

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
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: 既存の超解像顕微鏡の技術的な限界を超えた、無制限の多重染色と高密度画像を実現する超解像蛍光顕微鏡法 IRIS を発展させ、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、いくつかの医学・生命科学上の重要課題に取り組むことで、多種分子の分布や複合体形成を単一の細胞・組織標本の中で、多重超解像可視化解析する研究プラットフォームを樹立するとともに、その科学技術としての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 用プローブ迅速作製法の開発と IRIS プローブの順次作製。
 - (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、多様な分子複合体を形成しつつ生命機能を支えている。本研究グループは、高密度標識による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、「超解像ジレンマ」と呼ばれる問題を克服し、性能を飛躍的に向上させる技術である。従来の蛍光抗体や蛍光タンパク質を用いた標識法は、蛍光分子の密度や量が限られており、蛍光分子が発する光子の数にも限界がある。そのため、たとえ撮像装置の性能が良くなっても、データ密度には限界があり、画像の分解能も制限されてしまう。一方、IRIS 法は、迅速に結合解離を繰り返すプローブを順次交換・追加しながら、標的タンパク質の位置を検出する新手法(図1)を用いる。IRIS 法では、蛍光プローブを無尽蔵に利用できるため、緻密で忠実度の高い超解像画像が得られる。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、多種類のタンパク質を同一標本内で観察できる。

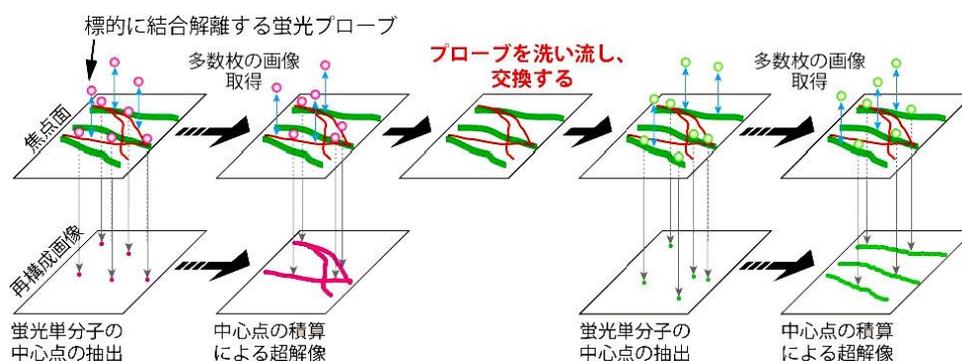


図1 標的に結合解離を繰り返す蛍光標識プローブを用いるIRIS法では、高密度の分子配置データの収集と、無限の種類 of 分子の分布捕捉が可能。蛍光プローブを順次追加できるため、高輝度照明を組合せた高精度分子ローカリゼーションの実現や、3次元超解像への拡張にその特長を生かすことが可能。

本研究では、この IRIS 法の応用範囲を拡張に向け、①多種の分子に対する IRIS 用プローブライブラリーを構築するとともに、②IRIS に最適化された自動蛍光顕微鏡の開発、③病理組織標本を用いた三次元 IRIS イメージングの確立など改良を行う。①については、抗体技術を応用した、任意の標的分子に対して迅速に結合・解離する IRIS プローブの作製プロトコルを樹立した(特許申請中)。現在、生体構造の組換えが関わる発生・分化・病態の過程を可視化するために、いくつかの生体分子に対する IRIS プローブの作製を進めている。②③については、①のプローブスクリーニングに適した半自動顕微鏡をセットアップするとともに、3次元の分子ローカリゼーション法に適した比較的簡易な照明系 2 種類と、球面収差を補正し標本深部への焦点合わせとZ軸方向の分子位置測定が可能で補償光学系を備えた顕微鏡を構築した。現在、これらの性能検証とセッティング最適化、および改良を進めている。