

無制限多重染色と高精細な画質を実現する超解像顕微鏡法 IRIS を開発

-多種のタンパク質が織りなすミクロの世界を可視化-

概要

京都大学大学院医学研究科 木内泰准教授、京都大学大学院生命科学研究科 渡邊直樹教授らの研究グループは、既存の手法を超えた高精細な画像が得られ、観察できる標的タンパク質の種類に上限がない超解像顕微鏡法 IRIS (Image Reconstruction by Integrating exchangeable Single-molecule localization) を開発しました。

昨年のノーベル賞の受賞対象となった超解像顕微鏡は、従来、光学顕微鏡の限界とされていた分解能 (~200 nm) よりも一桁小さい分解能でタンパク質の分布を観察することを可能にしました。しかし、分解能がタンパク質のサイズに近づいたため、抗体などによる標識の不均一さが目立つようになり、画像がタンパク質の分布を必ずしも正確に反映しないことが問題とされてきました。さらに多種類のタンパク質を染め分け、同一の細胞で観察することは困難でした。

今回の研究において、本研究グループは、迅速に結合解離を繰り返すプローブを用いて標的タンパク質を可視化するという簡単なアイデアにより、従来法の限界を突破できることを見出しました。図1に IRIS の原理を示します。IRIS では、標的に結合するタンパク質の部分断片を蛍光標識してプローブとして用います。多数のプローブの結合を捕捉することで標的の標識率を上限なく高めることができ、高密度標識による精細な画像を得ることができます。さらにプローブを洗い流して順次別のプローブと交換することで、原理的に上限のない種類のタンパク質を観察することができます。IRIS による高精細画像と無制限多重染色は、多様なタンパク質が複雑に絡み制御される生命現象の解明に強力な手段を提供します。さらに IRIS によって観察可能な分子種が今後増えることで、細胞研究や病理診断における免疫組織化学解析が飛躍的に発展することが期待されます。

本研究成果は、2015年7月6日(米国東部時間)に米国科学雑誌「Nature Methods」のオンライン速報版で公開されました。

1. 背景

可視光を用いた顕微鏡では、光の回折限界のため理論的に分解能の限界がおおよそ 200 nm であると考えられてきました。しかし、近年、蛍光標識の照明方法や発光方法を工夫することで、光の回折限界を超えた分解能をもつ顕微鏡法が開発されました。それらは超解像顕微鏡法と呼ばれ、現在のところ大きく3つの方式 (STED、SIM、PALM/STORM) に分けられます(注1)。この超解像顕微鏡法の開発の功績が評価され、Eric Betzig 博士、Stefan W. Hell 博士、William E. Moerner 博士が2014年ノーベル化学賞を受賞しました。

しかし、分解能の向上に伴い、標的タンパク質を可視化するための蛍光抗体や蛍光タンパク質の密度の限界のため、画像の忠実度が悪化することが認識されていました。ナイキストのサンプリング定理によると標識間隔の2倍以下の形状は正しく捕捉できないとされています。例えば、蛍光抗体を用いて標識した場合、抗体の大きさが10ナノメートル余りあるため、20ナノメートル以下のスケールでタンパク質の配置を完全に捉えることは困難です。また、蛍光タンパク質を融合させた標的タンパク質を用いた場合でも、内在性の標的タンパク質を標識体に全て置きかえることは困難であるとともに、外来性の融合タンパク質を大量に導入する悪影響を避ける必要性から標識密度にはおのずと限界があります。よって、

従来の超解像顕微鏡法の分解能の限界は 20 ナノメートル付近であることが予想されます。一方、多種類のタンパク質を同一標本内で超解像顕微鏡を用いて可視化する試みがありますが、その場合でも蛍光プローブが狭い範囲にある複数種のタンパク質を標識する際、物理的に互いに干渉することで標識密度が下がり、画質が悪化することが懸念されてきました。

