

## 博士論文（要約）

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

## 【要約】

同一の蛍光団を有し異なる open form の寿命 ( $\tau_{Sp}$ ) を有するプローブ群を開発した。

## 【背景・目的】

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  $\text{NH}_2$  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。

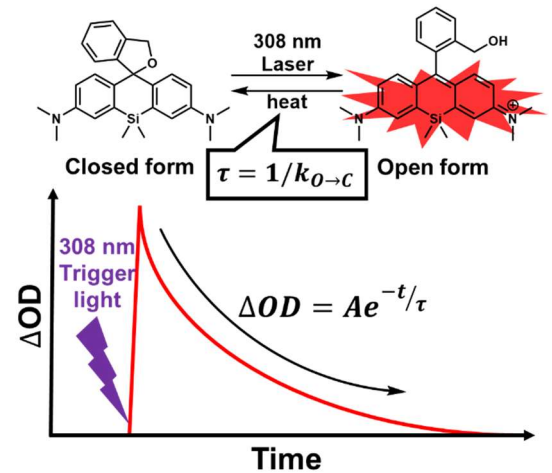


Figure 1. T type photochromic behavior of HMR derivatives.

## 【方法・結果】

### 1. Photochromic 特性を有する蛍光色素母核の探索

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、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 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)。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  $\tau_{Sp}$  を評価を行った。その結果、pH 7.4 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。また、 $\tau_{Sp}$  調節部位の環拡大及び配座自由度の制御を行うことで、同一の蛍光団を有し pH 7.4 の水中で msec、sub sec、sec order の  $\tau_{Sp}$  を有する HM-

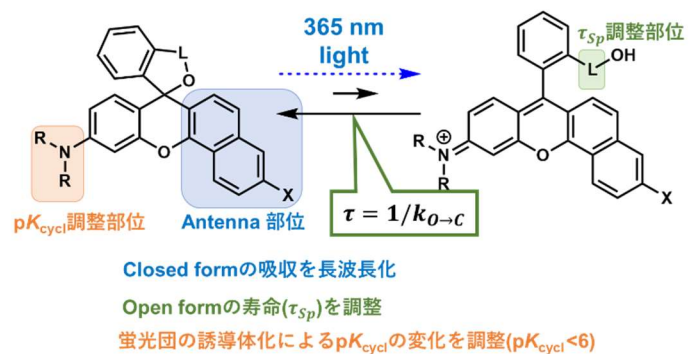


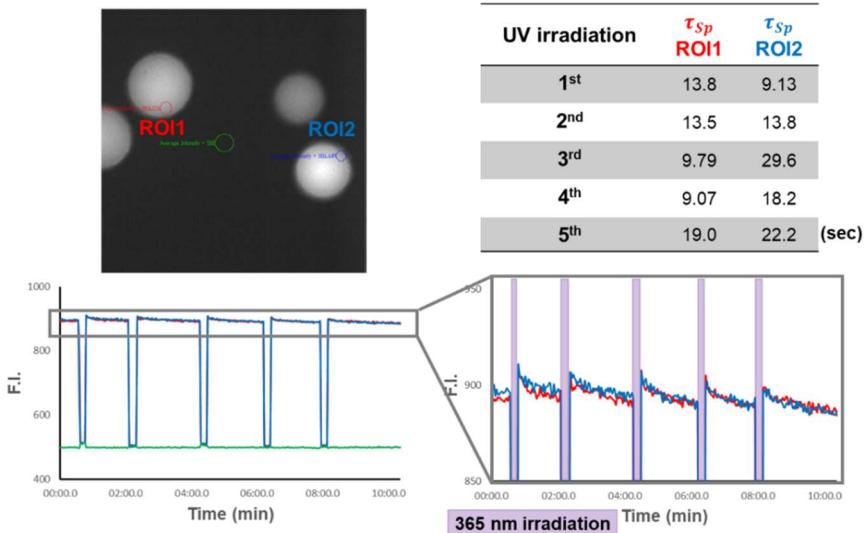
Figure 2. Molecular design T-type photochromic fluorescent probe

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  $\tau_{Sp}$  を評価を行った。その結果、pH 7.4 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。また、 $\tau_{Sp}$  調節部位の環拡大及び配座自由度の制御を行うことで、同一の蛍光団を有し pH 7.4 の水中で msec、sub sec、sec order の  $\tau_{Sp}$  を有する HM-

NOxaR、CHP-NOxaR、HE-NOxaR の 3 種類のプローブを開発した。

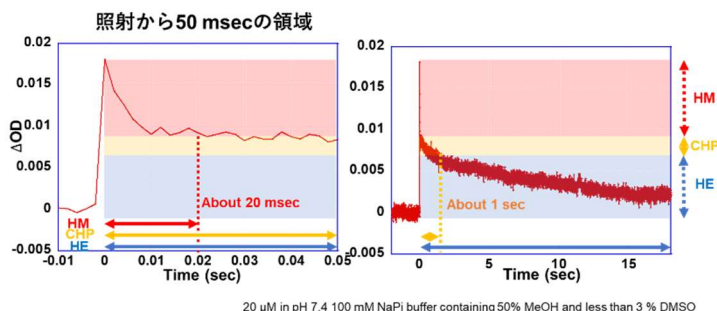
## 2. 落射蛍光顕微鏡での検討

落射顕微鏡下での機能実証のためにクリックリンカー介してプローブと結合させた TentaGel® の Time-lapse イメージングを行った(Figure 3)。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  $\tau_{Sp}$  はプローブ単体での値と近いことから、開発したプローブが落射蛍光顕微鏡下でも機能し、十分観察可能であることが示された。



## 3. 混合系での $\tau_{Sp}$ の評価

$\tau_{Sp}$  が異なるプローブを混合した状態でそれぞれのプローブの減衰を区別可能か検討するために、開発した 3 種類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 4)。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  $\tau_{Sp}$  を算出したところ、算出された各成分の  $\tau_{Sp}$  は各プローブ単体での測定値と良い一致を示した。また、各成分の Trigger 光照射直後の吸光度変化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。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 20 msec までは 3 種類のプローブが観測され、20 msec から 1 sec 程度まで 2 種類、1 sec 以降は 1 種類のみ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的时间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できると示唆された。



20  $\mu$ M in pH 7.4 100 mM NaPi buffer containing 50% MeOH and less than 3% DMSO

各成分の  $\tau_{Sp}$

1成分系		3成分混合系	
HM	4.00 $\pm$ 0.04 msec	成分1	3.80 $\pm$ 0.28 msec
CHP	802 $\pm$ 7 msec	成分2	558 $\pm$ 24 msec
HE	9.77 $\pm$ 0.13 sec	成分3	16.7 $\pm$ 0.5 sec

Figure 4. Laser Flash photolysis of HM-, CHP- and HE-NOxaR

## 【投稿論文】

本研究で開発したプローブ群については米国特許出願済みであり、現在論文投稿準備中である。