

フジテレビジョン賞

自発的な明滅特性を有する蛍光色素の開発と
超解像蛍光イメージング法への応用

東京大学大学院 医学系研究科 生体物理医学専攻
博士課程4年

宇野 真之介

1. 緒言

生命現象を理解する上で、生物の基本的な構成単位である細胞を「生きた状態のまま」直接観察することの意義は大きい。そのため、細胞生物学研究において、本来無色透明である細胞を感度良く観察するためのツールとして、蛍光イメージング法が発展してきた。蛍光イメージング法の開発にあたり、顕微鏡の光学系の構築と同時に、緑色蛍光タンパク質 (Green fluorescent protein, GFP) や有機小分子蛍光色素を骨格として急速に開発が進められている。蛍光プローブの果たす役割は大きく、GFPの開発に対して2008年にノーベル化学賞が授与されたことから明らかである。現在では、細胞内部にある情報伝達物質の動きや酵素の働きを可視化する蛍光プローブも開発されており [1], 可視化できる対象は今後更に増加すると考えられる。しかし、蛍光という光を用いる蛍光イメージング法には、「回折限界」と呼ばれる物理的な空間分解能の限界が存在し、細胞内に存在する微細な構造を観測するには不十分であるという課題があった (図1)。

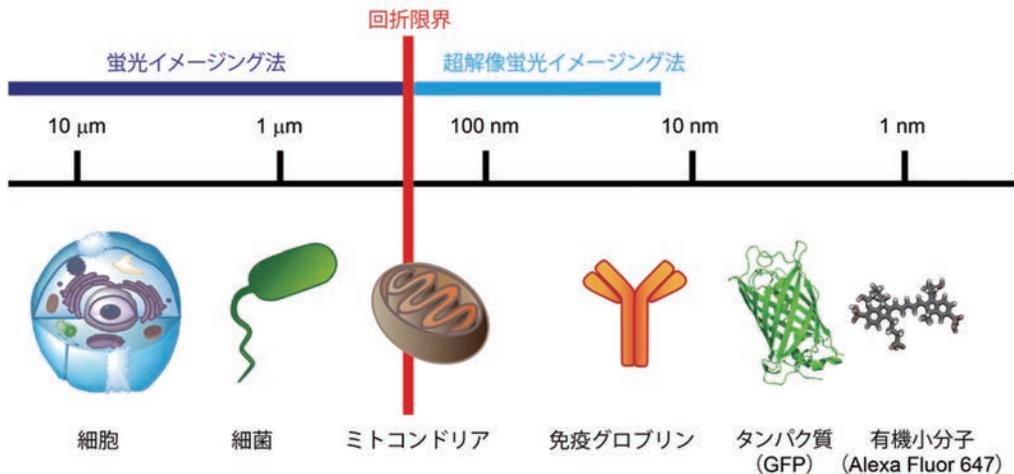


図1. 蛍光イメージング法の空間分解能。

光は波の性質を有しているため蛍光顕微鏡下において1nm程度の蛍光色素は波長程度に広がって観測されてしまい(この広がりを点像分布関数と呼ぶ), 分子が近づきすぎると各分子を区別することができなくなる (図2)。この空間分解能の限界を回折限界と呼び、おおよそ波長の半分程度(約200nm)である。この回折限界を突破し、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のが、2014年ノーベル化学賞が授与された超解像蛍光イメージング法である [2]。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、筆者らが有機化学の観点から新たに設計、開発した有機小分子蛍光色素及びその超解像イメージング法への応用、そして、今後の展開について述べる。

