

# 細胞内タンパク質複合体の分子構成をナノスケールで可視化する革新的手法 —多種のタンパク質で構成される分子複合体の実体が明らかに—

## 概要

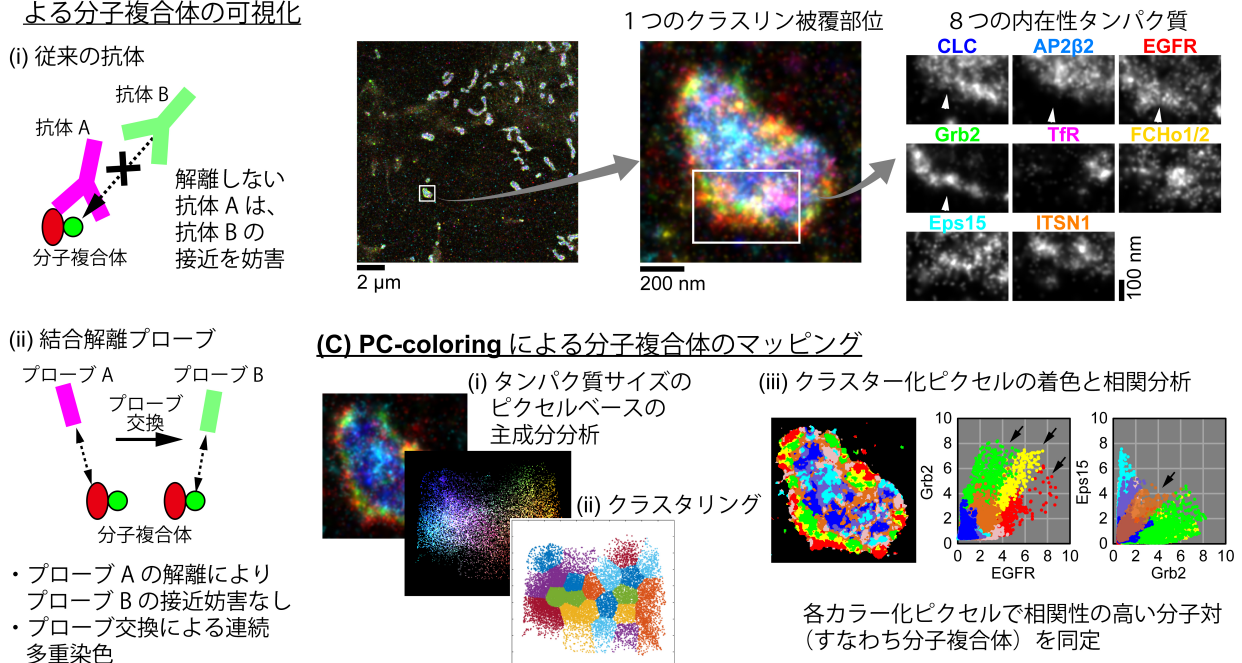
木内泰 医学研究科准教授（研究当時、現：同特定准教授）、渡邊直樹 生命科学研究所教授（兼：医学研究科教授）、Dimitrios Vavylonis 米国リーハイ大学教授との研究グループは、細胞機能を担うタンパク質複合体を可視化するため、抗血清から作製した超解像顕微鏡法 IRIS 用プローブと画像解析 PC-coloring を開発し、8つの内在性タンパク質の分子局在とそれらの分子複合体の分布を明らかにしました。

内在性タンパク質の抗体染色において、標的分子に結合した抗体は、その大きさ（12 nm）に起因して、その近傍の分子への抗体の接近を空間的に妨害します（図 1A i）。この不完全な標識が、複数の分子で構成される複合体の超解像可視化を難しくしていました。超解像顕微鏡法 IRIS は、標的に結合解離するプローブを用いて、多数のプローブの結合（標識）と解離によって空間的に妨害されない高密度標識と、さらにプローブ交換によって連続多重染色を実現しています（図 1A ii）。本研究では、抗血清由来の結合解離プローブによる8種の内在性タンパク質の可視化（図 1B）と、それらの分子局在を定量解析する新手法 PC-coloring による分子複合体のマッピングを可能にしました（図 1C）。

