

平成26年12月1日発行(毎月1回1日発行)通巻763号 昭和15年4月18日第3種郵便物認可 CODEN:KAKYAU ISSN 0451-1964

C H E M I S T R Y

化学

DECEMBER
2014
Vol.69

12

特別解説 • Special reviews

ノーベル賞を読み解く

2014年 化学賞, 生理学・医学賞, 物理学賞

解説 • Research article

単一キラリティーの カーボンナノチューブ合成!

連載講座 • Serial lecture

有機化学の
新たな指導原理 **有機軌道論** ⑨

6 おかげ
さまで
SINCE 1954

2014年ノーベル賞を読み解く 化学賞

超解像蛍光顕微鏡を可能にした蛍光分子

——有機化学の観点から

阿部二郎

青山学院大学理工学部化学・生命科学科

今年のノーベル化学賞の授賞対象となった超解像蛍光顕微鏡は、優れた蛍光分子の開発なくして実現できなかった。見たい対象や現象に合わせて、最適な分子をつくりだす、化学者の貢献がますます期待される分野である。

超解像蛍光顕微鏡の重要性

従来の光学顕微鏡の空間分解能（識別可能な最小距離）は、200 nm が理論的な限界だといわれていた。今年のノーベル化学賞は、その「200 nm の壁」を超える超解像蛍光顕微鏡を開発した Eric Betzig 博士、Stefan W. Hell 博士、William E. Moerner 博士の3氏に授与された。細胞内では分子の動き・化学反応・分子間相互作用が空間的・時間的に巧妙に制御されることで細胞機能を発現しているため、1分子の動きを追跡して細胞システムを理解することは生物学分野の研究者にとって長年の夢であった。一方で、細胞内小器官やタンパク質、ほとんどのウイルスの大きさは数十～数百 nm であり、従来の蛍光顕微鏡では 200 nm 以下の細かい部分はぼんやりとしか見ることができないため、それらの詳しい構造や細胞内での移動の様子を詳しく観察することはできなかった。

Hell 博士と Betzig 博士はそれぞれ、20～40 nm 程度の空間分解能をもつ誘導放出抑制（stimulated emission depletion；STED）顕微鏡¹⁾、光活性化局在顕微鏡（photoactivated localization microscopy；PALM）²⁾と呼ばれ

る超解像蛍光顕微鏡を開発することで「200 nm の壁」を超えることに成功した。そして Moerner 博士が PALM に利用される単一分子観測の基礎を確立させたのである。超解像蛍光顕微鏡の登場により、生きた細胞中における個々の分子の挙動を明らかにすることが可能になり、超解像蛍光顕微鏡は医学や生物学において強力な研究ツールとなった。ここでは、「STED 顕微鏡や PALM を使って超解像蛍光イメージングを効率的に測定するためには、どのような蛍光分子が適しているか」という有機化学的な観点から解説する。限られた紙面の都合上、超解像蛍光顕微鏡の測定原理については省かせていただく。

STED 顕微鏡に用いる蛍光色素

STED 顕微鏡の測定に用いる蛍光色素としては、①従来の蛍光顕微鏡用の蛍光色素に求められる生体透過性の高い赤色光により励起できること、②極性溶媒中での高い蛍光量子収率、③大きなモル吸光係数、④水や緩衝液に対する優れた溶解性、⑤細胞膜透過性に優れている正電荷をもっていること、⑥細胞毒性が低いことなどがあげられる。さらにこれらの条件に加えて、⑦高い光安定性、⑧項間交差による励起三重項状態の生成量が少ないこと、⑨励起状態の寿命が比較的長いこと、⑩蛍光スペクトルの長波長側に励起状態の吸収をもたないことなどが求められる。

励起状態に留まる時間が長ければ、誘導放出が起こる確率が増大して空間分解能が向上するため、励起状態が比較的長い寿命(3 ns 以上)をもつことは重要である。さらに、比較的高強度の STED 光を必要とするため、蛍光色素の褪色が問題となることが多い。STED 光の波長は蛍光スペクトルの最も長波長側に設定するために、基底状態分子が吸収すること

