

## 論文の内容の要旨

### 論文題目 **Photochromic 特性を付与した色素群の開発による 新規時間分解蛍光イメージング技法の構築**

氏名 大野 久史

#### 【序論】

蛍光波長が異なるプローブを用いて複数のターゲット分子を同時に可視化することができるマルチカラーイメージングは、多数の生体分子が介在する生命現象を理解する上で必須技術である。一方で、蛍光性有機小分子のスペクトル幅は通常 50~100 nm あるため、同時に検出できる限界は 4~5 色までであり、この Color Barrier を克服する新イメージング技術開発が強く望まれている。

Rhodamine は高い水溶性、蛍光量子収率、強い光褪色耐性を備えていることから蛍光プローブの母核として汎用されており、これまでに Rhodamine を母核とした多種多様なプローブが開発されてきた。当研究室ではこれまでに、

Hydroxymethyl Rhodamine 類 (HMR 類) を母核とする様々な蛍光プローブを開発してきたが、中でもライブ超解像イメージングを可能とする HMSiR は生理 pH で無蛍光の分子内スピロ環化体 (closed form) と蛍光性の open form が平衡状態にあり、99%が closed form として存在する。ここに 308 nm パルス光を照射すると open form の割合が一過的に上昇し、これが熱的に平衡状態へと戻る T 型 Photochromic 特性を示す (Figure 1) (Nature Chem. 6, 681-689 (2014))。生成した open form は平衡状態に戻る際に  $\tau_{Sp}$  が経過するごとに  $1/e$  になるような指数関数的な減少を示す。さらに、同一の蛍光団を有するプローブであっても  $\tau_{Sp}$  は求核基部分の OH 基を NH<sub>2</sub> 基や SH 基に変更することで nsec から msec order まで幅広い time range を取りうるため、通常の落射蛍光顕微鏡でも open form の減衰を観察することが可能である。本研究ではこの Photochromic 特性に着目し、open form の寿命  $\tau_{Sp}$  が異なるプローブ群を開発することで、落射蛍光顕微鏡での時間分解観測に基づく新たな多重蛍光イメージング技法の構築を目指した。

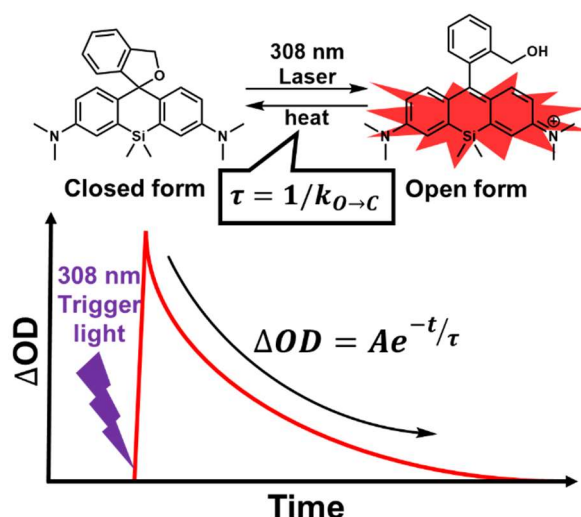


Figure 1. T type Photochromic behavior of HMR derivatives.

## 【本論】

### 1. Photochromic 特性を有する蛍光色素母核の探索

当研究室のこれまでの検討では trigger 光として主に 254 nm や 308 nm を用いていたが、一般的に普及している落射蛍光顕微鏡に組み込むこと、さらには生細胞イメージングへの適用を考慮し、より長波長の 365 nm LED 光源で機能するプローブの開発を目指した。そこで、Rhodamine 骨格に closed form の吸収波長を決める Antenna 部位、様々な求核性置換基・官能基を  $pK_{cycl}$  調整部位、 $\tau_{Sp}$  調節部位として導入した HMR 誘導体を設計した (Figure 2)。

