている。このようなハードウェアの発展とともに開発が進められているのが蛍光色素である。蛍光タンパク質と有機合成小分子は並び立つ分子ツールであり、それぞれに優れた特性がある。本発表では、その場ですぐに核やミトコンドリア DNA をラベルできる有機合成小分子として最近我々が報告した DNA 染色色素(Kakshine)の分子構造やその特徴、適用範囲などを中心に、私が所属する名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所で得られた最近の研究成果を報告する。

機械学習によって明視野細胞画像から遺伝子型の違いを判別できるか
**Machine learning approach for discrimination of genotypes based on bright-field
cellular images**

鈴木吾大², 齋藤裕^{1,3,4}, 〇光山統泰¹

¹産業技術総合研究所 人工知能研究センター, ²一般財団法人シネコカルチャー, ³産総研・早大 生体システムビッグデータ解析 オープンイノベーションラボラトリ, ⁴東京大学大学院新領域創成科学研究科

Godai Suzuki², Yutaka Saito^{1,3,4}, 〇Toutai Mitsuyama¹

¹Artificial Intelligence Research Center, AIST, ²Synecoculture Association. ³AIST-Waseda University Computational Bio Big-Data Open Innovation Laboratory. ⁴Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo.

Morphological profiling is a combination of established optical microscopes and cutting-edge machine vision technologies, which stacks up successful applications in high-throughput phenotyping. One major question is how much information can be extracted from an image to identify genetic differences between cells. While fluorescent microscopy images of specific organelles have been broadly used for single-cell profiling, the potential ability of bright-field (BF) microscopy images of label-free cells remains to be tested. Here, we examine whether single-gene perturbation can be discriminated based on BF images of label-free cells using a machine learning approach. We acquired hundreds of BF images of single-gene mutant cells, quantified single-cell profiles consisting of texture features of cellular regions, and constructed a machine learning model to discriminate mutant cells from wild-type cells. Interestingly, the mutants were successfully discriminated from the wildtype (area under the receiver operating characteristic curve (AUC) = 0.773). The features that contributed to the discrimination were identified, and they included those related to the morphology of structures that appeared within cellular regions. Furthermore, functionally close gene pairs showed similar feature profiles of the mutant cells. Our study reveals that single-gene mutant cells can be discriminated from wild-type cells based on BF images, suggesting the potential as a useful tool for mutant cell profiling.

新規プローブの開発と応用による低分子量生体分子の可視化解析
Imaging analyses of low molecular weight bioactive molecules by the development and application of novel probes

○塗谷睦生^{1,2,3}

¹慶應義塾大 医学部、²横浜国大 環境情報、³JST さきがけ

○Mutsuo Nuriya^{1,2,3}

¹ Keio University School of Medicine, ² Graduate School of Environment and Information Sciences, Yokohama National University, ³ JST PRESTO

生命現象の理解においては、見て理解する、可視化が非常に強力な手段であり、この可視化研究においては蛍光イメージングが非常に有効である。蛍光タンパク質の発見と展開、そして様々な蛍光色素の開発により、これらを対象となる生体分子にタグとして付け、可視化することが可能となり、生命科学研究の発展に大きな寄与をしている。しかし、実際には、今もなおまだ見えていない分子が多々存在する。その多くは、生命現象に非常に重要な役割を果たす、低分子量の分子群である。この中には、塩基、アミノ酸、糖などの生体高分子の構成要素や代謝関連物質などが含まれ、また神経系では神経伝達物質の多くが分子量が 1,000 にも満たない低分子量のものである。ここで、蛍光タンパク質はその数十倍の分子量を持ち、比較的小さいと思われる蛍光色素でも分子量が 1,000 程度ある。このように大きな蛍光分子を低分子量生理活性物質に付加すると、化学的性質、そしてそれによる生物学的性質が大きく変化してしまい、よってプローブとして適さない。このような蛍光タグ法の適用の限界が、低分子量生理活性物質の可視化、そしてそれによる理解を阻んできた。この状況を打開するためには、新たな可視化法の開発が必要不可欠である。

この問題を解決するため、我々は近年、アルキンタグ法の応用を進めている。炭素 2 原子の三重結合を持つアルキンは、生体中には存在しないため特異的なタグとなる。そして分子量が 25 程度と非常に小さく、その付加による対象分子への影響を最小限に止めることができる。更に、アルキンは、アジドと特異的な環化反応をすることから、アジド付加蛍光色素などによるその後の検出ができ、また、ラマン散乱による検出も可能である。これらのことを鑑み、我々は、低分子量神経調節物質のアルキンタグ・プローブの開発と応用を進めている。本講演では、その最初の応用例であるアルキンタグ・ドーパミンの開発と応用の例を紹介する。

高輝度蛍光ナノ粒子を用いた病理解析による乳癌内分泌療法の耐性予測
**Prediction of endocrine therapy resistance in breast cancer by immunohistochemistry
 using nanoparticles with ultra-high brightness**

○権田幸祐¹、北村成史¹、石田孝宣²、多田寛²

¹ 東北大・院 医学系 医用物理学分野、² 東北大・院 医学系 乳腺・内分泌外科学分野

○Kohsuke Gonda¹, Narufumi Kitamura¹, Takanori Ishida, Hiroshi Tada^{1,2}

¹ Department of Medical Physics, Graduate School of Medicine, Tohoku University

² Department of Breast and Endocrine Surgical Oncology, Graduate School of Medicine,
 Tohoku University

女性ホルモンエストロゲンの受容体であるエストロゲン受容体 α (ER α) は、ヒトの乳がんの発生と成長に重要な役割を果たすことが知られている。乳がん患者の約70%がER α 陽性を示すが、多くのER α 陽性乳がん患者は、内分泌療法で効果的に治療される。しかし、転移性乳がん患者の大半が、またER α 陽性乳がん患者の約40%が内分泌療法に対し耐性を示す。この耐性獲得機序には様々な説が提案されているが、その一つとして細胞核内ではなく核外（細胞膜および細胞質）に存在するER α によって媒介されるクロストークが関連すると考えられてきた。しかし、核外のER α はその存在量が微量であるため、既存の免疫組織化学法（IHC）では定量的な病理診断が難しく、細胞膜および細胞質に存在するER α の評価が内分泌療法の抵抗性を予測できるかどうかは実証されていなかった。我々は、独自開発した高輝度蛍光ナノ粒子（phosphor-integrated dots : PID）を用いた免疫組織化学法（IHC-PID）を利用してこの課題を解決し、乳がん患者の内分泌療法耐性の予測診断技術の開発を目的として研究を進めた。

ER α の発現量が異なる細胞株を用いて培養細胞ブロックのパラフィン切片を作製し、核に局在するER α についてIHC-PIDを行った。ER α を高発現する細胞株、ER α を中程度に発現する細胞株、ER α の発現が低い細胞株およびER α 陰性細胞株、以上の間でPIDの存在粒子数を示すPIDスコアが有意に異なることが示された。さらに得られたPIDスコアをER α のmRNA発現量のリアルタイムqRT-PCR測定およびFACSによる発現タンパク量の定量解析と比較し、両者が強い相関関係を示すことを確認した。次に、発現ベクターを用いてHeLa細胞の細胞核内および細胞核外にそれぞれ特異的にER α -EGFPを発現する細胞を樹立し、PIDによる局在評価を行ったところ、PIDの輝点が細胞核内および細胞核外でそれぞれEGFPと共局在することを確認した。これらの結果から、PIDを用いて核の内外のER α の発現量をそれぞれ評価可能であることが示された。以上の結果をもとに、ER α 陽性/HER2陰性乳がんの65人の患者の組織切片についてIHC-PID試験を行い、ER α 総量、核内ER α 、核外ER α のそれぞれのPIDスコア、および核内ER α と核外ER α の比率（ENR）を測定した。その結果、従来の色素（DAB）を用いたIHCによる評価方法（Allredスコア、Hスコア）や、IHC-PIDでER α 総量を測定しただけの方法に比べ、本研究のENRスコアは全生存期間の低下（ $p = 0.048$ ）および無病生存期間（DFS）（ $p = 0.007$ ）と有意に相関していることが分かった。さらに多変量解析によりENRがDFSの独立した予後予測因子であることが明らかになり、乳がん患者の内分泌療法耐性を予測できることが示された。

細胞内の水の測定から細胞内夾雑環境・液-液相分離を探る

Investigation of intracellular crowding environments and liquid-liquid phase separation by measuring water in a cell

○中林孝和

東北大院薬

○Takakazu Nakabayashi

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University

近年、タンパク質の濃度が非常に濃い状態（液滴）と薄い状態の二相が生じる液-液相分離（LLPS）が、特に細胞生物学の分野において注目を集めている。温度変化などの外部摂動が細胞に生じたときに、細胞内に過渡的に LLPS が生じることは知られていた。しかし、外部摂動だけではなく、各種生理現象に対しても LLPS の寄与が相次いで報告され、現在の LLPS 研究の潮流を作っている。また、この LLPS はタンパク質濃度の不均一な状態が細胞内で生じることを意味しているが、そもそも細胞内は緩衝溶液のような「きれいな」環境とは全く異なる。細胞の中は分子クラウディングと呼ばれるタンパク質や脂質分子などの生体分子で非常に混み合った分子夾雑環境であり、この分子クラウディング効果によって、細胞内にあるタンパク質や核酸の構造および機能が変化することが報告されている。LLPS も分子夾雑環境の一つとしてみなすことができる。

我々は、LLPS が生じる分子メカニズム、LLPS と分子夾雑環境との関係、そして液滴からのタンパク質の線維化のダイナミクスについて、細胞内にある水のラマンバンドの測定から検討している^{1,4}。分子夾雑環境も LLPS も、水の中に生体分子が溶けた状態であり、今までは溶けた溶質に着目した研究が行われてきた。しかし、水に着目すると、水の密度は溶質の濃度と反比例の関係にあり、水の密度測定から分子夾雑環境の定量化を行うことができる（図 1）。また水は非常に高濃度であるために、生体分子やイオンの濃度変化に対して鈍感であり、水のラマンバンドを強度標準とした液滴内外のラマンスペクトルを測定することで、液滴内のタンパク質の濃度、構造、液滴内外の構成成分の同定などをラベルフリーで行うことができる。ラマン散乱強度は非常に弱いことが欠点であるが、水の濃度は非常に高いために、比較的容易に測定できる長所もある。また、水分子が関与する水素結合の変化も得られる可能性もある。本発表では、水のラマン測定を用いた細胞内の分子夾雑環境の定量^{1,4}、細胞内環境測定²、さらに液-液相分離に適用し、構造変化、濃度定量化を行った結果³などを紹介する。

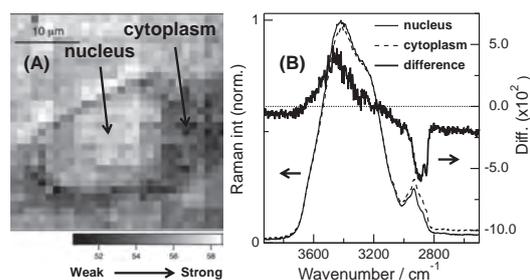


図 1. (A) HeLa 細胞の O-H 伸縮振動のラマンイメージと (B) 核と細胞質のラマンスペクトル。3000~3700 cm^{-1} の O-H 伸縮振動バンドにおいて、核の方が細胞質よりもバンド強度が強く、水分子が多いことがわかる¹。

1. M. Takeuchi, S. Kajimoto, T. Nakabayashi, *J. Phys. Chem. Lett.* 8, 5241 (2017).
2. T. Sugimura, S. Kajimoto, T. Nakabayashi, *Angew. Chem. Int. Ed.* 59, 7755 (2020).
3. K. Murakami, S. Kajimoto, D. Shibata, K. Kuroi, F. Fujii, T. Nakabayashi, *Chem. Sci.* 12, 7411 (2021).
4. D. Shibata, S. Kajimoto, T. Nakabayashi, *Chem. Phys. Lett.* 779, 138843 (2021).

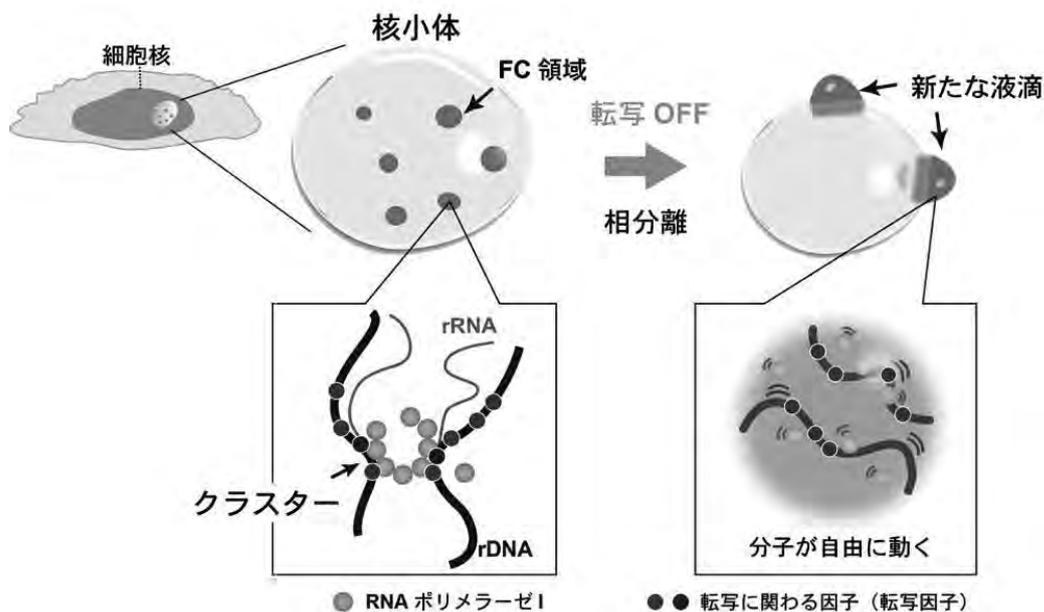
非膜オルガネラでの転写制御の解明

○井手聖^{1,2}、今井亮輔^{1,2}、大地弘子¹、前島一博^{1,2}

¹ 遺伝研・遺伝メカニズム、² 総研大・生命科学

細胞内には核小体に代表されるような膜のないオルガネラが存在する。最近、それらの多くが「液-液相分離」と言われ、その実態は油と水の分離に見られる原理によって作られる液滴（ドロレット）であることが細胞生物学のホットトピックとなっている。精製したタンパク質が試験管内で液滴を形成する一方で、細胞内の環境で実際どのように相分離が起きているのか、それが生理機能にどのように寄与しているのかについては不明であった。本研究では、細胞内で分子の1個1個を観察できる超解像蛍光顕微鏡を用いることで、核小体サブコンパートメントFC（Fibrillar center）領域内に局在する二つの因子、リボソームのRNA合成に関わるRNAポリメラーゼI（Pol I）と、転写因子UBFを通してリボソームRNA遺伝子（rDNA）の振る舞いを観察し、もともと液滴様構造体である核小体内においてrDNAの転写抑制によって新たな液滴様構造体が形成されることを明らかにした。

転写が行われている通常状態ではPol IはrDNAクロマチン上でクラスター形成し、rDNAを拘束していた（図の左）。一方、阻害剤によりPol Iの転写が阻害されると、Pol IがrDNAからはずれ、自由拡散運動となり、核小体内に流動性の高い巨大な液滴となってたまっていた（図の右）。また、ヒト遺伝性疾患の原因となる変異型Pol Iを発現させることでも同様の液滴が出現した。興味深いことに、この変異型Pol Iは正常型に対してドミナントネガティブに働き、その作用機序は液滴から転写開始因子が選択的に排除されるためであることがわかった。以上、核小体内での新たな相分離に伴うrDNAの転写抑制のメカニズムが明らかとなった。細胞内相分離がリボソームの異常に起因するヒト遺伝性疾患の原因となることから、このような細胞の異常や関連疾患の理解が進むことが期待される。



図：核小体内で起こる新たな相分離

生きた細胞内で非膜オルガネラを「操る」合成生物学技術の開発
Synthetic Biology Tools to Manipulate Membrane-less Organelles in Living Cells

○中村秀樹^{1,2}

¹京都大学 工 合成・生物化学

²JST ERATO 浜地ニューロ分子技術

○Hideki Nakamura¹

¹ Department of Synthetic Chemistry and Biological Chemistry, Graduate School of Engineering,
Kyoto University

² JST ERATO Hamachi Innovative Molecular Technology for Neuroscience

生きた細胞の中で、複数種のタンパク質や核酸がダイナミックに集合してできる非膜オルガネラは、おもに相転移・相分離現象との関連から最近の細胞生物学研究で多くの注目を集めています。これら非膜オルガネラは、周囲に脂質二重膜の物理的境界をもたないことから短時間のうちに集合・離散することができ、遺伝子発現を介する機構よりも“速く”細胞内シグナル系を制御可能なメカニズムであると考えられます。さらに、従来は知られていなかった、あらたな非膜オルガネラの発見・報告も相次いでおり、これらの生理的意義について更なる研究の進展が待たれます。

しかし多くの場合、非膜オルガネラが形成されること「そのもの」の生理的意義を直接実験的に検証することは難しいのが現状です。その最大の要因は、生きた細胞内で非膜オルガネラの集合・離散「そのもの」を操作する技術が存在しないことです。従来の主流である遺伝学的手法は、タンパク質の欠損や過剰発現を伴うため、操作したタンパク質の機能が変化し、非膜オルガネラをつくることそのものの意義を直接検証することができません。薬理学的手法も、重要なシグナル系の活性を変化させるものであり、こちらも非膜オルガネラの集合・離散そのものの意義を見ることはできません。

これらの課題を克服するため、私は、「つくる・操る」ことで生命を「理解する」ことを目指す合成生物学分野の技術を応用して、非膜オルガネラの集合・離散を、生きた細胞内で自在に「操る」ためのツール開発を行ってきました。その過程で、ストレス条件下の細胞内で形成されるストレス顆粒をモデルに、非膜オルガネラを「つくる」ツール iPOLYMER、そして「こわす」ツール ActuAto^r の開発に成功しました。本講演では、これらふたつの技術の概要と、非膜オルガネラ研究における合成生物学技術の活用について今後の展望をお話しします。併せて、現在進行中の他の技術開発についてもできる限りご紹介いたします。

■ 一般演題（ポスター） ■

植物の立体再構成システムを用いたミオシン XI 変異体草姿の定量解析

○吉田大一¹、國田樹²、戸田真志³、上田晴子⁴、檜垣匠⁵

¹熊本大・院・自然科学、²琉球大・工、³熊本大・総合情報統括センター、⁴甲南大・理工、⁵熊本大・国際先端科学技術研究機構

○Daichi Yoshida¹, Itsuki Kunita², Masashi Toda³, Haruko Ueda⁴, Takumi Higaki⁵

¹Graduate School of Science and Technology, Kumamoto University, ²Faculty of Engineering, University of the Ryukyus, ³Center for Management of Information Technologies, Kumamoto University, ⁴Faculty of Science and Engineering, Konan University, ⁵IROAST, Kumamoto University

植物は茎や枝を伸ばして特徴的な草姿を構築する。茎や枝の配置は光や水などの資源獲得能力や、自重や積雪などにより生じる力学的な負荷の軽減に寄与すると考えられている。シロイヌナズナはゲノムや個体のサイズが小さいことなどから古くからモデル植物として用いられており、重力屈性や姿勢制御など草姿の形成に係る現象の変異体も数多く単離されている。本研究では、その中でも植物の姿勢制御変異体として単離されたミオシン XI 変異体に注目した。シロイヌナズナのみオシン *Xif* および *Xik* を同時に欠損した *xif xik* 二重変異株は花茎や側枝がねじれた形態をとり、さらに4種類のみオシン XI を欠損した六重変異株は花茎が過剰に屈曲しコイル状になることが報告されている。(Okamoto et al. 2015)。

私たちは植物の姿勢制御とミオシン XI の関係を理解することを目的として、ミオシン XI 変異体における草姿の立体構造を定量的に評価した。草姿の三次元データ取得および解析は当研究室で開発した植物の立体再構成システムを用いた (Kunita et al. 2021)。野生株 (Col-0)、*xif* 変異株、*xik* 変異株、*xif xik* 二重変異株の花茎および側枝の立体構造を再構成し、側枝の角度や曲率などの計測を実施した。また、各変異体における経時的な側枝構築を定量評価するために、およそ24時間毎に画像取得を行い、四次元 (XYZT) の定量解析も実施した。本発表では、一連の解析結果から示唆された側枝の構築機構について議論したい。

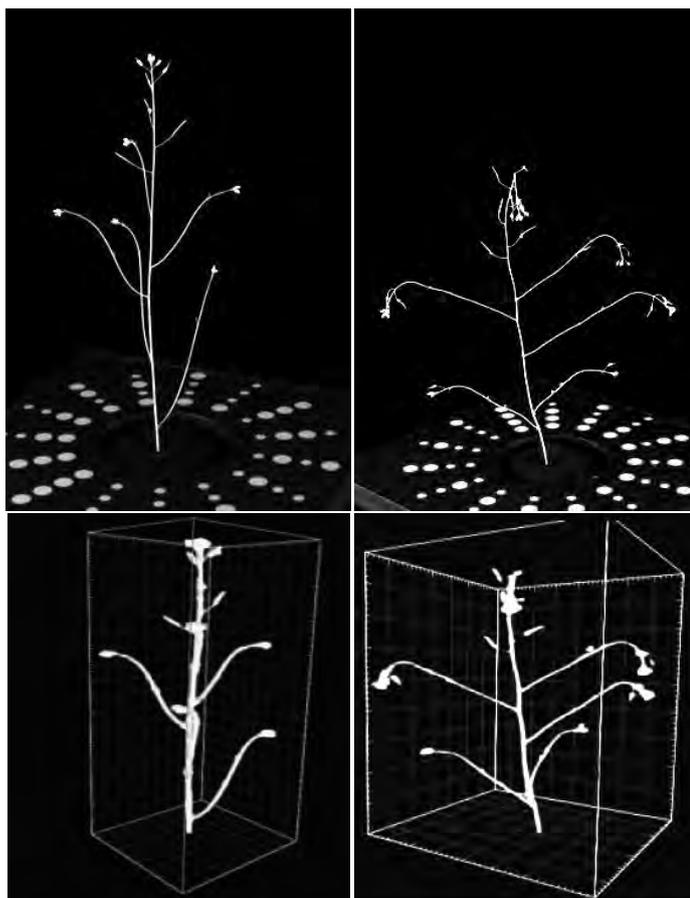


図. シロイヌナズナ野生株 (Col-0) (左)、*xif xik* 二重変異体 (右) の画像 (上) および立体再構成像 (下)

微小管結合タンパク質 *RIC1* 過剰発現による子葉器官および表皮細胞の形態変化
Quantitative analysis of cotyledon shape and pavement cell morphology in *RIC1*-overexpressors

○菊川琴美¹、曾我康一²、今村寿子³、檜垣匠⁴

¹熊本大・院・自然科学、²大阪市立大・院・理、
³九州大・院・医、⁴熊本大・国際先端科学技術研究機構

○Kotomi Kikukawa¹, Kouichi Soga², Hisako Takigawa-Imamura³, Takumi Higaki⁴

¹ Graduate School of Science and Technology, Kumamoto Univ., ² Graduate School of Science, Osaka City Univ., ³ Graduate School of Medical Sciences, Kyushu Univ., ⁴ IROAST, Kumamoto Univ.