その結果、膜受容体を細胞内に取り込む分子装置であるクラスリン被覆部位の縁で、上皮成長因子受容体（EGFR）を外側に配置した層状の分子複合体を発見しました。これは、EGFR をクラスリン被覆部位へリクルートする分子複合体の構成を示唆しています。今後、本研究手法によって、細胞内の様々な分子複合体の実体が明らかになることが期待できます。

本研究成果は、米国東部時間 2025 年 4 月 23 日午前 11 時（日本時間 24 日午前 0 時）に、米国の国際学術誌「*Structure*」にオンライン掲載されました。

図 1 (A) 結合解離プローブによる分子複合体の可視化 (B) 抗血清由来の結合解離プローブによる IRIS 多色超解像イメージング (C) PC-coloring による分子複合体のマッピング



## 1. 背景

細胞内の多種多様なタンパク質は、様々な分子複合体を形成し、それらを構成要素として細胞移動や分裂といった高度な細胞機能を発揮しています。多くのタンパク質は、結合相手の異なる複数の結合ドメインを持つため、それらの複合体の分子構成は、その働きを理解する上で極めて重要です。最近報告された超解像顕微鏡法では、その分解能は、分子複合体内の構成分子の位置が識別できる数ナノメートルにまで向上しています。しかし、抗体を使った内在性タンパク質の染色では、抗体の大きさ（約 12 nm）よりも狭い領域には複数の抗体を入れることはできません（図 1Ai）。このため抗体に標識された分子の周りの分子を可視化することは容易ではありません。細胞内でタンパク質複合体の分子構成を調べるためには、分解能だけでなく、タンパク質の標識方法の改善が必要でした。我々が開発した多色超解像顕微鏡法 IRIS（用語解説 1）では、標的に結合解離する蛍光プローブを用いた標識方法（図 1Aii）を開発し、多数回のプローブ結合を捉えることで、従来の抗体染色の限界を超えた高密度標識を実現しています。さらに結合解離プローブは洗い流せるので、別のプローブと交換することで、原理的な制限のない連続多重染色も実現しています。これまで結合解離プローブは、結合タンパク質の断片、モノクローナル抗体の断片（Fab）や抗原認識部位の改変抗体から作製してきました。本研究では、新たに抗血清から結合解離プローブを作製する方法を開発しました。抗血清は、抗原の様々な部位に対する抗体を含むため、分子複体内で一部の抗体結合部位が隠された標的分子も可視化することが期待できます。その結果、抗体が結合できる最大密度を超えた標識密度で、膜受容体を細胞内に取り込む分子装置であるクラスリン被覆部位で 8 つの内在性タンパク質の分布を明らかにしました。さらにそれらの分子局在の相関性を定量解析する Protein Cluster coloring（PC-coloring）を開発し、それらの分子複合体の分布を明らかにしました。

## 2. 研究手法・成果

ウサギ抗血清に最も多く含まれる IgG クラスの抗体は、抗原結合部位を 2 つもつため、一般的に抗原と強く結合します。IgG 抗体をタンパク質分解酵素パパイニンで処理することで、抗原結合部位を 1 つにして、この親和性を弱めた抗体断片（Fab）を作製することができます。抗血清から蛍光標識 Fab の作製過程では、蛍光標識と Fab 化が、親和性に大きく影響を及ぼすため、我々は、このステップのプロトコルを詳細に検討しました。その結果、抗体を抗原ビーズに結合させ、抗原結合部位を保護した状態で、蛍光標識することで、非特異的な結合の少ない蛍光抗体を得ることができました。この蛍光抗体から Fab を作製し、さらに再精製することで、非特異的な結合が少なく、標的に結合後、解離する Fab プローブの作製に成功しました。この Fab プローブは、抗体が結合できる限界密度の 3.6 倍から 6 倍の高密度で内在性の標的タンパク質を標識しました。さらにこの Fab プローブは、数十ミリ秒から数百ミリ秒間、標的に結合していました。そこで複数フレームに渡って同じ標的に結合している Fab プローブの蛍光中心点を平均化することで、標的の位置精度を高め、IRIS 超解像画像の分解能を約 2 倍に改善できました（図 2）。

