

生きた細胞の構造を鮮明に撮る！

－自然に明滅する蛍光色素の開発と超解像蛍光イメージングへの応用－

1. 発表者：

浦野 泰照（東京大学大学院医学系研究科生体物理医学専攻、同薬学系研究科 教授）

神谷 真子（東京大学大学院医学系研究科生体物理医学専攻 助教）

宇野 真之介（東京大学大学院医学系研究科生体物理医学専攻 博士課程4年）

2. 発表のポイント：

- ◆自然に明るくなったり、暗くなったり（明滅）する蛍光色素を開発し、細胞に悪い影響を及ぼさない温和な条件で生きた細胞の超解像蛍光イメージング（注1）に成功しました。
- ◆これまで一般的な蛍光色素を明滅させるためには細胞に悪い影響を及ぼす特殊な条件が必要でしたが、ローダミンと呼ばれる蛍光色素に最適な化学スイッチを導入してこの課題を解決しました。
- ◆温和な条件下で超解像蛍光イメージングができるようになり、これまで観測できなかった生命現象の理解に貢献できると期待されます。

3. 発表概要：

細胞を生きた状態のまま観察できる蛍光イメージング法は、これまでさまざまな生命現象を明らかにしてきました。しかし、蛍光イメージング法の空間分解能は約 200 ナノメートル（注2）であり、細胞の中にある複雑な構造を観察するには不十分でした。近年研究が進められている「超解像蛍光イメージング法」は、蛍光色素を明滅させることでこの限界を超えられる手法です。しかし、この手法で一般的な蛍光色素を用いる場合には細胞に添加物を加え、強いレーザーを照射する必要があります。このような条件は細胞に悪影響を与え、細胞を元気な状態で観察するのは困難でした。

東京大学大学院医学系研究科、同薬学系研究科浦野泰照教授らは、ローダミンと呼ばれる蛍光色素に最適な化学スイッチを導入し、条件によらず自然に明滅する蛍光色素「HMSiR」の開発に成功しました（添付資料 図参照）。さらに開発した蛍光色素を用いて細胞の骨格を形成する微小管を染色し、細胞に優しい弱いレーザー光によって約 1 時間にわたって微小管の動く様子を観察することに初めて成功しました。

今回開発した蛍光色素を使うことで生きた状態のまま細胞の詳細な構造を観察することが可能となり、さまざまな生命現象の解明に役立つことが期待できます。

4. 発表内容：

蛍光イメージング法は細胞を生きた状態のまま観察できるため、これまでさまざまな生命現象の解明に役立ってきました。しかし、光は波の性質をもつため蛍光イメージング法の空間分解能は波長の半分程度（約 200 ナノメートル）であり、細胞内にある複雑な微細構造を観察することはできませんでした。近年盛んに研究が進められている「超解像蛍光イメージング法」はこの分解能の限界を超える画期的な手法であり、今まで見えなかった現象を捉えられる可能性があります。

超解像蛍光イメージング法の一つである一分子局在化法では蛍光色素を明滅させ、それぞれの分子が空間的に重ならないように順番に光らせます。そして、光らせた各分子の位置を数 10 ナノメートルの精度で正確に決定し、最終的に全ての分子の位置情報を重ねあわせて高解像度の画像を得る手法です。しかし、この手法で一般的な蛍光色素を明滅させるためには、細胞への高濃度のチオール添加や強いレーザー照射が必要であり、細胞を元気な状態で観察することは困難でした。

東京大学大学院医学系研究科、同薬学系研究科浦野泰照教授らの研究グループは、ローダミンと呼ばれる蛍光色素に化学スイッチを導入することで、従来必要であった添加物や強いレーザー照射が無くとも自然に明滅する蛍光色素の開発に成功しました。

同研究グループはこれまでに分子内で結合を作る構造を持つローダミン類が、強い蛍光を示す開環体構造と全く蛍光を示さない閉環体構造の 2 種類の構造を取ることを明らかにしてきました。この 2 種類の構造は室温下で可逆的に変換され、光る状態と光らない状態が自然に入れ替わります。同時に光っている分子の割合と光る状態が続く時間を最適化することで一分子局在化法に有用な自然に明滅する蛍光色素が開発可能と考え研究を始めました。

ローダミン類を一分子局在化法で用いるためには、(1) 空間的に重ならないように同時に蛍光を発する分子が数%以下であることと (2) 蛍光を発している時間が顕微鏡での観察に適した数 100 ミリ秒であることが重要です。同研究グループはローダミンの化学構造を変化させることでこの割合と光る時間を調節できることを見出しました。化学構造を最適化した結果、約 1% というごく僅かな分子のみが同時に光り、約 300 ミリ秒間光った後に蛍光が消え、また別の分子が光るといった性質を持つ蛍光色素「HMSiR (Hydroxymethyl Si-rhodamine)」を開発することに成功しました (添付資料 図参照)。

HMSiR の自然に明滅する性質は、これまで困難であった測定法を可能にしました。従来の一時的な蛍光色素を用いる一分子局在化法では全反射顕微鏡を用いて強いレーザーを照射する必要があったため、ガラス面から約 200 ナノメートルまでにある細胞膜近傍の構造しか観測できませんでした。一方、HMSiR はレーザー強度の弱いスピニングディスク共焦点レーザー顕微鏡 (注 3) 下でも明滅するため、細胞の深部にある構造を観察することができます。同研究グループは、ガラス面から数マイクロメートル (注 4) 離れている細胞の核上部に位置する直径約 120 ナノメートルの環状構造を持つ核膜孔を高解像度で観察することに成功しました。