あべ・じろう ● 青山学院大学理工学部化学・生命科学科教授、1991年早稲田大学大学院理工学研究科博士後期課程修了、〈研究テーマ〉光化学、フォトクロミズム

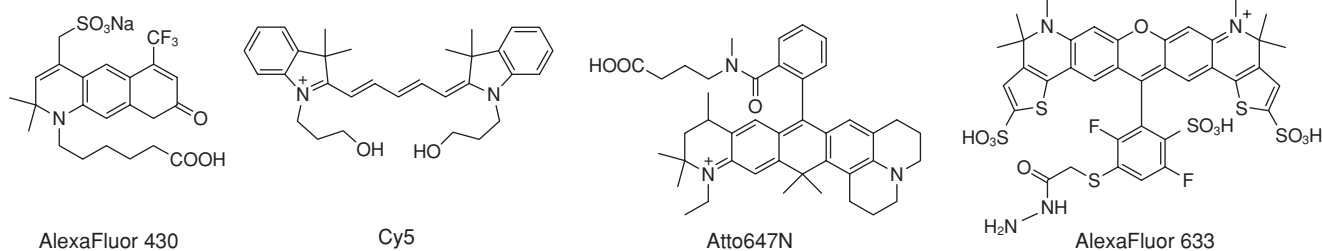


図1 STED顕微鏡に用いられるおもな蛍光色素

はない。たとえ測定試料に高強度のレーザー光を照射しても、分子が光を吸収しなければ光化学反応や光熱変換は起こらず、温度上昇や褪色も起こらない。褪色の原因は蛍光色素の励起状態がSTED光を吸収することで高い励起状態に遷移して、蛍光色素が壊れてしまうことである。すなわち、蛍光スペクトルの長波長側に励起状態の吸収がない蛍光色素の開発が望まれる³⁾。

またSTED顕微鏡での観察性能を向上させるためには、大きなストークスシフトをもつ蛍光色素が渴望されている。ストークスシフトとは、吸収スペクトルの極大波長と蛍光スペクトルの極大波長の差であり、基底状態と励起状態の平衡核配置の違いが大きいほど大きくなる。ほぼ同じ波長領域に蛍光を示すストークスシフトの大きな蛍光色素と、ストークスシフトの小さな蛍光色素を併用すると、励起波長を変えることで、それぞれの蛍光色素の蛍光を選択的に検出することができる。このようにして得られたマルチカラーイメージングから、細胞内での複数の標的分子の機能解析を同時並行で

行うことが可能となる。

図1に代表的な蛍光色素であるAlexaFluor 430(クマリン系色素)、Cy5(シアニン系色素)、Atto647N(カルボピロニン系色素)、AlexaFluor 633(ローダミン系色素)の分子構造を示す。Atto647Nは優れた光安定性を備えており、STED顕微鏡用として最も広く使われている蛍光色素であるが、いくつか課題も指摘されている⁴⁾。たとえば、タンパク質と複合体を形成したときに蛍光量子収率が減少すること、疎水性のため細胞内の不特定サイトに結合することにより蛍光イメージ像のコントラスト比が低下すること、2種類のジアステレオマーが存在していることなどがあげられる。さらに、Atto647Nで蛍光ラベル化した分子は、カバーガラスやマイクロキャピラリーチューブの壁面に強く吸着することがあるため、*in vitro*の分析が難しいという欠点がある。一方で、AlexaFluor 633やCy5はAtto647Nに比べて光安定性が乏しく、蛍光量子収率が低いという欠点がある。

