

博士論文

分子内環化平衡の制御に基づく超解像イメージング法の確立

宇野 真之介

## 目次

要旨	1
第一章 序論	2
第一節 回折限界を超える超解像イメージング法	3
第二節 蛍光プローブの明滅法	12
第三節 課題と本研究の目的	19
第二章 自発的な明滅特性を有する蛍光色素の開発	21
第一節 自発的な明滅特性を有する蛍光色素の設計	22
第二節 分子内スピロ環化平衡の平衡定数の評価	29
第三節 開環体の持続時間の評価	44
第三章 一分子イメージングによる蛍光特性の評価	55
第一節 明滅特性の評価	56
第二節 位置決定精度の評価	60
第四章 超解像イメージングへの応用	63
第一節 <i>In vitro</i> で再構築した微細構造の超解像イメージング	64
第二節 細胞深部に位置する微細構造の超解像イメージング	69
第三節 生細胞タイムラプス超解像イメージング	73
第五章 考察と今後の展望	83
第一節 総括	84
第二節 考察	86
第三節 今後の展望	91
実験の部	96
参考文献	119
発表文献・学会発表・特許一覧	131
謝辞	135

## 要旨

蛍光顕微鏡の空間分解能を大幅に向上させる超解像イメージング法は生命現象の理解に更なる飛躍をもたらすと期待される。本手法の技術開発は急速に進んでいるが、測定に欠かせない蛍光色素／蛍光タンパク質及びその使用条件の開発は発展途上にあり、添加物の使用や強い励起光が必要なことが多く、生細胞を観察する上で未だ改善の余地が多い。本研究では、有機小分子蛍光色素であるローダミン類の分子内スピロ環化平衡に着目し、その化学構造を最適化することで、自発的に明滅するという新たな特性を持つ蛍光色素を開発した。この蛍光色素を用いることで従来よりも温和な条件下で測定可能な超解像イメージング法を確立することに成功した。

# 第一章

## 序論

## 第一節 回折限界を超える超解像イメージング法

### 第一項 蛍光イメージング法の空間分解能の限界

細胞を生きた状態のまま観察できる蛍光イメージング法の開発により，生命現象に対する理解は大きく進展した．色彩豊かな蛍光タンパク質や有機小分子蛍光色素を骨格とする蛍光プローブの開発によって，細胞の構造だけでなく，情報伝達物質や酵素反応が関与する細胞の機能を可視化することも可能となってきた<sup>1-6</sup>．しかし，今後更なる高機能蛍光プローブが開発されたとしても，細胞内にある構造や機能を観察するには限界がある．それは，蛍光をはじめとする光を用いる光学顕微鏡が普遍的に持つ「回折限界」と呼ばれる空間分解能の限界である (図 1-1)．

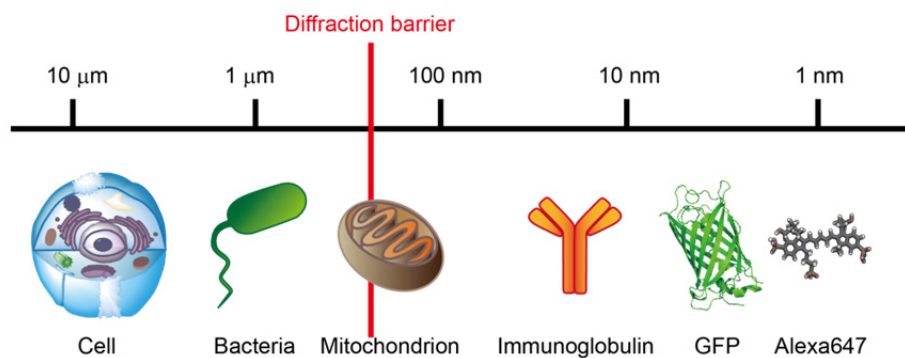


図 1-1. 蛍光イメージング法の空間分解能の限界.

光は波動性を持つため、1 nm 程度の蛍光色素が発した蛍光はレンズを通して集光しようとしても一点に集光することは不可能であり、波長程度 (半径数 100 nm) にぼやけて観測されてしまう (図 1-2)。この広がりを点像分布関数 (Point spread function, PSF) と呼ぶ。PSF のため蛍光分子が一定の距離以上に近接すると、二点から発せられる蛍光シグナルが重なってしまい、二点を識別することが不可能となる。これを回折限界と呼び、1873 年 Abbe が定式化し、後に Rayleigh は二点を識別できる距離として光学顕微鏡の空間分解能を  $0.61\lambda/NA$  ( $\lambda$  は波長、NA はレンズの開口数) と定義した<sup>7,8</sup>。例えば NA = 1.40,  $\lambda = 500$  nm の場合、約 220 nm であり、細胞内に存在するタンパク質複合体等の微小構造を観察する際に、この回折限界は大いに問題となる。そのため、未知の高次構造を検討するには固定化処理が必要なものの、空間分解能が遥かに高い電子顕微鏡に頼らざるを得なかった。

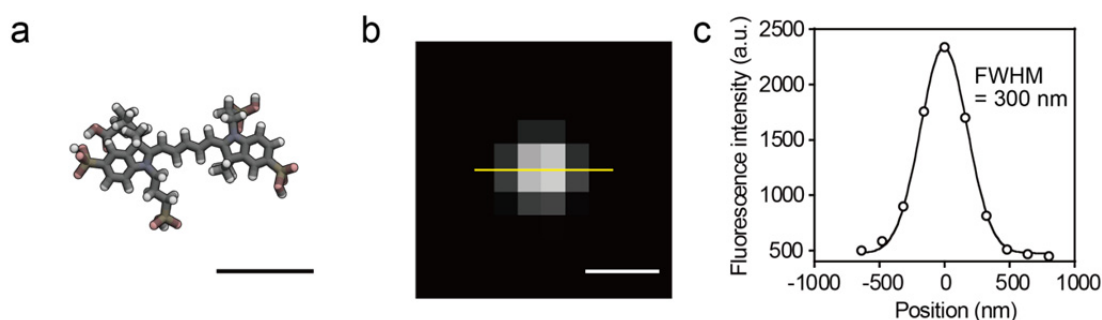


図 1-2. 点像分布関数 (PSF). (a) Alexa647 の化学構造. (b) Alexa647 の蛍光画像. (c) b) における黄線の蛍光強度分布. スケールバー：1 nm (a), 500 nm (b).

長い間この空間分解能の限界を超えることはできないと考えられてきたが、1990年代から2000年代にかけて回折限界を突破する超解像イメージング法 (Super-resolution microscopy 又は Nanoscopy) と呼ばれる手法が次々に提案、実現されてきた<sup>9-13</sup>。生細胞において多色で観察できるといった蛍光イメージング法の長所を生かしつつ、弱点であった空間分解能を大きく向上させることができれば、細胞生物学研究において強力な手法となり、生命現象の理解に更なる飛躍をもたらすと期待される。開発されてから間もないにも関わらず、超解像顕微鏡の開発 (“for the development of super-resolved fluorescence microscopy”) に対して Eric Betzig 博士, Stefan W. Hell 博士, William E. Moerner 博士らに 2014 年ノーベル化学賞が授与されたことからその期待の大きさが伺われる。

超解像イメージング法は次項で紹介するように様々な原理に基づく手法が開発されている。さらに、数多くの研究グループの参画や顕微鏡メーカー各社からの市販化に伴い、測定手法の改良だけでなく生物学研究への応用も始まり、急速に研究が進められている (図 1-3)。しかしながら、各手法にはこれまでの蛍光イメージング法に比べて様々な制約が存在しており、特に生細胞への応用には更なる改良が求められているのが現状である。現在、超解像イメージング法の開発は (1) 光学系の設計, (2) 蛍光プローブ及び測定条件の開発, (3) 解析アルゴリズムの開発が三位一体となって行われる段階に来ている。本論文では主

に (2) に着目し、有機光化学の観点から開発した新規蛍光プローブを基盤技術とする超解像イメージング法を提案する。

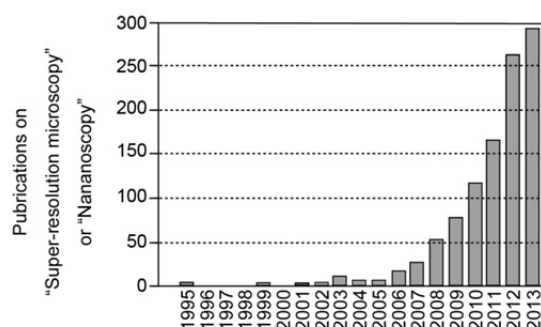


図 1-3. 超解像イメージング法に関する論文発表数の推移。Web of science において“Super-resolution microscopy” or “Nanoscscopy”で検索した結果。

## 第二項 超解像イメージング法の測定原理

超解像イメージング法は様々な測定原理に基づき、数多くの手法が開発されている。本項では既に超解像顕微鏡として市販化されている代表的な手法を中心に測定原理及び各手法における蛍光プローブの果たす役割について概説する。

### (i) Stimulated emission depletion (STED) microscopy

S. W. Hell らが 1994 年に提案した手法であり<sup>14</sup>、その後実用化され広視野顕微鏡における超解像イメージング法の先陣を切った<sup>15,16</sup>。STED 顕微鏡は共焦点レーザー顕微鏡と同様の走査型顕微鏡であり、空間分解能は PSF の大きさが決定する。STED では、PSF を実質的に小さくして空間分解能を向上させるため、レ



レーザーの発振原理にも使われている誘導放出と呼ばれる物理現象を利用する。通常の励起光の周りにドーナツ状に成型した STED 光を照射すると、励起状態にある分子は誘導放出によって STED 光と同一波長の発光を伴って強制的に基底状態に戻されるため、通常の蛍光シグナルを消すことができる。誘導放出は蛍光スペクトルの長波長側の波長で起こすことができるため、フィルターによって STED 光及び誘導放出光をカットし、STED 光が照射されていない中心部分から出る蛍光シグナルのみ抽出することが可能である。さらに、STED 光のレーザー強度を強くしていくことによって誘導放出の効率が飽和し、ドーナツの穴が小さくなっていくため、PSF より小さい範囲の蛍光シグナルのみを検出することができる。理論的には空間分解能の限界はなく、褪色に強い蛍光性ナノダイヤモンドを用いて 6 nm という空間分解能が達成されている<sup>17</sup>。しかし、実際の生物試料を用いた測定では、STED 光による蛍光プローブの褪色や生物試料へのダメージが問題となるため、30~50 nm 程度の空間分解能での測定が行われる。STED は画像解析処理を行う必要がなく、artifact を含みにくいという長所がある。また、多色化<sup>18</sup>や三次元での観察<sup>19</sup>、高速化<sup>20</sup>、褪色の低減<sup>21</sup>等の技術開発も進んでいる。さらに、応用面では生細胞観察<sup>22</sup>だけでなく、生きたマウスの脳にある神経細胞を観測することにも成功しており<sup>23</sup>、今後様々な領域での活用が期待される。一方、STED に用いられる蛍光プローブに着目すると、蛍光タンパ

ク質及び褪色に強い有機小分子蛍光色素が広く用いられている<sup>24</sup>。また、誘導放出以外にも光反応による消光機構を利用することができ、蛍光色素の三重項状態を利用した手法 (Ground state depletion, GSD)<sup>25</sup> や photoswitchable な蛍光タンパク質を用いる手法<sup>26</sup> が報告されている。これらの手法は総称して Reversible saturable optical fluorescence transitions (RESOLFT) と呼ばれる<sup>27</sup>。誘導放出の代わりに高効率な光反応を利用することで、ドーナツ状の光を弱くすることが出来るため、生細胞試料への適用が期待されている。現在、一部の蛍光タンパク質以外に有用な光反応を基にした消光機構を有する蛍光プローブの利用は殆ど報告されていないため、褪色に強い有機小分子を基にした蛍光プローブの開発が待たれる。

#### (ii) Structured illumination microscopy (SIM)

SIM は 2000 年に M. G. L. Gustafsson が報告した手法であり、モアレ現象を利用して超解像画像を取得する方法である<sup>28</sup>。縞状の励起光を生物試料へ角度、位相を変えて照射し、9-15 枚の蛍光画像を取得する。得られた画像と励起光の構造情報を用いて画像解析を行い、元の構造情報を通常の約 2 倍の空間分解能で取得することができる。また、飽和した励起光を用いることによって、更なる空間分解能の向上も報告されている (Saturated SIM, SSIM)<sup>29</sup>。本手法は、他の

超解像イメージング法に比べて空間分解能は劣るものの、蛍光色素に対する要求はなく、通常の蛍光イメージングと同様に多色化や三次元観察が可能である<sup>30</sup>。また1枚の超解像画像取得にかかる時間は1 s程度と比較的速く、生細胞への適用も可能である<sup>31</sup>。

### (iii) Single-molecule localization microscopy (SLM)

2006年に3グループから同様の測定原理を用いた手法が報告された。E. Betzig らの Photoactivated localization microscopy (PALM)<sup>32</sup>、S. Hess らの Fluorescence photoactivation localization microscopy (FPALM)<sup>33</sup>、X. Zhuang らの Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)<sup>34</sup> である。これらの手法は用いる蛍光プローブの種類が異なるものの、測定原理はいずれも同一であり、1995年に E. Betzig が提唱したものに端を発する<sup>35</sup>。その後、蛍光プローブや測定条件を工夫した手法が数多く報告されており、総称して Single-molecule localization microscopy (SLM) や Localization microscopy と呼ばれる<sup>36</sup>。SLMでは、蛍光プローブを空間的に重ならないように時間をずらして光らせ、その位置を数 10 nm の精度で決定し、得られた分子の位置情報を重ね合わせることで高解像度の画像を取得する (図 1-4)。本手法も多色化<sup>37,38</sup> や三次元での測定<sup>39-41</sup> が達成されている。

SLM は大きく分けて下記の 2 つの要素技術から成る. (1) 蛍光を発している分子の位置をフィッティングにより数 10 nm の精度で決定する手法と (2) 蛍光プローブの特性や測定条件を工夫して, PSF 内に存在する分子を重ならないように一分子ずつ順番に光らせる手法である. (1) の位置決定に関しては, アクチン上を移動するミオシンの位置を数 nm の精度で測定することに成功した Fluorescence imaging with one-nanometer accuracy (FIONA) と呼ばれる手法<sup>42</sup>が応用されている. 蛍光を発する分子が一分子である場合, PSF を二次元ガウス関数でフィッティングすることによってその位置を正確に決定することが可能である. SLM の空間分解能を左右するこの位置決定精度は検出するフォトン数に依存し, 十分に明るい試料では $\sigma/N^{1/2}$  ( $\sigma$ は PSF の標準偏差,  $N$ は検出したフォトン数) で決定される<sup>43,44</sup>. 従って, 一般的に蛍光タンパク質よりも褪色に強い有機小分子蛍光色素の方が適していると考えられる<sup>45</sup>. 一方, (2) の順番に光らせる手法は蛍光プローブや使用条件の検討により様々な手法が開発されており, 色素の種類や消光メカニズムにより, 名称も様々である<sup>36</sup>. 本研究も (2) の順番に光らせる手法の開発に相当するため, これまでに報告された手法について次節でまとめる.

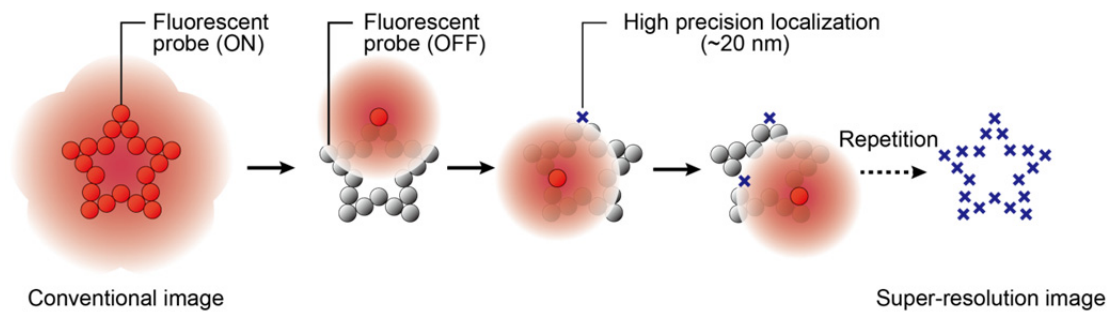


図 1-4. SLM の測定原理.

(iv) Super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI)

上記の 3 手法に比べると開発途上であるものの、測定装置の種類に依らないことや高い時間分解能を達成できる可能性があること、蛍光分子の開発が鍵であることから簡単に紹介する。SOFI は一分子に由来する蛍光シグナルの自己相関係数を利用して超解像画像を取得する手法である<sup>46</sup>。具体的には、各ピクセルの蛍光強度のゆらぎから  $N$  次のキュムラントを計算することで  $N^{1/2}$  倍の空間分解能を達成する手法である。さらにピクセル間の相互相関関数を考慮することで、 $N$  倍の空間分解能を取得することが可能である<sup>47</sup>。本手法の達成においても、蛍光色素を明滅させることが必要であり、これまでに量子ドット<sup>46</sup>、蛍光色素の三重項やラジカルアニオン<sup>48</sup>、分子間 FRET<sup>49</sup> の利用が報告されている。

## 第二節 蛍光プローブの明滅法

SLM の達成には蛍光プローブを明滅させ、近傍に位置する蛍光プローブを時間的に分離し、それぞれを個別に観察することが重要である。この明滅させる手法は PALM, FPALM, STORM の報告を皮切りに研究が進められ、現在では非常に多くの手法が報告されている<sup>50-53</sup>。本節では、SLM に利用可能な蛍光プローブの明滅法についてまとめる。応用面での違いから (1) 不可逆的な手法と (2) 可逆的な手法に分類する。

### 第一項 不可逆的な手法

PALM あるいは FPALM では、光照射により無蛍光状態から蛍光状態に変換される蛍光プローブや、蛍光波長が大きくシフトする蛍光プローブが用いられる。活性化に用いる光照射の強度を弱く設定することで、空間的に重ならない程度にごく僅かな蛍光分子のみを蛍光状態に変換する。活性化された蛍光分子の位置を決定後、褪色させてまた別の分子を蛍光状態に変換することで SLM のサイクルを達成する (図 1-5a)。各分子を褪色させる必要があるため、同一蛍光プローブを複数回観察することはできず、生細胞における微細構造の経時変化等の検討には利用できない。最近になって一つの蛍光プローブから一回だけ位置を

決定することを利用し、微小環境に存在するタンパク質の個数を定量するという使用法が検討され始めている<sup>54,55</sup>.

不可逆的な手法に用いられる蛍光プローブとしてはこれまでタンパク質の拡散速度の評価やパルスチェイス実験等に用いられてきた光活性化型／光波長変換型の蛍光タンパク質<sup>56</sup>やケージド蛍光色素<sup>57</sup>が広く利用できる。例えば蛍光タンパク質として光活性化型のPAGFP<sup>33</sup>や光波長変換型のKaede<sup>32</sup>が報告されている。また、有機小分子を基にしたケージド蛍光色素の利用も多数報告されている(図1-5b-e)<sup>58-64</sup>。

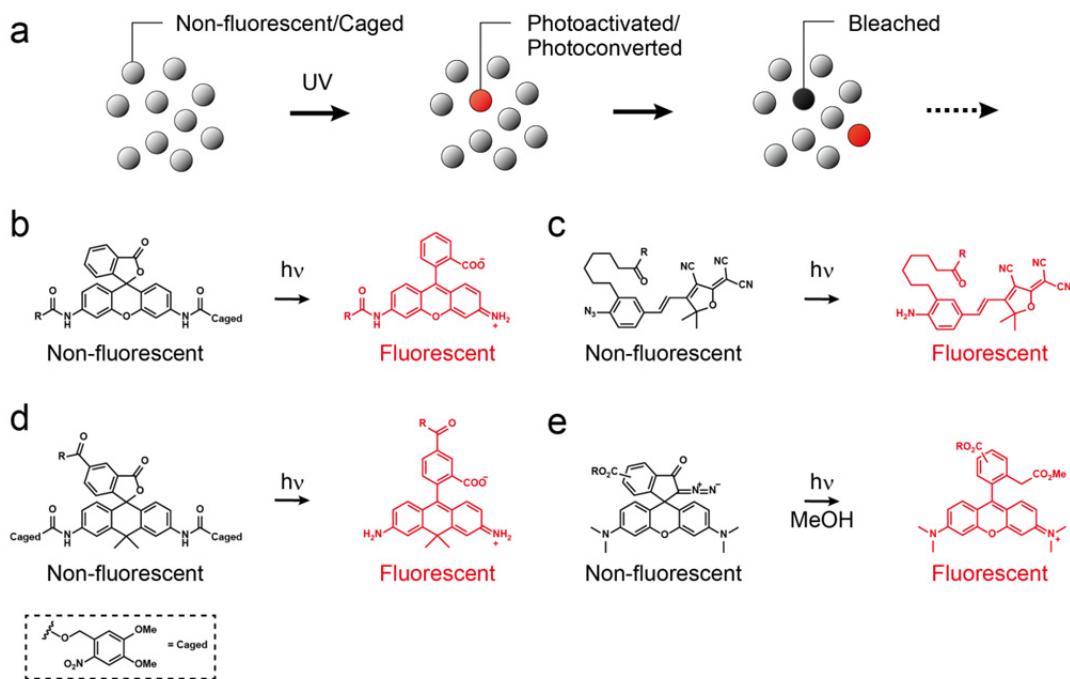


図1-5. PALM/FPALM に用いる蛍光プローブ。(a) 光により不可逆的に活性化又は波長が変化する蛍光プローブを用いた SLM の測定スキーム。(b) ケージドローダミン 110<sup>63</sup>。(c) Azido-DCDHF<sup>58, 59</sup>。(d) ケージドカルボローダミン 110<sup>64</sup>。(e) ロードミン NN<sup>60-62</sup>。

## 第二項 可逆的な手法

可逆的に蛍光／無蛍光状態が変換される蛍光プローブは、同視野において複数回超解像画像を取得することができるため、生細胞中における微細構造の経時変化の検討に有用である。この目的には、二波長の光照射で可逆的に蛍光の ON/OFF が可能なフォトクロミック蛍光プローブが適しており、Dronpa や mGeos-X<sup>65</sup>、Dreiklang<sup>66</sup>等の蛍光タンパク質が利用されている<sup>67</sup>。また、有機小分子ではフォトクロミック分子であるジアリールエテン<sup>68-73</sup>やアゾベンゼン<sup>74</sup>、オキサジン<sup>75</sup>を利用して可逆的に ON/OFF が可能な蛍光プローブの開発も進められているが (図 1-6a-c)、生細胞での超解像イメージングの達成には水溶液中での光応答性や細胞膜透過性等といったことが課題として残っている。また、紫外光照射により蛍光状態になり、一定時間経過後、熱的に無蛍光状態に戻るフォトクロミックローダミンが開発されているが、活性化後強い励起光により褪色させるケージド化合物の様な利用に限られている (図 1-6d)<sup>76-80</sup>。



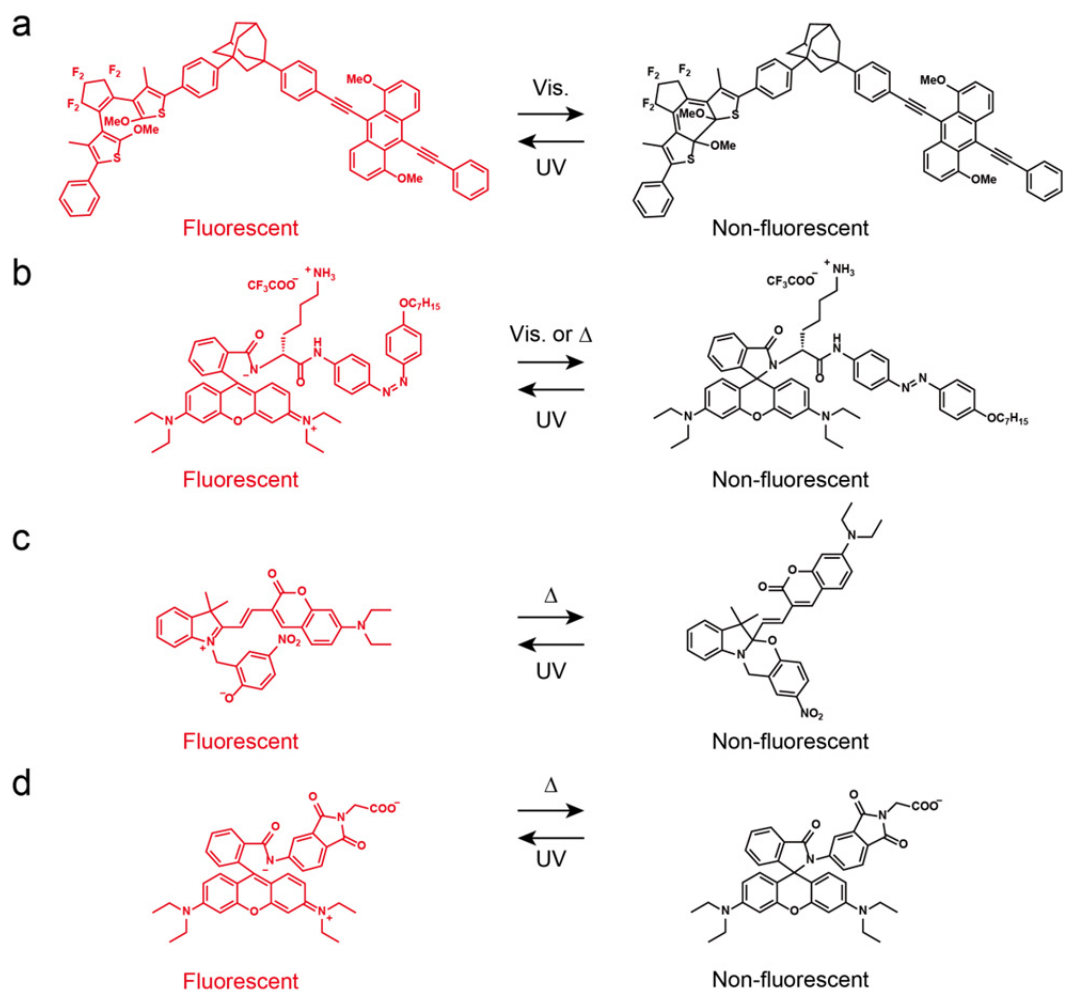


図 1-6. フォトクロミック蛍光分子. (a) ジアリールエテンの光異性化に基づく蛍光分子<sup>68</sup>. (b) アゾベンゼンの光異性化に基づく蛍光分子 (RSA-AZO)<sup>74</sup>. (c) オキサジンの光異性化に基づく蛍光分子<sup>75</sup> (d) フォトクロミックローダミン誘導体<sup>76-79</sup>.

一方、蛍光色素と添加物との反応による蛍光の明滅を利用して SLM を達成する手法が開発されている。例えば有機小分子による SLM を最初に達成した STORM では脱酸素条件下においてチオールを添加し、Cy3-Cy5 等のシアニンペアを用いて蛍光のスイッチングを達成した<sup>34,38</sup>。Cy5 を強く励起するとチオールが付加することで無蛍光状態に変換され<sup>81</sup>、Cy3 を励起することで再び Cy5 が蛍光状態に変換されることを利用している。その後、一般的な蛍光色素であるローダミンやオキサジン、シアニンをチオール等の還元剤等を加えた条件下で、強いレーザー光を照射すると大部分の分子が長寿命の無蛍光状態に変換されることが報告された。ごく一部の蛍光色素が熱的に基底状態へと戻り、蛍光を発するため SLM が可能となる。本手法は direct STORM (dSTORM)<sup>82, 83</sup> あるいは Ground state depletion microscopy followed by individual molecule return (GSDIM)<sup>84</sup> と呼ばれており、現在最も汎用的に利用できる手法の一つである (図 1-7a)。無蛍光状態としては、ローダミンでは三重項状態や一電子還元されたラジカルアニオンが生成し、オキサジンではさらに一電子還元されたロイコ体が生成することが知られている<sup>85</sup>。また、Alexa647 や Cy5 等のシアニン類では、チオールの付加反応により共役系が切断され無蛍光状態になっていることが示唆されている (図 1-7b)<sup>81</sup>。dSTORM に必要な還元剤として、外部から添加する 10-100 mM 程度の Mercaptoethylamine (MEA) や  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) が用いられるが、

細胞内に存在するグルタチオン (GSH) を利用することも可能であり、実際に生細胞イメージングも達成されている<sup>86-88</sup>。これらの無蛍光状態は熱的に戻るだけでなく、405 nm の光照射により基底状態へと変換されるため、測定中に蛍光状態の分子の割合を調節するのに利用されている<sup>89</sup>。

同様に、蛍光色素と酸化剤や還元剤を組み合わせることで無蛍光状態を達成する Blink microscopy と呼ばれる手法<sup>90</sup>や、オルガネラ局在性蛍光色素に応じたイメージングバッファの最適化<sup>91</sup>による SLM が報告されている。また、銅イオンの可逆的な結合による消光を利用した Chemically improved resolution for optical nanoscopy (CHIRON) (図 1-7c)<sup>92</sup> や抗体や DNA が可逆的に結合することを利用する Points accumulation for imaging in nanoscale topography (PAINT) あるいは universal PAINT (uPAINT) といった手法も報告されている<sup>93-96</sup>。

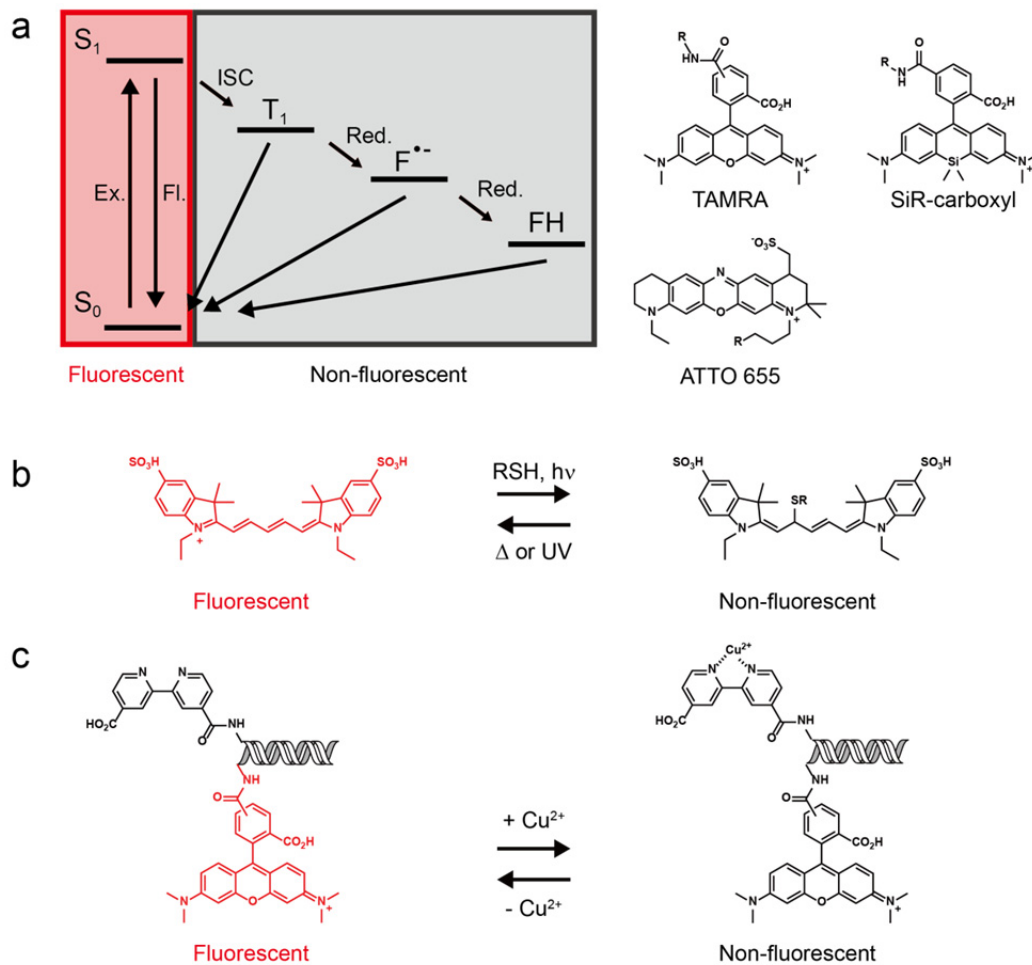


図 1-7. SLM に用いられる可逆的な蛍光スイッチング法. (a) 三重項状態 ( $T_1$ ), ラジカルアニオン ( $F^{\bullet-}$ ), ロイコ体 (FH) 等の無蛍光状態を利用した可逆的な蛍光スイッチング (dSTORM 又は GSDIM) と生細胞 SLM に用いられる代表的な蛍光色素の化学構造<sup>86-88</sup>. (b) 光照射下におけるシアニンへの可逆的なチオール付加<sup>81</sup>. (c) 可逆的な銅イオン ( $\text{Cu}^{\text{II}}$ ) の結合 (Chemically improved resolution for optical nanoscopy, CHIRON)<sup>92</sup>.

### 第三節 課題と本研究の目的

#### 第一項 従来法の課題

前節でまとめたように、蛍光プローブの明滅法は多岐にわたりそれぞれ一長一短がある。その中で一般的な有機小分子蛍光色素を広く使う事ができ、生細胞イメージングにも成功している dSTORM/GSDIM は最も汎用性の高い手法の一つである。しかしながら、本手法において蛍光プローブの明滅特性は蛍光色素の種類や励起光の強度、還元剤の種類及び濃度等の使用条件に大きく依存することが報告されている<sup>89</sup>。例えば、シアニン類ではチオール存在下で褪色を防ぐため酸素を除去することが好ましく、生細胞での観察ではその影響が懸念される。一方、ローダミンやオキサジンを用いる場合、酸素を除く必要はないものの大部分を無蛍光状態に変換するために、事前に強いレーザー照射が必要である。そのため、蛍光色素の褪色や活性酸素種による細胞への光毒性<sup>97</sup>が懸念される。また、複数の蛍光色素を用いた多色イメージングを行う際に、全ての蛍光プローブに最適な観察条件の設定が困難な場合が予想される。したがって、添加物や励起光の影響を最小限に抑えた生理的条件下において、生細胞の SLM を行うことが望ましく、蛍光プローブの明滅法には未だ改良の余地が残されている。

## 第二項 本研究の目的

本研究では、蛍光色素自体の構造を新たに設計，検討することによって，添加物やレーザー強度に依らず自発的に明滅する蛍光色素を開発し，それを用いた温和な条件下でも実施可能な超解像イメージング法の確立を目指した (図 1-8).

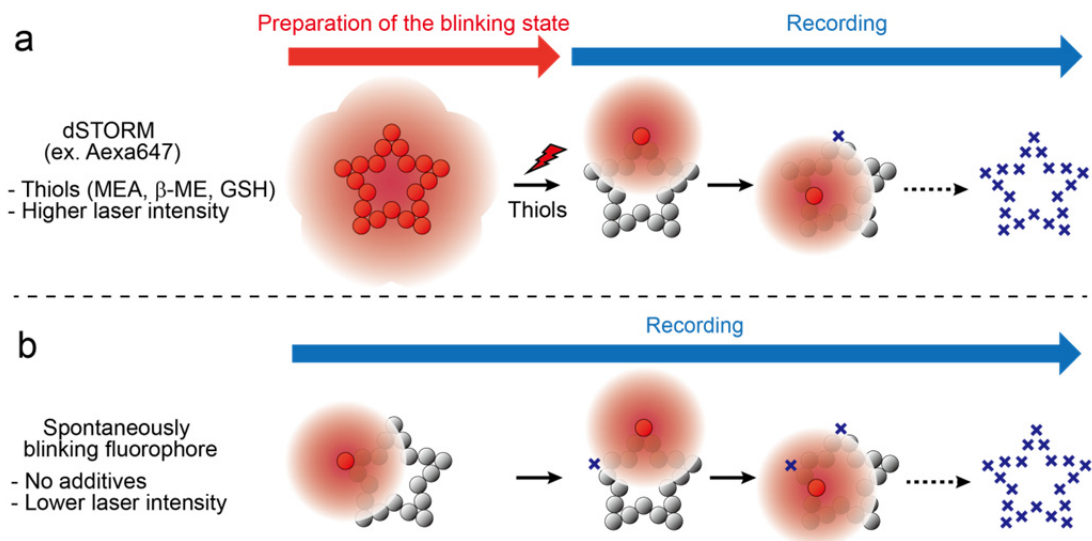


図 1-8. 自発的に明滅する蛍光色素を用いた SLM の測定スキーム. 一般的な蛍光色素 (a) と自発的に明滅する蛍光色素 (b) を用いた SLM. 自発的に明滅する蛍光色素を用いる SLM では一般的な蛍光色素を用いる場合に必要な添加物や測定前の強いレーザー照射を必要としない.

