



大阪大学  
OSAKA UNIVERSITY

国立大学法人 大阪大学

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-1

TEL: 06-6877-5111 (代)

www.osaka-u.ac.jp

Press Release



永井 健治

ながい たけはる

産業科学研究所  
(生体分子機能科学研究分野 教授)

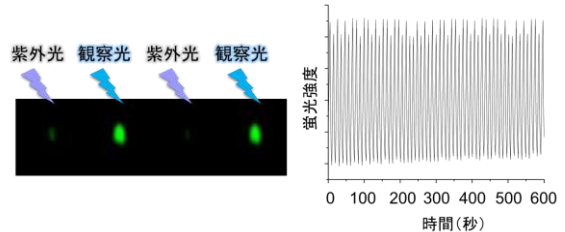
【発表】 細胞に優しい！高速に光スイッチできる蛍光タンパク質を開発  
～極微世界における生命動態の解明に光～

【本研究成果のポイント】

- 極めて安定的で高速に光スイッチのオンオフ可能な蛍光タンパク質の開発に成功
- 超解像観察につきものの光毒性が極めて低く、優しい生体試料観察が可能
- 細胞内の様々な局在・機能と結びつけた観察が可能になり、極微の世界における生命動態のダイナミクスの解明に期待

【概要】

大阪大学産業科学研究所永井健治教授、大学院工学研究科藤田克昌准教授らの研究チームは、高速に光スイッチングが可能な蛍光タンパク質 Kohinoor (コヒノール) の開発に成功しました。Kohinoor は紫外光を当てると蛍光性がオフになり、観察用の光を当てると蛍光性がオンになる、正の光スイッチングタンパク質※1 であり、従来の正の光スイッチングタイプに比べて明るく、スイッチオンが4倍、スイッチオフが3倍速い応答速度を示し、光スイッチング回数が25倍長く続く高い安定性を示します。



左は試験管内に入れた Kohinoor が紫外光照射により蛍光性がオンオフする様子を示した蛍光観察像示したもの。右はその時の蛍光強度の時系列変化を示している。

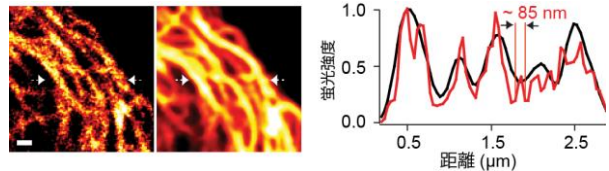
光スイッチング蛍光タンパク質は、回折限界※2 を超えた空間解像度を得ることができる超解像顕微鏡※3 観察に広く利用されています。従来の超解像観察では、強い励起光を用いることによる光毒性※4 が問題視されてきました。また、装置が複雑であり、普及を妨げる要因ともなっていました。今回、正の光スイッチング性能を持つ Kohinoor を用いることにより、従来の超解像顕微鏡のシステム構成を大幅に簡略化することに成功しました。

特筆すべきこと点として、観察時の光強度が  $0.004 \text{ J/cm}^2$  という、従来の同一計測法に比べて  $1/10,000 \sim 1/375$  倍もの極めて低い光強度で細胞に優しい超解像顕微鏡法が実現したことが挙げられます。

今回開発した Kohinoor を用いることで、様々な高速超解像技術に応用可能となります。また、蛍光タンパク質を用いることで、細胞内の様々な分子の局在・機能と結びつけた観察が可能となることから、回折限界を超えた極微の世界における生命動態のダイナミクスを明らかにすることが将来的に可能です。

本研究成果は、米国 Nature Methods (4月27日) (米国東部時間) に掲載されます。

超解像観察像 通常の観察像



左から Kohinoor に超解像観察像、通常の顕微鏡で観察した像。スケールバーは 500 nm。右のグラフは同一線上の蛍光強度輝度値の値を示している。最も細い所で 85 nm という、回折限界 (~200 nm) を超えた分解能を実現している。

【研究の背景】

光の回折限界を超えた超解像計測は、細胞内の微細構造を生きたままナノメートル(1 mmの100万分の1)の大きさで観察可能な技術で、2014年ノーベル化学賞を受賞しています。これまでに数多くの超解像技術が開発されてきましたが、どの手法も蛍光物質を利用します。特に、光により蛍光性をオン・オフ可能な光スイッチング蛍光タンパク質は、PALM※3やRESOLFT※3といった超解像顕微鏡技術に幅広く利用されています。