さらに HMSiR を用いると細胞への励起光による毒性を最小限に抑えて超解像蛍光イメージングが可能になります。同グループは細胞の骨格を形成する微小管を HMSiR で染色し、細胞に優しい弱いレーザー光によって約 1 時間にわたって微小管の動く様子を約 50 ナノメートルの高い空間分解能で観察することに初めて成功しました。

このように、今回開発した蛍光色素を使うことでこれまで難しかった細胞の深部にある構造の観察や生きた細胞の連続観察が高解像度で行えるようになり、さまざまな生命現象の解明に繋がると期待されます。

本研究は、以下の研究グループとの共同研究で行われました。

群馬大学理工学研究院 飛田研究室（教授 飛田成史）

理化学研究所生命システム研究センター 岡田研究室（チームリーダー 岡田康志）

東京大学大学院薬学系研究科 船津研究室（教授 船津高志）

東京大学生産技術研究所 藤田研究室（教授 藤田博之）

本研究は、文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究「蛍光生体イメージ」の支援を受けて行われました。

5. 発表雑誌：

雑誌名：「Nature Chemistry」(7月20日)

論文タイトル：A spontaneously blinking fluorophore based on intramolecular spirocyclization for live-cell super-resolution imaging

著者：Shin-nosuke Uno, Mako Kamiya*, Toshitada Yoshihara, Ko Sugawara, Kohki Okabe, Mehmet C. Tarhan, Hiroyuki Fujita, Takashi Funatsu, Yasushi Okada, Seiji Tobita, and Yasuteru Urano*

DOI番号：10.1038/nchem.2002

7. 問い合わせ先：

浦野 泰照（東京大学大学院医学系研究科生体物理医学専攻 同薬学系研究科 教授）

TEL: 03-5841-3601, FAX: 03-5841-3563, E-mail: uranokun@m.u-tokyo.ac.jp

神谷 真子（東京大学大学院医学系研究科生体物理医学専攻 助教）

TEL: 03-5841-3601, FAX: 03-5841-3563, E-mail: mkamiya@m.u-tokyo.ac.jp

8. 用語解説：

（注1）超解像蛍光イメージング

通常の蛍光イメージング法の空間分解能の限界を超えて、数10ナノメートルの空間分解能で観察できる手法。今回、研究グループは超解像蛍光イメージング法の一つである一分子局在化法と呼ばれる手法に有用な蛍光色素の開発に成功しました。

（注2）ナノメートル（nm）

1ナノメートルは、10億分の1メートル。

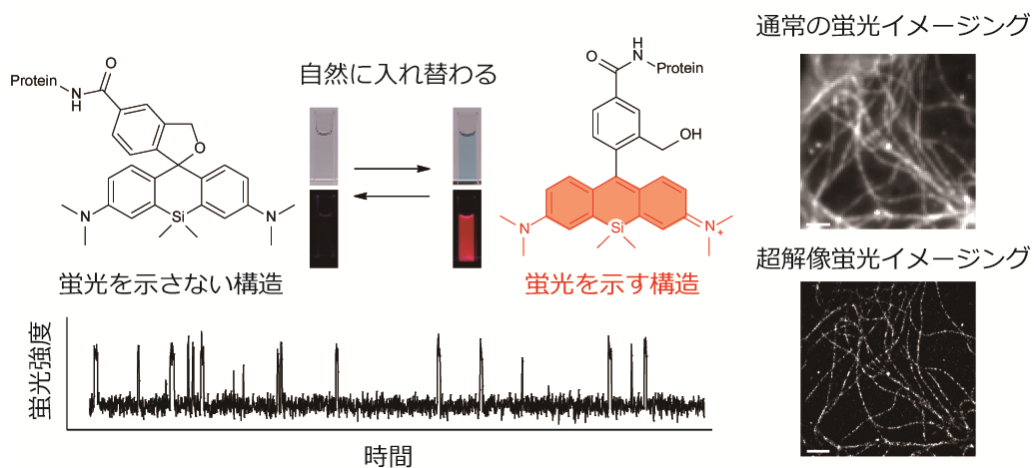
（注3）スピニングディスク共焦点レーザー顕微鏡

多数のピンホールが配置されたディスクを回転させ、そこにレーザーを照射してマルチビームをつくり同時にスキャンすることで、一般的な共焦点レーザー顕微鏡に比べ高速に画像を取得できる顕微鏡。レーザーを分散させて照射するため試料へのダメージや蛍光色素の褪色が抑えられ、生細胞イメージングに汎用されている。

（注4）マイクロメートル（ μm ）

1マイクロメートルは、100万分の1メートル。

9. 添付資料：



蛍光を示す構造（開環体構造）と蛍光を示さない構造（閉環体構造）が自然に入れ替わる HMSiR を使うと従来よりも温和な条件で超解像蛍光イメージングによる画像が得られる。右図は生きた細胞の微小管を観察した結果。図内左下の白線は2マイクロメートルを示す。