

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B））

研究期間：2019～2021

課題番号：19KK0198

研究課題名（和文）蛍光偏光を用いた等方性分解能顕微鏡の開発と細胞膜動態の可視化

研究課題名（英文）Development of isotropic resolution microscopy using fluorescence polarization and visualization of cell membrane dynamics

研究代表者

大場 雄介（Ohba, Yusuke）

北海道大学・医学研究院・教授

研究者番号：30333503

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,100,000円

研究成果の概要（和文）：緑色蛍光タンパク質の2箇所に膜局在配列を一つずつ付加することで細胞膜と蛍光タンパク質の発色団が常に直行する位置に固定される角度センサーを作製した。また、赤色蛍光タンパク質でも同様のセンサーを作製した。加えて、任意の角度の偏光での励起と発した光を偏光に基づき分光する全反射偏光蛍光顕微鏡をセットアップした。これらを用いて膜の角度の変化を蛍光強度の変化として捉えることができる手法を確立し、受容体依存性エンドサイトーシス超初期過程を可視化することに成功した。が確立できた。また、開発した全反射顕微鏡を用いて、インクレチンGLP-1がL細胞から分泌される瞬間を直接捉えることに世界で始めて成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

開発した角度プローブによりz方向の分解能が向上し、より多次元での膜動態の光学顕微鏡観察が可能になる。また、細胞膜以外のオルガネラや個別の分子に着目することで、これまで生物学研究ではあまり注目されてこなかった「角度」と「向き」に関する様々な情報を収集することができる。将来的には本研究成果を基盤として「角度」と「向き」に着目した新しい生物学の新領域の開拓が期待される。また、今回開発したインクレチン分泌プローブにより、L細胞からGLP-1が分泌される瞬間を捉えることに成功した。現在の社会課題になりつつある糖尿病に対し、インクレチン分泌促進という観点からの新たな解決策探索への応用も期待できる。

研究成果の概要（英文）：A goniometric biosensor was developed by adding two types of membrane localizing sequences at two sites on the green fluorescent protein. The cell membrane and the fluorescent protein chromophore are fixed at a position orthogonal to each other. A similar biosensor was also developed for the red fluorescent protein. In addition, a total-reflection polarized fluorescence microscope was set up to excite samples with regulated anisotropic light and to detect emission lights through spectroscopy based on the polarization. Using these techniques, we established a method to capture changes in the angle of the membrane as changes in fluorescence intensity and succeeded in visualizing the very early process of receptor-mediated endocytosis. In addition, using the total reflection microscope we developed in this study, we succeeded for the first time in the world in direct capturing the secretion of the incretin GLP-1 from L cells.

研究分野：細胞生理学

キーワード：蛍光顕微鏡 偏光顕微鏡 等方性分解能 蛍光タンパク質 異方性

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ダイナミックな生命現象を理解するためには、空間軸 ( $x, y, z$  軸) と時間軸 ( $t$  軸) のすべてに関する情報が必要である。しかし、技術的限界からこの4次元情報すべての高分解能計測は不可能であり、先人の研究者はそのどれかを捨てる「トレードオフ」を許容することで、自らが求める観察を実現し、多くの成果を挙げてきた。したがって、技術革新によるトレードオフへの挑戦は我々研究者が持つ共通のモチベーションあるいは好奇心の一つである。例えば2014年にノーベル化学賞を受賞した超解像顕微鏡は、光学顕微鏡の回折限界 (200~300 nm の  $xy$  分解能) を超えた高分解能観察 (50~100 nm 程度) を、ある程度の時間分解能で行うことを可能にした。しかしながら、 $z$  軸方向の分解能 (通常の光学顕微鏡で 700 nm、最新の一般的超解像顕微鏡で 300 nm 程度) は未だ改善の余地がある。

