

科学研究費助成事業「新学術領域研究（研究領域提案型）」 研究概要  
〔令和2年度事後評価用〕

令和2年6月30日現在

機関番号：82401

領域設定期間：平成27年度～令和元年度

領域番号：3704

研究領域名（和文） 共鳴誘導で革新するバイオイメーjing

研究領域名（英文） Resonance Biology for Innovative Bioimaging

領域代表者

宮脇 敦史 (MIYAWAKI Atsushi)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：80251445

交付決定額（領域設定期間全体）：（直接経費）1,265,064,374円

研究成果の概要

本研究領域では、①超解像イメージング、②生体深部イメージング、③ストレスイメージング、④ズームインアウトの4テーマを共有するように活動を行ってきた。以下に成果の概要を記述する。

①「超解像イメージング」:

超解像イメージングにおいて2つの課題を設定した。ひとつは「深部超解像」がある。たとえばbasal側の細胞表面だけでなく、カバーガラス表面から相当に離れて存在する構造（核内構造体、ゴルジ体、あるいはapical側の細胞表面）の光学観察の空間分解能を上げる試みである。細胞内屈折率の不均一性によって収差が生じ、カバーガラス表面から離れるに従ってPSF（点像分布関数）が歪むのが一因である。もう一つはデータ取得速度である。「超解像イメージング」に関する技術開発において、当領域設定期間内に以下の成果を得た。

- ・[深部超解像]マルチビームスキャン方式（ベクトルビームおよび波面補正技術）などの開発（根本）
- ・[高速超解像]自発的明滅プローブを利用した超解像度画像の高速撮影（神谷）

②「生体深部イメージング」:

生体組織の深部ライブイメージングを可能にするために、(蛍光・発光)色素の長波長化およびレーザー技術の開発を行った。具体的には以下の通りである。

- ・無機蛍光色素 (OTN-NIR) 開発 (曾我)
- ・発光タンパク質の長波長化 (>700 nm) (宮脇、牧)
- ・国産の赤色の蛍光タンパク質の開発 (宮脇)
- ・FRET バイオセンサーの長波長化 (宮脇、松田)
- ・新規レーザー光源による2光子励起イメージング (根本、今村)
- ・色素の長波長化の為に密度汎関数理論による色素分子特性の予測手法の構築 (浅沼)

③「ストレスイメージング」:

数ある生体ストレスの中でも、酸化ストレスに着目し当領域設定期間内に以下の成果を得た。

- ・蛍光タンパク質を材料に様々な酸化ストレスプローブ開発 (宮脇)
- ・GSH (還元型グルタチオン) 定量プローブ開発 (神谷)
- ・ビリルビン (非抱合型、抗酸化作用を示す) 定量プローブ開発・改良 (宮脇)
- ・組織透明化と二価鉄イオンプローブによる酸化ストレスの組織イメージング (平山、麓)

④「ズームインアウト」:

生物学の対象の空間スケールは、細胞内微細構造—細胞—組織—器官—個体と分類でき、それぞれのスケールを対象としたバイオイメーjingがなされている。異なる空間スケールの画像データを処理しながら、ある文脈で小空間スケールのデータを大空間スケールのデータに包含させることを提供するデータベースの構築に取り組んだ。

研究分野：バイオイメーjing

### 1. 研究開始当初の背景

バイオイメージングの開発対象として、一般的に、色素（プローブ）、ハードウェア（光学機器）、ソフトウェアの3つがある。色素とハードウェアについては我が国独自の開発要素技術があり、学術的にも産業的にも世界をリードしてきた実績がある。一方、ソフトウェアについては世界に後れをとっている。昨今は、4Dイメージングが流行りで、しかも、より細かく、広く、深く、速く、長く観察する必要が叫ばれ、画像データの量がますます膨大する傾向にある。巨大データ（ギガバイト、テラバイト）に振り回されないように技術体系を整備する必要がある。

### 2. 研究の目的

バイオイメージングが健全に発展するためには、「色素」、「ハードウェア」、「ソフトウェア」を三位一体として開発していくことが重要である。さらに本領域では、生物学の著しい多様性を鑑み「サンプル調製」を開発研究対象に加えたい。サンプルを顕微鏡の対物レンズの先に固定するだけでも多大な創意工夫の余地がある。固定サンプルの透明化技術を含め、観察するために行うサンプル調製を大きく取り上げる。「色素」、「ハードウェア」、「ソフトウェア」、「サンプル調製」の4つを頂点とする三角錐を想定し、本領域で開発する技術のそれぞれをその四面に投影していく。