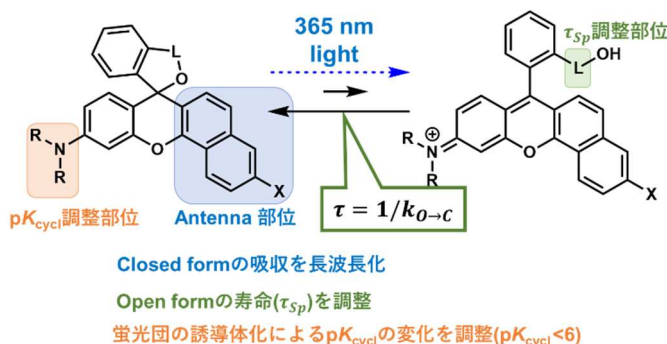


Figure 2. Molecular design T-type photochromic fluorescent probe

Antenna 部位及び  $pK_{cycl}$  調整部位を最適化するために、まず求核基を Hydroxymethyl 基 (HM 基) に固定して誘導体を複数合成し、リン酸緩衝液中での吸収・蛍光測定による  $pK_{cycl}$  の評価及び 355 nm パルスレーザー照射を用いた Laser Flash Photolysis 法での過渡吸収測定による  $\tau_{Sp}$  の評価を行った。その結果、pH7.4 において 95%以上が closed form になる適切な求電子性を持ち、パルスレーザー照射によって一過的に open form が生成し、その後の再平衡化に伴う吸収減少する photochromic 特性を示す NOxaR 骨格を見出した (Figure 3)。

### 2. Open form の寿命 $\tau_{Sp}$ の time range の拡張

落射顕微鏡での open form の減衰の観察を容易にするために  $\tau_{Sp}$  の長寿命化を行った。Closed form のスピロ環部分の環拡大によって  $\tau_{Sp}$  の長寿命化ができると考え、Hydroxyethyl 基 (HE 基) と Hydroxypropyl 基 (HP 基) を導入した HE-, HP-NOxaR の合成・評価を行った。HE-NOxaR は HM-NOxaR と比較して  $pK_{cycl}$  が約 1 上昇しており、pH7.4 では約 80%が closed form になった。一方で、スピロ環部分を 7 員環まで拡大した HP-NOxaR では  $pK_{cycl}$  が 11.5 まで上昇しており、pH7.4 でほぼすべてが Open form になった。続いて過渡吸収測定を行った結果、HE-NOxaR では sec オーダーの  $\tau_{Sp}$  が観測され、スピロ環のサイズ調整により msec オーダーと sec オーダーの大きく異なる  $\tau_{Sp}$  を持つ複数プローブの開発に成功した (Figure 3)。なお、pH7.4 で closed form がほとんど存在しない HP-NOxaR では指数関数的減衰が観測されなかった。

n	1 (HM group)	2 (HE group)	3 (HP group)
$pK_{cycl}$	5.8	6.7	11.3
$\tau_{Sp}$	$4.0 \pm 0.04$ msec	$9.77 \pm 0.13$ sec	N.D.

Figure 3.  $pK_{cycl}$  and  $\tau_{Sp}$  value of HM-, HE- and HP-NOxaR.

開発したプローブの中で最も  $\tau_{Sp}$  が長い HE-NOxaR を用いて落射顕微鏡での蛍光イメージングを検討することとした。そこで、落射蛍光顕微鏡下でクリックリンカー介して HE-NOxaR と TentaGel® の Time

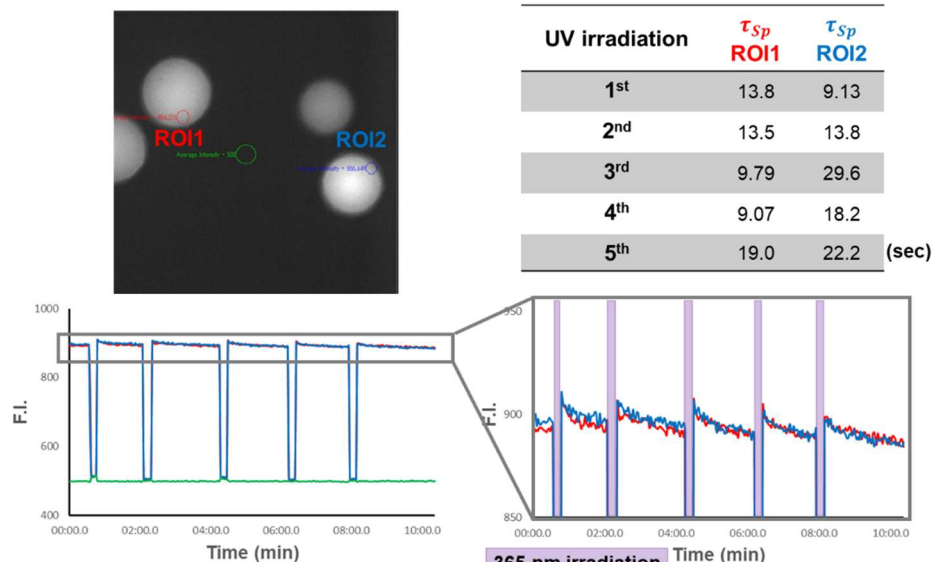


Figure 4. Time lapse imaging of HE-NOxaR conjugated beads.