実は、生命を理解する上で  $x, y, z, t$  軸と同じくらい重要にもかかわらず、これまであまり注目されてこなかった要素がある。それは「向き」あるいは「角度」に関する情報である。角度の重要性を容易に理解することができる実生活の簡単な例を挙げると、例えば、同時刻の同じ空間内に二人の人が居たとする。この両者がお互いに向かい合っているか背中を向けているかにより、両者の関係性は大きく異なる。隣り合う二つの席に座る二人が、時折顔を見合わせれば知り合いであろうし、ほとんど違う方向を見ていれば他人であろう。しかし、従前の生物学等の研究においてこの状況は「同距離」「同濃度」という評価になるため、これらは等価として扱われてきた。

### 2. 研究の目的

本研究では、蛍光偏光の異方性を用いて分子の「向き」を測定することで、生命現象における「角度」に関する情報を取得する技術を開発する。それを用いて、これまでの光学顕微鏡では観察できなかった膜の曲率変化を、高い時間分解能 (秒レベル) で観察する。角度の要素を含めることで、エンドサイトーシスの初期過程等、 $z$  軸方向において 100 nm 程度の範囲内で生じる細胞膜のダイナミクスを可視化できる「等方性分解能顕微鏡」を開発し、膜動態の分子メカニズムを解明するための基盤を構築する。また、「角度」の情報を画像化するため、1) 角度情報をセンスする「角度レポーター分子」と、2) 角度レポーターの情報を画像化する光学系 (顕微鏡) を開発する。さらに、開発した顕微鏡を用いて新たな生命現象の可視化に挑戦する。

具体的にはインスリン分泌作用を有するホルモンであるインクレチンの分泌過程を直接可視化する。インクレチンは、食事摂取に反応して分泌される消化管ホルモンで、膵臓  $\beta$  細胞からのインスリン分泌を促進する。哺乳類では、グルコース依存性インスリン分泌促進ポリペプチド (GIP) とグルカゴン様ペプチド 1 (GLP-1) という二つのインクレチンが報告されている。そのうち GLP-1 は、耐糖能の維持に重要な役割を果たすことが証明されている。GLP-1 は、腸管 L 細胞において、シグナルペプチダーゼによるシグナルペプチドの切断とプロホルモンコンバーターゼ 1/3 (PC1/3) を介した翻訳後処理により、前駆体のプログルカゴンから合成され。GLP-1 分泌促進因子として、グルコース、グルタミンなどのアミノ酸、脂肪酸、胆汁酸など様々な物質が、また、KCl やフォルスコリンなど細胞内因子が知られている。細胞内因子は、それぞれ脱分極や cAMP レベルの上昇を介して、GLP-1 分泌を促進する。

これまでも蛍光タンパク質を用いたホルモン分泌過程の可視化に取り組んだ報告がある。例えば、インスリンや成長ホルモンの細胞内局在や分泌過程は、蛍光融合タンパク質を用いて可視化できる。また、ヒト成長ホルモン、神経ペプチド Y、組織プラスミノゲンアクチベーターなど、分泌顆粒で共局在する因子を用いた間接的手法も用いられている。GLP-1 のエキソサイトーシス解析にもそれら間接法が活用されてきた。しかし、GLP-1 に蛍光タンパク質を直接付加した GLP-1 と蛍光タンパク質の融合タンパク質を用いた可視化例は、存在しない。これは、GLP-1 の複雑な翻訳後修飾過程のため、GLP-1 に単純にタグを付けると、本来の GLP-1 の局在や機能が損なわれるためと考えられる。そこで本研究では、GLP-1 ペプチドの途中に蛍光タンパク質を挿入することで、GLP-1 の蛍光融合タンパク質の開発を試み、生細胞での GLP-1 のエキソサイトーシスを可視化することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 角度レポーターの開発

