

[課程—2]

審査の結果の要旨

氏名 宇野 真之介

本研究は、超解像イメージング法の一つである **Single-molecule localization microscopy (SLM)** の実施において鍵となる蛍光プローブの明滅法を有機光化学の観点から新たに設計、開発した蛍光色素 **HMSiR** によって達成し、**HMSiR** の明滅特性を利用した超解像イメージング法を確立したものであり、下記の結果を得ている。

1. 分子内求核基を有するローダミン誘導体が示す、吸収・蛍光を有する開環体と無色・無蛍光の開環体から成る、熱的な分子内スピロ環化平衡を **SLM** における明滅に最適化するため、分子内求核基及び蛍光団の構造を変化させたローダミン誘導体群を設計、有機合成した。
2. **SLM** に必要な蛍光色素の特性として、同時に光る開環体の存在比率と開環体の持続時間に着目し、それぞれ分子内スピロ環化平衡の平衡定数 (pK_{cycl}) と開環体の持続時間 (τ) を指標として、合成したローダミン誘導体を分光学的測定及びレーザーフラッシュフォトリシスにより評価した。生理的 **pH** において約 1%が開環体で存在し、それぞれの開環体が約 **250 ms** 後に閉環体に戻る性質を有する **HMSiR** を見出した。
3. **HMSiR** をラベル化した抗体をガラス面に吸着し、全反射顕微鏡を用いて一分子イメージングを実施し、一般的な蛍光色素の明滅に必要なチオール基の添加や無蛍光状態に変換するレーザー照射をすること無く、**HMSiR** が自発的に明滅することが示された。
4. *In vitro* で重合し、**HMSiR** で標識した **RecA** フィラメント及び微小管の **SLM** を実施し、従来必要であったチオール基や脱酸素酵素システムを添加すること無く、従来の **SLM** と同等の **SLM** 画像が取得できることだけでなく、従来の 10 分の 1 以下のレーザー強度においても **HMSiR** が明滅し **SLM** 画像を取得できることが示された。
5. レーザー強度が分散され弱くなるため、従来の **SLM** を行うことができないスピニングディスク共焦点レーザー顕微鏡を用いて、全反射顕微鏡での測定が困難な核上部に位置する核膜孔の **SLM** を行い、**HMSiR** が自発的な明滅を示し、核膜孔の微小な環状構造の **SLM** 画像を取得できることが示された。

6. タグタンパク質を介して生細胞中の β -tubulin を HMSiR で標識し、チオール等の添加物を加えていない培地中において、従来の 10 分の 1 以下のレーザー強度で微小管の SLM を行い、HMSiR が生細胞内の生理的条件下においても自発的に明滅し、SLM 画像を構築できることが示された。
7. レーザー強度を下げることにより、細胞への光毒性及び蛍光色素の褪色を低減し、SLM を 10 分間隔で 7 回繰り返し、約 1 時間にわたる微小管の動きを 47 nm の空間分解能で観察することに成功した。
8. さらに、5 min 連続して測定後、30 s の画像から 1 枚の SLM を構築し、15 s ずつオーバーラップさせて SLM 画像を構築することによって、 β -tubulin の重合／脱重合のダイナミクスを 15 s/reconstructed image の時間分解能で観察することに成功した。

以上のように、本論文は、自発的に明滅するという新たな特性を有する蛍光色素を開発することによって、従来よりも温和な条件下において実施可能であり、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により細胞の深部にある構造を観測できる超解像イメージング法を確立することに成功した。今後、生細胞内の微細構造を研究する上で有用な選択肢の一つと成り得るだけでなく、超解像イメージング法の発展に必要な不可欠な蛍光色素の開発において重要な貢献を成すと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。