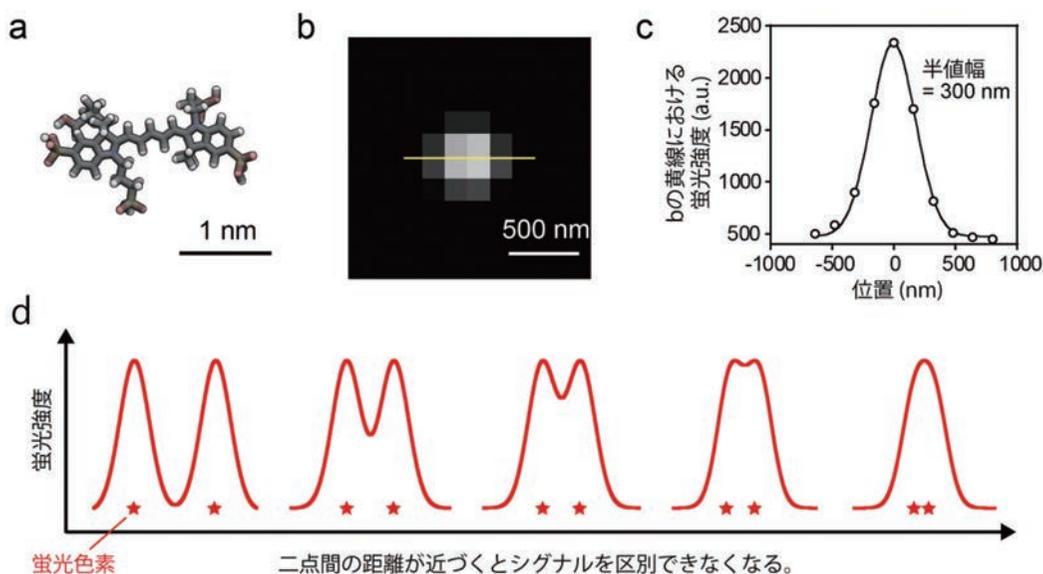


図2. 点像分布関数。(a) 有機小分子である Alexa Fluor[®] 647 の構造。(b) Alexa Fluor[®] 647 の一分子イメージング画像。(c) b における黄線の蛍光強度。(d) それぞれの蛍光色素が点像分布関数に従って広がるため、一定の距離(波長の半分程度)以上に近接すると蛍光シグナルが分離できなくなる。

2. 自発的に明滅する蛍光色素の設計

本研究では、超解像イメージング法の中でも蛍光プローブの特性が大きな鍵となる、Single-molecule localization microscopy (SLM) に着目した [3]。SLM では、近傍に位置する蛍光プローブを時間的にずらして個別に発光させ、それらの中心位置を精確に決定する。光る分子が一分子であれば、その中心位置を数 10nm の精度で決定することが可能である [4]。順番に決定した全ての分子の位置情報を最終的に重ね合わせることで高解像度の画像を取得することができる。しかし、通常の蛍光色素はその名の通り、常に蛍光を発する性質を有するため、SLM を行う際には、何らかの工夫により蛍光プローブを順番に光らせることが必要である。例えば、一般的な有機小分子蛍光色素を用いる場合には、高濃度のチオール存在下で、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する。この無蛍光状態は熱的、又は紫外光の照射により再び蛍光状態に戻るため、分子を光らせたり暗くさせたりする(明滅させる)ことが可能となり、SLM の測定条件を達成することができる(図 3a)。本手法は Direct stochastic optical reconstruction microscopy (dSTORM) と呼ばれ、現在最も汎用的な手法の一つである [5]。明滅に必要なチオールとして細胞内に存在するグルタチオンを利用することも可能であり、生きた細胞における dSTORM も報告されている [6]。しかしながら、明滅に最適な測定条件の設定には、非内在性のチオールや酸素を除去する酵素等の添加物の利用が必要なことも多く、また、測定前に無蛍光状態に変換するための強いレーザーを照射することが必要であることから、細胞への添加物の影響や光毒性だけでなく、蛍光色素の褪色といったことが懸念される [7]。そこで本研究では、ローダミンと呼ばれる蛍

光色素を骨格とする，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，それを用いて温和な生理的条件下においても測定可能な超解像蛍光イメージング法の確立を目指した(図3b)。

