

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22247

研究課題名（和文）生細胞標本での超解像イメージングを可能にする蛍光プローブ技術の開発

研究課題名（英文）Development of the fluorescent probe technology for live-cell super-resolution imaging

研究代表者

廣瀬 謙造（Hirose, Kenzo）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・教授

研究者番号：00292730

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：生きた細胞でのナノスケールでの分子配置の計測を可能にするために、高い空間分解能を有する単一分子局在化法を原理とする超解像顕微鏡技術の開発に取り組んだ。単一分子局在化法に必要な、標的分子に標識した蛍光分子の高速での明滅を可能にする新しい蛍光スイッチング方式としてDeQODEシステムを開発した。DeQODEシステムを利用して生きた細胞内のオルガネラや機能分子の超解像イメージングを達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞機能を制御する分子メカニズムをナノメートルスケールの細胞内の構造体や分子複合体に着目して理解する必要性が高まってきたが、それに叶う生細胞に適用できる超解像イメージング技術は未整備である。特に、蛍光プローブ技術については、既存の技術の改変では生細胞での超解像イメージングには全く対応できない。本研究の成果によって、抗体を用いた低分子蛍光分子の蛍光ON/OFFスイッチングを利用して生細胞での分子のナノレベルの配置を経時的に観察できる技術をベースとしたライブセル超解像イメージング技術が可能になり、今後の生物学研究で求められるナノスケールの精密計測に貢献することができる。

研究成果の概要（英文）：Super-resolution microscopy enables visualization of the fine arrangement of intracellular molecules and the structure of intracellular organelles with a high spatial resolution (<200 nm). However, since it is difficult to induce the blinking of fluorescent molecules required for the STORM method in living cells, applying the STORM method to living cells has been delayed. In order to measure nanoscale-molecular arrangement in living cells, we developed a super-resolution microscopy technology based on the single-molecule localization method. For fast blinking of fluorescent molecules labeled on target molecules, required for single-molecule localization methods, we developed a turn-on type fluorescence tagging technique named the DeQODE system. We achieved super-resolution imaging of organelles and functional molecules using the DeQODE system in living cells.

研究分野：薬理学・ケミカルバイオロジー

キーワード：超解像顕微鏡 蛍光プローブ

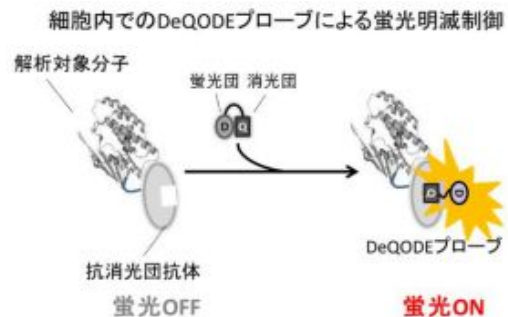
## 1. 研究開始当初の背景

超解像顕微鏡法は既存の光学顕微鏡の空間分解能である 200nm 以下の空間分解能で細胞内の分子の微細な配置や細胞内小器官の構造を高精細に可視化することができ、生物学の様々な領域の研究への導入が進んでいる。複数の超解像顕微鏡法の中でも群を抜いている 10nm 程度の空間分解能を有する STORM 法は今後生物学関連の多様な研究領域でニーズが高まっていくと考えられている (Baddely et al. Annu Rev Biochem. 87, 965-989, 2018)。実際、申請者らは、シナプス研究に STORM 法を用いて、中枢神経系シナプス前終末での神経伝達物質の開口放出が起こる場所の分子実体が、複数のタンパク質が形成する 50nm 程度の大きさの超分子的なタンパク質複合体であるという重要な発見をしている (Nat Neurosci, 2018)。

STORM 法はその高い空間分解能から、生きた細胞内部の分子の微細配置の様子や細胞内小器官のナノスケールの微細構造の経時的変化を追跡できる次世代型としての高いポテンシャルを有している。STORM 法では観察対象の分子に標識した蛍光分子を空間的にまばらに明滅させ、現れた蛍光輝点の重心位置をマッピングする作業 (点描画) を繰り返して超解像イメージを得る。しかしながら、現行の STORM 法では、蛍光分子の明滅に高濃度の還元剤が必要であるため、生きた細胞へは適用できない。一方で STORM 法の類似技術である PALM 法では改変型の蛍光タンパク質を用いて蛍光明滅をさせる方式を取っているが、蛍光が暗く、STORM 法と同等の空間分解能を得ることは難しい。このような現状において、生細胞で高い時間分解能と空間分解能を兼ね備えた超解像イメージングには、生体親和性が高い条件下で STORM 法に最適な蛍光明滅を実現できる蛍光プローブ技術の開発が肝となる。

