

研究終了報告書

「次世代バイオイメージングのための分子技術の開発」

研究期間：2017年10月～2021年3月

研究者：浅沼 大祐

1. 研究のねらい

蛍光イメージングは、緑色蛍光タンパク質(GFP)(2008年ノーベル化学賞)等の利用により、生きている細胞の活動を観察することを可能とし、多様な生命現象の解明に貢献してきた。しかしながら、観察の際に照射する励起光で蛍光分子が壊れる光褪色により、現状の観察には避け難い制約が伴っている。近年、超解像顕微鏡法(2014年ノーベル化学賞)等の開発・発展に伴い、安定した蛍光観察を可能とする技術に対するニーズは益々高まっている。本研究では、従来解消が困難である光褪色の問題を回避し、通常の蛍光観察から超解像観察に至るまで、計測性能を極限に高めた蛍光イメージングを実現する革新的な分子技術を開発する。

2. 研究成果

(1) 概要

蛍光イメージングは、生きている細胞の活動を観察することを可能とし、多様な生命現象の解明に貢献してきた。しかしながら、光褪色により現状の観察には大きな制限が伴っている。本研究では、従来解決が困難であった光褪色の問題を回避して、計測性能を極限にまで高めた蛍光イメージングを実現する革新的な分子技術を開発した。提案する DeQODE ケミカルタグ技術において、プローブは可逆的にタグタンパク質へ結合して光るため、光褪色が生じても褪色プローブの解離の後に新たなプローブがタグへと結合する交換現象により蛍光シグナルを連続的に得ることができる。多数のプローブの候補を設計・合成し、タグタンパク質との結合解離を精査するスクリーニングを通じて、プローブの結合解離が実用的に速いケミカルタグ技術を開発した。本技術をライブセル STED 顕微鏡法に応用したところ、プローブの交換現象により神経細胞においてシナプスタンパク質の連続した超解像イメージングを実現した。

(2) 詳細

研究テーマ A「プローブ・タグの開発」

本項目では、プロトタイプとして開発していた小分子プローブ、および、抗消光団一本鎖抗体(特願 2017-7952、PCT/JP2018/001457)を基に、本課題で提案する分子技術の開発を行った(図1)(主な研究成果リスト(3))。蛍光色素と消光団のハイブリッド分子である QODE プローブは単独では消光団の作用により光らないが、DeQODE タグタンパク質へ結合することにより消光団の作用が解消されて明るく光る。蛍光観察時にタグに結合した QODE プローブが光褪色しても、光褪色した分子がタグから解離した後に、別のプローブがタグへと結合することで再び蛍光シグナルを得ることが可能である。QODE プローブ・DeQODE タグタンパク質の結合・解離特性について精査するため、ストップフロー測定による *in vitro* キネティクス解析を行った。プロトタイプのプローブについて、結合・解離速度定数(k_{on} , k_{off})がそれぞれ約 1×10^6 (L/mol/s)、 1×10^{-2} (/s)と算出され、親和性の指標として解離定数は約 1×10^{-8} (mol/L)となった。解離定数が

10 nmol/L オーダーと親和性が高く、低濃度のプローブによりケミカルタグを染色でき、蛍光染色でよく問題となる非特異的染色を回避することが可能である。しかしながら、 k_{off} が約 1×10^{-2} (/s) であり、プローブのケミカルタグタンパク質への結合時間 ($\tau = 1/k_{off}$) は 100 秒程度と長く、光褪色の問題を実用的に回避するためにプローブ・タグの交換反応の高速化が必要であった。

DeQODE タグタンパク質に対するプローブの交換を高速化する上で、解離反応に関わるプローブの固有値である k_{off} を増大させることが必要不可欠となる。細胞イメージングの条件下では、結合反応は $k_{on} \times [\text{Probe}]$ で概ね規定され、プローブの濃度が関わるため解離反応と異なり介入が可能である。解離特性に着目したプローブの最適化のため、消光団を中心とした構造展開を行い、数十種類のプローブ誘導体を開発した。さらに、これらのプローブ群についてタグタンパク質とのキネティクス解析を行ったところ、 k_{off} (/s) が 1×10^{-4} から 2、 k_{on} (L/mol/s) が 3×10^5 から 1×10^7 と大きな多様性を持っていることを明らかにした(図2)。親和性が著しく向上した稀少なプローブも見られたが、プローブ・タグの交換反応の高速化の観点から、プロトタイプと比較して k_{off} が 1 桁大きく、また、 k_{on} も比較的大きく、 $K_d \leq 1 \times 10^{-7}$ (mol/L) となる親和性を有したプローブに着目した。誘導体化したプローブはよく消光しており、細胞イメージングへの応用の際にバックグラウンド蛍光は小さく、蛍光染色の特異性が高かった。誘導体スクリーニングを通して、本提案の蛍光イメージングの応用に所望である QODE プローブの開発に至った。