細胞膜の曲率 (細胞膜の変形) を計測するための角度レポーターを開発する。蛍光タンパク質は発色団の向きに平行 ( $\beta$ -barrel の長軸にほぼ直行) な偏光に特異的に励起される異方性を示す。したがって、蛍光タンパク質の相対的な向きを細胞膜に対して固定することで、偏光により細胞膜の向きを検出することができる。以上の予備的知見をもとに、遺伝子工学的な手法を用いることで、蛍光タンパク質の二箇所に膜局在化シグナルを付加し、要件を満たす角度センサーを創出する。また、緑色蛍光タンパク質に加えて、他のカラーバリエーションを用いた角度センサーの多色化を実現する。

## (2) 偏光全反射顕微鏡の開発

### 照明光学系の開発

光が屈折率の高い媒質から低い媒質(ガラスから水がこれに当たる)に臨界角を超える角度で入射すると、媒質の界面で全反射する。この全反射面近傍ではエネルギーのしみ出しによりエバネセント場が形成される。全反射顕微鏡はエバネセント場(ガラスと培地の境界面)に存在する蛍光分子のみを特異的に励起して、背景光を低く抑えた高いシグナルノイズ比を実現する観察手法である。この励起光源として使用するレーザーは直線偏光を有している。これをガルバノミラーで円形に偏位させ、後焦点面と共役の位置に軸対称偏光素子という特殊な光学素子を介することで、細胞膜と平行な偏光成分のみからなる光(*s-pol*)あるいは垂直な偏光成分のみからなる光(*p-pol*)で励起する照明法を実現する。

具体的にはレーザー光源 COMPACT-488/561 (World Star Tech 社、カナダオンタリオ州マーカム)のビーム径を2枚のアクロマティックレンズ(Thorlabs 社、米国ニュージャージー州ニュートン)を用いて4倍に拡大した。2軸ガルバノミラー(Thorlabs)は、2×拡大システムと結像レンズ( $f=200\text{ mm}$ 、Thorlabs)を介して焦点面と共役になるように配置した。顕微鏡筐体はオリンパス社(東京)製 IX81 を、対物レンズには同じくオリンパス社製の全反射用対物レンズ UPLAPO100XOHR(倍率100倍、開口数1.5)を、ダイクロイックミラーには Di03-R488/561-25x36 (米国ニューヨーク州ロチェスター)を、また、中央精機社(東京)の電動ステージを使用した。後焦点面と共役の位置には軸対称偏光素子である 1/2 波長光渦リターダー(ソーラボ社特注)を配置した。

### 観察光学系の開発

フィルター切り替えには BioPoint MAC 5000 filter and shutter control unit(Ludl Electronic Products 社、米国ニューヨーク州ホーソーン)を用いた。1次結像の位置に視野を分割するためのスリットを配置し、リレーレンズで光路を平行化した上で 1/2 波長板と偏光ビームスプリッターにより、0度、45度、90度、135度の偏光に分光したのち、偏光プリズムで合成し、チューブレンズで再度2次結像面に配置するカメラセンサーに結像させた。撮像装置としては Oxford Instruments 社(英国北アイルランド・ベルファスト)製の電子増倍型電荷結合素子(EMCCD)カメラ iXon Ultra 888 を使用した。これにより膜と角度センターの相対角度を蛍光強度の差により検討した。生細胞イメージングはカメラを一次結像面に直接配置することで行った。エミッションフィルターには FF01-512/630-25 (Semrock 社製)を用いた。なお、顕微鏡および周辺機器の制御には MetaMorph ソフトウェア(Molecular Devices 社、米国カリフォルニア州サンノゼ)を、試料周囲の温度および環境保持には ChamSlide インキュベーターシステム(Live Cell Instrument 社、韓国ソウル)。

## (3) 角度レポーターと偏光全反射顕微鏡を用いた膜の傾きの観察

HEK293T 細胞(CRL011268)、Cos-1 細胞(CRL-1650)および HeLa 細胞(CCL-2)に、ポリエチレンイミンを用いて角度レポーター発現プラスミドを導入した。24時間後、上記の偏光全反射顕微鏡で細胞を観察した。生きた細胞でのエンドサイトーシス可視化時には、観察10分後に上皮増殖因子で細胞を刺激した。