## 2. 研究の目的

本研究では生きた細胞内の分子を超解像顕微鏡で高い時間空間分解能で観察できる蛍光プローブ技術の開発を目的とする。具体的には、応募者が独自に開発した分子タグと小分子蛍光分子を用いて、生きた細胞での STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) 法に適用できる高い生体親和性を有し、明るく、かつ高速の蛍光明滅が可能な蛍光プローブ技術を開発する。



## 3. 研究の方法

### 1) 生体親和性の高い細胞内蛍光明滅法の開発

生細胞で STORM 法を可能にする蛍光プローブ設計の基本デザインは、細胞内に可視化対象の分子との融合タンパク質として発現させた抗消光団一本鎖抗体(scFv)に対して、消光団と蛍光物質を共有結合させた細胞膜透過性の化合物(蛍光明滅プローブ)が結合した際に蛍光明滅プローブの蛍光消光が解除され、初めて蛍光性となる仕組みを利用する。ここで scFv と細胞内に存在する蛍光明滅プローブが可逆的かつ繰り返し結合・解離することで蛍光明滅が実現される。この系は蛍光明滅に還元剤を必要とせず、高い生体親和性の条件下での蛍光明滅が期待できる。応募者は予備的実験で、消光団として知られているジニトロフェニル基(DNP)に対する scFv を取得し、この scFv を発現させた培養細胞に蛍光明滅プローブを負荷した際に細胞が蛍光性となることから、本研究で提案する蛍光標識技術が細胞内で機能することを確認している。また、研究代表者はこれまでにプロトタイプの蛍光明滅プローブを用いて、細胞内小器官や種々の細胞内のタンパク質の蛍光標識に成功しており、分子タグとして有用であることを確認している。本研究開始後は、すでに取得している DNP に対する scFv へのアミノ酸変異導入や蛍光明滅プローブの置換基操作によって scFv と蛍光明滅プローブとの間の解離速度を調節することで、高速の蛍光明滅を実現し、秒オーダーの時間分解能での超解像イメージの取得を可能にする。

### 2) 生きた神経細胞での実証的な超解像イメージング

中枢神経系シナプスを標本とした生細胞超解像イメージングを通じて、本研究で開発した蛍光プローブ技術の有用性を実証する。標的分子と抗消光団一本鎖抗体との融合タンパク質を CaMKII プロモーター制御により神経細胞特異的な発現ができるレンチウイルスベクターを用いて培養海馬神経細胞に発現させたいうで、細胞に蛍光明滅プローブを負荷し、超解像イメージングを行う。ここでは、神経細胞への電気刺激によって、それぞれの分子がシナプス内での分布にどのような変化が生じるのかを時間軸に沿って可視化解析し、開発した蛍光プローブ技術が実際の生細胞標本での超解像イメージングに適用できることを実証する。

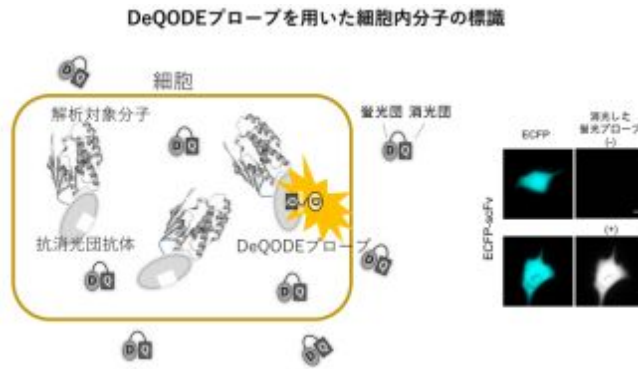
## 4. 研究成果

### 新規蛍光明滅法 (DeQODE システム) の開発

DeQODE システムは蛍光消光団と蛍光色素を共有結合させ有機化合物(QODE プローブ)と抗消光団抗体 (DeQODE タグ) から構成される。DeQODE プローブは通常は蛍光が OFF の状態であるが、DeQODE タグとの結合によって消光能が失われ、蛍光 ON になることが期待でき

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

る。マウスを用いて作製した消光団に対するモノクローナル抗体をベースにして、定法に従い消光団に対する一本鎖抗体 (scFv) を4クローン取得した。取得した scFv を哺乳類細胞の発現ベクターに組み込み、Hela 細胞に遺伝子導入し、細胞内での安定性を評価した。遺伝子導入した Hela 細胞に QODE プローブを負荷し、細胞質の蛍光シグナルを評価した結果、細胞内で安定的に発現できる scFv が1クローン得られた。また、複数種類の QODE プローブを合成し、DeQODE タグとの結合前後の蛍光の消光効率、抗消光団抗体との結合に伴う蛍光の活性化効率を精製した DeQODE タグを用いて調べ、DeQODE タグとの結合により、蛍光 ON/OFF のスイッチングができることを確認した。ここで優れた性能を示した DeQODE タグと QODE プローブの組み合わせで生きた培養 Hela 細胞を標識した結果、QODE プローブ存在下においても高いコントラストで細胞の蛍光像が得られることが確認できた。