lapse イメージングを行った。ビーズが入った well 全体に対して 365 nm LED で 10 秒間の光照射を行ったところ、365 nm LED を照射後に TentaGel® 部分の蛍光強度が増大し、時間経過とともに指数関数的に減少した。この挙動は LED を繰り返し照射しても観測され、それぞれの減衰に対して指数関数 fitting を行うと 10~20 秒程度の  $\tau_{Sp}$  が算出された。Time-lapse イメージングから算出された  $\tau_{Sp}$  は HE-NOxaR の値と近いことから落射蛍光顕微鏡下でも HE-NOxaR が機能し、十分観察可能であることが分かった。

### 3. 多重イメージングを指向した $\tau_{Sp}$ の調整

多重イメージングを達成するプローブ群を開発する上で、同一蛍光波長領域内に時間分解法で区別可能なシグナルをなるべく多く用意する必要がある。蛍光顕微鏡のフレームレートを考慮すると蛍光強度変化を追跡可能な timescale は msec オーダー以上になるが、誘導体間の  $\tau_{Sp}$  の差が小さいと 2 つの成分に分離・検出することが困難になることが想定される。そこで、分離の容易さを考慮し、 $\tau_{Sp}$  の差が 10 倍程度になることを目安に、HM-NOxaR と HE-NOxaR の中間に位置する sub sec オーダーの  $\tau_{Sp}$  を有するプローブ構造を探索した。HE 基の配座自由度を適切に減少させることでスピロ環化の反応速度が加速し目標とす

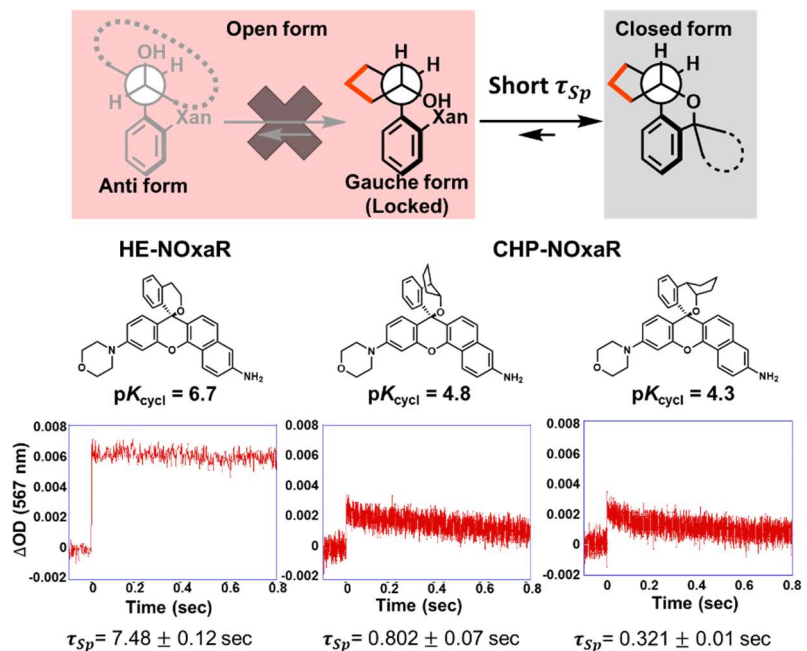


Figure 5. gauche-locked CHP-NOxaR

る time range まで $\tau_{Sp}$ を短寿命化できると考えた。そこで、HE 基のメチレン鎖部分に 5 員環構造を導入することで *gauche* 配座に固定した Cis-2-hydroxycyclopentyl(以下 CHP 基)を有する CHP-NOxaR を合成・評価した。その結果、CHP-NOxaR でも過渡吸収の指数関数的減少が観測され、その $\tau_{Sp}$ は HE-NOxaR の 1/10 程度の sub sec オーダーであることが明らかとなった(Figure 5)。