## (4) インクレチン GLP-1 分泌の可視化

### 蛍光 GLP-1 の作製

プログルカゴンのシグナルペプチド(sp)を含む、あるいは含まない GLP-1 の cDNA 配列を合成し、pFxxII ベクターにサブクローニングした。蛍光タンパク質のコード配列を、GLP-1 の 26 番目のリジンと 27 番目のバリンの間に挿入した。蛍光タンパク質としては、緑色蛍光タンパク質、スーパーフォルダー緑色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質(mCherry、mOrange、DsRed)を用いた。分泌顆粒マーカー用の発現プラスミドは Addgene から購入した。

### L 細胞モデル細胞株

L 細胞のモデル細胞として広く用いられている GLUTag 細胞および STC-1 細胞は、それぞれ Dr. J. Drucker (カナダトロント大学)および Dr. Hanahan (米国カリフォルニア大学サンフランシスコ校)から譲受して使用した。なお、GLUTag 細胞はマウス大腸腺腫に由来し、STC-1 細胞はマウスの十二指腸の内分泌腫瘍に由来し、GLUTag 細胞は L 細胞と同様の分泌プロファイルを示すが、STC-1 細胞は GLP-1 以外にも GIP、コレシストキニン、ソマトスタチンなど L 細胞では分泌されないいくつかのペプチドホルモンを分泌することが知られている。

細胞は、10%ウシ胎児血清および 1%ペニシリン/ストレプトマイシンを含むダルベッコ変法イーグル培地を用い、37°C、5%炭酸ガスの湿潤環境下で培養した。遺伝子導入にはサーモフィッシュャー社の Lipofectamine 3000 またはポリエチレンイミンを用いた。

### 試薬と抗体

D-グルコースと L-グルタミンはシグマアルドリッチ社(米国ミズーリ州セントルイス)から購入した。塩化カリウムおよびフォルスコリンは、それぞれ富士フイルム和光純薬株式会社(大阪)および Focus Biomolecules 社(米国ペンシルバニア州プリマス・ミーティング)から購入した。抗 GLP-1 マウスモノクローナル抗体(#ab23472)は Abcam 社(英国ケンブリッジ)から購

入した。西洋わさびペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス免疫グロブリン G は Jackson ImmunoResearch 社 (米国ペンシルバニア州ウエスト・グループ) から購入した。

#### イムノプロット解析

細胞を NP40 溶解バッファー [ 50 mM トリス塩酸 (pH 7.4) , 150 mM 塩化ナトリウム、0.5% ノニデット P-40、5 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) , 10% グリセロール、1 mM オルトバナジン酸ナトリウム、1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル (PMSF) , 100 mM フッ化ナトリウム、10 µg/mL ロイペプチン、10 µg/mL アプロチニン ] 中で 30 分、氷上で可溶化した。細胞可溶化液を 20,400 g、4°C で 5 分間遠心分離して得られた上清を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に付した。分離したタンパク質をポリビニリデン・ジフルオリド膜に転写し、イムノプロット解析を行なった。免疫複合体は ECL ウェスタンブロットティング検出試薬 (GE Healthcare 社、米国イリノイ州シカゴ) と MIIS イメージングシステム (佐倉市) を用いて検出した。

#### 共焦点顕微鏡による観察

GLUtag 細胞に発現ベクターを導入し、導入 24 時間後に培地をフェノールレッド不含 DMEM/F12 (サーモフィッシャー社) に交換したのち Fluoview FV10i 共焦点顕微鏡および 60×対物レンズ (開口数 = 1.35) (ともにオリンパス社製) を用いて撮像した。

