

「統合 1 細胞解析のための革新的技術基盤」
平成 27 年度採択研究代表者

H27 年度 実績報告書

渡邊 直樹

京都大学大学院生命科学研究科（京都大学医学研究科 兼務）
教授

多重高密度超解像顕微鏡IRISによる多分子複合体マッピング

§ 1. 研究実施体制

(1) 「IRIS」グループ

- ① 研究代表者: 渡邊 直樹（京都大学大学院生命科学研究科、教授）
- ② 研究項目: 多重高密度標識超解像顕微鏡 IRIS を広く生命科学研究、病理診断に応用できるように、以下の項目について研究開発を進める。同時に、IRIS の技術を応用した医学生命科学課題に取り組むことで、多種の標的分子を細胞や組織標本の中で、多重超解像解析を可能とする顕微鏡解析プラットフォームの樹立を目指すとともに、技術応用の可能性を拡張することを目指す。
 - (i) 多色超解像顕微鏡 IRIS 用プローブの迅速開発法の樹立。
 - (ii) 標的を標識するための IRIS タグとそのプローブの開発。
 - (iii) 3D 化と自動化に向けた組織切片作製法と顕微鏡光学系の改良。

§ 2. 研究実施の概要

生体分子は、様々な相互作用を介し多様な分子複合体を形成しつつ生命機能を支えている。われわれの研究グループは、先行研究において、高密度標識による高精細画像と無制限の多重染色を実現した超解像蛍光顕微鏡法 IRIS の開発に成功した (Kiuchi et al. *Nature Methods* 12: 743-746, 2015)。これは、2014 年ノーベル賞を受賞した超解像顕微鏡の「超解像ジレンマ」と呼ぶ問題を克服し、その能力を拡張する新コンセプトの超解像顕微鏡である。

既存の PALM/STORM 法では、12 nm ほどの蛍光抗体のサイズや外来から導入可能な蛍光分子の密度の上限から、原理的に解像度を 20 nm 以下にすることは困難である。現に、細胞構造がまだらに染色されることが問題となっていた。それに対し、われわれの IRIS 法は、迅速に結合解離を繰り返すプローブを用いて標的タンパク質を可視化するアイデア (図1) により、従来法にない精細かつ忠実な画像が得られるようになった。さらにプローブを洗い流して順次別のプローブと交換することで、上限のない種類のタンパク質の分布を同一標本内で観察できる (図2)。

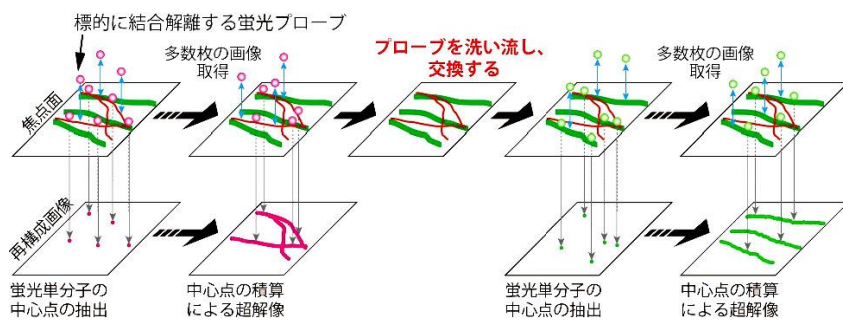


図1 IRIS では、標的に結合解離を繰り返す蛍光標識プローブを用いるため、高密度の分子配置データの取得と、無制限の種類の分子の分布捕捉が可能。

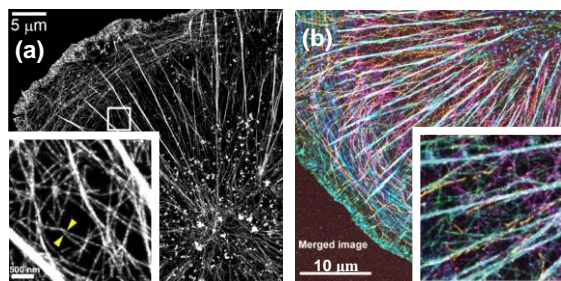


図2

- (a) 細胞内アクチン線維の高密度標識超解像。
- (b) 4種類の細胞構造(アクチン、微小管、中間径フィラメント、接着斑)を2つの焦点面で可視化した7重染色 IRIS 像。

IRIS 法は、通常の免疫組織学的な手法に比べ、①無制限の多重染色、②高密度標識による忠実な超解像画像、③狭い領域にある複数分子配置の正確な可視化、④細胞や組織全体を俯瞰、⑤3次元超解像への拡張性、⑥タンパク間相互作用のマッピングといった様々なメリットをもたらすことが期待される。本研究では、この IRIS 法の応用範囲を拡張することで、細胞研究、病態研究のための次世代の研究プラットフォームの構築を目標とする。その実現に向け、多種の分子が織りなす相互作用を可視化するための IRIS 用プローブライブラリーを構築するとともに、IRIS に最適化された自動蛍光顕微鏡の開発、病理組織標本を用いた IRIS 撮影法の確立など様々な改良を行う。これらの技術的発展とともに、細胞レベル、個体レベルの種々の疾患モデルへと応用した研究を展開することで、生体内で機能する分子複合体の形成過程を、細胞から組織まで全体を俯瞰しつつ分子レベルのスケールで網羅的に可視化解明する研究を実現、実証し、次世代の細胞研究・病理診断へ向けた技術革新を展開する。