

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03833

研究課題名(和文) 超解像イメージングを革新する蛍光プローブの創製

研究課題名(英文) Fluorescent probes for live-cell super-resolution imaging

研究代表者

佐藤 守俊 (Sato, Moritoshi)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：00323501

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではライブセル超解像イメージングの実現に向けて、今までにない全く新しいタイプの蛍光プローブの開発研究を行なった。青色光受容体のプロテインエンジニアリングに基づいて開発して蛍光プローブについて、実際にライブセル超解像イメージングにおける有用性を実証することができた。本研究によりライブセル超解像イメージングという新しい世界が実現し、様々な生命現象を極めて高い空間分解能で観察できるようになるだろう。

研究成果の概要(英文)：We have developed a novel fluorescent probe for live-cell super-resolution imaging based on protein engineering of a blue-light photoreceptor. We have demonstrated its applicability to live-cell super-resolution imaging. The present study could allow us to visualize a broad range of biological processes at the super-resolution.

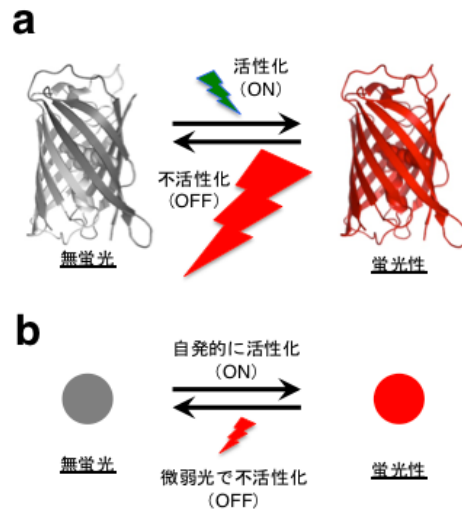
研究分野：蛍光イメージング

キーワード：蛍光 イメージング 細胞 超高解像度 タンパク質

1. 研究開始当初の背景

1990年代の中期以降、GFPをはじめとする蛍光タンパク質は、生命科学研究の目覚ましい発展に大きく貢献してきた。さらに、2000年代初頭に開発された PA-GFP (2002年、点灯型)、Kaede (2002年、変色型)、Dronpa (2004年、点滅型) に代表される光活性化型の蛍光タンパク質 (photoactivatable fluorescent protein: paFP) は、光照射で蛍光のスイッチング (点灯や変色、点滅) を自由自在にコントロールできるため、既存の蛍光タンパク質では不可能だった新しい技術分野を開拓した。その最たるものが、photoactivated localization microscopy (PALM) と呼ばれる超解像イメージング技術 (2014年ノーベル化学賞) である。既存の蛍光タンパク質を用いたイメージングでは、細胞に導入した蛍光タンパク質の全分子が同時に光ってしまうため、光の回折という物理現象に支配された低い解像度・空間分解能 (観察光の波長の半分程度: 緑色光であれば 230 nm 程度) の画像しか取得できない。Eric Betzig らは 2006 年、蛍光タンパク質の代わりに paFP を用いて、かつ同時に光る paFP の分子数が著しく少なくなるように撮影条件を設定することにより、光の回折による影響を回避して超解像イメージングを実現できることを実証した。このように paFP の光活性化特性を利用するイメージング技術によって、分子のサイズに近い空間分解能で細胞の構造情報を取得できるようになった。このように paFP を用いた超解像イメージング技術 (PALM) は、空間分解能については従来技術を遥かに凌ぐ一方で、当該技術には大きな課題が残っている。PALM には著しく強い光照射が必要なため、細胞への強い光毒性や蛍光プローブ (paFP) の退色を避けることができない (図 1)。このため現状の技術では細胞の超解像画像を 1 枚から数枚しか撮影できず、細胞を生かしたまま長時間にわたって撮影し続けるのは不可能であっ

た。もし、生きた細胞の数百枚・数千枚もの超解像画像を数十時間～数日にわたって撮影し、超解像イメージングのムービーを見ながら生命科学研究を遂行できるようになれば、そのインパクトは計り知れない (下図)。