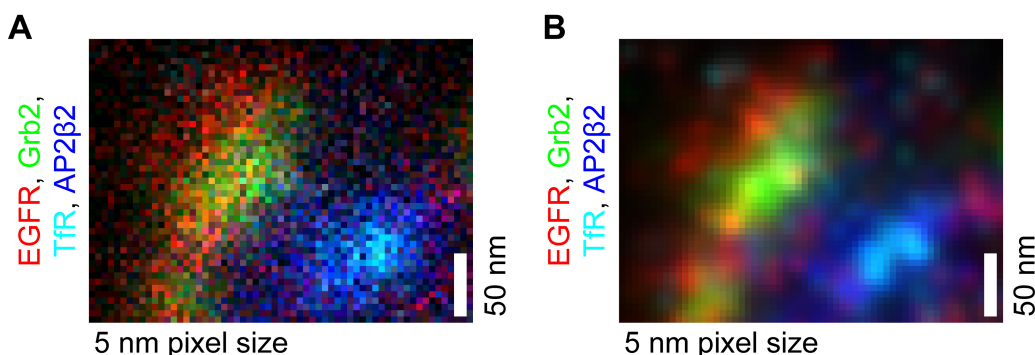


図 2：プローブの蛍光中心点の平均値を使った分解能の改善。(A) 標的に結合したプローブの蛍光中心点を積算して再構築された従来の超解像画像。

(B) 複数フレームに渡って結合したプローブの蛍光中心点の平均値と標準誤差を使って、ガウシアンレンダリングによって、再構築された超解像画像。分解能は、約 2 倍に改善している。

我々は、この手法で、膜受容体を細胞内に取り込む分子装置であるクラスリン被覆部位で、8つの内在性タンパク質の分子局在を明らかにしました（図1B）。興味深いことに上皮成長因子（EGF）の刺激によってその受容体（EGFR）とその結合タンパク質である Grb2 が、クラスリン被覆部位の縁でクラスター状に共局在していました（図1B 白矢頭）。EGFR は、EGF と結合することで、増殖・生存の細胞内シグナルを活性化するため、抗腫瘍薬の重要な標的ですが、EGF 刺激後、EGFR は、クラスリン被覆部位から細胞内に取り込まれ（エンドサイトーシス）、そのシグナルを不活性化します。クラスリン被覆部位の縁で共局在する EGFR と Grb2 のクラスターは、そのエンドサイトーシス過程に関わる分子複合体の形成部位を示しています。

この EGFR を含む分子複合体の構成を調べるため、我々は、分子局在の相関性を評価する画像解析 PC-coloring を開発しました。PC-coloring は、主成分分析（PCA）とクラスター分析を用いて、画像ピクセルを標的分子の強度比に基づいて分類します（図1C）。IRIS による高密度標識と高分解能は、タンパク質レベルの大きさのピクセル（5 nm）の分類、すなわち同一の分子複合体内の構成分子比でピクセルを分類することを可能にしました。この分類したピクセルで、分子局在の相関性を2つの標的分子間の相関係数を計算することで評価します。その結果、EGF 刺激した時にクラスリン被覆部位の縁に層状の分子複合体形成が明らかになりました。クラスリン被覆部位の縁の外側から EGFR の優勢な領域、EGFR と Grb2 の複合体形成領域、Grb2 の優勢な領域と Grb2 とクラスリン被覆部位構成分子の複合体形成領域が並んでいました（図3）。この EGFR とクラスリン被覆部位構成分子の間に Grb2 が位置する複合体の構成は、Grb2 が EGFR とクラスリン被覆部位を繋ぐことで、EGFR をリクルートすることを示唆しています。EGFR のエンドサイトーシスの遅延は、腫瘍の悪化と関連しており、今後、その遅延を引き起こす分子複合体の実体を明らかにすることが期待できます。本研究で実証したように IRIS と PC-coloring は、細胞機能を担っている様々な分子複合体の研究を強力に推し進めることができます。

