

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「統合1細胞解析のための革新的技術基盤」  
研究課題「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」

## 研究終了報告書

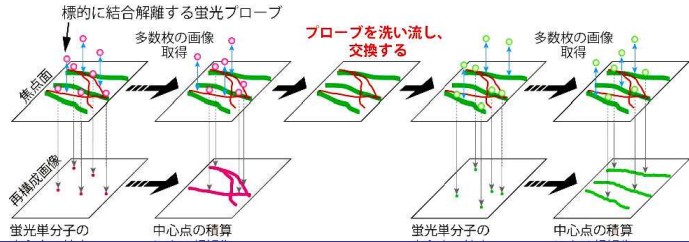
研究期間 2015年10月～2021年3月  
(新型コロナウイルス感染症の影響を受け2021年9月まで延長)

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)

## § 1 研究実施の概要

### (1) 実施概要

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 IRIS を発案した (Kiuchi et al. *Nature Methods* 12: 743-746, 2015)。超解像顕微鏡は、光学顕微鏡の分解能限界とされてきた 200 ナノメートルの壁を破り、電子顕微鏡が得意な分子のアイデンティティを捕捉しながらの高解像度観察を可能とする。その注目度は、2014 年のノーベル賞に選ばれたことから分かる。しかし、抗体や蛍光タンパク質を用いる通常の超解像顕微鏡では、その標識体の大きさに起因する標識密度の限界から、「超解像ジレンマ」と呼ばれる「斑な」画像劣化が目立ち、分解能にも限界があることがクローズアップされてきた。われわれはこれを克服するために、可視化する標的に対し結合・解離を繰り返す蛍光標識体を用いる IRIS を開発した。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ように (右図)、原理的に無制限の種類タンパク質を同一標本内で多重に可視化観察できる。



	従来の分子ローカリゼーション法	IRIS 法
特徴	既存法のなかでは最も高分解能	特殊プローブが必要 (基本作製法は樹立)
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
三次元超解像	光消退により多数平面は困難	多平面の精密なイメージングが可能
画像忠実度	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	抗体の空間干渉のため全可視化困難	標本内の全ての標的を可視化可能
分解能限界	約 20 nm (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

従来法にはない多くの長所をもつ IRIS 法であるが、普及に向け必要とされる技術ポイントとして、可視化の対象となる標的ごとに、秒単位の速さで結合・解離を繰り返すことのできる蛍光標識プローブ (IRIS プローブ) が必要なことがあげられる。本研究では、標的を認識する抗体を改変することで IRIS プローブを迅速に作製する方法を樹立した。まず、標的を認識する抗血清から IRIS に適した親和性をもつ抗体断片を精製する方法、およびモノクローナル抗体ライブラリーから迅速な解離速度をもつものを半自動化された顕微鏡スクリーニングで同定する方法を確立した。さらに、得られた抗体の改良と標識体の大量精製を実現する抗体可変領域のリコンビナント発現系を導入し、高効率で性能の良い IRIS プローブの作製法を樹立した。このリコンビナント IRIS プローブの開発過程において、既存のモノクローナル抗体から IRIS に適した速い解離速度をもつリコンビナントプローブが高い確率で得られることが判明した。このことは、既存の、或いは現在開発されつつある多数のモノクローナル抗体の資産を生かし、多彩な標的に対応する IRIS プローブのライブラリーが作りだせる可能性を示唆している。

加えて、蛍光プローブを無尽蔵に供給しつつ撮像できる IRIS の能力を引き伸ばすため、組織標本の三次元可視化に適した、無影のライトシート照明を備えた顕微鏡も構築した。さらに組織深部の蛍光単分子可視化に有効な、輝度と光安定性が高い近赤外蛍光体の同定にも成功した。IRIS プローブは、複数ペプチドタグに対するものを確立し、タグ付加タンパク質のトランスジーンによって超解像解析が開始できるようにした。これらの要素技術が開発されたことにより、細胞間の相互位置を保ったまま、生体標本の中の多種分子の局在や複合体形成を立体的に可視化する超解像顕微鏡がほぼ実現しつつある段階まで、本プロジェクトは達成した。今後の広い医学研究や病理診断への応用・普及に向けた基盤技術の完成に至っている。

新型コロナウイルス感染症の影響を受け6ヶ月研究期間を延長し、抗体由来プローブを組み合わせた細胞・組織内多重標的解析と単一 mRNA の超解像可視化の実証を進めた。