#### 全反射蛍光顕微鏡法による分泌過程の可視化

ライブセルイメージングには、コラーゲンコートした直径 35mm のガラス底ディッシュ (松波硝子、岸和田市) に植えた細胞に、spGLP-1-sfGFP の発現ベクターをトランスフェクションした。TIRF イメージングは、ハックス平衡塩溶液 (HBSS ; 20 mM HEPES pH 7.2, 114 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.16 mM MgSO<sub>4</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 25.5 mM NaHCO<sub>3</sub> および 0.2% bovine serum albumin 含有) 中で刺激因子存在または非存在下で実施された。画像は 50ms ごとに 10 分間取得した。融合イベントの数は手動でカウントした。画像解析は Metamorph ソフトウェアで行った。

## 4. 研究成果

緑色蛍光タンパク質の 171-174 アミノ酸の位置にパルミチン酸化モチーフを、C 末端にイソプレニル化配列を付加し、二ヶ所で細胞膜にアンカーした角度レポーターを作製した。また赤色蛍光タンパク質 mCherry でも同様の角度レポーターを作製した。また、C 末端のイソプレニル化配列をプレクストリン相同領域に置換した角度センサー群も試作した。

この角度センサーの発現プラスミドを HEK293T 細胞に導入し、4 分割偏光観察用光学系を用いて観察したところ、角度により蛍光強度が変化することが確認された。このことは当初の予想通り細胞膜に対して蛍光タンパク質が平行に、その発色団は直行していることを示している。

次に、全反射照明を用いて基底側の細胞膜を特異的に励起するとともに、軸対称偏光素子への入射光の偏向の角度を変えることで、サンプル面の偏光成分が平行な場合と (s-pol) や垂直な成分のみからなる光 (p-pol) を切り替えて観察した。すると、s-pol での蛍光強度に比べて p-pol での蛍光強度が大きかった。また、連続的に偏向を変化させることで蛍光強度も連続的に変化した。つまり、当初の計画通り、膜の角度の変化を蛍光強度の変化として捉えることができる手法が確立できた。

この実験系を用いて、エンドサイトーシス初期に細胞膜が貫入する様子の可視化を試みた。Cos-1 細胞にこの角度プローブを発現させ、基底膜を偏光全反射顕微鏡で s-pol のみで励起し、10 秒ごとにタイムラプス観察した。観察開始 10 分後に蛍光標識した上皮増殖因子を添加したところ、増殖因子が吸着した部位で蛍光強度の上昇の開始が観察された。つまり受容体と結合した増殖因子を取り込む受容体依存性エンドサイトーシス超初期過程を可視化することに成功した。

次に、構成した顕微鏡を用いてインスリン分泌促進する腸管ホルモンであるインクレチン GLP-1 分泌過程の可視化するため、GLP-1 と蛍光タンパク質の融合タンパク質を開発した。GLP-1 ペプチドは生合成過程で N 末 C 末ともにプロテアーゼによる切断を受けるため、GLP-1 配列の途中にタグする方針とした。GLP-1 作動薬であるリラグルチドとデュラグルチドは GLP-1 配列の途中や修飾やスペーサー配列が挿入されているので、それらの分子構造を参考に 26 番目と 27 番目のバリンの間に赤色蛍光タンパク質 mCherry を挿入することにした。また GLP-1 配列としてプログルカゴンのシグナルペプチドを含むものと含まないものを準備した。GLUtag 細胞にこれらの発現ベクターを遺伝子導入し、GLP-1-mCherry の細胞内局在を顕微鏡観察したところ、N 末端にシグナルペプチドを持つ融合タンパク質 (spGLP-1-mCherry) は顆粒状の局在を示した。また、この顆粒は分泌顆粒マーカーである NPY や tPA と共同在化したが、初期エンドソームマーカーである Rab5 とは異なる局在であった。一方、シグナルペプチドを持たない GLP-1-mCherry とシグナルペプチドと mCherry の融合タンパク質は mCherry 単体と同様に主に細胞質に分布していた。このことから、シグナルペプチドと GLP-1 配列の両方が融合タンパク質の分泌顆粒への局在に必要であることが示された。イムノプロット解析では、spGLP-1-mCherry を発現する GLUtag 細胞の細胞溶解液には、プロセッシング後とプロセッシング前に相当するそれぞれ約 30kDa と 34kDa の二つのバンドが見られた。一方、PC1/3 を発現していない HEK293T 細胞では、約 34kDa のバンドのみが認められた。以上の結果から、GLUtag 細胞において spGLP-1-mCherry は分泌顆粒にソーティングされ、特異的酵素によるプロセッシングを受けていることが示された。

