

渡邊 直樹

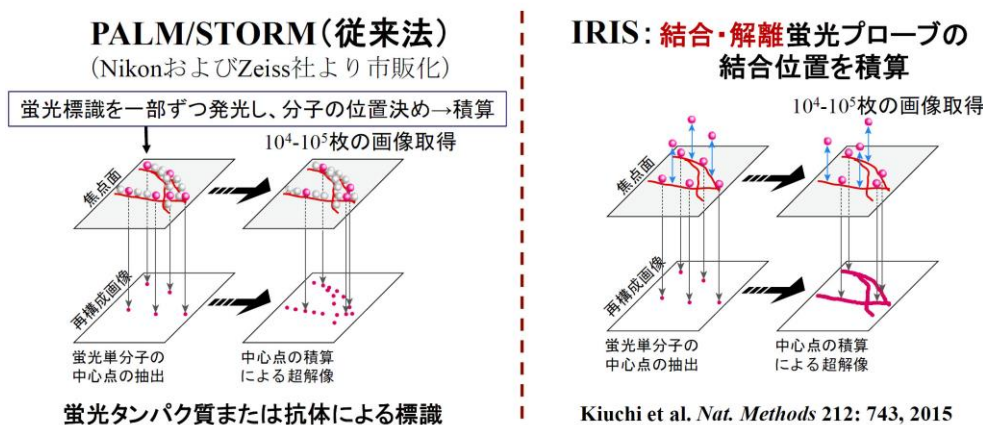
京都大学大学院生命科学研究科 (京都大学医学研究科 兼務)
教授

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. 研究成果の概要

生命現象の多くは、生体分子の複合体や超分子構造の組換えによって駆動される、細胞や組織の形態変化を伴って発現する。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する超解像蛍光顕微鏡法である IRIS を発案し、その潜在能力を実証した (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、すなわち「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(下図参照)。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画像が得られるとともに、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の配置決定(およびその 3 次元可視化)を同一標本内で実現しうる。

多重高密度超解像顕微鏡IRIS: 従来の分子ローカリゼーション法との違い



	従来の分子ローカリゼーション法	IRIS法
	(既存法のなかで最も高分解能)	(特殊プローブが必要。基本作製法は樹立済み)
多重染色	基本的に2色程度まで	無制限の多重染色が可能
三次元像の構築	光消退により多数平面は困難	数多くの平面の精密なイメージングが可能
画像忠実度	(抗体)標識密度に由来する不均一な画像	高密度標識によるハイレゾ画像
狭小領域での分子配置	標識同士の干渉のため、とりこぼす可能性	全ての標的を可視化可能
理論限界分解能	約20ナノメートル(サンプリング定理による)	タンパク質サイズのスケールまで可能性あり

本研究では、IRIS 法を広く組織解析や病理診断に応用可能な技術とすることを目標に、①多種分子に対する IRIS 用プローブ、②IRIS に最適化された自動蛍光顕微鏡、③三次元 IRIS イメージングへ向けた光学系等の開発を進めてきた。①については、標的を認識する抗体をベースとした IRIS プローブの基本作製法を樹立した。さらに、抗体の配列を組み込んだリコンビナントプローブの作製にも着手し、高効率で迅速に最適化されたプローブを開発する方法に目処が立った。②③についても、三次元の超解像用データを取得できる顕微鏡の基本的なプラットフォームの構築に成功しており、組織切片の調整法や撮像条件の最適化、一部の自動化にも現在取り組んでいる。加えて、細胞内 mRNA の網羅的解析にも、IRIS の原理を応用した多重可視化法開発にも取り組んでいる。これらの技術的改良とともに、学術的にも、細胞・組織内での多種タンパク質・mRNA の微細な配置を可視化することで、生体内の微細構造の組換えや形態変化のしくみを解明するための、新しいアプローチを提案することにも取り組む。

【代表的な原著論文】

1. Sawako Yamashiro and Naoki Watanabe, “Quantitative high-precision imaging of myosin-dependent filamentous actin dynamics” *J Muscle Res. Cell Motil.* vol. 41, pp.163-173, 2020
2. Dean Thumkeo, Yoshichika Katsura, Yukako Nishimura, Pakorn Kanchanawong, Kiyoshi Tohyama, Toshimasa Ishizaki, Shunsuke Kitajima, Chiaki Takahashi, Takako Hirata, Naoki Watanabe, Matthew F. Krummel and Shuh Narumiya, “mDia1/3-dependent actin polymerization spatiotemporally controls LAT phosphorylation by Zap70 at the immune synapse” *Sci. Adv.* vol. 6, eaay2432, 2020
3. Kazuma Koseki, Daisuke Taniguchi, Sawako Yamashiro, Hiroaki Mizuno, Dimitrios Vavylonis and Naoki Watanabe, “Lamellipodium tip actin barbed ends serve as a force sensor” *Genes Cells* vol. 24, pp.705-718, 2019

§ 2. 研究実施体制

(1) 渡邊グループ

- 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)
(グループ内の主な共同研究者 京都大学大学院医学研究科 准教授 木内 泰)

② 研究項目

既存の超解像顕微鏡の限界を超えた多重染色と高密度標識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。

- ・多色超解像顕微鏡 IRIS 用プローブ迅速作製法開発改良と IRIS プローブの順次作製
- ・標的を標識するための IRIS タグとそのプローブの開発、および生体構造改変解析への応用
- ・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
- ・IRIS 法の原理を応用した網羅的遺伝子発現解析法開発