## Press Release

光スイッチング蛍光タンパク質には、紫外光により蛍光性がオンになり、観察光(励起光)により観察するとともに蛍光性がオフになる負のスイッチングタイプ、観察光により蛍光性がオンになり、紫外光により蛍光性がオフになる正のスイッチングタイプ、観察光、蛍光性のオン・オフ光が全て異なる波長のデカップルタイプの3種類が存在しています。これら3種のうち、種類が豊富な負のスイッチングタイプの蛍光タンパク質がよく用いられてきました。しかしながら、**観察中に蛍光性がオフになるため十分な蛍光を得るためには強い光を当てる必要があります**。また、RESOLFTの装置が複雑になるため、STED<sup>※3</sup>に比べて1000倍以上弱い光で観察可能な技術にもかかわらず、RESOLFTの普及を妨げる要因の一つとなっていました。

一方、正のスイッチングタイプやデカップルタイプは、観察光により蛍光性をオンにすることが出来るため、弱い励起光観察が可能という利点があるにもかかわらず、光スイッチング速度が遅い・光安定性が悪い、といった問題点がありました。従って、**高速・高安定な正の光スイッチングタイプの蛍光タンパク質が期待されていました**。

### 【本研究成果が社会に与える影響(本研究成果の意義)】

今回我々が開発したKohinoorは、**弱い光強度で使用可能であり、光毒性の低い、生体に優しい超解像イメージングが可能であるため、超解像顕微鏡の課題の一つである光毒性の問題を克服することができます**。

また、蛍光タンパク質を用いることで、細胞内の様々な分子の局在・機能と結びつけた観察が可能となることから、**回折限界を超えた極微の世界における生命動態のダイナミクスを明らかにすることが将来的に可能です**。

### 【特記事項】

本研究は、文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究「少数性生物学」、物質・デバイス領域共同研究拠点、日本学術振興会外国人特別研究員の助成によりなされたものです。

また、米国のNature Methods誌上にて4月27日(米国東部時間)に掲載されます。

【キーワード】 蛍光タンパク質、光スイッチング、超解像観察、細胞

### 【用語解説】

#### ※1 光スイッチング蛍光タンパク質:

2008年ノーベル化学賞受賞で知られる下村脩博士らの蛍光タンパク質は、励起光を当てると蛍光を発します。この蛍光タンパク質に変異を加えることで、例えば紫外光を当てることにより蛍光性を制御することの出来るタンパク質を作ることができます。2004年に理研の宮脇敦史博士らは、「Dronpa」と呼ばれる、紫外光により蛍光性がオフになる光スイッチング蛍光タンパク質を報告しました。今日では、多くの光スイッチング蛍光タンパク質が開発され、超解像イメージングに用いられています。

#### ※2 回折限界:

光は様々な物質にあたると、その物質の構造の細かさに応じてその進行方向が変化します。それを光の回折と呼びます。回折した光は対物レンズによって集められ、像を形成します。形成した像の細かさは、使用した光の波長や対物レンズの性能によりますが、可視光では200 nm程度が限界になります。

#### ※3 超解像顕微鏡(PALM, STED, RESOLFT):

2014年ノーベル化学賞を受賞した技術で、上記回折限界を超える分解能を、可視光を用いた光学顕微鏡で



大阪大学  
OSAKA UNIVERSITY

国立大学法人 大阪大学

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-1

TEL: 06-6877-5111 (代)

www.osaka-u.ac.jp

## Press Release

得ることができます。光スイッチング蛍光タンパク質を1分子レベルで確率的に光らせ、その位置座標を元に超解像を行うPALM (PhotoActivated Localization Microscopy)や、蛍光の誘導放出を利用したSTED (Stimulated Emission Depletion)法が知られています。このうちSTED法では、ドーナツ形状の光を観察部位に照射して、不要な蛍光をオフにします。この原理を光スイッチングタンパク質に応用したものがRESOLFT (Reversible Saturable Optical Fluctuation)法で、STED法に比べ1000～10万倍弱い光で超解像イメージングを実現することが可能です。今回、Kohinoorを用いることで、さらに375～10,000倍低い光強度での観察に成功しました。

#### ※4 光毒性:

強力な光を細胞に照射すると、細胞内で活性酸素などが発生し細胞が傷害されます。これを光毒性と呼びます。