## 第二章

### 自発的な明滅特性を有する蛍光色素の開発

## 第一節 自発的な明滅特性を有する蛍光色素の設計

### 第一項 ローダミン類の分子内スピロ環化平衡

ローダミン類は水溶性，高いモル吸光係数，高い蛍光量子収率，高い光安定性，可視光領域での多彩な波長域に用いることができるといったことから汎用される蛍光色素骨格であり<sup>98</sup>，SLMにも適していると考えられる(図2-1a)。しかし，一般的なローダミン類は2'位にカルボキシ基を有しており，水溶液中において常に吸収・蛍光を示す開環体構造で存在する。SLMでは任意の時間において大部分が無蛍光状態であることが必要であるため，上述したような特殊な条件下で無蛍光状態に変換させる必要がある(第一章 第二節)。

ローダミンを基にした蛍光プローブの開発の過程において，キサントレン環のアミノ基をアミド基やカルバメート基に変換することで，スピロラクトン構造が安定化されることが知られている。同様に，カルボキシ基をアミド化するとスピロラクタム構造が安定化され，水溶液中で閉環体構造として存在する。これらの閉環体構造ではキサントレン環の共役系が切断されるため，可視光領域における吸収及び蛍光が完全に消失する。開環／閉環の構造変化に伴う蛍光変化が大きいため，観測対象との反応に伴う蛍光の回復を利用した蛍光プローブ(図2-1b)<sup>98-101</sup>や光照射によって蛍光が回復するケージド化合物<sup>57</sup>が数多く開発され



ている (図 1-5b).

一方, 当研究グループではこれまでにローダミンのカルボキシ基を求核性の高いメルカプトメチル基やヒドロキシメチル基に置換した誘導体が水溶液中において開環体/閉環体構造から成る分子内スピロ環化平衡を示すことを明らかにしてきた<sup>102</sup>. これらのローダミン誘導体は酸性条件下では吸収・蛍光を示す開環体構造をとり, 塩基性条件下では無色無蛍光である閉環体構造をとる. 観測対象との化学反応によって, 生理的 pH 環境 (pH 7.4) における開環体構造の割合が増加し, 蛍光強度が大きく上昇することを利用して, 次亜塩素酸 (図 2-1c)<sup>102, 103</sup> やプロテアーゼ活性 (図 2-1d)<sup>104, 105</sup> を高感度で検出する蛍光プローブの開発に成功している.

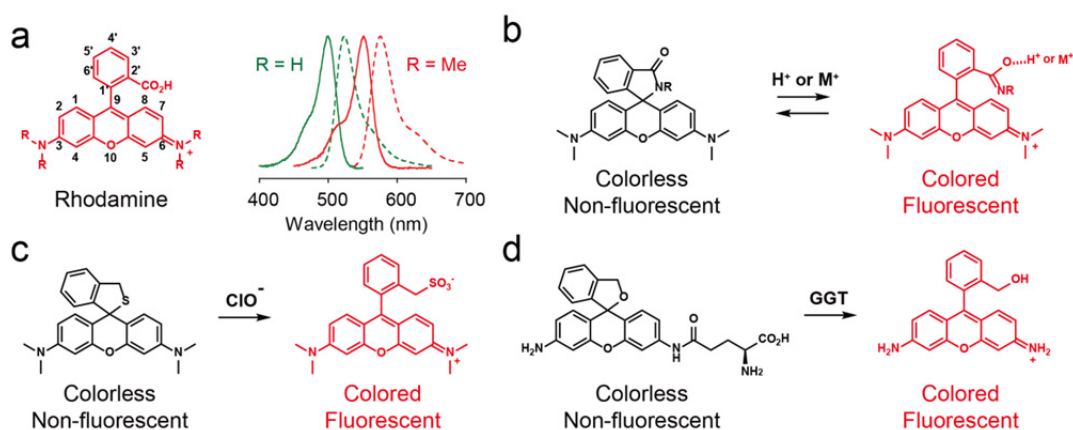


図 2-1. ローダミン骨格を有する蛍光プローブ. (a) ローダミンの化学構造 (左). ローダミンの吸収スペクトル (実線) と蛍光スペクトル (点線) (右). (b) 金属イオンを検出する蛍光プローブ. (c) 次亜塩素酸を検出する蛍光プローブ<sup>102</sup>. (d)  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase (GGT) を検出する蛍光プローブ<sup>104</sup>.

## 第二項 SLM に用いる蛍光色素に必要な特性

これまでの蛍光プローブの開発では、分子の集合としての蛍光特性の変化を利用してきたが、SLM では一分子における蛍光特性が重要となる。水中で熱的な分子内スピロ環化平衡を示すローダミン類の一分子に着目すると、ある時間間隔で蛍光性の開環体と無蛍光性の閉環体が室温下で可逆的に入れ変わっており、自発的に蛍光の明滅を示していると考えられる。本研究ではこの自発的な明滅特性を化学構造の検討により SLM での使用に最適化することで SLM プローブの開発を目指した。

ローダミン類の分子内スピロ環化平衡を生細胞中の中性環境下での SLM に利用するためには、通常の生細胞イメージングに必要な水中における高い蛍光特性や光褪色耐性、細胞膜透過性等に加え、下記の 2 つの特性が必要である。

- (1) 測定条件下において大部分が無蛍光性の閉環体構造で存在する。
- (2) 開環体構造が顕微鏡で検出可能な時間光った後に閉環体構造に戻る。

(1) 近接する蛍光分子から発せられる蛍光シグナルが重ならず、一分子の位置を正確に決定するためには大部分が無蛍光状態で存在することが必要である。

Nyquist-Shannon のサンプリング定理によると 20 nm の空間分解能を得るには、

10 nm 毎にシグナルを得ることが必要である。このとき回折限界内 (直径 300

nm) の領域を約 700 分子の蛍光色素でラベル化する必要があり, 1 分子のみ光っている状態を達成するには, 蛍光状態で存在する割合は大凡 0.04% であることが理想的である. また, 観測対象とするタンパク質等の密度, すなわち回折限界内に存在する分子数に応じて最適な割合は異なる. すなわち, この割合が高い場合には高密度に存在するタンパク質の観察ができず, この割合が低すぎる場合には全ての分子の位置を決定するまでの時間が長くなってしまい, 生細胞での観察では細胞の動きの影響が大きくなってしまう.

(2) 分子の位置決定の精度は検出するフォトン数に依存するため十分なフォトン数を検出する必要がある. 一般的に SLM に用いられる EMCCD カメラの露光時間は 10-100 ms/frame 程度であるため, その程度の時間スケールの間, 蛍光状態が維持されることが望ましい. 例えば, 開環体の持続時間が露光時間に比べて非常に短い  $\mu\text{s}$  程度である場合, 通常の励起光照射では十分な蛍光シグナルを得ることは難しくなる.

これらの特性を定量的に評価するために, (1) 分子内環化平衡の平衡定数 ( $pK_{\text{cycl}}$ ) と (2) 開環体の持続時間 ( $\tau$ ) を指標とすることにした. ここで  $\tau$  は蛍光色素で一般的に用いられる蛍光寿命とは異なる.  $pK_{\text{cycl}}$  は開環体の吸光度の pH 変化を測定し, 滴定曲線から開環体の吸光度が半分になる pH として概算することができる<sup>106</sup>. 例えば, 図 2-2a に示すように  $pK_{\text{cycl}} = 8.5$  であるローダミン誘導

体は pH 7.4 において大部分が開環体構造として存在しているのに対し、 $pK_{cycl} = 6$  であるローダミン誘導体は大部分が閉環体構造として存在している。そこで、pH 7.4 において大部分が閉環体構造をとる化合物の選択基準として、 $pK_{cycl}$  の目標値を 6 以下に設定した。 $\tau$  の決定にはレーザーフラッシュフォトリシス法 (LFP, Laser flash photolysis) を用いることにした。本手法は、パルス幅が 10 ns のレーザーパルス (308 nm) を閉環体構造に照射し、光反応により開環体構造を過渡的に生成させる。その後、水溶液中において元の平衡状態に戻るのに伴い、過渡的に生成した開環体の吸光度が減少する。この過渡吸収の減衰曲線を解析することにより、開環体が閉環体に戻るまでの時間  $\tau$  を評価できる。 $\tau$  が長すぎると全ての分子の位置を決定するのに時間がかかりすぎてしまい、 $\tau$  が短すぎると同一レーザー強度において、カメラの露光時間内に検出できる光子数が少なくなり、正確に分子の位置を決定しにくくなる (図 2-2b)。そこで顕微鏡下で十分に検出が可能な化合物を選択するため、 $\tau$  の目標値を 10 から数 100 ms と設定した。

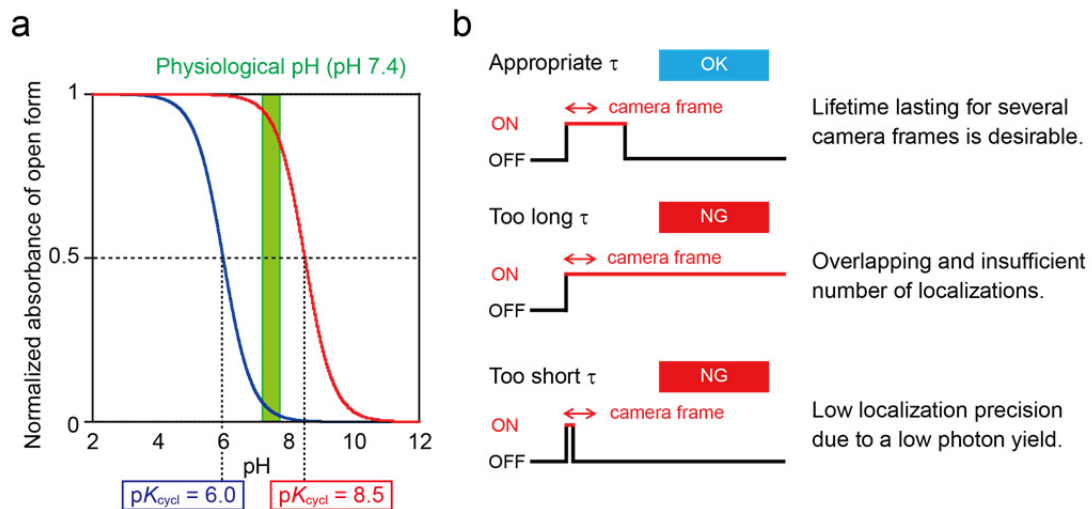


図 2-2. ローダミンの分子内スピロ環化平衡に基づく SLM プロープに必要な特性. (a)  $pK_{cycl}$  が 6.0 (青) 又は 8.5 (赤) であるローダミン誘導体の pH 滴定曲線の模式図. 生理的 pH (pH 7.4) において SLM を行うためには大部分の分子が閉環体で存在する必要がある. (b) 開環体の持続時間が異なるローダミン誘導体の蛍光強度変化の模式図. 正確な位置決定に必要な光子数を検出するために, 蛍光状態は顕微鏡のカメラの露光時間程度続く必要がある.

### 第三項 開発戦略

上記の特性を有するローダミン誘導体を開発するために、本研究では下記の順序で研究を進めた。

- (1) ローダミン類の化学構造のうち分子内求核基と求電子基である蛍光団に着目し、有機化学の観点からそれぞれの構造を変化させた誘導体群を合成する。
- (2) 各 pH における吸収スペクトル測定により  $pK_{\text{cycl}}$  を決定し、 $pK_{\text{cycl}}$  が 6 以下のローダミン誘導体を選択する。
- (3) (2) で選択したローダミン誘導体の  $\tau$  を LFP により決定し、 $\tau$  が 10 から数 100 ms の誘導体を選択する。
- (4) 得られたローダミン誘導体の蛍光特性、明滅特性を顕微鏡下で評価した後、超解像イメージングを実施する。

## 第二節 分子内スピロ環化平衡の平衡定数の評価

### 第一項 設計と合成

ローダミン誘導体の分子内スピロ環化平衡において、閉環反応は分子内求核基と求電子基である蛍光団の求核付加反応であると考えられる。当研究グループのこれまでの研究において、分子内求核基の求核性や蛍光団の求電子性が分子内スピロ環化平衡に影響することが示唆されている。例えば、次亜塩素酸を検出するプローブの開発において、分子内求核基がアルコールである分子が中性では開環体構造で存在するのに対して、チオールに置換した分子は閉環体構造が安定化され、水溶液中で常に閉環体構造をとることが報告されている。さらに次亜塩素酸との反応により分子内求核基がチオールから求核性が殆ど無いスルホン酸に酸化されると開環体が安定化され蛍光が回復することが利用されている<sup>102, 103</sup>。また、蛍光団のアミノ基のアルキル基の種類やアミド化によっても分子内スピロ環化平衡はシフトすることが報告されている<sup>105</sup>。しかしながら、これらの検討では溶液における評価が中心であり、SLMで重要となる一分子における開環体の持続時間あるいは閉環反応速度の評価はこれまで全く実施されていなかった。

そこで、求核性の異なるメルカプトメチル基（チオール， $-\text{SH}$ ），アミノメチル基（アミン， $-\text{NH}_2$ ），ヒドロキシメチル基（アルコール， $-\text{OH}$ ）を分子内求核基として持つローダミン誘導体设计了。また、蛍光団の構造としてキサンテン環のアミノ基にアルキル基またはアミド基を導入した化合物及び 10 位の酸素原子をケイ素原子に置換した化合物を設計した (図 2-3)。本研究で評価したローダミン誘導体 14 種の構造を図 2-4 に示す。

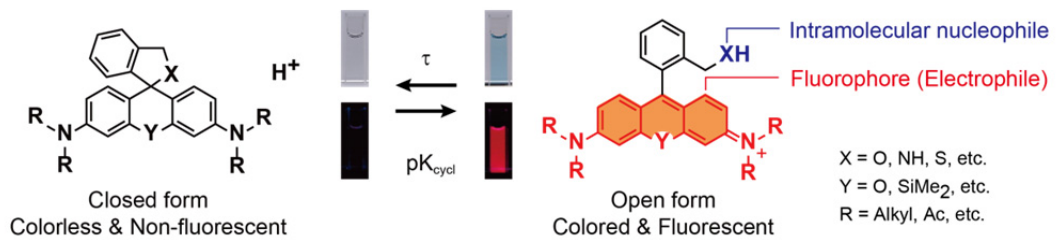


図 2-3. SLM に適したローダミン誘導体の設計。

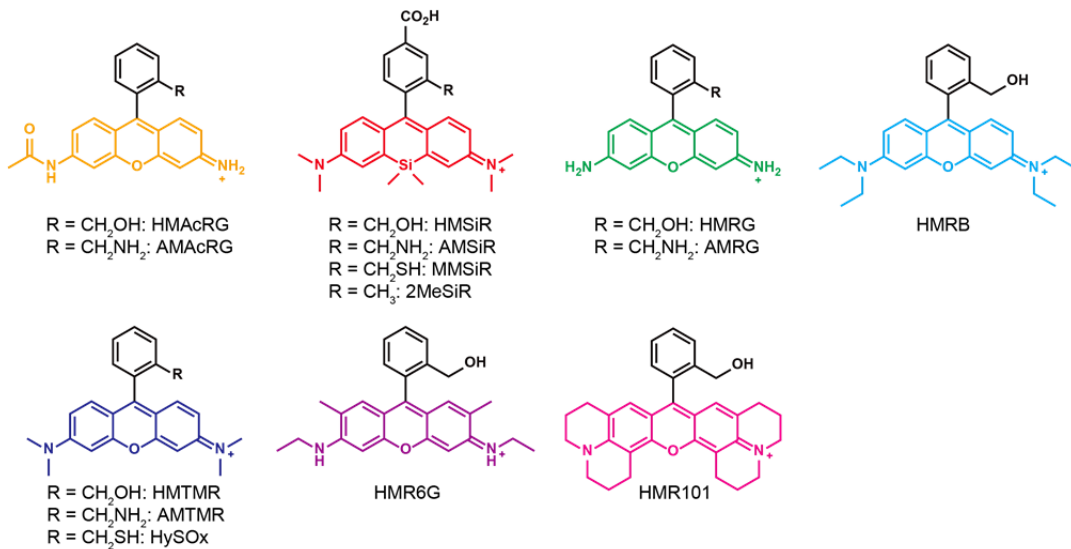
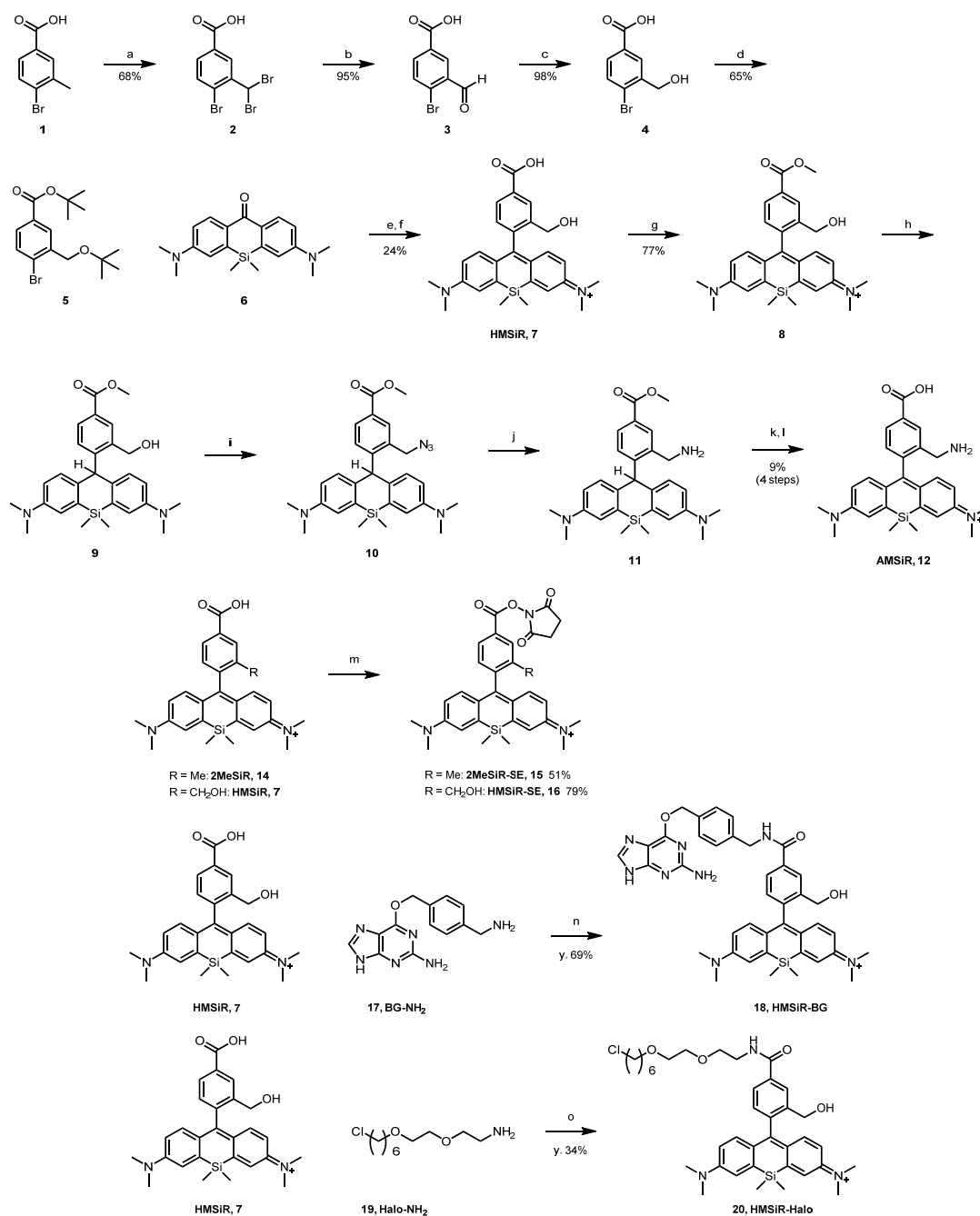


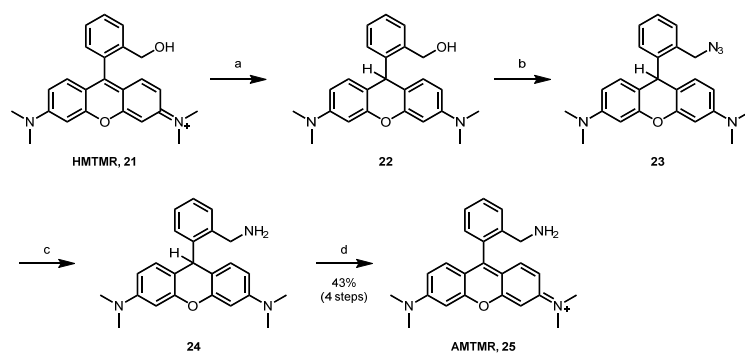
図 2-4. 本研究で合成，評価したローダミン誘導体の化学構造。



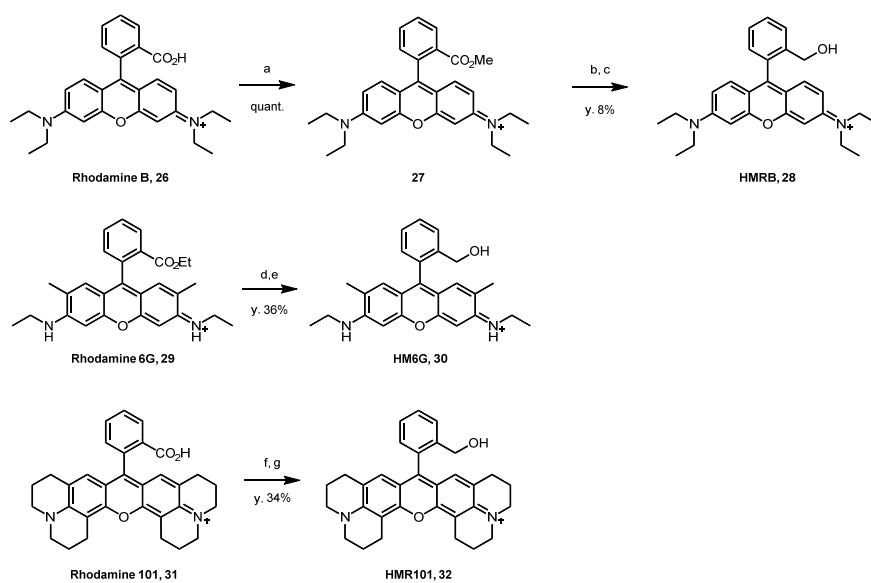
各ローダミン誘導体を下記のスキーム又は既報のスキームに従って合成した。  
また、**HMSiR** 及び **2MeSiR** に関してはタンパク質にラベル化するためにスクシンイミドエステル体 (**HMSiR-SE**, **2MeSiR-SE**), タグタンパク質である SNAP tag 及び Halo tag の基質である **HMSiR-BG**, **HMSiR-Halo** を合成した。



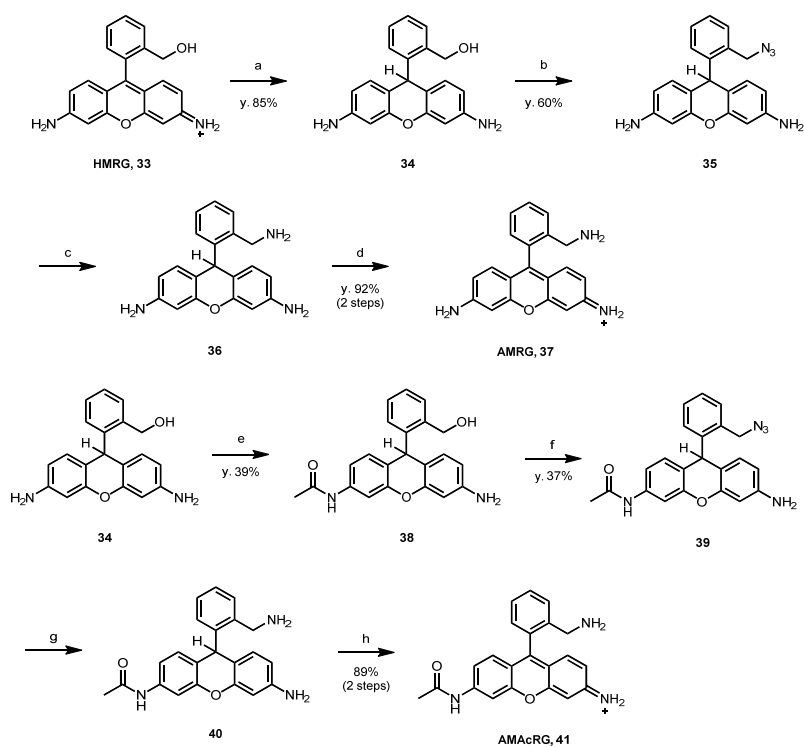
**スキーム 2-1. SiR 誘導体の合成経路.** (a) NBS, AIBN, CCl<sub>4</sub>, reflux, 18 h; (b) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, 70 °C, 4 h; (c) NaBH<sub>4</sub>, THF, 0 °C, 5 h; (d) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, <sup>t</sup>BuOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., 3 d; (e) *sec*-BuLi, THF, -78 °C, then **6**, -78 °C to r.t., 2 h; (f) TFA, r.t., 42 h; (g) TMSCHN<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 10/1, r.t., 10 min; (h) H<sub>2</sub>, Pd/C, THF, r.t., 40 min; (i) DPPA, DBU, toluene, 80 °C, 3 h; (j) PPh<sub>3</sub>, THF/H<sub>2</sub>O = 10/1, reflux, 12 h; (k) LiOH, H<sub>2</sub>O/MeOH = 1/3, r.t., 6 h; (l) chloranil, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., 12 h; (m) NHS, WSCD, DMF, r.t. (n) HOBt, EDC-HCl, TEA, DMF, 0 °C to r.t., 17 h. (o) HOBt, EDC-HCl, TEA, DMF, 0 °C to r.t., 13 h.



スキーム 2-2. AMTMR の合成経路. (a) NaBH<sub>4</sub>, MeOH, 0 °C, 30 min; (b) DPPA, DBU, toluene, 80 °C, 1 h; (c) PPh<sub>3</sub>, THF/H<sub>2</sub>O = 10/1, reflux, 19 h; (d) chloranil, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., 1 h.



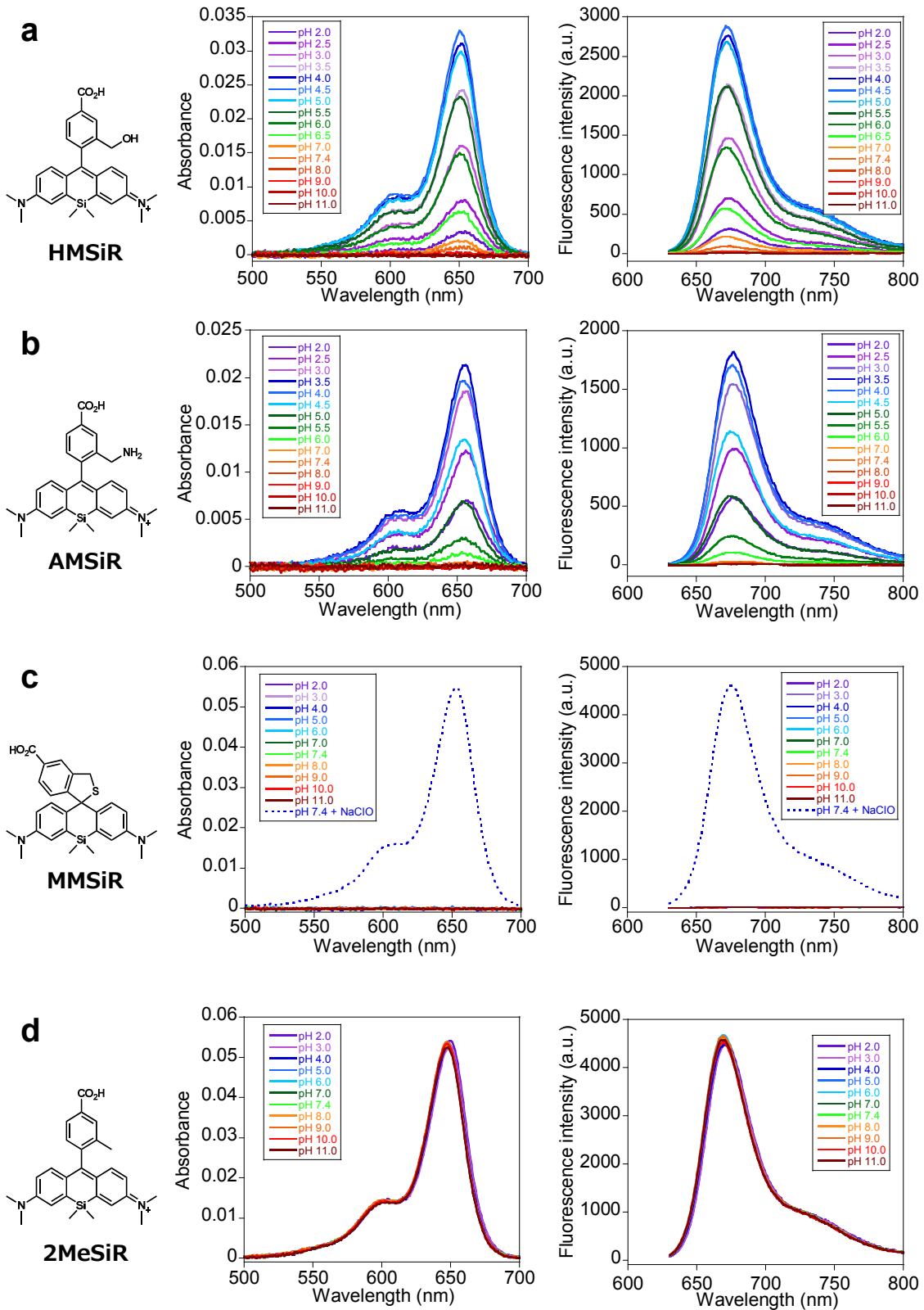
スキーム 2-3. ヒドロキシメチルローダミン誘導体の合成経路. (a) MeI, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, r.t., overnight; (b) LAH, THF/dioxane/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = 4/1/10, r.t., 1 h; (c) chloranil, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., 30 min; (d) LAH, THF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = 5/1, 0 °C; (e) chloranil, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., 30 min; (f) BH<sub>3</sub>, THF, r.t., overnight; (g) chloranil, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., 30 min.

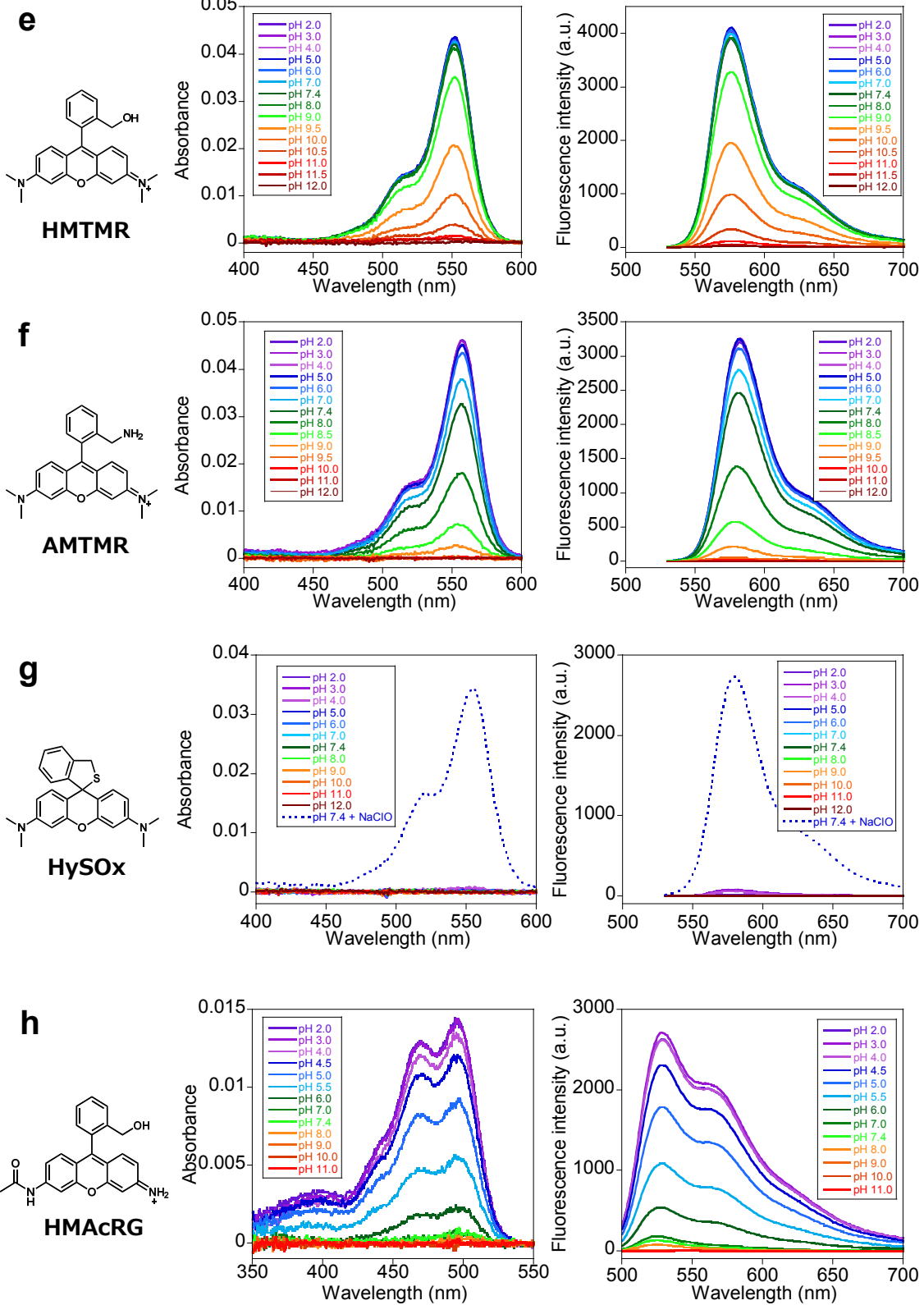


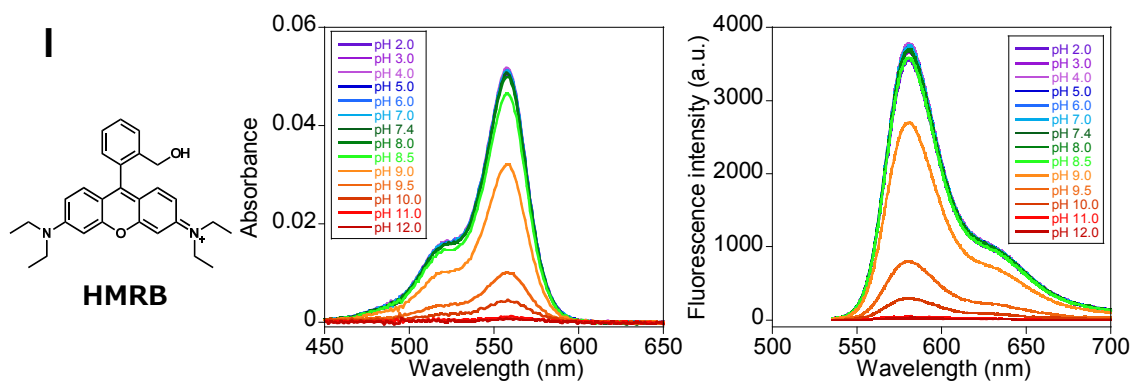
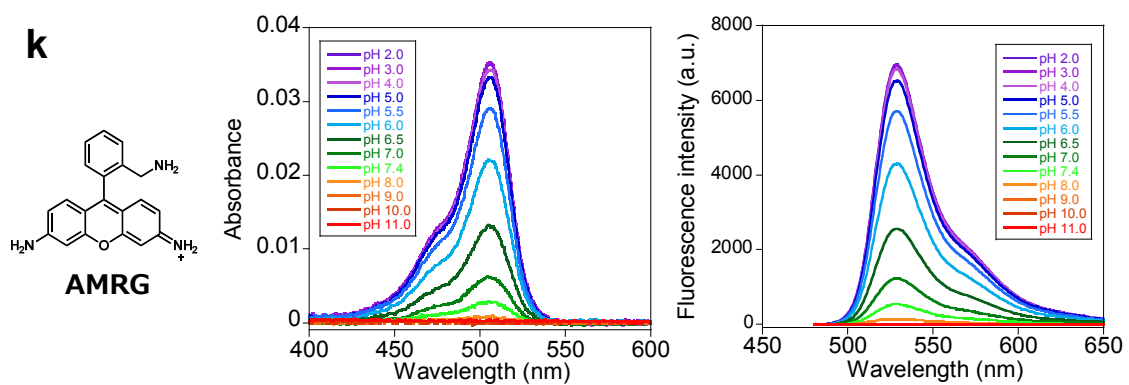
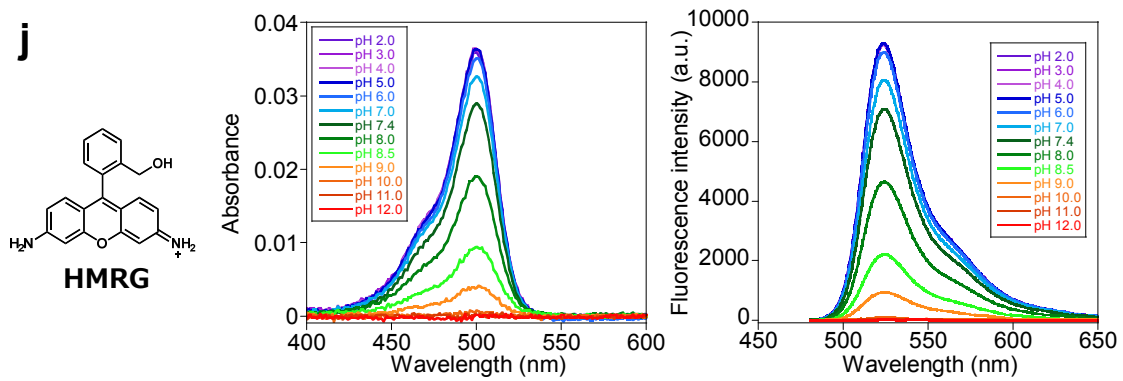
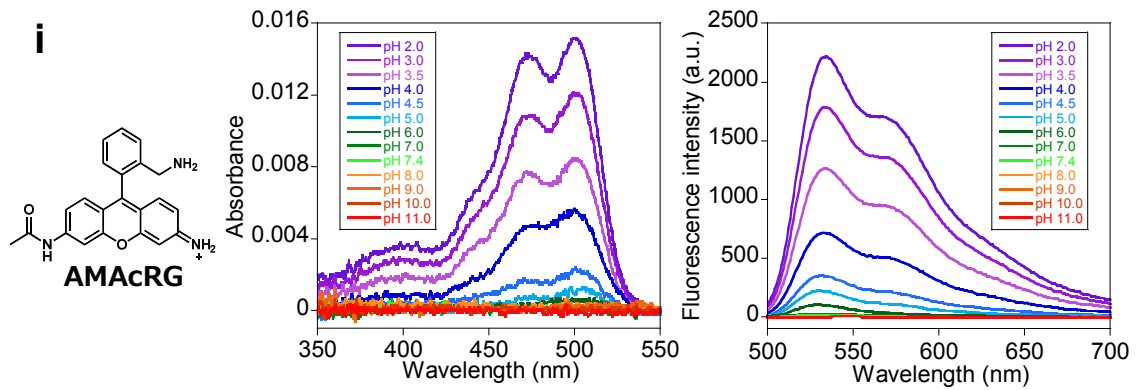
スキーム 2-4. AMRG 及び AMAcRG の合成経路. (a)  $\text{NaBH}_4$ , MeOH, 0 °C, 10 min; (b) DPPA, DBU, THF, 80 °C, 17 h; (c)  $\text{PPh}_3$ , THF/ $\text{H}_2\text{O}$  = 10/1, reflux, 18 h; (d) chloranil,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , r.t., 30 min; (e)  $\text{Ac}_2\text{O}$ , pyridine, 0 °C, 12 h; (f) DPPA, DBU, THF, 80 °C, 17 h; (g)  $\text{PPh}_3$ , THF/ $\text{H}_2\text{O}$  = 10/1, reflux, 12 h; (h) chloranil,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , r.t., 30 min.

