

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 宇野 真之介

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。しかし、細胞内の微細構造を詳細に検討する際に、「回折限界」と呼ばれる空間分解能の限界が問題となる。近年、この回折限界を突破する超解像イメージング法が次々に提案、実現されてきており、生命現象の理解に更なる飛躍をもたらすと期待されている。超解像イメージング法は様々な原理に基づく手法が開発されているが、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。

本論文では、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。具体的には、超解像イメージング法の測定原理及び蛍光プローブの役割について概説し（第一章）、ローダミンの分子内環化平衡を利用した自発的に明滅する蛍光色素の開発について詳述する（第二章）。開発した蛍光色素の明滅特性を一分子イメージングにより評価した後（第三章）、従来法では困難であった細胞深部に位置する構造の超解像イメージング及び1時間の生細胞タイムラプス超解像イメージングが可能であることを実証した（第四章）。

1. 自発的に明滅する蛍光色素の開発

本研究では、一分子イメージングに基づく超解像イメージング法である、Single-molecule localization microscopy (SLM) に着目した。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。したがって SLM の達成には蛍光プローブを順番に光らせる手法が鍵となり、これまで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いる。その中でも Direct stochastic optical reconstruction microscopy (dSTORM) は一般的な有機蛍光色素を高濃度チオール存在下で、強いレーザー光を照射して三重項状態等の無蛍光状態に変

換し、明滅させる手法である。細胞内に存在するグルタチオンを利用することで、生細胞イメージングも達成されており、現在最も汎用的に利用できる手法の一つである。しかしながら、添加物の利用や測定前にも強いレーザー照射が必要であり、蛍光色素の褪色や細胞への光毒性が懸念される。そこで本研究では、蛍光色素自体の構造を最適化することで、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。

自発的な明滅特性を有する蛍光色素の骨格として高い蛍光特性を有し、生細胞イメージングにも適用可能なローダミンを選択した。当研究グループでは、ローダミン類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分子内スピロ環化平衡を示すことを明らかにしてきた。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。本研究ではこの構造変化に由来する蛍光の明滅特性を化学構造の検討により最適化し、SLM に適した蛍光プローブの開発を目指した。自発的に明滅するローダミン類を生細胞中の中性環境下での SLM に利用するためには、(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といった特性が必要である。

明滅特性を定量的に評価するために、(1) 分子内スピロ環化平衡の平衡定数 (pK_{cycl}) と (2) 開環体の持続時間 (τ) を指標とすることにし、 pK_{cycl} の目標値を 6 以下、 τ の目標値を 10 から数 100 ms と設定した。下記の順序に従って研究を進めた。(i) ローダミン類の化学構造を分子内求核基と求電子基である蛍光団に分け、それぞれの構造を変化させた誘導体群を合成する。(ii) 各誘導体の pK_{cycl} を決定し、 pK_{cycl} が 6 以下のローダミン誘導体を選択する。(iii) (ii) で選択したローダミン誘導体の τ を決定し、 τ が 10 から数 100 ms の誘導体を選択する。(iv) 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。

ローダミン誘導体群を合成し、それぞれの吸光度の pH 滴定曲線から pK_{cycl} を算出した。検討の結果、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し、 pK_{cycl} が低下することが示された。続いて、 pK_{cycl} が 6 以下である誘導体の開環体の持続時間 τ をレーザーフラッシュフォトリス法 (LFP) により評価した。測定の結果、分子内求核基の種類により τ が大きく変化し、チオール基及びアミノ

基を有するローダミンの τ が μs 以下であるのに対して、ヒドロキシ基を有するローダミンの τ は 20-300 ms 程度であることが明らかとなった。SLM への利用の観点から顕微鏡で十分に検出できるヒドロキシ基を有する誘導体を選択し、中でも高い蛍光特性を示す **HMSiR** を顕微鏡下で評価することにした。

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。具体的には **HMSiR** でラベル化した抗体をカバーガラスに吸着し、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) 中で測定した。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 程度とした。測定の結果、**HMSiR** は (1) 同時にごく僅かな分子のみ蛍光を発していること (2) 一般的な蛍光色素が速やかに褪色するのに対して可逆的かつ自発的に明滅することが明らかとなった。また、分子内スピロ環化平衡に基づくため、高い ON/OFF コントラスト、十分な蛍光状態の持続時間、低いレーザー強度における明滅が達成できることが示された。1 回の明滅において最大約 2,600 フォトン放出し、位置決定精度は最大 21 nm であった。

2. 超解像イメージングへの応用

HMSiR を用いてプラスミド DNA 上に重合した RecA フィラメントの超解像イメージングを行った。dSTORM と同程度のレーザー強度で測定した結果、通常の蛍光画像では直径約 500 nm の環状構造が潰れたのに対して、SLM では明確に観察できた。続いて、dSTORM では困難である弱いレーザー強度で微小管の SLM を試みた結果、通常の蛍光画像に比べて、再構築した SLM 画像では微小管の構造が明確に観察できた。

次に、スピニングディスク共焦点レーザー顕微鏡での観察を試みた。スピニングディスク共焦点レーザー顕微鏡では、レーザー光が分散され弱くなるため一般的な蛍光色素を用いた dSTORM は困難であるが、**HMSiR** は自発的に明滅する特性を有するため SLM が達成できると考えた。具体的には、核上部に位置する核膜孔の SLM を試みた。核膜孔を構成する POM121 及び Nup107 をラベル化して測定した結果、**HMSiR** は明滅を示し、再構築した SLM 画像では環状構造が観測できた。解析の結果、POM121 が Nup107 の外側に位置していること、8 回対称構造であることが示唆され、これまでの報告と一致した。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。

生細胞中の β -tubulin の SLM を行った。**HMSiR** のタグタンパク質基質誘導体は細胞膜を透過し、他の細胞内小器官に不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できることが示された。培地中において dSTORM の 10 分の 1 以下のレーザー強度で測定した結果、細胞質内での自発的な明滅が確認でき、最大 5 分間の観察中において明確な光毒性は見られなかった。次に 10 分間のインターバルで合計 7 回のタイムラプス SLM を行った。その結果、約 1 時間にわたる微小管の動きを 47 nm という高い空間分解能で測定することに成功した。また、5 分間連続測定した画像をオーバーラップさせて SLM 画像を構築することで、 β -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/frame 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。このように、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** を用いて生細胞タイムラプス SLM が達成できることが示された。

3. 結語

本研究においてローダミン類の化学構造を修飾し、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で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 SLM や生細胞タイムラプス SLM を達成した。このように、**HMSiR** を用いた SLM は既存の 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。