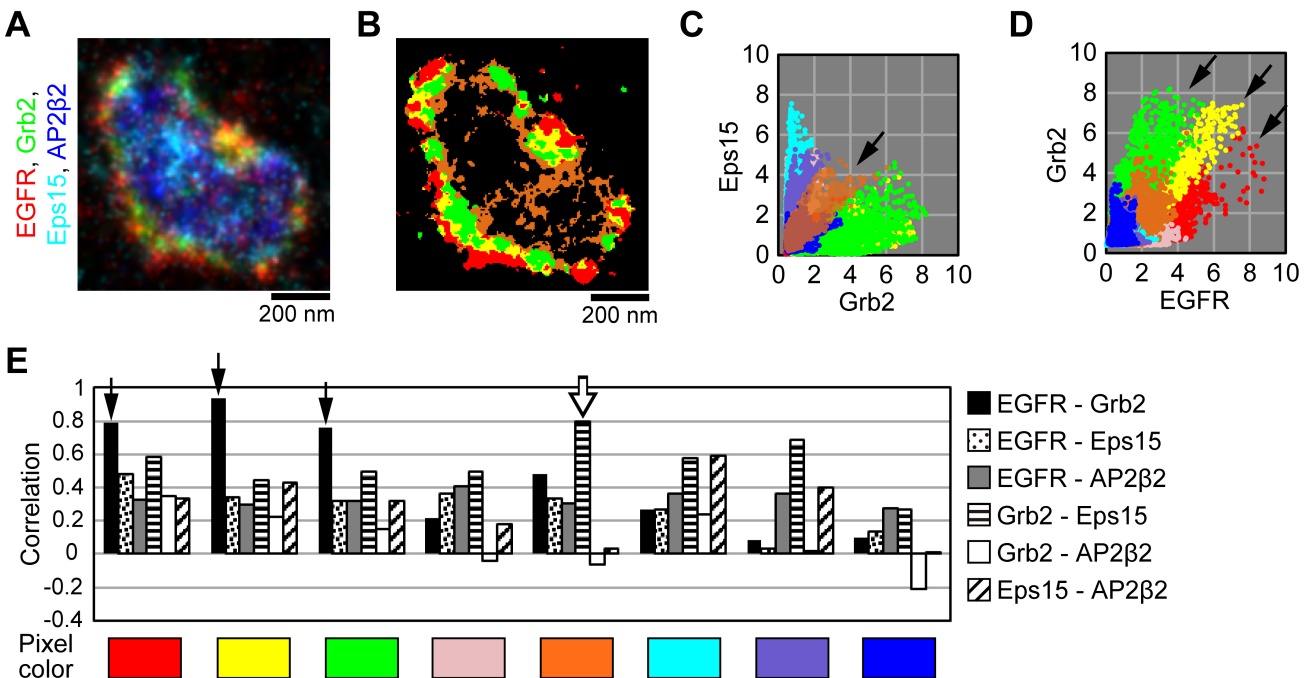


図3：クラスリン被覆部位の縁での層状の分子複合体。

(A) EGFR、Grb2、Eps15、AP2βのIRIS多色超解像画像。AP2βの分布がクラスリン被覆部位の範囲を示している。  
 (B) PC-coloringによって標的の強度比の近いピクセルを分類し、着色した。赤、黄、緑、オレンジのピクセルだけ表示している。  
 (C, D) カラー化ピクセルごとにGrb2とEps15の相関図(C)とEGFRとGrb2の相関図(D)。  
 (E) 各カラー化ピクセルにおける2つの標的分子間の相関係数。これらの強度比と相関係数からクラスリン被覆部位の縁の外側から、EGFRの優勢な領域(赤)、EGFRとGrb2の複合体領域(黄)、Grb2の優勢な領域(緑)とGrb2とEps15(クラスリン被覆部位構成分子)の複合体領域(オレンジ)が並んだ層状の複合体形成が明らかになった。



### 3. 波及効果、今後の予定

従来の超解像顕微鏡法ではクラスリン被覆部位の辺縁部に局在することしか見えていなかった分子群が、IRIS と PC-coloring によって層状の分子複合体を形成していることが明らかになりました。さらにその分子複合体の構成から、その働きが推定されました。抗血清由来の結合解離プローブは、様々な標的タンパク質に対して作製できます。このため、IRIS と PC-coloring による解析は、様々な分子複合体に適用でき、波及効果が極めて大きいです。今後は、EGFR を含む HER ファミリータンパク質のシグナル分子複合体の解析を進めます。HER ファミリータンパク質は、多くの腫瘍で発現が亢進しており、分子標的薬の主要な標的ですが、HER ファミリータンパク質の発現量比に応じて、腫瘍形成能や患者の予後に違いがあるため、そのシグナル分子複合体の構成を明らかにします。さらに HER の分子複合体の空間マップは、分子標的薬の作用やその分子複合体の構成に基づいたがん患者の病理診断の評価システムへと発展が期待できます。