## 第二項 $\text{p}K_{\text{cycl}}$ の決定

ローダミン誘導体の各 pH のリン酸緩衝液中における吸収スペクトル及び蛍光スペクトルを測定した (図 2-5).







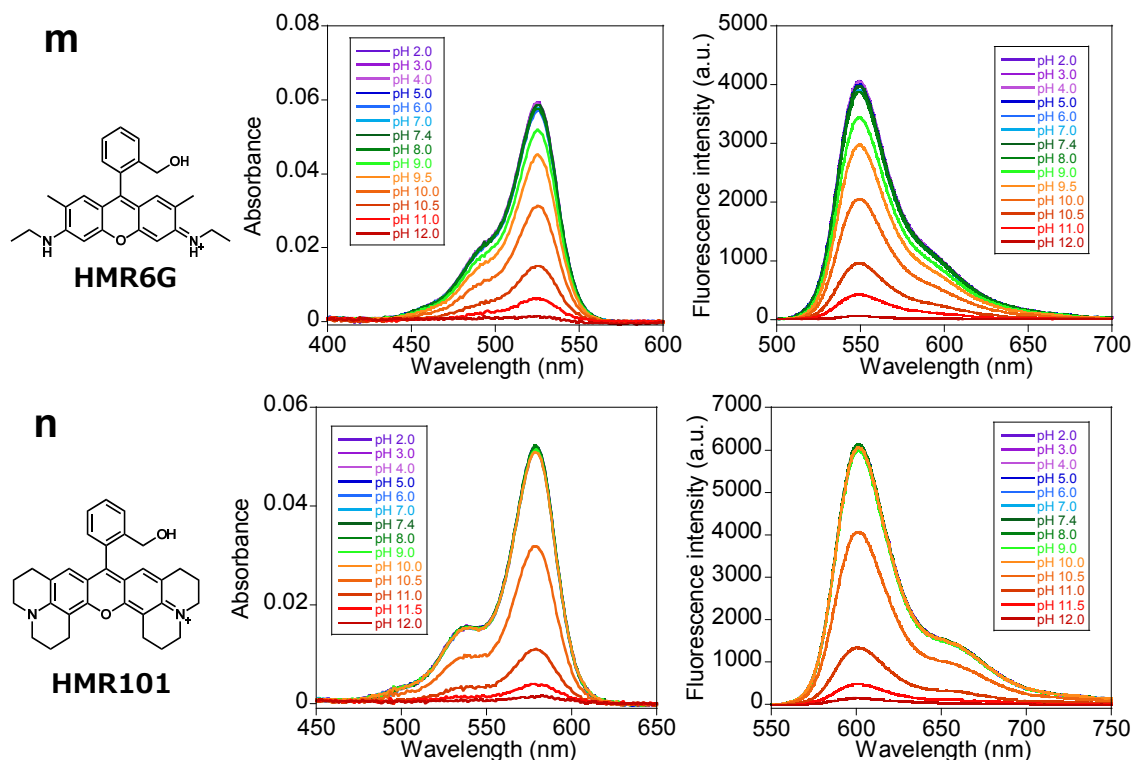


図 2-5 ローダミン誘導体の吸収・蛍光スペクトル. (a) HMSiR, (b) AMSiR, (c) MMSiR, (d) 2MeSiR, (e) HMTMR, (f) AMTMR, (g) HySOx, (h) HMAcRG, (i) AMAcRG, (j) HMRG, (k) AMRG, (l) HMRB, (m) HMR6G, (n) HMR101 の吸収スペクトル (左) と蛍光スペクトル (右). 各 pH の 0.2 M リン酸緩衝液 (0.1% DMSO) 中で測定. 蛍光色素の濃度が 0.5  $\mu$ M になるように混合し, 直後に測定. 蛍光スペクトル測定の励起波長は 610 nm (a-d), 510 nm (e-g), 460 nm (h-k, m), 520 nm (l, n). MMSiR と HySOx は pH 7.4 において次亜塩素酸ナトリウム溶液 (NaClO) と完全に反応させ, 吸収・蛍光を示す生成物を得た (青の点線).



各誘導体の吸光度及び蛍光強度の pH 滴定曲線を作成し (図 2-6, 図 2-7), 開環体の吸光度が最大値の半分になる pH として  $pK_{cycl}$  を算出した (表 2-1)<sup>105, 106</sup>. ヒドロキシメチル (HM) 基を有するローダミン誘導体 (HM ローダミン), アミノメチル (AM) 基を有するローダミン誘導体 (AM ローダミン) の多くは, シグモイド曲線を示し, 酸性では開環体構造, 塩基性では閉環体構造で存在することが示された. それに対して, 蛍光団がケイ素置換ローダミン (SiR) である **HMSiR** と **AMSiR** はローダミンスピロアミド<sup>76, 78</sup> と同じようにベル型の滴定曲線を示し, 酸性側において再び閉環体構造をとることが示唆された. 傾向として, AM ローダミンの  $pK_{cycl}$  は HM ローダミンに比べて 1.1-1.9 小さく, 閉環体構造がより安定化されていると考えられる. さらに, メルカプトメチル (MM) 基を有するローダミン誘導体 (MM ローダミン) は測定 pH の範囲 (pH 2-11) において常に閉環体構造で存在するのに対して, 分子内求核基を持たない **2MeSiR** は常に開環体で存在することが示された. これらの結果から, 分子内求核基の求核性が高くなるほど閉環体構造が安定化され,  $pK_{cycl}$  が酸性側にシフトすることが示唆される (一般的に求核性の高さは HM, AM, MM の順に高くなる).

また, 蛍光団の Lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) を密度汎関数法 (Density functional theory, DFT) により算出した結果, LUMO が低くなるほど  $pK_{cycl}$  は低下する傾向が見られた (図 2-8). このことから蛍光団の求電子性が高

くなるほど閉環体が安定化されることが示唆された。SiR ではケイ素原子とメチル基が形成する $\sigma^*$ 軌道とキサンテン環の $\pi^*$ 軌道の相互作用の結果、LUMO が安定化され<sup>107, 108</sup>、求電子性が高くなっているため  $pK_{cycl}$  が低下していると考えられる。以上の結果から、分子内求核基の求核性及び蛍光団の求電子性が高くなるほど閉環体構造が安定化され、分子内スピロ環化平衡が酸性側にシフトすることが示された。検討したローダミン誘導体のうち、 $pK_{cycl}$  が 6 以下である誘導体である **HMSiR**, **HMAcRG**, **AMSiR**, **AMAcRG**, **MMSiR**, **HySOx** を選択し、次節で閉環体の持続時間  $\tau$  を評価した。

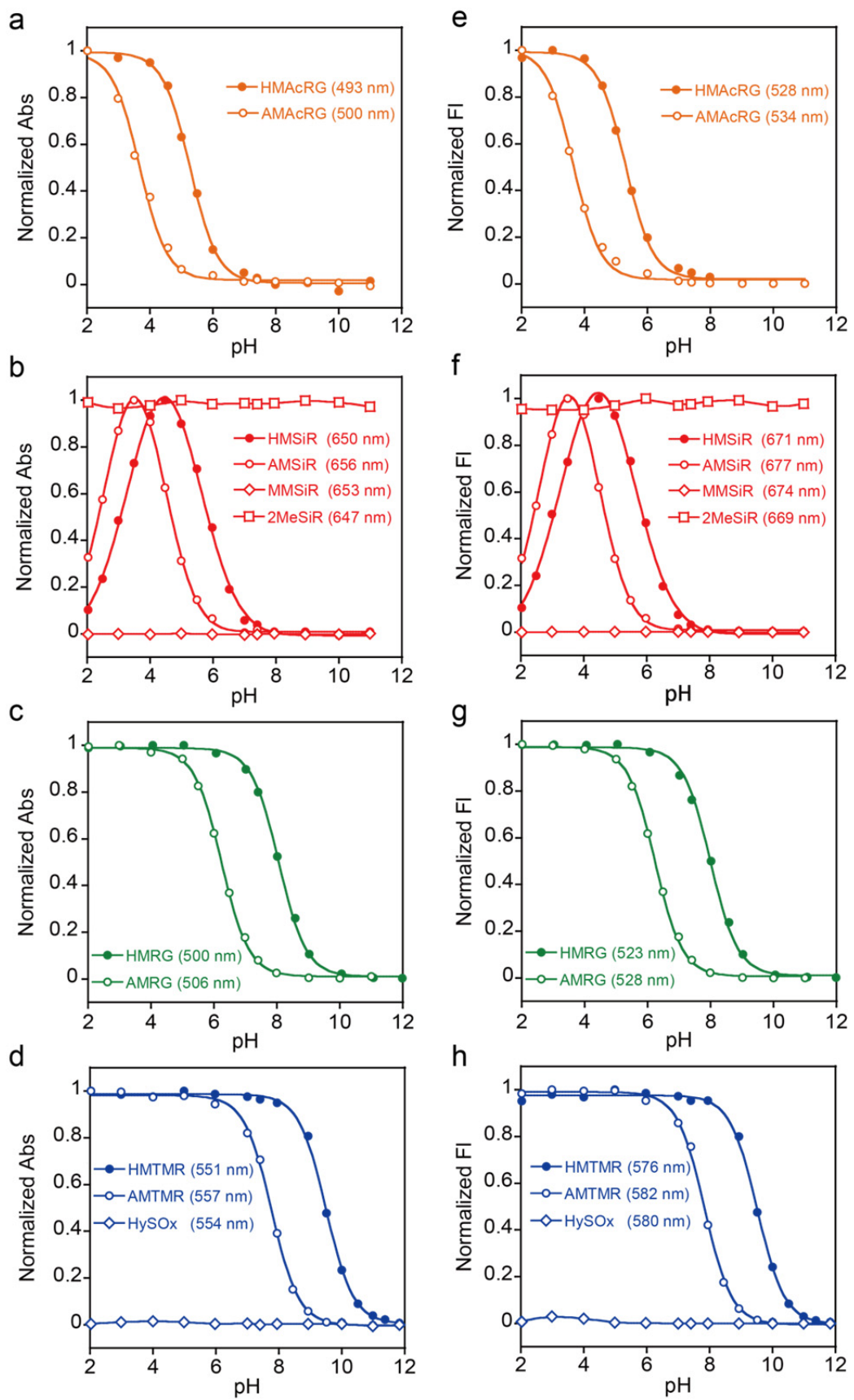


図 2-6. 分子内求核基の熱的な分子内スピロ環化平衡に与える影響. 開環体の吸光度 (a-d) と蛍光強度 (e-h) をプロットした. 括弧内に波長を示す. それぞれ最大値で規格化し, **MMSiR** と **HySOx** に関しては次亜塩素酸との反応で生じた生成物の吸光度又は蛍光強度で規格化した. 各 pH の 0.2 M リン酸緩衝液 (0.1% DMSO) 中で測定. 分子内求核基を有するローダミン誘導体は吸収を有する開環体と無色の閉環体から成る分子内スピロ環化平衡を示し, pH に応じて開環体の存在比率が変化した. 分子内求核基の求核性が高いほど閉環体が安定化され,  $pK_{cycl}$  の値が酸性側にシフトした.

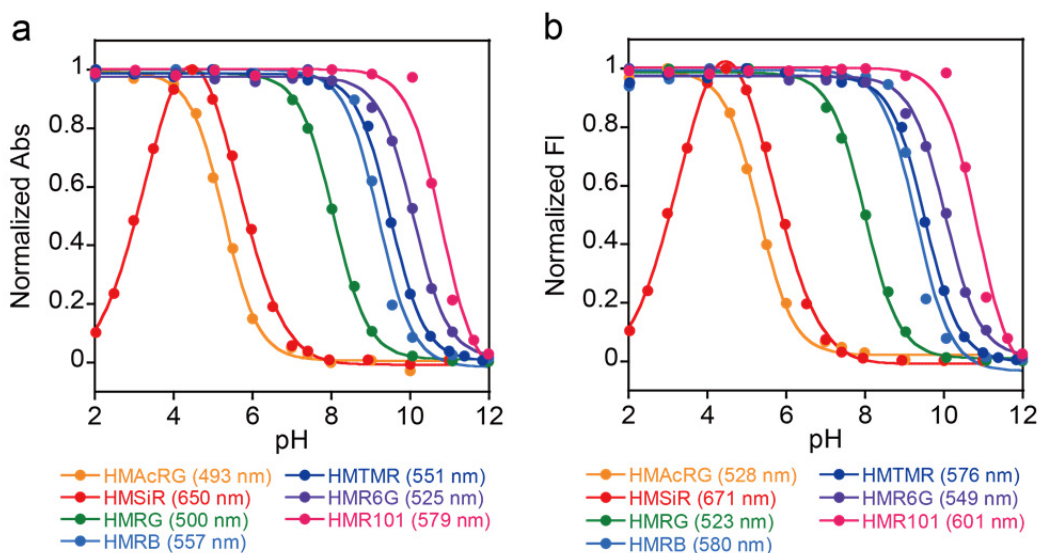


図 2-7. 求電子基である蛍光団の熱的な分子内スピロ環化平衡に与える影響. 開環体の吸光度 (a) と蛍光強度 (b) をプロットした. 括弧内に波長を示す. それぞれ最大値で規格化した. 各 pH の 0.2 M リン酸緩衝液 (0.1% DMSO) 中で測定. 蛍光団の求電子性が高いほど閉環体が安定化され,  $pK_{cycl}$  の値が酸性側にシフトした.

表 2-1. ローダミン誘導体の  $pK_{cycl}$

Compounds	$pK_{cycl}$	Compounds	$pK_{cycl}$	Compounds	$pK_{cycl}$	Compounds	$pK_{cycl}$
HMAcRG	5.3	AMAcRG	3.7				
HMSiR	5.8	AMSiR	4.7	MMSiR	< 2	2MeSiR	> 11
HMRG	8.1	AMRG	6.2				
HMRB	9.2						
HMTMR	9.5	AMTMR	7.8	HySOx	< 2		
HMR6G	10.1						
HMR101	10.8						

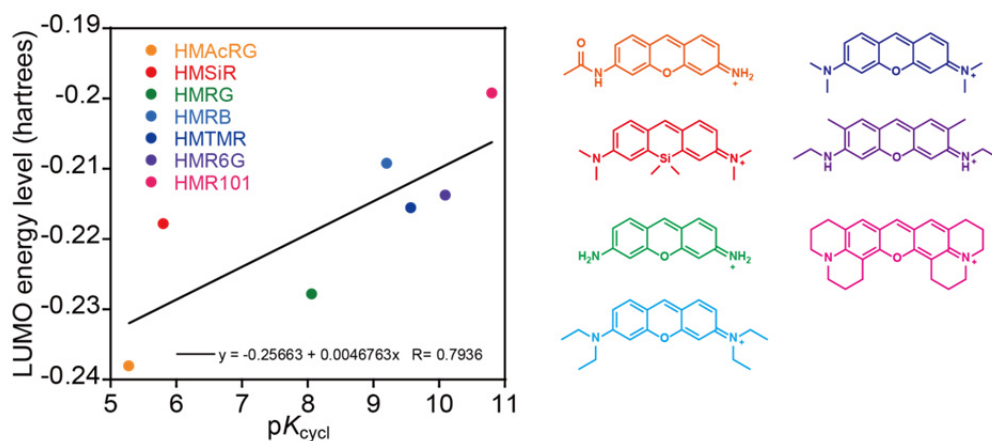


図 2-8. ヒドロキシメチルローダミンの  $pK_{cycl}$  と LUMO エネルギーレベルの関係性. 右に構造を示すキサントン環の LUMO エネルギー準位を Gaussian 09 (B3LYP/6-31+G\*) を用いて計算した.

### 第三節 開環体の持続時間の評価

#### 第一項 化学構造と開環体の持続時間の関係性

第二章第一節でも述べたようにローダミンスピロアミドは閉環体構造で安定に存在するが、紫外光を照射することによって吸収・蛍光を示す開環体が生成する、すなわちフォトクロミズムを示すことが知られている。これまでフォトクロミズムの機構の速度論的な解析において、レーザーフラッシュフォトリシス法が用いられてきた<sup>109, 110</sup>。本研究でも同様に、 $pK_{cycl}$ が6以下であった6種のローダミン誘導体をリン酸緩衝液 (pH 7.4) 中でLFPを行った。308 nmのレーザーパルス (10 mJ/pulse, 10 ns) を照射すると開環体と同波長域の過渡吸収が生じ、熱的に減衰する様子が観測された (図 2-9)。観測波長を変化させることで過渡吸収スペクトルを測定した所、酸性状態で取得した開環体の吸収スペクトルとほぼ一致した (図 2-10)。さらに、二段階のレーザー照射により、過渡種の蛍光スペクトルを取得した結果、酸性における開環体の蛍光スペクトルとほぼ一致した (図 2-11)。以上の結果、観測した過渡種の吸収/蛍光スペクトルが開環体の吸収/蛍光スペクトルと一致し、副生成物を生成すること無く元の状態に戻っていることから、レーザーパルス照射で生じた過渡種は開環体であることが示唆された。したがって、LFPによって得られる過渡吸収の経時変化を解析

することで、開環体が閉環体に熱的に戻るまでの時間、すなわち開環体の持続時間  $\tau$  を評価できると考えられる。

各誘導体の過渡吸収を測定した結果、MM ローダミンの閉環速度は非常に速く、 $\tau$  は LFP の時間分解能 ( $\sim 50$  ns) 以下であり、定量的に評価することができなかった。一方、AM ローダミンは二成分から成る過渡吸収の減衰曲線を示した。閉環反応のメカニズムの詳細については今後の検討が必要である。実際に SLM を行う場合に重要となる遅い方の成分に着目し、一次の速度式でフィッティングして  $\tau$  を算出した結果、MM ローダミンに比べてやや遅くなり  $\tau$  は 3-10  $\mu$ s 程度であった (表 2-2)。これらに対して、HM ローダミンの  $\tau$  は長く、20-300 ms 程度であることがわかった。以上の結果、開環体の持続時間  $\tau$  は分子内求核基の種類に大きく依存し、求核性が高くなるほど短くなることが示された。SLM への利用の観点からは、AM ローダミン及び MM ローダミンの  $\tau$  は顕微鏡で検出するには短すぎるため、 $\tau$  が EMCCD カメラの露光時間程度である HM ローダミンが適していると考えられる。

HM ローダミンのうち、Cy5 や Alexa647 と同程度の吸収/蛍光波長 (Abs/Em = 650 nm/671 nm) を有し、モル吸光係数 ( $\epsilon$ ) が  $100,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 、蛍光量子収率 ( $\Phi_{\text{Fl}}$ ) が 0.3 と高い蛍光特性を示すことから **HMSiR** を選択し顕微鏡下での評価を行うこととした ( $\epsilon, \Phi_{\text{Fl}}$  とともに水中で開環体として存在する誘導体の値<sup>88</sup>)。こ

れまでにローダミンスピロアミドやローダミンスルホンアミドも水溶液中において開環体／閉環体構造を示し、自発的に明滅する蛍光プローブとして利用できる可能性があった。しかしながら、ローダミンスルホンアミドは SLM に必要な特性である 6 以下の  $pK_{\text{cycl}}$  及び 10-数 100 ms の  $\tau$  を満たしていなかった<sup>111</sup>。また、ローダミンスピロアミドは光により開環体を生じさせた後にケージド化合物のように強いレーザー照射により褪色させてしまう不可逆的なプローブとして利用されているに限られていた<sup>76, 78-80</sup>。したがって **HMSiR** は、基底状態における熱平衡に基づく蛍光の明滅を示し、かつその明滅特性が SLM に必要な条件を満たしている初めての例であり、これは分子内求核基としてヒドロキシメチル基を選択することにより実現されたと考えられる。



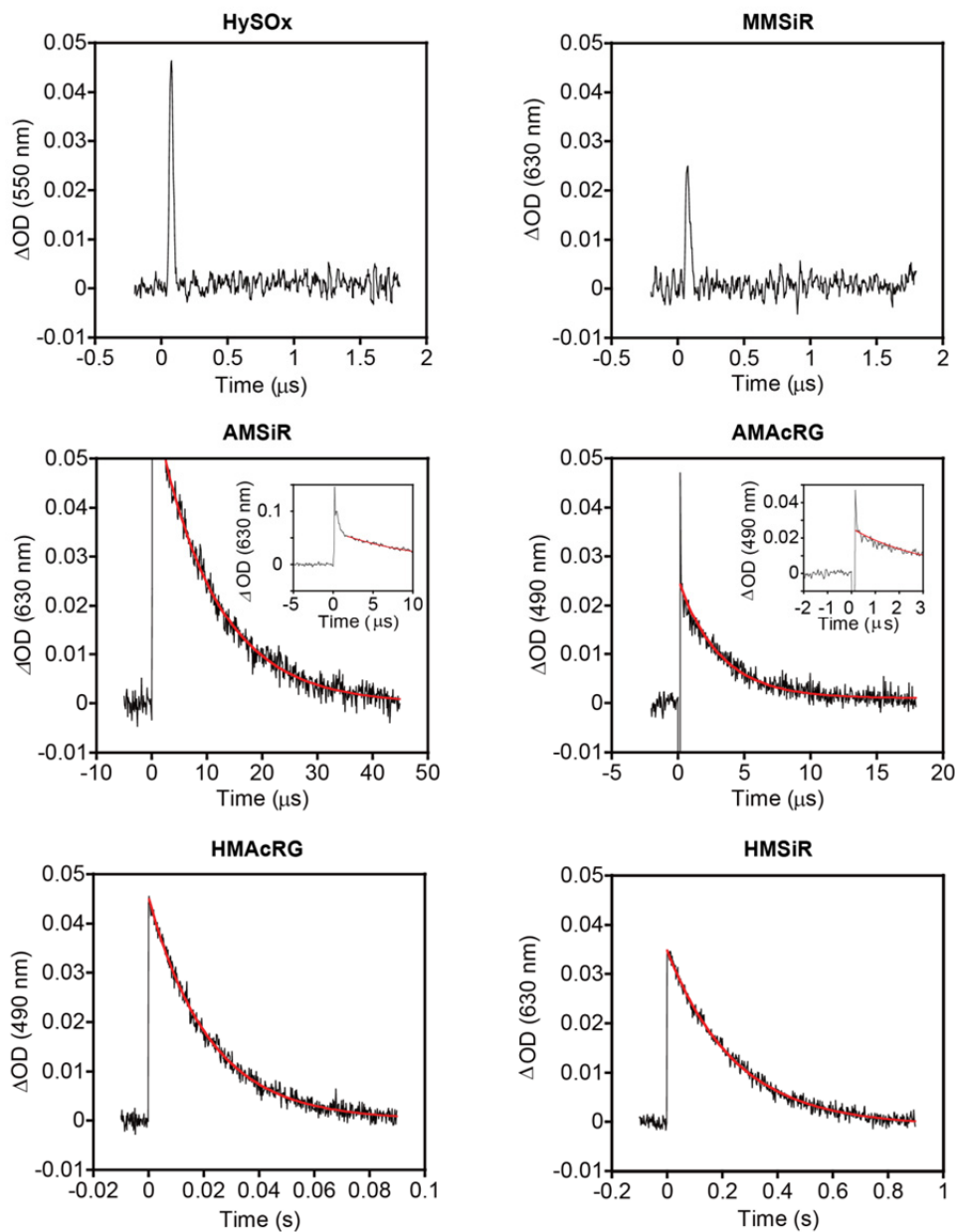


図 2-9. ローダミン誘導体のレーザーフラッシュフォトリシス (LFP). 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4, 1-2% DMSO) 中, 22 °C でレーザーパルス (308 nm, 10 mJ/pulse) を照射して得られた過渡吸収の減衰曲線. MM 基を有する **MMSiR** と **HySOx** の開環体の持続時間は装置の時間分解能 (50 ns) 以下であった. AM 基を有する **AMSiR** と **AMAcRG** は速い成分と遅い成分からなる二相性の過渡吸収の減衰曲線を示した. HM 基を有する **HMSiR** と **HMAcRG** は EMCCD カメラの露光時間に適した開環体の持続時間を示した.

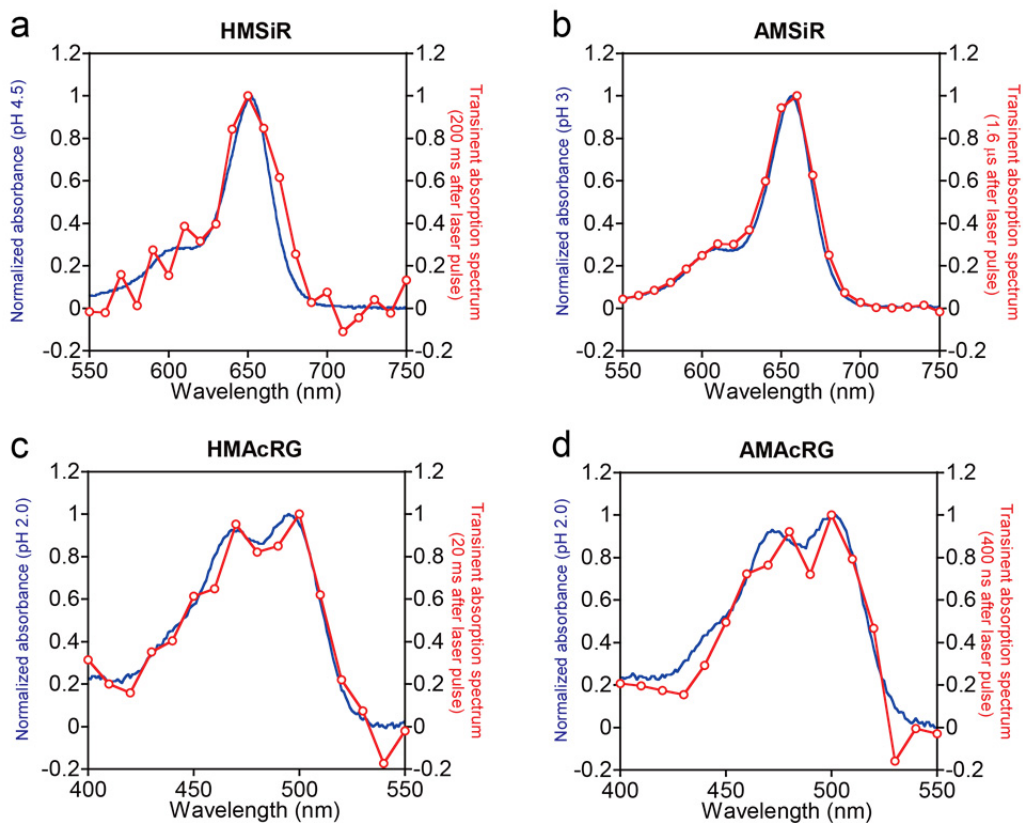


図 2-10. 過渡吸収スペクトルと定常状態における吸収スペクトル. (a) **HMSiR**, (b) **AMSiR**, (c) **HMAcRG**, (d) **AMAcRG** の過渡吸収スペクトルはレーザーパルスを照射してからそれぞれ 200 ms, 1.6  $\mu$ s, 20 ns, 400 ns 後に得た. 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4, 3% DMSO) 中で測定. 吸収スペクトルは開環体で存在する pH, (a) **HMSiR** (pH 4.5), (b) **AMSiR** (pH 3.0), (c) **HMAcRG** (pH 2.0), (d) **AMAcRG** (pH 2.0) で測定. それぞれ最大値で規格化.

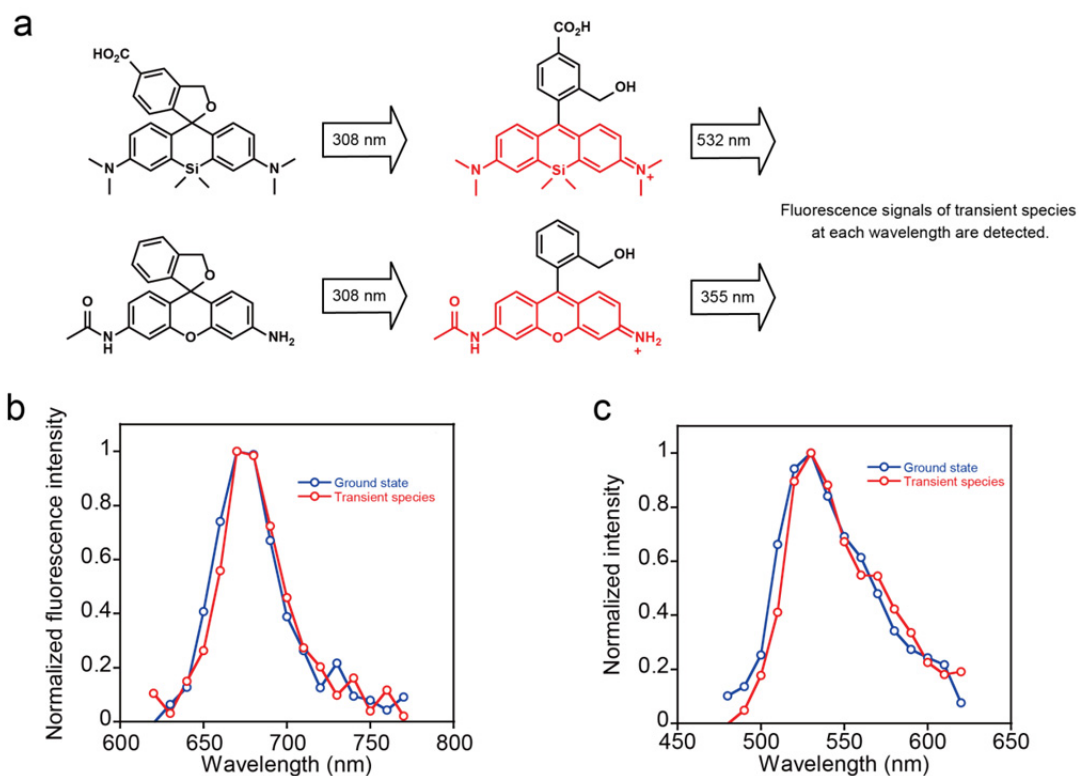


図 2-11. HMSiR と HMAcRG の過渡蛍光スペクトル. (a) 二段階励起を用いた過渡蛍光スペクトルの測定スキーム. 308 nm のレーザーパルス照射の 0.2  $\mu$ s 後, HMSiR を 532 nm, HMAcRG を 355 nm のレーザーパルスで励起し, 各波長の蛍光シグナルを測定した. 308 nm のレーザー照射なしの測定値を差し引き, 過渡蛍光スペクトルとした. (b-c) (b) HMSiR, (c) HMAcRG の定常状態における蛍光スペクトル (青) と過渡蛍光スペクトル (赤). 定常状態における蛍光スペクトル (青) は 308 nm のレーザーパルスを照射せずに測定した値. 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4)/MeOH = 9/1 の混合溶液 (数% DMSO) 中で測定. それぞれ最大値で規格化.