2. 研究の目的

超解像イメージング技術では、paFP の蛍光特性を光照射でスイッチングする過程が鍵を握っている。問題なのは、既存の paFP は光照射による不活性化 (OFF) の効率が非常に低く、スイッチングのために著しく強い光照射が必要なことである。この著しく強い光照射こそが、細胞に対する激しい光毒性と paFP の退色を引き起こし、超解像イメージング技術に大きな制約を与える原因となっている。上述した PA -GFP, Kaede, Dronpa 以外にも、様々な paFP が開発されているが、いずれも OFF 効率は極めて低い。本研究では、植物等の光受容体タンパク質が著しく高い OFF 効率を有する点に着目し、従来にない全く新しい蛍光プローブを開発することとした。これにより微弱光でのライブセル超解像イメージングを実現する。

植物のように微弱光を利用して生きている生物の光受容体が著しく高いスイッチング効率を有する点に着目し、従来とは全く異なるタイプの蛍光プローブを創製する点が本研究の大きな特徴である。既存技術では不可

能だったライブセル超解像イメージングが実現し、様々な生命現象の一部始終を分子のサイズに近い解像度でつぶさに観察できるようになれば、そのインパクトは計り知れないと考えている。神経細胞や幹細胞、免疫細胞、筋細胞などの正常細胞やガン細胞に代表される疾患細胞はもとより、酵母やバクテリア等の微小な生物など、強い光毒性を伴う既存技術では困難だったサンプルにおいて、長時間のライブセル超解像イメージングが実現できれば、計測技術として極めて意義深いだろう。

3. 研究の方法

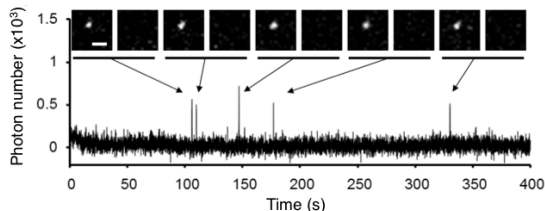
研究責任者は、長時間のライブセル超解像イメージングを実現するために、植物が有する青色光受容体が非常に弱い光照射でスイッチング (OFF) できることに着目した。しかし野生型の青色光受容体の蛍光強度は、超解像イメージングを行うにはあまりにも低すぎる。従って本研究では、当該光受容体にさらなるアミノ酸変異を導入してその輝度を大幅に向上させ、より高い空間分解能でライブセル超解像イメージングを実現する蛍光プローブとして完成させることを目的として研究を開始した。

植物の青色光受容体の蛍光輝度を大幅に高めるために、まず、青色光受容体の補因子(フラビンモノヌクレオチド, FMN) の結合部位に対して集中的にアミノ酸変異を導入した。次に、アミノ酸変異導入により生成した大量の変異体に対して、ハイスループット・スクリーニングを行なった。具体的には、それぞれの変異体を発現する大腸菌を寒天培地で培養し、コロニーを形成させた。大腸菌コロニーの蛍光強度を CCD カメラで可視的にスクリーニングし、大幅に輝度が向上した変異体を含む大腸菌コロニーを単離した。このような部位特異的変異導入と CCD カメラを用いたハイスループット・スクリーニングの実験サイクルを繰り返すことにより、青色光受

容体を大幅に分子進化させ、高輝度・高空間分解能の蛍光プローブの開発を目指した。

4. 研究成果

以上のような青色光受容体の分子進化の結果、蛍光強度が大幅に増強した変異体を取得することができた。さらにこの変異体は、微弱光によるスイッチング (OFF) という当該光受容体の最大のメリットと上述の変異導入によって失っていないことがわかった。この変異体の精製タンパク質を作製し、ガラスの表面に物理吸着で精製タンパク質を固定して顕微鏡下で一分子イメージングによる評価を行なった (下図)。この *in vitro* での評価により、当該変異体が一分子イメージングを実現可能な蛍光強度と蛍光スイッチング特性を有することが明らかになった。以上のように、青色光受容体への変異導入により開発した新しい蛍光プローブを以下の細胞を用いた評価に用いることとした。



開発した蛍光プローブとアクチンの融合タンパク質をコートする cDNA を作製し、融合タンパク質を細胞に発現させたところ、蛍光顕微鏡下で繊維状の構造体が観察された。このことから、開発した蛍光プローブを融合してもアクチンの機能に影響がないことがわかった。さらに開発した蛍光プローブとアクチンの融合タンパク質を発現する細胞の超解像イメージングを行った (行なった操作: サンプルに含まれる蛍光プローブを微弱光で一分子イメージングする。一分子イメージングで得られた蛍光プローブ 1 分子の蛍光輝点の中心点を、点拡がり関数に基づいてナノメートル程度の精度で算出する。各輝点の

