

## 審査の結果の要旨

氏名 両角 明彦

両角 明彦は「細胞内グルタチオンの求核付加・解離平衡に基づく超解像蛍光イメージングプローブの開発」と題し、以下の研究を行った。

超解像蛍光イメージング法は、光学顕微鏡の空間分解能の限界を超えた画期的なイメージング技法であり、その1つに、蛍光プローブ分子を確率的に明滅させ、1分子ずつ高精度に位置決定することで超解像画像を構築する single-molecule localization microscopy (SMLM) という手法がある。なかでも、一般的な蛍光色素を明滅させることで SMLM を達成する dSTORM および GSDIM は、最も汎用される手法の1つである。しかしながら、一般的な色素を明滅させるには添加剤や強い光照射が必要であり、細胞毒性や蛍光色素の光褪色が問題となる。この問題を克服するべく、当研究グループでは、添加剤や強い光照射によらず自発的に明滅し、穏和な条件下で使用できる SMLM 用赤色蛍光ローダミン色素 HMSiR の開発に成功してきた (*Nature Chem.* 6, 681-689 (2014))。この分子は蛍光性の開環体と無蛍光性の閉環体との間の分子内スピロ環化平衡に基づき自発的に明滅する。その特徴から、生細胞の超解像観察に適した蛍光プローブとして注目を集めており、次なる段階として、特に多色観察を可能にするために、HMSiR と異なる波長域を有する色素の開発が強く望まれている。しかしながら、分子内スピロ環化平衡を利用する分子設計のみでは、分子構造上の制約から実現しうる光特性に限られるという課題があった。実際に、当研究グループでは、同じ分子設計戦略の下に SMLM 用蛍光プローブの多色化を試みてきた (*Chem. Commun.* 54, 102-105 (2018)) が、HMSiR と異なる波長域を有するスピロ環化型ローダミンで、適切な明滅特性を示し、かつ生細胞 SMLM に適用可能なものを開発するには至らなかった。そこで両角明彦は、新たな蛍光明滅原理に基づく分子設計指針を確立することで、生細胞で機能する SMLM 用蛍光プローブの幅広い光特性の実現、特に多色化に資することを目指し、研究を開始した。

### 1. 新たな蛍光明滅原理に基づき適切に明滅する蛍光色素母核の開発

分子内スピロ環化平衡の本質は、求電子種としてのキサンテン系蛍光団に対する分子内求核基の求核付加および解離であるが、同様の現象はキサンテン系色素と外部求核種との間の分子間反応としても起こり得る。このことに着目し、本研究では、キサンテン系色素の自発的な蛍光明滅の原理を、従来の分子内スピロ環化平衡から外部求核種との分子間の求核付加・解離平衡へと拡張することを試みた。生理的条件の細胞内環境で利用できる求核種としては、生きた動物細胞内に mM という高濃度で存在する低分子性チオールであるグルタチオン (GSH) に着目した。すなわち、生細胞内 GSH の求核付加・解離平衡を新たな蛍光明滅原理として利用することで、新たな SMLM 用蛍光プローブの開発を試みた。

まず、生細胞内の GSH に応答して SMLM に適した明滅特性を示すように、色素分子構造の最適化を図った。ここで、色素分子が満たすべき条件は、(1) 生細胞内の GSH 濃度下において大部分が無蛍光性の GSH 付加フォームとして存在し（蛍光性フォームの存在比率が 0.1-1%程度）、(2) 蛍光性フォームが、その蛍光シグナルを顕微鏡下で十分に検出できる時間だけ持続することである。上記 2 点を定量的に評価するための指標として、GSH 共存下での吸光度の測定から算出される解離定数 ( $K_{d, \text{GSH}}$ )、および laser photolysis による求核付加過程の観測から決定される蛍光性フォームの平均持続時間 ( $\tau$ ) を、それぞれ検討した。ここで、 $K_{d, \text{GSH}}$  については、生細胞内の GSH 濃度が 1-10 mM 程度であることを考慮し、その目標範囲を 1-100  $\mu\text{M}$  と定めた。また、蛍光性フォームの持続時間は、顕微鏡用カメラのうち比較的高速なものに対応するべく、100  $\mu\text{s}$ -100 ms を目標範囲とした。

当研究グループでこれまでに得られていた、2' Me SiR600 の  $K_{d, \text{GSH}}$  が 1 mM 程度であるという知見 (*Nature Chem.* 9, 279-286 (2017)) をもとに、これよりも小さい  $K_{d, \text{GSH}}$  を示すと予想されるキサントゲン系色素 6 種を合成・評価した。その結果、9Phe SiP600, SiP650, CP550 の 3 化合物が目標範囲内の  $K_{d, \text{GSH}}$  を示した。続いて、これらの  $\tau$  を測定したところ、SiP650 および CP550 は 1-10 mM の GSH 存在下で目標範囲内の  $\tau$  を示した。一方、9Phe SiP600 は、GSH が低濃度の場合に  $\tau$  が長すぎることで、また蛍光量子収率が低いことから、SMLM での利用においては不利だと考えられた。以上を総合して、赤色蛍光色素 SiP650 および黄緑色蛍光色素 CP550 の 2 化合物を候補色素母核とした。