表 2-2. ローダミン誘導体の明滅特性

Compounds	$pK_{cycl}$	$\tau$ (s)
<b>HMSiR</b>	5.8	$2.45 \times 10^{-1}$
<b>HMAcRG</b>	5.3	$2.18 \times 10^{-2}$
<b>AMSiR</b>	4.7	$1.07 \times 10^{-5}$
<b>AMAcRG</b>	3.7	$3.09 \times 10^{-6}$
<b>MMSiR</b>	< 2	$< 5.00 \times 10^{-8}$
<b>HySOx</b>	< 2	$< 5.00 \times 10^{-8}$

## 第二項 開環体の持続時間の環境依存性

SLM において標的タンパク質を観察するためには、蛍光色素で特異的にラベル化する必要がある。蛍光タンパク質を用いる場合には、遺伝子操作によって共発現させることでラベル化が可能であるが、有機小分子を用いる場合には別の方法が必要である。固定細胞においては予め蛍光色素でラベル化した二次抗体による染色がよく用いられるが、生細胞では使用できない。そのため、生細胞においては蛍光色素の局在性<sup>112</sup>、SNAP tag<sup>113</sup>や Halo tag<sup>114</sup>に代表されるタグタンパク質<sup>115, 116</sup>、クリックケミストリーやリガンドの結合を利用したタンパク質への特異的ラベル化法<sup>117</sup>の利用が必要である。これまでに、蛍光色素の局在性を利用して DNA<sup>118</sup>、細胞膜<sup>119</sup>、ミトコンドリア<sup>91, 119</sup>、ライソソーム<sup>119</sup>、小胞体<sup>91, 119</sup>、ゴルジ体<sup>91</sup>の SLM が報告されている。また、タグタンパク質を利用した SLM<sup>86-88</sup> やクリックケミストリーを利用した SLM<sup>120, 121</sup> も報告されている。

**HMSiR**を用いる場合も抗体やタグタンパク質を用いて標的タンパク質を特異的にラベル化する必要がある。これまで水溶液中において  $pK_{cycl}$  や  $\tau$  を評価してきたが、タンパク質と結合時に分子をとりまく微小環境の影響によってこれらの特性が変化する可能性がある。そこで、水溶液中とタンパク質表面の微小環境の違いによる分子内スピロ環化平衡への影響を検討することにした。はじめに IgG 抗体にラベル化した **HMSiR (HMSiR-IgG)** の吸収/蛍光スペクトルを測定し、 $pK_{cycl}$  を算出した結果、ラベル化していない **HMSiR** と同等であることが確認できた ( $pK_{cycl} = 5.8$ ) (図 2-12)。また、**HMSiR-IgG** 及び精製した SNAP tag に *in vitro* で結合した **HMSiR-SNAP** の  $\tau$  を LFP で測定した結果、未結合の **HMSiR** に比べて閉環速度が僅かに速くなっていることがわかった (図 2-13)。メタノール濃度を増加させた場合に閉環速度が速くなったことから (図 2-14)、疎水的な環境において閉環反応が加速されることが示唆される。このことから、タンパク質表面も水溶液中に比べてやや疎水的な環境であるため、閉環反応が僅かに加速されたものと考えられる。しかしながら、タンパク質にラベル化した場合においても  $\tau$  は数 10~数 100 ms であり、SLM に利用するには問題のない範囲である。

また、分子内スピロ環化平衡は酸塩基平衡であるため、閉環速度は pH の影響を受けると考えられる。そこで pH の影響を評価するため pH を変化させて LFP を行った。その結果、pH の増加に伴い閉環反応は加速され、 $\tau$  が短くなることが示された (図 2-15)。しかしながら、pH 6~8 の範囲において  $\tau$  は数 100 ms 程度に維持されており、**HMSiR** は中性~弱塩基性の細胞内小器官である細胞質、核、ミトコンドリア等で SLM プロブとして機能することが示唆された。一方で酸性側のリソソーム等では、 $\tau$  は十分に長いものの開環体の存在比率が高くなってしまうため (図 2-6)、別途  $pK_{cycl}$  が低い蛍光色素を選択し直す必要があると考えられる。

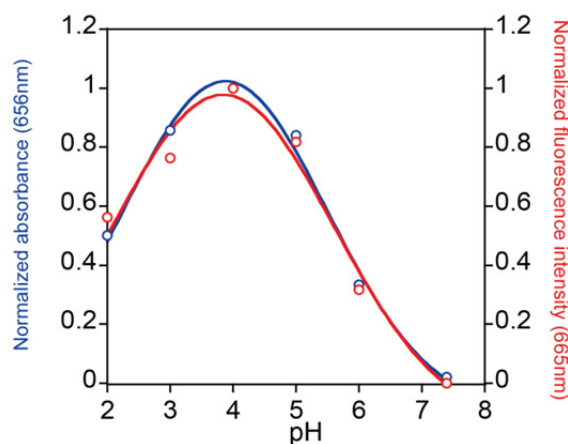


図 2-12. タンパク質へのラベル化の分子内スピロ環化平衡への影響。抗体 (Erbtux) にラベル化した **HMSiR** の各 pH における吸光度 (青) と蛍光強度 (赤)。それぞれ最大値で規格化。中性付近の  $pK_{cycl}$  は 5.8 であり、未結合時の **HMSiR** とほぼ変わらなかった。

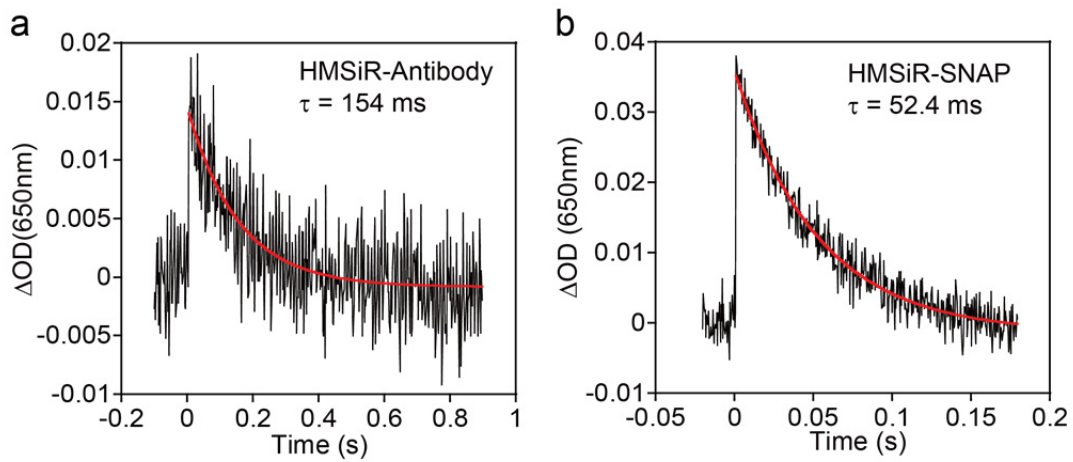


図 2-13. タンパク質にラベル化した HMSiR の過渡吸収の減衰曲線. HMSiR を (a) 抗体 (Erbix) 又は (b) SNAP-tag に結合し, PBS (pH 7.4) 中で測定. 開環体の持続時間は, 未結合時 (245 ms) に比べると僅かに短くなった.

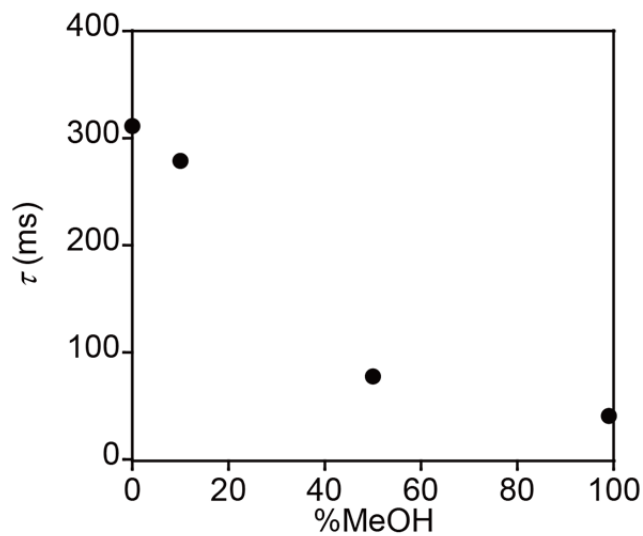


図 2-14. HMSiR の開環体の持続時間のメタノール濃度依存性. メタノール濃度を変化させた 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で測定. メタノール濃度の増加に伴い開環体の持続時間は短くなった.

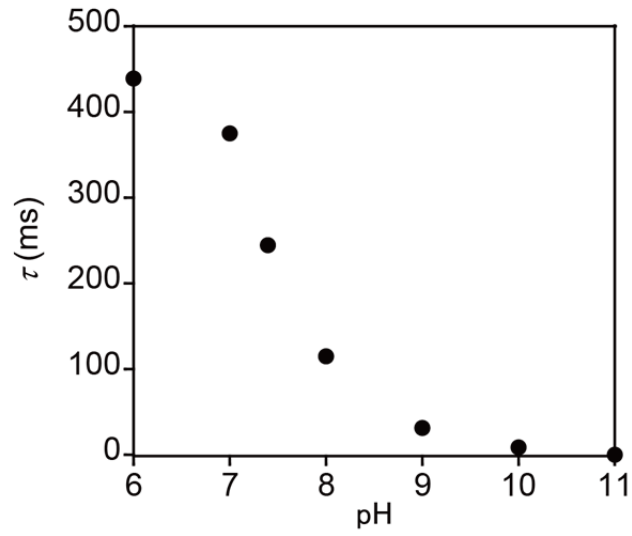


図 2-15. HMSiR の開環体の持続時間の pH 依存性. 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4, 3% DMSO) 中で測定. pH の増加に伴い開環体の持続時間は短くなった.



## 第三章

### 一分子イメージングによる蛍光特性の評価

## 第一節 明滅特性の評価

**HMSiR** の蛍光特性及び明滅特性を一分子イメージングにより評価し、超解像イメージング法への有用性を検証した。コントロールとして、分子内求核基を持たないため分子内スピロ環化平衡を示さない **2MeSiR** と dSTORM で最もよく使われている蛍光色素の一つである Alexa647 の評価も行った。それぞれの蛍光色素のスクシンイミドエステル体を用いて色素/抗体が 1 以下になるように抗体にラベル化した (**HMSiR-IgG**, **2MeSiR-IgG**, Alexa647-IgG)。ラベル化した抗体をカバーガラスに吸着し、全反射顕微鏡 (Total-internal-reflection fluorescent microscopy, TIRFM) によって観察した (図 3-1)。測定は従来の dSTORM で必要なチオール等の添加や脱酸素処理を行わず、リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で行った。また、無蛍光状態に変換するための事前のレーザー照射を行わず、励起強度を dSTORM の 10 分の 1 程度である  $40\text{-}100\text{ W cm}^{-2}$  とした。

各蛍光分子をほぼ同数程度カバーガラスに吸着した所、Alexa647-IgG や **2MeSiR-IgG** とは異なり、**HMSiR-IgG** ではある時間において僅かな分子のみ蛍光を発していることが観測された。これは、**HMSiR-IgG** の大部分が無蛍光の閉環体構造で存在するためと考えられる。150 s の測定の結果、Alexa647-IgG や **2MeSiR-IgG** はチオール非存在下、酸素存在下では、殆ど明滅せず数 s から数 10 s 以内に速やかに褪色した。それに対して、**HMSiR-IgG** は分子内スピロ環化

平衡によって、可逆的かつ自発的に明滅する様子が観測された。閉環体が全く吸収・蛍光を示さないために SLM で正確な位置決定をするのに重要な高い ON/OFF コントラストが達成できている。一分子イメージングにおける HMSiR の閉環体の持続時間 (Fluorescence-on time) の分布は図 3-2a に示すようになり、平均で約 100 ms であったことから、LFP で測定した  $\tau$  とほぼ一致しており、SLM に適していると考えられる。また、HMSiR の明滅特性は基底状態における平衡反応に基づくため、閉環体の持続時間はレーザー強度には依存しないと想定される。実際にレーザー強度が低い場合 ( $< 500 \text{ W cm}^{-2}$ ) には、ほぼ一定の閉環体の持続時間を示すことが確認できた。しかしながら、極度に強いレーザー強度 ( $> 1 \text{ kW cm}^{-2}$ ) においては、閉環体の持続時間は短くなる傾向が見られた (図 3-2b)。これは dSTORM 等と同様に色素が三重項状態やラジカルアニオン等の無蛍光状態に変換されてしまったためであると考えられる。1 回の明滅においてレーザー強度に応じて最大約 2,600 フォトンを出しており (図 3-2c)、Alexa647 の STORM バッファー中における 3,500 フォトン<sup>122</sup> より僅かに少ない程度であった。また、明滅の回数はレーザー強度に依るが、450 s で 20-100 回程度であり、SLM の繰り返し測定が可能であることが示唆された (図 3-2d)。

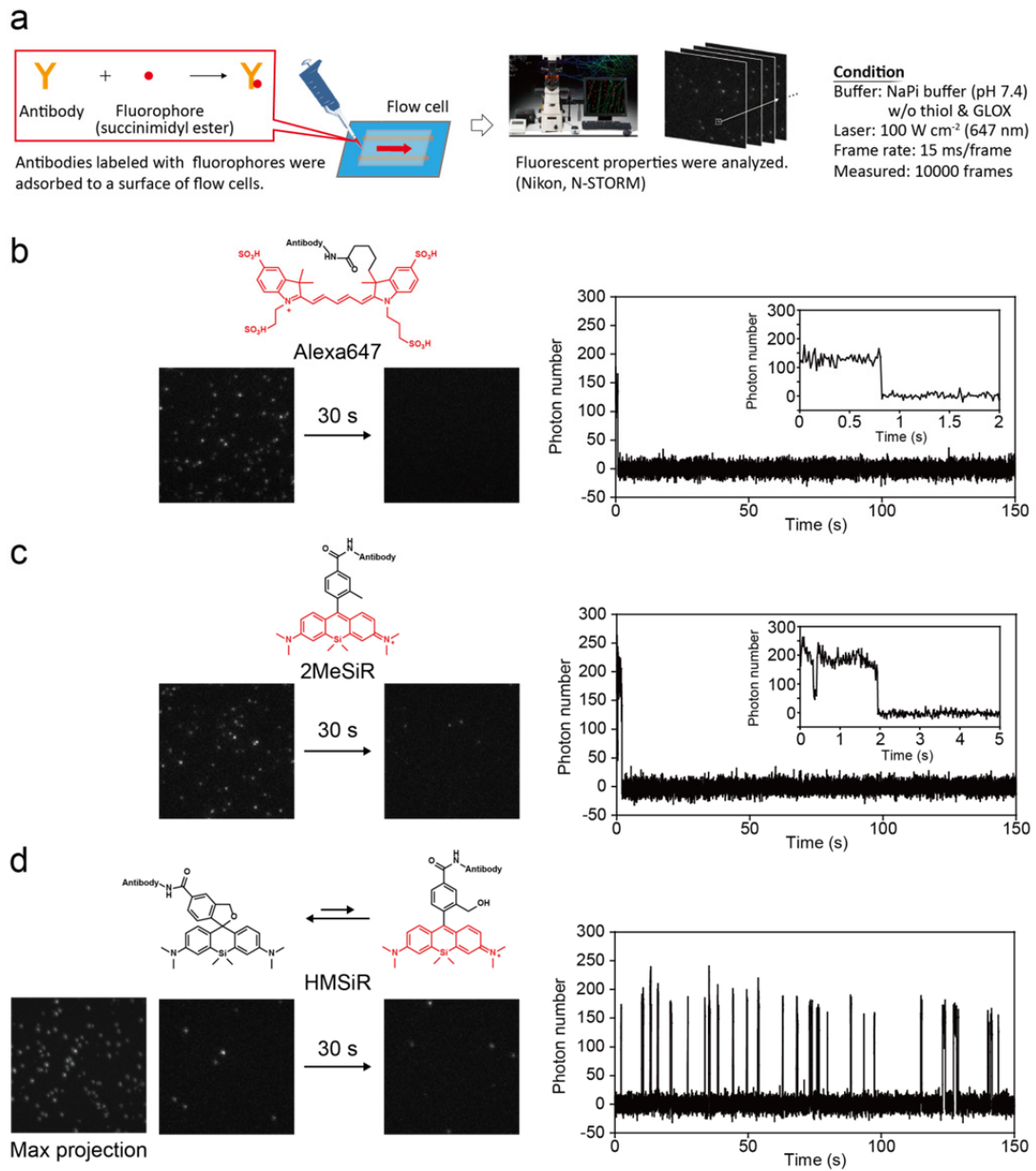


図 3-1. 抗体にラベル化した蛍光色素の明滅特性の評価. (a) 一分子イメージングによる明滅特性の評価法. (b-d) 一分子の蛍光強度変化. 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で測定. 励起光条件: 647 nm (100 W cm<sup>-2</sup>). チオール及び脱酸素酵素システム (GLOX) 非存在下において, Alexa647 及び 2MeSiR は数 10 s 以内に不可逆的に褪色した. それに対して HMSiR は熱的な分子内スピロ環化平衡に基づき, 可逆的な明滅を示した.

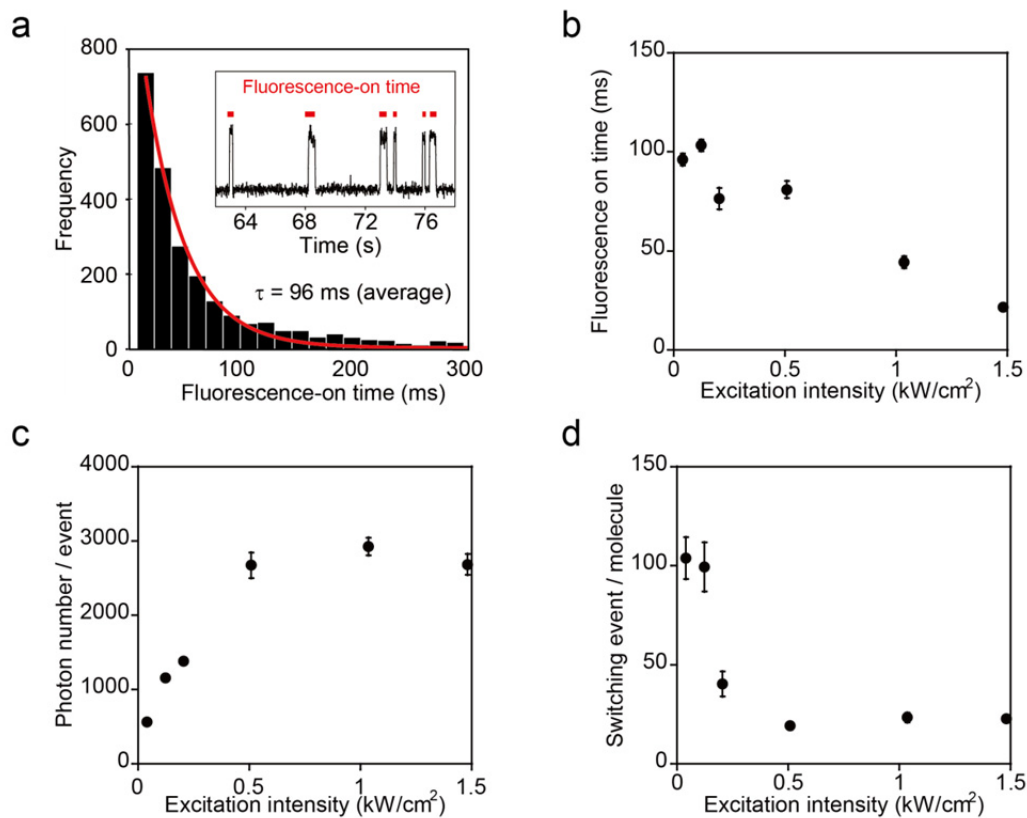


図 3-2. HMSiR の明滅特性. (a) 抗体にラベル化した HMSiR の開環体の持続時間の分布. 励起光条件:  $647 \text{ nm}$  ( $40 \text{ W cm}^{-2}$ ). (b) HMSiR の開環体の持続時間と励起光強度の関係性. Mean  $\pm$  s.e. (N = 100-5000). (c) 励起光強度と明滅当たりのフォトン数の関係性. Mean  $\pm$  s.e. (N = 100-5000). (d) 励起光強度と明滅回数との関係性. 測定時間:  $450 \text{ s}$  (30,000 frame). Mean  $\pm$  s.e. (N = 48). すべて  $10 \text{ mM}$  リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で測定.

## 第二節 位置決定精度の評価

SLM において分子の位置決定精度は、ラベル化密度と並び空間分解能を決定する要因である。そこで、**HMSiR** でラベル化した抗体をカバーガラスに吸着し、その位置決定精度を測定した。はじめに通常の dSTORM と同程度の  $1.5 \text{ kW cm}^{-2}$  ( $15 \text{ ms/frame}$ ) のレーザー強度で測定し、500 フォトン以上検出できたシグナルに関して繰り返し位置を決定した。分子の位置の分布をプロットし、二次元ガウス関数でフィティングすると、その分布の半値幅 (Full width at half maximum, FWHM) は  $22 \text{ nm}$  であった (図 3-3b)。以降、この FWHM を各条件における分子の位置決定精度とする。この値は検出フォトン数から予測される理論値とほぼ同程度の精度であった<sup>123</sup>。また、同照射条件における STORM バッファー中の Alexa647 の位置決定精度は、同様に 500 フォトン以上のシグナルを解析した結果、FWHM =  $18 \text{ nm}$  であった (図 3-3a)。**HMSiR** は Alexa647 に比べると明滅あたりのフォトン数が僅かに少ないため、少し位置決定精度が低下するものの、超解像イメージング法として用いるには十分な精度であると言える。レーザー強度を  $500 \text{ W cm}^{-2}$  に下げた場合には、位置決定精度は FWHM =  $21 \text{ nm}$  と  $1.5 \text{ kW cm}^{-2}$  での精度と殆ど変わらなかった。これは  $500 \text{ W cm}^{-2}$  以上において明滅あたりのフォトン数が約 2,600 で一定となることと一致していると考えられる (図 3-2c)。

これまで超解像イメージング法の開発では、空間分解能の高さが最優先事項であり、検出光子数を出来るだけ多くするためレーザー出力を最大にして測定することが多かった。しかし、光毒性の影響が無視できない生細胞イメージングでは、目的の空間分解能を達成しつつ、できるだけレーザー強度を弱めることが望ましい。しかし、一般的な蛍光色素を用いる dSTORM においては、明滅特性や蛍光/無蛍光状態の存在比もレーザー強度に依存するため、レーザーを弱めることが困難である。それに対して、**HMSiR** は基底状態における熱的な平衡状態に基づく明滅特性を有しているため、弱いレーザー強度での SLM が可能であると考えられる。ただし、レーザー強度の低下により、検出光子数が少なくなるため、位置決定精度の低下は避けられない。実際にレーザー強度を変化させて位置決定精度を評価した結果、 $100 \text{ W cm}^{-2}$  (15 ms/frame) では FWHM = 29 nm であり、 $40 \text{ W cm}^{-2}$  (30 ms/frame) では FWHM = 47 nm であった。このように、dSTORM に比べてレーザー強度を大きく下げた場合においても通常の蛍光イメージング法に比べると極めて高い空間分解能を得ることが示された。従って **HMSiR** を用いた SLM はレーザー強度の影響を受けやすい実験系において、通常の蛍光イメージングに比べて高い空間分解能で観察する手法として有用であると考えられる。

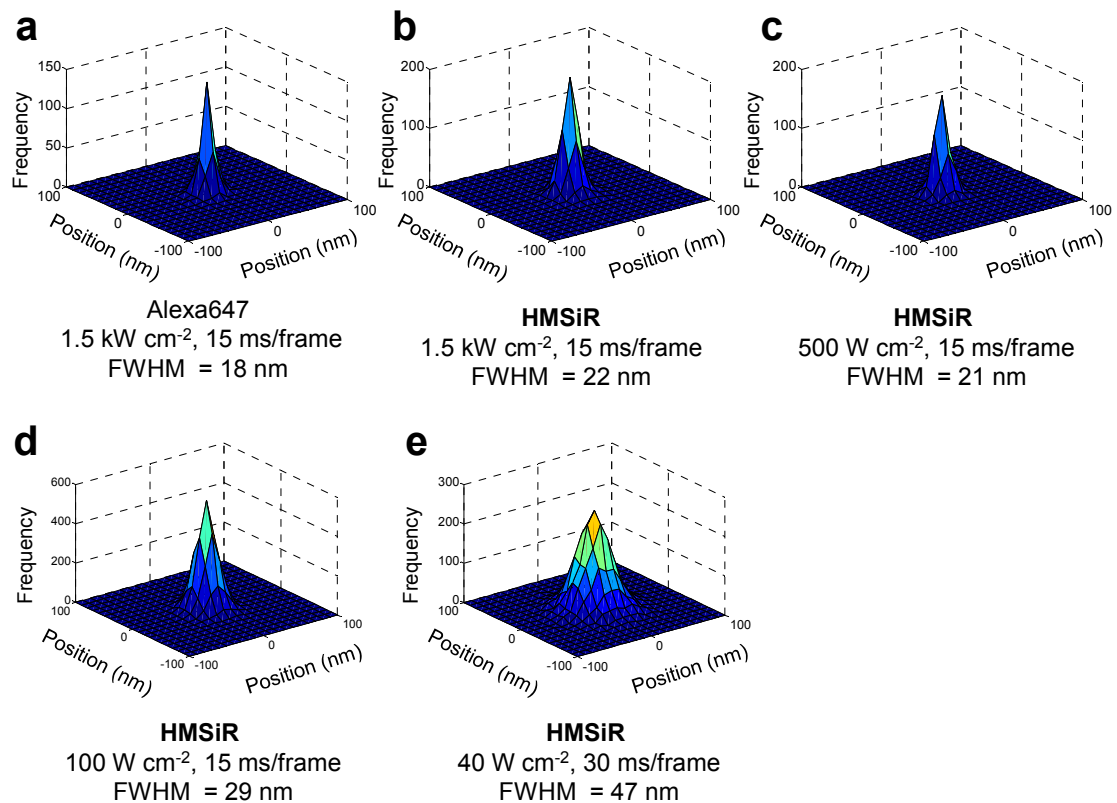


図 3-3. 分子の位置決定精度の評価. (a) Alexa647-IgG は STORM バッファー (β-ME と GLOX を含む) 中で測定. (b-e) HMSiR-IgG は 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で測定. それぞれ 60 分子に対して繰り返し決定した位置座標を重ねてプロットした. 二次元ガウス関数でフィッティングし, 半値幅 (FWHM) の値で評価した. カットオフ値として 500 フォトン (a-c), 150 フォトン (d), 100 フォトン (e) を使用. 励起光: 647 nm. 測定条件: 15 ms/frame (a-d) 又は 30 ms/frame (e).



## 第四章

### 超解像イメージングへの応用

## 第一節 *In vitro* で再構築した微細構造の超解像イメージング

### 第一項 RecA フィラメントの超解像イメージング

はじめに **HMSiR** を用いて *in vitro* の系における超解像イメージングを行った。観測対象として直径約 500 nm の環状 DNA 上に重合した RecA フィラメントを選択した。通常の蛍光イメージングでは環状構造が潰れてしまうのに対して、SLM では環状構造が確認できることを期待した。まず、DNA 結合タンパク質である RecA を **HMSiR** のスクシンイミドエステル体 (**HMSiR-SE**) によってラベル化した (**HMSiR**/RecA = 1.6)。次に、 $\Phi$ X174 RFII DNA (5,386 bp, 直径約 500 nm の環状 DNA) と混合し、重合バッファー中で反応させることで DNA 上に RecA フィラメントを形成した。得られた RecA フィラメントをカバーガラスに吸着し、チオールを加えていない Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 中で  $500 \text{ W cm}^{-2}$  のレーザー強度で測定した。その結果、**HMSiR** が自発的な明滅を示すことが確認できた。5,000 frame 測定した画像を解析し、SLM 画像を再構築したところ、通常の蛍光画像に相当する 5,000 frame の平均化画像に比べて、SLM 画像では RecA フィラメントの環状構造が高い分解能で観察できた (図 4-1a-c)。RecA フィラメントの幅は  $\text{FWHM} = 51.4 \pm 3.2 \text{ nm}$  (mean  $\pm$  s.e., N=10) であった。従来の dSTORM と比較するため、Alexa647 で RecA をラベル化し、チオールとして MEA、脱酸

素酵素システムとして Glucose oxidase with catalase (GLOX) を加えた STORM バッファー中で dSTORM を行なった。再構築した SLM 画像において, RecA フィラメントの幅は  $FWHM = 47.2 \pm 2.0 \text{ nm}$  (mean  $\pm$  s.e.,  $N = 5$ ) であった (図4-1d-f)。

このように, 比較的強いレーザー強度を用いると, **HMSiR** は Alexa647 と同程度の超解像画像が添加物等を加えない簡便な操作で取得できることが示された。

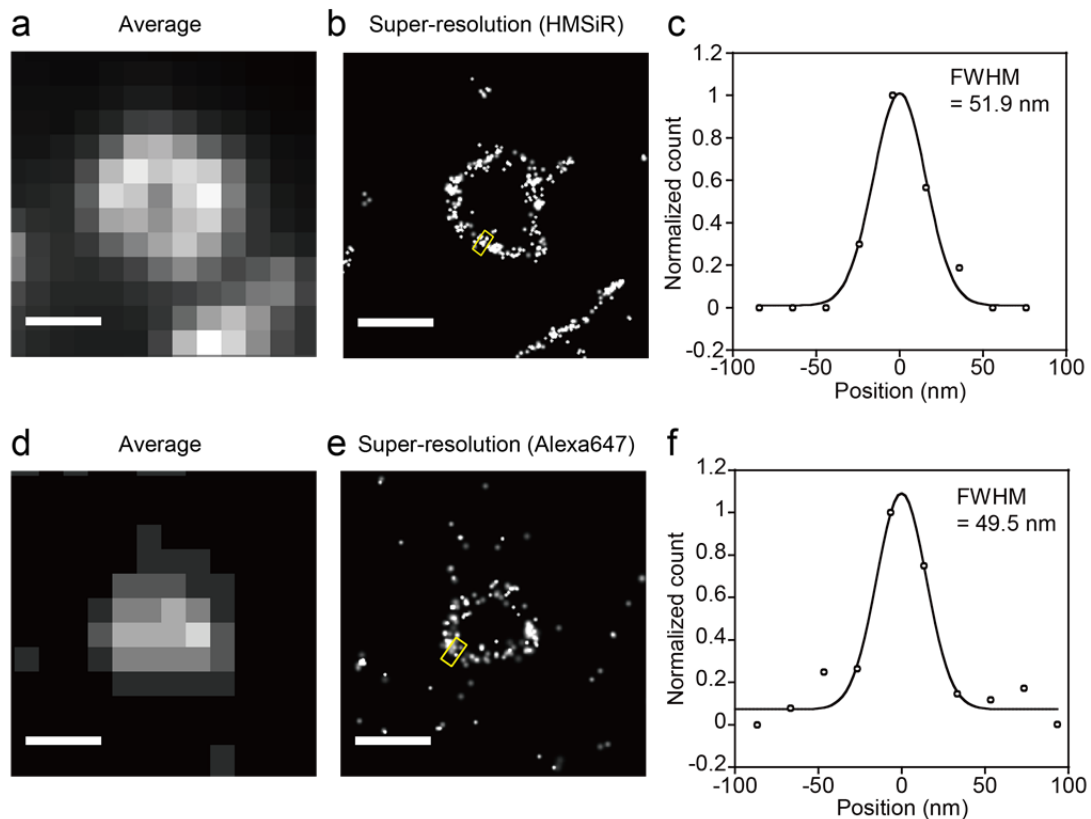


図 4-1.  $\Phi$ X174 RFII DNA 上に重合した RecA フィラメントの *in vitro* SLM. (a-b) HMSiR を用いた (a) 平均化画像と (b) SLM 画像. FWHM =  $51.4 \pm 3.2$  nm (SLM 画像, mean  $\pm$  s.e., N = 10). 励起光条件: 647 nm ( $500 \text{ W cm}^{-2}$ ). 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4), 100 mM NaCl, 7 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1.5 mM ATP- $\gamma$ -S 中で測定. (c) b における黄で示した領域の輝点数の分布. (d-e) Alexa647 を用いた (d) 平均化画像と (e) SLM 画像. (f) e における黄で示した領域の輝点数の分布. FWHM =  $47.2 \pm 2.0$  nm (SLM 画像, mean  $\pm$  s.e., N = 5). 励起光条件: 647 nm ( $500 \text{ W cm}^{-2}$ ). STORM バッファー (MEA と GLOX を含む) 中で測定. スケールバー: 500 nm.

## 第二項 微小管の超解像イメージング

続いて、**HMSiR** のレーザー強度に依らない明滅特性を利用して、dSTORM では困難である弱いレーザー強度での SLM を試みた。観測対象として *in vitro* で再構築した微小管を選択した。ブタの脳から精製した tubulin を **HMSiR-SE** 及びコントロールである **TAMRA-SE** でラベル化した。ラベル化 tubulin と非ラベル化 tubulin (**HMSiR-tubulin**/**TAMRA-tubulin**/tubulin = 40/50/10 (v/v)) を混合してインキュベートすることで重合し、微小管を形成した。ラベル化された微小管を poly-L-lysine (PLL) でコートしたカバーガラスに吸着し、PBS (pH 7.4) 中で dSTORM の 10 分の 1 以下のレーザー強度である  $20 \text{ W cm}^{-2}$  で SLM を行った。この条件においてもレーザー照射直後から **HMSiR** の明滅が確認でき、取得した 20,000 frame の画像から SLM 画像を構築した。TAMRA で観察した通常の蛍光画像に比べて、SLM 画像では微小管の構造が明確に観察できた (図 4-2)。このように、**HMSiR** の分子内スピロ環化平衡に基づく明滅特性を利用することで、弱いレーザー照射による SLM が可能であることが示された。SLM において空間分解能とレーザー強度 (検出フォトン数) はトレードオフの関係にある。従って、**HMSiR** を用いた SLM では各々の実験に要求される条件、例えば空間分解能、測定時間、光毒性といった条件によって、レーザー強度を設定できると考えられる。

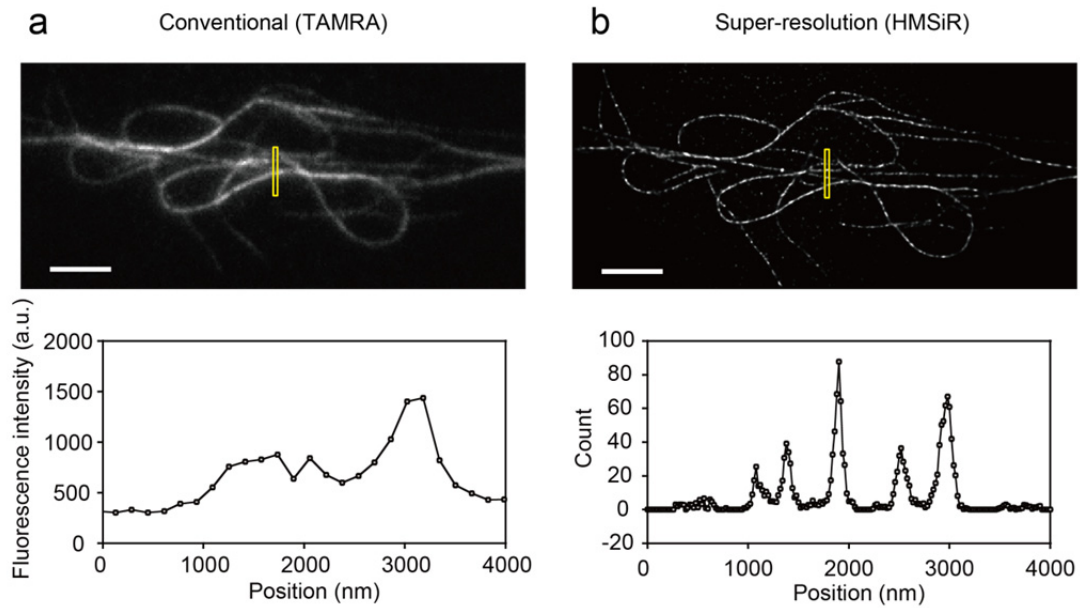


図 4-2. 低レーザー強度を用いた微小管の *in vitro* SLM. *In vitro* で TAMRA 又は HMSiR でラベル化したチューブリンを混合し、重合した. TAMRA で測定した通常の蛍光画像 (a) と HMSiR で測定した SLM 画像 (b). 励起光条件:(b) 647 nm ( $20 \text{ W cm}^{-2}$ ). PBS (pH 7.4) 中で測定. 黄で示した領域の蛍光強度又は輝点数の分布を下に示す. スケールバー:  $5 \mu\text{m}$ .