植物の器官の形や大きさは、器官を構成する個々の細胞の数や形、配置に影響を受けると考えられているが、器官と細胞の関係性は未だ不明瞭な点が多い。多くの双子葉植物の葉表皮ではジグゾーパズル状の細胞が互いに噛み合うように配置されている。このジグゾーパズル型細胞形態形成には微小管結合タンパク質 *RIC1* が関与していることが広く認められており、シロイヌナズナ *RIC1* 過剰発現株の敷石細胞では凹凸形状が抑制され、細長く伸びた形態をとることが報告されていた。そこで我々は、植物の器官と細胞の関係を探ることを目指して、*RIC1* 過剰発現株をツールに子葉器官および表皮細胞の形態解析を進めている。

RIC1 過剰発現株では播種後およそ7日目に子葉辺縁部に凹凸が出現する形態異常が認められ、およそ14日目以降で子葉の面積拡大成長に遅延が生じることが分かった(図1)。次に、共焦点顕微鏡画像の多点取得と自動つなぎ合わせによる広域高解像度画像(図2)に基づく細胞形態解析を行った結果、子葉面積が減少した播種後およそ14日目で表皮細胞面積が減少していることが分かった。次に、子葉および細胞の拡大成長に遅延が生じた播種後14日目の子葉組織切片を作成して解析した結果、*RIC1* 過剰発現株の表皮細胞の厚さが増大していることが明らかになった。また、透過型電子顕微鏡観察画像に基づいて表皮細胞壁の厚さを計測した結果、表皮細胞壁の厚さが増大していることが示された。以上の結果により、*RIC1* 過剰発現が引き起こした細胞壁の異常によって表皮細胞の平面的かつ多方向への効率的な面積拡大とジグゾーパズル型形態形成が損なわれ、その結果、子葉器官の形態異常が引き起こされたと考えられる。現在、この仮説を検証する数理モデル解析も進めており、本発表ではこの結果も併せて階層横断的な形態形成機構についても議論したい。

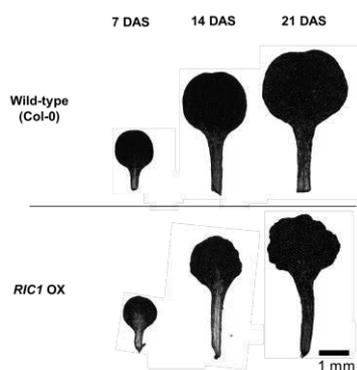


図1. 子葉の形態変化

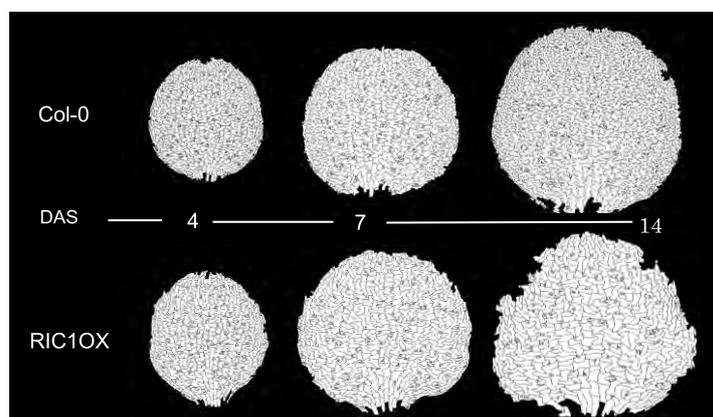


図2. 表皮細胞のセグメンテーション画像

シロイヌナズナ子葉における表皮細胞の形態形成初期の超微細構造解析
Ultrastructural analysis of the early stages of pavement cell morphogenesis
in *Arabidopsis cotyledons*

○秋田佳恵¹, 高木智子², 檜垣匠³, 馳澤盛一郎⁴, 永田典子¹

¹日本女子大・理, ²日本女子大・電顕, ³熊本大・IROAST, ⁴法政大・生命科学

○Kae Akita¹, Tomoko Takagi², Takumi Higaki³, Seiichiro Hasezawa⁴, Noriko Nagata²

¹ Dept. Chem. Biol. Sci., Japan Woman's Univ., ² Laboratory of Electron Microscopy, Japan Woman's Univ. ³ IROAST, Kumamoto Univ., ⁴ Hosei Univ.

多くの双子葉植物において、葉の表皮細胞は隣接した細胞同士が入り組んだジグゾーパズル型を呈する。表皮細胞は、分化前の原表皮細胞では直線的な細胞壁をもつ単純な形状をしているが、分化および成熟に伴い細胞壁が湾曲して複雑化する。この形態形成は、他の組織で知られる植物細胞の成長様式では説明がつかないため、独自の形態形成機構が存在すると考えられている。これまでに我々は、シロイヌナズナの同一個体において成熟段階の異なる本葉を観察し、表皮細胞の形態形成に関わる局所的な膜交通が存在している可能性を見出した。電子顕微鏡による観察では、表皮細胞の湾曲部において細胞膜が大きく陥入した細胞膜外領域に多数の小胞を有する paramural body (PMB) が確認された (Akita et al. 2017)。そこで本研究では、種子段階の子葉を材料に用いることにより、細胞形態形成の初期段階を観察するとともに、本葉と子葉における細胞内の違いについて検証することとした。

野生型シロイヌナズナを寒天培地に播種し、春化处理 4 日を経て、明条件に移した日を芽生え 0 日と定義し、芽生え 1, 2, 3 日の子葉を固定した。観察には電界放出形走査電子顕微鏡 (FE-SEM) を用いることにより、広域かつ高解像度の画像を取得した。取得した電子顕微鏡画像について、各区画から 10 細胞ずつ選択し、構造 7 種 (細胞膜, 核, 液胞, リピッドボディ, ミトコンドリア, ペルオキシソーム, 色素体) を手動にて領域分割した。子葉の表皮細胞では、本葉のような大きな PMB は観察されなかったが、本葉では見られなかったリピッドボディが数多く存在していた。リピッドボディの細胞占有率を測定したところ、芽生え 1 日は 50%, 芽生え 2 日では 31% を占め、芽生え 3 日では 0% と急激に減少した。その一方、液胞の細胞占有率は、芽生え 1 日では 20%, 芽生え 2 日は 31%, 芽生え 3 日は 94% と増加し、芽生え 3 日までの間に細胞内が大きく変化していることが明らかとなった。さらに、細胞内構造が多数観察された芽生え 1, 2 日について、細胞膜から各構造までの最短距離を測定したところ、他の構造と比較してリピッドボディは顕著に細胞辺縁部に分布していることがわかった。また、異なる細胞内構造が近接している様子が見られたことから、各構造間における最短距離を測定したところ、芽生え 2 日における色素体の 93% は、最近傍のミトコンドリアまでの距離が 0.1 μm 以内であった。この結果から、細胞形態形成初期にオルガネラコンタクトが起こっている可能性があると考え、現在、オルガネラ間の相互作用が起きているのか、また相互作用がある場合、細胞形態形成との関連があるのかを検証するため、各構造間における接触長の計測に取り組んでいる。

画像解析による超解像法 SRRF の *in vivo* イメージングへの適用

Image analysis based super-resolution two-photon microscopy for *in vivo* imaging

○堤 元佐^{1,2}、高橋 泰伽^{1,2,3}、小林 健太郎⁴、根本 知己^{1,2,3,4}

¹自然科学研究機構 生理学研究所、²自然科学研究機構 生命創成探究センター、

³総合研究大学院大学 生理科学専攻、⁴北海道大学 電子科学研究所

○Motosuke Tsutsumi^{1,2}、Taiga Takahashi³、Kentaro Kobayashi⁴、Tomomi Nemoto^{1,2,3,4}

¹NIPS, NINS, ²ExCELLS, NINS, ³Dept. Physiol. Sci., SOKENDAI, ⁴RIES, Hokkaido Univ.

近年、超解像顕微鏡法の普及により光の回折限界を超えて微細な生体现象を可視化できるようになってきた。しかし、既存の超解像顕微鏡法は光学特性の良いサンプルや表面付近での観察を前提としており、組織や生体深部への適用には困難を伴う。

一方で、Super Resolution Radial Fluctuation (SRRF) 法 (Gustafsson *et al.*, *Nat. Commun.* **7**; 12471) は 2016 年に発表された新規の超解像化手法である。この手法は蛍光分子局在化法をベースとしており、連続取得された顕微鏡観察像における蛍光強度の空間・時間相関解析から個々の蛍光ピークを分離し、数 10 nm の精度で重心位置を決定できる。この方法の特長は、画像解析による手法であることから既存の各種顕微鏡観察法との組み合わせが可能なことである。

本研究で我々は、深部超解像イメージングの実現に向けて、SRRF 法の 2 光子顕微鏡への適用を試した (TP-SRRF)。最初に、2 光子顕微鏡で生体脳模倣ゲル中の蛍光ビーズの蛍光像を複数枚取得し、得られた画像シリーズに対して SRRF 処理を行った。SRRF 固有のパラメーターの検討・最適化を行った結果、TP-SRRF は生体脳模倣ゲル 1 mm 深部でも空間分解能の向上効果を示した。同処理条件でナノルーラー (顕微鏡分解能評価ツール) の TP-SRRF 観察を試したところ、構造化照明顕微鏡 (SIM) に匹敵する約 160 nm の 2 点分解能が確認された。また、Thy1-EYFP (H-line) マウス固定脳スライスの観察では、特に透明化処理を施さずとも、表面近傍はもとより 100 μm 深部でも神経細胞樹状突起スパインを観察することに成功した (図)。さらに、H-line マウスの *in vivo* イメージングに TP-SRRF を適用したところ、生体脳表から 200 μm 深部において樹状突起スパインを明瞭に解像することが確認された。

以上の結果から、TP-SRRF による生体深部超解像イメージングの実用性が示された。この手法は既存の 2 光子顕微鏡に容易に適用でき、超解像観察の適用可能範囲を大きく広げ得ると期待される。

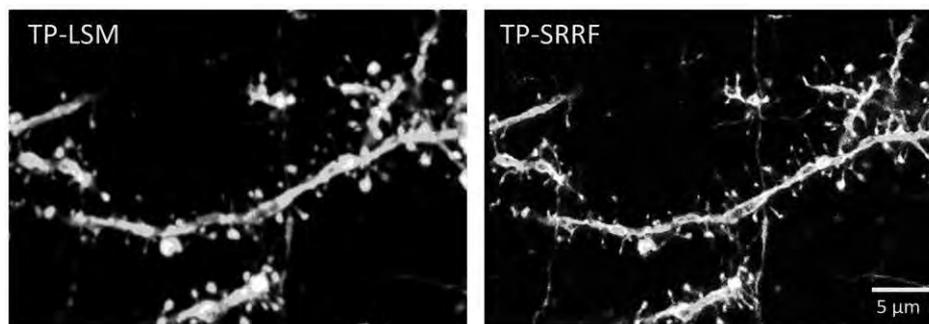


図 : H-line マウス固定脳スライス表面付近の 2 光子顕微鏡像 (左) と TP-SRRF 像 (右)

多点走査型 2 光子顕微鏡を用いた生体脳のボリューム Ca²⁺イメージング

○安宅光倫^{1,2,3}、大友康平^{1,2,3}、榎木亮介^{1,2,3}、根本知己^{1,2,3}

¹総合研究大学院大学 生命科学研究科 ²自然科学研究機構 生命創成探究センター

³自然科学研究機構 生理学研究所

大脳皮質の神経細胞群を 3 次元空間内において同時に可視化可能なボリュームイメージング法の開発が近年盛んに行われている。とりわけ 2 光子顕微鏡による 20 μm 程度のサイズの神経細胞の Ca²⁺イメージングの際に必要な時空間分解能を維持したままで、高速に観察深さ位置を変える手法が考案されている。一方、スピニングディスクスキャナによる多点レーザー走査方式では励起光がマイクロレンズアレイを通過して試料に分割照射され、ディスクの回転とともに焦平面全域が均一にスキャンされる。従って撮像ピクセル数が増大してもスキャン時のピクセル滞在時間が撮像の律速になりにくいことが特長であり、生体脳の広視野・高画素 1 光子 Ca²⁺イメージングへの適用も報告されている (Yoshida *et al.*, 2018)。近年、我々は 2 光子励起光源に高出力の近赤外超短光パルスレーザーを用い、2 光子スピニングディスク共焦点顕微鏡 (TPLSM-SD)の広視野化を達成した (Otomo *et al.*, 2015)。また TPLSM-SD はマウス生体脳の *in vivo* 3 次元観察が可能であることを実証した (安宅他, 日本生理学会(2019))。そこで、本研究では、生体脳のボリューム Ca²⁺イメージングを実現するために、TPLSM-SD に連続焦平面走査機構を導入した。

焦平面の z 方向走査を連続的に実施するために、我々は電氣的に制御可能な液体レンズ (Electrically Tunable Lens (ETL); EL-16-40-TC, Optotune) を導入した。 ETL による焦平面移動および sCMOS カメラ (ORCA Fusion BT, Hamamatsu) による画像取得を同期制御するためのプログラムを作成した。焦平面を連続的に等速で変化させながら $xy-t$ 像を取得し、 $xy-t$ 像の各フレームに対応する深度情報に基づいて 4 次元 ($xyz-t$) 像を再構成した。本システムのデモンストレーションとして、マウス脳に赤系の Ca²⁺指示薬 (Cal-590 AM) を導入し、生体脳ボリューム Ca²⁺イメージングを実施した。その結果、およそ $200 \times 200 \times 35 \mu\text{m}^3$ の観察領域について z 方向に約 9 分割された 4 次元像を取得でき、3 次元空間内における各神経細胞の位置情報および自発神経活動を 1.5 volume/sec の時間分解能で可視化することに成功した (図 1)。今後、本システムの改良により、大脳皮質第 2/3 層の全域に渡って神経細胞群の活動とその位置情報を高密度に可視化できると期待される。

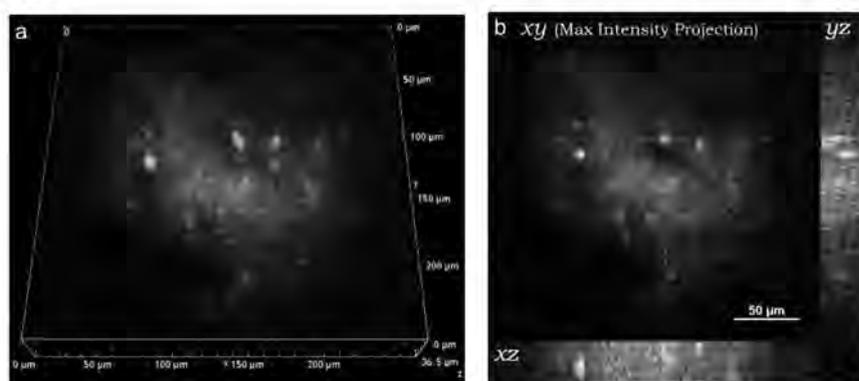


図 1 生体脳ボリューム Ca²⁺イメージング (a) 3 次元表示 (b) 2 次元表示

リピッドバブルと超音波を利用したがん組織内血管透過性促進法の開発

Enhancement of vascular permeability in tumor tissue with lipid-stabilized microbubble and ultrasound.

○鈴木 亮^{1,2}、影山彩織¹、小俣大樹¹、宗像理紗¹、丸山一雄^{1,2}

¹帝京大 薬、²帝京大 先端総研

○Ryo Suzuki^{1,2}, Saori Kageyama¹, Daiki Omata¹, Lisa Munakata¹, Kazuo Maruyama^{1,2}

¹ Faculty of Pharma-Science, Teikyo University, ² ACRO, Teikyo University

【目的】 固形腫瘍では、血管透過性の亢進とリンパ毛細管による排泄機能の欠如により、リポソームなどのナノメディシンが受動的ターゲティングでがん組織に長く滞留する Enhanced Permeability and Retention (EPR) 効果が報告されている。この EPR 効果を利用した製剤としてドキシソルビン封入リポソーム製剤 (Doxil[®]) が、カボジ肉腫や卵巣がん臨床応用されている。しかし、患者によりがん組織内の血管透過性が異なり、Doxil[®] ががん組織に送達されにくい患者も多く、十分な治療効果が得られていない。そのため、Doxil[®] を効率良くがん組織にデリバリーできる新たなドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発が必要不可欠である。これまでに我々は、微小気泡 (リピッドバブル (LB)) を全身投与し、標的組織に超音波を照射すると LB の膨張と収縮や圧壊により血管内皮細胞の間隙が開口し、血管外に様々な分子をデリバリーできることを報告してきた。そこで本研究では、この LB と超音波の併用によるデリバリー技術を利用し、がん組織内血管透過性促進に基づく、固形がん組織への新規 Doxil[®] デリバリー法の開発を行った。

【方法】 Doxil[®] デリバリー評価：マウス大腸がん細胞 (Colon-26) 担がんマウスに Doxil[®] を静脈内投与した。さらに、LB (5×10^7 個) を持続的に静脈内投与しながら、がん組織に超音波 (1 MHz, 1 W/cm², 1 分間 (Duty: 50%)) を照射した。この操作を 4 回繰り返し、一定時間後に血液を灌流し、がん組織内のドキシソルビン量を測定した。また、がん組織内への Doxil[®] の分布を評価するため、DiO 標識 Doxil[®] を投与し、上述の方法で LB 投与と超音波照射した。6 時間後、がん組織の凍結切片を作成し、がん組織内の Doxil[®] の分布を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

担がんマウスに対する抗腫瘍効果：Colon-26 担がんマウスに前項の方法で Doxil[®] 投与、LB 投与および超音波照射を行った。本治療は、Colon-26 移植 9 日後を治療開始日 (Day 0) として計 3 回 (Day 0, 2, 4) 行った。なお、抗腫瘍効果は腫瘍体積を指標に評価した。

【結果・考察】 LB と超音波の併用による Doxil[®] のがん組織移行性を検討したところ、LB と超音波の併用により、Doxil[®] 単独投与群より高いがん組織内ドキシソルビン量が認められた。次に、LB と超音波の併用による Doxil[®] のがん組織内分布を検討した。その結果、超音波非照射群において Doxil[®] はがん組織内にほとんど確認できなかった。一方、超音波照射群では、がん組織内に Doxil[®] が広がって分布していることが確認された。そこで、この Doxil[®] デリバリーによるがん治療効果を評価した。その結果、Doxil[®] 単独投与群と比較し、LB と超音波照射の併用群において、高い腫瘍増殖抑制効果が認められた。以上より、LB と超音波照射を組み合わせた血管透過性促進法は、Doxil[®] をはじめとする EPR 効果に基づく固形腫瘍組織への受動的ターゲティング型ナノメディシンの有効性を向上できる新しい DDS 戦略になるものと期待される。

免疫賦活化核酸搭載脂質ナノ粒子の抗腫瘍効果および生体内分布の検討

Assessment of anti-tumor effect and biodistribution of immunostimulatory oligodeoxynucleotide loaded lipid nanoparticles

○宗像理紗¹、小俣大樹¹、小山正平^{2,3}、岡田欣晃⁴、吉岡靖雄^{4,8}、青枝大貴⁵、鈴木 亮^{1,9}

¹帝京大 薬、²阪大院 医、³国立がん研セ 先端医療開発セ、⁴阪大院 薬、

⁵阪大微研、⁶阪大 先導、⁷阪大微研会、⁸阪大 MEI、⁹帝京大 先端総研

○Lisa Munakata¹, Daiki Omata¹, Shohei Koyama^{2,3}, Yoshiaki Okada⁴,

Yasuo Yoshioka^{4,8}, Taiki Aoshi⁵, Ryo Suzuki^{1,9}

¹ Fac. Pharm-Sci., Teikyo University, ² Grad. Sch. Med., Osaka University, ³ NCC-EPOC,

⁴ Grad. Sch. Pharm. Sci., Osaka University, ⁵ RIMD, Osaka University, ⁶ OTRI, Osaka University,

⁷ BIKEN Foundation, Osaka University, ⁸ MEI, Osaka University, ⁹ ACRO, Teikyo University

【目的】効果的ながん免疫療法を構築するためには、自然免疫と獲得免疫の両者の活性化が不可欠である。近年では、抗腫瘍免疫の誘導における自然免疫活性化が重要視されている。これまでに我々は、Toll 様受容体 9 を刺激して自然免疫を活性化する CpG 核酸 (D35) を搭載した脂質ナノ粒子 (D35LNP) を開発し、担がんマウスの腫瘍内に D35LNP を投与することで、抗腫瘍効果が得られることを見出した。しかし、腫瘍内投与によるがん治療は、がん組織の部位により患者負担が大きい。そこで本研究では、患者負担を軽減する目的で D35LNP の静脈内投与による抗腫瘍効果について検討した。さらに、静脈内投与における D35LNP の生体内分布および多くの D35LNP の分布が認められた肝臓に対する傷害性を評価した。

【方法】D35LNP は D35 水溶液と脂質エタノール溶液をマイクロ流路で混合し作製した。マウス大腸がん (MC38) 細胞を皮内移植したマウスに細胞移植後 9 日目から 1 日おきに計 5 回、D35 または D35LNP を静脈内に投与し、抗腫瘍効果を検討した。抗腫瘍効果は、腫瘍体積を指標に評価した。また、DiR で蛍光修飾した D35LNP を担がんマウスに静脈内投与し、投与 6 時間後の DiR の生体内分布を *in vivo* imaging system (IVIS) で評価した。さらに、正常マウスに D35LNP を 1 日おきに計 5 回、静脈内投与し、血中 AST・ALT の測定および肝組織 (HE 染色) の検鏡にて肝傷害性を評価した。