分子と光の間の相互作用を介して、特徴的な振る舞いが観察対象に現われる。こうした現象を活用してバイオイメージング技術を開発する試みを狭義の「レゾナンスバイオ」と呼ぶ。本領域は、分子をデザインする研究者と光をコントロールする研究者の集いを基本に、分子と光の間の相互作用を究めて革新的なバイオイメージング技術を開発することを目的とする。さらに、バイオイメージングを中心に据えた学際的な共同研究を推進して、様々な生物学分野におけるパラダイムを揺り動かす試みを広義の「レゾナンスバイオ」の名のもとに行う。

### 3. 研究の方法

公募班の研究者には、新学術領域研究が新トレンドを創る使命を帯びていることを承知してもらった。独自のサイエンスを拠点にしながらい分野の研究者と交わることでしなやかに発展する余白を感じさせる研究を支援した。

バイオイメージングを巡る共鳴を領域内に創り出すため、連携共同研究のボトムアップ的発生を促した。さらに班会議で行われた班員発表をもとに以下のような連携をトップダウン的に提案した。

- ・画像の取得と処理については、さらなるニーズとシーズのマッチングを検討した。計画班横田が進めている「情報処理基盤システム・データベースの開発」と歩調を合わせ、画像データの提供量が飛躍的に増えるような環境を領域内に整備した。

- ・プローブ開発に関しては、遺伝子コード型と化学合成（ペプチド）型の両方を採用するアプローチの進展に注目した。プローブ利用に関しても、遺伝子コード型と化学合成（ペプチド）型の両方を試すような研究を推進。

バイオイメージングを巡る共鳴を領域外に世界規模で広げるため、国際シンポジウム、国際技術講習会などを、若手研究者中心で開催した。

### 4. 研究の成果

#### 研究項目 A01 分子のデザイン

##### A01 (計画・宮脇)

**マイトファジープローブの開発**: マイトファジープローブ mito-SRAI を開発し、パーキンソン病モデルマウスにおいて、病態解明の手がかりとなるマイトファジー発生の細胞種特異性を発見した (Katayama et al., Cell 2020)。

**人工生物発光システムの開発**: 赤色の発光基質 (Akalumine) の発光反応を担う発光酵素を改変し、発光強度が大幅に改善された人工生物発光システム、AkaBLI を開発した (Iwano et al., Science 2018)。

**細胞周期、DNA 損傷に対するハイブリッドプローブの開発**: 細胞周期プローブ、Fucci のバリエーションを開発し、DNA 損傷による細胞死は、細胞周期と相関することを示した (Sakaue-Sawano A. et al., Mol. Cell 2017)。

##### A01 (計画・松田)

**振動実験のための低分子化合物の作成と新規光遺伝学ツールの開発**: 細胞内情報伝達分子を生きた組織で制御するためのケミカルバイオロジーツール SLIPT (Nakamura et al. ACS Chem Biol 2020、分担研究者の築地と共同) 及び多光子顕微鏡下で操作可能な光遺伝学ツール 2paCRY2 (Kinjo et al. Nat Method 2019) を開発した。

##### A01 (計画・曾我)

**種々のイメージングシーンに対応する明るい蛍光プローブの開発**: cm オーダーの深部の可視化

が可能な、色素内包ミセル構造プローブ、カーボンナノチューブプローブ、希土類含有セラミックスナノ粒子(RED-CNP)プローブを開発した。

A01 (計画・神谷)

**新たな光明滅原理に基づく超解像蛍光イメージングプローブの開発**：細胞内求核分子と蛍光団との分子間求核付加反応を新たな光明滅原理として用いることで、自発的光明滅超解像イメージングプローブの多色化ならびに明滅特性の拡張に成功した (Morozumi et al. J. Am. Chem. Soc., 2020)。

A01 (公募・磯村)

**マウス分節時計における遺伝子発現振動の 1 細胞イメージング技術の開発と同期メカニズムの解明**：計画研究の宮脇班による新規黄色蛍光タンパク質 Achilles によって、マウス分節時計における Hes7 遺伝子の 1 細胞レベルでの可視化に成功した。本研究結果は Nature 誌に掲載された。

A01 (計画・今村)

**新規 2 光子励起光シート蛍光顕微鏡の開発**：2 光子励起光源からのビーム形状の工夫により高分解能でメダカの稚魚を丸ごとイメージングできる高視野の光シート蛍光顕微鏡を開発した。開発過程において、根本班の佐藤俊一先生と光源開発の共同研究を行った。

A02 (計画・根本)

**生体脳海馬神経活動のイメージング**：海馬全層の “in vivo” イメージングを可能とする基盤技術の開発し、海馬 CA1 ニューロンのビデオレートでの神経活動のイメージングに成功した(Cell, 2019)。

A02 (計画・横田)