## 第二節 細胞深部に位置する微細構造の超解像イメージング

### 第一項 スピニングディスク共焦点レーザー顕微鏡による SLM

蛍光分子の位置を正確に決定するには、高い signal-to-noise ratio (SNR) が必要である。そのため、SLM では TIRFM や薄層斜光照明法 (Highly inclined and laminated optical sheet (HILO) microscopy<sup>124</sup>) を用いて測定することが多い。しかしながら、これらの照明系ではカバーガラス直下にある細胞膜近傍の構造しか測定することはできない。それに対して、共焦点レーザー顕微鏡はカバーガラスから離れた構造を断層的に観察することが可能であるが、走査型顕微鏡であるため撮像速度が遅く SLM には利用できない。一方、スピニングディスク共焦点レーザー顕微鏡 (Spinning-disk confocal microscope) はレーザーを多数のピンホールが並ぶアレイディスクを通して分散して照射し、多数の蛍光シグナルを CCD カメラで同時に検出するため、高い時間分解能で観察することができる<sup>125</sup>。また、共焦点レーザー顕微鏡と同じく断層的に撮影することが可能であるため、細胞深部においても高い SNR で撮影することができる。ただし、レーザーを分散させて照射するためそれぞれのレーザー強度が低くなってしまい、蛍光色素を三重項等の無蛍光状態に変換できないため、一般的な蛍光色素を用いた dSTORM/GSDIM を行うことはできなかった。一方で、HMSiR は一般的な蛍

光色素とは異なり，強いレーザー照射で無蛍光状態に変換する必要がなく自発的に明滅するため，スピニングディスク共焦点レーザー顕微鏡を用いることが可能であると考えた．そこで，ガラス面から離れた位置にある構造として，核上部に位置する核膜孔 (Nuclear pore complex, NPC) を選択し SLM を試みた．

## 第二項 核膜孔の超解像イメージング

NPC は核と細胞質間の物質輸送を司り，数 100 のタンパク質から構成される巨大なタンパク質複合体である．半径約 60 nm の環状構造であり，8 回対称の位置にサブユニットが位置する．NPC の構造の大きさやタンパク質の複雑な組成のため，詳細な構造を解析するのはこれまで困難であった．また，通常の蛍光イメージングでは観測できない回折限界以下の環状構造であることから超解像イメージングの良いターゲットとされてきた．例えば，細胞から取り出し，精製した核をガラス面に吸着し，TIRFM を用いた dSTORM によって NPC の構造が観察されている<sup>126</sup>．また，細胞内の核の下部に位置する NPC の測定も報告されているが<sup>127</sup>，細胞深部に位置する核上部にある NPC の SLM を報告した例はなかった．



NPC を構成するタンパク質である POM121 と Nup107 の GFP 融合タンパク質である POM121-GFP 及び Nup107-GFP を安定発現させた HeLa 細胞を用いた。細胞を固定化し、抗 GFP 一次抗体と **HMSiR** でラベル化した二次抗体を用いて染色した。スピニングディスク共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した結果、ガラス面から数  $\mu\text{m}$  離れた核上部の位置においても **HMSiR** の明滅が確認できた。SLM で画像を構築した結果、それぞれのタンパク質で 8 回対称の環状構造の一部が観測できた (図 4-3)。完全な 8 回対称構造になっていない原因として、(1) NPC を構成する POM121 及び Nup107 のコピー数がそれぞれ 8, 32 と少ないこと<sup>128</sup>、(2) GFP を持たない内在性のタンパク質が混在していること、(3) 抗体染色で全てのタンパク質が染色することが困難であることが考えられる。これらの環状構造の半径を算出すると POM121 では  $48.5 \pm 1.4 \text{ nm}$  (mean  $\pm$  s.e., N = 100) であり、Nup107 では  $38.6 \pm 1.2 \text{ nm}$  (mean  $\pm$  s.e., N = 100) であった。これらの半径の違いは POM121 が NPC の外側に位置し、Nup107 が内側に位置するというこれまでに報告されている知見と一致している<sup>129</sup>。また、POM121 の位置情報に関して隣接点の中心角を解析すると  $48.6 \pm 3.2^\circ$  (mean  $\pm$  s.e., N = 74) であり、8 回対称構造 ( $45^\circ$ ) であることが示唆された。このように **HMSiR** とスピニングディスク共焦点レーザー顕微鏡を併せて用いることによって細胞深部に位置する構造の SLM が達成できることが示された。

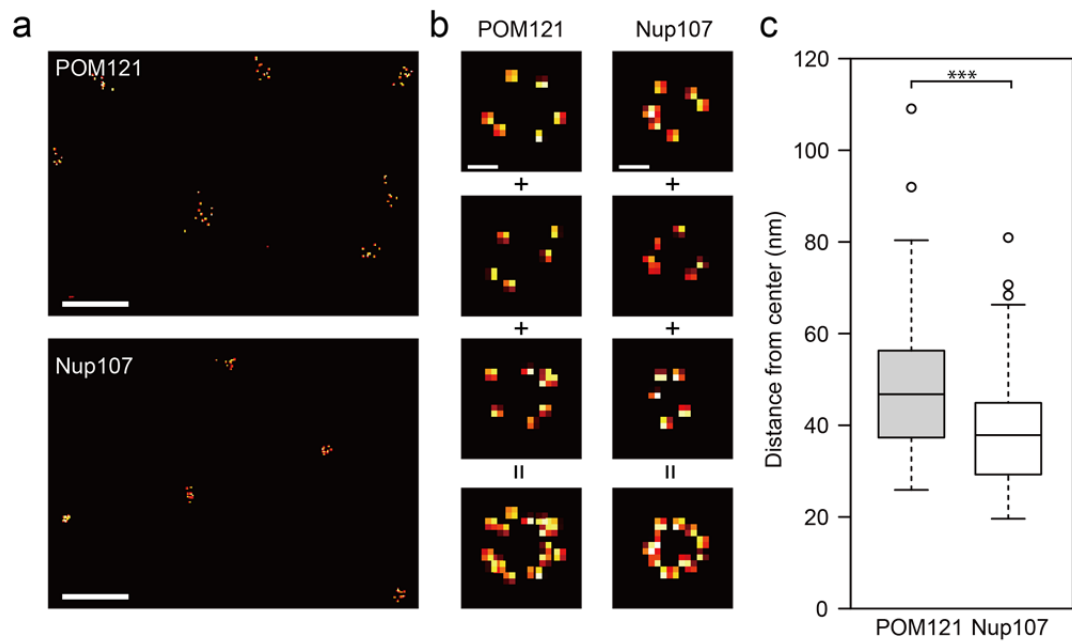


図 4-3. スピニングディスク共焦点レーザー顕微鏡を用いた SLM. 核膜孔 (NPC) を構成する POM121-GFP 又は Nup107-GFP を安定発現した HeLa 細胞を固定化後, HMSiR-IgG を用いてラベル化. PBS (pH 7.4) 中で測定. (a) 核の下部に位置する NPC の SLM 画像 (b) 核の上部 (ガラス面から約 4  $\mu\text{m}$  離れた位置) に位置する NPC の SLM 画像. (c) 核膜孔タンパク質の中心からの距離. POM121:  $48.5 \pm 1.4$  nm (mean  $\pm$  s.e., N = 100), Nup107:  $38.6 \pm 1.2$  nm (mean  $\pm$  s.e., N = 100). \*\*\*  $p < 0.001$  (Welch's t-test). スケールバー: (a) 500 nm, (b) 50 nm.

### 第三節 生細胞タイムラプス超解像イメージング

#### 第一項 生細胞 SLM

**HMSiR** を用いて生細胞中の微細構造の SLM を試みた。標的タンパク質として  $\beta$ -tubulin を選択し、タンパク質を特異的にラベル化するために、タグタンパク質である SNAP tag 及び Halo tag とそれらの基質である **HMSiR** 誘導体 (**HMSiR-BG** 及び **HMSiR-Halo**) を利用することにした。具体的には、 $\beta$ -tubulin を SNAP tag あるいは Halo tag の融合タンパク質として HeLa 細胞や Vero 細胞に一過的に発現させ、**HMSiR-BG** 及び **HMSiR-Halo** で染色した。基質濃度を 100 nM 程度に抑えて終夜染色することで非特異的な集積を防ぐことができた。その結果、いずれの基質を用いた場合においても微小管を特異的にラベル化することができた。この結果は **HMSiR** の基質誘導体が細胞膜を透過し、他の細胞内小器官に非特異的に集積することなく、細胞質内のタンパク質を特異的にラベル化することができることを示している。

はじめに  $\beta$ -tubulin-SNAP tag を **HMSiR** でラベル化した HeLa 細胞の SLM を行った。培地中において酸素存在下でチオールや酸素除去剤等の添加物を加えずに dSTORM と同程度の比較的強いレーザー強度 ( $500 \text{ W cm}^{-2}$ ) で測定した。その結果、生細胞内の環境においても **HMSiR** は照射直後から明滅を示し、SLM で

再構築した画像は平均化画像に比べて高い分解能であることが確認できた (図 4-4). しかしながら, 微小管の直径を評価した結果,  $98.7 \pm 6.7$  nm (mean  $\pm$  s.e., N = 8) であり, dSTORM/GSDIM を用いて固定細胞の微小管を観測した報告例<sup>88</sup>に比べて分解能が悪かった. これは生細胞を観察しているため, 測定時間中における微小管の動きや細胞質内を拡散している未重合の $\beta$ -tubulin によるバックグラウンドが原因であると考えた. そこで, 同様に **HMSiR** でラベル化した細胞を固定化し, PBS 中において同一の照射条件で測定した結果, 微小管の直径は  $52.4 \pm 2.3$  nm (mean  $\pm$  s.e., N = 19) となり, 報告例と同程度であることが示された (図 4-5). 微小管自体の直径 ( $\sim 25$  nm) に加え, SNAP tag 自体の大きさ (20 kDa, 数 nm) や位置決定精度 (21 nm) を考慮すると妥当な結果であると考えられる.

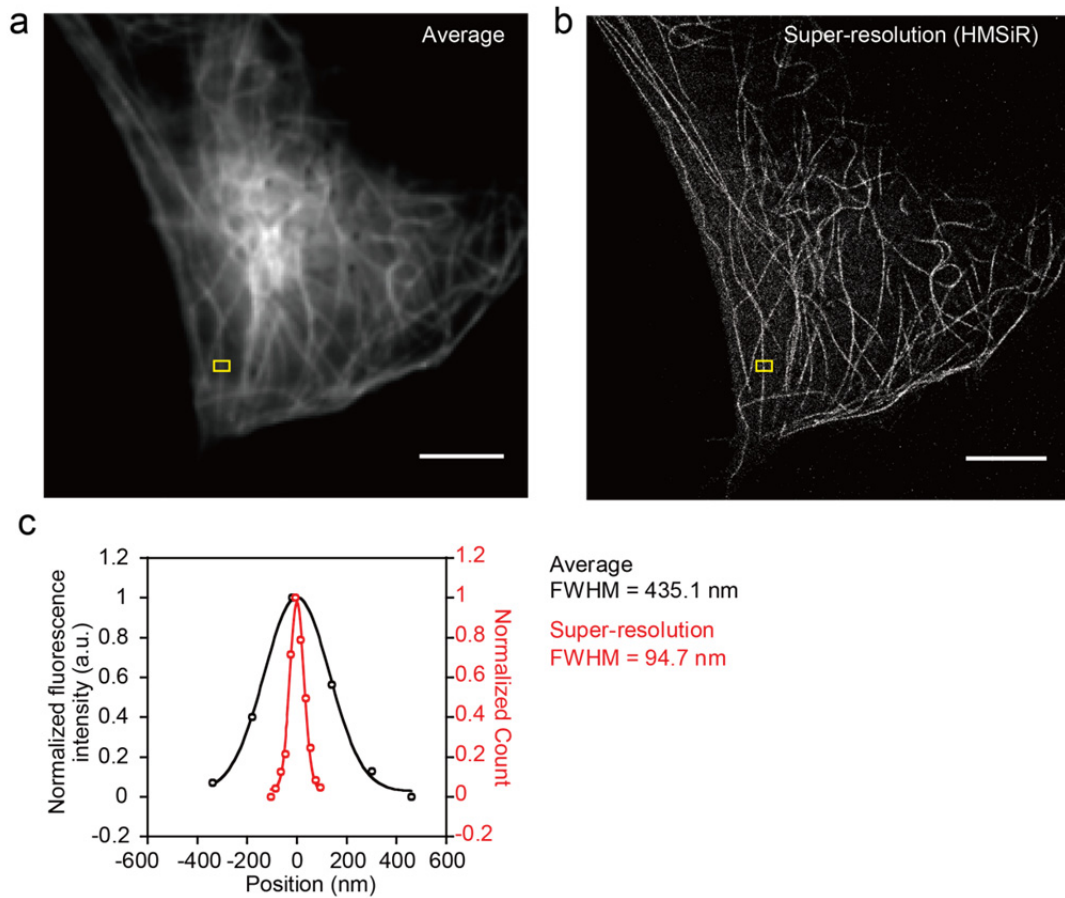


図 4-4. HMSiR を用いた  $\beta$ -Tubulin-SNAP の生細胞 SLM.  $\beta$ -Tubulin-SNAP を HeLa 細胞に発現させ, HMSiR-BG でラベル化. (a) 平均化画像と (b) SLM 画像. 励起光条件: 647 nm ( $500 \text{ W cm}^{-2}$ ). 洗浄後, 培地 (DMEM) 中で測定. (c) 黄で示した領域の蛍光強度又は輝点数の分布. FWHM =  $98.7 \pm 6.7 \text{ nm}$  (SLM 画像, mean  $\pm$  s.e., N = 8). スケールバー: 5  $\mu\text{m}$ .

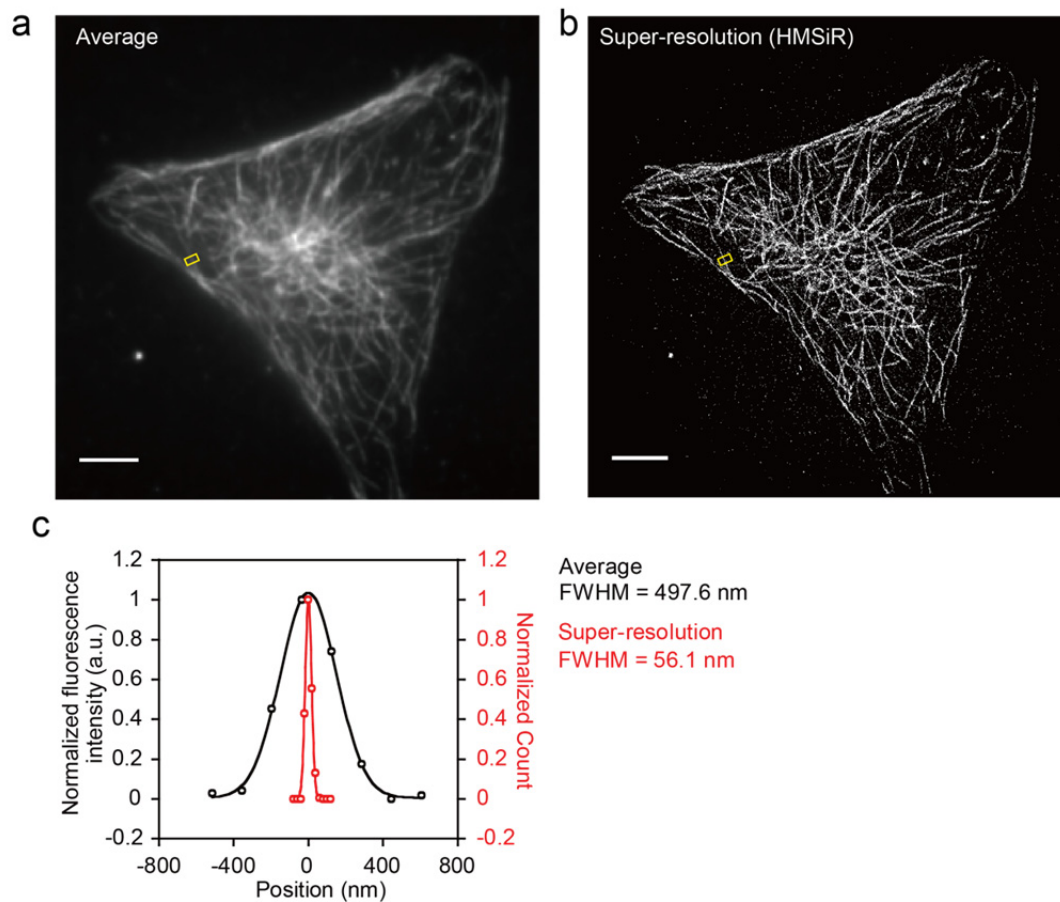


図 4-5. HMSiR を用いた  $\beta$ -Tubulin-SNAP の固定細胞における SLM.  $\beta$ -Tubulin-SNAP を HeLa 細胞に発現させ、HMSiR-BG でラベル化後、メタノールで固定化. (a) 平均化画像と (b) SLM 画像. 励起光条件: 647 nm ( $500 \text{ W cm}^{-2}$ ). PBS (pH 7.4) 中で測定. (c) 黄で示した領域の蛍光強度又は輝点数の分布.  $\text{FWHM} = 52.4 \pm 2.3 \text{ nm}$  (SLM 画像,  $\text{mean} \pm \text{s.e.}$ ,  $N = 19$ ). スケールバー:  $5 \mu\text{m}$ .

## 第二項 生細胞タイムラプス SLM

無蛍光状態に変換するためのレーザー照射が不要であり、弱いレーザー強度でも自発的に明滅するという **HMSiR** の特性は、レーザー強度を低減した SLM を可能とし、色素の褪色や光毒性を最低限に抑えることができると考えられる。そこで、この特性を利用して生細胞内の構造の動きをタイムラプス SLM によって追跡することが可能であると考えた。

$\beta$ -tubulin-Halo tag を発現した Vero 細胞を **HMSiR-Halo** でラベル化し、dSTORM の 10 分の 1 以下である  $40 \text{ W cm}^{-2}$  のレーザー強度で測定した。**HMSiR** はこの条件においても自発的に明滅し、最大 5 min の観察中において明確な光毒性は見られなかった。次にタイムラプス SLM を行った。30 ms/frame で 1,000 frame 測定 (合計 30 s) し、1 枚の SLM 画像を再構築した。この操作を 10 min のインターバルで合計 7 回行った。その結果、約 60 min にわたる微小管の動きを通常の蛍光イメージングに比べて高い空間分解能で測定することに成功した (図 4-6)。この条件では分子の位置決定精度は FWHM = 47 nm である (図 3-3)。

SLM は他の超解像イメージング法に比べると低い時間分解能が欠点であり、生細胞イメージングへの障害となっていた。そこで測定、解析条件を変更し、より高い時間分解能で細胞内の構造の動きを生細胞 SLM で観察することを試みた。40  $\text{W cm}^{-2}$  で 10,000 frame (30 ms/frame, 合計 5 min) 測定後、500 frame ずつ

オーバーラップした 1000 frame (frame 1-1,000; 501-1,500; 1,000-2,000 等) から SLM 画像を構築した。その結果, tubulin の重合/脱重合のダイナミクスを高い空間分解能を維持したまま, 15 s/reconstructed image という比較的高い時間分解能で観察することに成功した (図 4-7)。これらの結果は **HMSiR** でのラベル化やイメージングは微小管のダイナミクスを阻害することなく観察できることを示唆している。また, 高いレーザー強度や添加物を加えない細胞への影響を最低限に抑えた温和な条件下において **HMSiR** を用いた生細胞タイムラプス SLM が達成できることが示された。

**HMSiR** を用いた SLM は SIM に比べてやや低い時間分解能であるものの, 極めて高い空間分解能での測定が可能である。また, 一般的な蛍光色素を用いる SLM とは異なり生理的条件下においても測定可能であり, TIRFM や HILO 以外にもスピニングディスク共焦点レーザー顕微鏡などの光学系を用いることが可能である。このように, **HMSiR** を用いた SLM は既存の生細胞 SLM にはない利点を有することから, 今後生物学研究を行う際の有力な選択肢になり得ると期待される。



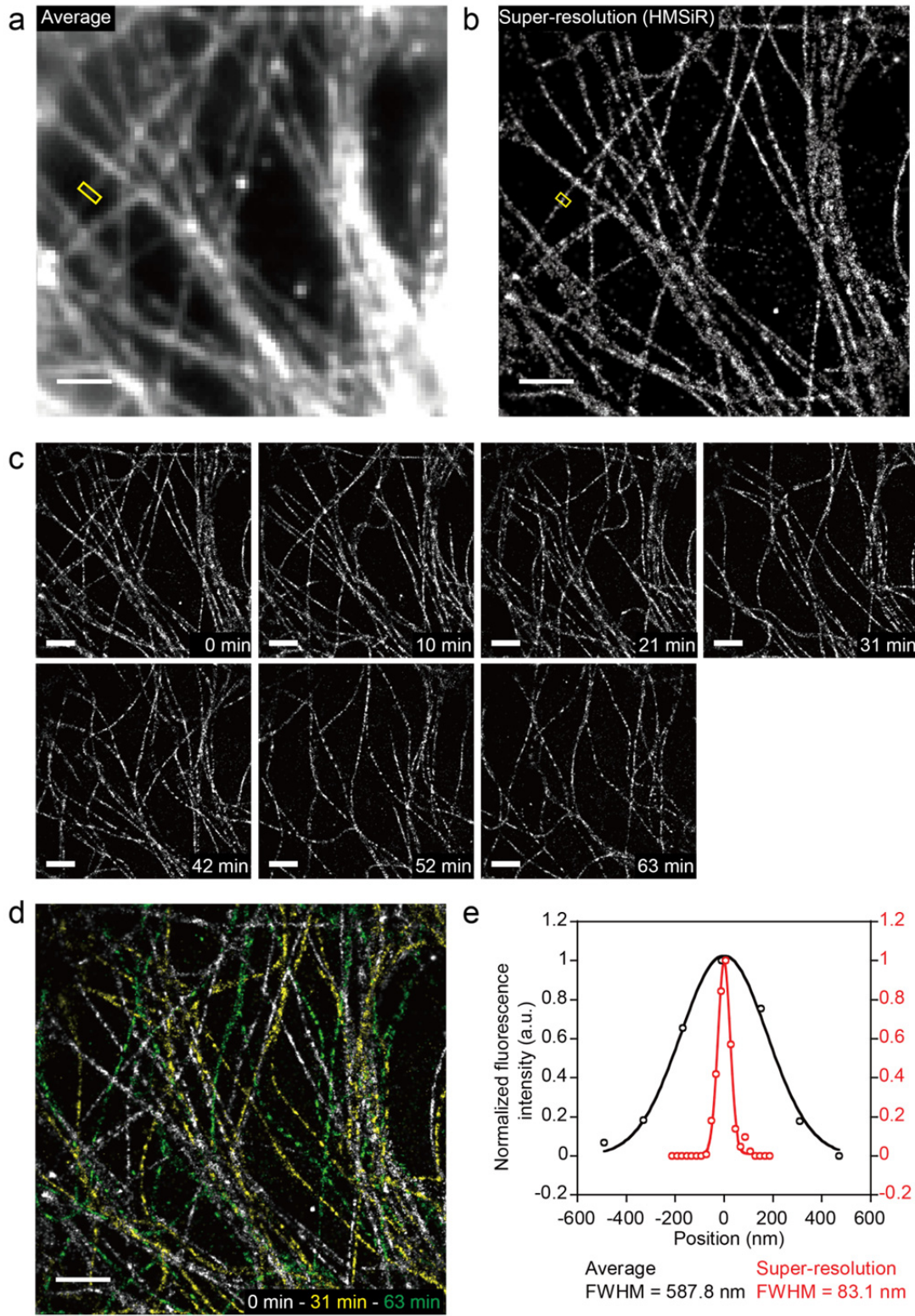


図 4-6. HMSiR を用いた生細胞タイムラプス SLM.  $\beta$ -Tubulin-Halo を Vero 細胞に発現させ, HMSiR-Halo でラベル化. (a) 平均化画像と (b) SLM 画像. 励起光条件: 647 nm ( $40 \text{ W cm}^{-2}$ ). リプレーティング後, 培地 (Leibovitz's L-15) 中で測定. 1000 枚の画像 (30 ms/frame, 測定時間: 30 s) から SLM 画像を構築. (c-d) 微小管の SLM を 10 min のインターバルで 7 回繰り返し行った. 0 min (白), 31 min (黄), 63 min (緑). (e) 黄で示した領域の蛍光強度又は輝点数の分布. FWHM =  $563.1 \pm 13.1 \text{ nm}$  (平均化画像, mean  $\pm$  s.e., N = 10) と  $79.8 \pm 3.3 \text{ nm}$  (SLM 画像, mean  $\pm$  s.e., N = 10). スケールバー:  $2 \mu\text{m}$ .

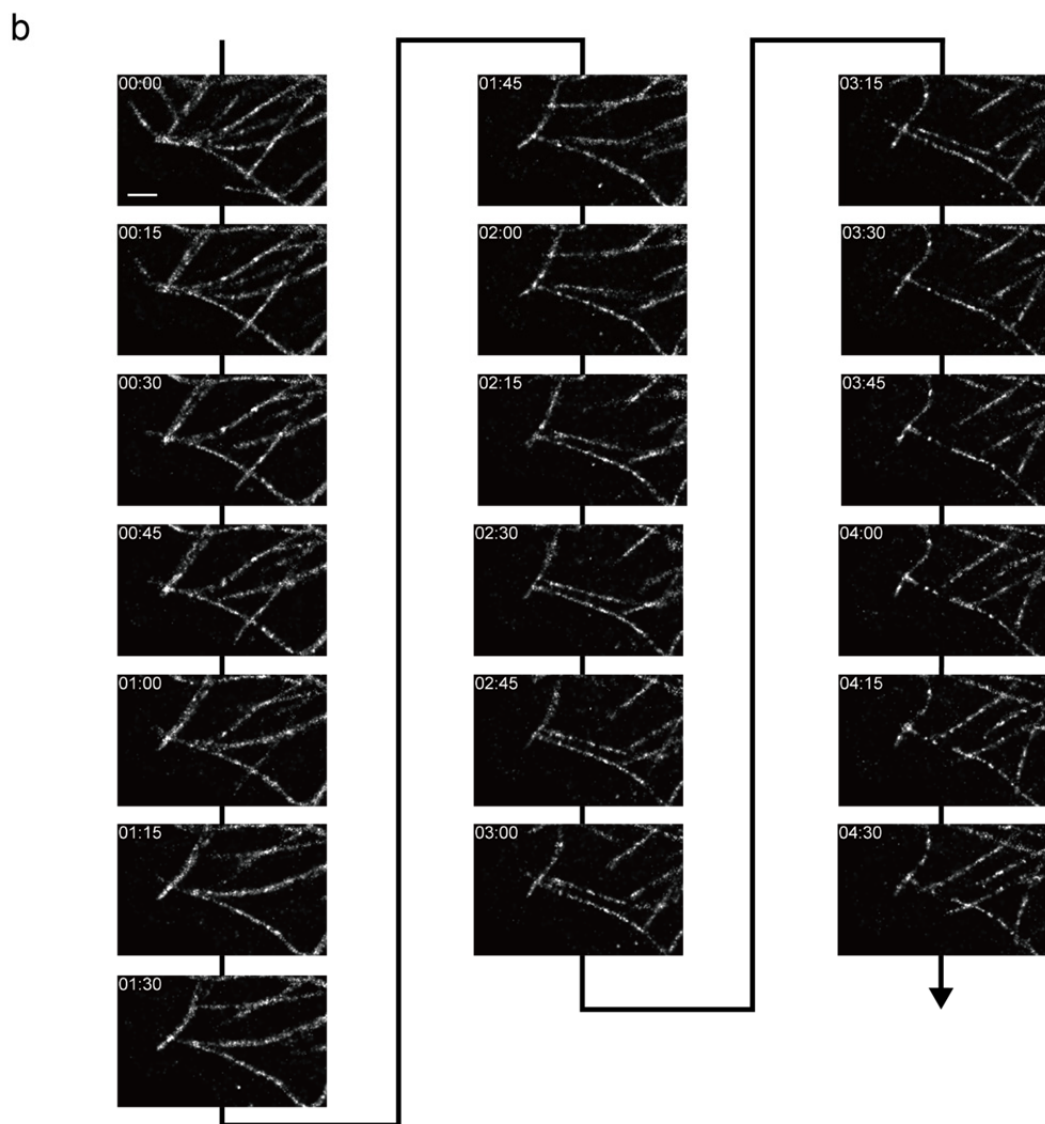
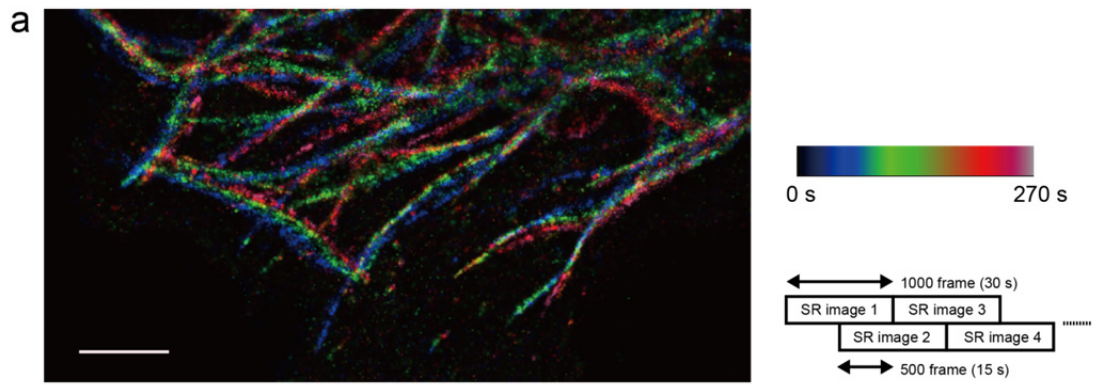


図 4-7. 生細胞タイムラプス SLM における時間分解能の向上.  $\beta$ -Tubulin-Halo を Vero 細胞に発現させ, HMSiR-Halo でラベル化. 励起光条件: 647 nm ( $40 \text{ W cm}^{-2}$ ). リプレーティング後, 培地 (Leibovitz's L-15) 中で測定. 1000 枚の画像 (30 ms/frame, 測定時間: 30 s) で SLM 画像を構築. 500 枚 (15 s) ずつ重なるようにずらして SLM 画像を構築して動画を作成. スケールバー: (a)  $2 \mu\text{m}$ , (b)  $1 \mu\text{m}$ .

## 第五章

### 考察と今後の展望

## 第一節 総括

本研究においてローダミン類の化学構造を設計，検討し，分子内スピロ環化平衡の平衡定数及び開環体の持続時間を最適化することによって，生細胞 SLM に適した自発的な明滅特性を有する蛍光色素 **HMSiR** の開発に成功した。**HMSiR** は中性条件において大部分が無蛍光状態で存在し，それぞれの分子が顕微鏡の検出に適した時間スケールで自発的に明滅を繰り返すという新たな特性を有する．この **HMSiR** の明滅特性を利用することで従来の SLM では困難であった細胞深部における超解像イメージングや生細胞タイムラプス超解像イメージングを達成した．

**HMSiR** に基づく SLM の利点は下記の 3 点にまとめられる．

- (1) 一般的な有機小分子蛍光色素を用いる SLM に必要とされてきた還元剤等の添加物や脱酸素処理を必要としないため，生理的条件下で超解像イメージングを行うことが可能である．
- (2) 明滅特性は基底状態における分子内環化平衡に基づくため，蛍光状態の存在比や持続時間はレーザー強度に原理的には依存しない．従って，実験毎に要求される空間分解能や細胞への光毒性の影響，蛍光色素の褪色の影響を考慮してレーザー強度の最適化が可能である．

(3) TIRFM や HILO 等の照明系以外にスピニングディスク共焦点レーザー顕微鏡を用いて SLM を行うことができるため、観測領域をガラス面近傍から細胞深部まで拡張することが可能となる。

## 第二節 考察

本節では、本研究で得られた結果について (1) **HMSiR** による SLM の限界と改良への指針及び (2) 分子内スピロ環化平衡のメカニズムの観点から考察する。

### 第一項 **HMSiR** による SLM の限界と改良への指針

本研究で開発した **HMSiR** は添加物やレーザー強度に依らず明滅し、生理的条件下において SLM が可能であることを実証した。**HMSiR** を今後更に改良していくに当たり、(1) 開環体の存在比率の低下と (2) 明滅あたりのフォトン数の向上が重要であると考えられる。以下に詳細を述べる。

(1) pH 7.4 における **HMSiR** の開環体の存在比率は、 $pK_{\text{cycl}}$  と  $\epsilon$  から約 1% 程度と考えられる。従って、第二章第一節と同様の議論から、回折限界内に **HMSiR** が約 30 分子存在する (約 50 nm 間隔で分子が位置する) 場合に、1 分子のみが光る状態が達成され、この密度でラベル化した試料で得られる空間分解能は約 100 nm である。実際の微小管の測定においては、これよりも高密度にラベル化されていると考えられるが、蛍光状態の分子が重なった場合、解析対象から除外されるため、超解像画像が得られたと考えられる。従って、今後の開発において、実際に使用できるラベル化密度や得られる超解像画像の画質を評価するためには、DNA 折り紙等の設計可能な微細構造を利用することが望ましいと考えられ



る。また、同時に光り解析対象から除外された場合、SLM 画像に寄与しないフォトンを放出することになり、最終的に得られる輝点数が減少するだけでなく、蛍光色素が褪色するまでに放出可能なフォトン数を無駄にしていると考えられる。したがって、高密度試料における SLM の達成及び蛍光色素のフォトン数の有効利用の観点から、開環体の存在比率の低下が望まれる。具体的には  $pK_{cycl}$  を約 1-2 程度酸性側にシフトさせることができれば、**HMSiR** での測定が困難な高密度試料においても SLM が達成できると考えられる。例えば、**HMAcRG** の  $pK_{cycl}$  が 5.3 であることから、蛍光団の求電子性を増大させることで  $pK_{cycl}$  の低下が期待される。分子設計の観点からは、蛍光団への求電子基 (例えばフッ素や塩素等) の導入が有効であると考えられるが、蛍光特性 (蛍光波長や蛍光量子収率) の変化には注意する必要がある。一方、HM 基に比べて AM 基では  $pK_{cycl}$  が 1-2 程度低下しているように、分子内求核基の検討も有効であると考えられる。また、本研究で評価した **AMSiR** は、十分なフォトン数を検出できるレーザー強度を用いれば、高密度試料にも適用できる可能性がある。

(2) **HMSiR** は基底状態における熱平衡に基づき明滅するため、原理的には開環体の持続時間はレーザー強度に依存せず、レーザー強度の増加に伴い明滅あたりのフォトン数が増加することが期待された。しかしながら、第三章第一節で述べたように、非常に強いレーザー照射時には開環体の持続時間は短くなり、

明滅あたりの光子数は  $500 \text{ W cm}^{-2}$  で飽和し、最大 2,600 フォトンであった。より高い空間分解能を達成するためには、高いレーザー強度においても光子数が飽和しないことが望まれる。この現象について考察すると、褪色するまでに 20 回程度明滅していることから、還元剤非存在下の測定条件であるものの、光照射によって何らかの長寿命無蛍光状態に変換されてしまったと考えられる。この現象の解明には例えば高時間分解能のレーザーフラッシュフォトリススにより、三重項状態等の無蛍光状態の分子種の同定が必要であると考えられる。また、分子設計の観点からの解決方策としては、ローダミン以外の蛍光団の検討や cyclooctatetraene 等の三重項状態のクエンチャーを分子内に導入することが考えられる。

## 第二項 分子内スピロ環化平衡のメカニズム

本研究では LFP の導入により化学構造によって、平衡定数だけではなく開環体の持続時間 (閉環反応速度) が大きく変化するという新たな知見を得た。しかしながら、ローダミン誘導体の分子内スピロ環化平衡の詳細なメカニズムについては検討の余地が多分に残されている。例えば、分子内スピロ環化平衡は酸塩基平衡であることから、脱プロトン化の過程が関与しているのは明らかである。実際に、pH が高くなるほど閉環反応が加速し、開環体の持続時間が短くな

ることを確認した (図 2-15). しかし, 開環体の持続時間 ( $\log \tau$ ) と pH をプロットした場合に pH 7.4 及び pH 10 で傾きが変化することから, 脱プロトン化とそれに続く閉環反応からなる単純な反応様式とは異なることが示唆された. この原因として, pH が低い場合にキサンテン環へのプロトン化により求電子性が変化することや pH が高い場合にヒドロキシオンと分子間で反応することが考えられ, これらを考慮して反応様式を決定することが必要と考えられる.

また, AM ローダミンの過渡吸収において, ns オーダーの速い成分と  $\mu\text{s}$  オーダーの遅い成分の二成分が観測された (図 2-9). ベンジルアミンの  $\text{pK}_a$  が 9.3 であり, 開環体あるいは閉環体のアミンが水中でプロトン化された分子種とプロトン化されていない分子種が混在していると考えられ, これらが関与する反応を反映しているのではないかと推察される. HM ローダミンに関しても, 時間分解能以下においてさらに速い成分が存在する可能性もあるため, より速い時間分解能での LFP を行うことでメカニズムに関する新たな知見が得られるかもしれない. また, HM ローダミンの開環体の持続時間が 10-100 ms オーダーであることが, SLM を低レーザー強度で行う際に重要であるが, このように反応様式が複雑であることから, この持続時間を決定する要因 (物性, 化学構造等) については更なる検討が必要である.

