

渡邊 直樹

京都大学大学院生命科学研究科
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標識による高忠実度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、病理診断への応用を目指す。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利用法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
 - (iv) IRIS 法の原理を応用した網羅的遺伝子発現解析など、発展的技術の開発

§ 2. 研究実施の概要

多くの生命現象は、細胞の形の変化とリンクする。そのなかで生体分子は、多様な分子複合体を形成する。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、既存の超解像顕微鏡が原理的に抱える問題～「斑な」標識による画像劣化を根本的に克服する技術である。IRIS 法では、迅速に結合解離を繰り返す蛍光プローブを高感度顕微鏡で 1 分子可視化しつつ、標的タンパク質の位置を検出する、新しい分子ローカリゼーション法 (図1) を用いる。IRIS 法では、蛍光プローブの量と種類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つつ順次異なるプローブに交換することで、原理的に無制限の種類のタンパク質を同一標本内で観察できる。

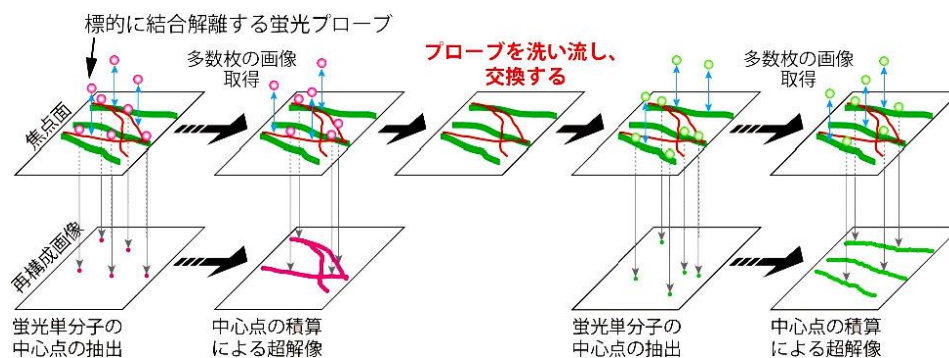


図1 標的に結合解離を繰り返す蛍光標識プローブを用いる超解像顕微鏡法 IRIS の概要

本研究では、IRIS 法の応用拡大を目標に、①多種の分子に対する IRIS 用プローブライブラリー、②IRIS に最適化された自動蛍光顕微鏡、③病理組織標本の三次元 IRIS イメージング、の確立へ向けた種々の改良を進めている。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 (国際特許申請中)、現在、複数のマウス由来タンパク質分子に対する IRIS プローブの作製を進めている。その過程で、ケースによっては、インビトロの結合アッセイの指標だけでは、プローブの優劣の判断が困難であることが判明し、更なる手法の改良・開発を進めている。②③については、三次元の分子ローカリゼーション法に適しつつ操作がシンプルな照明系や、球面収差の補正と Z 軸方向の分子位置測定が可能な補償光学系を備えた顕微鏡を導入し、最適化および改良を進めてきた。加えて、一定厚以上の組織標本に残存する自家蛍光や光散乱による悪影響を軽減する手法として、近赤外領域の分子ローカリゼーションに適した蛍光色素のスクリーニングを行い、2 種類の光耐性色素を同定した [Yamashiro and Watanabe *Sensors (Basel)* 17: E1545, 2017; および関連する総説 Yamashiro and Watanabe *Sensors (Basel)* 17: E1585, 2017]。また、共同研究として細胞骨格形成の二次元数理モデルを構築した [Ryan, G.L et al. *Cytoskeleton (Hoboken)* 74: 490-503, 2017]。元来、生細胞内の分子動態解析への応用を目指した成果であるが、固定標本での深部構造の IRIS 法による可視化と、IRIS での可視化対象として期待される細胞構造の三次元構築機構の解明においても、有用な実験・解析ツールを提供することが期待される。