



分野: 生命科学・医学系

キーワード: 蛍光タンパク質、光スイッチング、超解像イメージング

生きた細胞を超高解像観察！ 発光の ON-OFF が自在な赤色蛍光タンパク質を開発

【研究成果のポイント】

- ◆ 光らせることで細胞の観察を可能にする蛍光タンパク質について、発光の ON-OFF を人為的に行うことが可能な、赤色蛍光タンパク質を開発
- ◆ 従来は、発光の明るさなど細胞観察に必要な特性が不十分で、超解像蛍光イメージング^{※1}への応用が困難だった
- ◆ 生きた細胞内の微細な構造の相互作用を調べるツールとしての応用に期待

❖ 概要

大阪大学産業科学研究所の尾崎(野間)涼平さん(大学院生命機能研究科博士後期課程)、永井健治教授らの研究グループは、三重大学大学院医学系研究科の竹本研教授、設楽久志助教らとともに、発光の ON-OFF を人為的に行うことが可能な、ポジティブ光スイッチング型赤色蛍光タンパク質^{※2}「rsZACRO」の開発に成功しました。

今回、研究グループは、既存の赤色蛍光タンパク質を改良することで、3倍明るく、OFF状態への切り替え速度が5倍速い「rsZACRO」を開発することに成功しました。既存のポジティブ光スイッチング型緑色蛍光タンパク質「Kohinoor2.0^{※3}」と併用することで、生きた細胞内の微細な構造を色分けした超解像蛍光イメージングが可能となります(図1)。

本研究成果は米国科学誌「ACS Nano」(オンライン)に2月12日(水)(現地時間)に公開されました。

❖ 研究の背景

光スイッチング蛍光タンパク質は、光照射によって蛍光性を有する ON 状態と、無蛍光な OFF 状態を切り替えることが可能な蛍光タンパク質です。励起光によって ON 状態へ遷移(ON スwitching)し、別の波長の光によって OFF 状態へ遷移(OFF スwitching)するものは「ポジティブ型」に分類され、超解像蛍光イメージングへ応用されています。

超解像蛍光イメージングとは、光を照射することで、生きた細胞など、サイズが 200 nm 以下の観察対

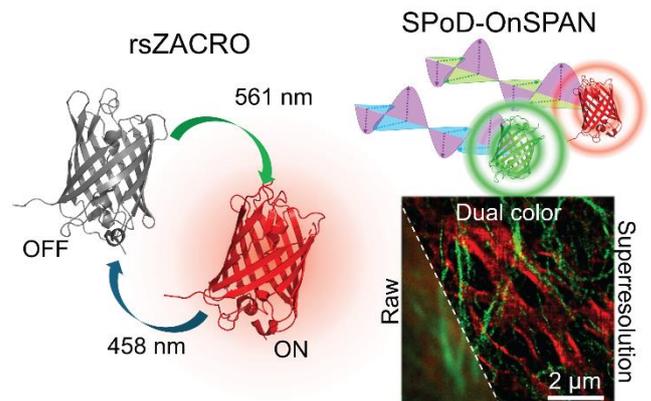


図1:今回開発した rsZACRO(左)と、rsZACRO を用いた SPoD-OnSPAN による 2 色超解像イメージング(右)

Press Release

象を可視化する技術ですが、従来の方法では、照射する光が強すぎるために細胞がダメージを受け、本来の生命活動を阻害してしまう懸念がありました。

そこで研究グループは、観察対象を蛍光標識する色素にポジティブ光スイッチング型緑色蛍光タンパク質を用いることで、照射する光の強さを大幅(約 100 万分の 1)に低減させる手法である SPoD-OnSPAN^{※4} 法を開発しました。この手法を拡張し、生細胞の中で異なる微細構造の同時観察が実現すると、生命現象をより包括的に理解することが可能になります。

SPoD-OnSPAN 法に応用可能なポジティブ光スイッチング型赤色蛍光タンパクを探したところ、赤色のものは、オリゴマー^{※5} を形成するため蛍光タグ^{※6} として使用できない、明るさや光スイッチング特性が不十分、などの理由で超解像イメージングへの応用はされていませんでした。そのため、これらの蛍光タンパク質を用いて生きた細胞内の 2 つの微細構造の位置関係性を調べる研究は、色のバリエーションの制約により困難でした。