次に、蛍光 GLP-1 のカラーパレットを広げることを目指し、mCherry に加えて、緑色蛍光タンパク質 (EGFP) 、スーパーフォルダー緑色蛍光タンパク質 (sfGFP) 、黄色蛍光タンパク質 (Venus) )

赤色蛍光タンパク質( mOrange、DsRed )を使用した。このうち、spGLP-1-spGFP と spGLP-1-Venus は spGLP-1-mCherry と同様に顆粒状局在を示したが、他の蛍光タンパク質を用いた場合は細胞質へのびまん性局在あるいはチューブ状の局在を呈した。sfGFP、Venus、mCherry は蛍光タンパク質の中でもフォールディングが高く、結果的に「明るい」ことが知られている。このことは、spGLP-1 と蛍光タンパク質の融合タンパク質が分泌顆粒に局在するためには、より高いフォールディング効率が必要であることを示唆している。

最後に、全反射顕微鏡により、生細胞における GLP-1 分泌を単一分泌顆粒の分解能で可視化することを目指した。全反射顕微鏡でエキソサイトシスをフラッシュイベントとして視覚的に識別するためには、蛍光タンパク質の蛍光強度が pH 6 付近で大きく変化することが望ましい。Venus と sfGFP はこの条件を満たしており、実際、spGLP-1-sfGFP 発現細胞ではフラッシュイベントを観察することができた。フラッシュイベントと GLP-1 分泌は、グルコース、グルタミン、フォルスコリン、 $\alpha$ -リノレン酸の処理により有意に促進された。したがって、spGLP-1-sfGFP は、基礎的および栄養誘導的な GLP-1 分泌の両方を可視化することができた。

近年、原子間力顕微鏡やイオンコンダクタンス顕微鏡を用いた細胞膜動態観察が注目を集めている。これらのイメージングモダリティは分解能が光学顕微鏡の 10 倍程度あり、従前捉えることができなかったナノレベルの膜の動きが目で見えるようになってきた。本研究で開発した角度プローブによって、 $z$  方向の光学顕微鏡の分解能向上が実現し、より多次元での膜動態観察が可能になると期待できる。一方、上記の原子間力顕微鏡やイオンコンダクタンス顕微鏡は走査型プローブ顕微鏡ゆえ細胞表面観察には力を発揮するものの細胞内部は原理上未達領域である。したがって、細胞膜以外のほかオルガネラや個別の分子に着目し、本研究で開発した技術を応用することで、これまで生物学研究ではあまり注目されてこなかった「角度」と「向き」に関する様々な情報を収集することができる。将来的には本研究成果を基盤として「角度」と「向き」に着目した新しい生物学の新領域の開拓を目指したい。

今回、新たに開発した spGLP-1 と蛍光タンパク質の融合タンパク質を用いて、L 細胞モデル細胞からの GLP-1 分泌を可視化することに成功した。蛍光タンパク質を N 末端や C 末端ではなく、GLP-1 の途中に付加することは、GLP-1 の機能を維持し、分泌顆粒への移行を確実にするために重要であると思われる。加えて、蛍光タンパク質のフォールディング効率が高いこと、および適切な pH 感受性を有することが、分泌顆粒に局在し全反射顕微鏡としてその分泌がフラッシュイベントとして捉えられることに重要であることも明らかとなった。これにより、GLP-1 分泌のより詳細なメカニズムの解明が進むものと期待される。