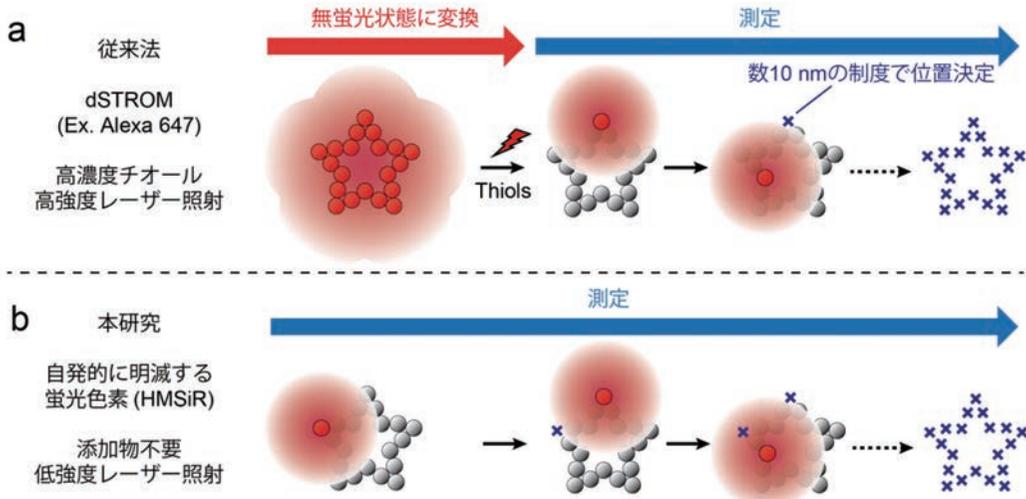


図3. SLMの測定スキーム。(a)一般的な蛍光色素を用いるdSTORM。高濃度チオール存在下で強いレーザー照射により，無蛍光状態に変換してから測定する。(b)本研究で開発した自発的に明滅する蛍光色素を用いたSLM。添加物や事前のレーザー照射を必要とせず，細胞への悪影響を低減できる。

当研究グループでは，ローダミン類が有するカルボキシ基を求核性の高いメルカプトメチル基又は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[8, 9]。これらの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る一方で，塩基性条件下では無色・無蛍光である閉環体構造で存在する(図4)。この構造変化に伴う蛍光強度変化は大きく，ペプチダーゼとの反応によりこの平衡を開

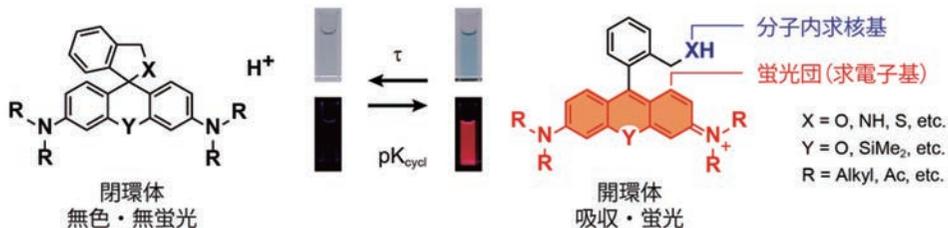


図4. ローダミン類の分子内スピロ環化平衡。二種類の構造が熱的な平衡状態で存在し，その平衡定数である pK_{cycl} と開環体の持続時間 τ を化学構造の検討により，最適化することでSLMに適した蛍光プローブの開発を目指した。

環体側にシフトさせ、蛍光強度を上昇させることによって、ペプチダーゼの発現が亢進しているがんの高感度検出に成功している[10]。本研究では、このような蛍光プローブの開発とは異なり、多数の分子が集まった水溶液の蛍光特性ではなく、一分子が示す蛍光の明滅特性、すなわち熱的な平衡状態にある分子がある時間間隔で、開環体と閉環体の間を行き来している現象を自発的な明滅特性として利用するという着想を得た。この明滅特性を化学構造の検討により SLM に最適化することによって、新規 SLM 用蛍光プローブを開発することを目指した。この自発的に明滅するローダミン類を生きた細胞内の中性環境下における 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。SLM 用蛍光プローブの開発にあたり、この明滅特性を定量的に評価するために、それぞれ(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、生理的条件下において SLM が実施可能な明滅特性として、 pK_{cycl} の目標値を6以下、 τ の目標値を10から数100ms と設定した。