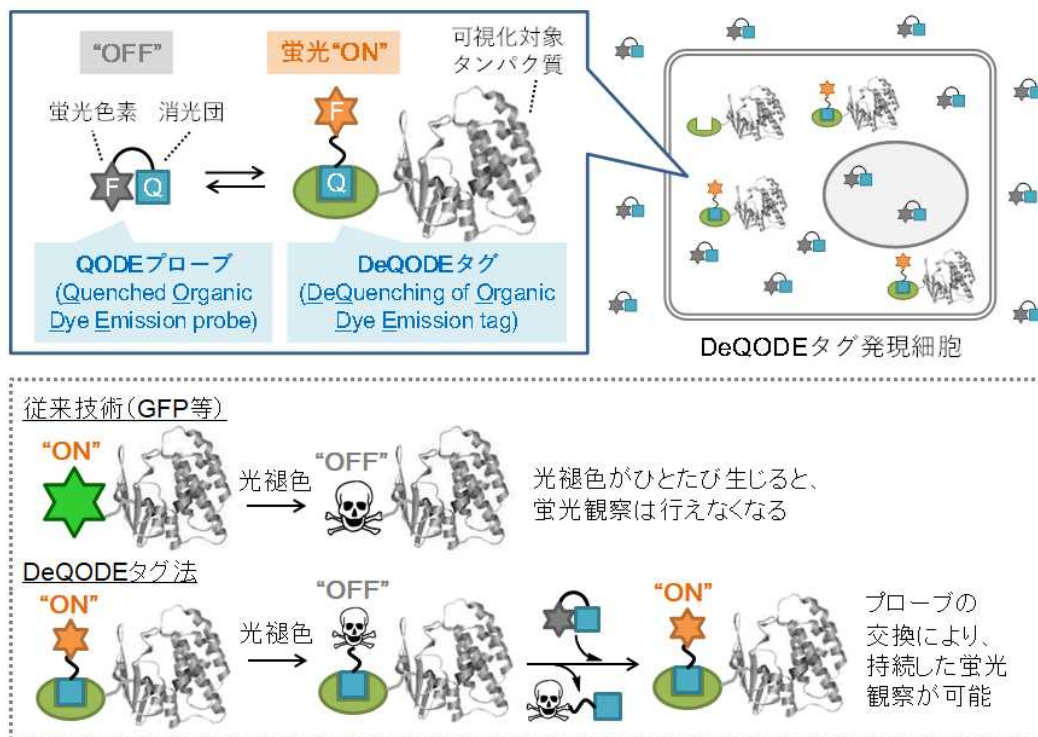


図1. DeQODE ケミカルタグ技術

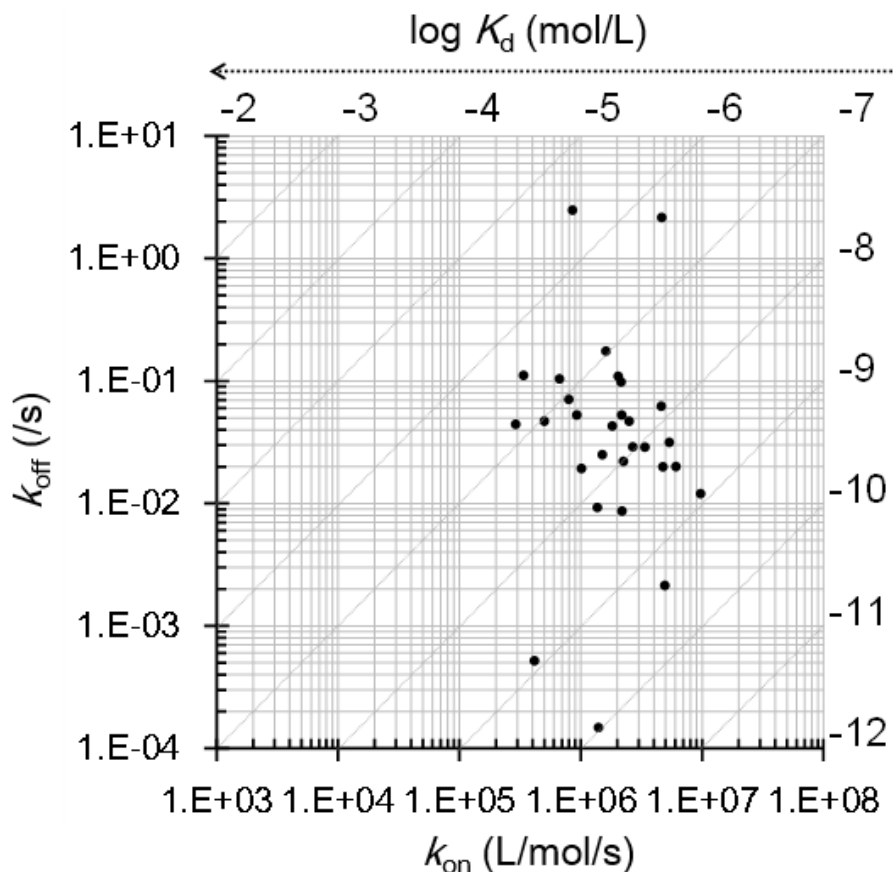
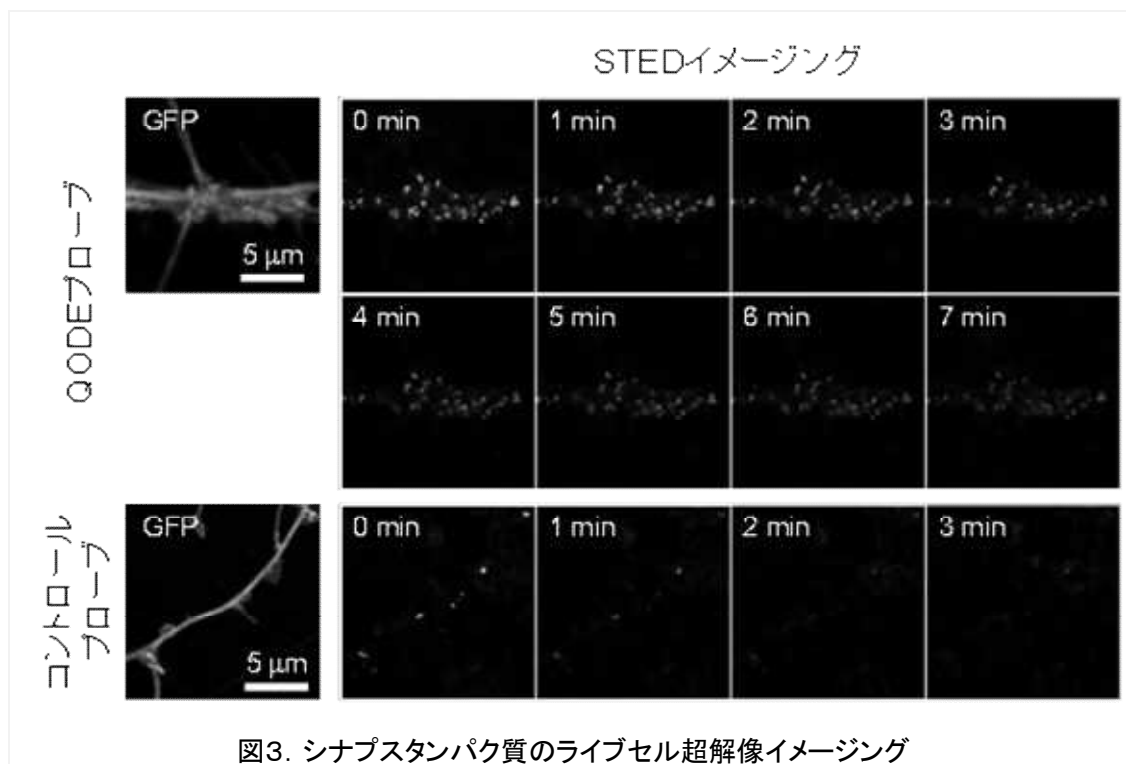


図2. プローブのキネティクス特性

研究テーマB「実証イメージング」

多様な細胞現象のメカニズムを明らかにする上で、蛍光プローブを用いた分子イメージングは極めて強力な手法である。高性能の蛍光プローブを開発して応用することにより、シグナル伝達分子に着目した細胞現象の可視化を実現した(主な研究成果リスト(1)-1)。また、神経細胞の化学固定標本を用いた超解像イメージングを通して、複数種類のシナプスタンパク質による数十 nm 程度の超分子集合体を可視化し、その集合体の個数がシナプスの神経伝達物質の最大の放出量、すなわち情報量、を決定することを明らかにした(主な研究成果リスト(1)-2)。さらに、生きている神経細胞を対象としたシナプス分子の連続した可視化のため、DeQODE ケミカルタグ技術を光放出抑制(stimulated emission depletion; STED)顕微鏡法に応用して超解像イメージングを行った。シナプスタンパク質である Homer の可視化を行ったところ、誘導体スクリーニングを通して開発した QODE プローブ($k_{\text{off}} = 2 \times 10^{-1}$ (/s))によって連続した超解像イメージングが可能であり、シナプス分子の変容を可視化した(図3)。解離速度が2桁小さいコントロールプローブ($k_{\text{off}} = 2 \times 10^{-3}$ (/s))では光褪色によって連続した観察は極めて困難であり、本課題で提案する分子技術によって光褪色の問題を回避できることを実証し、当初設定していた目的を達成した。



