



Title	Photoswitchable Fluorescent Molecules with High Reversibility Assisted by Protein Surface Modification
Author(s)	鳥井, 健司
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/96032
rights	
Note	

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 (鳥井健司)

論文題名

Photoswitchable Fluorescent Molecules with High Reversibility Assisted by Protein Surface Modification
(タンパク質表面修飾を利用した可逆的な光スイッチング蛍光分子)

論文内容の要旨

光スイッチング蛍光分子(Photoswitchable fluorescent molecules: PSFMs)とは、光照射によりその蛍光強度を可逆的に制御することができる分子を指す。これらの分子は細胞内生体分子の動態をリアルタイムで追跡するためのマーカーや超解像イメージング技術用の蛍光プローブとして応用できる。これまで、光スイッチ可能な蛍光タンパク質が広く用いられてきたが、光安定性が低く光褪色しやすいことや、分子サイズが大きくミスローカライズの原因になることが問題であった。そのため、蛍光タンパク質よりも光安定性に優れ、分子サイズが小さい合成ベースのPSFMsの開発が精力的に行われている。これまで、多種多様なPSFMsが報告されているが、細胞膜透過性が低いことや毒性の還元剤が蛍光スイッチのために必要であることなどの課題が残り、生細胞イメージングへ利用可能なPSFMsの例はほとんどない。そこで、本博士論文では、生細胞内で可逆的な蛍光スイッチングを可能にするPSFMsの開発とその戦略について述べる。

第1章では、フォトクロミック分子の一つであるアリルアゾピラゾール(AAP)を利用したPSFMsの開発に取り組んだ。AAPは、光照射によってE体とZ体の2つの構造に可逆的に光異性化する。そこで、AAPの両端にそれぞれ蛍光色素と消光基を導入したPSFMを着想した。この分子設計では、E(*trans*)体では蛍光色素と消光基が空間的に離れているため、消光基が働かずに色素が蛍光を発する。一方で、Z(*cis*)体に光異性化すると、消光基と蛍光色素が近接して蛍光消光が起きる。このスイッチング戦略に基づいて設計したPSFMsは期待通り、365 nm照射によるZ体への異性化で蛍光強度が減少し、530 nm照射によるE体への異性化で、蛍光強度が回復し、可逆的な応答を確認することができた。

第2章では、フォトクロミック分子の一つであるフリルフルギミドを利用した新たなPSFMsの開発に取り組んだ。フリルフルギミドは、365 nm照射により開環体(無色体)から閉環体(着色体)に異性化し、530 nm照射で元の開環体に戻る。この特性を利用して、フリルフルギミドをFörster resonance energy transfer (FRET)による光制御可能な蛍光消光基として用いたPSFMsを開発した。この分子設計では、FFが開環体の時は、色素の蛍光スペクトルとFFの吸収スペクトル間で重なり積分がないため、色素は蛍光を発する。一方で、閉環体に光異性化すると、重なり積分が現れ、FRETによる色素の消光が起きる。このコンセプトに基づいた新規PSFMとして、FF-TMRを開発した。FF-TMRは光照射により、FRETによる蛍光強度の制御を繰り返し行うことができた。また、蛍光スイッチングの性能を詳細に調べることで、水溶液中では分子間凝集によって、FF-TMRの光安定性が低下していることを突き止めた。そのため、FF-TMRをタンパク質表面に修飾することで、分子間凝集を抑制し、光安定性が大幅に改善できることを見出した。この戦略を応用して、FF-TMRを修飾させた抗体を用いた免疫染色法による蛍光イメージングを行ったところ、固定細胞内での可逆的な蛍光スイッチングを確認することができた。

第3章では第2章で得られた知見を活用し、生細胞イメージングへの応用を目指したPSFMとしてTrp-BODIPY-FFを開発した。Trp-BODIPYは環境応答性色素であり、疎水環境や高粘性環境で蛍光強度が増大する発蛍光性を有する。そのため、Trp-BODIPYは疎水的で尚且つ分子運動が束縛されるタンパク質表面と結合することで蛍光強度が増大することを期待した。発蛍光プローブは標的タンパク質と結合した時のみ、蛍光シグナルが観察できる一方で、遊離プローブからの蛍光シグナルが検出されないため、非洗浄での生細胞イメージングを可能にする。細胞内の蛍光標識はHalo-tagのラベル化技術を利用した。Trp-BODIPY-FFにHalo-tagリガンドを導入したHTL-Trp-BODIPY-FFは、細胞内に発現したHaloタグタンパク質と特異的に結合し、非洗浄で生細胞に存在する標的タンパク質の蛍光標識を達成した。更に、ラベル化後のHTL-Trp-BODIPY-FFは光照射によって、可逆的な蛍光強度が変化する様子を蛍光イメージングにより可視化することに成功した。本研究成果は、生細胞超解像イメージングを指向したPSFMsの分子設計において、有用な指針を示すものである。