**VCAT5 及び RBICP の開発と生物学応用**：画像処理統合システム VCAT5 及びクラウドシステム RBICP を開発し、脳の遺伝子発現解析(M.Morita et al. Nucleic Acids Res.2019)、細胞集団の動態解析(A. Sakane et al. Front. Cell Dev. 2018; MBoC 2016)、遺伝子発現の 3 次元可視化(H. Saito et al. Nat. Commun. 2017)や細胞分裂時の微小管解析(N. Yamashita et al. J. Biomed. Opt.2015)などへ応用した。

A02 (公募・青木)

**細胞間の不均一な分子活性によって細胞が死ぬか生きるかの運命が決まることを発見**：JNK と p38 の活性を同時に可視化する系を開発し、p38 の JNK の活性に対する負のフィードバック及び不均一なフィードバックによる細胞死が生じる割合の制御を発見した (Miura et al. Cell Rep 2018)。

A02 (公募・磯部)

**多焦点面同時 2 光子イメージング技術の開発**：50W, 100fs, 50MHz のファイバーレーザーを開発するとともに、11.8Hz で 4 つの焦点面を同時に 2 光子イメージングする技術を開発し、マウスの In-vivo カルシウムイメージングへ応用した(特許申請中)。

A03 (公募・毛利)

**共焦点画像を用いた高速多点 FCS の実現**：これまで相分離液滴の流動性の検証に FRAP が用いられてきたが、細胞内では液滴が数百 nm と小さく適用が困難だった。我々は新規 FCS 法を開発することで、世界に先駆けて細胞内の生理的条件下での液滴の FCS 計測を行うことに成功した (Y.Fujioka et al., Nature 2020)。

## 5. 主な発表論文等 (受賞等を含む)

### <雑誌論文>

A01 (計画・宮脇)

1. Katayama H., Hama H., Nagasawa K., Kurokawa H., Sugiyama M., Ando R., Funata M., Yoshida N., Homma M., Nishimura T., Takahashi M., Ishida Y., Hioki H., Tsujihata Y., \*Miyawaki A. (2020) Visualizing and modulating mitophagy for therapeutic studies of neurodegeneration. *Cell* **181**(5): 1176-1187 (2020)
2. Iwano S., Sugiyama M., Hama H., Watakabe A., Hasegawa N., Kuchimaru T., Tanaka KZ, Takahashi M., Ishida Y., Hata J., Shimozono S., Namiki K., Fukano T., Kiyama M., Okano H., Kizaka-Kondoh S., McHugh TJ., Yamamori T., Hioki H., Maki S., \*Miyawaki A. Single-cell bioluminescence imaging of deep tissue in freely moving animals. *Science* **359**: 935-939 (2018)

A01 (計画・松田)

1. Kinjo T, Terai K, Horita S, Nomura N, Sumiyama K, Togashi K, Iwata S, \*Matsuda M. “FRET-assisted photoactivation of flavoproteins for in vivo two-photon optogenetics,” *Nat Methods*. **16**(10):1029-1036 (2019)
2. Komatsu N, Terai K, Imanishi A, Kamioka Y, Sumiyama K, Jin T, Okada Y, Nagai T, \*Matsuda M. “A platform of BRET-FRET hybrid biosensors for optogenetics, chemical screening, and in vivo imaging.” *Sci Rep*. **12**;8(1):8984 (2018)

A01 (計画・曾我)

1. Takumi Chihara, Masakazu Umezawa, Keiji Miyata, Shota Sekiyama, Naoki Hosokawa, Kyohei Okubo, Masao KAMIMURA, Kohei Soga, "Biological Deep Temperature Imaging with Fluorescence Lifetime of Rare-Earth-Doped Ceramics Particles in the Second NIR Biological Window," *Scientific Reports*, **9**: 12806 (2019)

2. Shota Sekiyama, Masakazu Umezawa, Yoko Iizumi, Takuji Ube, Toshiya Okazaki, Masao KAMIMURA, Kohei Soga, "Delayed Increase in Near-Infrared Fluorescence in Cultured Murine Cancer Cells Labeled with Oxygen-Doped Single-Walled Carbon Nanotubes," *Langmuir* **35**(3): 831–837 (2019)

A01 (計画・神谷)

1. Morozumi A, \*Kamiya M, Uno S, Umezawa K, Kojima R, Yoshihara T, Tobita S, \*Urano Y. "Spontaneously blinking fluorophores based on nucleophilic addition/dissociation of intracellular glutathione for live-cell super-resolution imaging." *J. Am. Chem. Soc.* **142**: 9625–9633 (2020)
2. Umezawa K, \*Kamiya M, \*Urano Y. "A reversible fluorescent probe for real-time live-cell imaging and quantification of endogenous hydropolysulfides." *Angew. Chem. Int. Ed.* **57**:9346–9350 (2018).