【結果・考察】D35 単独投与群では、腫瘍の増殖抑制効果が認められなかった。一方、D35LNP 投与群では、有意な腫瘍の増殖抑制効果が認められた。このことから、D35LNP の静脈内投与においても効果的な抗腫瘍免疫による抗腫瘍効果が得られたものと考えられた。次に DiR 修飾 D35LNP の組織分布を評価したところ、D35LNP は肝臓や脾臓、肺で高い蛍光が確認され、D35LNP がこれらの臓器に多く集積することが明らかとなった。特に、肝臓への集積が最も高かったため、D35LNP の肝傷害性を評価した。その結果、D35LNP 投与による血中 AST・ALT の上昇は認められず、肝組織の検鏡においても著しい傷害は認められなかった。以上より、D35LNP は、静脈内投与において安全性および有効性の高いがん免疫療法剤となることが期待される。

【謝辞】本研究の一部は、AMED 次世代がん医療創生研究事業、JSPS 科研費 (JP20K22505)、帝京大学先端総研インキュベーション助成金によるものである。

高速原子間力顕微鏡を用いた糖転移酵素の分子構造動態解析

Dynamical structural analyses of glycosyltransferases using high-speed atomic force microscope

○矢木宏和¹、渡辺大輝²、Ganser Christian²、金 明美¹、吉田早希¹、佐藤匡史¹、
梅澤芙美子^{1,2}、柚木康弘³、守島 健³、杉山正明³、内橋貴之^{2,4}、加藤晃一^{1,2}

¹名古屋市立大学薬学部/大学院薬学研究科、²自然科学研究機構生命創成探究センター、
³京都大学複合原子力科学研究所、⁴名古屋大学大学院理学研究科

○Hirokazu Yagi¹, Hiroki Watanabe², Ganser Christian², Akemi Kim¹, Saki Yoshida¹, Tadashi Sato¹,
Fumiko Umezawa^{1,2}, Yasuhiro Yunoki³, Ken Morishima³, Masaaki Sugiyama³, Takayuki Uchihashi^{2,4}, and
Koichi Kato^{1,2}

¹Faculty and Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, ²Exploratory
Research Center on Life and Living Systems, National Institutes of Natural Sciences,

³Institute for Integrated Radiation Nuclear Science, Kyoto University,

⁴Faculty of Science, Nagoya University,

糖鎖はタンパク質や脂質を修飾し、様々な生命機能を制御している。糖鎖はゲノム情報による直接制を受けておらず、その生合成を担っているのが糖転移酵素である。例えば、ヒトでは 200 種類近くの糖転移酵素が同定されているが、その多くが単一の触媒ドメインを有する 2 型膜タンパク質である。これらの酵素が合成する糖鎖の種類に応じて特異な酵素複合体を形成し、効率の良い糖鎖合成を担っていることが考えられている。一方で、2 糖の繰り返し構造を伸長する糖転移酵素の中には 2 種類の糖転移活性部位を有する“バイファンクショナル”な酵素が存在するが、こうした酵素による糖鎖形成の詳細なメカニズムは明らかではない。

高速原子間力顕微鏡 (AFM) はタンパク質のダイナミクスを溶液環境下で可視化できる手法である。本研究では特に、①N-アセチルガラクトサミンおよびグルクロン酸を交互に糖転移することによりコンドロイチンを合成する大腸菌酵素 K4CP、および②細胞接着を担うラミニン結合性糖鎖の形成を司る LARGE および POMGNT2 に着目して、高速 AFM を利用した動的構造解析を行った。

本発表では、こうした高速 AFM による動的な構造解析に加えて、X 線溶液散乱、結晶構造解析、超遠心分析の結果を合わせて、それぞれの糖転移酵素の動態に基づいた糖鎖の伸長メカニズムを議論する。

物理化学的手法と分子動力学シミュレーションによるアガリクス由来βグルカンの立
体構造観測

**Three-dimensional structure observation of β glucan derived from *Agaricus brasiliensis*
by Physicochemical method and molecular dynamics simulation**

○松村義隆¹、井上広大¹、墨野倉誠¹、久保美香子¹、出村茉莉子¹、市岡隆幸¹、森本康幹¹、
田代充²、石橋健一³、大野尚仁³、小島正樹¹

¹東薬大・生命、²明星大・理工、³東薬大・薬

○Yoshitaka Matsumura¹, Kodai, Inoue¹, Makoto Suminokura¹, Mikako Kubo¹, Mariko Demura¹,
Takayuki Ichioka¹, Yasumasa Morimoto¹, Mitsuru Tashiro², Ken-ichi Ishibashi³, Naohito Ohno³,
Masaki Kojima¹

¹ School of Life Sciences, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

² Department of Interdisciplinary Science and Engineering, School of Science and Engineering,
Meisei University

³ School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

アガリクス由来βグルカンは抗腫瘍効果や免疫賦活作用があることが知られている。他にも複数の機能を持ち、様々なアプローチによりその多様な作用が研究されている。しかしながら、βグルカンは水に溶けにくく揺らぎも大きいため結晶化が困難であることから、その立体構造の観測についてはあまり研究がなされていない。そこで我々は、X線小角溶液散乱などの複数の物理化学的手法を用いてアガリクス由来βグルカンの天然立体構造観測を試みてきた。その結果、X線小角溶液散乱では多分散ではあったが少なくとも2つ以上の主成分があり球状の形であること、3量体もしくは3量体と単量体の混在である可能性が示された。そして、その中でも分子量の比較的小さい方の成分は原子間力顕微鏡で観測されたものと矛盾がないことも分かった。今回はさらに固体NMRでも観測を試みた。その結果、ここでも単量体と3量体の混在の可能性が示唆された。実験で得られた構造情報をもとに分子動力学シミュレーションを行い、決定した代表構造を決定した。これらの観測結果をポスター講演にて紹介したい。

遊離脂肪酸が膵臓β細胞のミトコンドリア膜電位に与える影響
～トランス脂肪酸の影響～

**Effects of a trans fatty acid, elaidic acid,
on mitochondrial membrane potential of INS-1 β-cells.**

齋藤喜久恵¹、○鈴木真理子²、永田莉子¹、川久保愛美²、田中直子^{1,2}

¹ 大妻女子大 家政、² 大妻女子大・院 人間文化研究

Kikue Saito¹, ○Mariko Suzuki², Riko Nagata¹, Megumi Kawakubo², Naoko Iida-Tanaka^{1,2}

¹ Home Economics, Otsuma Women's University

² Graduate School of Studies in Human Culture Studies, Otsuma Women's University

【目的】2型糖尿病の発症・憎悪の主要因の一つとして、血中脂肪酸濃度の上昇に伴い、インスリン分泌低下や細胞死など膵臓β細胞に悪影響を及ぼす「脂肪毒性」が挙げられる。飽和脂肪酸の毒性の高さは既に知られているが、脂肪酸の種類ごとの作用機序や内容の違いはあまり知られていない。一方、トランス脂肪酸が健康に及ぼす悪影響は世界的に問題視されており、LDL-コレステロール値の上昇、炎症性サイトカイン産生量の上昇を引き起こし、動脈硬化やインスリン抵抗性を増大させることが知られているが、膵臓β細胞への影響については報告が少ない。昨年度の学術集会で、飽和脂肪酸であるパルミチン酸は小胞体ストレスを喚起する一方、一価の不飽和脂肪酸であるオレイン酸は、膵臓β細胞の酸化ストレス関連のタンパク質発現量を増加させ、ミトコンドリア ATP 合成およびグルコース添加後のミトコンドリア膜電位変化にも影響を与えることを報告した。本研究では、オレイン酸のトランス型異性体であるエライジン酸に着目し、その構造の違いがミトコンドリア膜電位および酸化ストレスに与える影響を観察したので報告する。

【方法】脂肪酸として、一価不飽和脂肪酸であるオレイン酸(OA)、OA のトランス型異性体であるエライジン酸(EA)の2種類を比較対象とした。ラット膵臓β細胞由来の INS-1 細胞を用い、OA、EA をそれぞれ 200 μM になるように 0.8%BSA を含む培地に添加し 6 日間培養、グルコース刺激後のミトコンドリア膜電位の観察と活性酸素の測定を行った。膜電位の蛍光観察には TMRE、酸化ストレスの観察には CellROX を用いた。

【結果・考察】未処理の INS-1 細胞では、グルコース添加後に一時的なミトコンドリア膜電位の過分極とその後の緩やかな下降が観察されたが、OA で 6 日間処理した細胞では、グルコース添加後の膜電位の上昇率が高く、その後もグルコース添加前より高い膜電位が 30 分後まで維持される傾向が見られ、ミトコンドリアでの活性酸素産生が高まっている可能性が示唆された。一方、EA 処理細胞では、グルコース添加 10 分後までは未処理の INS-1 と同様の膜電位変化が観察されたが、10 分後以降は下がらずに高めの膜電位が維持された。さらに蛍光色素 CellROX を用いてグルコース添加後のミトコンドリア酸化ストレスのイメージングを試みた。

大麦粉の腸内発酵による短鎖脂肪酸の増加は、L 細胞に発現する GPR43 を介して
GLP-1 分泌、細胞内 Ca^{2+} 放出量を増加させる

An increase in short-chain fatty acids by colonic fermentation of barley flour affects
GLP-1 secretion and intracellular Ca^{2+} dynamics via GPR43 expressed on L cells

○三尾 建斗¹、田中 直子^{1,2}、青江 誠一郎^{1,2}

¹大妻女子大・院 人間文化研究 ²大妻女子大 家政、

Kento Mio¹, Naoko Iida-Tanaka^{1,2}, Seiichiro Aoe^{1,2}

¹Graduate School of Studies in Human Culture Studies, Otsuma Women's University

²Faculty of Home Economics, Otsuma Women's University

【目的】大麦は水溶性食物繊維を多く含む穀物であり、その生理機能の一つに腸内発酵作用がある。我々は以前に大麦粉を含む飼料をマウスに摂取させると、耐糖能改善作用を示すと共に、盲腸で短鎖脂肪酸（SCFAs）が増加する事を明らかにした^{(1), (2)}。酢酸、プロピオン酸、酪酸などの SCFAs は、消化管内 L 細胞に存在する短鎖脂肪酸受容体 GPR43 を介してインクレチンホルモンである GLP-1 の分泌を促す事で、糖代謝の改善に寄与することが知られている。これらの事から大麦の上記作用には SCFAs の増加による GPR43 シグナルを介した効果が期待されるが、これまで評価した報告は少なく、その作用機構は不明である。そこで本研究では大麦を摂取したマウスの消化管内容物を採取し、マウス L 細胞由来株である GLUTag 細胞を用いて、大麦の摂取により変動する腸内代謝産物が GLP-1 分泌に及ぼす影響を検討した。

【方法】マウスに 5% の食物繊維量となるようにセルロース（HC）あるいは大麦粉（HB）を配合した高脂肪食を 12 週間与え、飼育終了後盲腸内容物を採取し、SCFAs を測定した。GLUTag 細胞はトロント大学 Dr. D Drucker より供与されたものを用い、盲腸内容物は 1/100 容で細胞に加えた。GLP-1 含量は盲腸内容物添加 2 時間後に上清を回収し ELISA 法にて測定した。L 細胞分化に関わる mRNA の発現は、添加 12 時間後に Real-time PCR で定量した。盲腸内容物添加後の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化は fluo-4 を用いて蛍光観察した。加えて siRNA トランスフェクションにより GPR43 を特異的にノックダウンした細胞を用いて、同様の指標を測定した。

【結果及び考察】HB 群のマウスは HC 群と比較して盲腸中の酢酸、総 SCFAs 含量が有意に増加した。HB 群の盲腸内容物で処理した GLUTag 細胞では、HC 群で処理した細胞と比べて GLP-1 分泌量および、GLP-1 産生の律速酵素である PC1/3 の mRNA 発現量が有意に増加しており、HB 群のマウス盲腸内容物中の成分が GLP-1 産生及び分泌を促進していると考えられた。GLUTag 細胞に HB 群の盲腸内容物を添加した際の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化は HC 群の盲腸内容物を添加した場合と比べると大きく、 Δ AUC は有意に大きかった。また、これらの効果は短鎖脂肪酸受容体 GPR43 ノックダウン細胞では確認されなかった。以上のことから、大麦の摂取による糖代謝の改善作用は腸内代謝産物の増加による GPR43 を介した GLP-1 分泌量の亢進が寄与していると推測した。

1) Mio et al., *Cereal Chemistry* 97(1) (2020).

2) Mio et al., *Nutrients* 12(11):3546, (2020).

メラノソーム分解の可視化システム Visualization of Melanosome Degradation

○川口馨加¹、渡辺実夢¹、古川紗帆²、竹森洋^{1,2}、平田洋子^{1,2}、古田享史^{1,2}

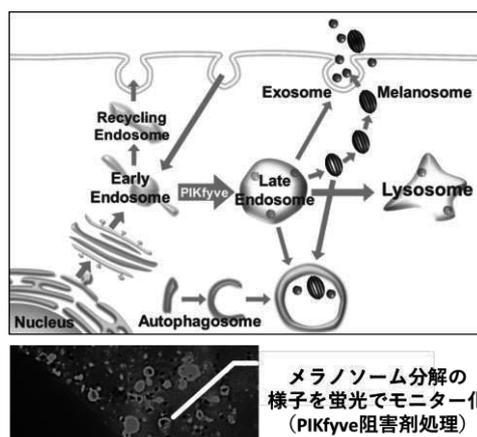
¹岐阜大・院 自然科学技術、²岐阜大 工

○Kyoka Kawaguchi¹, Miyu Watanebe¹, Saho Furukawa², Hiroshi Takemori^{1,2}, Yoko Hirata^{1,2},
Kyoji Furuta^{1,2}

¹ Graduate School of Natural Science Technology Research, Gifu University

² Faculty of Engineering, Gifu University

【背景】メラニン、紫外線から肌を守るために重要な役割を果たしている。しかし、メラニンが過剰に生成されると、色素沈着やそばかすを引き起こし、肌トラブルとして認識される。当研究グループは、化合物ライブラリーからメラニン合成抑制剤の探索を行ってきた。その作用機序を解明するため、メラニン合成抑制能を持つ化合物を蛍光化したところ、細胞内の小胞（エンドソーム・リソソーム）を可視化できることを見出した。



【結果】はじめに、本新規蛍光化合物で染色される標的を、各種小胞マーカーとして蛍光タンパク質 mCherry を利用して絞り込んだ。その結果、Rab7 や CD63 等の小胞輸送関連タンパク質と共局在し、多小胞体 (MVB: multivesicular bodies) -リソソーム系列の細胞内小胞特異性が判明した。メラノソームの形成もこの多小胞体経路に依存することから、化合物の誘導体がメラニン合成抑制として働くことが説明できる。一方、メラニン合成抑制を示さない類似の化合物は、蛍光による粒の見え方が異なることも判明した。これらの結果より、メラニンの合成抑制と蛍光による粒の形成には相関があると考えられる。

続いて、PIKfyve 酵素（ホスファチジルイノシトール 3,5 2-リン酸化酵素）の阻害剤は細胞内小胞の形成を抑制し、メラニン合成を抑制することが報告されている。本新規蛍光化合物の染色状態も、PIKfyve 阻害剤で蛍光強度と質が変化し、メラノソームがオートファゴソームに包まれる像が観察された。同一の作用を持つ生薬を評価したところ、アケビエキスが類似する染色像を示した。これより本化合物は、メラノソーム分解能の評価に利用できる可能性を有すると結論した。

さらに、検討過程で本新規蛍光化合物がエクソソーム関連小胞を染色することが示唆されたため、精製エクソソームを染色したところ、牛ミルク及び米糠エクソソームを染色でき、牛乳や野菜ジュースと反応する結果を得た。

【結論】本新規蛍光化合物はエンドソームやリソソームへの細胞内小胞特異性を持ち、メラノソーム分解の可視化システムに利用できる。また本化合物は添加するのみで観察可能であり、新たな脂質小胞解析法としての利用が期待される。

MitoMM2 によるマイトファジー検出法の開発 Development of mitophagy detection method by MitoMM2

○前田美和¹、鈴木麻由¹、今石潤²、竹森洋^{1,2}

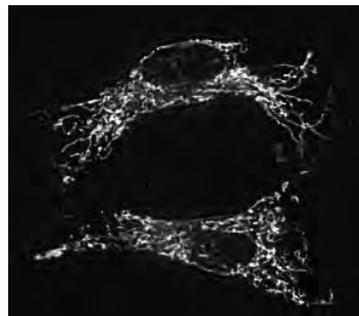
¹岐阜大・院 自然科学、²岐阜大 化学生命

○Miwa Maeda¹, Mayu Suzuki¹, Jun Imaishi², Hiroshi Takemori^{1,2}

¹ Graduate School of Natural Science and Technology, Gifu University

² Department of Chemistry and Biomolecular Science, Faculty of Engineering, Gifu University

ミトコンドリアは真核生物の細胞小器官であり、ATP の産生やアポトーシスに重要な役割を果たしている。ミトコンドリアの機能不全は脳卒中やアルツハイマー病など様々な疾患の原因となる。ミトコンドリアを蛍光染色する試薬は数多く市販されており、MitoTracker[®]や rhodamine 123 などが一般的に用いられる。しかし、市販されている試薬にはいくつかの欠点を持ち、蛍光の不安定さや広い発光スペクトル、また高濃度界面活性剤での洗いが出来ないなど、考慮しなければならない点がある。



今回、新規のミトコンドリア染色蛍光剤となる MitoMM1/2 を開発したので報告する。使用方法は従来試薬と同様に、培養液に添加するだけと簡単でありライブイメージングを可能とする。MitoMM1/2 の励起および蛍光波長は MitoTracker[®]Red と同様で TRITC フィルターを利用し、緑色の蛍光にオーバーラップしない特性から、FITC や Alexa Fluor[®]488 等との二重染色が可能である。ミトコンドリア局在は従来試薬と同様に膜電位依存的であり、脱共役剤である FCCP 処理で局在が消失する。一方、細胞固定化後に高濃度界面活性剤処理に耐性である点で、抗体染色による二重染色が容易である。その点で MitoMM1/2 は従来ミトコンドリアライブイメージング剤と比べより使用しやすい試薬であると考えている。

今回、免疫蛍光法による二重染色や GFP タグ付きタンパク質を用いたライブイメージングで、MitoMM1/2 がマイトファジーの検出試薬として利用できることを確認した。培養細胞を飢餓状態で培養すると、MitoMM2 が CD63 (エンドソーム・ライソソームマーカー) やオートファジーマーカーである LC3 タンパクとの局在が重なる結果が得られた。同様なマイトファジーのライブ検出は、別のエンドソーム・ライソソーム染色剤 (GIF) と MitoMM1/2 でも観察された。

これらの特徴は MitoMM1/2 の構造内に存在するイソシアネートによる標的タンパク質中のアミンとの共有結合により、マイトファジー誘導後も分解が遅れ、オートファゴソーム小胞内へ MitoMM1/2 が止まることによると考える。

ATX-II は $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構の逆方向回転モードの活性化を介して
 肺静脈心筋細胞の細胞内 Na^+ 及び Ca^{2+} 濃度を上昇させる
**ATX-II increases intracellular Na^+ and Ca^{2+} concentration in pulmonary vein
 cardiomyocytes by activating reverse-mode $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger**

○斎藤太郎、大場亜衣子、高野裕大、濱口正悟、行方衣由紀、田中光
 東邦大 薬 薬物

○Taro Saito, Aiko Ohba, Yuta Takano, Shogo Hamaguchi, Iyuki Namekata, Hikaru Tanaka
 Dept. Pharmacol., Toho Univ. Fclt. Pharmaceut. Sci.