3. 自発的に明滅する蛍光色素の合成と評価

はじめに、ローダミン類の化学構造のうち分子内求核基に着目し、求核性が高い順にチオール基、アミノ基、ヒドロキシ基をそれぞれ有する MMSiR, AMSiR, HMSiR 及び、スピロ環化平衡を示さないコントロール化合物としてメチル基を有する 2MeSiR を設計、合成した(図5a)。次に、得られた各誘導体の吸光度の pH 滴定曲線から pK_{cycl} を算出した(図5b)。その結果、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、分子内スピロ環化平衡が酸性側にシフトし、 pK_{cycl} が低下することが明らかとなった。続いて、 pK_{cycl} が6以下であった誘導体の開環体の τ をレーザーフラッシュフォトリシス法(LFP)により評価した。測定の結果、レーザーパルス照射直後に開環体由来する過渡吸収が観測され、熱的に閉環体に戻る様子が観測された。解析の結果、分子内求核基の種類により τ が大きく変化し、MMSiR 又は AMSiR の τ が μs 以下と非常に短かったのに対して、HMSiR の τ は 245ms と長いことが初めて明らかとなった(図5c)。

次に、SLM への利用の観点から顕微鏡のカメラで十分に検出できる寿命を有する HMSiR を選択し、顕微鏡下において評価することにした。具体的には、HMSiR 及びコントロール化合物である 2MeSiR のスクシンイミドエステル誘導体を用いてそれぞれラベル化した抗体をカバーガラスに吸着固定し、全反射顕微鏡で観察した。この際、従来の dSTORM における明滅に必要なチオールの添加や脱酸素処理は行わず、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、レーザー照射と同時に測定を開始し、励起強度を dSTORM の10分の1程度と低く設定した。測定の結果、緩衝液中において分子内求核基を持たない 2MeSiR が数秒以内に褪色したのに対して、HMSiR が可逆的かつ自発的に明滅することが明らかとなった。HMSiR の明滅特性に着目すると、分子内スピロ環化平衡に基づき明滅しているため、蛍光強度の高い ON/OFF コントラストが達成できており、SLM に適していると考えられる。また、添加物や強いレーザー強度に依らず明滅しており、測定条件が緩和できると考えられる。さらに、LFP の結果から予測されるように、十分な蛍光状態の持続時間を有しているため、1回の明滅において最大約2,600 フォトン放出することが可能であり、検出フォトン数に依存する位置決定精度は最大21nm

であることが明らかとなった。これらの結果は、dSTORMの条件下における Alexa Fluor® 647 に比べても遜色なく、SLMの実施に十分な特性である。

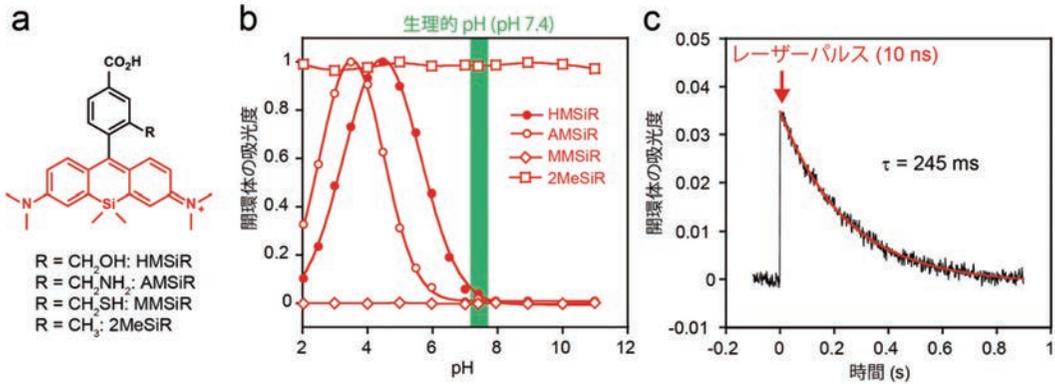


図5. pK_{cycl} 及び τ の評価。(a) 様々な分子内求核基を有する Si 置換ローダミン。(b) 分子内求核基の違いによる平衡定数の変化。生理的 pH (図中緑の範囲) において、大部分が閉環体構造で存在する分子が SLM に適している。(c) HMSiR の LFP の測定結果。リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で測定。レーザーパルス (308nm, 10ns) の照射により、閉環体が開環体に一時的に変換されることで吸光度が増大し、その後熱的に閉環体に戻る様子が観測できた。[11]