また、今回開発した spGLP-1 と蛍光タンパク質の融合タンパク質は直接培養液中に分泌される。したがって単に培養上清の蛍光強度を測定するだけで、基礎分泌量および KCl やフォルスコリン等分泌促進因子により誘導された分泌量を定量することが可能である。これまで酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) がホルモンや神経伝達物質の分泌量の解析に汎用されてきた。今回開発したプローブを用いた分泌量の測定は、特異的な抗体を必要とせず、かつ洗い等工程も不要で、培養上清液の蛍光強度を測定することにより、分泌量を迅速かつ簡便に決定できるため、安価かつ迅速な薬剤スクリーニングへの適用も期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 藤岡容一朗, 天野麻穂, 大場雄介	4. 巻 280
2. 論文標題 ウイルスの細胞侵入を視る	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 922-925
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 吉田藍子, 藤岡容一朗, 天野麻穂, 大場雄介	4. 巻 37
2. 論文標題 弱い相互作用のインターフェースと細胞応答の当時可視化を実現するイメージング技術	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Drug Delicery System	6. 最初と最後の頁 102-111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujioka Y, Kashiwagi S, Yoshida A, Satoh A, Fujioka M, Amano M, Yamauchi Y, Ohba Y	4. 巻 -
2. 論文標題 A method for the generation of pseudotyped virus particles bearing SARS coronavirus spike protein in high yields	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2021.07.30.454063	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takeuchi Y, Narumi R, Akiyama R, Vitiello E, Shirai T, Tanimura N, Kuromiya K, Ishikawa S, Kajita M, Tada M, Haraoka Y, Akieda Y, Ishitani T, Fujioka Y, Ohba Y, Yamada S, Hosokawa Y, Toyama Y, Matsui T, Fujita Y	4. 巻 30
2. 論文標題 Calcium Wave Promotes Cell Extrusion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 670 ~ 681.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2019.11.089	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kashiwagi S, Fujioka Y, Kondo T, Satoh A, Yoshida A, Fujioka M, Sasajima H, Amano M, Teshima T, Ohba Y	4. 巻 44
2. 論文標題 Localization of BCR-ABL to Stress Granules Contributes to Its Oncogenic Function	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 195 ~ 204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.19033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kashiwagi S, Fujioka Y, Satoh A, Yoshida A, Fujioka M, Nepal P, Tsuzuki A, Aoki O, Paudel S, Sasajima H, Ohba Y	4. 巻 44
2. 論文標題 Folding Latency of Fluorescent Proteins Affects the Mitochondrial Localization of Fusion Proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 183 ~ 194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.19028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Maishi N, Kikuchi H, Sato M, Nagao-Kitamoto H, Annan Dorcas A., Baba S, Hojo T, Yanagiya M, Ohba Y, Ishii G, Masutomi K, Shinohara N, Hida Y, Hida K	4. 巻 20
2. 論文標題 Development of Immortalized Human Tumor Endothelial Cells from Renal Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4595 ~ 4595
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20184595	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kondo T, Fujioka M, Fujisawa S, Sato K, Tsuda M, Miyagishima T, Mori A, Iwasaki H, Kakinoki Y, Yamamoto S, Haseyama Y, Ando S, Shindo M, Ota S, Kurosawa M, Ohba Y, Teshima T, The North Japan Hematology Study Group (NJHSG)	4. 巻 110
2. 論文標題 Clinical efficacy and safety of first-line nilotinib therapy and evaluation of the clinical utility of the FRET-based drug sensitivity test	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 482 ~ 489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-019-02696-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 佐藤 絢、藤岡容一郎、大場雄介