3. 今後の展開

本研究において、光褪色の問題を回避する新技術を開発し、超解像観察を含むイメージング手法の高度化を実現した。今後、本技術を多様な生体分子の可視化へ応用する。また、互いに直行して認識する複数のケミカルタグ技術を開発することにより、多分子の動態を高精細に同時可視化するマルチカラーイメージングが実現可能となる。複雑な生命現象を理解する上で、鍵となる複数の生体分子の時空間動態を同時に可視化することは極めて重要である。

4. 自己評価

提案する分子技術の開発のため、研究期間を通して研究補助者を最大2名雇用し、質量分析器を付属した精製装置やフーリエ変換赤外分光光度計の機器等を導入して円滑な研究遂行を可能とする研究体制を構築した。本体制により研究開発を推進し、数多くの機能性分子を開発して光褪色の問題を回避する蛍光イメージングの提供を実現し、当初設定していた目標を達成した。今後、世界中の研究者が利用して研究の幅を容易に広げることが可能な、日本発のデファクトスタンダードの蛍光イメージング技術としてさらなる改良・普及を進めていく。本研究は、光褪色の問題を回避する新技術の開発を実現し、超解像観察を含むイメージング手法の飛躍的な高度化により戦略目標である次世代フォトリソグラフィの開拓に貢献したと評価できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 2件

1. Kitajima N, Takikawa K, Sekiya H, Satoh K, Asanuma D, Sakamoto H, Takahashi S, Hanaoka K, Urano Y, Namiki S, Iino M & Hirose K. Real-time in vivo imaging of extracellular ATP in the brain with a hybrid-type fluorescent sensor. *eLife* 9:e57544 (2020)

ATP は遍在する細胞外シグナル伝達分子である。本研究では、新たな高性能の蛍光プローブの開発に基づき、高い時空間解像度で細胞外 ATP の生体内イメージングを実現する方法を開発した。蛍光プローブは生きているマウスの大脳皮質の神経細胞に結合させることが可能で、電気刺激に応答して同心円状に伝播する細胞外 ATP 放出の波を明確に可視化した。本技術は、*in vivo* での多様な生物学的プロセスの細胞外 ATP ダイナミクスを調べるのに役立つと期待される。

2. Sakamoto H, Ariyoshi T, Kimpara N, Sugao K, Taiko I, Takikawa K, Asanuma D, Namiki S & Hirose K. Synaptic weight set by Munc13-1 supramolecular assemblies. *Nat. Neurosci.* **21**, 41-49 (2018).

シナプスの結合は、ニューロンネットワークダイナミクスの重要な決定要因である。シナプス前終末のタンパク質の超解像イメージングと神経伝達物質の単一シナプスイメージングを組み合わせた高度な測定・解析手法を構築して用いることにより、中枢グルタミン酸作動性シナプスの結合の重みを決定するメカニズムをはじめて明らかにした。Munc13-1 分子がシナプス前終末で他のタンパク質とナノスケールの超分子自己集合体を形成し、個々のシナプスで数ビットの情報をエンコードする可能性を示した。

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件 (特許公開前のものも含む)

(3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Daisuke Asanuma, Shigeyuki Namiki, and Kenzo Hirose. Fluorophore-quencher based chemical tag technology for biological imaging. 2019 International Conference for Leading and Young Medical Scientists (IC-LYMS 2019). Taipei, Taiwan. 2019/12/20 (Invited).
2. 浅沼大祐、高精細なバイオイメージングのためのケミカルタグ技術の開発、第 92 回日本生化学会大会 シンポジウム「ケミカルツールで切り開く生命科学研究」。横浜、神奈川県。2019/9/18 (招待)。
3. Hiroyuki Okamoto, Daisuke Asanuma, Shigeyuki Namiki, and Kenzo Hirose. Development of a tag-probe based cell labeling technique for in vivo fluorescence imaging. WCP2018 Kyoto, Japan. 2018/7/5.
4. Shigeyuki Namiki, Daisuke Asanuma, and Kenzo Hirose. Development live cell super-resolution microscopy based on a novel fluorescence switching technology. WCP2018 Kyoto, Japan. 2018/7/5.
5. Yusuke Kojima, Daisuke Asanuma, Hiroyuki Okamoto, Shigeyuki Namiki, and Kenzo Hirose. Development of a chemical tag tool for near-infrared fluorescence *in vivo* imaging. 第 92 回日本薬理学会年会。大阪、日本。2019/3/16.