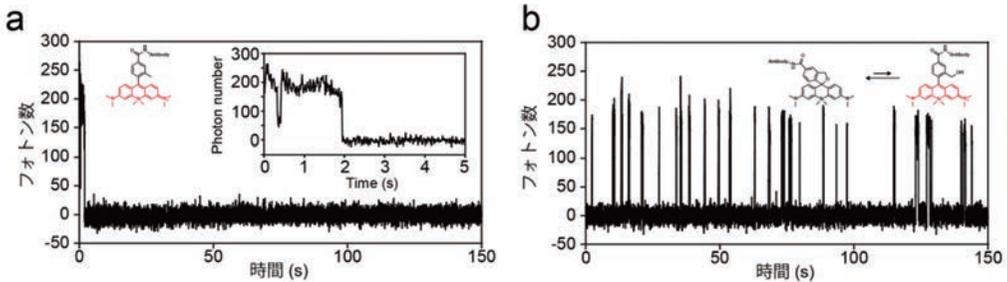


図6. 全反射顕微鏡による一分子イメージング。(a) 分子内求核基を持たない 2MeSiR は数秒以内に不可逆的に褪色した。(b) HMSiR は可逆的に明滅する様子が観測された。それぞれ、リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中、 $100\text{W}/\text{cm}^2$ (647nm) の励起光で観察した。[11]

4. HMSiR の超解像蛍光イメージングへの応用

上記の結果を踏まえ、HMSiR を用いた SLM を行った。はじめに、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。DNA 結合タンパク質である RecA を HMSiR でラベル化し、直径約 500nm のプラスミド DNA 上に重合し、RecA フィラメントを構築した。dSTORM と同程度の比較的強いレーザー強度 ($500\text{W}/\text{cm}^2$) で測定した結果、通常の蛍光画像では直径約 500nm 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 10 分の 1 以下の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。これらの結果より、dSTORM に比べて添加物を加えず、

レーザー強度を低減した温和な条件下において SLM が可能であることが示された。

次に、自発的な明滅特性を活かし、スピニングディスク共焦点レーザー顕微鏡を用いた SLM を試みた。通常、SLM は高いシグナルノイズ比を達成すると同時に、蛍光色素を無蛍光状態に変換するのに必要なレーザー強度が得られる全反射顕微鏡を用いることが多く、測定範囲はガラス面近傍に限られてしまう。それに対して、スピニングディスク共焦点レーザー顕微鏡では、ガラス面から離れた構造を励起できる一方で、レーザー光を分散して照射することによってそれぞれの強度が弱くなるため、一般的な蛍光色素を無蛍光状態に変換することは難しく、dSTORM には適していない。本研究で開発した HMSiR はレーザー強度に依らず自発的に明滅する特性を有するため、スピニングディスク共焦点レーザー顕微鏡を用いた SLM が達成できると考えた。具体的には、固定細胞の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 HMSiR でラベル化した抗体により染色し測定した結果、HMSiR が明滅を示すことが確認できた。測定した画像から再構築した SLM 画像では、点像分布関数よりも小さく通常の蛍光イメージングでは点にしか見えない核膜孔の環状構造が観測できた。さらに、半径及び中心角を解析した結果、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することを確認した [12]。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従来困難であった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。

次に、生細胞中の β -tubulin の SLM を行った。生細胞内におけるタンパク質の特異的なラベル化には、タグタンパク質を利用した。これらのタンパク質は GFP と同様に、目的のタンパク質と共発現させておき、蛍光色素が結合した基質を反応させることで、蛍光色素をラベル化することができる [13]。本研究では、Vero 細胞にタグタンパク質の一種である Halo-tag を β -tubulin と共発現させておき、HMSiR の Halo-tag 基質を培地に添加し、ラベル化した。この基質は細胞膜を透過し、ミトコンドリア等の細胞内小器官に不特異的に集積