結論では、以上の結果について総括し、今後の展望について記した。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (鳥井健司)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 菊地和也
	副 査	教授 木田敏之
	副 査	教授 正岡重行
	副 査	教授 生越専介
	副 査	教授 平野康次
	副 査	教授 松崎典弥
	副 査	教授 安田誠
	副 査	教授 鷹巣守
	副 査	教授 伊東忍
	副 査	教授 藤塚守
	副 査	教授 家裕隆
	副 査	教授 芝田育也

論文審査の結果の要旨

本博士論文では、生細胞での超解像蛍光イメージングを指向した新規光スイッチング蛍光分子について述べている。光スイッチング蛍光分子(Photoswitchable fluorescent molecules: PSFMs)は、光照射によりその蛍光強度を可逆的に制御することができる分子を指す。これらの分子は細胞内生体分子の動態をリアルタイムで追跡するためのマーカーや超解像イメージング技術用の蛍光プローブとして応用できる。これまで、光スイッチ可能な蛍光タンパク質が広く用いられてきたが、光安定性が低く光褪色しやすいことや、分子サイズが大きくミスローカライズの原因になることが問題であった。そのため、蛍光タンパク質よりも光安定性に優れ、分子サイズが小さい合成ベースのPSFMsの開発が精力的に行われている。これまで、多種多様なPSFMsが報告されているが、細胞膜透過性が低いことや毒性の還元剤が蛍光スイッチのために必要であることなどの課題が残り、生細胞イメージングへ利用可能なPSFMsの例はほとんどない。そこで、本博士論文では、生細胞内で可逆的な蛍光スイッチングを可能にするPSFMsの開発とその戦略について述べている。

第1章では、フォトクロミック分子の一つであるアリルアゾピラゾール(AAP)を利用したPSFMsの開発に取り組んだ。AAPは、光照射によってE体とZ体の2つの構造に可逆的に光異性化する。そこで、AAPの両端にそれぞれ蛍光色素と消光基を導入したPSFMを着想した。この分子設計では、E(trans)体では蛍光色素と消光基が空間的に離れているため、消光基が働かず色素が蛍光を発する。一方で、Z(cis)体に光異性化すると、消光基と蛍光色素が近接して蛍光消光が起きる。このスイッチング戦略に基づいて設計したPSFMsは期待通り、365 nm照射によるZ体への異性化で蛍光強度が減少し、530 nm照射によるE体への異性化で、蛍光強度が回復し、可逆的な応答を確認することができた。

第2章では、フォトクロミック分子の一つであるフリルフルギミドを利用した新たなPSFMsの開発に取り組んだ。フリルフルギミドは、365 nm照射により開環体(無色体)から閉環体(着色体)に異性化し、530 nm照射で元の開環体に戻る。この特性を利用して、フリルフルギミドをFörster resonance energy transfer (FRET)による光制御可能な蛍光消光基として用いたPSFMsを開発した。この分子設計では、FFが開環体の時は、色素の蛍光スペクトルとFFの吸収スペクトル間で重なり積分がないため、色素は蛍光を発する。一方で、閉環体に光異性化すると、重なり積分が現れ、FRETによる色素の消光が起きる。このコンセプトに基づいた新規PSFMとして、FF-TMRを開発した。FF-TMRは光照射により、FRETによる蛍光強度の制御を繰り返し行うことができた。また、蛍光スイッチングの性能を詳細に調べることで、水溶液中では分子間凝集によって、FF-TMRの光安定性が低下していることを突き止めた。その

ため、FF-TMR をタンパク質表面に修飾することで、分子間凝集を抑制し、光安定性が大幅に改善できることを見出した。この戦略を応用して、FF-TMR を修飾させた抗体を用いた免疫染色法による蛍光イメージングを行ったところ、固定細胞内での可逆的な蛍光スイッチングを確認することができた。

第3章では第2章で得られた知見を活用し、生細胞イメージングへの応用を目指した PSFM として Trp-BODIPY-FF を開発した。Trp-BODIPY は環境応答性色素であり、疎水環境や高粘性環境で蛍光強度が増大する発蛍光性を有する。そのため、Trp-BODIPY は疎水的で尚且つ分子運動が束縛されるタンパク質表面と結合することで蛍光強度が増大することを期待した。発蛍光プローブは標的タンパク質と結合した時のみ、蛍光シグナルが観察できる一方で、遊離プローブからの蛍光シグナルが検出されないため、非洗浄での生細胞イメージングを可能にする。細胞内の蛍光標識は Halo-tag のラベル化技術を利用した。Trp-BODIPY-FF に Halo-tag リガンドを導入した HTL-Trp-BODIPY-FF は、細胞内に発現した Halo タグタンパク質と特異的に結合し、非洗浄で生細胞に存在する標的タンパク質の蛍光標識を達成した。更に、ラベル化後の HTL-Trp-BODIPY-FF は光照射によって、可逆的な蛍光強度が変化する様子を蛍光イメージングにより可視化することに成功した。

以上のように、本論文で述べられた研究成果は、生細胞超解像イメージングを指向した PSFM の分子設計において、有用な指針を示すものであり、生命科学研究を大きく発展させると期待できる。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。