背景・目的：肺静脈は肺から左心房に血液を送る血管であるが、その管壁には心筋層が存在している。この肺静脈心筋は潜在的に自動能を有しており、電気的自発活動が心房に伝わると心房細動などの不整脈の原因となることが示唆されている。我々は以前に Na^+ 電流の持続性成分 (Late I_{Na}) を増大させる ATX-II が肺静脈心筋での自発活動を誘発させることを明らかにした。また、BAPTA の前処置による細胞内 Ca^{2+} のキレートが、ATX-II の誘発する自発活動を抑制するという示唆も得ている。そこで本研究では Late I_{Na} 活性化による肺静脈心筋細胞の電気的異常興奮にイオン環境がどのように関与するのかを高速共焦点レーザー顕微鏡及び蛍光顕微鏡を用いて検討した。

方法：体重 290-550 g の Hartley 系雄性のモルモットを使用してランゲンドルフ灌流心を作成し、冠動脈から Collagenase 及び Protease を灌流して肺静脈心筋細胞を単離した。単離肺静脈心筋細胞に Fluo-4/AM 5 μM を取り込ませ、高速スキャン型共焦点顕微鏡 (Nikon 社、A1R) を用いて画像を取得し、細胞内 Ca^{2+} 動態を観察した。細胞内の Na^+ 濃度の定量については SBFI/AM 10 μM を単離肺静脈心筋細胞に取り込ませ、落射蛍光顕微鏡 (浜松ホトニクス社、AQUACOSMOS) を用いて観察した。 Na^+ と Ca^{2+} の同時測定では SBFI/AM 10 μM と Fluo-4/AM 5 μM を細胞に導入し、落射蛍光顕微鏡 (Zeiss 社、Axio Observer.Z1) により観察を行った。

結果・考察：ATX-II 処置により細胞内 Na^+ 濃度が約 5.7 mM 上昇し、それに続いて Ca^{2+} 濃度が上昇した。また、ATX-II を処置することで細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇及び Ca^{2+} transient や Ca^{2+} wave 等の自発的 Ca^{2+} oscillation の増加が認められた。それらの増加は $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構の阻害薬である SEA0400 の前処置によって有意に抑制された。

これらの結果より、ATX-II の処置は細胞内 Na^+ 濃度を上昇させ $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構の逆方向回転モード (Na^+ を細胞外へ排出し Ca^{2+} を細胞内に汲み入れる) を活性化し、それに伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度の間接的な上昇を介して自発活動を引き起こすことが示唆された。

したがって、Late I_{Na} や $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構の研究は肺静脈心筋をターゲットとした新規心房細動治療薬の開発につながり得るものと思われる。

試料表面の屈折率差が近赤外蛍光 CT に及ぼす影響
**Effect of Refractive Index Difference at Sample Surface
 to Near-Infrared Fluorescence Tomography**

○竹松 真歩¹、梅澤 雅和¹、世良 俊博²、横田 秀夫³、大久保 喬平¹、上村 真生¹、曾我 公平¹

¹東京理大・先進工・マテ工、²九大・工・機械工、²理研・光量子・画像情報処理

○Maho Takematsu¹, Masakazu Umezawa¹, Toshihiro Sera², Hideo Yokota³,

Kyohei Okubo¹, Masao Kamimura¹, Kohei Soga¹

¹Dep. Mater. Sci. Technol., Tokyo Univ. Sci., ²Dep. Mechan. Eng., Fac. Eng., Kyusyu Univ.,

³RIKEN Cent. Adv. Photonics Image Processing Res. Team

波長 1000 nm を超える近赤外光は生体深部の観察を可能にすることから、複数の角度から撮像した投影像を再構成することにより試料内部の断層画像を得ることができる¹⁾。しかし、可視及び近赤外光を用いたイメージングでは X 線 CT と異なり、試料表面の屈折率 (RI: Refractive Index) の差が問題となる。先行研究では、試料内部での光の吸収や散乱が蛍光 CT の結果に及ぼす影響が検証されてきた^{2) 3)}。しかし、試料表面の RI 差による蛍光の屈折が及ぼす影響については検証されていない。本研究では試料内部の蛍光体の位置を断層画像上に輝度最大の画素として描出することを蛍光 CT の目的と定め、これを可能にする試料の浸漬条件の検討を行った。試料表面の RI 差が蛍光 CT の結果に及ぼす影響について、試料を RI の近い液体に浸漬することで試料内部の蛍光が正しい位置に再構成された例を、今年の当学会学術集會にて報告した。しかし、どれほどの RI 差であれば位置推定が可能であるかという結論の一般化には至っていなかった。

本研究では、断層画像上での蛍光体の位置推定が可能となる試料表面の RI 差がどの範囲であるかを検証することを目的とした。そのために、点蛍光体を配置した正方形断面の試料を想定し、人工的に作成した 2 次元画像を CT 再構成することで、試料表面の RI 差による断層画像の乱れを定量評価した。

試料表面の RI 差が大きいとき、断層画像上で蛍光体の位置として描出された輝度最大の画素は、実際の蛍光体の位置からずれた (Fig. 1)。この蛍光体推定位置は、試料表面の RI 差と試料内部での蛍光体の深さに依存していた。また位置推定可能な RI 比の許容範囲は、蛍光体が浅い位置にある場合が最も広く、RI 比が 0.97-1.03 のとき、蛍光体がどの位置であっても位置推定が可能であった (Fig. 2)。本研究の成果は、近赤外蛍光 CT を用いた蛍光体の 3 次元位置情報取得のための実験条件の設定に役立つと期待される。

Reference: 1) M. Umezawa, *et al.*, *J. Biophotonics*, **13** (2020) e202000071; 2) W. C. Barber *et al.*, *Technol. Cancer. Res. Treat.*, **9** (2010) 45; 3) V. Ntziachristos *et al.*, *Nat. Biotechnol.* **23** (2005) 313.

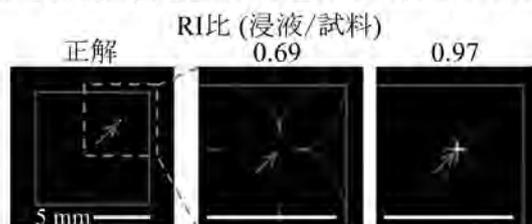


Fig. 1 異なる試料表面の RI 比を想定した断層画像 (実線: 試料輪郭、矢印: 蛍光体の正解位置)

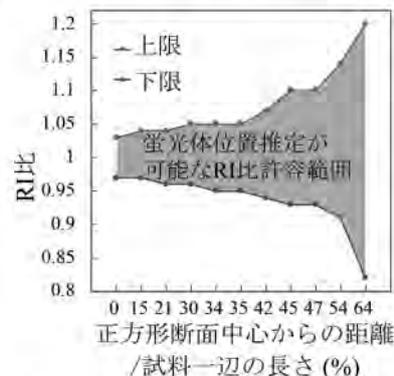


Fig. 2 想定した正方形断面试料中の蛍光体の位置と位置推定が可能な RI 比の許容範囲の関係

疎水性高分子の立体構造が OTN 近赤外蛍光色素の内包特性に及ぼす影響
**Effect of Molecular Structure of Hydrophobic Polymers
 on the Loading Properties of a Near-Infrared Fluorescent Dye, IR-1061**

○市橋 理江¹、梅澤 雅和¹、植屋 佑一²、高本 英司²、

大久保 喬平¹、上村 真生¹、曾我 公平¹

¹東京理大・先進工・マテ工、²JSR 株式会社・筑波研究所

○Kotoe Ichihashi¹, Masakazu Umezawa¹, Yuichi Ueya², Eiji Takamoto²,

Kyohei Okubo¹, Masao Kamimura¹, Kohei Soga¹

¹Dep. Mater. Sci. Technol., Tokyo Univ. Sci., ²Tsukuba Res. Lab., JSR Co.

高分子にポリマー色素を内包した蛍光プローブは、生体毒性が低く様々なバイオイメージング分野への応用が期待されている。特に有機蛍光色素 IR-1061 は、生体組織による散乱や吸収が少ない近赤外光を生じ生体深部の現象の観察を可能にするが、蛍光性を維持するためには OH⁻の影響を回避する必要がある。これまでに、様々な化学組成のポリマーを疎水性コアに持つポリマーナノ粒子の疎水性コア領域に IR-1061 を導入する例が報告されており¹⁻⁴、コアポリマーの候補としてポリ乳酸が見出されている。ポリ乳酸には、L 体のみで構成される poly(L-lactide) (PLLA) と D, L 体の混合物から成る poly(D,L-lactide) (PDLLA) があり、両者は分子間に働く水素結合の強さが異なると報告されている⁵。その極性や構造の相違から、IR-1061 との親和性やポリマーミセル中の IR-1061 の安定性が光学異性体によって異なることが予測される。本研究は、ポリ乳酸の立体構造の違いによる IR-1061 の内包特性の変化を検証することを目的とした。

まず調製したポリ乳酸の薄膜を用いて、色素-ポリ乳酸間の親和性の違いを評価した。IR-1061 の 2 量体 (dimer: D) のピーク面積に対する単量体 (monomer: M) のピーク面積の比 (M/D 比) は、PLLA 中での 0.74 に対して PDLLA 中では 0.82 と大きな値を示したことから、PDLLA の方が IR-1061 との親和性が高いと考えられる。次に、PDLLA および PLLA を疎水コアに持つポリマーミセル (シェル: PEG) 中の IR-1061 の安定性を評価すると、PBS に分散させた PDLLA 中の IR-1061 は PLLA 中のものより蛍光強度がミセル作製直後から減少した。PDLLA は PLLA より

も結晶性が低く堅牢性が低いために、PDLLA 中で IR-1061 は、分散媒環境の影響を受けやすかったと考えられる。以上の結果から、蛍光強度を長時間維持するプローブを作製するためには、色素との親和性が高いだけでなく、堅牢性の高い疎水鎖を選択する必要があることが示唆された (Fig. 1)。

References: 1) Z. Tao *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **52** (2013) 13002; 2) M. Kamimura *et al.*, *Polym. J.*, **49** (2017) 799; 3) M. Umezawa *et al.*, *Anal. Sci.*, **37** (2021) 485; 4) Y. Ueya *et al.*, *RSC Adv.*, **11** (2021) 18930; 5) M. Rissanen *et al.*, *J. Appl. Polym. Sci.*, **110** (2008) 2399.

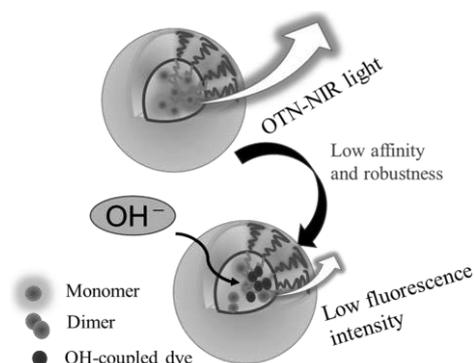


Fig. 1 ポリ乳酸の色素親和性と堅牢性が与える色素の光学特性への影響

ライブセルイメージングを用いたレーザー光毒性の波長依存性

Wavelength dependence of phototoxicity caused by irradiation of laser light using live-cell imaging

*山口樹也¹, 大坂昇¹, 松山哲也¹, 和田健司¹, 岡本晃一¹, 川喜多愛², 村田香織², 杉本憲治²

¹大阪府立大学工学研究科, ²大阪府立大学生命環境科学研究科

*Mikiya Yamaguchi¹, Noboru Osaka¹, Tetsuya Matsuyama¹, Kenji Wada¹, Koichi Okamoto¹, Ai Kawakita², Kaori Murata², Kenji Sugimoto²

¹ Graduate School of Engineering, Osaka Prefecture University

² Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University

1. はじめに

我々は、ライブセルイメージング技術を用いて、短波長可視光が生細胞に与える影響について研究を進めてきた。これまでにレーザー光照射後の細胞の動態を観察することにより、光毒性の照射部位、細胞周期依存性を示してきた。今回は、375 nm 及び 405 nm の 2 波長のレーザー光を細胞に照射し、DNA 修復の補助の働きを持つタンパク質である PCNA(増殖細胞核抗原)および、細胞核の動態を観察することにより光毒性の波長依存性を検証した。

2. 実験系

蛍光顕微鏡の光学系を Fig. 1 に示す。励起フィルターを用いて、白色 LED 光から蛍光タンパク質の励起に適した波長の光を切り出し、ダイクロイックミラーにより反射した後、対物レンズ($\times 60$)で集光してシャーレ内の悪性黒色腫由来細胞に照射した。生細胞は細胞核を mPlum-histoneH3 で、PCNA を EGFP で可視化している。生細胞からの蛍光は対物レンズ、ダイクロイックミラーを通過し、蛍光フィルターで励起光と分離した後、レンズで集光して EMCCD カメラで観察した。また、側方に配置した半導体レーザー(375 nm, 405 nm) の出力光をダイクロイックミラーにより合波し、LED 照射系に挿入したカバーガラスで反射させ($\sim 3\%$)、生細胞の特定部位に集光照射した。

3. 実験結果

S 期にある生細胞の細胞核中心に対して、波長 375, 405 nm のレーザー光を強度 1.5 ~ 4.5 μW で 1 分間照射し、その後 10 分間にわたり PCNA の動態を観察した。非照射部の輝度を基準として照射部の輝度変化を調べ、PCNA の集積度を評価した。PCNA は DNA 修復の補助の働きを持つタンパク質であるため、その集積度は DNA 損傷度を反映していると考えられる。Fig. 2 に輝度比の最大値の照射強度依存性を示す。波長 375 nm のレーザー光照射時は、強度にかかわらず輝度比の最大値はほぼ一定であったのに対し、波長 405 nm のレーザー光照射時は、照射強度とともに輝度比の最大値が増加している。また、輝度比の最大値は、照射強度が 1.5 μW の場合は 375 nm の方が大きく、3.0 μW で同程度、4.5 μW では 405 nm の方が大きい結果になっている。このような照射強度依存性の違いから、波長 375 nm, 405 nm のレーザー光照射で別の光吸収物質により DNA 損傷が起きている可能性があると考えられる。レーザー光照射後の 24 時間細胞生存率に関しては当日報告する予定である。

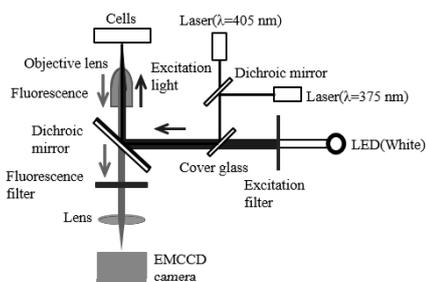


Fig. 1 Configuration of fluorescent microscope

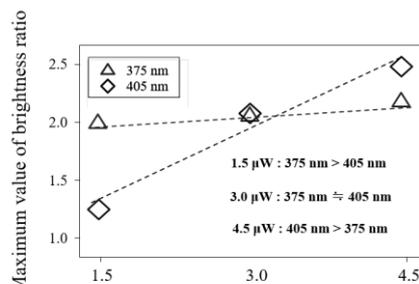


Fig. 2 Maximum value of Brightness ratio after laser irradiation

赤色 FRET 型 ATP プローブの開発とエネルギー代謝の Dual-FRET イメージング Development of red-shifted ATP probe and application to Dual-FRET imaging

○新藤豊¹、衛澤峰^{1,2}、堀田耕司¹、岡浩太郎^{1,2,3}

¹慶大 理工、²早大 理工、³高雄医大 医学

○Yutaka Shindo¹, Zefeng Wei¹, Kohji Hotta¹, Kotaro Oka^{1,2,3}

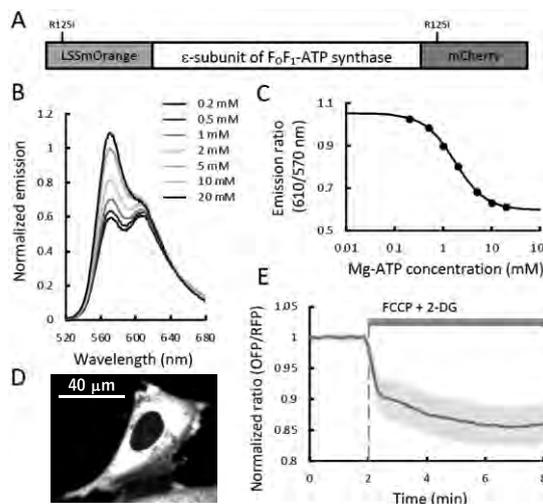
¹ Faculty of Science and Technology, Keio University

² Waseda Research Institute for Science and Engineering, Waseda University

³ College of Medicine, Kaohsiung Medical University

ATP は細胞内エネルギー通貨として働く重要な分子である。細胞内の ATP は主に解糖系およびミトコンドリアでの酸化的リン酸化により産生され、その濃度は通常、厳密にコントロールされている。一方で、細胞分裂時や細胞周辺部の仮足等のエネルギー要求性が高い部位では、ATP 濃度は時空間的に変動する。また、がん細胞での解糖系の亢進による ATP 産生の増加や、神経変性疾患による神経細胞死におけるミトコンドリア機能不全による ATP 枯渇など、細胞内 ATP 濃度の異常は病態とも深く関連付けられている。さらに、最近になって ATP がシグナル分子として働くとの報告もある。このように ATP 濃度の変動は細胞内での様々なイベントにかかわっており、生理状態を反映する様々なシグナルや細胞動態との同時測定が可能になれば、それらの間の関係性がより詳細に解明できるのではないかと期待される。

細胞内 ATP 濃度変化の時空間的な解析に蛍光イメージングは有用であり、これまでにいくつかの遺伝子コード型 ATP プローブが開発されてきた。中でも ATeam に代表されるレシオメトリックタイプのプローブは、細胞の動きや形態変化の影響を受けにくく、細胞辺縁部や動くオルガネラなどでも正確な ATP 測定が期待できる。しかし、CFP-YFP 間の FRET を用いた他の遺伝子コード型プローブとの併用が容易なものはこれまでに報告されていない。本研究では、ATeam の CFP-YFP を橙色—赤色蛍光タンパク質に置き換えることで、レシオメトリックタイプの Red-ATeam を開発した (図 A, B)。Red-ATeam の応答濃度範囲は一般的なほ乳類細胞内の ATP 濃度に良く対応していた (図 C)。これを HeLa 細胞に発現させて、ミトコンドリアおよび解糖系を FCCP と 2DG により阻害したところ、急激な ATP 濃度減少が観察できたことから、細胞内で機能するプローブの開発に成功したと判断した (図 D, E)。また、遺伝子コード型ピルビン酸プローブである Pylonic と同時に HeLa 細胞に同時発現させることで、細胞内の ATP およびピルビン酸の濃度変化を同時に測定することにも成功した。これは、Red-ATeam が既存の CFP-YFP FRET を用いたプローブとの同時使用が可能であり、ATP 濃度変化と細胞内のイベントとの関連性を調べるうえで有用なツールになり得ることを示している。



開発した Red-ATeam の構成と応答性

自発的 Ca^{2+} transient の発生における $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger の役割

—モルモット洞房結節細胞での検討—

Role of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in the generation of spontaneous Ca^{2+} transient in guinea pig sinoatrial node cells

○尾高 椋介、濱口 正悟、行方 衣由紀、田中 光

東邦大 薬 薬物学

○Ryosuke Odaka, Shogo Hamaguchi, Iyuki Namekata, Hikaru Tanaka

Dept. Pharmacol., Toho Univ. Fclt. Pharmaceut. Sci.

心臓の洞房結節で発生する自発的な電気活動は規則正しい拍動の源である。その本質は緩やかな脱分極である歩調取り電位であり、細胞膜上のイオンチャンネルに依存した膜電位変化によって形成されると考えられる。近年細胞内 Ca^{2+} が $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) を介して自発活動を調整している可能性 (Ca^{2+} clock 説) が提唱されており、議論を呼んでいる。NCX は Na^+ と Ca^{2+} を 3:1 で交換輸送するため起電性を有するトランスポーターであり、 Ca^{2+} 排出に伴う交換輸送により膜電位を脱分極させる要因の一つとなる可能性がある。本研究ではモルモット洞房結節細胞において NCX による脱分極電流が自発活動に寄与しているのか否か、高速スキャン型共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光イメージング法と薬理的な手法により検討した。

モルモット洞房結節細胞で NCX の発現や局在を検討するために間接法による免疫蛍光染色を行った。NCX1 抗体によって細胞膜上に染色されたことから、NCX1 が洞房結節細胞膜上に満遍なく発現していることが確認できた。

NCX が Ca^{2+} 動態と自発活動に及ぼす影響を薬理的に評価するため、モルモット洞房結節細胞に Ca^{2+} indicator の Fluo-4 を導入して高速 Ca^{2+} イメージングを適用し、自発的な電気活動を一過性の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇である Ca^{2+} transient として捉えた。洞房結節細胞で細胞外液を正常栄養液から low Na^+ 液に置換し NCX の活性を抑制したところ、自発的な Ca^{2+} transient の basal 蛍光強度は上昇するが、頻度への影響は小さい細胞が観察された。low Na^+ 液で basal 蛍光強度が上昇したことから NCX は細胞内 Ca^{2+} の排出に機能していることが確認された。その一方で自発活動の頻度への影響は少ないことが示唆された。歩調取り電位に対する low Na^+ 液の影響をガラス微小電極法で直接確認したところ、変化はみられなかった。

さらに NCX の阻害薬である SEA0400 で low Na^+ 液と同様の検討を行ったところ、モルモット洞房結節の自発的な Ca^{2+} transient の頻度と歩調取り電位には影響を及ぼさなかった。

以上の結果より、モルモット洞房結節細胞では NCX が発現し、 Ca^{2+} 排出を担っているにもかかわらず、自発的 Ca^{2+} transient への寄与は小さいことが示唆された。

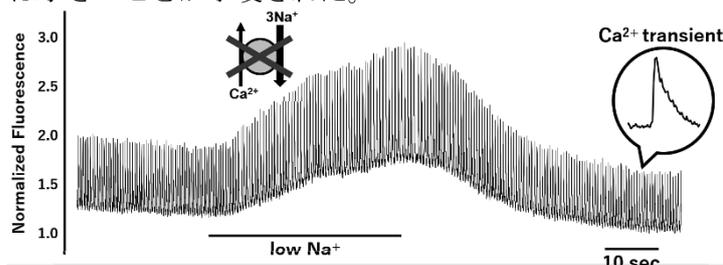
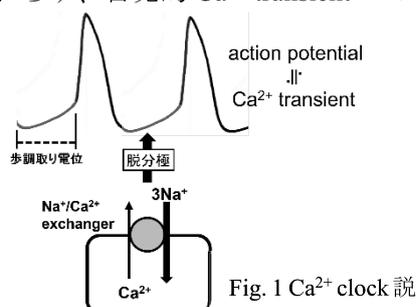


Fig. 2 自発的 Ca^{2+} transient に対する low Na^+ 液の影響

ショウガ辛味成分ショウガオールが骨格筋の運動機能の質に与える影響

Effects of [6]-shogaol on skeletal muscle constructs and function in C2C12 myotubes.