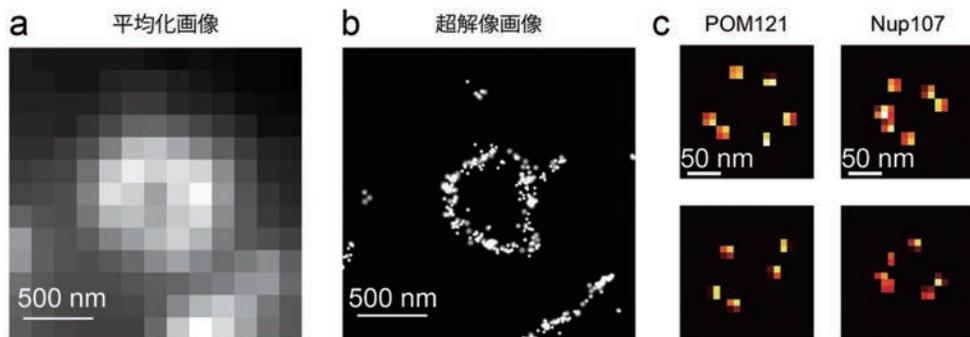


図7. HMSiR を用いた SLM。(a-b) プラスミド DNA 上に重合した RecA フィラメントの SLM。Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 中、 $500\text{W}/\text{cm}^2$ (647nm) の励起光で 5000 フレーム (15ms/frame) 測定した。(a) 5000 フレームの平均化画像。通常の蛍光イメージング画像に相当する。(b) SLM 画像。フレーム毎に分子の位置を決定し、重ねあわせることにより分解能が大きく向上した。(c) 固定細胞の核膜孔を構成するタンパク質である POM121 及び Nup107 の SLM 画像。8回対称の位置に存在するタンパク質の一部が観測された。また、POM121 の方が Nup107 より半径が大きく、POM121 が外側に位置するという知見と一致した。[11]

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明らかとなった。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、細胞質内においても自発的に明滅する様子が確認できた。30s 間(1,000フレーム)で取得した画像から再構築した SLM 画像では、平均化画像に比べて微小管構造を高い空間分解能で観測できることが明らかとなった(図8a-b, d)。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47nm という高い空間分解能で測定することにはじめて成功した(図8c)。通常の dSTORM では、無蛍光状態への変換及び測定時に