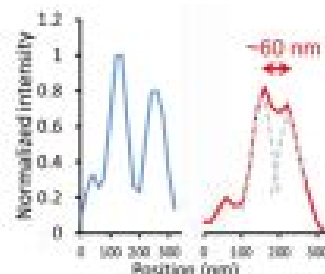
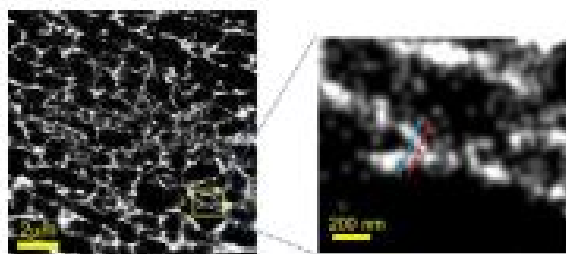
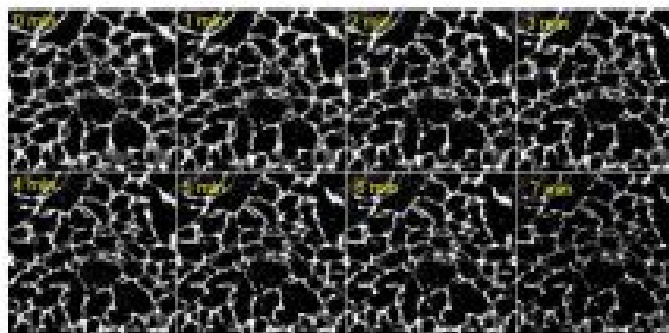


蛍光明滅速度の高速化

生細胞で超解像イメージングを行うには、数分間に数万枚の蛍光明滅画像の取得が必要であるため、色素が蛍光性となっている時間が短い必要がある。そのためには結合解離が速い QODE プローブと抗 DeQODE タグの組み合わせを用意する必要がある。精製リコンビナント抗消光団 scFv と消光団 蛍光色素化合物との結合・解離反応をストップフロー法により解析し、高速での超解像イメージングを実現するために速い解離時定数の消光団 蛍光色素化合物と抗消光団 scFv の組み合わせを選別した。さらに消光団の誘導体化と scFv の相補性決定領域内へのアミノ酸変異導入を行い、QODE プローブと DeQODE タグ間の解離速度を約 100 倍の高速化することに成功した。

DeQODE システムによる実証的生細胞超解像イメージング

DeQODE システムを用いたテストとして、生きた COS7 細胞内の小胞体を対象とした超解像イメージングを行った。小胞体に DeQODE タグを発現させた COS7 細胞に QODE プローブを負荷することによって、高精細な蛍光明滅を惹起し、1分子蛍光イメージングによって、高精細な輝点画像を取得した。3万枚の蛍光輝点像を基にして、超解像イメージを再構成し、20秒の時間分解能で小胞体の動きを可視化できることを示した。続いて、培養海馬神経細胞のシナプスに局在する Homer-1 分子に結合するナノボディーを介して DeQODE タグを Homer1 に結合させ、QODE プローブを負荷することによって、Homer1 の超解像イメージを連続的に取得し、Homer1 のナノ構造変化の経時観察を実現した。DeQODE システムを用いた超解像顕微鏡法は、DeQODE タグを付加した分子について幅広く適用が可能であり、多様な生命科学分野への今後の応用が進むことが期待できる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林新九郎、大久保洋平、並木繁行、浅沼大祐、廣瀬謙造
2. 発表標題 Establishment of a new method for long-term single-molecule fluorescence imaging and its application to synaptic molecules
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 磯野有希、浅沼大祐、大久保洋平、並木繁行、廣瀬謙造
2. 発表標題 Development of a novel chemical tag tool for calcium imaging by near-infrared fluorescence
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林新九郎、並木繁行、浅沼大祐、廣瀬謙造
2. 発表標題 再生可能な蛍光ラベリングを導入した長時間一分子トラッキング技術の開発
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北島奈美、瀧川健司、関谷敬、浅沼大祐、坂本寛和、並木繁行、飯野正光、廣瀬謙造
2. 発表標題 脳虚血における細胞外ATP動態の生体内蛍光イメージング
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅沼大祐、並木繁行、廣瀬謙造
2. 発表標題 消光団を利用したケミカルタグ技術の開発とライブセル超解像イメージングへの応用
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学大学院医学系研究科機能生物学専攻細胞分子薬理学分野  
<http://www.pharmacol.m.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関