❖ 研究の内容

研究グループは、赤色蛍光タンパク質にタンパク質工学である試験管内分子進化法を用いて遺伝子改良することにより「rsZACRO」を開発しました。rsZACRO の rs は reversible switching(可逆的)の略で、ZACRO は赤い果実の柘榴(ざくろ)に加え、“究極・未知”をあらわす「Z」と、ギリシャ語で“頂点・先端”を意味する「ACRO」を組み合わせる“究極の先端”の意味を持たせたいという願いから命名しました。

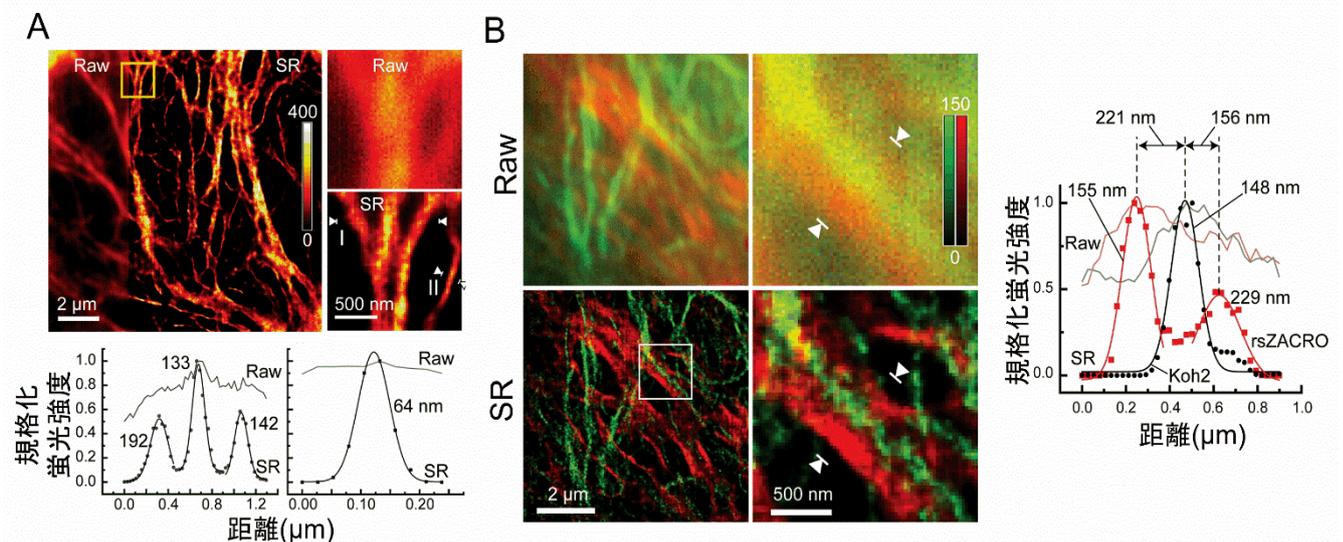


図 2:

(A)

上. Vimentin-rsZACRO を発現する HeLa 細胞の生画像(Raw)と SPoD-OnSPAN による超解像イメージング (SR)画像。

下. Raw 画像と SR 画像の蛍光強度のラインプロファイル。ラインプロファイルは SR 画像に示した矢印 I、II に挟まれた蛍光強度から得た。数値は FWHM(半値全幅, nm)を示す。

(B)

左. Vimentin-rsZACRO と LifeAct-Kohinoor2.0(緑色蛍光タンパク質)を発現する HeLa 細胞の生画像(Raw)と SPoD-OnSPAN による超解像イメージング画像(SR)。

右. Raw 画像と SR 画像における rsZACRO と Kohinoor2.0 の蛍光強度のラインプロファイル。ラインプロファイルは Raw と SR 画像に示した矢印に挟まれた蛍光強度から得た。数値は FWHM(半値全幅, nm)を示す。

Press Release

rsZACRO は、哺乳類細胞内において、既存のポジティブ光スイッチング型赤色蛍光タンパク質より 3 倍明るく、5 倍速い OFF スwitching速度を示しました。さらに、吸収スペクトルの pH 依存性から、タンパク質内部の発色団^{※7}が pH 中性付近で電離状態と非電離状態^{※8}の比率を一定に保っていることが判明しました。この比率はそれぞれ、OFF スwitching、蛍光に寄与することから、rsZACRO の高い光スイッチング特性に重要であることが示唆されました。また、細胞骨格関連タンパク質との融合タンパク質を発現する哺乳類細胞に対し SPoD-OnSPAN 観察を行い、赤色の超解像イメージングを実証しました。さらにポジティブ光スイッチング型緑色蛍光タンパク質 Kohinoor2.0 を発現する哺乳類細胞との SPoD-OnSPAN 観察を行い、細胞内の微細構造の 2 色超解像イメージングに成功しました(図 2)。