## (2) 顕著な成果

### <優れた基礎研究としての成果>

#### 1. 細胞—組織標本深部における単分子可視化のための近赤外蛍光プローブ開発

概要:組織標本内での蛍光単分子可視化は、微弱なシグナルに比べ、標本由来の自家蛍光ノイズが大きく、観察範囲が著しく制限される。本研究では、CF680R および DL649 が高輝度かつ蛍光退色抵抗性であり、近赤外単分子可視化に有用なことを見出した。赤色波長帯域に比べ自家蛍光とのSN比が約6倍改善し、アクチン標識体を用いた分子可視化により、上皮細胞頭頂部における半減期 441 秒の線維寿命が捕捉された(Yamashiro et al. *Sensors* 17, E1545, 2017)。本研究は、組織やオルガノイドのような立体的な標本内の分子動態可視化の道を開くとともに、深部構造の IRIS 可視化ツール開発の方向性も示した。

#### 2. IRIS プローブ用モノクローナル抗体スクリーニングの樹立と組織改変ダイナミクス可視化

概要:本研究で樹立した IRIS プローブに適した解離速度をもつモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングから、3種のペプチドタグ、複数のアクチン結合タンパク質に対する抗体 Fab 断片 IRIS プローブを作製した。それらを組み合わせ、生体内の主要なアクチン構造の1つ、内耳の不動毛におけるアクチン線維と線維束化タンパク質の異なる構築速度を可視化することに成功した(Miyoshi et al. *Cell Rep.* 34: 108708, 2021)。低親和性・結合解離プローブによる検出が任意の標的分子に対し実証した成果であり、超解像顕微鏡 IRIS を含めた様々な解析手法にこのアプローチが応用されることが期待される。

#### 3. 細胞骨格改変機構や抗がんキナーゼ阻害薬による逆説的細胞増殖機構を可視化説明

概要:細胞構造制御分子の異常が引き起こすフェノタイプは、広範囲に及ぶ場合があり、分子の働きをピンポイントで検出することはときに困難となる。がん関連キナーゼ、免疫細胞の情報伝達、神経シナプス形成、生殖細胞の支持、聴覚に重要な種々の分子の働きを、細胞内で分子を可視化する手法および電子顕微鏡、超解像顕微鏡を組み合わせ説明した。特に、アクチン線維のねじれ構造のフォルミンファミリーによる制御(*PNAS*誌2018年)や細胞先端に局限するアクチン重合センサーを高分解能観察によって世界で初めて捉えた。また、細胞イメージングの所見から、がん治療に用いられるキナーゼ阻害薬がそれらの標的である c-*Src* を逆説的に活性化し、接着依存性のがん細胞増殖シグナルを活性化することを発見、注目を集めている(*Cell Reports* 誌2021年)。

### <科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

#### 1. IRIS プローブ作製法樹立と特許化

概要:任意のタンパク質標的を特異的に認識し、且つ3秒以内の半減期で標的から解離する、IRIS 撮像条件を満たす蛍光標識プローブの作製法の基本プロトコルを樹立した。IRIS の基本原理とともに特許を取得した(PCT/JP2016/057817)。プローブ作製法のメインは、抗体を活用したものであり、抗体関連のリソースをもつ研究グループや企業とタイアップすることで、広い応用に向けた超解像多分子解析プラットフォームの普及に資すると期待される。

#### 2. 既存のモノクローナル抗体を改良したリコンビナント IRIS プローブ作製法の樹立

概要:多重染色や忠実度において既存の超解像顕微鏡の限界を IRIS 法は超越するものの、可視化したい標的に対する蛍光プローブが個別に要求される。この困難を克服するため、2つの戦略を展開した。1つはペプチドタグを可視化する複数の IRIS プローブの樹立(*Cell Report* 2021 に報告済)であり、もう1つは、抗体断片の高効率リコンビナント化(他大学との共同研究にて実施中)とその改変によるプローブ作製法の構築である(投稿中)。後者では、既存のモノクローナル抗体を改良することで高い確率で迅速に IRIS 像が得られており、人類がもつ大多数の抗体資産の活用が期待できる。

#### 3. 組織深部の分子ローカリゼーションが可能な顕微鏡プロトタイプ構築

概要: 通常の免疫化学的手法とは異なり、IRIS では無限の蛍光標識体で順次標的を可視化する。そのため、組織標本などの深部構造を立体的に可視化する際、より広く高分解の像が実現できる。しかしながら、既存の蛍光照明では深部の分子可視化は背景ノイズや照明ムラが大きく、分子ローカリゼーションが困難である。これらを回避できるよう、入光方向が可変なライトシート照明を備えたプロトタイプ顕微鏡を構築した。上述した近赤外蛍光プローブと組み合わせることで、組織深部での分子複合体・構造の立体可視化が可能となった。