### 4. 研究プロジェクトについて

本研究は、下記の支援を受けて実施されました。

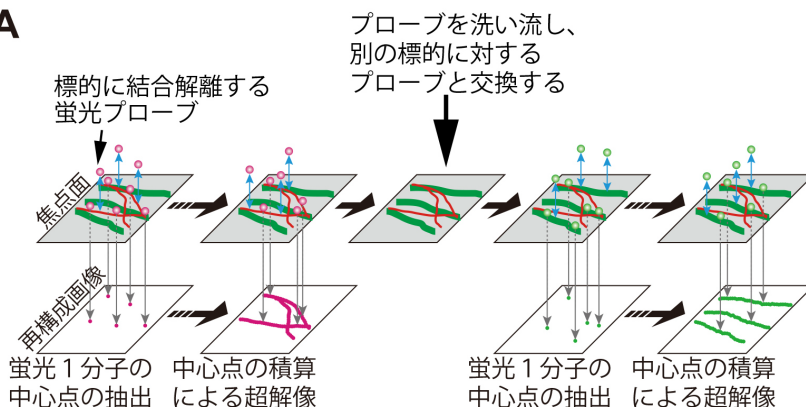
木内泰：科研費 学術変革領域研究 (A) 公募研究 24H01282 (研究代表)、基盤研究 (C) 21K06168 (研究代表)、新学術領域研究公募研究 19H04961 (研究代表)、基盤研究 (C) 17K07384 (研究代表)、新学術領域研究公募研究 15H01635 (研究代表)、寄付金 旭硝子財団 (研究代表)、武田科学振興財団 (研究代表)

渡邊直樹：科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推進事業 (CREST) 研究領域「統合 1 細胞解析のための革新的技術基盤」研究課題「多重高密度超解像顕微鏡 IRIS による多分子複合体マッピング」JPMJCR15G5 (研究代表)、科研費 基盤研究(A) 22H00456 (研究代表)、寄付金 上原記念生命科学財団 (研究代表)

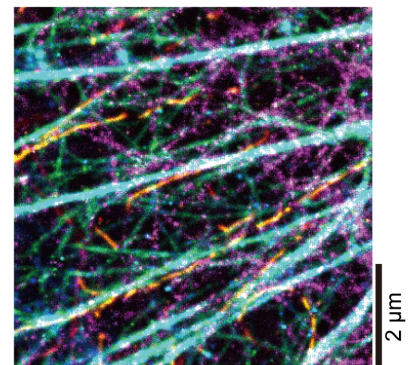
Dimitrios Vavylonis : NIH grant number R35GM136372 (研究代表)

#### <用語解説>

A



B



1: Image Reconstruction by Integrating exchangeable Single-molecule localization (IRIS) は、木内らによって 2015 年に開発された結合解離プローブを用いた多色超解像顕微鏡法 (Kiuchi et al., Nature Methods, v12, 743-746, 2015)。

(京都大学プレスリリース参照：<https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2015-07-07>) (A) IRIS の原理。固定・膜可溶化した細胞で標的に結合解離する蛍光プローブの標的への結合を蛍光 1 分子として捉える。結合後、解離したプローブは、素早く拡散するので、蛍光 1 分子としては捉えられない。多数回のプローブ結合を計測し、それらの蛍光中心点を積算することで、超解像画像を再構築する。さらにプローブを交換することで、複数の標的タンパク質を連続多重染色する。(B) アクチン線維、微小管、中間径フィラメントの IRIS 多色超解像画像。



### <研究者のコメント>

「多種多様なタンパク質によって自律制御される細胞は、驚異的であり、そのシステムの原理を明らかにすべく研究を行っています。IRIS で得られる超解像の写真は、内在性タンパク質の織り成す造形の美しさと複雑さに満ち溢れています。IRIS は長時間の撮影が必要ですが、この誰も見たことのないナノの世界を堪能できます。」(木内泰)

### <論文タイトルと著者>

タイトル：Laminar organization of molecular complexes in a clathrin coat revealed by nanoscale protein colocalization  
(ナノスケールのタンパク質共局在で明らかになったクラスリン被覆部位での層状の分子複合体)

著者：Tai Kiuchi, Ryouhei Kobayashi, Shuichiro Ogawa, Louis L. H. Elverston, Dimitrios Vavylonis and Naoki Watanabe

掲載誌：Structure DOI：10.1016/j.str.2025.03.012