



Title	光スイッチング蛍光タンパク質の色変異体の開発と生命科学研究への応用
Author(s)	尾崎, 涼平
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/101889
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (尾 崎 涼 平)

論文題名

光スイッチング蛍光タンパク質の色変異体の開発と生命科学研究への応用
(Color variants of photoswitching fluorescent protein for biological research)

論文内容の要旨

Photoswitching fluorescent protein (rsFP) can reversibly switch between fluorescently bright (ON) and dark (OFF) states upon irradiation with certain wavelengths of light. rsFP is classified as positive-type if the wavelength of light for switching from off to on state (on-switching) overlaps with the wavelength of excitation light, and negative-type if the wavelength of light for switching from on to off state (off-switching) overlaps with the wavelength of excitation light. Positive-type rsFPs (p-rsFPs) are an essential tool for biocompatible super-resolution imaging such as RESOLFT (reversible saturable optical fluorescence transitions) and SPoD-OnSPAN (super-resolution polarization demodulation/on state polarization angle narrowing) and negative rsFPs (n-rsFPs) are also essential for super-resolution imaging such as pcSOFI (photochromic stochastic optical fluctuation imaging) and SPA-SIM (selective plane activation structured illumination microscopy). In fluorescence imaging, multiplexed fluorescence imaging using multiple fluorescent reporters of different colors allows us to observe multiple signals at once and to study the relationship between signals in living cells. Therefore, the more color variants of rsFPs are expected to allow for capturing multiplexed signals in super-resolution imaging. However, the number of colors in super-resolution imaging using p-rsFP has been limited to one, where the green p-rsFPs such as Kohinoor2.0 and Padron2 are available but no red p-rsFPs are available for super-resolution imaging. In the case of n-rsFP, two color super-resolution imaging using green and red n-rsFP has been performed so far. Thus, the limitation of the number of colors available in super-resolution imaging is currently one for p-rsFP and two for n-rsFP. Here, I developed a red p-rsFP, rsZACRO and demonstrate two-color super-resolution imaging in combination with a green p-rsFP, Kohinoor2.0. I also developed a blue n-rsFP, rsBFP, and a green n-rsFP, rsSapphire, which would allow for up to 4 color super-resolution imaging in combination with conventional green and red n-rsFPs. These developed rsFPs color variants would facilitate studies of multiple processes and exploration of their relationships in living cells at high spatial resolution.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (尾 崎 涼 平)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	永井健治
	副 査	教授	井上康志
	副 査	教授	上田昌宏
	副 査	准教授	森田梨津子

論文審査の結果の要旨

蛍光タンパク質 (FP) のうち、励起光によって蛍光を示す状態 (ON) と示さない状態 (OFF) を可逆的に遷移するものを、光スイッチング蛍光タンパク質 (rsFP) という。rsFPのうち蛍光発生のための励起光によってON状態に遷移するものはポジティブ型、OFF状態に遷移するものはネガティブ型に分類される。これらのrsFPは生きた細胞内の約200 nm以下の微細構造を可視化する超解像イメージングに有用である。しかし、rsFPのカラーバリエーションは、ネガティブ型rsFPでは2つ、ポジティブ型rsFPでは1つであり、3つ以上の観察対象の関係性を、rsFPを用いた超解像イメージングによって調べる研究には制約があった。尾崎氏は、新規ポジティブ型赤色rsFPを開発し、既存のポジティブ型緑色rsFPと併用することで2色超解像イメージングを実証した。さらに、新規ネガティブ型青色rsFP、そしてUV励起によって緑蛍光を示すネガティブ型rsFPを開発し、カラーバリエーションの数を大幅に更新した。これによって生きた細胞内で最大4色の超解像イメージングが可能となり、細胞内微細構造動態の関係性に関する研究を大きく促進させることが期待される。

本論文は、蛍光の物理化学とタンパク質工学、さらにはバイオイメージングの専門知識と研究能力の統合によって成しえた研究成果であり、博士の学位を授与するに値するものと認める。なお、チェックツール “iThenticate 2.0” を使用し、剽窃、引用漏れ、二重投稿等のチェックを終えていることを申し添える。