< 代表的な論文 >

1. “Helical rotation of diaphanous-related formin mDial generates actin filaments resistant to cofilin” Mizuno, H., Tanaka, K., Yamashiro, S., Narita, A. and Watanabe, N. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115: E5000–E5007, 2018

概要: 細胞の極性形成や細胞質分裂に重要なフォルミンファミリータンパク質が、アクチン線維端に結合したまま回転し線維を伸長させることが、われわれの以前の研究(2011年 Science 誌に発表)で明らかにされた。本論文では、その活性が線維をねじるトルクを生み、線維のねじれ構造を緩めることを可視化証明した。さらに、この働きがアクチン脱重合因子の作用に拮抗することも見いだした。このアクチン重合因子と脱重合因子の干渉は、互いに遠距離にある分子の機能・活性を制御するものであり、生体分子として非常にユニークな性質と言える。

2. “Semi-automated single-molecule microscopy screening of fast-dissociating specific antibodies directly from hybridoma cultures” Miyoshi, T., Zhang, Q., Miyake, T., Watanabe, S., Ohnishi, H., Chen, J., Vishwasrao, H.D., Chakraborty, O., Belyantseva, I.A., Perrin, B.J., Shroff, H., Friedman, T.B., Omori, K. and Watanabe, N. *Cell Rep.* 34: 108708, 2021.

概要: 任意のタンパク質、ペプチドモチーフを認識する IRIS 用プローブを効率よく取得するために、抗原との解離速度が速いモノクローナル抗体を迅速に作製する方法論を確立した。通常どおり免疫したマウスから作製したハイブリドーマライブラリーから、単分子可視化顕微鏡による解離速度が速い抗体をスクリーニングする。抗体の Fab 断片に蛍光色素を付加することで、数種類の標的を標本内で同時超解像可視化することに成功した。

3. “Paradoxical activation of c-Src as a drug-resistant mechanism” Higuchi, M., Ishiyama, K., Maruoka, M., Kanamori, R., Takaori-Kondo, A. and Watanabe, N. *Cell Rep.* 34: 108876, 2021.

概要: 古くから知られる原癌遺伝子産物 c-Src が、がん治療に用いられるキナーゼ阻害薬が結合することによって、細胞内で活性型の分子構造に変化することを捉えた。Src のキナーゼドメインに薬剤抵抗性変異が生じると、キナーゼ阻害薬の早期解離が起き、下流の FAK をリン酸化し、それが引き金となって、Grb2~Erk のシグナルが活性化、細胞増殖を促進することが判明した。阻害薬がかえってがん細胞の増殖を促す逆説的な作用を見出したものであり、抗がん治療薬や治療戦略の開発に大きなインパクトをもつと考える。

## §2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

### ① 渡邊 IRIS グループ

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)

研究項目

既存の超解像顕微鏡の限界を超える多重染色と高密度標識を実現した超解像蛍光顕微鏡法 IRIS を発展させ、広く生命科学研究、病理診断への応用への道をひらく。

- ・多色超解像顕微鏡 IRIS 用プローブの迅速作製法開発
- ・標的を標識するための IRIS タグとそのプローブの開発、および生体構造変換解析への応用
- ・3D 化と自動化に向けた顕微鏡光学系の改良
- ・IRIS 法の原理を応用したインサイツ網羅的遺伝子発現解析法の開発

(2)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

本研究グループは、細胞生物学と数理生物学を融合させた学際的な国際共同研究を米国 Lehigh 大学物理学教室 Dimitrios Vavylonis 教授らのグループと2009年頃より行ってきており、本研究課題についても、IRIS に用いる顕微鏡画像データの演算プログラムの改良について支援を要請し、共同研究を行っている。頻回に情報交換の機会を設けており、特に2019年には1月および同年3月の2回にわたって、「JST 戦略的創造研究推進事業 国際強化支援策」の支援により、Vavylonis 教授とその研究グループの複数のメンバーを京都大学に長期招聘し、共同研究および学術交流を行った。

加えて、CREST「統合一細胞」領域内共同研究を、民谷栄一教授(阪大・工)グループ植田充美教授(京大・農)と行った。植田教授らが開発したラクダ科の動物の最小抗体ナノボディーの発現ライブラリーを活用した IRIS プローブの大規模スクリーニングに取り組んだ。

また、京都大学の複数の臨床系教室と個体レベルの解析への IRIS の応用について共同研究中である。

モノクローナル抗体からのリコンビナント IRIS プローブの作製、および組織標本に適したライトシート照明を備えたプロトタイプ顕微鏡については、それぞれ他大学の研究者、光学機器メーカーと共同で開発を進めており、一定の成果が得られつつある。