LFP による解析では、レーザーパルスによる励起過程を含む反応を観測しており、実際に観測している化学種が熱平衡における開環体と同一であることを実証することは困難である。本研究では $\epsilon$ が大きく観測が容易な可視光領域における過渡吸収/蛍光スペクトルにより同定を行ったが、紫外光領域も含めた過渡吸収/蛍光スペクトルを取得し、定常状態におけるスペクトルと比較することが望ましいと考えられる。また、反応速度の遅い誘導体に関してはストップフロー法を導入することで、基底状態における反応を追跡することが可能となり、実際の使用に則した知見が得られると期待される。

一方、以上のような測定・解析を進めると同時に、ローダミン誘導体を新たに設計し、合成・評価を続けることもメカニズムの解析において重要である。例えば、脱プロトン化の過程に摂動を与えるため、HM ローダミンのベンジル位にトリフルオロメチル基等の求電子基を導入した誘導体の合成、評価により脱プロトン化速度と開環体の持続時間の関係性を検討できると考えられる。また、分子内求核種の炭素鎖を伸ばしたヒドロキシエチル基やヒドロキシプロピル基を導入し、化学構造と  $pK_{\text{cycl}}$  及び開環体の持続時間の関係性を検討することで新たな知見が得られると期待される。

### 第三節 今後の展望

本研究で得られた成果は今後、下記のように展開していくと考えられる。

#### 第一項 HMSiR を用いた SLM の生物学研究への応用

一般的な蛍光色素を添加物と共に用いる dSTORM が開発され、比較的入手しやすい全反射顕微鏡やフリーの解析ソフトの普及により、生物学研究への応用例が増加し始めている。色の異なる複数の蛍光色素で標的タンパク質をラベル化し、三次元で観察することも可能となってきたため、固定細胞中の微細構造の観察においても、電子顕微鏡とは異なる構造情報が得られるようになってきている<sup>130</sup>。超解像イメージング法の次の段階は、蛍光イメージング法の最大の長所とも言える生細胞中における微細構造の観察である。これまでに生細胞における SLM は達成されているものの、今後の課題として測定条件の緩和と時間分解能の向上が挙げられる。

dSTORM においても細胞中の GSH を還元剤として利用することで生細胞イメージングが達成されているが、SLM の測定条件を達成するため細胞中の酸化還元状態への影響や強いレーザー照射によって生じる活性酸素種の影響が懸念され、研究目的によっては使いづらい場面が想定される。本研究で提案した手法

は蛍光色素自体に明滅特性を付与することで、従来のような特殊な条件を用いない、生理的条件に限りなく近い環境における生細胞 SLM を可能とする。さらに、スピニングディスク共焦点レーザー顕微鏡と併せることで細胞深部にまで観測領域を広げることにも成功しており、生物学研究において魅力的な選択肢の一つになると考えられる。一方で、時間分解能の向上においては、次項で詳述するように明滅特性の制御法の確立が重要になると考えられる。

## 第二項 蛍光色素の自発的な明滅特性の制御法の確立

蛍光プローブの明滅現象は一分子を観測することで初めて認識され<sup>131</sup>、当初一分子 FRET 等の解析における重大な artifact の原因とされた<sup>132</sup>。そのため、明滅現象を抑制する研究が進められ<sup>133</sup>、その過程において明滅現象のメカニズムが検討されてきた。そのような背景の中、明滅現象を積極的に利用する SLM が開発され、明滅特性は蛍光プローブの新たな特性として認識されつつある。

本研究では、この明滅特性を蛍光色素の化学構造の最適化によって制御し、SLM に適した蛍光プローブの開発に成功した。その過程において、分子内求核基の求核性や蛍光団の求電子性によって、蛍光／無蛍光状態の比率や蛍光状態の持続時間の調節が可能であるという知見を得た。今後、更なる誘導体の評価

を進めることで、化学構造による明滅特性の制御法の構築が期待される。今後、明滅特性を最適化することで下記のような測定が可能になると考えられる。

#### (1) 生理的条件下における多色での SLM

タンパク質相互作用の詳細な解析等において、SLM を多色で実施することは不可欠である。本研究では、近赤外の波長域で使用可能な **HMSiR** の開発に成功したが、緑～赤色の波長域における蛍光プローブの開発には至らなかった。**HMAcRG** は緑の波長域で  $pK_{cycl}$ ,  $\tau$ 共に基準を満たしているものの、 $\epsilon$ が 30,000 程度と低いため、本研究の知見を活かしさらに明るい蛍光色素の開発が望ましいと考えられる。

#### (2) タンパク質の密度に応じた蛍光プローブの開発

**HMSiR** は同時に約 1%が蛍光状態で存在しているため、PSF 内に高密度で存在するタンパク質構造の SLM には適していない。設計法の確立によって、蛍光状態の持続時間を 100 ms 程度に維持したまま、蛍光状態の存在比率を変化させることが可能となれば生物学研究において、観測対象の密度に応じた使い分けが可能となるだろう。

### (3) 高い時間分解能の解析アルゴリズムへの対応

SLM は原理的に測定時間が長く，細胞内部における速い動きを追従することには適さないことも観測対象を制限する大きな原因である．測定範囲を制限することによって時間分解能を向上させている例もあるが<sup>122</sup>，細胞の一部ではなく全体を観測できることが望ましい．本研究では，解析条件の工夫により比較的速い時間分解能での測定が可能であることを示した (図 4-7)．一方で，一つの解決策として解析アルゴリズムの開発が急速に進められており<sup>134, 135</sup>，Scientific complementary metal-oxide semiconductor (sCMOS) カメラと複数の点が重なっていても位置決定が可能なアルゴリズムを組み合わせることで，ビデオレート (32 frame/s) での SLM 測定も可能となってきている<sup>136</sup>．このように，カメラをはじめとする光学機器の開発や解析アルゴリズムの開発が進むに連れ，さらに時間分解能が向上していくと考えられる．そのとき，現在の SLM に適したプローブでは対応できないことが予想され，本研究で示した化学構造を基にした制御法が重要となると考えられる．



#### (4) 明滅特性を活かした測定法の開発と応用

蛍光プローブの明滅特性は SLM だけではなく、自己相関関数あるいはキュムラントを利用した超解像イメージング法である SOFI にも必要な特性である。SOFI にはこれまで量子ドットや分子間 FRET の利用等が用いられているものの、未だ生細胞で利用できる蛍光プローブの種類は少なかった。本研究で示した蛍光色素等を用いることで光学系に依らず、高い時間分解能を達成できる SOFI の応用例が増加することが期待される。また、ラベル化した分子のうち少しずつ光らせて一分子イメージングを行うことで、一細胞内で多数の分子の運動の情報を得る手法が開発されている (sptPALM)<sup>137</sup>。同時に光る分子を少なくした上で、自発的に明滅させることによって、蛍光色素が放出可能なフォトン数を分割して放出し、通常よりも長い時間測定することが可能になると考えられる。これまで、蛍光プローブが有する蛍光波長や蛍光量子収率、蛍光寿命といった蛍光特性及び分子の局在性、化学物質との反応性を基にして新たなイメージング法が開発されてきた。SLM の開発を契機に、蛍光プローブの明滅特性を新たなパラメーターとする測定法が開発され、未知の生命現象を観測することが可能になるかもしれない。

## 実験の部

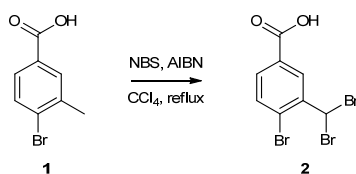
### 試薬と機器

試薬と溶媒は試薬会社 (Wako Pure Chemical, Tokyo Chemical Industries, Aldrich Chemical Company, Dojindo Laboratories) から購入し, 精製することなく使用した. 混合溶媒の組成は体積分率 (v/v) で記載した. カラムクロマトグラフィーは中圧分取液体クロマトグラフ EPCLC-AI-580S chromatograph (Yamazen) を用いて行った.  $^1\text{H}$  核磁気共鳴 (NMR) スペクトル及び  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルは Bruker AVANCEIII 400 (400 MHz ( $^1\text{H}$ ), 101 MHz ( $^{13}\text{C}$ )) を用いて測定し, 溶媒のシグナル ( $\text{CDCl}_3$ : 7.26 ppm ( $^1\text{H}$ ), 77.16 ppm ( $^{13}\text{C}$ ),  $\text{CD}_3\text{OD}$ : 3.31 ppm ( $^1\text{H}$ ), 49.00 ppm ( $^{13}\text{C}$ ), acetone-*d*<sub>6</sub>: 2.05 ppm ( $^1\text{H}$ ), 29.84 ppm ( $^{13}\text{C}$ )) を内部標準として化学シフト ( $\delta$ ) を記載し, 結合定数を Hz で記載した. 高分解能質量分析スペクトル (HRMS) は Bruker micrOTOFII (エレクトロスプレーイオン化法, ESI) を用いて測定した. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による精製及び分析には, 逆相カラム (GL Sciences, 精製: Inertsil ODS-3 10 mm  $\times$  250 mm 又は Inertsil ODS-3 20 mm  $\times$  250 mm, 分析: Inertsil ODS-3 4.6 mm  $\times$  250 mm), ポンプ (Jasco, PU-2080 又は PU-2087), 検出器 (Jasco, MD-2010 又は MD-2018) から構成される HPLC システムを用いた.

### ヒドロキシメチル基の変換に関する注記

ヒドロキシメチル基の反応性を向上させるため, ロイコ体を経由する合成スキームを採用した. 有機溶媒中においてヒドロキシメチルローダミン誘導体 (化合物 **8** 等) はスピロ環化構造で存在する傾向にあるため, ヒドロキシメチル基を他の置換基に変換することが困難である. そこで, キサンテン環を還元し, ロイコ体に変換することでスピロ環化構造をとることを防ぎ, ヒドロキシメチル基を効率的に変換することが可能になる.

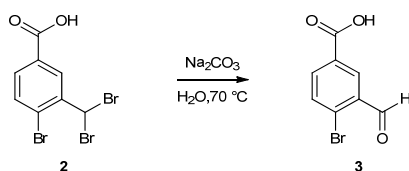
#### 4-ブロモ-3-ジブロモメチル安息香酸 (2)



4-ブロモ-3-メチル安息香酸 (1) (5.03 g, 23.4 mmol, 1 eq) の四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) 懸濁液 (100 mL) に N-ブロモスクシンイミド (NBS) (9.16 g, 51.5 mmol, 2.2 eq), アゾビスイソブチロニトリル (AIBN) (76.8 mg, 0.47 mmol, 0.02 eq) を加え, 18 h 加熱還流した. 室温に戻し, 10%炭酸ナトリウム水溶液を加え, ジクロロメタンで2回洗浄した. 濃塩酸を加え pH を1に調整し, 酢酸エチルで2回抽出した. 有機相を飽和食塩水で洗浄した後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥し, 溶媒を減圧除去した. 残渣をジクロロメタン/メタノール = 10/1 で洗浄し, 4-ブロモ-3-ジブロモメチル安息香酸 (2) (5.93 g, 68%) を白色固体として得た.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD): δ 8.63 (d, *J* = 2.1 Hz, 1 H), 7.86 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1 H), 7.71 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 7.29 (s, 1 H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, MeOD): δ 167.9 (C), 142.5 (C), 134.4 (CH), 133.2 (CH), 133.0 (CH), 132.9 (C), 125.5 (C), 39.9 (CH); HRMS (*m/z*): [M]<sup>-</sup> calcd. for C<sub>8</sub>H<sub>4</sub>Br<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, 368.77669; found, 368.77748.

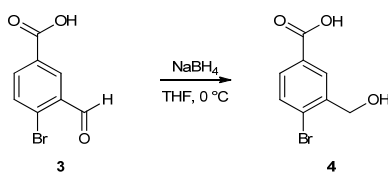
#### 4-ブロモ-3-ホルミル安息香酸 (3)



化合物 (2) (5.65 g, 15.1 mmol, 1 eq) を 10%炭酸ナトリウム水溶液 (100 mL) に溶解し, 70 °C で 4 h 攪拌した. 反応液をろ過し, ろ液に濃塩酸を加え pH を1に調整し, 酢酸エチルで2回抽出した. 有機相を飽和食塩水で洗浄し, 無水硫酸ナトリウムで乾燥した後, 溶媒を減圧除去し, 4-ブロモ-3-ホルミル安息香酸 (3) (3.29 g, 95%) を白色固体として得た.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>): δ 10.37 (s, 1 H), 8.46 (d, *J* = 2.2 Hz, 1 H), 8.17 (dd, *J* = 8.3, 2.2 Hz, 1 H), 7.94 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>): δ 191.3 (C), 166.1 (C), 136.5 (CH), 135.5 (CH), 134.7 (C), 131.7 (C), 131.5 (C), 131.5 (CH); HRMS (*m/z*): [M]<sup>-</sup> calcd. for C<sub>8</sub>H<sub>4</sub>BrO<sub>3</sub>, 226.93493; found, 226.93679.

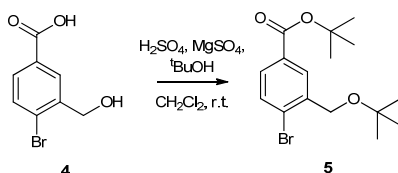
#### 4-ブロモ-3-ヒドロキシメチル安息香酸 (4)



化合物 (3) (500 mg, 2.18 mmol, 1 eq) をテトラヒドロフラン (10 mL) に溶解し、0 °C に冷却した。水素化ホウ素ナトリウム (123.8 mg, 3.27 mmol, 1.5 eq) をゆっくり加え、0 °C で 5 h 攪拌した。1 N 塩酸を加え、有機溶媒を減圧除去した。酢酸エチルを加え、1 N 塩酸、水、飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧除去し、4-ブロモ-3-ヒドロキシメチル安息香酸 (4) (492.7 mg, 98%) を白色固体として得た。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD): δ 8.21 (m, 1 H), 7.81 (dd, *J* = 8.2, 2.2 Hz, 1 H), 7.67 (d, *J* = 8.2 Hz, 1 H), 4.69 (s, 2 H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, MeOD): δ 169.1 (C), 142.4 (C), 133.7 (CH), 131.5 (C), 130.7 (CH), 130.3 (CH), 128.0 (C), 64.3 (CH<sub>2</sub>); HRMS (*m/z*): [M+Na]<sup>+</sup> calcd. for C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>BrNaO<sub>3</sub>, 252.94708; found, 252.94774.

#### 3-*tert*-ブトキシメチル-4-ブロモ安息香酸 *tert*-ブチル (5)



無水硫酸マグネシウム (2.08 g, 17.3 mmol, 8 eq) の脱水ジクロロメタン懸濁液 (30 mL) に濃硫酸 (232 μL, 4.33 mmol, 2 eq) を加え、アルゴン雰囲気下、室温で 15 min 攪拌した。化合物 (4) (500 mg, 2.16 mmol, 1 eq), *tert*-ブチルアルコール (1.60 g, 21.6 mmol, 10 eq) の順で加え、アルゴン雰囲気下密栓して、室温で 3 d 攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで 2 回抽出し、有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧除去し、シリカゲルクロマトグラフィーで精製し (*n*-ヘキサン/酢酸エチル = 100/0-91/9), 目的化合物 3-*tert*-ブトキシメチル-4-ブロモ安息香酸 *tert*-ブチル (5) (483.9 mg, 65%) を無色液体として得た。

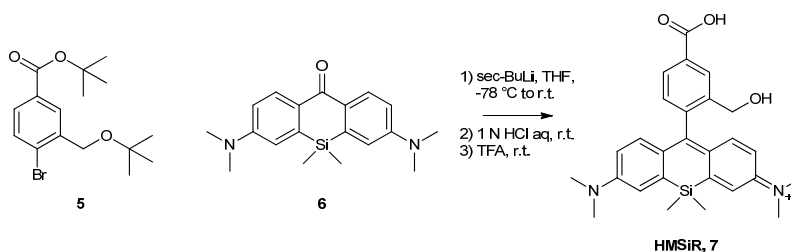
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.14 (m, 1 H), 7.71 (dd, *J* = 8.3, 2.2 Hz, 1 H), 7.54 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 4.50 (s, 2 H), 1.59 (s, 9 H), 1.32 (s, 9 H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, MeOD): δ 165.2, 139.4, 132.2, 131.3, 130.0, 129.2, 127.1, 81.2, 74.0, 63.4, 28.2, 27.7; HRMS

(*m/z*): [M+Na]<sup>+</sup> calcd. for C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>BrNaO<sub>3</sub>, 365.07228; found, 365.07232.

### Si キサントン (6)

Si キサントン (6) は既報に従って合成した<sup>88</sup>.

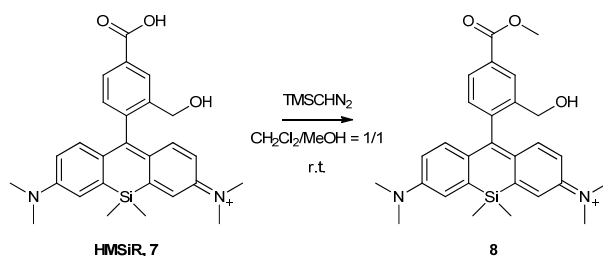
### HMSiR (7)



化合物 (5) (51.8 mg, 0.151 mmol, 7 eq) を脱水テトラヒドロフラン (3 mL) に溶解し, アルゴン雰囲気下, -78 °C に冷却した. 1M *sec*-ブチルリチウムシクロヘキサン, *n*-ヘキサン溶液 (151 μL, 0.151 mmol, 7 eq) をゆっくり加え, -78 °C で 5 min 攪拌した. Si キサントン (6) (7.0 mg, 0.022 mmol, 1 eq) のテトラヒドロフラン (2 mL) 溶液を加え, 室温で 2 h 攪拌した. 1 N 塩酸を加えて溶液が青くなった後, 飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え, 酢酸エチルで 2 回抽出し, 有機相を水, 飽和食塩水で洗浄し, 無水硫酸ナトリウムで乾燥し, 溶媒を減圧除去した. 残渣にトリフルオロ酢酸 (3 mL) を加え, 室温で 42 h 攪拌した後, 減圧除去し, HPLC で精製し (溶離液 A: 水, 0.1%トリフルオロ酢酸, 1%アセトニトリル, 溶離液 B: アセトニトリル, 1%水, A/B = 90/10-0/100 (40 min)), HMSiR (7) (2.4 mg, 24%) を青色固体として得た.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD): δ 8.41 (s, 1 H), 8.10 (d, *J* = 7.0 Hz, 1 H), 7.37 (d, *J* = 2.7 Hz, 2 H), 7.28 (d, *J* = 7.9 Hz, 1 H), 7.03 (d, *J* = 9.6 Hz, 2 H), 6.77 (dd, *J* = 9.6, 2.7 Hz, 2 H), 4.36 (s, 2 H), 3.35 (s, 12 H), 0.62 (s, 3 H), 0.61 (s, 3 H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, MeOD): δ 169.1, 167.9, 155.8, 149.4, 143.0, 142.1, 141.5, 132.8, 130.7, 129.4, 129.2, 128.1, 122.3, 115.3, 62.0, 40.9, -1.1, -1.3; HRMS (*m/z*): [M]<sup>+</sup> calcd. for C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Si, 459.20985; found, 459.21037.

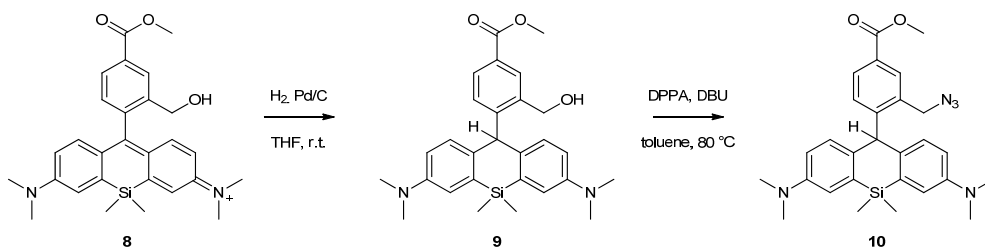
## HMSiR メチルエステル (8)



HMSiR (7) (4.3 mg, 0.009 mmol, 1 eq) をジクロロメタン/メタノール (3 mL/0.3 mL) に溶解し, 0 °C に冷却した. 2 M トリメチルシリルジアゾメタンジエチルエーテル溶液 (56.4  $\mu$ L, 0.113 mmol, 12 eq) をゆっくり加え, 10 min 攪拌した後, 酢酸を加え, 溶媒を減圧除去し, HMSiR メチルエステル (8) (5.0 mg, quant.) を青色固体として得た.

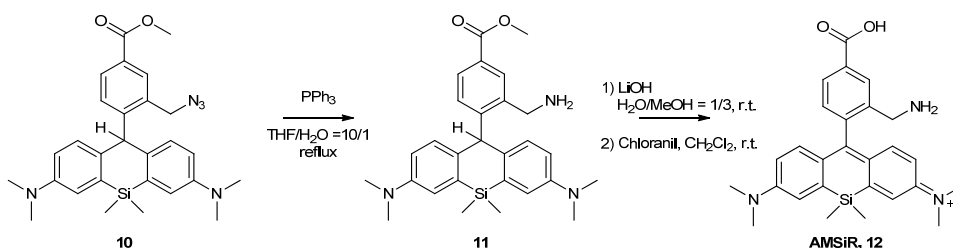
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.00 (s, 1 H), 7.93 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1 H), 7.09 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1 H), 6.96 (d,  $J = 2.9$  Hz, 2 H), 6.94 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2 H), 6.61 (dd,  $J = 8.9, 2.9$  Hz, 2 H), 5.29 (s, 2 H), 3.93 (s, 3 H), 2.95 (s, 12 H), 0.62 (s, 3 H), 0.54 (s, 3 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  167.2, 151.8, 148.9, 140.1, 137.7, 135.5, 129.5, 129.3, 128.7, 124.6, 122.9, 116.8, 113.9, 92.6, 72.2, 52.3, 40.6, 0.6, -1.0; HRMS ( $m/z$ ):  $[\text{M}]^+$  calcd. for  $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_3\text{Si}$ , 473.22550; found, 473.22454.

## AMSiR (12)



化合物 (8) (25 mg, 0.053 mmol, 1 eq) をテトラヒドロフラン (5 mL) に溶解し, パラジウム炭素(26 mg) を加え, 水素雰囲気下, 室温で 40 min 激しく攪拌した. セライト上でろ過し, ろ液を減圧除去した. 残渣をトルエン (5 mL) に溶解し, ジアザビシクロウンデセン (DBU) (15.8  $\mu$ L, 0.106 mmol, 2 eq), ジフェニルリン酸アジド (DPPA) (23.7  $\mu$ L, 0.106 mmol, 2 eq) を加え, アルゴン雰囲気下, 80 °C で 3 h 攪拌した. 飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え, 酢酸エチルで 2 回抽出し, 水, 飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥し, 溶媒を減圧除去

した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで粗精製し (*n*-ヘキサン/酢酸エチル = 84/16–64/36), 化合物 (10) をクルードで得た。これ以上精製をせず全量を次の反応に使用した。



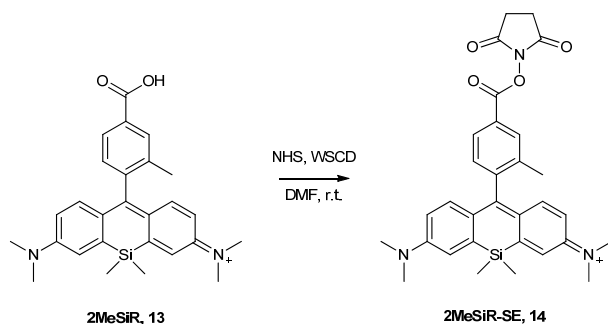
化合物 (10) をテトラヒドロフラン/水 (5 mL/0.5 mL) に溶解し, トリフェニルホスフィン (PPh<sub>3</sub>) (23 mg, 0.088 mmol, 2 eq) を加え, アルゴン雰囲気下で 12 h 加熱還流した。溶媒を減圧除去し, シリカゲルクロマトグラフィーで粗精製した (ジクロロメタン/メタノール = 92/8–85/15)。0.4 M 水酸化リチウム水/メタノール溶液 (1 mL) 加え, 室温で 6 h 攪拌した。1 N 塩酸を加え, ジクロロメタンで 2 回抽出し, 1 N 塩酸, 飽和食塩水で洗浄, 無水硫酸ナトリウムで乾燥した後, 溶媒を減圧除去した。ジクロロメタン (5 mL) に溶解し, クロラニル (22 mg) を加え, 室温で 12 h 攪拌した。溶媒を減圧除去し, HPLC で精製し (溶離液 A: 水, 0.1%トリフルオロ酢酸, 1%アセトニトリル, 溶離液 B: アセトニトリル, 1%水, A/B = 90/10–0/100 (40 min)), **AMSiR (12)** (2.1 mg, 9% (5 ステップ)) を青色固体として得た。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD): δ 8.05 (s, 1 H), 8.01 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 7.07 (d, *J* = 2.5 Hz, 2 H), 6.96 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 6.63–6.70 (m, 4 H), 4.45 (s, 2 H), 2.97 (s, 12 H), 0.64 (s, 3 H), 0.51 (s, 3 H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, MeOD): δ 174.2, 151.1, 148.0, 140.3, 138.6, 137.9, 134.1, 131.3, 131.2, 126.2, 124.5, 118.0, 115.2, 80.0, 40.5, 0.7, -2.0; HRMS (*m/z*): [M]<sup>+</sup> calcd. for C<sub>27</sub>H<sub>32</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Si, 458.22583; found, 458.22584.

### **2MeSiR (13)**

**2MeSiR (13)** は既報に従って合成した<sup>138</sup>。

## 2MeSiR-SE (14)

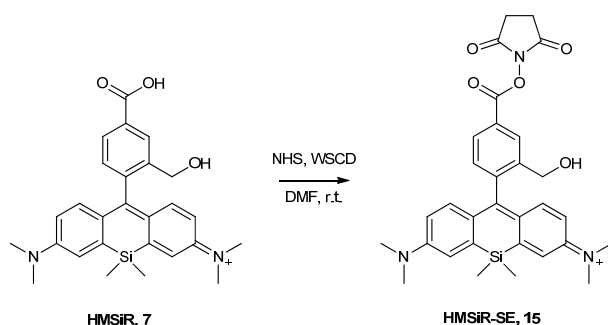


**2MeSiR 13** (3.0 mg, 0.0068 mmol, 1 eq) を脱水 *N,N*-ジメチルホルムアミド (2 mL) に溶解し、*N*-ヒドロキシコハク酸イミド (NHS) (3.9 mg, 0.034 mmol, 5 eq), 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (WSCD) (6.5 mg, 0.034 mmol, 5 eq) を加え、室温で 16 h 攪拌した。溶媒を減圧除去し、HPLC で精製し (溶離液 A: 水, 0.1%トリフルオロ酢酸, 1%アセトニトリル, 溶離液 B: アセトニトリル, 1%水, A/B = 90/10–0/100 (60 min)), **2MeSiR-SE (14)** (1.9 mg, 51%) を青色固体として得た。

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta$  8.20 (s, 1 H), 8.16 (dd,  $J = 8.0, 1.3$  Hz, 1H), 7.41-7.39 (m, 3 H), 7.03 (d,  $J = 9.7$  Hz, 2 H), 6.81 (dd,  $J = 9.7, 2.8$  Hz, 2H), 3.36 (s, 12 H), 2.94 (s, 4 H), 2.15 (s, 3 H), 0.63 (s, 3H), 0.61 (s, 3 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, MeOD):  $\delta$  171.8, 167.8, 163.0, 155.9, 149.5, 147.2, 141.8, 138.8, 133.0, 131.3, 128.7, 127.7, 127.2, 122.5, 115.6, 41.0, 26.6, 19.4, -1.1, -1.3; HRMS ( $m/z$ ):  $[\text{M}]^+$  calcd. for  $\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_4\text{Si}$ , 540.23131; found, 540.23256.



## HMSiR-SE (15)



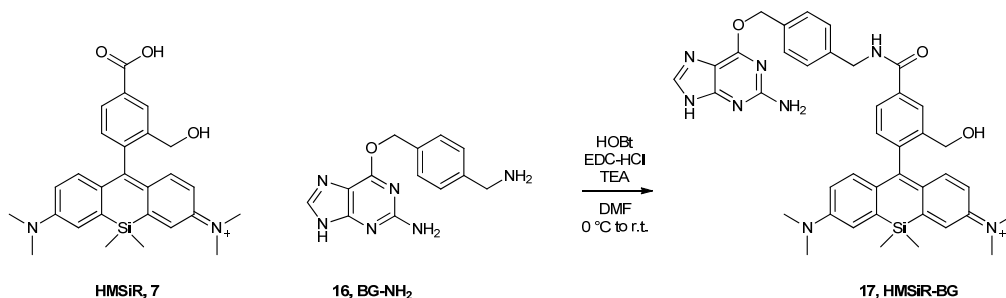
**HMSiR (7)** (8.4 mg, 0.018 mmol, 1 eq) を脱水 *N,N*-ジメチルホルムアミド (2 mL) に溶解し, *N*-ヒドロキシコハク酸イミド (NHS) (10.5 mg, 0.091 mmol, 5 eq), 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (WSCD) (17.5 mg, 0.091 mmol, 5 eq) を加え, 室温で 24 h 攪拌した. 溶媒を減圧除去し, HPLC で精製し (溶離液 A: 水, 0.1%トリフルオロ酢酸, 1%アセトニトリル, 溶離液 B: アセトニトリル, 1%水, A/B = 90/10-0/100 (30 min)), **HMSiR-SE (15)** (8.1 mg, 79%) を青色固体として得た.

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, MeOD):  $\delta$  8.52 (s, 1 H), 8.23 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1 H), 7.42 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1 H), 7.38 (d,  $J = 2.8$  Hz, 2 H), 7.03 (d,  $J = 9.6$  Hz, 2 H), 6.80 (dd,  $J = 9.6, 2.8$  Hz, 2 H), 4.38 (s, 2 H), 3.36 (s, 12 H), 2.95 (s, 4 H), 0.62 (s, 3 H), 0.62 (s, 3 H);  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz, MeOD):  $\delta$  171.8, 166.5, 163.1, 155.9, 149.4, 145.1, 142.7, 141.9, 131.4, 129.7, 127.8, 127.3, 122.5, 115.5, 61.7, 41.0, 26.6, -1.1, -1.3; HRMS ( $m/z$ ):  $[\text{M}]^+$  calcd. for  $\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_5\text{Si}$ , 556.22622; found, 556.22596.

## BG-NH<sub>2</sub> (16)

**BG-NH<sub>2</sub> (16)** は既報に従って合成した<sup>113</sup>.

## HMSiR-BG (17)



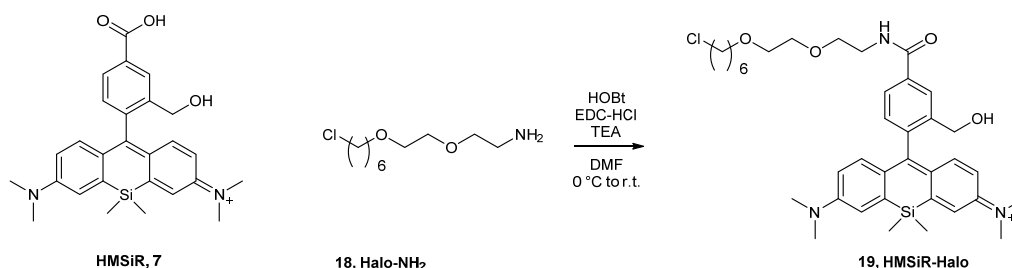
**HMSiR (7)** 化合物 (9.2 mg, 0.02 mmol, 1 eq) を脱水 *N,N*-ジメチルホルムアミド (1 mL) に溶解し, **BG-NH<sub>2</sub> (16)** (5.4 mg, 0.02 mmol, 1 eq), 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt) (2.7 mg, 0.02 mmol, 1 eq), 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (WSCD) (3.8 mg, 0.02 mmol, 1 eq), トリエチルアミン (5.6  $\mu$ L, 0.04 mmol, 2 eq) を加え, アルゴン雰囲気下, 室温で 17 h 攪拌した. 溶媒を減圧除去し, HPLC で精製し (溶離液 A: 水, 0.1%トリフルオロ酢酸, 1%アセトニトリル, 溶離液 B: アセトニトリル, 1%水, A/B = 90/10-0/100 (50 min)), **HMSiR-BG (17)** (9.9 mg, 69%) を青色固体として得た.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta$  8.33 (s, 1 H), 8.25 (s, 1 H), 7.95 (d,  $J = 7.1$  Hz, 1 H), 7.56 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2 H), 7.46 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2 H), 7.37 (d,  $J = 2.6$  Hz, 2 H), 7.27 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1 H), 7.04 (d,  $J = 9.6$  Hz, 2 H), 6.75 (dd,  $J = 9.6, 2.6$  Hz, 2 H), 5.66 (s, 2 H), 4.66 (s, 2 H), 4.36 (s, 2 H), 3.35 (s, 12 H), 0.61 (s, 3 H), 0.60 (s, 3 H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, MeOD):  $\delta$  169.4, 168.0, 161.2, 158.3, 155.8, 153.7, 149.4, 143.5, 142.2, 141.8, 141.6, 141.0, 136.2, 135.5, 130.7, 130.3, 128.8, 128.2, 127.3, 126.9, 122.3, 115.2, 108.4, 70.8, 62.1, 44.3, 40.9, -1.1, -1.3; HRMS ( $m/z$ ):  $[M]^+$  calcd. for C<sub>40</sub>H<sub>43</sub>N<sub>8</sub>O<sub>3</sub>Si, 711.32219; found, 711.32339.

## Halo-NH<sub>2</sub> (18)

**Halo-NH<sub>2</sub> (18)** は既報に従って合成した<sup>139</sup>.

## HMSiR-Halo (20)



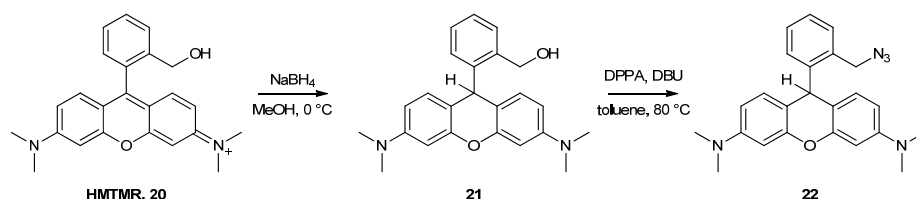
**HMSiR (7)** (10.6 mg, 0.02 mmol, 1 eq) を脱水 *N,N*-ジメチルホルムアミド (1 mL) に溶解し, 0 °C に冷却し, **Halo-NH<sub>2</sub> (18)** (5.2 mg, 0.03 mmol, 1.5 eq), 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt) (3.8 mg, 0.02 mmol, 1 eq), 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (WSCD) (5.3 mg, 0.02 mmol, 1 eq), トリエチルアミン (12.9  $\mu$ L, 0.09 mmol, 5 eq) を加え, アルゴン雰囲気下, 室温で 13 h 攪拌した. 溶媒を減圧除去し, HPLC で精製し (溶離液 A: 水, 0.1% トリフルオロ酢酸, 1% アセトニトリル, 溶離液 B: アセトニトリル, 1% 水, A/B = 90/10–0/100 (40 min)), **HMSiR-Halo (19)** (5.2 mg, 34%) を青色固体として得た.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta$  8.22 (s, 1 H), 7.92 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.37 (d,  $J = 2.6$  Hz, 2H), 7.26 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1 H), 7.05 (d,  $J = 9.6$  Hz, 2H), 6.76 (dd,  $J = 9.6, 2.6$  Hz, 2H), 4.37 (s, 2 H), 3.71-3.61 (m, 8 H), 3.53-3.49 (m, 4 H), 3.35 (s, 12 H), 1.77-1.70 (m, 2H), 1.63-1.56 (m, 2 H), 1.48-1.37 (m, 4 H), 0.62 (s, 3 H), 0.61 (s, 3 H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, MeOD):  $\delta$  169.5 (C), 168.1 (C), 155.8 (C), 149.5 (C), 142.2 (CH), 141.6 (C), 141.5 (C), 136.4 (C), 130.6 (CH), 128.3 (C), 127.3 (CH), 126.8 (CH), 122.3 (CH), 115.2 (CH), 72.2 (CH<sub>2</sub>), 71.3 (CH<sub>2</sub>), 71.2 (CH<sub>2</sub>), 70.6 (CH<sub>2</sub>), 62.2 (CH<sub>2</sub>), 45.7 (CH<sub>2</sub>), 41.1 (CH<sub>2</sub>), 40.9 (CH<sub>3</sub>), 33.7 (CH<sub>2</sub>), 30.5 (CH<sub>2</sub>), 27.7 (CH<sub>2</sub>), 26.5 (CH<sub>2</sub>), -1.1 (CH<sub>3</sub>), -1.3 (CH<sub>3</sub>); HRMS ( $m/z$ ): [M]<sup>+</sup> calcd. for C<sub>37</sub>H<sub>51</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Si, 664.33319; found, 664.33434.