2. 発表標題 ミトコンドリア - エンドソーム間相互作用によるエンドソーム成熟化促進機構
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤岡容一郎, 佐藤 絢, 吉田 藍子, 天野麻穂, 皆川慶嘉, 田端和仁, 野地博行, 大場雄介
2. 発表標題 インフルエンザウイルスの宿主細胞における感染成立機構の解析
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柏木 彩花、藤岡 容一郎、佐藤 絢、吉田 藍子、藤岡 真理、Nepal Prabha、続木 惇、青木 大空、Paudel Sarad、笹島 仁、大場 雄介
2. 発表標題 蛍光タンパク質の成熟促進化はミトコンドリアマーカ-本来の局在を阻害する
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 A. Yoshida A, N . Sakai, N . Takahashi, S . H . Yoshimura、 Y . Ohba
2. 発表標題 Live-cell imaging and analysis of the plasma membrane dynamics during clathrin-mediated endocytosis by high-speed atomic force microscopy
3. 学会等名 ASCB EMBO 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 A. O. Satoh, Y. Fujioka, H. Sasajima, S. Paudel, A. Nanbo, Y. Ohba
2. 発表標題 Functional Analysis of Mitochondria-endosome Interaction in the Regulation of Endocytosis
3. 学会等名 ASCB EMBO 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Amano, Y. Fujioka, A. O. Satoh, K. Horiuchi, A. Yoshida, H. Sasajima, C. Obuse, Y. Ohba
2. 発表標題 Irs4 Mediates Egf-dependent Upregulation of Endocytosis through the Recruitment of Ras-pi3k Complex to the Endosome.
3. 学会等名 ASCB EMBO 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤岡 容一郎、佐藤 絢、吉田 藍子、笹島 仁、Sarad Paudel、皆川 慶嘉、田端 和仁、野地 博行、大場 雄介
2. 発表標題 インフルエンザウイルス粒子の細胞取り込み機構の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 天野 麻穂、藤岡 容一郎、佐藤 絢、堀内 浩水、吉田 藍子、笹島 仁、小布施 力史、大場 雄介
2. 発表標題 IRS4はRas PI3K複合体のエンドソーム局在化を介して依存性エンドサイトーシスを制御する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Aiko Yoshida、Nobuaki Sakai、Naoki Takahashi、Shige H. Yoshimura、Yusuke Ohba
2. 発表標題 Probing in vivo dynamics of plasma membrane during clathrin-mediated endocytosis
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大場雄介
2. 発表標題 電位依存性Ca <sup>2+</sup> チャネルはシアル酸化依存的にA型インフルエンザヘマグルチニンと結合し宿主細胞へのウイルス粒子の取り込みを制御する
3. 学会等名 第92回日本生化学会学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田藍子、大場雄介
2. 発表標題 クラスリン依存性エンドサイトーシスに伴う細胞膜動態のライブセル可視化解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大場雄介
2. 発表標題 細胞膜動態のcorrelative imaging
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田 藍子、酒井 信明、高橋 直希、吉村 成弘、大場 雄介
2. 発表標題 高速原子間力顕微鏡によるエンドサイトーシスに伴う細胞膜の形状変化の ライブセルイメージング
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 絢、藤岡 容一朗、笹島 仁、南保 明日香、大場 雄介
2. 発表標題 ミトコンドリアポアタンパク質を介したミトコンドリア _ エンドソーム間 相互作用によるエンドサイトーシス制御機構
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柏木 彩花、藤岡 容一朗、笹島 仁、大場 雄介
2. 発表標題 蛍光タンパク質の成熟促進化はオルガネラマーカー本来の局在を阻害する
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大場雄介
2. 発表標題 Ras-PI3Kシグナルによるエンドサイトーシスの制御機構
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 シュードタイプウイルス集団及びその製造方法	発明者 大場雄介, 藤岡容一 朗	権利者 北海道大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-125781	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	藤岡 容一郎  (Fujioka Yoichiro)  (70597492)	北海道大学・医学研究院・講師   (10101)	
研究 分担者	佐藤 絢  (Sato Aya)  (90854662)	北海道大学・医学研究院・学術研究員   (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	Marine Biological Laboratory		