A01 (計画・今村)

1. Watanabe T, Ninomiya H, Saitou T, Takanezawa S, Yamamoto S, Imai Y, Yoshida O, Kawakami R, Hirooka M, Abe M, \*Imamura T, \*Hiasa Y. "Therapeutic effects of the PKR inhibitor C16 suppressing tumor proliferation and angiogenesis in hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo." *Scientific Reports* **10**: 5133 (2020)
2. \*Saitou T, Kiyomatsu H, Imamura T. "Quantitative Morphometry for Osteochondral Tissues Using Second Harmonic Generation Microscopy and Image Texture Information." *Scientific Reports* **8**: 2826 (2018)

A01 (公募・浅沼)

1. Sakamoto H, Ariyoshi T, Kimpura N, Sugao K, Taiko I, Takikawa K, Asanuma D, Namiki S and \*Hirose K. Synaptic weight set by Munc13-1 supramolecular assemblies. *Nat. Neurosci.* **21**: 41-49 (2018)

A01 (公募・青木)

1. Komatsubara A, Goto Y, Kondo Y, Matsuda M, \*Aoki K "Single-cell quantification of the concentrations and dissociation constants of endogeneous proteins" *Journal of Biological Chemistry*, **294**: 6062-6072 (2019)

A01 (公募・麓)

1. Wang S, \*Fumoto S, Miyamoto H, Tanaka M, Nishida K. Edaravone, a cytoprotective drug, enhances transgene expression mediated by lipoplexes in HepG2 cells and mice. *International Journal of Pharmaceutics* **548**: 173-181 (2018)

A01 (公募・林)

1. \*Saneyoshi T., Matsuno H., Suzuki A., Murakoshi H., Hedrick N.G., Agnello E., O'Connell R., Stratton M.M., Yasuda R., \*Hayashi, Y. "Reciprocal Activation within a Kinase-Effector Complex Underlying Persistence of Structural LTP." *Neuron* **102**(6): 1199-1210 (2019)

A02 (計画・根本)

1. \*Kozawa Y, Sato S, Light needle microscopy with spatially transposed detection for axially resolved volumetric imaging, *Scientific Reports* **9**: 11687 (2019)
2. Aoyagi Y, Hibi T, Kimori Y, Sawada M, Kawakami R, Sawamoto K, \*Nemoto T, Heterogeneous distribution of doublecortin-expressing cells surrounding the rostral migratory stream in the juvenile mouse. *J Comp Neurol.* **526**(16):2631-2646 (2018)

A02 (計画・横田)

1. Y. Mimura, S. Takemoto et al., "A statistical image analysis framework for pore-free islands derived from heterogeneity distribution of nuclear pore complexes", *Scientific Reports*, **7**:16315:1-14 (2017)
2. A. Sakane, S. Yoshizawa et al., "Conformational plasticity of JRAB/MICAL-L2 provides "law and order" in collective cell migration" , *MBoC*, **27**(20): 3095-3108 (2016).

A02 (公募・豊島)

1. Yu Toyoshima, Stephen Wu, Manami Kanamori, Hirofumi Sato, Moon Sun Jang, Suzu Oe, Yuko Murakami, Takayuki Teramoto, Chanhyun Park, Yuishi Iwasaki, Takeshi Ishihara, \*Ryo Yoshida & \*Yuichi Iino. "Neuron ID dataset facilitates neuronal annotation for whole-brain activity imaging of *C. elegans*". *BMC Biology* **18**: 30 (2020)

A02 (公募・日置)

1. Okunomiya T, Hioki H, Nishimura C, Yawata S, Imayoshi I, Kageyama R, Takahashi R, \*Watanabe D. "Generation of a MOR-CreER knock-in mouse line to study cells and neural circuits involved in mu opioid receptor signaling." *Genesis* **58**: e23341 (2019)

A03 (公募・長島)

1. Sinjab F, Hashimoto K, Zhao X, Nagashima Y, Ideguchi T, "Enhanced spectral resolution for broadband coherent anti-Stokes Raman spectroscopy." *Opt Lett.* **1;45**(5) (2020)

A03 (公募・毛利)

1. Y.Fujioka, J.Alam, D.Noshiro, K.Mouri, T.Ando, Y.Okada, A.May, R.Knorr, K.Suzuki, Y.Ohsumi, \*N.N.Noda, "Phase separation and dynamic phosphorylation organize the site of autophagosome

formation”, *Nature* 578–301 (2020)

<受賞>

1. 磯部圭佑, 文部科学大臣表彰若手科学者賞 2018年4月17日.
2. 宮脇敦史、秋の紫綬褒章、2017年
3. 宮脇敦史、上原賞、2017年
4. 宮脇敦史、島津賞、2015年

<ホームページや新聞等の各種メディア報道>

1. (宮脇班)日本経済新聞, 脳内部光らせ観察, 2018/2/26
2. (宮脇班)読売新聞, 脳深部光らせ外から観察, 2018/3/2
3. (宮脇班)テレビ朝日 グッド!モーニング, 2018/2/23