○栗山恵弥^{1,2}、深井梨沙¹、宮園佳歩¹、泉佐和¹、山口真由¹、田中光³、田中直子¹

¹大妻女子大・食物、²大妻女子大・院 人間文化研究、³東邦大・薬

○Megumi Kuriyama^{1,2}, Risa Fukai¹, Kaho Miyazono¹, Sawa Izumi¹, Mayu Yamaguchi¹,
Hikaru Tanaka¹, Naoko Iida-Tanaka

¹ Department of Food Science, Otsuma Women's University

² Graduate School of Studies in Human Culture Studies, Otsuma Women's University

³ Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toho University

【序論】ショウガの主要辛味成分はジンゲロールであるが、加熱により脱水反応を起こしショウガオールに変化することから、調理加熱後や乾燥ショウガ中ではショウガオールが多く含まれる。ショウガオールには、代謝促進、血糖降下作用などがあることが報告されているが、生体内最大の熱産生器官である骨格筋の代謝および運動機能にどのような影響があるか調べた研究は少ない。C2C12細胞は培養によって筋管細胞に分化し、電気刺激によって筋原線維構築を観察することができる培養細胞株であり、速筋のモデル細胞として研究に用いられている。本研究では、ショウガオールの摂取が筋肉の機能や運動能力に与える影響を明らかにすることを目的とし、C2C12細胞の筋分化の様子を観察しながら、糖質・脂質代謝、骨格筋タンパク質の発現量、および筋原線維の構造、太さなどの構造の変化、ミトコンドリアの状態変化などを、可視化技術を用いて多面的に調べた。

【方法】実験にはマウス由来筋芽細胞株 C2C12 を用いた。筋管細胞へ分化誘導 7 日後の細胞に、0~50 nM のショウガオールを添加し、電気刺激装置 C-Dish を用いて 24 時間 16.7V/25 mm の電気刺激を与えた。筋分化に関わるタンパク質、ミオシン重鎖の mRNA 発現は RealTimePCR を用いて定量した。またミオシン重鎖抗体を用いてサルコメア構造を可視化し、筋原線維構築を観察するとともに、ミオシン重鎖発現量の変化を定量した。ミトコンドリアは MitoTracker Green、脂肪滴蓄積量は Nile Red を用いて蛍光観察した。

【結果および考察】ショウガオールは電気刺激を与えない C2C12 筋管細胞に対し、筋分化を促進して速筋型ミオシン重鎖の発現量を増加させた。一方、電気刺激下では筋原線維への分化が若干抑えられ、および糖代謝に関わるタンパク質の発現も抑制される傾向がみられた。ショウガオールは、主に運動刺激のかからない状態で筋分化を促進する効果があることが示された。また、ショウガオールはミトコンドリア融合を促進し、脂肪合成を促進することも示され、ショウガオールが骨格筋細胞の好氣的エネルギー代謝を促進している可能性が示唆された。

肺微小循環動態の高解像度かつ高フレームレート *in vivo* イメージング
In vivo blood flow imaging of lung microvasculature with high spatio-temporal resolution in mouse

○澤麻理恵¹、牛山明²、服部研之¹

¹ 明治薬科大学、² 国立保健医療科学院

○Marie Sawa¹, Akira Ushiyama², Kenji Hattori¹

¹ Meiji Pharmaceutical University

² National Institute of Public Health

【目的】 血液循環の正常性は生体の維持にとって重要であり、疾病と循環障害は密接な関係がある。そのため、様々な臓器に対して血液微小循環のイメージング手法が確立されている。しかし、肺においては呼吸に伴う臓器自身の周期的動揺が大きいため、高解像度かつ高フレームレートでの観察が困難であり、その手法については発展途上である。本研究では先行研究の手法を改変し、チタン製ドーナツ型フレーム（外径:10 mm, 穴の径:5 mm）を用いて、自発呼吸下で観察が可能な密閉型肺ウィンドウ（Closed Lung Window: CLW）を作製し、肺微小循環を高解像度かつ高フレームレートで観察可能な *in vivo* リアルタイムイメージングの構築を目的とした。

【方法】 マウスの右胸壁に CLW を外科的に装着した。画像取得システムとして、倒立型顕微鏡（IX71, オリンパス）、共焦点スキャニングユニット（CSU-X1, 横河電機）および CMOS カメラ（ORCA-Flash4.0 V3, 浜松ホトニクス）で画像取得システム（IVM-CSU-CMOS システム）を構築した。マウスに TMR-Dextran 500kD（5%）を尾静脈投与し、IVM-CSU-CMOS システムで血管造影 *in vivo* イメージングを実施した。

【結果および考察】 CLW は呼吸管理下で所要 30 分程度で装着したのち、自発呼吸に戻ったのちは通常の飼育環境で長期にわたり生存可能であった。CLW を装着して数日経過後、麻酔下で血管造影を行った。その結果、IVM-CSU-CMOS システムで取得できる画像において個々の肺胞を同定できるとともに、それを取り巻く肺胞毛細血管を造影できた。本システムにおいては、倒立型顕微鏡を用いたため CLW 面がマウスの体の下方となり自重によって肺の呼吸に伴う周期的動揺を抑制できた。また、CSU と CMOS を組み合わせることで、肺の深度方向の空間的解像度を維持しつつ、20 frame/sec（露光時間 50 msec/frame）の時間的分解能も併せもつ動画として取得可能であった。これらの特徴に基づき、毛細血管内を流れる血球もトレースすることが可能となった。以上より、CLW と IVM-CSU-CMOS システムを用いて、肺微小循環の血球や免疫細胞などの働きを動的に捉えることができ、肺微小環境における新たな知見が得られることが期待される。

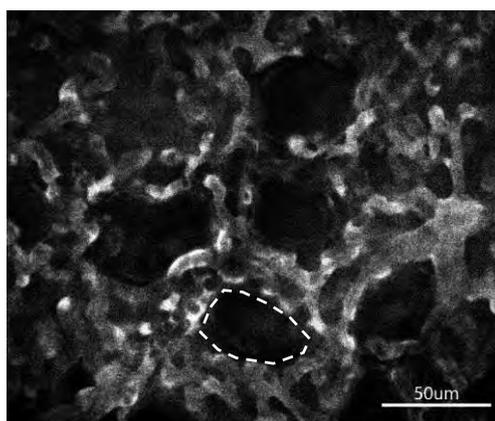


図 肺胞を取り囲む毛細血管像
 TMR-dextran を投与し血管造影した。
 点線で囲ったところが 1 個の肺胞を示す。

劇症型急性肺炎モデルマウスにおける免疫炎症細胞浸潤のイメージング解析
In vivo imaging of lung neutrophil accumulation in a mouse acute lung injury 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

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

【背景・目的】急性呼吸窮迫症候群(acute respiratory distress syndrome, ARDS)は、体内への何らかの侵襲が引き金となって発症し、激しい好中球浸潤と肺胞の広範な傷害(diffuse alveolar damage; DAD)を呈する病理像が特徴である。侵襲から発症までの期間は通常数日以内で、発症後の死亡率は40%を越えており有効な治療法が確立されていない。ARDSの発症にともない肺の毛細血管の内皮細胞や肺胞上皮細胞が傷害され、肺の浮腫や繊維化が誘導されて呼吸困難により死に至る。これまでの研究からARDSの発症には浸潤した活性化好中球が産生する脂質メディエーターやIFN γ などのサイトカインが関与していることなどが報告されているが、その詳細な発症メカニズムは明らかになっていない。現在新型コロナウイルス感染症の世界的なパンデミックにより世界で400万人以上の感染死者が出ているが、主な死因はウイルス感染による劇症型のARDS(Fulminant ARDS; FARDS)であり、治療法の確立は急務の課題である。本研究では新規に構築したFARDSモデルマウスと独自に開発してきたバイオイメージング技術を駆使して免疫炎症細胞浸潤様式の解析を行った。

【方法】マウスでの劇症型急性肺炎モデル(FARDSモデル)として、 α -Galactosylceramideによる感作後にLPSを経鼻投与する系を用いた。GFPやRFPなどの蛍光を発するトランスジェニックマウスからT細胞やB細胞、好中球、NKT細胞などを個別に単離して同系統の野生型に移入した後、劇症型急性肺炎を誘導してタイムコースを追った実験を行い、肺への免疫細胞浸潤の動態を蛍光顕微鏡を用いて観察した。

【結果・考察】FARDSモデルの誘導により野生型マウスではヒトでのARDS/FARDSの病理組織像と同様に非常に激しい好中球浸潤を特徴とした肺の激しい炎症性変化とともに、2~3日で80%以上のマウスが死亡した。好中球の肺への集積はLPS投与6時間後から顕著となり48時間後までに最高レベルに達した。またLPS投与後に誘導される好中球の集積が α -Galactosylceramideなど他の刺激因子の作用によって飛躍的に増強されることが明らかとなった。

今後、この実験系を用いて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、劇症型急性肺炎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。また新薬開発をする上で、発症抑制効果やその作用機構を調べるための有用なツールになることが期待される。

生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) による高光度化バクテリアルシフェラーゼを用いた自発光イメージング

Autonomous bioluminescence imaging with the improved bacterial luciferase by bioluminescence resonance energy transfer (BRET)

○加来友美、杉浦一徳、円谷徹之、長部謙二、永井健治

大阪大 産業科学研究所

○Tomomi Kaku, Kazunori Sugiura, Tetsuyuki Entani, Kenji Osabe, Takeharu Nagai

The Institute of Scientific and Industrial Research (SANKEN), Osaka University

発光バクテリアの発光システムは、*lux* オペロン (*luxCDABE*) を構成する 5 つの遺伝子により制御されている。そのうち、*luxA* と *luxB* はヘテロ二量体を形成して発光タンパク質 (ルシフェラーゼ) として機能する。また、*luxC*、*luxD*、*luxE* は発光基質 (ルシフェリン) の生合成に関与している。発光バクテリアのルシフェリン-ルシフェラーゼ反応を用いたレポーターアッセイは古くから行われてきたが、発光強度が十分ではなく、イメージングに用いられることは限定的であった。我々は、発光量子収率の低いルシフェラーゼから蛍光量子収率が相対的に高い蛍光タンパク質への生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) によって、熱散逸するエネルギーも光子に変換することで、発光量を増加させる方法に着目した (Saito et al., 2012, *Nat. Commun.* **3**, 1262)。そこで、黄緑色蛍光タンパク質 Venus 並びにその円順列変異体を *luxB* の C 末端に融合し、大腸菌で発現させて発光強度を比較した。その結果、157 番目のアミノ酸を新たな N 末端とする cp157Venus を融合したものは発光強度がおおよそ 10 倍に増加することを見出した。この改変型ルシフェラーゼを *luxC*、*luxD*、*luxE* 遺伝子とともにヒト培養細胞 (HKT293T) やタバコ (*Nicotiana benthamiana*) に導入したところ、自発光の高光度化が確認された。近年、ロシアのグループによってヤコウタケから生物発光関連遺伝子群がクローニングされ、それらを導入することで動植物の自発光化に成功しているものの、30°C 以上の温度条件下では発光しないなどの問題があった (Kotlobay et al., 2018, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **115**, 12728–12732)。今回我々が開発した高光度化バクテリアルシフェラーゼは 37°C でも活性を失わないことから、幅広い生物種における自発光イメージングが可能になると期待される。

参考文献 : Kaku T, Sugiura K, Entani T, Osabe K, Nagai T. Enhanced brightness of bacterial luciferase by bioluminescence resonance energy transfer. *Sci. Rep.* in press.

Heterogeneity and dynamics of the apoplastic fluid pH in different root zones revealed by a bioluminescent ratiometric indicator

Quang Tran ¹, Kenji Osabe ^{1,2}, Tetsuyuki Entani ², Tetsuichi Wazawa ², Mitsuru Hattori ^{1,2}, Takeharu Nagai ^{1,2}

¹ Graduate School of Engineering, Osaka University

² The Institute of Scientific and Industrial Research (SANKEN), Osaka University

Root apoplastic fluid plays an important role as an intermediate between cells and the surrounding environment. The acid growth theory suggests that the apoplastic fluid is acidic to facilitate cell wall loosening and modification during root growth. However, due to the technical limitations of previous methods, the quantification of the extracellular fluid pH in root has not been reported. Green-enhanced Nano-lantern (GeNL), a bioluminescent protein that we previously developed, is a fusion protein of a bioluminescent protein, NanoLuc (NLuc), and a green fluorescent protein, mNeonGreen (mNG). We found that the efficiency of bioluminescence resonance energy transfer (BRET) from NLuc to mNG is pH-dependent, by which the luminescence color changes from blue to green from pH 4.5 to 7.5. By fusing with a novel signal peptide of AtCel1 signal peptide, we applied GeNL as a bioluminescent ratiometric indicator for demonstrating the extracellular fluid pH of *Arabidopsis thaliana* root and performed time-lapse imaging of live root with cellular resolution for over 30 minutes. The apoplastic fluid stream was visualized with GeNL bioluminescence with high spatiotemporal resolution. We found that the apoplastic fluid of the root epidermis was acidic ranging from pH 5.7 to 7.0, the pH was dependent on root zones and dynamically changes during growth. These results suggest a strict regulation of the apoplastic fluid acidity, which is necessary for root elongation.

糖鎖リガンド sLeX mimic と小胞体局在シグナルペプチド KDEL を利用した
小胞体へのタンパク質デリバリー

**Targeted delivery of proteins to endoplasmic reticulum by conjugating
with sLeX mimic and KDEL**

○内田結、森川知彦、樋口ゆり子、山下富義 京都大学大学院薬学研究科

○Yui Uchida, Tomohiko Morikawa, Yuriko Higuchi, Fumiyoshi Yamashita

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

【背景・目的】抗体などのタンパク質を標的細胞の細胞内小器官に送達するには、特定の細胞の細胞膜透過に加えて、細胞内小器官への標的指向化が必要である。これまでに我々は、がんや炎症血管に高発現する E-selectin の天然リガンドである sialyl Lewis X (sLeX) の構造単純化糖 (mimic) の設計およびこれを標的指向化素子として用いた抗がん剤の細胞選択的送達に成功した[1,2]。本研究の目的は、タンパク質の細胞外から細胞内小器官へのシームレスな送達である。MDM2 に対する低分子抗体 scFv または蛍光タンパク質 mKO2 に対して、がん血管内皮細胞への選択的送達を目的に非天然アミノ酸アジドフェニルアラニン (AzF) を介して sLeX mimic を修飾した。さらに、小胞体への集積増大を目的にタンパク質の C 末端に Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) を配し、細胞への取り込みおよび小胞体への集積を評価した。

【方法】scFv(AzF)または mKO2-KDEL(AzF)の発現ベクターを構築し、大腸菌 BL21 (DE3) を用いて発現精製した。scFv(AzF)または mKO2-KDEL(AzF)を sLeX mimic-DBCO と 37°C で 5 時間反応させて結合体を得た。がん・炎症血管内皮細胞のモデルに、IL-1 β および TNF α によるサイトカイン処理により E-selectin を高発現させたヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた。

【結果・考察】sLeX mimic 修飾 mKO2 または scFv は、非修飾群と比べて細胞への取り込み量が有意に高かった (図 1)。これらの取り込みは、anti-E-selectin 抗体の前処理により抑制された。さらに、sLeX mimic 修飾 scFv は、細胞内の p53 を活性化した。sLeX mimic 修飾によりタンパク質を細胞選択的に送達できた。次に、sLeX mimic-mKO2-KDEL および sLeX mimic-mKO2 の細胞内分布を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、KDEL 融合体において mKO2 と小胞体マーカーの共局在が確認できた (図 2)。以上、sLeX mimic および KDEL によりがん血管内皮細胞の小胞体へタンパク質をデリバリーできることが示唆された。

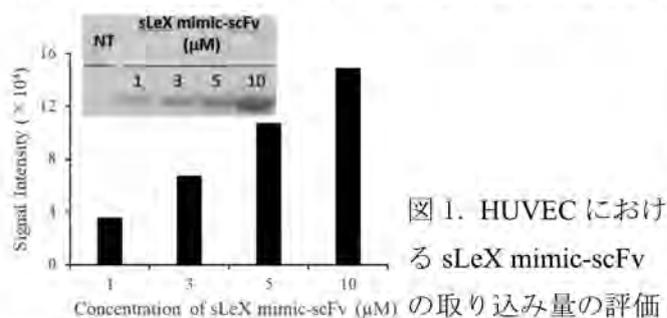


図 1. HUVEC における sLeX mimic-scFv の取り込み量の評価

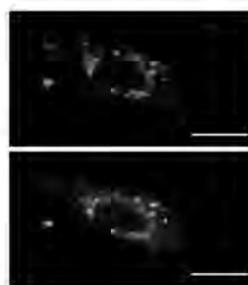


図 2. HUVEC における sLeX mimic-mKO2-KDEL の分布(上)および小胞体の分布(下) (Scale bar = 20 μm)

[1]ChantaLasrivong, Chanikarn, *Mol. Pharmaceutics*, 2017, 14, 5, 1528-1537

[2]ChantaLasrivong, Chanikarn, *RSC Advances*, 2019, 9, 20518-20527

Development of an “OFF-ON-OFF” fluorescence switch for real-time visualization of degradation of short-lived proteins in living cells

○Shahi Imam Reja¹, Yuichiro Hori^{1,2}, Kohei Yamasaki¹, Miyako Nishiura¹, Kazuya Kikuchi^{1,2,3}

¹Division of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, ²Immunology Frontier Research Center, ³Quantum Information and Quantum Biology Division, Osaka University, Osaka, Japan

Protein degradation plays an essential role in maintaining cellular homeostasis, and its disorder is known to be responsible for a range of neurodegenerative diseases.¹ While a cycloheximide-chase or radiolabeling assay is currently used to detect protein degradation, these techniques have limitations in cytotoxicity or handling complexity and, in addition, require cell lysis that is unsuitable for real-time detection. Recently, photoswitchable/photoactivatable proteins have been developed to overcome these problems,² but need a special instrument for light irradiation. Thus, there was a need to develop an alternative simple approach for real-time imaging of the degradation of short-lived protein.

This study demonstrates the development of a new PYP-tag-labeling probe that employs an “OFF-ON-OFF” fluorescence switching mechanism to enable real-time imaging of protein expression and degradation in living cells without the addition of cycloheximide. The probe has a trifunctional structure that contains a coumarin PYP-tag ligand-binding unit connected to a fluorescein fluorophore and a dinitroaryl quenching unit. The probe is non-fluorescent in the free state, becomes fluorescent upon protein labeling reactions, and decreases fluorescence intensity in response to protein degradation. This fluorescence switch was achieved by devising chemical principle based on contact quenching regulated by intramolecular association. Optimization of probe structures and PYP-tag mutants has enabled this fast-reacting ‘OFF-ON-OFF’ probe to be used to fluorescently image the expression of short-lived PYP-tagged protein and real-time visualization of its degradation in living cells.

In this conference, the details of the probe characterization and the live-cell imaging will be presented.

E-mail destination address : sreja@mls.eng.osaka-u.ac.jp

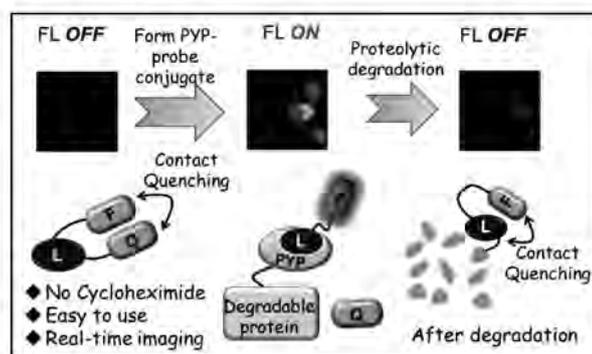


Figure 1: “OFF-ON-OFF” probe design and mechanism of fluorogenic labeling and degradation of short-lived PYP-tagged protein

References:

- 1) A. L. Goldberg, *Nature* **2003**, *426*, 895-899; 2) M. A. Eldeeb, R. S. Piragasam, M. A. Ragheb, M. Esmaili, M. Salla, R. P. Fahlman, *J. Neurochem.* **2019**, *151*, 520-533.

微小血管を可視化する造影剤の開発

Novel contrast agents based on titanium dioxide nanoparticle for microangiography

○田邊瑠里子^{1,2}、澁谷仁寿²、後藤拓¹、田村勝²、野村慎太郎^{1,2}

¹長浜バイオ大学 アニマルバイオサイエンス学科、²理化学研究所 バイオリソース研究センター

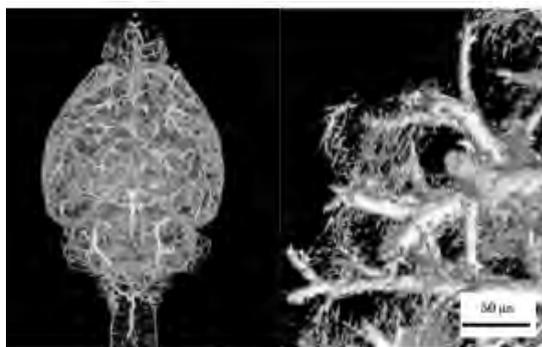
○Ruriko Tanabe^{1,2}, Hirotooshi Shibuya², Taku Gotoh¹, Masaru Tamura², Shintaro Nomura¹

¹Nagahama Inst. of Bio-Sci. and Tech., ²RIKEN BRC

循環障害は我が国の主要な死因であるにもかかわらず、病態モデル動物の多くはイヌやブタなどの中型動物であり、遺伝的解析が詳細に行われているマウス、ラットのモデル動物は数少ない。この原因として出血、うっ血、動静脈瘤、血栓、塞栓などの血管病変を検出するには小動物の血管があまりにも小さいことが挙げられる。従来実験動物の血管造影にはヒトで使われる血管造影剤が多く用いられている。ヒト用の血管造影剤で検出できる血管のサイズは直径 50-100 μm が限界であり、ヒトではかなり細い血管ではあるがマウスではかなり太い血管となる。我々が新たに開発した血管造影剤はテイカ社の二酸化チタンナノ粒子分散液を用いたもので臓器における直径 10 μm 以下の血管造影に成功した。

血管造影剤 TAKU-1 は二酸化チタンナノ粒子分散液 WD0456 と TKS-203 を 2:1 の比率で混合したものである。混合直後に直径 1-2 μm の粒子が出現し、混合後 5 分で凝集が認められる。WD0456 と TKS-203 それぞれに含まれる二酸化チタンナノ粒子のサイズは 10-100nm であるので分散剤の異なる 2 つのナノ粒子分散液の混合によってナノ粒子同士の部分的な会合が行われていると考えられる。左心室より導入された造影剤は小血管に停留し、未会合のナノ粒子は静脈に流出するため、中小血管を中心とした高いコントラストを有する画像を得ることができる。

もう一方の造影剤 TAKU-2 は二酸化チタンナノ粒子分散液 TKD-801 と PBS を 2:1 の比率で混合したものである。混合による再凝集は認められない。したがってこの造影剤は毛細血管などの細い血管を造影するために用いられる。TAKU-2 はエタノール、メタノールをはじめとする有機溶剤にきわめて感受性が高く、再凝集を起こす。したがって各臓器組織の毛細血管の造影、あるいは消化器の毛細血管を経由する肝臓門脈系の造影に適している。



写真左
TAKU-1 によるマウス
脳血管の造影
写真右
TAKU-2 によるマウス
肝臓毛細血管の造影

なお、本研究は文部科学省 科学研究費助成事業 若手研究の助成を受けて行われたものである。また、血管造影剤、造影法は特許化されている（2019 年 6571301 号、2021 年 特願 192522）

複数の精神・神経疾患に関わる Rab39B の細胞内局在の解析
Analysis of intracellular localization of Rab39B, a risk factor for psychiatric and neurological disorders

○¹宮地美沙^{1,2}、間裕太郎²、鯉沼真吾²、中村岳史²

¹東京理科大 薬、²東京理科大 生命研

○Misa Miyaji^{1,2}, Yutaro Hazama², Shingo Koinuma², Takeshi Nakamura²

¹Faculty Pharma Sci, ²Res Inst Biomed Sci, Tokyo University of Science

【研究背景】 神経組織に高発現する Rab39B は、知的能力発達不全を主症状とする X 染色体脆弱性症候群で欠失する領域に遺伝子座が存在することが知られていたが、この 10 年間で、自閉症や ADHD、若年性パーキンソン病のリスク因子であることが報告され急速に研究が進んでいる。2020 年に Rab39B ノックアウトマウスが報告され、表現型として、社会性行動の低下(自閉症の指標)、LTP の低下と学習記憶障害、神経新生の亢進と巨脳症、基底レベルでのオートファジーフラックスの低下が記載された。Rab39B の細胞内局在については、細胞質、ER とシスゴルジの間、細胞膜、小胞の一部に存在するという先行研究がある。Rab39B が GluA2 受容体の輸送に関わるという報告から Rab39B 陽性小胞はリサイクリング小胞ではないかと予想されるが、十分な検討がされていない。そこで本研究では、Rab39B の分子機能を知る手がかりとして、神経細胞株 Neuro2A を用いて各種エンドソームマーカーと Rab39B の共局在を検討した。

【実験手法】 一過性発現の場合、細胞ごとに発現レベルが異なり、内在性 Rab39B 量に対して大過剰の発現になることが多いため、EGFP-Rab39B の安定発現細胞株(Neuro2A 由来)を複数用意して検討した。そのうち比較的未分化状態を保っており、EGFP-Rab39B の発現が内在性 Rab39B のそれと大きく異ならないものとして F1-7 clone を選んで用いた。共局在の解析は MataMorph と Fiji の Plugin である JACoP を用いて行った。まず Matamorph 上で、数理形態学フィルターである h-dome filtering で segmentation を行い小胞を pick up した。Rab39B は相当量がゴルジ体にあるが、ゴルジ周りの小胞とゴルジの判別を自動で行うのは困難であり、不適切なものはマニュアルで ROI を選択して取り除いた。h-dome filtering のパラメータの設定が画像解析のポイントになる。JACoP はクラスター単位の共局在の定量が行なえる Plugin でありパラメータ設定の自由度が高いという特長がある。JACoP のメニューの 1 つである Object based analysis を用い、Rab39B と各種オルガネラマーカーの共局在を調べるのが目的であるため、共局在率としては overlap approach の値を使った。

【結果と考察】 Neuro2A 細胞を使った今回の解析で、Rab39B と LAMP(後期エンドソーム・リソソームマーカー)との共局在率は 64.4±6.2%、Lysotracker(リソソームマーカー)との共局在率は 43.3±6.3%、EEA1(初期エンドソームマーカー)との共局在率は 23.0±4.4%、Rab11(リサイクリングエンドソームマーカー)との共局在率は 40.9±4.0%という結果が得られた。共局在率の合計が 100%を超えているが、これは既報で指摘されているように、今回用いた代表的マーカーがある程度 overlap して存在することによって考えられる。リサイクリング経路の一部は分解経路とつながって働いているという最近のモデルも合わせて考えると、Rab39B 陽性小胞の 6 割程度は分解経路の小胞としての性格を持つと推測される。ノックアウトマウスの解析でオートファジーフラックスの低下が報告されていることから、分解経路に存在する Rab39B はオートファジーフラックスの維持に働いていることが予想され、今後その点を実験により検証したい。

複数の神経・精神疾患に関わる Rab39B の FRET バイオセンサーの開発
Development of FRET biosensor for Rab39B involved in various neurological
and psychiatric disorders

○鯉沼真吾¹、間裕太郎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

○Shingo Koinuma¹, Yutaro Hazama¹, 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.