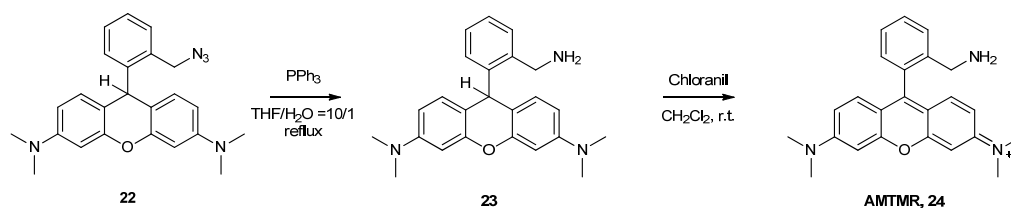
## HMTMR (20)

**HMTMR (20)** は既報に従って合成した<sup>102</sup>.

## AMTMR (24)



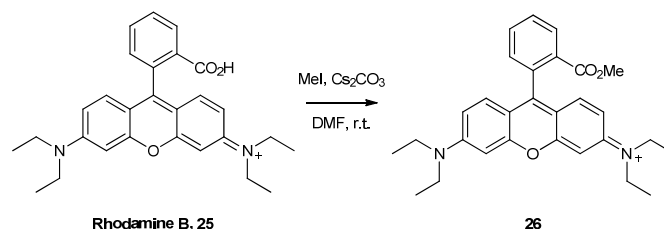
HMTMR (20) (23.8 mg, 0.064 mmol, 1 eq) をメタノール (3 mL) に溶解し、0 °C に冷却し、水素化ホウ素ナトリウム (NaBH<sub>4</sub>) (12 mg, 0.32 mmol, 5 eq) を加え、10 min 攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加え酢酸エチルで抽出し、水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧除去した。残渣をトルエン (2 mL) に溶解し、ジアザビシクロウンデセン (DBU) (19.1 μL, 0.128 mmol, 2 eq), ジフェニルリン酸アジド (DPPA) (27.5 μL, 0.128 mmol, 2 eq) を加え、アルゴン雰囲気下、80 °C で 1 h 攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで 2 回抽出し、水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧除去した。シリカゲルクロマトグラフィーで粗精製し (*n*-ヘキサン/酢酸エチル = 95/5–71/29), 化合物 (22) (19.7 mg) をクルードで得た。これ以上精製をせず全量を次の反応に使用した。



化合物 (22) をテトラヒドロフラン/水 (3 mL/0.3 mL) に溶解し、トリフェニルホスフィン(PPh<sub>3</sub>) (33.4 mg, 0.128 mmol, 2 eq) を加え、アルゴン雰囲気下で 19 h 加熱還流した。溶媒を減圧除去し、シリカゲルクロマトグラフィーで粗精製した (ジクロロメタン/メタノール = 93/7–86/14)。ジクロロメタン (5 mL) に溶解し、クロラニル (5 mg) を加え、室温で 1 h 攪拌した。溶媒を減圧除去し、HPLC で精製し (溶離液 A : 水, 0.1%トリフルオロ酢酸, 1%アセトニトリル, 溶離液 B : アセトニトリル, 1%水, A/B = 90/10–0/100 (40 min)), シリカゲルクロマトグラフィーで精製し (ジクロロメタン/メタノール = 91/9–84/16), AMTMR (24) (10.2 mg, 43% (4 ステップ)) を赤色固体として得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.34 (d, *J* = 7.4 Hz, 1 H), 7.29 (d, *J* = 7.1 Hz, 1 H), (t, *J* = 7.3 Hz, 1 H), 6.92 (d, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 6.80 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H), 6.45 (d, *J* = 2.5 Hz, 2

H), 6.41 (dd,  $J = 8.6, 2.5$  Hz, 2 H), 4.47 (s, 2 H), 2.94 (s, 12 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  151.5 (C), 150.9 (C), 148.4 (C), 140.8 (C), 129.2 (CH), 127.9 (CH), 127.3 (CH), 124.9 (CH), 122.1 (CH), 116.5 (C), 108.9 (CH), 99.2 (CH), 65.7 (C), 51.4 ( $\text{CH}_2$ ), 40.7 ( $\text{CH}_3$ ); HRMS ( $m/z$ ):  $[\text{M}]^+$  calcd. for  $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}$ , 372.20704; found, 372.20743.

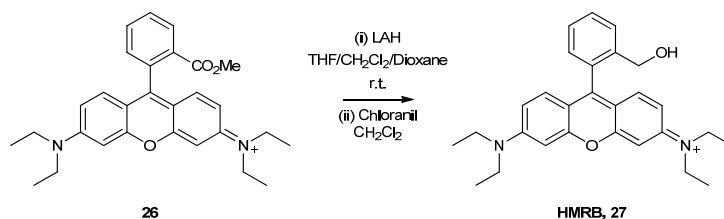
### ローダミン B メチルエステル (26)



ローダミン B (25) (0.95 g, 2 mmol, 1 eq) を脱水  $N,N$ -ジメチルホルムアミド (20 mL) に溶解し、ヨウ化メチル (MeI) (0.15 mL, 2.4 mmol, 1.2 eq), 炭酸セシウム (0.78 g, 2.4 mmol, 1.2 eq) を加え、室温下で終夜攪拌し、溶媒を減圧除去した。残渣をジクロロメタンに溶解し、水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧除去した。シリカゲルクロマトグラフィーで精製し (ジクロロメタン/メタノール = 99/1-90/10), ローダミン B メチルエステル (26) (1.4 g, quant.) を得た。

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.28 (dd,  $J = 7.9, 0.9$  Hz, 1 H), 8.00 (s, 1 H), 7.83 (dt,  $J = 7.5, 1.3$  Hz, 1 H), 7.74 (dt,  $J = 7.7, 1.3$  Hz, 1 H), 7.31 (dd,  $J = 7.6, 1.0$  Hz, 1 H), 7.05 (d,  $J = 9.5$  Hz, 2 H), 6.89 (dd,  $J = 9.5, 2.5$  Hz, 2 H), 6.80 (d,  $J = 2.5$  Hz, 2 H), 3.64 (q,  $J = 7.3, 8$  H), 1.32 (t,  $J = 7.3, 12$  H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  165.4, 158.9, 157.7, 155.5, 133.7, 133.2, 131.3, 131.2, 130.4, 130.2, 129.7, 114.3, 113.5, 96.3, 52.6, 46.2, 12.7; HRMS ( $m/z$ ):  $[\text{M}]^+$  calcd. for  $\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_3$ , 457.24857; found, 457.24934.

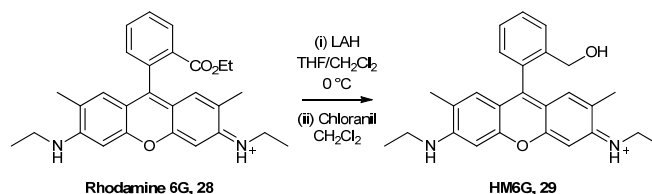
## HMRB (27)



化合物 (26) (560 mg, 1.13 mmol) のテトラヒドロフラン (20 mL), ジオキサン (5 mL), ジクロロメタン (50 mL) 懸濁液を 0 °C に冷却し, 水素化アルミニウムリチウム (LAH) を原料が消失するまで加え, 室温で 1 h 攪拌した. 水を加え, 有機溶媒を減圧除去した後, ジクロロメタンで 3 回抽出した. 有機相を水, 飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥し, 溶媒を減圧除去した. 残渣をジクロロメタン (50 mL) に溶解し, クロラニル (450 mg) を加え, 室温で 30 min 攪拌した. 水, 飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥し, 溶媒を減圧除去した. 残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製し (ジクロロメタン/メタノール = 92/8–85/15), **HMRB (27)** (40 mg, 8%) を得た.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta$  7.76 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1 H), 7.67 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1 H), 7.56 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1 H), 7.29 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1 H), 7.20 (d,  $J = 9.5$  Hz, 2 H), 7.06 (dd,  $J = 9.5, 2.4$  Hz, 2 H), 6.99 (d,  $J = 2.4$  Hz, 2 H), 4.35 (s, 2 H), 3.69 (q,  $J = 7.1, 8$  H), 1.31 (t,  $J = 7.1, 12$  H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, MeOD + NaOD):  $\delta$  153.6, 150.1, 146.1, 140.6, 130.8, 129.3, 129.0, 125.0, 121.7, 112.9, 109.2, 98.8, 86.3, 71.9, 45.4, 12.9; HRMS ( $m/z$ ):  $[\text{M}]^+$  calcd. for  $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_2$ , 429.25365; found, 429.25406.

## HMR6G (29)

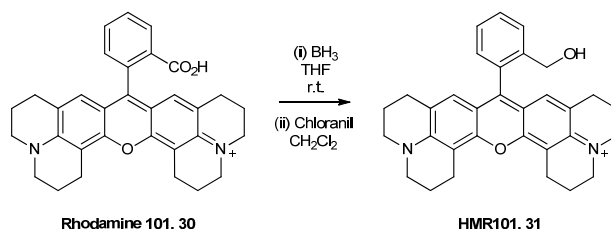


ローダミン 6G (28) (100 mg, 0.2 mmol) のテトラヒドロフラン (5 mL), ジクロロメタン (1 mL) 溶液を 0 °C に冷却し, 水素化アルミニウムリチウム (LAH) を原料が消失するまで加えた. 水を加え, ジクロロメタンで 2 回抽出した. 有機相を飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥し, 溶媒を減圧除去した. 残渣をジクロロメタン (5 mL) に溶解し, クロラニル (88 mg) を加え, 室温で

30 min 攪拌した。水，飽和食塩水で洗浄後，無水硫酸ナトリウムで乾燥し，溶媒を減圧除去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製し（ジクロロメタン／メタノール=90／10–85／15），**HMR6G (29)** (30 mg, 36%) を得た。

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta$  7.78 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1 H), 7.69 (dt,  $J = 7.6, 1.2$  Hz, 1 H), 7.58 (dt,  $J = 7.5, 1.1$  Hz, 1 H), 7.27 (dd,  $J = 7.5, 0.9$  Hz, 1 H), 6.94 (d,  $J = 0.9$  Hz, 2 H), 6.89 (s, 2 H), 4.32 (s, 2 H), 3.52 (q,  $J = 7.2, 4$  H), 2.14 (s, 6 H), 1.36 (t,  $J = 7.2, 6$  H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, MeOD):  $\delta$  159.0, 157.8, 157.5, 141.0, 132.3, 131.3, 130.4, 130.3, 129.5, 128.8, 126.9, 114.9, 94.9, 62.8, 39.4, 17.6, 14.0; HRMS ( $m/z$ ):  $[\text{M}]^+$  calcd. for  $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_2$ , 401.22235; found, 401.22242.

### **HMR101 (31)**



ローダミン 101 (**30**) (115 mg, 0.23 mmol) のテトラヒドロフラン (5 mL) 溶液を 0 °C に冷却し，1 M ボランテトラヒドロフラン溶液 (1 mL, 1 mmol) を加えた。室温で終夜攪拌後，水を加え，ジクロロメタンで抽出した。有機相を飽和食塩水で洗浄後，無水硫酸ナトリウムで乾燥し，溶媒を減圧除去した。残渣をジクロロメタン (5 mL) に溶解し，クロラニル (200 mg) を加え，室温で 30 min 攪拌した。水，飽和食塩水で洗浄後，無水硫酸ナトリウムで乾燥し，溶媒を減圧除去した。残渣を分取薄層クロマトグラフィーで粗精製し（ジクロロメタン／メタノール = 10／1, 0.1% トリフルオロ酢酸），ジクロロメタンに溶解し，飽和炭酸ナトリウム水溶液で洗浄後，無水硫酸ナトリウムで乾燥し，溶媒を減圧除去した。残渣を HPLC で精製し（溶離液 A：水，0.1%トリフルオロ酢酸，1%アセトニトリル，溶離液 B：アセトニトリル，1%水，A／B = 60／40–0／100 (30 min)），**HMR101 (31)** (38 mg, 34%) を得た。

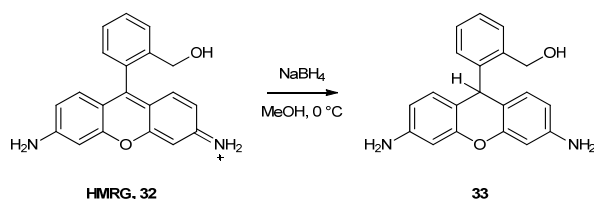
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta$  7.75 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1 H), 7.65 (dt,  $J = 7.6, 1.2$  Hz, 1 H), 7.53 (dt,  $J = 7.5, 1.0$  Hz, 1 H), 7.20 (dd,  $J = 7.5, 0.9$  Hz, 1 H), 6.68 (s, 2 H), 4.29 (s, 2 H), 3.55 (m, 8 H), 3.08 (m, 4 H), 2.69 (m, 4 H), 2.11 (m, 4 H), 1.96 (m, 4 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, MeOD):  $\delta$  155.2, 153.6, 152.7, 141.0, 132.6, 131.0, 130.4, 129.1, 128.6, 127.4, 125.5, 114.2, 106.6, 62.7, 51.9, 51.4, 28.5, 21.8, 21.0, 20.9; HRMS ( $m/z$ ):  $[\text{M}]^+$

calcd. for C<sub>32</sub>H<sub>33</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 477.25365; found, 477.25375.

### HMRG (32)

HMRG (32) は既報に従って合成した<sup>105</sup>.

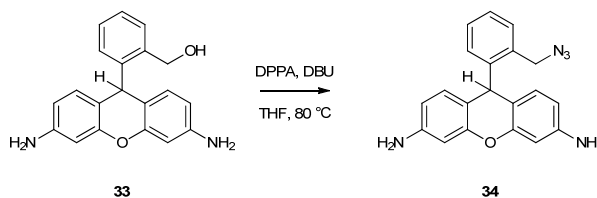
### Leuco HMRG (33)



HMRG (32) (53.7 mg, 0.169 mmol, 1 eq) をメタノール (5 mL) に溶解し, 0 °C に冷却後, 水素化ホウ素ナトリウム (64.0 mg, 1.69 mmol, 10 eq) を加え, 0 °C で 10 min 攪拌した. 水を加え, 酢酸エチルで 2 回抽出し, 飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥し, 溶媒を減圧除去し, **Leuco HMRG (33)** (45.7 mg, 85%) を得た.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD): δ 7.43-7.39 (m, 1 H), 7.18-7.13 (m, 2 H), 7.08-7.05 (m, 1 H), 6.65 (d, *J* = 8.2 Hz, 2 H), 6.42 (d, *J* = 2.3 Hz, 2 H), 6.31 (dd, *J* = 8.2, 2.3 Hz, 2 H), 5.38 (s, 1 H), 4.63 (s, 2 H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, MeOD): δ 152.8 (C), 148.5 (C), 146.6 (C), 139.5 (C), 131.9 (CH), 131.2 (CH), 128.9 (CH), 128.7 (CH), 127.3 (CH), 115.5 (C), 112.2 (CH), 103.4 (CH), 63.0 (CH<sub>2</sub>), 40.2 (CH); HRMS (*m/z*): [M+Na]<sup>+</sup> calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>2</sub>, 341.12605; found, 341.12642.

### Leuco-RG-CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub> (34)



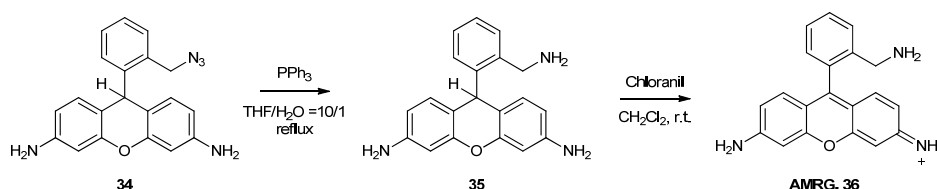
化合物 (33) (39.5 mg, 0.124 mmol, 1 eq) をテトラヒドロフラン (5 mL) に溶解し, ジアザビシクロウンデセン (DBU) (37.1 μL, 0.248 mmol, 2 eq), ジフェニルリン酸アジド (DPPA) (53.5 μL, 0.248 mmol, 2 eq) を加え, アルゴン雰囲気下, 80 °C で 17 h 攪拌した. 溶媒を減圧除去し, 残渣をシリカゲルクロマトグラフィ



ーで精製し (*n*-ヘキサン/酢酸エチル = 60/40–40/60), 化合物 (34) (25.7 mg, 60%) を得た.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta$  7.33 (dd,  $J = 7.2, 1.7$  Hz, 1 H), 7.27–7.19 (m, 2 H), 7.14 (dd,  $J = 7.3, 1.7$  Hz, 1 H), 6.58 (dd,  $J = 8.3, 0.6$  Hz, 2 H), 6.43 (d,  $J = 2.3$  Hz, 2 H), 6.32 (dd,  $J = 8.3, 2.3$  Hz, 2 H), 5.33 (s, 1 H), 4.41 (s, 2 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, MeOD):  $\delta$  152.8 (C), 148.8 (C), 147.5 (C), 134.3 (C), 132.6 (CH), 131.1 (CH), 131.0 (CH), 129.9 (CH), 127.7 (CH), 115.2 (C), 112.3 (CH), 103.5 (CH), 53.4 (CH<sub>2</sub>), 40.6 (CH); HRMS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>NaO, 366.13253; found, 366.13300.

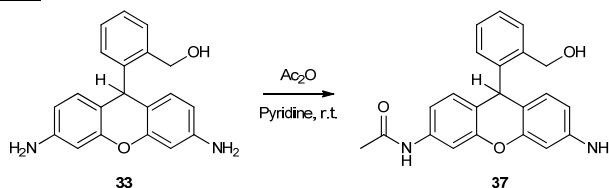
### AMRG (36)



化合物 (34) (23.9 mg, 0.070 mmol, 1 eq) をテトラヒドロフラン/水 (5 mL/0.5 mL) に溶解し, トリフェニルホスフィン (PPh<sub>3</sub>) (36.5 mg, 0.139 mmol, 2 eq) を加え, アルゴン雰囲気下で 18 h 加熱還流した. 溶媒を減圧除去し, ジクロロメタン (5 mL) に溶解し, クロラニル (34.2 mg) を加え, 室温で 30 min 攪拌した. 溶媒を減圧除去し, 残渣を HPLC で精製し (溶離液 A: 水, 0.1%トリフルオロ酢酸, 1%アセトニトリル, 溶離液 B: アセトニトリル, 1%水, A/B = 90/10-0/100 (40 min)), AMRG (36) (28.8 mg) を赤色固体として得た. NMR 測定のため, ジクロロメタンに溶解し, 飽和食塩水/0.1 N 水酸化ナトリウム水溶液 = 10/1 で洗浄後, 硫酸ナトリウムで乾燥し, 溶媒を減圧除去し, AMRG (36) (20.1 mg, 92%, 閉環体) をピンク色固体として得た.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.33 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1 H), 7.29 (dt,  $J = 7.2, 0.9$  Hz, 1 H), 7.20 (t,  $J = 7.3$  Hz, 1 H), 6.91 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1 H), 6.71 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2 H), 6.42 (d,  $J = 2.3$  Hz, 2 H), 6.32 (dd,  $J = 8.4, 2.3$  Hz, 2 H), 4.45 (s, 2 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  151.5 (C), 148.2 (C), 146.7 (C), 140.7 (C), 129.6 (CH), 127.9 (CH), 127.4 (CH), 124.9 (CH), 122.2 (CH), 118.6 (C), 111.4 (CH), 101.8 (CH), 65.7 (C), 51.3 (CH<sub>2</sub>); HRMS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O, 316.14444; found, 316.14626.

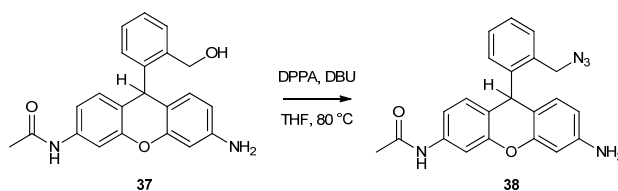
### Leuco-HMAcRG (37)



化合物 (33) (27.3 mg, 0.086 mmol, 1 eq) のピリジン (3 mL) 溶液を 0 °C に冷却し, 無水酢酸 (8.1  $\mu$ L, 0.086 mmol, 1 eq) を加え, アルゴン雰囲気下, 室温で 13 h 攪拌した. 溶媒を減圧除去し, 残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製し (*n*-ヘキサン/酢酸エチル = 30/70–12/88), 化合物 (37) (12.0 mg, 39%) を得た.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta$  7.43 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1 H), 7.42–7.40 (m, 1 H), 7.20–7.14 (m, 2 H), 7.07–7.04 (m, 1 H), 6.97 (dd,  $J = 8.5, 2.3$  Hz, 1 H), 6.87 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1 H), 6.67 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1 H), 6.45 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1 H), 6.33 (dd,  $J = 8.2, 2.3$  Hz, 1 H), 5.50 (s, 1 H), 4.67 (d,  $J = 5.3$  Hz, 2 H), 2.10 (s, 3 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, MeOD):  $\delta$  171.6 (C), 152.6 (C), 152.3 (C), 148.9 (C), 146.4 (C), 139.5 (C), 139.3 (C), 131.9 (CH), 131.2 (CH), 130.9 (CH), 129.2 (CH), 129.0 (CH), 127.5 (CH), 121.8 (C), 115.7 (CH), 114.9 (C), 112.5 (CH), 108.7 (CH), 103.3 (CH), 63.2 (CH<sub>2</sub>), 40.1 (CH), 23.8 (CH<sub>3</sub>); HRMS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>3</sub>, 383.13661; found, 383.13701.

### Leuco-AcRG-CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub> (38)

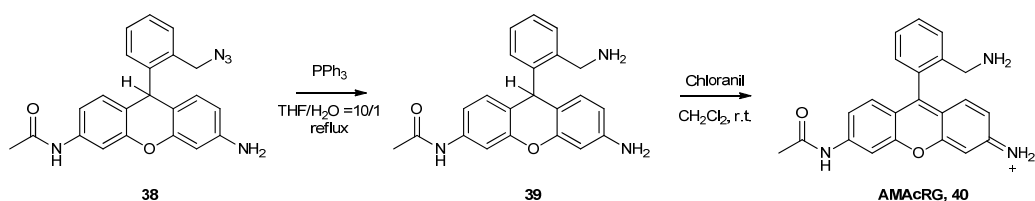


化合物 (37) (12.0 mg, 0.036 mmol, 1 eq) のテトラヒドロフラン (3 mL) 溶液に, ジアザビシクロウンデセン (DBU) (10.7  $\mu$ L, 0.072 mmol, 2 eq), ジフェニルリン酸アジド (DPPA) (15.4  $\mu$ L, 0.072 mmol, 2 eq) を加え, アルゴン雰囲気下, 80 °C で 17 h 攪拌した. 溶媒を減圧除去し, 残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製し (*n*-ヘキサン/酢酸エチル = 40/60–20/80), 化合物 (38) (5.1 mg, 37%) を白色固体として得た.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta$  7.46 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1 H), 7.36–7.33 (m, 1 H), 7.29–7.20 (m, 2 H), 7.14–7.12 (m, 1 H), 6.99 (dd,  $J = 8.4, 2.1$  Hz, 1 H), 6.79 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1 H), 6.60 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1 H), 6.47 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1 H), 6.34 (dd,  $J = 8.2, 2.3$  Hz, 1 H), 5.42

(s, 1 H), 4.45 (s, 2 H), 2.11 (s, 3 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, MeOD):  $\delta$  171.7 (C), 152.6 (C), 152.3 (C), 149.1 (C), 147.1 (C), 139.6 (C), 134.3 (C), 132.6 (CH), 131.3 (CH), 131.0 (CH), 130.7 (CH), 130.1 (CH), 127.9 (CH), 121.5 (C), 115.8 (CH), 114.6 (C), 112.5 (CH), 108.8 (CH), 103.4 (CH), 53.5 (CH<sub>2</sub>), 40.5 (CH), 23.8 (CH<sub>3</sub>); HRMS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>2</sub>, 408.14310; found, 408.14387.

### AMAcRG (40)



化合物 (38) (5.1 mg, 0.013 mmol, 1 eq) をテトラヒドロフラン/水 (3 mL/0.3 mL) に溶解し, トリフェニルホスフィン (PPh<sub>3</sub>) (6.9 mg, 0.026 mmol, 2 eq) を加え, アルゴン雰囲気下で 23 h 加熱還流した. 溶媒を減圧除去し, ジクロロメタン (3 mL) に溶解し, クロラニル (15 mg) を加え, 室温で 30 min 攪拌した. 溶媒を減圧除去し, 残渣を HPLC で精製し (溶離液 A: 水, 0.1%トリフルオロ酢酸, 1%アセトニトリル, 溶離液 B: アセトニトリル, 1%水, A/B = 90/10-0/100 (40 min)), **AMAcRG (40)** (6.6 mg) を赤色固体として得た. NMR 測定のため, ジクロロメタンに溶解し, 飽和食塩水/0.1 N 水酸化ナトリウム水溶液 = 10/1 で洗浄後, 硫酸ナトリウムで乾燥し, 溶媒を減圧除去し, **AMAcRG (40)** (3.0 mg, 89%, 閉環体) をピンク色固体として得た.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta$  7.56 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1 H), 7.42 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 1 H), 7.35 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 1 H), 7.26 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 1 H), 7.05 (dd,  $J$  = 8.5, 2.1 Hz, 1 H), 6.86 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 1 H), 6.74 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1 H), 6.59 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1 H), 6.50 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 1 H), 6.40 (dd,  $J$  = 8.4, 2.3 Hz, 1 H), 4.31 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 2 H), 2.11 (s, 3 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, MeOD):  $\delta$  171.7 (C), 153.1 (C), 152.4 (C), 150.2 (C), 148.1 (C), 142.4 (C), 140.3 (C), 130.2 (CH), 129.9 (CH), 129.1 (CH), 129.0 (CH), 125.7 (CH), 123.4 (C), 123.3 (CH), 116.5 (C), 115.9 (CH), 112.7 (CH), 108.5 (CH), 102.5 (CH), 67.7 (C), 51.3 (CH<sub>2</sub>), 23.9 (CH<sub>3</sub>); HRMS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, 358.15500; found, 358.15498.

## 吸収・蛍光スペクトル測定

蛍光色素をジメチルスルホキシド (ルミナゾール<sup>®</sup>, Dojindo Laboratories) に溶解し, 10 mM のストック溶液を調製した. ストック溶液を 0.2 M リン酸緩衝液で 0.5  $\mu$ M になるように希釈し, 測定した. 吸収スペクトルは UV-2450 UV/Vis spectrometer (Shimadzu Corporation), 蛍光スペクトルは F-7000 fluorescence spectrometer (Hitachi High-Technologies Corporation) を用いて測定した.

## レーザーフラッシュフォトリス (LFP)

蛍光色素を 10 mM リン酸緩衝液 (pH7.4, 1-2%ジメチルスルホキシド) に溶解し, 308 nm の吸光度が約 0.2 になるように濃度を調整した. 測定は 22 °C で行った. 励起光源として XeCl エキシマーレーザー (Lambda Physik, Lextra 50, パルス幅: 17 ns, 308 nm, 10 mJ/pulse) を使用した. 過渡吸収をデジタルストレージオシロスコープ (Tektronix, TDS-744 500 MHz 2G Samples/s 又は TDS-540 500MHz 1G Sample/s) を用いて記録した. 開環体の持続時間 ( $\tau$ ) は過渡吸収の減衰曲線を一次の指数関数でフィッティングして算出した.

## 蛍光色素によるタンパク質のラベル化

蛍光色素の *N*-ヒドロキシスクシンイミドエステル (Dye-SE) をジメチルスルホキシド (ルミナゾール<sup>®</sup>, Dojindo Laboratories) に溶解し, 10 mM のストック溶液を調製した. 一分子イメージング及び核膜孔の SLM に用いた抗体については, goat anti-mouse secondary antibody (IgG, Sigma-Aldrich), Dye-SE, PBS (pH 7.4, GIBCO)/0.2 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) = 1/1 を混合し, 室温下で 30 min インキュベートした. RecA フィラメントの SLM については, RecAf (New England Biolabs) を用いた. Tris-HCl 緩衝液を 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 8.5) に置換し, RecAf と Dye-SE を混合し, 37 °C で 30 min インキュベートした. ラベル化タンパク質を PD-10 column 又は PD MiniTrap<sup>TM</sup> G-25 (GE Healthcare) を用いて PBS (pH 7.4) で溶出し, 精製した. タンパク質へのラベル化率 (degree of labeling ratio (DOL)) を Dye [mol]/Protein [mol] とし, ラベル化タンパク質の吸光度と使用したタンパク質濃度より算出した. HMSiR の吸光度測定では開環体で存在する pH 4.5 に調整後,  $\epsilon = 60,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  として濃度を決定した. 一分子イメージングに使用したラベル化抗体の DOL は Alexa647-IgG (0.5), HMSiR-IgG (0.4),

**2MeSiR-IgG** (0.1) であった。核膜孔の SLM に用いた抗体の DOL は **HMSiR-IgG** (1.9) であった。RecA の DOL は Alexa647-RecA (1.3), **HMSiR-RecA** (1.6) であった。微小管の *in vitro* SLM に用いる tubulin を既報<sup>140</sup>に従ってブタの脳から精製し (約 4 mg/mL, PC 緩衝液, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5 mM GTP), 次に 5-(and-6)-carboxytetramethyl-rhodamine, succinimidyl ester (TAMRA-SE, Invitrogen) 又は **HMSiR-SE** を用いてラベル化した。ラベル化した tubulin は BRB80 緩衝液 (80 mM PIPES-NaOH (pH 6.8), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA) に溶解した状態で、液体窒素中で保存した。

### 一分子イメージングのサンプル調製

上述したラベル化抗体 (Dye-IgG) を用いて測定した。2 枚のカバーガラス (Matsunami Glass Ind.) を両面テープで重ねて作製したフローセル中で測定した。カバーガラスは事前に Milli-Q, 99%エタノール, 10 N 水酸化カリウム水溶液の順で 10 min ずつ超音波洗浄し, 10 N 水酸化カリウム水溶液に終夜浸漬後, Milli-Q で洗浄したものを使用した。Dye-IgG がそれぞれ重ならないように低密度でフローセルに吸着し, 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で洗浄後測定に用いた。

### 全反射顕微鏡 (N-STORM) を用いた一分子イメージングと SLM

SLM は N-STORM (Nikon, Apo TIRF 100× 1.49 Oil objective lens, electron-multiplying charge coupled device (EMCCD) camera (iXon DU897; Andor)) を用いて行った。試料面におけるピクセルサイズは 160 nm。測定中は Perfect Focus System により焦点面の位置を維持した。超解像画像 (SLM 画像) は NIS Elements Advanced Research (Nikon) により構築した。

### 一分子イメージングと解析

上述した様に Dye-IgG をフローセルに吸着させ, 全反射顕微鏡 (N-STORM, Nikon) を用いて 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で一分子イメージングを行った。励起光条件: 647 nm (40-100 W cm<sup>-2</sup>). 測定条件: 15 ms/frame, 2,000-10,000 frames, 22 °C。測定データは既報<sup>89</sup>に従って解析した。具体的には, 一分子の中心位置において 7×7 ピクセル (1.12×1.12 μm) の ROI を取り, 蛍光強度の時間変化を抽出した (NIS Elements Advanced Research, Nikon)。各条件において 48-144 分子のデータを MATLAB (Math Works) を用いて解析した。ROI 中の蛍光強度からバッ

クグラウンドの蛍光強度を差し引き、EM-CCD カメラの校正値 (測定条件における蛍光強度と光子数の変換式) を用いて光子数に変換した。開環体の持続時間は蛍光強度が閾値 (バックグラウンドにおける蛍光強度のゆらぎの標準偏差×4) を超えている時間として算出した。明滅当たりの光子数は、1 frame 当たりの光子数と開環体の持続時間から算出した。

### 分子の位置決定精度の評価

フローセルに Dye-IgG とドリフト補正に用いる蛍光ビーズ (FluoSpheres, 0.02  $\mu\text{m}$ , 625/645nm, Life Technologies) を加え、**HMSiR-IgG** はリン酸緩衝液 (pH 7.4), Alexa647 は STORM バッファー (10% glucose (Wako Pure Chemical), 560  $\mu\text{g}/\text{mL}$  glucose oxidase (Sigma-Aldrich), 34  $\mu\text{g}/\text{mL}$  catalase (Wako Pure Chemical), 140 mM  $\beta$ -mercaptoethanol (Wako Pure Chemical), 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0), 10 mM NaCl) を用いて洗浄した後に測定した。励起光条件: 647 nm ( $40\text{-}1500 \text{ W cm}^{-2}$ ). 測定条件: 15 ms/frame, 24 °C. NIS-Elements Advanced Research (Nikon) を用いてドリフト補正, 位置決定を行い, 60 分子の位置情報を重ね合わせて, ヒストグラムを作成し, 二次元ガウス関数でフィッティングして分子の位置決定精度を FWHM として算出した。

### プラスミド DNA 上の RecA フィラメントの *in vitro* SLM

上述した Dye-RecA (80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), プラスミド DNA ( $\Phi\text{X174 RF II DNA}$  (New England Biolabs), 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0), 100 mM NaCl, 7 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1.5 mM ATP- $\gamma$ -S を混合し, 37 °C で 1 h インキュベートし, RecA フィラメントを重合した。RecA フィラメントをそれぞれのイメージングバッファーで希釈し, フローセルに吸着し, SLM を行った。**HMSiR**: 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4), 100 mM NaCl, 7 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1.5 mM ATP- $\gamma$ -S. 励起光条件: 647 nm ( $500 \text{ W cm}^{-2}$ ). 測定条件: 15 ms/frame, 5,000 frames, 23 °C. カットオフ値: 500 フォトン. Alexa647: STORM バッファー (10% glucose (Wako Pure Chemical), 560  $\mu\text{g}/\text{mL}$  glucose oxidase (Sigma-Aldrich), 34  $\mu\text{g}/\text{mL}$  catalase (Wako Pure Chemical), 100 mM MEA (Sigma-Aldrich), 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM NaCl). 励起光条件: 647 nm ( $500 \text{ W cm}^{-2}$ ). 測定条件: レーザー照射により無蛍光状態に変換した後に測定. 15 ms/frame, 10,000 frames, 23 °C. カットオフ値: 300 フォトン。

### In vitro で重合した微小管の SLM

上述したラベル化 tubulin を混合し (unlabeled tubulin/HMSiR-tubulin/TAMRA-tubulin = 40/50/10 (v/v)), BRB80 緩衝液 (1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM GTP 含有) 中で 37 °C, 30 min インキュベートし重合し, 20 μM taxol を加えて安定化した. 重合した微小管を PBS (20 μM taxol 含有) で希釈し, poly-L-lysine (PLL) でコートしたフローセルに吸着させ, PBS (20 μM taxol 含有) で洗浄し, SLM を行った. 励起光条件: TAMRA: 561 nm (180 W cm<sup>-2</sup>), HMSiR: 647 nm (20 W cm<sup>-2</sup>). 測定条件: 23 ms/frame, 20,000 frames (HMSiR), 23 °C.

### HeLa 細胞の核膜孔タンパク質の免疫染色

POM121-GFP 又は Nup107-GFP を安定発現した HeLa 細胞を -20 °C のメタノール中で 30 min 固定化し, PBS で洗浄後, ブロッキングバッファー (PBS, 1% BSA) で 30 min ブロッキングした. 次にブロッキングバッファーで 10 μg/ml になるように希釈した一次抗体 (Anti Green Fluorescent Protein, Monoclonal Antibody, Wako) を細胞に加えて, 室温下で 1 h インキュベートした. PBS で 3 回洗浄後, ブロッキングバッファーで 30 min ブロッキングした. ブロッキングバッファーで 10 μg/ml になるように希釈した HMSiR-IgG (DOL = 1.9) を細胞に加えて, 室温下で 40 min インキュベートし, PBS で 3 回洗浄し, 測定に用いた.