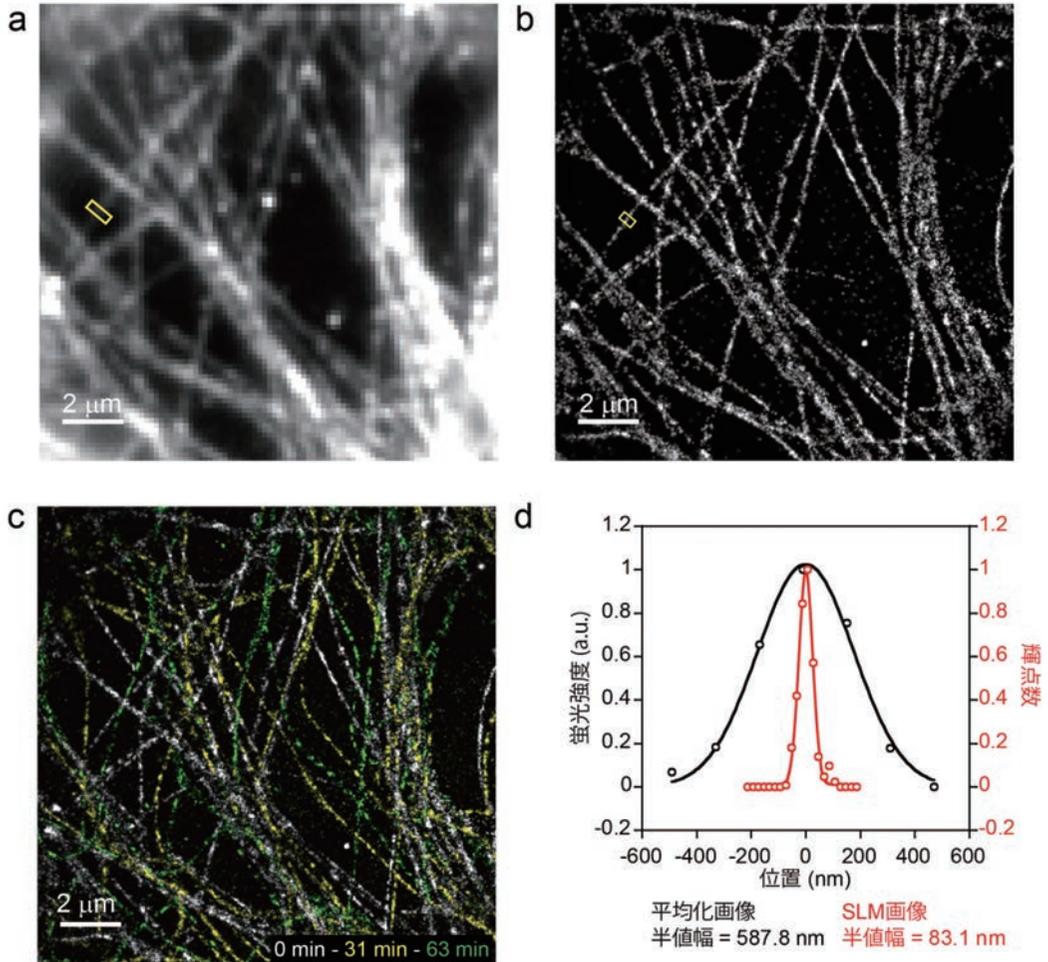


図8. 生細胞タイムラプス SLM。Vero 細胞に β -Tubulin-Halo を発現し、HMSiR-Halo で染色後、培地中で測定。40W/cm² (657nm) の励起光で1000フレーム (30ms/frame) 測定。(a) 1000フレームの平均化画像。(b) SLM 画像。(c) 生細胞中における微小管のタイムラプス SLM。10分毎に1000フレームの測定を合計7回繰り返した。図では0, 31, 63分の微小管をそれぞれ、白, 黄, 緑で表示。HMSiR の自発的な明滅特性のため、細胞への光毒性や色素の退色を低減することができるため、このような繰り返し測定が可能になった。(d) (a-b) 中の黄線で示した部分の蛍光強度及び輝点数の分布。[11]

1kW/cm²程度の強いレーザーを用いるため、このような繰り返し測定を行うと細胞への光毒性が大きいくだけでなく、蛍光色素自体が褪色してしまうために画質が低下してしまう。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、15s/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。

5. まとめと今後の展望

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[11]。本研究で得られた成果は、今後次のように展開されると期待される。

(1) HMSiRを用いたSLMによる生物学研究

一般的な蛍光色素を用いるdSTORMの開発と全反射顕微鏡や解析ソフトの普及に伴い、SLMによる超解像イメージングは次第に実証研究から生物学への応用研究に移行しつつある。例えば、固定細胞中の微細構造を多色で観察することで、新たな知見が得られつつある[14]。一方で、生きた細胞の観察においては、細胞への影響を最小限に留める測定条件の緩和や、比較的高速な現象を捉えるための時間分解能の向上が課題であった。本研究で開発したHMSiRは前者の測定条件の緩和を達成し、生細胞における1時間のタイムラプス観察を可能とした。さらに、自発的な明滅特性により、全反射顕微鏡以外にスピニングディスク共焦点レーザー顕微鏡も使用できるため、観測対象を拡大することに成功した。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、今後生物学研究において、超解像イメージングを実施する際の有力な選択肢になり得ると期待される。さらに、HMSiRの市販化も決定しており、生物学者の利用しやすくなることから、新たな生命現象の解明の一助になることが期待される。