神経組織に高発現する Rab39B は、知的能力発達不全を主症状とする X 染色体脆弱性症候群で欠失する領域に遺伝子座が存在することが知られていたが、この 10 年間で、自閉症や ADHD、若年性パーキンソン病のリスク因子であることが報告され急速に研究が進んでいる。2020 年に Rab39B ノックアウトマウスが報告され、表現型として、社会性行動の低下（自閉症の指標）、LTP の低下と学習記憶障害、神経新生の亢進と巨脳症、基底レベルでのオートファジーフラックスの低下が記載された。Rab39B の細胞内局在については、細胞質、ER とシスゴルジの間、細胞膜、小胞の一部に存在するという先行研究がある。しかし、これらのオルガネラのどこで Rab39B が疾患に関わるようなシグナル伝達を制御しているのかは不明である。膜輸送が時空間的に変動し続ける局所的な事象の集まりであることを踏まえると、Rab39B の制御機構をより詳細に調べるには細胞をすりつぶして解析する生化学的な手法や変異体を用いた解析では限界がある。そこで本研究では Rab39B の多様な機能を実現する分子メカニズムを明らかにすることを目指し、Rab39B 活性を高い時空間分解能で可視化できる FRET バイオセンサーの作製を試みた。

2 種類の基本デザインを使って、50 個を超える Rab39B センサーの候補を作製し、それぞれについてダイナミックレンジ（Rab39B の恒常活性型と優勢劣性型を組み込んだセンサーの FRET/CFP 比の変化幅）を蛍光分光光度計で評価した。一定以上のダイナミックレンジを持つ候補センサーについては、Rab39 の不活性化因子（GAP）に対して量依存的な応答を示すかどうかについてさらに検討した。現時点では Raichu-A804-GL がダイナミックレンジ 101%と高い性能を示した。これは当研究グループが報告した Raichu-Rab5 とほぼ同等のダイナミックレンジである。そこで Raichu-A804-GL を神経細胞株に発現させ細胞内局在を確認したところ、ほぼ全ての Rab39B 陽性小胞に存在することを確認した。現在、この Raichu-A804-GL を用いて FRET イメージングを行い、神経細胞株 Neuro2A における Rab39B 活性の時空間的な変化を検討している。

Ca²⁺, ROS を介したゼニゴケの迅速なストレス応答性長距離シグナル伝達機構の解析
Imaging analysis of stress-responsive rapid long-distance signaling
involving Ca²⁺ and ROS in *Marchantia polymorpha*

○渡邊健志郎¹、長谷川晃汰^{1,2}、進藤大輝^{1,2}、橋本研志^{1,2}、朽津和幸^{1,2}

東京理科大・院・理工・¹ 応用生物科学/² 農理工学際連携

○Kenshiro Watanabe¹, Kota Hasegawa^{1,2}, Hiroki Shindo^{1,2}, Kenji Hashimoto^{1,2}, Kazuyuki Kuchitsu^{1,2}

¹ Department of Applied Biological Science /² Interdisciplinary Agricultural Science & Technology
 Course, Tokyo University of Science

植物は脳神経系を持たないが、分散処理型の情報伝達・処理システムを発達させて個体全体を統御するシステムを持つと考えられ、傷害・病原体の感染・環境ストレスをはじめとする種々の刺激を感知すると、遠く離れた部位にシグナルを伝達し、全身的な応答を誘導する機構を備えている。維管束系(導管・篩管)を輸送されるホルモンなどの分子が関与する機構に加えて、被子植物は篩管を介した比較的高速なシグナル伝達系を持ち、Ca²⁺、活性酸素種(ROS)、電気的シグナルが関与する可能性が議論されているが、その分子機構や生理的意義は不明な点も多い。

植物細胞の極性先端成長等の場面では、細胞膜の局所において、Ca²⁺の結合とリン酸化により相乗的に活性化される ROS 生成酵素 NADPH oxidase (Nox)/Rboh と、ROS により活性化される Ca²⁺ チャンネルが相互依存的に活性化される可能性が提唱されている (Takeda *et al.* 2008; Kimura *et al.* 2012; Kaya *et al.* 2014) が、細胞間シグナル伝達系にこうした機構が関与するかどうかは不明である。私たちは、導管・篩管等の維管束系を持たない基部陸上植物ゼニゴケに Ca²⁺ センサー・ROS センサー蛍光タンパク質を発現させ、細胞質の Ca²⁺ 濃度および ROS 蓄積量の動態の、広範囲なライブイメージング系を構築し、傷害や電気刺激を与えた際のそれらの動態を解析した。

局所的な傷害処理を行うと、細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇、ROS の生成が傷害を与えた部位から遠位に向かって波状に伝播した。この伝播速度は Ca²⁺ で 1~1.2 mm/s、ROS で 0.7~0.9 mm/s と、被子植物の篩管細胞を介した伝播と概ね同速度だった。葉状体の全身的な刺激伝播の動態や、どのような刺激によりこうした迅速な長距離シグナル伝達系が活性化されるかの解析を進めている。ゼニゴケは陸上植物と共通の遺伝子を多く持ち、かつ遺伝的冗長性も低いことから、植物の長距離シグナル伝達を理解するための単純なモデル系と期待される。

ROS 生成の伝播は、Ca²⁺ チャンネル阻害剤及び、ゼニゴケが二種持つ Nox/Rboh のうち MpRbohB 欠損変異体で抑制されたことから、この”ROS wave”は Ca²⁺ を介した MpRbohB の活性化によるものと考えられる。一方で、細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇の伝播は、Ca²⁺ チャンネル阻害剤や陰イオンチャンネル阻害剤により抑制されたが、Nox/Rboh 欠損変異体や ROS 消去剤によって抑制されなかった。Ca²⁺ チャンネル・陰イオンチャンネル候補遺伝子の機能欠損変異体を系統的に大規模に作出し、”ROS wave”, ”Ca²⁺ wave”の生成に必要な因子の同定と、陸上植物が持つ迅速な長距離シグナル伝達系の分子機構やその進化の解明を進めている。”ROS wave”と”Ca²⁺ wave”との関係やその生理的意味についても議論したい。

ゼニゴケの細胞分裂組織における Ca^{2+} 動態の時空間パターンの解析:
自発的 Ca^{2+} スパイクの発見

Spatiotemporal pattern of Ca^{2+} dynamics in the cell-dividing zone of a model liverwort,
Marchantia polymorpha

○吉沢 優花^{1,2}、橋本 研志^{1,2}、萩原 雄樹^{1,2}、山下 優音¹、朽津 和幸^{1,2}

東京理科大・院・理工・¹ 応用生物科学² 農理工学際連携

○Yuka Yoshizawa^{1,2}, Kenji Hashimoto^{1,2}, Yuki Hagiwara^{1,2}, Yuto Yamashita¹, Kazuyuki Kuchitsu^{1,2}

¹ Department of Applied Biological Science /² Interdisciplinary Agricultural Science & Technology
Course, Tokyo University of Science

種々の刺激により誘導される細胞内 Ca^{2+} 濃度変化の時空間パターンは生体の情報伝達系の根幹をなすが、発生・形態形成における自発的な細胞内 Ca^{2+} 動態変化やそのメカニズム、生理的意義は不明な点が多く、特に植物ではほとんど理解されていない。私たちは、体制が単純なモデル植物ゼニゴケの細胞内 Ca^{2+} 動態のライブイメージング系を構築し、2020年度本学会学術集会において仮根の極性先端成長における Ca^{2+} の濃度勾配と振動的変化について報告した。植物の成長は、特定の頂端分裂組織における細胞分裂と、細胞伸長(体積の増大)により制御される。ゼニゴケ分裂組織は湾入した形状の中央に幹細胞があり、それに隣接する分裂細胞を起点として二次元方向に成長すること、また、被子植物の頂端分裂組織と異なり幹細胞が表層に位置することから、共焦点顕微鏡や多光子レーザー顕微鏡による細胞レベルのイメージングが比較的容易である。

ゼニゴケの頂端分裂組織において、一部の特定の細胞において、間隔をおいて自発的 Ca^{2+} スパイク様の一過的な Ca^{2+} 濃度上昇が繰り返される新規の現象を見出した。幹細胞、分裂細胞、さらにその周辺と、細胞毎にその濃度上昇の頻度に違いが認められた。 Ca^{2+} 濃度変化のパターンと、分裂組織及びその周辺における細胞分裂・分化・幹細胞の維持等の細胞の運命決定との関係、分子機構や生理的意義の解明を目指して解析を進めている。また細胞分裂・分化に異常を示す、活性酸素種生成酵素 NADPH oxidase/Rboh 遺伝子等の変異体を用いた比較解析により、細胞の分裂や運命決定と Ca^{2+} -ROS シグナルネットワークとの関係の解析を進めている。

タンパク質結合性を有する新規水溶性蛍光材料の開発

Development of a New Water-Soluble Fluorescent Material with a Protein Binding

○竹腰 和馬¹、矢下 亜紀良¹、川上 隼人¹、河合 功治¹、村井 利昭²¹ ミヨシ油脂株式会社、² 岐阜大学○Kazuma Takekoshi¹, Akira Yashita¹, Hayato Kawakami¹, Koji Kawai¹, Toshiaki Murai²¹ Miyoshi Oil & Fat Co., Ltd, ² Gifu University

【背景と目的】

有機蛍光発光化合物は、有機 OLED や発光ポリマーを含む有機 EL 分野で応用できるため、様々なタイプの分子骨格を有する多くの誘導体の開発は重要な課題の一つである。さらに生物分野では、分子イメージングやバイオイメージング分野で、生体細胞や細胞小器官、生理活性物質などを染色するために使われている。例えば有機蛍光色素を用いた分子イメージングでは、活性酸素やカルシウムイオンを定量的に検出することができる。さらにバイオイメージングでは、蛍光色素で化学的に標識した特異的抗体などの精製生体分子は、セルイメージング、ハイコンテンツ分析、フローサイトメトリー、ウェスタンブロッティング、ELISA などの測定における蛍光プローブとして、標的抗原や相互作用パートナーを検出することができる。

今回われわれは、光学的安定性に優れることやストークスシフト値が大きいこと、周辺環境や外部刺激に応答して発光色が変わることを含む様々な特異な性質を有するアミノチアゾールに着目した。これまで報告されたアミノチアゾールは疎水性であり、蛍光標識材料として使用するのが難しかったことから、ここでは水溶性を付与し、更にタンパク質結合性を付与することで、蛍光標識分子として利用できるアミノチアゾール化合物を開発した。得られた化合物は、水溶性、タンパク質結合性に加えて、光学特性（励起・蛍光発光スペクトル、蛍光量子収率、ストークスシフト値等）においても興味深い物性を示した。このことから新規なアミノチアゾールは、蛍光標識材料、バイオセンサーをはじめとする生物分野だけでなく、様々な分野で利用可能な蛍光発光化合物として提供することができる。

【結果と考察】

基本骨格を構築した後、置換基変換を経て 2 位フェニル基上にたんぱく質結合部位を組み込んだアミノチアゾールを合成した。得られたアミノチアゾールは水に溶解、緑色の蛍光発光を示した。またこの発光色は、アミノチアゾールのアミノ基上に導入する置換基によって制御することができる。実際にこの水溶性アミノチアゾールをタンパク質の一種であるアビジンと反応させ、その蛍光発光挙動を明らかにした。ポスター発表では、その詳細を報告する。

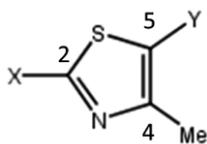


Figure 1. Structure of the compounds which we synthesized.

ウイルスの変異を考慮した COVID-19 治療薬の *in silico* 設計 *In silico* design of anti-COVID-19 agents for mutant pathogens

○椎野颯真¹, 五味晶彦¹, 星まどか¹, 今野翔², 林良雄², 小島正樹¹

¹東京薬科大 生命科学、²東京薬科大 薬学

○Souma Shiino¹, Akihiko Gomi¹, Madoka Hoshi¹, Sho Konno²,

Yoshio Hayashi² and Masaki Kojima¹

¹School of Life Sciences and ²School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の原因ウイルスである SARS-CoV-2 は、2002 年に中国で流行した SARS (重症急性呼吸器症候群) の原因ウイルス SARS-CoV のゲノム RNA と 89% の相同性があり [1]、特にメインプロテアーゼ 3CL^{pro} に関しては、アミノ酸配列中の 96% が同一である。3CL^{pro} は、コロナウイルスの 1a および 1b 遺伝子翻訳産物を特異的に切断して生活環に不可欠な種々の非構造タンパク質 (nsp) を成熟化する [2] ため、創薬の重要な標的である。このうち SARS-CoV 3CL^{pro} の阻害剤として林らが創製した YH-53 [3] は、SARS-CoV-2 の 3CL^{pro} に対しても有効であることが明らかとなった [4]。一方、ウイルス性疾患では変異株の出現による耐性化が問題になることが多く、COVID-19 でも顕在化しつつある [5]。本研究では、ウイルスの変異を考慮した COVID-19 治療薬を *in silico* で設計することを目的とした。

はじめに Nextstrain (<https://nextstrain.org/sars-cov-2>) の最新ゲノム情報から、3CL^{pro} をコードしている ORF1a 遺伝子の nsp5 領域で報告された変異のうち、分布率の高い上位 5 変種 (B.1.351, B.1.2, C.37, P.2, B.1.1.389) を抽出した。GenBank に登録されている野生型 SARS-CoV-2 のゲノム配列 (MN908947) と比較し、上記 5 種が各々 3CL^{pro} の Lys90Arg, Leu89Phe, Gly15Ser, Leu205Val, Pro96Ser の変異種に対応することを同定した。

次に、SARS-CoV-2 の 3CL^{pro} の結晶構造 (PDB ID: 6LZE) において、上記 5 箇所の変異部位を確認したところ、Leu89 と Leu205 を除いて分子表面に露出していた。また Gly15 のみ 2 量体形成への影響が示唆されたが、他の変異箇所は、活性部位および 2 量体形成界面から離れた場所に存在していた (図: 非対称単位は単量体。His41 と Cys145 は触媒残基)。

以上の知見を踏まえて、各変異型 3CL^{pro} の立体構造を分子動力学シミュレーションにより構築し、YH-53 および類縁化合物との *in silico* ドッキングを進めている。

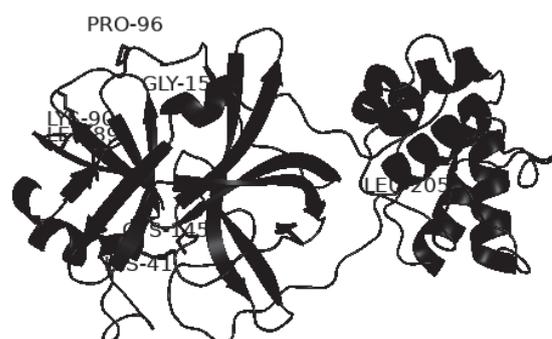
[1] Wu et al., *Nature* **579**, 265 (2020)

[2] Masters, *Adv. Virus Res.* **66**, 193 (2006)

[3] Thanigaimalai et al., *Eur. J. Med. Chem.* **68**, 372 (2013)

[4] Konno et al., *submitted*

[5] Korber et al., *Cell* **182**, 812 (2020)



広視野型 2 光子励起ライトシート顕微鏡の開発

Development of wide field 2-photon excitation light-sheet microscopy

○齋藤卓^{1,2}、今村健志^{1,2}

¹愛媛大・院 医学系研究科、²愛媛大・附属病院 先端医療創生センター

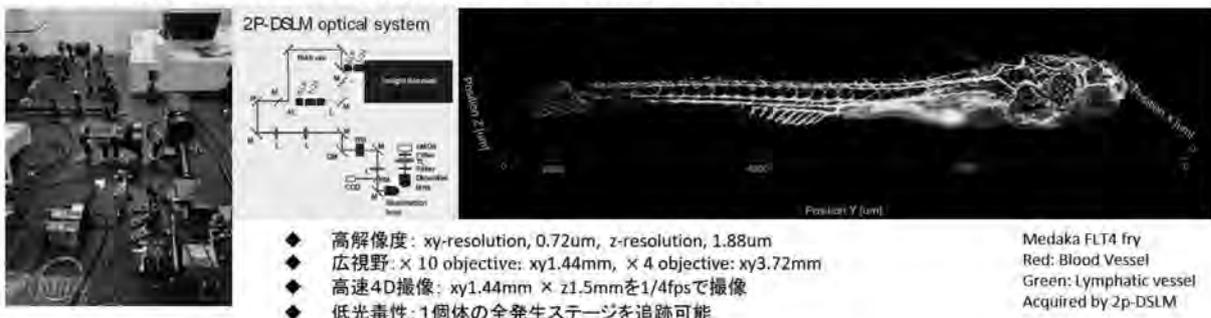
○Takashi Saitou¹, Takeshi Imamura^{1,2}

¹ Department of Molecular Medicine for Pathogenesis, Graduate School of Medicine, Ehime University

² Translational Research Center, Ehime University Hospital

メダカは、小型で、胚または稚魚の時期には体が透明なために個体全身におけるイメージング解析に優れた動物である。我々は、この脊椎動物における全身での時空間動態を観察するために、広視野で高速撮像可能な 2 光子励起ライトシート顕微鏡 (2-photon excitation light-sheet microscopy) の開発を行った。ライトシート顕微鏡は照射系と検出系が別れた顕微鏡システムで、シート状の照射による光学切片をカメラで撮像することで高速にイメージングをすることが可能な装置である。さらに、赤外光照射による 2 光子励起を用いることで生体に対する低光毒性と深部到達性の向上を果たすことができ、動物全身の観察に適したシステムを構築することができる。しかしながら、2 光子励起は、狭い範囲に光を集中させる必要があるために励起範囲 (光シート顕微鏡では“視野範囲”) が狭くなってしまいうという問題を抱えている。我々はこの問題を解決するために、レーザー集光範囲を光軸方向に伸長させる (励起範囲を広げる) ベッセルビーム形成を可能な限りシンプルにして、エネルギー損失を大きく抑制することを目指した光学ユニットを作製し、広視野化を実現した顕微鏡システムを構築した。本システムは、10 倍の検出用対物レンズを用いた場合に、軸方向分解能を 2-3 μm に保ったまま、ビーム長を 600-1000 μm の範囲で変化させることができる。さらに、ベッセルビームによる広範囲にわたる均一照射によって光毒性の低下も確認できている。我々は、この顕微鏡を用いてメダカ胚発生での高速・長時間にわたるイメージング解析に応用している。

2光子デジタル走査ライトシート顕微鏡によるメダカ個体丸ごとイメージング

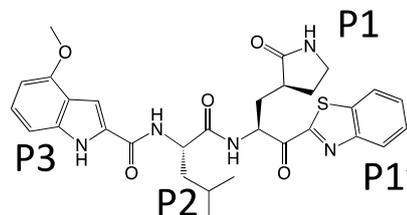


ADMET 特性を考慮した COVID-19 治療薬の *in silico* 設計***In silico* design of anti-COVID-19 agents with improved ADMET properties**○五味晶彦¹, 坂田喬亮¹, 星まどか¹, 椎野颯真¹, 今野翔², 林良雄², 小島正樹¹¹東京薬科大学・生命科学部, ²薬学部○Akihiko Gomi¹, Kyousuke Sakata¹, Madoka Hoshi¹, Souma Shiino¹, Sho Konno², Yoshio Hayashi² and Masaki Kojima¹¹School of Life Sciences and ²School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の原因ウイルスである SARS-CoV-2 は、2002 年に中国で流行した SARS (重症急性呼吸器症候群) の原因ウイルス SARS-CoV のゲノム RNA と 89% の相同性があり [1]、特にメインプロテアーゼ 3CL^{pro} に関しては、アミノ酸配列中の 96% が同一である。3CL^{pro} は、コロナウイルスの 1a および 1b 遺伝子翻訳産物を特異的に切断して生活環に不可欠な種々の非構造タンパク質 (nsp) を成熟化する [2] ため、創薬の重要な標的である。このうち SARS-CoV 3CL^{pro} の阻害剤として林らが創製した YH-53 [3] は、SARS-CoV-2 の 3CL^{pro} に対しても有効であることが明らかとなった [4]。