### スピニングディスク共焦点レーザー顕微鏡を用いた核膜孔の SLM

核膜孔の SLM はスピニングディスク共焦点顕微鏡システムを接続した Olympus IX81 倒立顕微鏡 (spinning-disk confocal microscope system (CSU-X1; Yokogawa Electric), cooled EMCCD camera (iXon3 DU-897; Andor), oil-immersion objective (60×, APON OTIRF, NA1.49; Olympus) を用いて行った. 2×の拡大レンズを顕微鏡とスピニングディスクの間に挿入し, ピンホールサイズと対物レンズの倍率を一致させた. 試料面におけるピクセルサイズは 100 nm. MetaMorph (Molecular Devices) により制御した. 励起光源: 640 nm (Sapphire; Coherent). フィルター: 692/40 nm バンドパスフィルター. 測定条件: 300 ms/frame, 10 frames. 超解像画像 (SLM 画像) は rapidSTORM<sup>141</sup> を用いて構築した. 核膜孔タンパク質の半径は, 中心からの距離の二乗平均平方根として算出した. 隣接点の中心角は, POM121 の SLM 画像における輝点の座標から, 隣接する 2 点の中心角を求

め平均値として算出した。

### HeLa 生細胞／固定細胞における $\beta$ -tubulin-SNAP のラベル化と SLM

HeLa 細胞をガラスチャンバー (Labtek II chambered coverglass (NUNC)) に播種し, D-MEM (高グルコース, L-glutamine, Phenol Red 含有 (Wako Pure Chemical), 10% FBS (Invitrogen), 1% PS (Invitrogen)) 中, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> で培養した。測定前日に $\beta$ -tubulin-SNAP のプラスミドを Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて, プロトコルに従いトランスフェクションし, 同時に 100 nM **HMSiR-BG** を添加し, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> で終夜インキュベートした。生細胞における SLM では, 培地 (D-MEM) で 3 回洗浄後, 培地中で SLM を行った。固定細胞における SLM では, 下記の順で固定化を行った。培地を除去後, 37 °C の BRB80 緩衝液 (0.2% NP-40 (substitute) 含有) で 30 s インキュベートし, -20 °C のメタノール (5 mM EGTA 含有) で 30 min 固定化した。BRB80 緩衝液で 3 回洗浄後, PBS に置換して SLM を行った。励起光条件: 647 nm (500 W cm<sup>-2</sup>)。測定条件: 15 ms/frame, 5,000 frames, 24 °C。カットオフ値: 500 フォトン。

### Vero 生細胞における $\beta$ -tubulin-Halo のラベル化と SLM

Vero 細胞を D-MEM (高グルコース, L-glutamine, Phenol Red 含有 (Wako Pure Chemical), 10% FBS (Invitrogen), 1% PS (Invitrogen)) 中, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> で培養した。測定前日に $\beta$ -tubulin-Halo のプラスミドを X-treamGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche) を用いて, プロトコルに従いトランスフェクションし, 同時に 100 nM **HMSiR-Halo** 及び 0.3 nM HaloTag<sup>®</sup> TMR Ligand (Promega) を添加し, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> で終夜インキュベートした。ガラス面に非特異的に吸着した蛍光色素によるバックグラウンドを低減するため, 細胞を新しいガラスチャンバー (Labtek II chambered coverglass (NUNC)) を事前に 0.1 mg/mL Cellmatrix Type I-C (Nitta Gelatin Inc.) でコートしたものにリプレATINGした。3 h インキュベートし細胞が吸着した後に培地を Leibovitz's L-15 (Life Technologies, 10% FBS (Invitrogen) 含有) に置換して測定した。励起光条件: 647 nm (40 W cm<sup>-2</sup>)。測定条件: 30 ms/frame, 24 °C。カットオフ値: 100 フォトン。



## 参考文献

1. Shaner, N. C., Steinbach P. A., Tsien R. Y. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods* **2**, 905-909 (2005).
2. Giepmans, B. N. G., Adams S. R., Ellisman M. H., Tsien R. Y. The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* **312**, 217-224 (2006).
3. Kobayashi, H., Ogawa M., Alford R., Choyke P. L., Urano Y. New strategies for fluorescent probe design in medical diagnostic imaging. *Chem. Rev.* **110**, 2620-2640 (2009).
4. Chan, J., Dodani S. C., Chang C. J. Reaction-based small-molecule fluorescent probes for chemoselective bioimaging. *Nat. Chem.* **4**, 973-984 (2012).
5. Terai, T., Nagano T. Small-molecule fluorophores and fluorescent probes for bioimaging. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.*, 1-13 (2013).
6. Lavis, L. D., Raines R. T. Bright building blocks for chemical biology. *ACS Chem. Biol.* **9**, 855-866 (2014).
7. Abbe, E. Beiträge zur theorie des mikroskops und der mikroskopischen wahrnehmung. *Archiv f. mikrosk. Anatomie* **9**, 413-418 (1873).
8. Rayleigh, L. On the theory of optical images, with special reference to the microscope. *J. R. Microsc. Soc.* **23**, 474-482 (1903).
9. Hell, S. W. Far-field optical nanoscopy. *Science* **316**, 1153-1158 (2007).
10. Hell, S. W. Microscopy and its focal switch. *Nat. Methods* **6**, 24-32 (2009).
11. Huang, B., Babcock H., Zhuang X. Breaking the diffraction barrier: Super-resolution imaging of cells. *Cell* **143**, 1047-1058 (2010).
12. Toomre, D., Bewersdorf J. A new wave of cellular imaging. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **26**, 285-314 (2010).
13. Yamanaka, M., Smith N. I., Fujita K. Introduction to super-resolution microscopy. *Microscopy* **63**, 177-192 (2014).
14. Hell, S. W., Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: Stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett.* **19**,

- 780-782 (1994).
15. Klar, T. A., Hell S. W. Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy. *Opt. Lett.* **24**, 954-956 (1999).
  16. Klar, T. A., Jakobs S., Dyba M., Egner A., Hell S. W. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 8206-8210 (2000).
  17. Rittweger, E., Han K. Y., Irvine S. E., Eggeling C., Hell S. W. STED microscopy reveals crystal colour centres with nanometric resolution. *Nat. Photon.* **3**, 144-147 (2009).
  18. Meyer, L. et al. Dual-color STED microscopy at 30-nm focal-plane resolution. *Small* **4**, 1095-1100 (2008).
  19. Schmidt, R. et al. Spherical nanosized focal spot unravels the interior of cells. *Nat. Methods* **5**, 539-544 (2008).
  20. Chmyrov, A. et al. Nanoscopy with more than 100,000 'doughnuts'. *Nat. Methods* **10**, 737-740 (2013).
  21. Vicidomini, G. et al. Sharper low-power STED nanoscopy by time gating. *Nat. Methods* **8**, 571-573 (2011).
  22. Westphal, V. et al. Video-rate far-field optical nanoscopy dissects synaptic vesicle movement. *Science* **320**, 246-249 (2008).
  23. Berning, S., Willig K. I., Steffens H., Dibaj P., Hell S. W. Nanoscopy in a living mouse brain. *Science* **335**, 551 (2012).
  24. List of reported STED dyes. <http://nanobiophotonics.Mpibpc.Mpg.De/old/dyes/>. Max Planck Institutes for Biophysical Chemistry, Dept. of NanoBiophotonics, Hell lab.
  25. Bretschneider, S., Eggeling C., Hell S. W. Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy by optical shelving. *Phys. Rev. Lett.* **98**, 218103 (2007).
  26. Grotjohann, T. et al. Diffraction-unlimited all-optical imaging and writing with a photochromic GFP. *Nature* **478**, 204-208 (2011).
  27. Hofmann, M., Eggeling C., Jakobs S., Hell S. W. Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly

- photoswitchable proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 17565-17569 (2005).
28. Gustafsson, M. G. L. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J. Microsc.* **198**, 82-87 (2000).
  29. Gustafsson, M. G. L. Nonlinear structured-illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 13081-13086 (2005).
  30. Fiolka, R., Shao L., Rego E. H., Davidson M. W., Gustafsson M. G. L. Time-lapse two-color 3D imaging of live cells with doubled resolution using structured illumination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 5311-5315 (2012).
  31. Kner, P., Chhun B. B., Griffis E. R., Winoto L., Gustafsson M. G. L. Super-resolution video microscopy of live cells by structured illumination. *Nat. Methods* **6**, 339-342 (2009).
  32. Betzig, E. et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* **313**, 1642-1645 (2006).
  33. Hess, S. T., Girirajan T. P. K., Mason M. D. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophys. J.* **91**, 4258-4272 (2006).
  34. Rust, M. J., Bates M., Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat. Methods* **3**, 793-796 (2006).
  35. Betzig, E. Proposed method for molecular optical imaging. *Opt. Lett.* **20**, 237-239 (1995).
  36. Klein, T., Proppert S., Sauer M. Eight years of single-molecule localization microscopy. *Histochem. Cell Biol.* **141**, 561-575 (2014).
  37. Shroff, H. et al. Dual-color superresolution imaging of genetically expressed probes within individual adhesion complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 20308-20313 (2007).
  38. Bates, M., Huang B., Dempsey G. T., Zhuang X. Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes. *Science* **317**, 1749-1753 (2007).
  39. Juetten, M. F. et al. Three-dimensional sub-100 nm resolution fluorescence

- microscopy of thick samples. *Nat. Methods* **5**, 527-529 (2008).
40. Huang, B., Jones S. A., Brandenburg B., Zhuang X. Whole-cell 3D STORM reveals interactions between cellular structures with nanometer-scale resolution. *Nat. Methods* **5**, 1047-1052 (2008).
  41. Shtengel, G. et al. Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 3125-3130 (2009).
  42. Yildiz, A. et al. Myosin V walks hand-over-hand: Single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science* **300**, 2061-2065 (2003).
  43. Thompson, R. E., Larson D. R., Webb W. W. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophys. J.* **82**, 2775-2783 (2002).
  44. Mortensen, K. I., Churchman L. S., Spudich J. A., Flyvbjerg H. Optimized localization analysis for single-molecule tracking and super-resolution microscopy. *Nat. Methods* **7**, 377-381 (2010).
  45. Lord, S. J., Lee H.-I. D., Moerner W. E. Single-molecule spectroscopy and imaging of biomolecules in living cells. *Anal. Chem.* **82**, 2192-2203 (2010).
  46. Dertinger, T., Colyer R., Iyer G., Weiss S., Enderlein J. Fast, background-free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 22287-22292 (2009).
  47. Dertinger, T., Colyer R., Vogel R., Enderlein J., Weiss S. Achieving increased resolution and more pixels with superresolution optical fluctuation imaging (SOFI). *Opt. Express* **18**, 18875-18885 (2010).
  48. Dertinger, T., Heilemann M., Vogel R., Sauer M., Weiss S. Superresolution optical fluctuation imaging with organic dyes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 9441-9443 (2010).
  49. Cho, S. et al. Simple super-resolution live-cell imaging based on diffusion-assisted forster resonance energy transfer. *Sci. Rep.* **3**, 1208 (2013).
  50. Fernandez-Suarez, M., Ting A. Y. Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 929-943 (2008).
  51. Heilemann, M., Dedecker P., Hofkens J., Sauer M. Photoswitches: Key

- molecules for subdiffraction-resolution fluorescence imaging and molecular quantification. *Laser Photon. Rev.* **3**, 180-202 (2009).
52. Vogelsang, J. et al. Make them blink: Probes for super-resolution microscopy. *ChemPhysChem* **11**, 2475-2490 (2010).
  53. van de Linde, S., Heilemann M., Sauer M. Live-cell super-resolution imaging with synthetic fluorophores. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **63**, 519-540 (2012).
  54. Coffman, V. C., Wu J.-Q. Counting protein molecules using quantitative fluorescence microscopy. *Trends Biochem. Sci.* **37**, 499-506 (2012).
  55. Puchner, E. M., Walter J. M., Kasper R., Huang B., Lim W. A. Counting molecules in single organelles with superresolution microscopy allows tracking of the endosome maturation trajectory. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 16015-16020 (2013).
  56. Shcherbakova, D. M., Sengupta P., Lippincott-Schwartz J., Verkhusha V. V. Photocontrollable fluorescent proteins for superresolution imaging. *Annu. Rev. Biophys.* **43**, 303-329 (2014).
  57. Mitchison, T. J., Sawin K. E., Theriot J. A., Gee K., Mallavarapu A. [4] Caged fluorescent probes. In: Gerard M (ed). *Methods in enzymology*, vol. 291. Academic Press, 1998, pp 63-78.
  58. Lord, S. J. et al. A photoactivatable push-pull fluorophore for single-molecule imaging in live cells. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 9204-9205 (2008).
  59. Lee, H.-I. D. et al. Superresolution imaging of targeted proteins in fixed and living cells using photoactivatable organic fluorophores. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 15099-15101 (2010).
  60. Belov, V. N., Wurm C. A., Boyarskiy V. P., Jakobs S., Hell S. W. Rhodamines NN: A novel class of caged fluorescent dyes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 3520-3523 (2010).
  61. Belov, V. N. et al. Masked rhodamine dyes of five principal colors revealed by photolysis of a 2-diazo-1-indanone caging group: Synthesis, photophysics, and light microscopy applications. *Chem. Eur. J.* **20**, 13162-13173 (2014).
  62. Kolmakov, K. et al. Masked red-emitting carbopyronine dyes with photosensitive 2-diazo-1-indanone caging group. *Photochem. Photobiol. Sci.* **11**,

- 522-532 (2012).
63. Banala, S., Maurel D., Manley S., Johnsson K. A caged, localizable rhodamine derivative for superresolution microscopy. *ACS Chem. Biol.* **7**, 289-293 (2011).
  64. Grimm, J. B. et al. Carbofluoresceins and carborhodamines as scaffolds for high-contrast fluorogenic probes. *ACS Chem. Biol.* **8**, 1303-1310 (2013).
  65. Chang, H. et al. A unique series of reversibly switchable fluorescent proteins with beneficial properties for various applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 4455-4460 (2012).
  66. Brakemann, T. et al. A reversibly photoswitchable GFP-like protein with fluorescence excitation decoupled from switching. *Nat. Biotech.* **29**, 942-947 (2011).
  67. Tiwari, D. K., Nagai T. Smart fluorescent proteins: Innovation for barrier-free superresolution imaging in living cells. *Dev. Growth Differ.* **55**, 491-507 (2013).
  68. Irie, M., Fukaminato T., Sasaki T., Tamai N., Kawai T. Organic chemistry: A digital fluorescent molecular photoswitch. *Nature* **420**, 759-760 (2002).
  69. Fukaminato, T. et al. Photochromism of diarylethene single molecules in polymer matrices. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 5932-5938 (2007).
  70. Fukaminato, T. et al. Fluorescence photoswitching of a diarylethene-perylenebisimide dyad based on intramolecular electron transfer. *Photochem. Photobiol. Sci.* **9**, 181-187 (2010).
  71. Fukaminato, T. et al. Single-molecule fluorescence photoswitching of a diarylethene-perylenebisimide dyad: Non-destructive fluorescence readout. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 4984-4990 (2011).
  72. Fukaminato, T. Single-molecule fluorescence photoswitching: Design and synthesis of photoswitchable fluorescent molecules. *J. Photochem. Photobiol. C* **12**, 177-208 (2011).
  73. Uno, K. et al. In situ preparation of highly fluorescent dyes upon photoirradiation. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 13558-13564 (2011).
  74. Fukaminato, T., Tateyama E., Tamaoki N. Fluorescence photoswitching based on a photochromic pKa change in an aqueous solution. *Chem. Commun.* **48**,

- 10874-10876 (2012).
75. Deniz, E. et al. Photoactivatable fluorophores for super-resolution imaging based on oxazine auxochromes. *J. Phys. Chem. C* **116**, 6058-6068 (2012).
  76. Fölling, J. et al. Photochromic rhodamines provide nanoscopy with optical sectioning. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 6266-6270 (2007).
  77. Fölling, J. et al. Fluorescence nanoscopy with optical sectioning by two-photon induced molecular switching using continuous-wave lasers. *ChemPhysChem* **9**, 321-326 (2008).
  78. Belov, V. N., Bossi M. L., Fölling J., Boyarskiy V. P., Hell S. W. Rhodamine spiroamides for multicolor single-molecule switching fluorescent nanoscopy. *Chem. Eur. J.* **15**, 10762-10776 (2009).
  79. Belov, V. N., Bossi M. L. Photoswitching emission with rhodamine spiroamides for super-resolution fluorescence nanoscopies. *Isr. J. Chem.* **53**, 267-279 (2013).
  80. Lee, M. K., Rai P., Williams J., Twieg R. J., Moerner W. E. Small-molecule labeling of live cell surfaces for three-dimensional super-resolution microscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 14003-14006 (2014).
  81. Dempsey, G. T. et al. Photoswitching mechanism of cyanine dyes. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 18192-18193 (2009).
  82. Heilemann, M. et al. Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 6172-6176 (2008).
  83. Heilemann, M., van de Linde S., Mukherjee A., Sauer M. Super-resolution imaging with small organic fluorophores. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 6903-6908 (2009).
  84. Fölling, J. et al. Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return. *Nat. Methods* **5**, 943-945 (2008).
  85. van de Linde, S. et al. Photoinduced formation of reversible dye radicals and their impact on super-resolution imaging. *Photochem. Photobiol. Sci.* **10**, 499-506 (2011).
  86. Wombacher, R. et al. Live-cell super-resolution imaging with trimethoprim conjugates. *Nat. Methods* **7**, 717-719 (2010).

87. Klein, T. et al. Live-cell dSTORM with SNAP-tag fusion proteins. *Nat. Methods* **8**, 7-9 (2011).
88. Lukinavičius, G. et al. A near-infrared fluorophore for live-cell super-resolution microscopy of cellular proteins. *Nat. Chem.* **5**, 132-139 (2013).
89. Dempsey, G. T., Vaughan J. C., Chen K. H., Bates M., Zhuang X. Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging. *Nat. Methods* **8**, 1027-1036 (2011).
90. Steinhauer, C., Forthmann C., Vogelsang J., Tinnefeld P. Superresolution microscopy on the basis of engineered dark states. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 16840-16841 (2008).
91. Carlini, L., Manley S. Live intracellular super-resolution imaging using site-specific stains. *ACS Chem. Biol.* **8**, 2643-2648 (2013).
92. Schwering, M. et al. Far-field nanoscopy with reversible chemical reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 2940-2945 (2011).
93. Sharonov, A., Hochstrasser R. M. Wide-field subdiffraction imaging by accumulated binding of diffusing probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 18911-18916 (2006).
94. Giannone, G. et al. Dynamic superresolution imaging of endogenous proteins on living cells at ultra-high density. *Biophys. J.* **99**, 1303-1310 (2010).
95. Jungmann, R. et al. Multiplexed 3D cellular super-resolution imaging with DNA-PAINT and Exchange-PAINT. *Nat. Methods* **11**, 313-318 (2014).
96. Iinuma, R. et al. Polyhedra self-assembled from DNA tripods and characterized with 3D DNA-PAINT. *Science* **344**, 65-69 (2014).
97. Schneckenburger, H. et al. Light exposure and cell viability in fluorescence microscopy. *J. Microsc.* **245**, 311-318 (2012).
98. Beija, M., Afonso C. A. M., Martinho J. M. G. Synthesis and applications of rhodamine derivatives as fluorescent probes. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 2410-2433 (2009).
99. Kim, H. N., Lee M. H., Kim H. J., Kim J. S., Yoon J. A new trend in rhodamine-based chemosensors: Application of spirolactam ring-opening to



- sensing ions. *Chem. Soc. Rev.* **37**, 1465–1472 (2008).
100. Chen, X., Pradhan T., Wang F., Kim J. S., Yoon J. Fluorescent chemosensors based on spiroring-opening of xanthenes and related derivatives. *Chem. Rev.* **112**, 1910-1956 (2011).
  101. Zheng, H., Zhan X.-Q., Bian Q.-N., Zhang X.-J. Advances in modifying fluorescein and rhodamine fluorophores as fluorescent chemosensors. *Chem. Commun.* **49**, 429-447 (2013).
  102. Kenmoku, S., Urano Y., Kojima H., Nagano T. Development of a highly specific rhodamine-based fluorescence probe for hypochlorous acid and its application to real-time imaging of phagocytosis. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 7313-7318 (2007).
  103. Koide, Y., Urano Y., Hanaoka K., Terai T., Nagano T. Development of an Si-rhodamine-based far-red to near-infrared fluorescence probe selective for hypochlorous acid and its applications for biological imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 5680-5682 (2011).
  104. Urano, Y. et al. Rapid cancer detection by topically spraying a  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase-activated fluorescent probe. *Sci. Transl. Med.* **3**, 110ra119 (2011).
  105. Sakabe, M. et al. Rational design of highly sensitive fluorescence probes for protease and glycosidase based on precisely controlled spirocyclization. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 409-414 (2013).
  106. Kamiya, M. et al.  $\beta$ -Galactosidase fluorescence probe with improved cellular accumulation based on a spirocyclized rhodol scaffold. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 12960-12963 (2011).
  107. Fu, M., Xiao Y., Qian X., Zhao D., Xu Y. A design concept of long-wavelength fluorescent analogs of rhodamine dyes: Replacement of oxygen with silicon atom. *Chem. Commun.*, 1780-1782 (2008).
  108. Koide, Y., Urano Y., Hanaoka K., Terai T., Nagano T. Evolution of group 14 rhodamines as platforms for near-infrared fluorescence probes utilizing photoinduced electron transfer. *ACS Chem. Biol.* **6**, 600-608 (2011).
  109. Knauer, K.-H., Gleiter R. Photochromism of rhodamine derivatives. *Angew. Chem. Int. Ed.* **16**, 113-113 (1977).

110. Willwohl, H., Wolfrum J., Gleiter R. Kinetics and mechanism of the photochromism of N-phenyl-rhodaminelactame. *Laser Chem.* **10**, 63-72 (1989).
111. Corrie, J. E. T. et al. Ring-chain interconversion of sulforhodamine-amine conjugates involves an unusually labile C-N bond and allows measurement of sulfonamide ionization kinetics. *J. Phys. Org. Chem.* **21**, 286-298 (2008).
112. Probes, T. M. The molecular probes<sup>®</sup> handbook—a guide to fluorescent probes and labeling technologies, 11<sup>th</sup> edition
113. Keppler, A. et al. A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. *Nat. Biotech.* **21**, 86-89 (2003).
114. Los, G. V. et al. Halotag: A novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis. *ACS Chem. Biol.* **3**, 373-382 (2008).
115. Hinner, M. J., Johnsson K. How to obtain labeled proteins and what to do with them. *Curr. Opin. Biotechnol.* **21**, 766-776 (2010).
116. Dean, K. M., Palmer A. E. Advances in fluorescence labeling strategies for dynamic cellular imaging. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 512-523 (2014).
117. Takaoka, Y., Ojida A., Hamachi I. Protein organic chemistry and applications for labeling and engineering in live-cell systems. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 2-21 (2013).
118. Benke, A., Manley S. Live-cell dSTORM of cellular DNA based on direct DNA labeling. *ChemBioChem* **13**, 298-301 (2012).
119. Shim, S.-H. et al. Super-resolution fluorescence imaging of organelles in live cells with photoswitchable membrane probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 13978-13983 (2012).
120. Erdmann, R. S. et al. Super-resolution imaging of the Golgi in live cells with a bioorthogonal ceramide probe. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 10242-10246 (2014).
121. Letschert, S. et al. Super-resolution imaging of plasma membrane glycans. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 10921-10924 (2014).
122. Jones, S. A., Shim S.-H., He J., Zhuang X. Fast, three-dimensional super-resolution imaging of live cells. *Nat. Methods* **8**, 499-505 (2011).
123. Quan, T., Zeng S., Huang Z.-L. Localization capability and limitation of

- electron-multiplying charge-coupled, scientific complementary metal-oxide semiconductor, and charge-coupled devices for superresolution imaging. *J. Biomed. Opt.* **15**, 066005 (2010).
124. Tokunaga, M., Imamoto N., Sakata-Sogawa K. Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells. *Nat. Methods* **5**, 159-161 (2008).
  125. Conchello, J.-A., Lichtman J. W. Optical sectioning microscopy. *Nat. Methods* **2**, 920-931 (2005).
  126. Löscherberger, A. et al. Super-resolution imaging visualizes the eightfold symmetry of gp210 proteins around the nuclear pore complex and resolves the central channel with nanometer resolution. *J. Cell. Sci.* **125**, 570-575 (2012).
  127. Szymborska, A. et al. Nuclear pore scaffold structure analyzed by super-resolution microscopy and particle averaging. *Science* **341**, 655-658 (2013).
  128. Cronshaw, J. M., Krutchinsky A. N., Zhang W., Chait B. T., Matunis M. J. Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* **158**, 915-927 (2002).
  129. Hoelz, A., Debler E. W., Blobel G. The structure of the nuclear pore complex. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 613-643 (2011).
  130. Xu, K., Zhong G., Zhuang X. Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons. *Science* **339**, 452-456 (2013).
  131. Dickson, R. M., Cubitt A. B., Tsien R. Y., Moerner W. E. On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein. *Nature* **388**, 355-358 (1997).
  132. Roy, R., Hohng S., Ha T. A practical guide to single-molecule fret. *Nat. Methods* **5**, 507-516 (2008).
  133. Rasnik, I., McKinney S. A., Ha T. Nonblinking and long-lasting single-molecule fluorescence imaging. *Nat. Methods* **3**, 891-893 (2006).
  134. Small, A., Stahlheber S. Fluorophore localization algorithms for super-resolution microscopy. *Nat. Methods* **11**, 267-279 (2014).
  135. Deschout, H. et al. Precisely and accurately localizing single emitters in fluorescence microscopy. *Nat. Methods* **11**, 253-266 (2014).

136. Huang, F. et al. Video-rate nanoscopy using sCMOS camera-specific single-molecule localization algorithms. *Nat. Methods* **10**, 653-658 (2013).
137. Manley, S. et al. High-density mapping of single-molecule trajectories with photoactivated localization microscopy. *Nat. Methods* **5**, 155-157 (2008).
138. Myochin, T., Hanaoka K., Komatsu T., Terai T., Nagano T. Design strategy for a near-infrared fluorescence probe for matrix metalloproteinase utilizing highly cell permeable boron dipyrromethene. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 13730-13737 (2012).
139. Singh, V., Wang S., Kool E. T. Genetically encoded multispectral labeling of proteins with polyfluorophores on a DNA backbone. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 6184-6191 (2013).
140. Hyman, A. et al. [39] Preparation of modified tubulins. In: Richard BV (ed). *Methods in enzymology*, vol. 196. Academic Press, 1991, pp 478-485.
141. Wolter, S. et al. Rapidstorm: Accurate, fast open-source software for localization microscopy. *Nat. Methods* **9**, 1040-1041 (2012).

## 発表文献・学会発表・特許一覧

本研究はこれまでに以下のように論文発表, 学会発表, 特許出願されている。

### 【学術論文】

1. **Shin-nosuke Uno**, Mako Kamiya, Toshitada Yoshihara, Ko Sugawara, Kohki Okabe, Mehmet C. Tarhan, Hiroyuki Fujita, Takashi Funatsu, Yasushi Okada, Seiji Tobita, Yasuteru Urano.  
A spontaneously blinking fluorophore based on intramolecular spirocyclization for live-cell super-resolution imaging.  
*Nature Chemistry*, **6**, 681-689 (2014).

本論文は *Nature Chemistry* の Views and News (Gražvydas Lukinavičius and Kai Johnsson. “Fluorescence microscopy: Strategic blinking”, *Nature Chemistry* **6**, 663 (2014)) 及び日本経済新聞 (2014年7月21日), 財経新聞 (2014年7月23日), 日本経済産業新聞 (2014年7月24日) で紹介された。

### 【総説・解説等】

1. 浦野泰照, 宇野真之介, 神谷真子 「スピロ環化平衡に基づく蛍光プローブの論理的開発—がんイメージング, 超解像イメージングへの応用」, *生体イメージング研究 Update* (第4章), 編集 石井優, 南山堂
2. 宇野真之介, 神谷真子, 浦野泰照 「超解像イメージングを実現する蛍光プローブ」, *光化学*, **45**, 130-136 (2014)
3. 宇野真之介, 神谷真子, 浦野泰照 「自発的に明滅する蛍光色素の開発と超解像顕微鏡への応用」, *生物物理*, **55**, 031-033 (2015)

### 【学会発表】

#### <招待講演>

1. ○宇野真之介, 神谷真子, 吉原利忠, 飛田成史, M. C. Tarhan, 藤田博之, 浦野泰照 「自発的プリンキング機能を有する超解像イメージングプローブの開発」, 日本顕微鏡学会 第70回記念学術講演会, 千葉, 幕張メッセ, 2014年5月

<国際会議における発表>

口頭発表

1. ○**Shin-nosuke Uno**, Mako Kamiya, Toshitada Yoshihara, Seiji Tobita, Mehmet C. Tarhan, Hiroyuki Fujita, Yasuteru Urano. “Development of fluorescent probes for super-resolution imaging based on intramolecular spirocyclization”, International Conference on Photochemistry 2013, Leuven, Belgium, July, 2013.
2. ○**Shin-nosuke Uno**, Mako Kamiya, Toshitada Yoshihara, Ko Sugawara, Kohki Okabe, Mehmet C. Tarhan, Hiroyuki Fujita, Takashi Funatsu, Yasushi Okada, Seiji Tobita, Yasuteru Urano. “Development of Spontaneously blinking fluorophores based on intramolecular spirocyclization for super-resolution imaging”, XXVth IUPAC Symposium on Photochemistry, Bordeaux, France, July, 2014.
3. ○**Shin-nosuke Uno**, Mako Kamiya, Toshitada Yoshihara, Ko Sugawara, Kohki Okabe, Mehmet C. Tarhan, Hiroyuki Fujita, Takashi Funatsu, Yasushi Okada, Seiji Tobita, Yasuteru Urano. “A spontaneously blinking fluorophore based on intramolecular spirocyclization for live-cell super-resolution imaging”, 3<sup>rd</sup> Annual conference of the International Chemical Biology Society (ICBS 2014), San Francisco, USA, November, 2014.

本発表は *Nature Chemical Biology* の Meeting Report (Evan W Miller, “Chemical biologists rush to San Francisco for the ICBS”, *Nature Chemical Biology* **11**, 91 (2015)) で紹介された。

ポスター発表

1. ○**Shin-nosuke Uno**, Mako Kamiya, Yasuteru Urano. “Activatable Fluorescence Probes Based on Intramolecular Spirocyclization”, 4th HOPE Meeting, Tsukuba, Japan, March, 2012.
2. ○**Shin-nosuke Uno**, Mako Kamiya, Toshitada Yoshihara, Seiji Tobita, Yasuteru Urano. “Equilibrium and kinetic studies of intramolecular spirocyclization of rhodamine derivatives bearing various nucleophiles”, XXIV IUPAC Symposium on Photochemistry, Coimbra, Portugal, July, 2012.
3. ○**Shin-nosuke Uno**, Mako Kamiya, Toshitada Yoshihara, Seiji Tobita, Mehmet C. Tarhan, Hiroyuki Fujita, Yasuteru Urano. “Development of fluorescent probes for super-resolution imaging based on intramolecular spirocyclization”, Frontiers 2013 Symposium, Lausanne, Switzerland, June, 2013

4. ○Shin-nosuke Uno, Mako Kamiya, Toshitada Yoshihara, Ko Sugawara, Kohki Okabe, Mehmet C. Tarhan, Hiroyuki Fujita, Takashi Funatsu, Yasushi Okada, Seiji Tobita, Yasuteru Urano. “Live-cell super-resolution imaging with spontaneously blinking fluorophores”, Chem-Bio Informatics Society (CBI) Annual Meeting 2014, Tokyo, Japan, October, 2014.

<国内会議における発表>

口頭発表

1. ○宇野真之介, 神谷真子, 吉原利忠, 飛田成史, M. C. Tarhan, 藤田博之, 浦野泰照 「スピロ環化平衡を示すローダミン類を用いた超解像蛍光イメージングプローブの開発」, 第3回 Vivid Workshop, 石川県, 2013年2月
2. ○宇野真之介, 神谷真子, 吉原利忠, 飛田成史, M. C. Tarhan, 藤田博之, 浦野泰照 「分子内スピロ環化平衡に基づく超解像蛍光イメージングプローブの開発」, 日本化学会第93春季年会, 立命館大学, 2013年3月, **学生講演賞受賞**
3. ○宇野真之介, 神谷真子, 吉原利忠, 飛田成史, Mehmet C. Tarhan, 藤田博之, 浦野泰照 「ローダミン類の分子内スピロ環化平衡を利用した超解像イメージングプローブの開発」, 日本薬学会第134年会, パレアホール(熊本), 2014年3月, **大学院生シンポジウム採択**
4. ○宇野真之介, 神谷真子, 吉原利忠, 菅原皓, 岡部弘基, Mehmet C. Tarhan, 藤田博之, 船津高志, 岡田康志, 飛田成史, 浦野泰照 「自発的ブリンキング特性を最適化した超解像蛍光イメージングプローブの開発」, 日本ケミカルバイオロジー学会 第9回年会, 大阪大学, 2014年6月

ポスター発表

1. ○宇野真之介, 神谷真子, 吉原利忠, 飛田成史, M. C. Tarhan, 藤田博之, 浦野泰照 「自発的ブリンキング機能を有する超解像蛍光イメージングプローブの開発」, 第22回日本バイオイメージング学会学術集会, 東京大学, 2013年9月

2. ○宇野真之介, 神谷真子, 吉原利忠, 菅原皓, 岡部弘基, Mehmet C. Tarhan, 藤田博之, 船津高志, 岡田康志, 飛田成史, 浦野泰照 「自発的ブリンキング機能を有する蛍光プローブによるライブセル超解像蛍光イメージング」, 第14回東京大学生命科学シンポジウム, 東京大学, 2014年5月

#### 【受賞歴】

1. 日本化学会第93春季年会 (2013) 学生講演賞  
「分子内スピロ環化平衡に基づく超解像蛍光イメージングプローブの開発」
2. 第5回 (平成26年度) 日本学術振興会 育志賞  
「分子内スピロ環化平衡に基づく超解像蛍光イメージングプローブの創製」

#### 【特許】

特許出願番号：特願 2014-6456 (P2014-6456)

出願日：平成26年1月17日

発明の名称：超解像蛍光イメージング用プローブ

発明者：浦野泰照, 神谷真子, 宇野真之介

本研究で開発した超解像イメージングプローブ **HMSiR** は五稜化学株式会社より上市予定.



## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多くのご支援とご指導を賜りました東京大学医学系研究科 生体情報学教室 浦野 泰照 教授に深く感謝致します。研究を俯瞰した上での的確なアドバイス並びに他分野の研究者達との共同研究の機会を頂けたことで貴重な経験を積むことができました。

日々の研究に関して直接ご指導して頂きました、東京大学医学系研究科 生体情報学教室 神谷 真子 助教に心より感謝致します。研究手法の指導、実験データの解釈、研究の方向性についての議論、論文や学会発表の指導等についてサポートして頂いたことで、本研究をまとめることができました。

レーザーフラッシュフォトリシス実験において共同研究をさせて頂き、実験のご指導並びに光化学の観点から有意義な議論をして頂いた群馬大学大学院理工学府 飛田 成史 教授、吉原 利忠 助教に深く感謝致します。

生細胞における超解像イメージングの技術指導及び生物学の観点から有意義なアドバイスをして頂いた理化学研究所生命システム研究センター (QBiC) 岡田 康志 チームリーダーに心より感謝申し上げます。また、プラスミドの調製をして頂いた、浅田 純子 女史並びに生化学的手法を指導して頂いた許 尚丹 博士に深く感謝致します。

tubulin の精製法及び観察法をご教授して頂きました、東京大学 生産技術研究所 藤田 博之 教授、Mehmet C. Tarhan 博士に深く感謝致します。

一分子イメージングにおける解析法の指導及び超解像イメージングに関する議論をして頂きました、東京大学薬学系研究科 生体分析化学教室 船津 高志 教授、岡部 弘基 助教、菅原 皓 氏に心より感謝致します。

超解像顕微鏡 (N-STORM) を迅速に設置して頂き、その使用法及びデータの解析法について詳細にご教授下さいました、株式会社ニコインステック 及川 義朗 氏、榎田 秀 氏、小倉 忠克 氏、今瀬 亨 氏、高橋 知明 氏、高橋 恵太 氏に深く感謝致します。

$\beta$ -tubulin-SNAP のプラスミドを提供して頂いた、Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL) Kai Johnsson 教授、Gražvydas Lukinavičius 博士に深く感謝致します。

超解像イメージングの評価に用いた ImageJ のスクリプトを作成して頂いた、大阪大学産業科学研究所 新井 由之 助教に心より感謝申し上げます。

超解像イメージング法に関して貴重なご助言を頂いた, Yale University Derek K. Toomre 教授に深く感謝致します。

真面目な議論や愉快的な話で 4 年間楽しく過ごさせて頂きました, 東京大学医学系研究科 生体情報学教室の皆様に深く感謝申し上げます。

これまでの生活を支え, 多大なる支援を受け賜りました家族に深く感謝申し上げます。

最後に, 心身ともに献身的なサポートをして頂いた, 妻 里紗, 息子 誠太郎に心より感謝致します。

2015 年 2 月 宇野 真之介