## 2. GSH の求核付加・解離平衡に基づく SMLM 用蛍光プローブの開発と評価

SiP650 および CP550 を用いて生細胞における観察標的を標識し可視化するための手段として、タンパク質タグの利用を考えた。本研究ではまず、HaloTag をモデル系として、SMLM 用蛍光プローブの開発と評価を行った。具体的には、各色素母核にアルキルリンカーを介してカルボン酸を付与した誘導体 (SiP650-BA, CP550-BA) を経て、HaloTag リガンドとなるクロロアルカン構造を縮合反応によって導入した (SiP650-Halo, CP550-Halo)。さらに、各色素がタンパク質に結合した状態での特性評価を行うために、予め精製・単離された HaloTag タンパク質を SiP650-Halo, CP550-Halo により共有結合的に標識した SiP650-HaloTag, CP550-HaloTag を調製した。

続いて、SiP650-BA, CP550-BA および SiP650-HaloTag, CP550-HaloTag に関して、その光特性および GSH 応答性を評価した。その結果、誘導体化およびタンパク質への結合により、 $K_{d, \text{GSH}}$  および  $\tau$  が色素母核単体に比べて数倍から数十倍程度増大する傾向が見られたものの、これらは当初設定した目標値に照らして実用範囲内にあると判断した。さらに、全反射蛍光顕微鏡下で蛍光挙動の 1 分子観測を行ったところ、SiP650-HaloTag, CP550-HaloTag とともに、生理的濃度の GSH 存在下で大部分の分子が無蛍光性状態として存在し、かつ強い光照射や他の添加剤によらず自発的かつ可逆的な蛍光明滅を示すことが確かめられた。さらに、それら明滅イベントに関して輝点解析を行った結果、プローブ 1 分子が放出する光子数および 1 分子の位置決定精度といった観点からも、SMLM 用蛍光プローブとしての有用性が示された。

## 3. 超解像イメージングへの応用

まず、SiP650-Halo および CP550-Halo を用いて、生細胞における微小管の SMLM を試みた。具体的には、HaloTag 融合  $\beta$ -チューブリンを発現した哺乳類細胞にプローブを加えて洗浄し

た後、蛍光顕微鏡下で観察した。その結果、プローブは細胞膜を透過し、HaloTag を介して生細胞内の微小管を特異的に標識できること、添加剤や強い光照射なしに蛍光明滅を示すことを確認した。さらに、100-400 W/cm<sup>2</sup> の励起光照射下、1000-5000 frame (8.8 ms/frame) の画像を取得し SMLM 画像を構築した結果、平均化画像に比べて高い空間分解能で微小管を可視化できることを示した。特に、CP550 は緑色光で励起され黄緑色の蛍光を発する色素であることから、生細胞内で自発的に明滅する SMLM 用蛍光色素として、赤色蛍光色素 HMSiR に続く 2 色目の色素の開発に初めて成功したことになる。

続いて、CP550 に関し、生細胞 2 色 SMLM を含めた応用範囲の拡張を狙って、SNAP-tag 基質型誘導体を開発した。すなわち、SNAP-tag 基質構造を CP550 に導入した CP550-BnClPy を新たに合成し評価したところ、本誘導体も生細胞内の観察対象を特異的に標識することが可能であり、超解像画像を構築できることを確認した。特に、ミトコンドリア局在型 SNAP-tag を発現した細胞に CP550-BnClPy を添加し染色することで、ミトコンドリアの動態を数秒という比較的高い時間分解能で経時的に超解像観測することに成功した。本結果は、CP550 が自発的かつ比較的高速な明滅を示すことをうまく利用した例である。さらに、CP550 誘導体を HMSiR 誘導体と併用することで、生きた哺乳類細胞においてミトコンドリアと微小管を、生きたバクテリア細胞においては細胞分裂関連タンパク質と細胞膜を、それぞれ 2 色で超解像観察することに成功した。前者の系では経時的観察も達成した。

以上のように両角明彦は、細胞内 GSH の求核付加・解離平衡を利用した新たな蛍光明滅原理を提案し、本原理に基づく 2 種の新規 SMLM 用蛍光色素の開発に成功した。特に CP550 の開発により、自発的に明滅する色素による生細胞 2 色 SMLM が初めて達成された。今後は、幅広い領域の生物学研究者と協同しながら、より高次の実験系への応用が進められることが大いに期待される。以上の業績は、薬学分野におけるライブイメージング技術に画期的な進展をもたらし、イメージングに基づく生命機能の理解に繋がる重要なものであることから、博士（薬科学）の授与にふさわしいものと判断した。