一般に新薬の開発においては、動物実験や臨床試験段階で候補医薬品に重篤な毒性や副作用が見出されるといって「死の谷」が問題となっている [5]。このため、化合物の設計段階から薬物動態・毒性 (ADMET) を考慮することが望ましいが、ADMET のように因果関係が複雑な特性の予測には、AI (人工知能) や機械学習の適用が有効と考えられる。本研究では、化学構造と ADMET 特性の実測値を関連づけたビッグデータを用いて部分構造を改変し、ADMET 特性を改善した COVID-19 治療薬の候補化合物を設計した。

ACD/Percepta を用いて、YH-53 の化学構造式 (図上) を SMILES 表記 (図下) で入力し、ADMET 特性 (log P、分子量、水素結合供与基の数、水素結合受容基の数、回転可能結合の数、環構造の数、溶解度、Caco-2 透過性、血漿タンパク質結合率、血液脳関門通過能、ヒト腸管吸収率、CYP 阻害性、hERG 阻害性等) を予測した。次に YH-53 の P1 部位と P3 部位の部分構造を改変し、ADMET 特性が向上した化合物を抽出した。ADMET 特性どうしが相反する場合は、Lipinski パラメータ (log P、分子量、水素結合供与基の数、水素結合受容基の数) を優先した。さらにドッキングシミュレーションを行い、標的の 3CL^{pro} に正しいポーズで結合する化合物のみを最終的な候補化合物とした。発表にて、最終候補化合物の化学構造を提示する。

[1] Wu et al., *Nature* **579**, 265 (2020)[2] Masters, *Adv. Virus Res.* **66**, 193 (2006)[3] Thanigaimalai et al., *Eur. J. Med. Chem.* **68**, 372 (2013)[4] Konno et al., *submitted*[5] Egan *In: Drug Design: Structure- and Ligand-based**Approaches* (Merz et al. eds.) 165 (2010)

```
COc1cccc2[nH]c(C(=O)N[C@@H](CC(C)C)C(=O)N[C@@H](C[C@@H]3CCNC3=O)C(=O)c3nc4cccc4s3)cc12
```

シンクロトロン X 線 μ CT 法によるラット大腿骨内に高濃集するウラン分布の可視化
Visualization of uranium concentrated in rat femur using synchrotron based X-ray μ CT

○大澤大輔¹, 上原章寛², 小西輝昭¹, 寺田靖子³, 星野真人³, 上杉健太郎³, 武田志乃²

¹ 量研機構 量子生命科学研究所

² 量研機構 放射線医学研究所

³ 高輝度光科学研究センター

○Daisuke Ohsawa¹, Akihiro Uehara², Teruaki Konishi¹, Yasuko Terada³, Masato Hoshino³,
 Kentaro Uesugi³, Shino Homma-Takeda²

¹Institute for Quantum Life Science,

National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology (QST)

²National Institute of Radiological Sciences,

National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology (QST)

³Japan Synchrotron Radiation Research Institute (JASRI)

骨は内部被ばく核種の重要な移行器官とされており、内部被ばくによる骨成長への影響が懸念される。しかしながら、これら核種の骨移行評価はカルシウムの体内動態モデルに基づくシミュレーションが主であり、特に、骨発達の盛んな幼齢期における骨への移行量や骨発達への影響についての基礎データが不足している状況にある。一方で、X 線 CT は X 線透過画像から断層画像を非破壊的に再構成する技術であり、大型放射光施設 SPring-8 の高輝度、高指向性の単色 X 線を光源とすることで、汎用の医療診断 CT を超えるサブミクロンの空間分解能が達成されうる。さらに、再構成画像を注目する元素の吸収端前後のエネルギーで取得し差分することで、その元素のみを高い明暗差で画像抽出できる。

本研究では、骨発達期におけるウランの骨移行とその影響を明らかにするため、異なる週齢のマウスに酢酸ウランを皮下注射し、注射 1 日後に解剖採集して得られた大腿骨をウラン L3 吸収端 (17.17 keV) 前後の X 線エネルギー (17.140, 17.172 keV) で透過撮像し、続いて、再構成画像を差分することで、ミクロンオーダーの空間分解能でウラン高濃集部位と骨構造とを 3 次元可視化した。本講演では、その詳細を報告する

A highly-sensitive genetically encoded temperature indicator exploiting a temperature-responsive elastin-like polypeptide

○Cong Quang Vu^{1,2}, Shun-ichi Fukushima², Tetsuichi Wazawa², and Takeharu Nagai^{1,2*}

¹ Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871, Japan

² SANKEN (The Institute of Scientific and Industrial Research), Osaka University, Ibaraki, Osaka 567-0047, Japan

*Correspondence: ng1@sanken.osaka-u.ac.jp

Genetically encoded temperature indicators (GETIs) allow for real-time measurement of subcellular temperature dynamics in live cells. However, GETIs have suffered from poor temperature sensitivity, which may not be sufficient to resolve small heat production from a biological process. Here, we develop a highly-sensitive GETI, denoted as ELP-TEMP, comprised of a temperature-responsive elastin-like polypeptide (ELP) fused with a cyan fluorescent protein (FP), mTurquoise2 (mT), and a yellow FP, mVenus (mV), as the donor and acceptor, respectively, of Förster resonance energy transfer (FRET). At elevated temperatures, the ELP moiety in ELP-TEMP undergoes a phase transition leading to an increase in the FRET efficiency. In HeLa cells, ELP-TEMP responded to the temperature from 33 to 40 °C with a maximum temperature sensitivity of $45.1 \pm 8.1\%/^{\circ}\text{C}$, which was the highest ever temperature sensitivity among hitherto-developed fluorescent nanothermometers. Although ELP-TEMP showed sensitivity not only to temperature but also to macromolecular crowding and self-concentration, we were able to correct the output of ELP-TEMP to achieve accurate temperature measurements at a subcellular resolution. We successfully applied ELP-TEMP to accurately measure temperature changes in cells induced by a local heat spot, even if the temperature difference was as small as $<1^{\circ}\text{C}$, and to visualize heat production from stimulated Ca^{2+} influx in live HeLa cells induced by a chemical stimulation. Furthermore, we investigated temperatures in the nucleus and cytoplasm of live HeLa cells and found that their temperatures were almost the same within the temperature resolution of the measurement. Our study would contribute to better understanding of cellular temperature dynamics, and ELP-TEMP would be a useful GETI for the investigation of cell thermobiology.

■公開講座■

「味と匂いのバイオイメージング」

脳活動と行動実験からみたヒトの味嗅覚の知覚システム

○小早川 達¹○Tatsu Kobayakawa¹¹ Human Informatics and Interaction Research Institute,

National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

味覚・嗅覚などの化学受容感覚は日常の「食事」と直接結びついており、それらの感覚は生活の質に大きな影響を及ぼす。日常生活では「味」という言葉が頻繁に用いられるが、我々が感じる「味」は純粋な「味覚- つまり舌から入力される感覚」ではない。しかし我々が何かを食べている時に、味覚以外の感覚の関与を意識する機会は少なく、「味」に対する違和感を「味覚異常」と勘違いすることが往々にして起き、実際に味覚の異常・低下を訴える患者を対象とした調査では、味覚の低下を訴える患者の半数が、味覚ではなく嗅覚の低下が認められる。つまり味とは味覚だけでなく、嗅覚影響が大きくさらに触覚、聴覚も口腔内の感覚に影響を及ぼす。

前述のように日常生活の中では味覚と嗅覚が合わさった「味」を私達は「口の中で」感じている。しかしながら嗅覚は鼻の奥の嗅粘膜で受容される感覚であり、その感覚が味覚と一体となり口の中での感覚になっている。味覚と嗅覚の相互作用について述べられている報告が数多くある。それらは味覚による嗅覚の増強あるいは抑制効果、もしくはその反対であり、前述の一体感についての言及はほとんどない。そこで筆者らは同時性判断課題を用いて、味覚と嗅覚の関係を調べた。同時性判断とは二種類の刺激を短い時間差を設けて提示を行い、二種類の刺激が主観的に同時か、同時でないかの判断を行わせる心理物理課題であり、一般的には異なる感覚モダリティ(聴覚と視覚など)間の感覚間相互作用の時間特性の解明のために用いられる。その結果、味覚と嗅覚の組み合わせが日常でよくある場合(食塩と醤油の香り)条件下ではそうでない条件(食塩と葉の香り)と比較して味覚と嗅覚の一体感(時間分解能の低下)が生じることがわかった。また同時判定課題遂行時の味覚と嗅覚の事象関連電位計測を行った結果、参加者が「同時」と判断した場合は「同時でない」と判断した場合と比較して、味覚一次野の活動が有意に抑制されていることを見出した。

本講演でヒトの味嗅覚の脳機能計測に触れると共に、行動実験による味嗅覚の知覚に対する経験の影響についても話をさせていただけると幸いである。

オルガノイド培養法を用いた消化管味センサー細胞の機能解析
**Functional analysis of taste sensor cells in digestive organs using
 organoid culture system**

○岩槻 健

↑東京農業大学 応用生物科学部 食品安全健康学科

○Iwatsuki Ken

Department of Nutritional Science and Food Safety, Tokyo University of Agriculture

「人間の先祖は？」と聞かれ、原人やサルと答える人はいるかもしれないが、イソギンチャクやクラゲと答える人はまずいない。しかし、味細胞の研究をしている私には、どうしても太古の昔から海に漂うこれらの生物こそ我々の先祖に思えてしまう。それは、これらの生物には我々と同様に栄養素を取り込み、危険物を回避したりする機能が備わっており、形こそ違えども歴史上一つの線で繋がっていると感じるからである。

よく調べると、イソギンチャクやクラゲは腸を中心にその周りを傘や筒で覆うような構造になっている。あたかも腸が一番大切な存在であるが如くである。

この単純な腸は、長い進化の過程でより効率よく安全に栄養素を吸収し、毒物など好ましく

ないものを排除するために進化し、我々の持っている複雑な消化管へと姿を変えていったと考えられる。一般に消化管は、口腔内から肛門まで続く一続きのホースに例えられる。口腔内で外部から最初に食品と接触する場所が舌である。この舌の上には味細胞が味蕾という形で存在しており、口に含んだものが栄養物か危険物質か瞬時に見分ける能力を持っている。口に入れた瞬間に、“甘い、うまい”と感じられるものは栄養素であり、“苦い、酸っぱい”と感じられるものは毒物や腐敗したものであるというシグナルである。そのため、前者では無意識のうちに飲み込む準備が始まり後者では本来は吐き出そうと体は身構える。これは通常の反応であり、乳幼児や自然界の動物の反応である。例外は人間の大人であり、敢えて苦いものや酸っぱいものを食するため、動物界の中でも特殊な存在であるといえる。

重要なことは、口腔内の味細胞とその祖先である消化管に存在するセンサー細胞は、味覚受容体を介して栄養素や危険物質を感じている点である。つまり、今日でも両者は非常に似た性質を有している。我々は、最近開発された消化管三次元培養法であるオルガノイド培養法を導入し、消化管に存在する味細胞の先祖と口腔内の味蕾の双方の機能を比較しながら解析している。最近、ヒトと同じ霊長類であるサルの消化管と舌から消化管オルガノイドおよび味蕾オルガノイドを作製することに成功した。本発表では、消化管幹細胞や味蕾オルガノイドが増殖する様子や特定の細胞に分化する様子をタイムラプス画像にて紹介する。また、カルシウムイメージングによる味蕾オルガノイドの呈味物質への応答の様子を紹介する。現在、研究者の間でも話題の多い三次元培養方法について少しでも理解が進めば幸甚である。

内胚葉の進化



味やニオイの刺激で変わる！動物の脳活動

○溝口尚子¹

¹明海大 歯学部 生理学分野

ニオイや味は、動物にとって大切な情報源です。たとえば、ニオイは身の周りにどんなものがあるか、今いる場所が安心できる場所か、それから食べ物のありかを探るときにも役立っています。そして食べ物を口に入れると味を感じますが、実はニオイは味の感じ方にまで影響を及ぼします。すぐ実感できる例では、風味豊かで美味しく感じるコーヒーであっても、鼻をつまんでニオイを感じない状態にして飲んでみると、たちまち苦い味だけがする水のように感じます。

ところで、動物は味やニオイを身体のどこで感じるのでしょうか。はじめに、センサーとしてはたらく細胞が味やニオイを情報として受け取ります。味の情報は味蕾にある味細胞によって受け取られます。その後、受け取った情報は感覚神経によって脳に伝えられ、そこで情報の処理が行われます。味やニオイの特徴を具体的にコレ！と決める（認識する）のは、脳の中でも一番外側にある大脳です。今回は、この大脳の活動に焦点を充てます。

大脳と一口にいっても、左右の大脳半球に分かれていて、より細かな区域（領域）ごとに機能が異なります。これを機能局在といいます。理解を深めるにあたって、この機能局在がヒト以外の動物の脳にも存在することを紹介します。何かに触れた感覚を処理するために活動する領域と、味やニオイを情報として処理するときに活動する領域は違います。そのことを知ったうえで、動物実験で観察できる味やニオイの刺激をしたときの脳活動を観てみましょう。

我々の研究室では、脳の活動を目でとらえることを目的に、条件や刺激の種類によって活動する部位の違いを動画で記録するイメージングという方法をよく用います。この方法で大脳の表面を観察すると、味を与えたときとニオイを与えたときとで活動が活発になる領域がはっきり異なる様子を見ることが出来ます。味とニオイを別々に与えたときと、ふだん食べている食事のように、味とニオイを同時に与えたときでは脳でみられる活動が異なります。また、イメージング実験前に、実験で刺激として使用する味とニオイを動物に経験させると、脳の活動はさらに大きく変化することが明らかになってきました。当日は、実際の実験結果をいくつか紹介します。一方、この方法だけでは、細胞レベルの細かいことはわかりませんので、他の方法で得られた結果を知りたくになります。世界に目を向けると、さまざまな手法で研究が進められていることに驚かされます。味やニオイを動物に与える実験で、脳がどんな風に活動して見えるか、これまでに明らかになっていることを我々の研究室で得られた結果と織り交ぜながら紹介する予定です。

■ 発表者索引 ■

ア			荻野 英賢	P22
青江誠一郎	P11		長部 謙二	P24、P23
青枝 大貴	P7		尾高 椋介	P19
秋田 佳恵	P3		小俣 大樹	奨励賞受賞講演 1、 P7、P6
安宅 光倫	P5			
イ			力	
石田 孝宣	S3-6		加来 友美	P23
石橋 健一	P9		影山 彩織	P6
石原 孝也	S2-1		加藤 薫	S3-2
石原 直忠	S2-1		加藤 晃一	P8
泉 佐和	P20		上村 真生	P15、P16
市岡 隆幸	P9		河合 功治	P32
市橋 理江	P16		川上 隼人	P32
井手 聖	S4-2		川喜 多愛	P17
井上 広大	P9		川口 馨加	P12
今石 潤	P13		川久保愛美	P10
今井 亮輔	S4-2		観音 裕考	S2-1
今村 健志	P34			
今村 寿子	P2		キ	
岩槻 健	O-2		菊川 琴美	P2
			菊地 和也	P26
ウ			北村 成史	S3-6
上杉健太朗	P36		金 明美	P8
上田 晴子	P1			
上原 章寛	P36		ク	
植屋 佑一	P16		朽津 和幸	P30、P31
牛山 明	P21		國田 樹	P1
内田 結	P25		久保美香子	P9
内橋 貴之	P8		栗山 恵弥	P20
梅澤芙美子	P8			
梅澤 雅和	P15、P16		コ	
エ			鯉沼 真吾	P29、P28
衛 澤峰	P18		甲賀 大輔	S3-1
榎木 亮介	P5		小島 正樹	P9、P33、P35
円谷 徹之	P23、P24		後藤 拓	P27
			小西 輝昭	P36
オ			小早川 達	O-1
大久保喬平	P15、P16		小林健太郎	P4
大坂 昇	P17		五味 晶彦	P33、P35
大澤 大輔	P36		小山 正平	P7
太田 善浩	S2-2		権田 幸祐	S3-6
大友 康平	P5		今野 翔	P33、P35
大野 尚仁	P9			
大場亜衣子	P14		サ	
岡 浩太郎	A-4、P18		齋藤喜久恵	P10
岡田 欣晃	P7		齋藤 恭子	S3-2
岡本 晃一	P17		齋藤 卓	P34
			齋藤 太郎	P14

齋藤 裕	S3-4	ツ	
坂田 喬亮	P35	堤 元佐	P4
佐藤 匡史	P8		
佐藤 良勝	S3-3	テ	
澤 麻理恵	P21	出村茉莉子	P9
		寺田 靖子	P36
シ			
椎野 颯真	P33、P35	ト	
澁谷 仁寿	P27	戸田 真志	P1
島崎健太朗	S3-2		
進藤 大輝	P30	ナ	
新藤 豊	P18	永井 健治	P23、P24、P37
		永田 典子	P3
ス		永田 莉子	P10
杉浦 一徳	P23	中林 孝和	S4-1
杉本 憲治	P17	中村 岳史	P28、P29
杉山 正明	P8	中村 秀樹	S4-3
洲崎 悦生	S1-1	中村 優子	S3-2
鈴木 吾大	S3-4	中山 俊憲	P22
鈴木 麻由	P13	行方衣由紀	P14、P19
鈴木真理子	P10		
鈴木 亮	P6、P7	ニ	
墨野 倉誠	P9	西浦美也子	P26
セ		又	
世良 俊博	P15	塗谷 睦生	S3-5
ソ		ネ	
曾我 康一	P2	根本 知己	P4、P5
曾我 公平	P15、P16		
		ノ	
タ		野村慎太郎	P27
大地 弘子	S4-2		
高木 智子	P3	ハ	
高野 裕大	P14	萩原 雄樹	P31
高橋 泰伽	P4	間 裕太郎	P28、P29
高本 英司	P16	橋本 研志	P30、P31
竹腰 和馬	P32	長谷川明洋	P22
武田 志乃	P36	長谷川晃汰	P30
竹松 真歩	P15	馳澤盛一郎	P3
竹森 洋	P12、P13	服部 研之	P21
田代 充	P9	服部 満	P24
多田 寛	S3-6	花田賢太郎	S3-2
田中 直子	P10、P11、P20	濱口 正悟	P14、P19
田中 光	P14、P19、P20	林 良雄	P33、P35
田邊瑠里子	P27	原島 秀吉	S2-3
田村 勝	P27		

ヒ			矢下亜紀良	P32
檜 垣匠	A-3、P1、P2、P3		山口 真由	P20
樋口ゆり子	A-1、P25		山口 樹也	P17
			山崎 康平	P26
フ			山下 富義	P25
深井 梨沙	P20		山下 優音	P31
深澤 征義	S3-2		山田 勇磨	S2-3
福島 俊一	P37		山本条太郎	奨励賞受賞講演 2
福田 光則	P29			
古川 紗帆	P12		ユ	
古田 享史	P12		柚木 康弘	P8
ホ			ヨ	
星野 真人	P36		横田 秀夫	P15
星 まどか	P33、P35		吉岡 靖雄	P7
堀田 耕司	P18		吉沢 優花	P31
堀 雄一郎	P26		吉田 早希	P8
			吉田 大一	P1
マ			ワ	
前島 一博	S4-2		和沢 鉄一	P24、P37
前田 美和	P13		和田 健司	P17
松村 義隆	P9		和田 直之	P29
松山 哲也	P17		渡邊健志郎	P30
丸山 一雄	P6		渡辺 大輝	P8
丸山 翔太	S2-1		渡邊 実夢	P12
ミ			C	
三尾 建斗	P11		Ganser Christian	P8
溝口 尚子	O-3		Shi-Wei Chu	S1-3
光山 統泰	S3-4		J	
宮川 拓也	A-2		Aklima Jannatul	S2-2
宮地 美沙	P28		R	
宮園 佳歩	P20		Shahi Imam Reja	P26
ム			S	
宗像 理紗	P6、P7		Pal Soumyadip	S2-1
村井 利昭	P32		T	
村田 香織	P17		Quang Tran	P24
モ			V	
毛内 拡	S1-2		Cong Quang Vu	P37
森川 知彦	P25			
守島 健	P8			
平田 洋子	P12			
森本 康幹	P9			
ヤ				
矢木 宏和	P8			

■ 総会資料 ■

2021 年度 日本バイオイメーシング学会

総会資料

2021 年 9 月 10 日
日本バイオイメーシング学会
会長 岡 浩太郎

会場：オンライン開催

議題：2020 年度事業報告、2021 年度事業経過報告および 2022 年度事業計画

総会議案

各委員会より

1. 庶務報告
2. 財務報告
3. 会計監査
4. 企画委員会
5. バイオイメーシング誌委員会
6. bioimages 誌編集委員会
7. ホームページ編集委員会
8. 集会委員会
9. 賞選考委員会
10. 研究助成選考委員会
11. 講習会委員会
12. 国際交流委員会
13. 新技術情報委員会
14. 男女共同参画委員会
15. 人事
16. その他

各委員会資料

1. 庶務報告（加藤（晃））

20 年度事業報告

- 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

21 年度事業経過報告

- 1) 事務局の移転に伴う、定款、入会申込書、会員情報変更届の修正
- 2) 会報などを各委員会と協力して発送
- 3) 会員情報の管理・更新
- 4) その他

22 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
- 4) 会員情報の管理・更新
- 5) その他