❖ 本研究成果が社会に与える影響(本研究成果の意義)

本研究成果により、生体内の複数の微細構造の動態に関わる未知の生命現象の発見につながることを期待されます。

❖ 特記事項

本研究成果は、2025 年 2 月 12 日(水)(現地時間)に米国科学誌「ACS Nano」(オンライン)に掲載されました。

タイトル: “A Positive-type Reversibly Photoswitching Red Fluorescent Protein for Dual-color Superresolution Imaging with Single Light Exposure for Off-switching”

著者名: Ozaki-Noma Ryohei, Wazawa Tetsuichi, Kakizuka Taishi, Shidara Hisashi, Takemoto Kiwamu, Nagai Takeharu

DOI: <https://doi.org/10.1021/acsnano.4c16847>

なお、本研究は、科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推進事業 CREST における研究課題 (JPMJCR15N3)、文部科学省科学研究費助成事業新学術領域研究「シンギュラリティ生物学」(18H05408、18H05410)、JSPS 科研費(21K19225、22K04891、23KJ1492)の助成を得て行われました。

❖ 用語説明

※1 超解像蛍光イメージング

光学顕微鏡のうち、光の回折限界 (約 200 nm)以下の空間分解能を有する光学顕微鏡法。

※2 ポジティブ光スイッチング型赤色蛍光タンパク質

蛍光タンパク質は、励起光によって光るタンパク質であり、生体試料に遺伝子導入が可能のため光学顕微鏡の標識プローブとして有用である。蛍光タンパク質のうち、励起光によって蛍光を示す状態(ON)と示さない状態(OFF)を可逆的に遷移(光スイッチング)するものを、光スイッチング蛍光タンパク質(rsFP)という。rsFP のうち蛍光のための励起光によって ON 状態に遷移するものはポジティブ型に分類される。ポジティブ光スイッチング型蛍光タンパク質のうち、赤色蛍光を示すものを、ポジティブ光スイッチング型赤色蛍光タンパク質という。

※3 Kohinoor2.0

緑蛍光を示すポジティブ光スイッチング型蛍光タンパク質。UV 光によって OFF スwitchングし、励起光である青色光で ON スwitchングする。

※4 SPoD-OnSPAN

偏光面が回転する励起光/スイッチング光をポジティブ光スイッチング型蛍光タンパク質に照射することで蛍光の揺らぎを誘発し超解像イメージングを達成する顕微鏡法。

※5 オリゴマー

タンパク質の単量体(モノマー)が比較的少ない数で結合した重合体のこと。

※6 蛍光タグ

タンパク質などを観察するための蛍光標識のこと。

※7 発色団

蛍光タンパク質の内部に位置する α ヘリックスの 3 つのアミノ酸が環化、脱水、酸化によって形成される構造(オワンクラゲ由来 GFP では、65Ser、66Tyr、67Gly が発色団 4-(p-hydroxybenzylidene)-5-imidazolinone を形成する)。

※8 電離・非電離状態

蛍光タンパク質の発色団を構成するチロシンのヒドロキシ基の水素 H が乖離している状態を電離、結合している状態を非電離状態という。

【尾崎(野間)さん(大学院生)のコメント】

ポジティブ光スイッチング型赤色蛍光タンパク質は超解像イメージングに需要があるものの、2008 年以降から開発が途絶えていました。今回、偶然にも三重大学で開発された赤色蛍光タンパク質にポジティブ型の光スイッチング能があることを発見し、本研究に至りました。蛍光が点滅する光スイッチングの性質はとても面白く、超解像蛍光イメージングを通じて生命科学研究を切り拓く応用例を今後示していきたいと思えます。

❖ 参考 URL

大阪大学産業科学研究所・永井研究室

<https://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/bse/index.html>

三重大学大学院医学系研究科生化学分野・竹本研究室

<https://www.medic.mie-u.ac.jp/biochem/index.html>

Press Release

❖ 本件に関する問い合わせ先

<研究に関すること>

大阪大学産業科学研究所 教授

永井健治(ながい たけはる)

TEL:06-6879-8481 FAX:06-6875-5724

E-mail:ng1@sanken.osaka-u.ac.jp

<プレスリリースに関すること>

大阪大学 産業科学研究所 広報室

TEL:06-6879-8524

E-mail:press@sanken.osaka-u.ac.jp

三重大学 企画総務部総務チーム 広報室

TEL:059-231-9789 FAX:059-231-9000

E-mail:koho@ab.mie-u.ac.jp