(2) 蛍光色素の自発的な明滅特性の制御法の確立

一方で本研究は、明滅特性の制御を可能にする全く新しい蛍光色素の設計指針にもなり得る。今後の検討により、化学構造と明滅特性の関係を明らかにし、分子設計法を確立することにより、次世代のSLMプローブの開発に貢献できると考えられる。例えば、上述したSLMのもう一つの課題である時間分解能の向上において、近年解析アルゴリズムの発達によりビデオレートでの測定も可能になってきている[15]。このような測定には高速な明滅特性を有する蛍光プローブが適しており、現在のSLMに最適化された蛍光プローブの明滅特性では対応できないことが想定される。本研究で示した化学構造による精密制御法は今後更なる発展が期待される解析アルゴリズムに対する蛍光プローブを提供する手法の一つとして

重要であると考えられる。

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大院医 浦野泰照教授、神谷真子助教に深く感謝致します。また共同研究者である群馬大院理工 飛田成史教授、吉原利忠助教、理研 岡田康志チームリーダー、東大生産研 藤田博之教授、Mehmet C. Tarhan 博士、東大院薬 船津高志教授、岡部弘基助教、菅原皓氏に感謝致します。

参考文献

1. Chan, J., Dodani S. C., Chang C. J. (2012) . Reaction-based small-molecule fluorescent probes for chemoselective bioimaging. *Nat. Chem.* **4**: 973-984.
2. Hell, S.W. (2007) . Far-field optical nanoscopy. *Science* **316**: 1153-1158.
3. Klein, T., Proppert S., Sauer M. (2014) . Eight years of single-molecule localization microscopy. *Histochem. Cell Biol.* **141**: 561-575.
4. Yildiz, A., Forkey J. N., McKinney S. A., Ha T., Goldman Y. E., Selvin P. R. (2003) . Myosin V walks hand-over-hand: Single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science* **300**: 2061-2065.
5. Heilemann, M., van de Linde S., Schüttpelz M., Kasper R., Seefeldt B., Mukherjee A., Tinnefeld P., Sauer M. (2008) . Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**: 6172-6176.
6. Wombacher, R., Heidbreder M., van de Linde S., Sheetz M. P., Heilemann M., Cornish V.W., Sauer M. (2010) . Live-cell super-resolution imaging with trimethoprim conjugates. *Nat. Methods* **7**: 717-719.
7. Dempsey, G. T., Vaughan J. C., Chen K. H., Bates M., Zhuang X. (2011) . Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging. *Nat. Methods* **8**: 1027-1036.
8. Kenmoku, S., Urano Y., Kojima H., Nagano T. (2007) . 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.
9. Sakabe, M., Asanuma D., Kamiya M., Iwatate R. J., Hanaoka K., Terai T., Nagano T., Urano Y. (2013) . Rational design of highly sensitive fluorescence probes for protease and glycosidase based on precisely controlled spirocyclization. *J. Am. Chem. Soc.* **135**: 409-414.
10. Urano, Y., Sakabe M., Kosaka N. et al. (2011) . Rapid cancer detection by topically spraying a γ -glutamyltranspeptidase-activated fluorescent probe. *Sci. Transl. Med.* **3**: 110ra119.
11. **Uno, S.**, Kamiya M., Yoshihara T. et al. (2014) . A spontaneously blinking fluorophore based on intramolecular spirocyclization for live-cell super-resolution imaging. *Nat. Chem.* **6**: 681-689.
12. Hoelz, A., Debler E.W., Blobel G. (2011) . The structure of the nuclear pore complex. *Annu. Rev. Biochem.* **80**: 613-643.
13. Dean, K. M., Palmer A. E. (2014) . Advances in fluorescence labeling strategies for dynamic

- cellular imaging. *Nat. Chem. Biol.* **10**: 512-523.
14. Xu, K., Zhong G., Zhuang X. (2013) . Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons. *Science* **339**: 452-456.
 15. Huang, F., Hartwich T. M. P., Rivera-Molina F. E. et al. (2013) . Video-rate nanoscopy using sCMOS camera-specific single-molecule localization algorithms. *Nat. Methods* **10**: 653-658.