2. 研究手法・成果

我々は、同時に観察できるタンパク質の種類に上限がなく、さらに標的を高密度で標識することで高精細な画像が得られる超解像顕微鏡法 IRIS を開発しました。他の超解像顕微鏡法に対する IRIS の原理的な違いを図 1 に示します。他の超解像顕微鏡では、標的に結合する蛍光抗体や蛍光タンパク質を使うために標識密度には限界があります。一方 IRIS では、標的に結合するタンパク質の部分断片を蛍光標識してプローブとして用います。このため IRIS では、プローブの結合回数に応じて標的の標識率を上限なく高めることができ、高密度標識による高精細な画像を得ることができます。さらにプローブを洗い流して順次別のプローブと交換することで、原理的に上限のない種類数のタンパク質を観察することができます。IRIS を用いることでアクチンフィラメントに対する標識密度は、抗体の結合できる最大密度よりも二桁近い高密度を容易に達成でき、忠実性の高い画像が得られました (図 2)。また分解能は、最も高い分解能をもつ超解像顕微鏡と遜色ない 23 nm が得られています。さらに多様な細胞構造を可視化するプローブを開発し、細胞全体のアクチンフィラメント、微小管、中間径フィラメント、接着斑を同時に高分解能で可視化する画像を得ることができました (図 3)。例えば、中間径フィラメントは、細胞局所ごとにアクチンフィラメントや微小管といった異なるパートナーと絡み合うことが明らかになりました。本研究によって、同一標本内における複数の標的分子の分布を高い分解能で捉え、従来の超解像顕微鏡法より高精細な画質で可視化する能力を IRIS がもつことが実証されました。

3. 波及効果

IRIS による高密度標識による高精細な画像と無制限の多重染色は、様々なタンパク質が複雑に結合することで制御される生命現象を解明するための強力な手段となります。IRIS は、標的を可視化するための標識プローブを順次交換しながら画像をつくります。その特徴から、①無制限の多重染色、②狭い領域に共存する複数の分子配置の捕捉を可能とするとともに、③長時間の撮影による三次元超解像顕微鏡や④高輝度の照明によりプローブ結合位置測定精度を向上させたスーパー超解像顕微鏡へと発展する潜在的能力を持ちます。また、⑤細胞内で分子プローブが結合するサイトのマッピングや、⑥タンパク質間の結合に働くモチーフの検索にも応用できます。

4. 今後の予定

細胞骨格にのみならず多数の生体分子に対するプローブの開発を現在進めています。細胞研究への応用のみならず、癌や神経変性疾患など病気に関係する異常なタンパク質の分布や蓄積をいち早く捉えるなど革新的な病理診断・病態解明への応用も視野に入れた開発を進めています。

<論文タイトルと著者>

Multitarget super-resolution microscopy with high-density labeling by exchangeable probes

Tai Kiuchi, Makio Higuchi, Akihiro Takamura, Masahiro Maruoka & Naoki Watanabe

<用語解説>

注1)

超解像顕微鏡法の3つの方式

1. STED (誘導放出制御顕微鏡法) : Stimulated emission depletion microscopy
2. SIM (構造化照明顕微鏡法) : Structured illumination microscopy
3. PALM/STORM (光活性化局在性顕微鏡法および確率的光学再構築顕微鏡法) : Photoactivated localization microscopy および Stochastic optical reconstruction microscopy