中心を集めて描画することにより、超解像イメージング画像を構築する)。これにより、開発した蛍光プローブを用いて超解像イメージング画像を取得できることがわかった ($\sigma_{\text{median}} = 65.4 \text{ nm}$)。

PALM で利用されている既存の paFP として Dronpa を選択し、開発した蛍光プローブとの比較を行なったところ、開発した蛍光プローブは Dronpa の 1,000 分の 1 以下の微弱光で超解像イメージングを実現できることがわかった。このため、Dronpa では蛍光退色と細胞への光毒性が原因で、10 枚程度しか超解像画像を取得できないが、開発した蛍光プローブの場合、微弱光での超解像イメージングが可能のため、蛍光退色や光毒性がほとんど観察されないことがわかった。

さらに研究責任者は開発した蛍光プローブとアクチンの融合タンパク質を用いて長時間の超解像イメージングを行なったところ、少なくとも 2 日程度にわたり、500 枚程度の超解像画像を取得できることがわかった。この超解像画像をつなぎ合わせて作製した“超解像ムービー”には、細胞が増殖するプロセスにおけるアクチン繊維の振る舞いの一部始終が超解像分解能で写っていた。

研究責任者の佐藤は共同研究者（静岡大・成川講師）と共に、シアノバクテリアより新規の光受容体（AM1_1186g2, AM1_1557g2, AM1_1870g3 など）の探索を行なってきた¹³⁾。当該光受容体はいずれも非常にサイズが小さく、かつ遠赤色蛍光を発するという特長を有する。しかも、非常に弱い光でスイッチング (OFF) できることを見出している。しかし、青色光受容体のケースと同様に、野生型のままでは蛍光強度が非常に低く、超解像イメージングに利用するには大幅な改良が必要である。本研究では、遠赤色でのライブセル超解像イメージングを目指して、当該遠赤色光受容体のプロテインエンジニアリングも行なった。

青色光受容体の場合と同様に、遠赤色光受容体の補因子（フィコシアノビルリン、PCB）の結合部位に集中的にアミノ酸変異を導入し、CCD カメラを用いたハイスループット・スクリーニングを行った。その結果、野生型の遠赤色光受容体よりも大幅に蛍光強度が増強した変異体を取得することができた。この変異体は、野生型と同様に、微弱光で蛍光スイッチング (OFF) ができることがわかった。現在、さらなる蛍光強度の増強を目指して、この変異体にプロテインエンジニアリングを施しているところである。

上述のように、本研究ではライブセル超解像イメージングの実現に向けて、今までにない全く新しいタイプの蛍光プローブの開発研究を行なった。青色光受容体のプロテインエンジニアリングに基づいて開発して蛍光プローブについて、実際にライブセル超解像イメージングにおける有用性を実証することができた。本研究のコンセプトに基づいてさらに蛍光プローブのカラーバリエーションが充実させることができれば、マルチカラー・ライブセル超解像イメージングという新しい世界が実現するかもしれない。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 2 件）

- ① K. Fushimi, T. Nakajima, Y. Aono, T. Yamamoto, Ni-Ni-Win, M. Ikeuchi, M. Sato and R. Narikawa, “Photoconversion and fluorescence properties of a red/green-type cyanobacteriochrome AM1_C0023g2 that binds not only phycocyanobilin but also biliverdin” *Front. Microbiol.*, 7, 588 (2016). DOI: 10.3389/fmicb.2016.00588. 査読有
- ② M. Hasegawa, K. Fushimi, K. Miyake, T. Nakajima, Y. Oikawa, G. Enomoto, M. Sato, M. Ikeuchi and R. Narikawa, “Molecular characterization of DXCF cyanobacteriochromes from the cyanobacterium *Acaryochloris marina* identifies a blue-light power sensor” *J. Biol.*

Chem., 293, 1713-1727 (2018). DOI:
10.1074/jbc.M117.816553. 査読有

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 守俊 (SATO, Moritoshi)
東京大学・大学院総合文化研究科・教授
研究者番号：00323501

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()