#### 4. 混合系での $\tau_{Sp}$ の評価

開発した 3 種類のプローブを混合した状態でもそれぞれの減衰を区別可能か検討するために HM-, CHP -, HE-NOxaR の 3 つのプローブをそれぞれ 20  $\mu$ M ずつ混合して溶解したリン酸緩衝液を作製し、LFP 法での過渡吸収測定を行った(Figure 6)。3 種混合系を用いた測定から得られた過渡吸収の減衰に対して 3 成分の指数関数 fitting を行い各成分の $\tau_{Sp}$ を算出した。算出された各成分の $\tau_{Sp}$  は、HM- NOxaR、CHP - NOxaR、HE-NOxaR それぞれ単独での測定値と良い一致を示した。

また、3 成分の指数関数 fitting から得られた Trigger 光照射直後の吸光度変化を示す $\Delta OD_{t=0}$ からそれぞれの成分の濃度比を算出したところプローブの混合比である 1:1:1 に近い値が得られた(Figure 6)。このことから fitting で分けた 3 成分は各プローブの減衰を反映したものであることが強く示唆された。また、3 つのプローブの  $\Delta OD$  への寄与を図中に示すと次のようになる。パルスレーザー照射から 20msec までは HM-,CHP-,HE-NOxaR の 3 つのプローブが観測され、20msec から 1sec 程度まで CHP-,HE-NOxaR の 2 つのプローブが、1sec 以降は HE-NOxaR が観測されていることが分かる。以上から 3 つのプローブを混合した状態でも測定の時間領域を適切に分けることによって、それぞれのプローブが同じ空間に分布していても区別することができると示唆された。

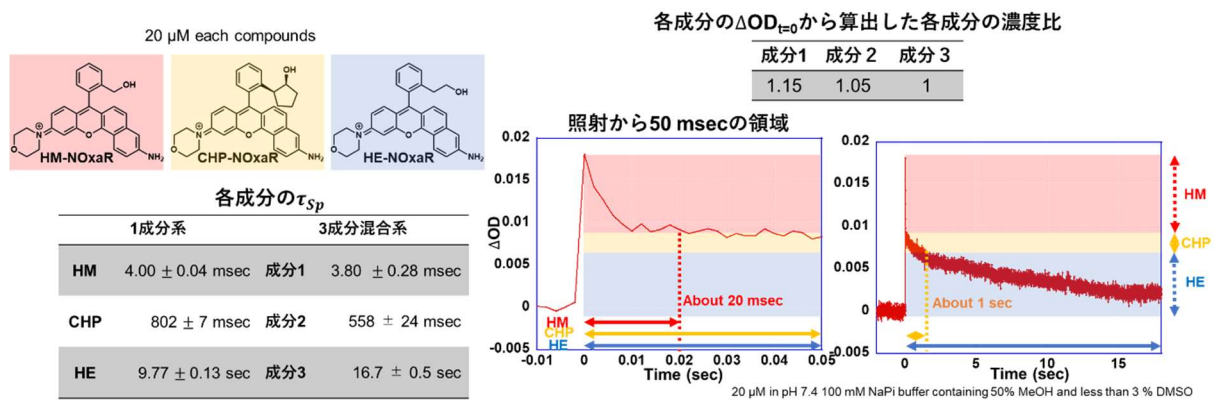


Figure 6. Laser Flash photolysis of HM-, CHP- and HE-NOxaR

#### 【結論】

本研究では、photochromic 特性を有する HMR 体の開発に基づく新規時間分解蛍光イメージング法の創製を目指し、求核基部分の配座自由度に着目して構造展開を行うなどの設計により、様々な  $\tau$  を持つプローブ群を開発し、落射蛍光顕微鏡下での機能実証に成功した。本イメージング技法は、3 種類以上の同一蛍光波長を持つプローブ由来の蛍光を、一波長測光で明確に分離検出することを可能とするものであり、さらに本技術を 3 色程度の異なる蛍光団へと展開することで、color barrier を克服した、10 種類程度の細胞内生体分子の多重イメージングが可能となることが強く期待される。