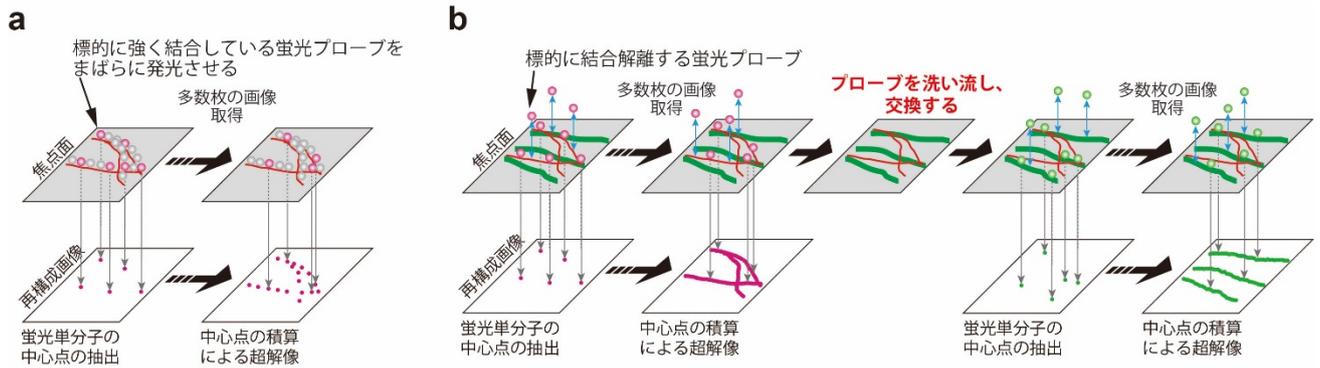


図1 超解像顕微鏡法 PALM/STORM と比較した IRIS の優位性。 (a) PALM/STORM では、標的に蛍光抗体や蛍光タンパク質を結合させ、それらをまばらに発光させる。その中心点を多数の画像を用い積算することで超解像画像を再構成する。(b) IRIS では、標的に繰り返し結合解離する蛍光プローブを用いて、結合位置を抽出し、超解像画像を再構成する。PALM/STORM では標識密度に限界があるが、IRIS では取得する画像枚数を増やすことで標識密度を上限なく高めることができる。さらにプローブを交換することで、多種類の標的を画像化できる。

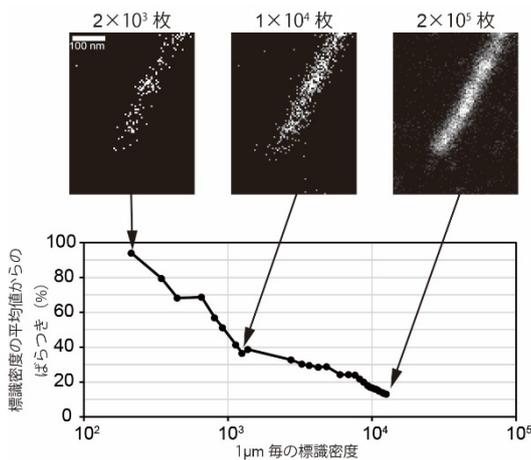
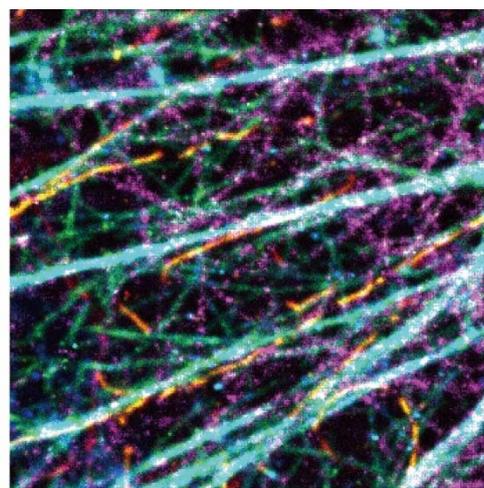
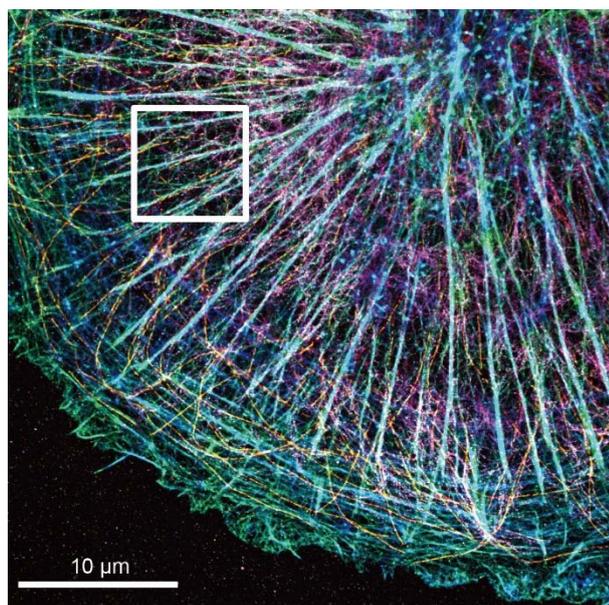


図2 アクチンフィラメントを用いた標識密度に応じた超解像の画質向上の検証。 標識密度が増加するに従って、再構成される超解像画像がスムーズに標識され画質が向上し(上の画像)、標識のばらつきが減少する(下のグラフ)。画像の上部の数字は、超解像画像を作成するために使った元蛍光画像の枚数。



底面 全体
 ● アクチンフィラメント
 ● 微小管
 ● 中間径フィラメント
 ● 接着斑

図3 : IRIS による多重染色超解像。 アクチンフィラメント、微小管、中間径フィラメント、接着斑が細胞の底面と全体で可視化されている。右図は、左図の白枠で囲まれた場所の拡大図。