2. 財務報告（太田）（添付資料 参照）

20 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

21 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

22 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
- 3) 学術集会会場での会費徴収

3. 監査（木原、船津）

- 1) 会計監査の報告

4. 企画委員会（鈴木(亮)）

20 年度事業報告

- 1) 賛助会員への勧誘

21 年度事業経過報告

- 1) 賛助会員への勧誘
- 2) 第 30 回学術集会 記念シンポジウムの企画

22 年度事業計画

- 1) 賛助会員への勧誘

5. バイオイメージング誌委員会（朽津）

20 年度事業報告

- 1) 会報発行 和文誌「バイオイメージング」第 29 巻 1・2 号（通巻 86・87 号）合併号）発行
- 2) 和文誌「バイオイメージング」の新たな Web site を、日本バイオイメージング学会のホームページ内に開設し、<https://j-bioimaging.org/bioimagingmag/> 新体制になって以来刊行した、第 22 巻 1 号（通巻 72 号；2013 年 6 月刊行）から最新号までを公開
- 3) 和文誌「バイオイメージング」と英文誌「Bioimages」の編集方針の見直し（和文の総説・解説、原著論文は、「Bioimages」に掲載の方向）に基づく、投稿規定の修正とホームページへの掲載
- 4) 投稿（研究室紹介等）呼びかけ、特集記事の充実

21 年度事業経過報告

- 1) 和文誌「バイオイメージング」第 30 巻 1 号（通巻 88 号）を発行、30 巻 2 号（通巻 89 号）を 2021 年 8 月に刊行予定
- 2) 和文誌「バイオイメージング」の Web-site での公開、和文誌ホームページの充実
- 3) 投稿（研究室紹介等）呼びかけ、特集記事の充実
- 4) 和文誌「バイオイメージング」と英文誌「Bioimages」とのあり方を検討

22 年度事業計画

- 1) 和文誌「バイオイメージング」第 31 巻発行
- 2) 和文誌「バイオイメージング」の Web-site での公開、和文誌ホームページの充実
- 3) 投稿（研究室紹介等）呼びかけ、特集記事の充実
- 4) 広告掲載の必要性について検討

6. bioimages 誌編集委員会（小島）

20 年度事業報告

- 1) Bioimages Vol. 28 の論文のアップロード
- 2) 投稿規程の改訂（和文原稿の受付）
- 3) Vol. 5（1997）以降のバックナンバーのオンライン化

21 年度事業経過報告

- 1) Bioimages Vol. 29 の論文アップロード準備中
- 2) Vol. 4（1996）以前のバックナンバーのオンライン化

22 年度事業計画

- 1) Bioimages Vol. 30 の論文アップロード
- 2) バックナンバーのオンライン化の継続

7. ホームページ編集委員会（曾我）

20 年度事業報告

- 1) 特になし

21 年度事業経過報告

- 1) 特になし

22 年度事業計画

- 1) 特になし

8. 集会委員会（永井）

20 年度事業報告

第 29 回学術集会

日程： 2020 年 11 月 20 日（金）～ 21 日（土）

会場： オンライン開催

大会長： 根本 知己（岡崎自然科学研究機構 生命創成探究センター）

参加費： 一般（正会員・協賛学会員：4,000 円、非会員：6,000 円）

学生（学部学生（4 年生以下）無料、会員大学院生（学部 5 年生以上）3,000 円、非会員：5,000 円）

後援： 自然科学研究機構 生命創成探究センター

公開講座： 開催なし

21 年度事業経過報告

第 30 回学術集会

日程： 2021 年 9 月 9 日（木）～ 10 日（金）

会場： オンライン開催

大会長： 田中 直子（大妻女子大学 家政学部 食物学科）

参加費： 一般（正会員・協賛学会員：4,000 円、非会員：6,000 円）

大学院生および学部 5 年生以上（学生会員：3,000、非会員：5,000 円）

学部 4 年生以下：無料

公開講座「味と匂いのバイオイメージング」

日程： 2021 年 9 月 11 日（土）10：00～12：00 オンライン開催

22 年度事業計画

第 31 回学術集会・公開講座

日程：2022 年 9 月 3 日（土）～ 5 日（月）

会場：大阪大学銀杏会館

大会長： 永井 健治（大阪大学産業科学研究所）

9. 賞選考委員会（田中）

20 年度事業報告

1) 奨励賞：行方 衣由紀（東邦大学薬学部）

21 年度事業経過報告

1) 奨励賞：小俣 大樹（帝京大学薬学部）

山本 条太郎（産業技術総合研究所）

22 年度事業計画

1) 奨励賞について、学会ホームページに推薦のお願いを掲載予定。

10. 研究助成選考委員会（菊池）

20 年度事業報告

1) 特になし

21 年度事業経過報告

1) 特になし

22 年度事業計画

1) 特になし

11. 講習会委員会（加藤(薫)）

20 年度事業報告

1) 特になし

21 年度事業経過報告

1) 特になし

22 年度事業計画

1) 計画中（COVID-19 の収束状況などを考慮して今後の開催を検討）

1 2. 国際交流委員会（鈴木(和)）

20 年度事業報告

- 1) 次回国際シンポジウム開催に向けての準備

21 年度事業経過報告

- 1) 次回国際シンポジウムの開催に向けての準備

22 年度事業計画

- 1) 次回国際シンポジウム開催に向けての準備

1 3. 新技術情報委員会（根本）

20 年度事業報告

- 1) 特になし

21 年度事業経過報告

- 1) 特になし

22 年度事業計画

- 1) 特になし

1 4. 男女共同参画委員会（洲崎）

20 年度事業報告

- 1) 男女共同参画学協会連絡会第 18 期運営委員会（オンライン開催）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（ただし 20 年度は、実質的取り組みは中止となった）
- 3) 女子中高生夏の学校（8 月 7 日～9 日）はオンライン開催となり、協賛・参加してきたポスターセッションは行われなかった。

21 年度事業経過報告

- 1) 男女共同参画学協会連絡会第 19 期運営委員会（オンライン開催）に参加
- 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) 女子中高生夏の学校（8 月 8 日～9 日；オンライン開催）において「ポスター・キャリア相談」に参加

22 年度事業計画

同様の活動を継続予定

15. その他

審議事項

- 1) 第31回学術集会の準備について
- 2) その他

2020年度決算書（2020年1月1日～2020年12月31日）

日本バイオイメージング学会

会長 岡 浩太郎 印

理事(財務担当) 太田 善浩 印

一般会計

収入

2019年より繰越	5,047,097
利息	5
会費	931,000
第6回国際学会剰余金	1,043,897
収入計	7,021,999

支出

通信費	22,272
謝金・人件費	192,000
男女共同参画	10,000
奨励賞	100,000
振込手数料	2,090
HP作成維持費	71,500
雑費	2,112
小計	399,974

2021年度への繰越	6,622,025
支出計	7,021,999

特別会計(国際学会準備金等)

収入

2019年度より繰越	4,290,669
収入計	4,290,669

支出

2021年度への繰越	4,290,669
支出計	4,290,669

2022年度予算案(2022年1月1日～2022年12月31日)

一般会計

収入

繰り越し	5,413,825
会費	931,000

収入計	6,344,825
-----	-----------

支出

バイオイメージング印刷・送付	250,000	広報
Bioimages アップロード費	100,000	広報
ホームページ管理費	70,200	広報
謝金・人件費	50,000	庶務、会計
英文校閲費	100,000	編集
会議費	10,000	庶務
奨励賞・研究助成	100,000	賞選考
男女共同参画(分担金 他)	95,000	男女共同・国際
学術集会準備金	300,000	集会
雑費	60,000	庶務・会計
予備費	5,209,625	

支出計	6,344,825
-----	-----------

特別会計(国際学会準備金等)

収入

繰り越し	4,290,669
------	-----------

収入計	4,290,669
-----	-----------

支出

2023年度への繰越	4,290,669
------------	-----------

支出計	4,290,669
-----	-----------

監査証明書

日本バイオイメージング学会
会長 岡 浩太郎 殿

日本バイオイメージング学会 2020 年度収支決算報告書を監査した結果、正確
妥当なものとお認めます。

令和 3 年 4 月 24 日

監事 水原裕 

監査証明書

日本バイオイメージング学会
会長 岡 浩太郎 殿

日本バイオイメージング学会 2020 年度収支決算報告書を監査した結果、正確
妥当なものと認めます。

令和 3 年 4 月 23 日

監事 船津高志 

日本バイオイメーjing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jing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jing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jing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jing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jing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たとき、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jing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、庶務担当理事の所属先（〒467-8603 愛知県名古屋市瑞穂区田辺通3-1 名古屋市立大学大学院薬学研究科・生命分子構造学分野）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、常務理事とバイオイメーjing誌編集委員会委員長、bioimages 誌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、バイオイメーjing誌編集、bioimages 誌編集、ホームページ編集、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、2019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。

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

〒467-8603 名古屋市瑞穂区田辺通3-1

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

日本バイオイメーjing学会事務局

TEL：052-836-3448 FAX：052-836-3450

E-mail：office@j-bioimaging.org

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く思います。日本における基礎生命科学与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 〒467-8603 名古屋市瑞穂区田辺通3-1

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

日本バイオイメーjing学会事務局

TEL：052-836-3448 FAX：052-836-3450

E-mail：office@j-bioimaging.org

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://j-bioimaging.org>

No. _____

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 office@j-bioimaging.org

郵送 :

〒467-8603 愛知県名古屋市瑞穂区田辺通3-1

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

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

2021年度の各委員会：名簿

○：委員長

1. 会長
岡 浩太郎
2. 副会長
加藤 晃一、洲崎 悦子
3. 庶務
○加藤 晃一
4. 財務
○太田 善浩
5. 企画
○鈴木 亮、竹本 邦子、橋本 香保子、長谷川 明洋
* 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. バイオイメーキング誌編集
加藤 有介、菊地 和也、○朽津 和幸、曾我 公平、檜垣 匠、樋口 ゆり子、宮川 拓也
7. bioimages 誌編集
朽津 和幸、小島 清嗣、○小島 正樹、斎野 朝幸、洲崎 悦子、寺川 進、宮川 拓也
8. ホームページ編集
岡 浩太郎、小島 正樹、朽津 和幸、○曾我 公平、檜垣 匠
9. 集会
太田 善浩、加藤 薫、立野 玲子、○永井 健治
10. 賞選考
大塩 力、高松 哲郎、○田中 直子、田之倉 優、寺川 進、浜口 幸久
11. 研究助成選考
○菊地 和也、鈴木 和男、中山 俊憲、根本 知己
12. 講習会
岡部 弘基、○加藤 薫、櫻井 孝司、佐々木 章、中村 岳史、
企業から（オリンパス、カールツァイス、ニコン、浜松ホトニクス）
13. 国際交流
木原 裕、○鈴木 和男、鈴木 亮、永井 健治
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
14. 新技術情報
荒井 祐仁、加藤 薫、鶴旨 篤司、○根本 知己、晝馬 亨、三井 直人
15. 男女共同参画
加藤 有介、朽津 和幸、○洲崎 悦子、田中 直子、橋本 香保子、樋口 ゆり子

2021年度役員

1. 役員

1) 評議員 (2022.12.31 まで) (現員 38 名)

荒井 祐仁、池水 信二、大塩 力、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、朽津 和幸、小島 正樹、齋野 朝幸、洲崎 悦子、鈴木 和男、鈴木 亮、曾我 公平、竹本 邦子、立野 玲子、田中 直子、田之倉 優、鶴旨 篤司、寺川 進、富田 光子、永井 健治、中村 岳史、中山 俊憲、根本 知己、橋本 香保子、長谷川 明洋、浜口 幸久、檜垣 匠、樋口 ゆり子、晝馬 亨、古野 忠秀、宮川 拓也、三井 直人、矢木 宏和

2) 監事 (2 名 : 2022.12.31 まで)

木原 裕、船津 高志

3) 理事 (16 名 : 4 年任期、2 年毎半数改選、評議員により互選) (現員 15 名)

2022.12.31 まで

菊地 和也、朽津 和幸、洲崎 悦子、鈴木 和男、鈴木 亮、田中 直子、根本 知己

2024.12.31 まで

太田 善浩、岡 浩太郎、加藤 薫、加藤 晃一、小島 正樹、曾我 公平、永井 健治、檜垣 匠

3) 特任理事 (2 年任期) (6 名まで)

2022.12.31 まで

大塩 力、田之倉 優、浜口 幸久

4) 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 : 2022.12.31 まで : 岡 浩太郎

副 会 長 : 2022.12.31 まで : 加藤 晃一、洲崎 悦子

庶務担当理事 : 2022.12.31 まで : 加藤 晃一

財務担当理事 : 2022.12.31 まで : 太田 善浩

2. 名誉会員 (非役員)

新井 孝夫、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、南谷 晴之、安岡 則武

バイオイメージング 第30巻 第2号

2021年8月27日発行

発行所：日本バイオイメージング学会
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
〒467-8603 名古屋市瑞穂区田辺通 3-1
TEL:052-836-3448 FAX:052-836-3450
E-mail: office@j-bioimaging.org
URL: <http://j-bioimaging.org/>

第30回日本バイオイメージング学会学術集会 講演要旨集

■ 広告企業一覧 ■

オリンパス株式会社

カールツァイス株式会社

株式会社ニコンソリューションズ

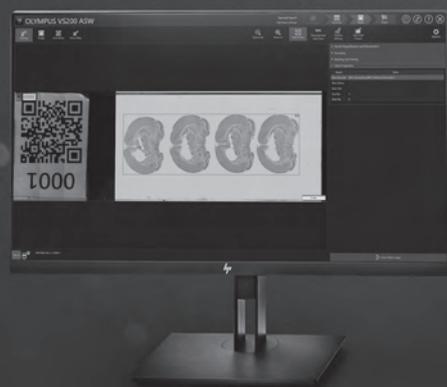
浜松ホトニクス株式会社

The Power to See More

スライド標本を迅速で且つ高画質にデジタル化、
貼り合わせのムラを最小限に抑えた定量性の
高いバーチャルスライド画像作成を実現

リサーチスライドスキャナー

SLIDEVIEW VS200



5つの観察手法(蛍光/明視野/暗視野/位相差/簡易偏光)に対応し、
幅広い用途で活躍

専用光学系と新設計の対物レンズX Lineにより
定量性の高いバーチャルスライド画像作成を実現

※本製品は、医療用途にはご利用いただけません。



Seeing beyond

ZEISS @

日本バイオイメージング学会

ZEISS LSM 980 with NIR



ZEISS Elyra 7 with Lattice SIM²





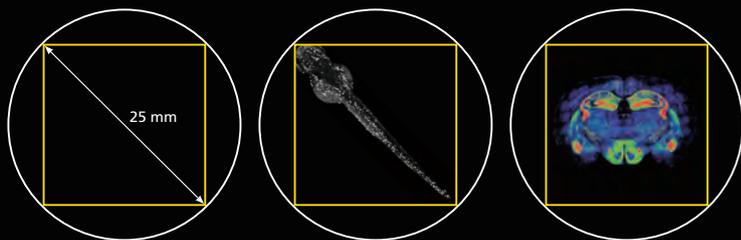
共焦点レーザー顕微鏡システム

AX / AX R

NEW

より広く

業界随一の広視野（対角 25 mm）。オルガノイド、ショウジョウバエの胚、マウスの脳切片、透明化サンプルなどの大型標本の全景を 1 ショットで捉えます。



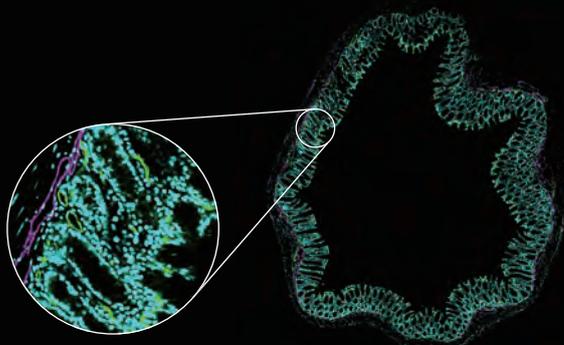
より速く

業界最速、毎秒 720 枚の撮影スピードを実現。ライブセルイメージングや *in vivo* イメージングなど、生きたサンプルの形態変化や刺激反応を逃しません。高速撮影により励起光による光毒性を抑えサンプルの退色を低減し、よりサンプルにやさしいイメージングを可能します。



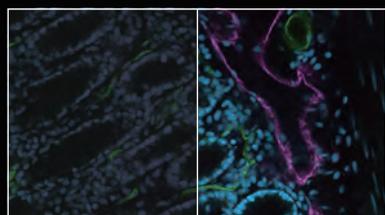
より解像度高く

レゾナントスキャナーでは、従来機比 4 倍となる 2K × 2K、ガルバノスキャナーでは、8K × 8K の高解像度を達成。細胞や組織における生命現象を、細部まで正確に捉えます。

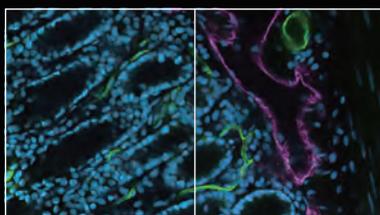


AI で新たなイメージングへ

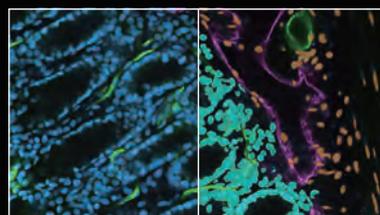
AX のパワーを最大限に引き出す画像統合ソフトウェア *NIS-Elements* 機能を充実。カスタマイズ可能なイメージングワークフローや最先端の AI 技術による画像解析を組み合わせることで、これまでにない新しい共焦点イメージングを体感できます。



Autosignal.ai



Denoise.ai



Segment.ai

株式会社 **ニコン ソリューションズ**

お問い合わせ先（フリーダイヤル）：(0120) 586-617
製品紹介サイト：www.microscope.healthcare.nikon.com/ja_JP

顕微鏡に役立つ情報を発信中!!



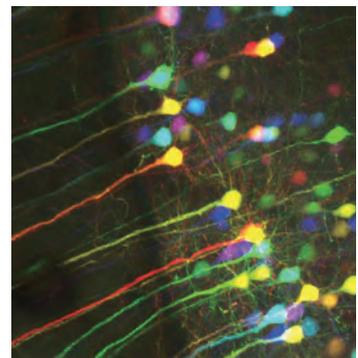
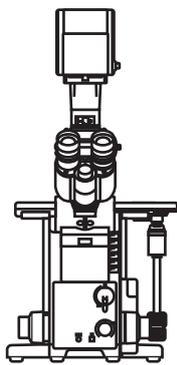
マイコ
MAICO™

MEMS CONFOCAL UNIT

MAICO® MEMS共焦点ユニット C15890シリーズ

HAMAMATSU
PHOTON IS OUR BUSINESS

お使いの倒立顕微鏡に取り付けるだけで、
共焦点蛍光イメージングが可能に！



倒立顕微鏡

MAICO®

共焦点蛍光顕微鏡

特長

- 励起・蛍光波長を選択、後から追加もできるサブユニット構造
- 実験台に置けるコンパクトサイズ
- MEMSミラーによるハイスピードスキャン
- ゴールドスタンダードの共焦点光学系
- レーザ管理区域が不要
- 「DCAM-API」によるソフトウェアサポート

MAICOの撮像動画を公開しています。

浜松ホトニクス MAICO 共焦点 🔍



浜松ホトニクス株式会社 WEB SITE www.hamamatsu.com

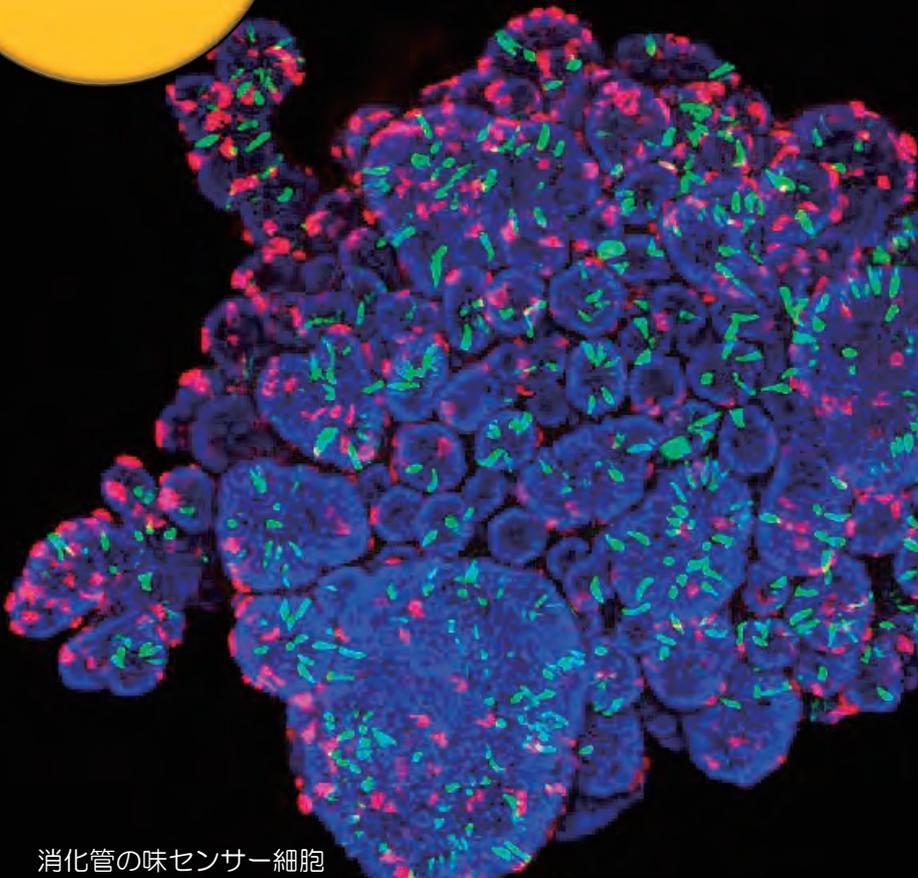
□システム営業推進部 〒431-3196 浜松市東区常光町812 TEL (053)431-0150 FAX (053)433-8031 E-Mail sales@sys.hpk.co.jp

第30回日本バイオイメーシング学会学術集会 公開講座

味と匂いの

バイオイメーシング

参加
無料



消化管の味センサー細胞
画像提供：岩槻 健 先生（東京農業大学）

2021年

9月11日 10:00~12:00 土

脳活動と行動実験からみたヒトの味嗅覚の知覚システム
小早川 達（国立研究開発法人 産業技術総合研究所）

オルガノイド培養法を用いた消化器味センサー細胞の機能解析
岩槻 健（東京農業大学 食品安全健康学科）

味やニオイの刺激で変わる！動物の脳活動
溝口 尚子（明海大学歯学部 形態機能成育学講座）

運営事務局

〒102-0075 東京都千代田区三番町12 大妻女子大学 田中直子

E-mail : 30th.bioimaging@gmail.com

TEL : 03-5275-6138

※可能な限りE-mailにてお問い合わせください