細胞内のタンパク質を直接観測する方法として、標的タン

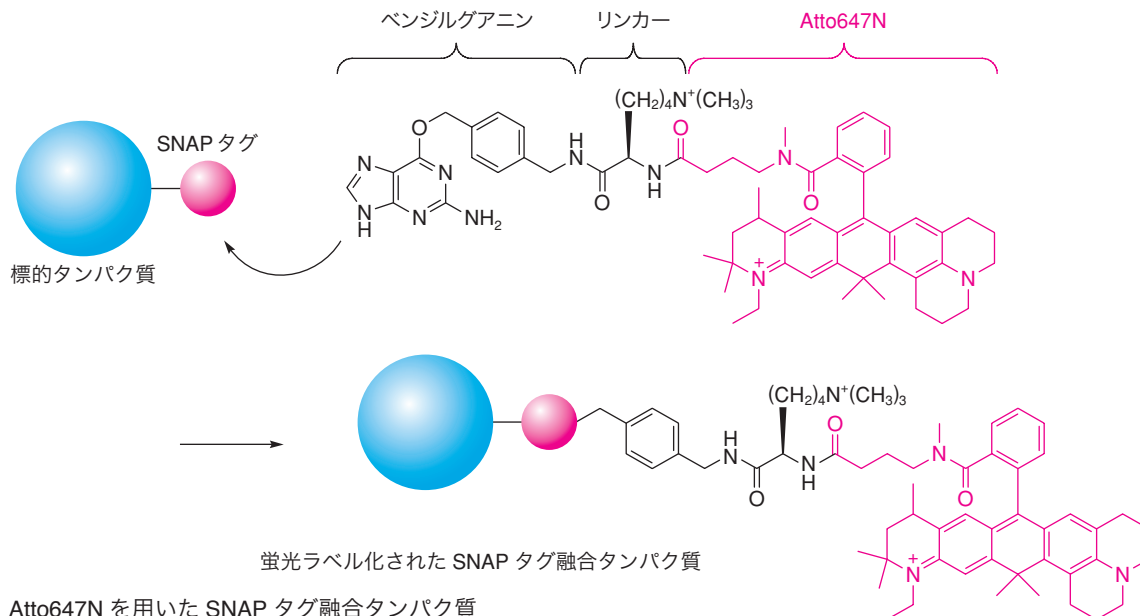


図2 Atto647Nを用いたSNAPタグ融合タンパク質

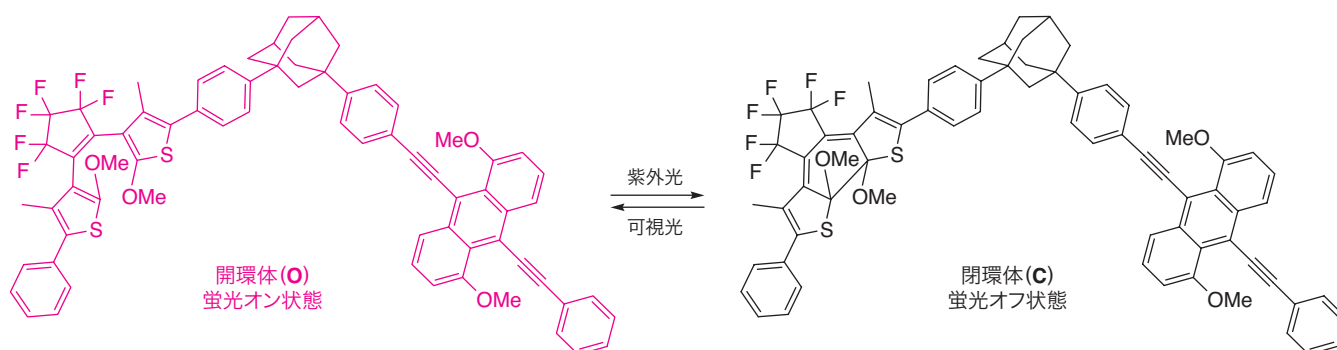


図3 光で蛍光スイッチするジアリールエテン誘導体

パク質に目印となるタグを融合し、このタグに対して選択的に結合する蛍光色素を用いて標的タンパク質を蛍光ラベル化する手法がある。具体的には、目的遺伝子をタグ融合タンパク質発現ベクターに挿入し、そのベクターを細胞に導入してタグ融合タンパク質を発現させる。さらに蛍光色素を細胞培養液に添加して、蛍光色素との共有結合によりタグ融合タンパク質を蛍光ラベル化する。SNAP タグは DNA 修復酵素の変異体であり、ベンジルグアニン誘導体と特異的に共有結合する。たとえば Atto647N のベンジルグアニン誘導体で標的タンパク質を蛍光ラベル化した SNAP タグ融合タンパク質 (図2) があり、これを用いた中心体 (動物細胞における細胞小器官の一つ) の STED 顕微鏡イメージングが報告されている⁵⁾。このような蛍光ラベル化されたタグ融合タンパク質を用いた超解像蛍光顕微鏡のライブイメージングは、標的タンパク質の時空間動態変化に関する詳細な情報を与えるため、今後ますます重要な研究ツールとなる。しかし、現状では細胞内タンパク質を蛍光ラベル化するためのタグ-蛍光色素の組合せは限られており、今後の開発が期待される。

PALM に用いる蛍光色素

PALM では 1 分子レベルでの蛍光のオン・オフの操作が可能な蛍光分子を用いる。緑色蛍光タンパク質 (GFP) の発見により、下村 脩博士が 2008 年のノーベル化学賞を受賞したことは記憶に新しい。GFP は紫外光を当てると緑色の蛍光を発することから、生物学的な過程を細胞レベルでモニタリングするための蛍光タグとして利用されるようになった。Moerner 博士は、遺伝子改変した GFP が 405 nm と 488 nm の光を交互に当てることで蛍光オン状態と蛍光オフ状態にスイッチできることを見いだした⁶⁾。そして Betzig 博士が、この

ような光活性化 GFP を用いて 1 分子からの蛍光測定を繰り返すことで超解像蛍光イメージングの構築に成功したのが PALM の幕開けとなった²⁾。宮脇らは遺伝子改変することで蛍光のオン・オフが可能なフォトクロミック特性 (物質が光を吸収することで、色が可逆的に変化する性質) をもつ GFP を開発し、Dronpa と命名した。Dronpa は緑色蛍光を発するが、500 nm 付近の青色光を当てると分子構造が変化して蛍光が消失し、400 nm 付近の紫色の光を当てると再び分子構造が変化し、もとの緑色蛍光を発する状態にもどる⁷⁾。このようなフォトクロミック GFP を蛍光タグとして用いることで PALM による超解像蛍光イメージングが可能となる。

一方、低分子量の有機蛍光分子でも PALM に応用することができる。入江らは Betzig 博士の光活性化 GFP の 1 分子蛍光の報告²⁾ に先立ち、フォトクロミック特性をもつジアリールエテンに蛍光部位を導入した誘導体の 1 分子蛍光測定に成功していた (図3)⁸⁾。開環体 (O) に 325 nm の紫外光を当てると閉環体 (C) に光異性化し、C に 488 nm の可視光を当てると O にもどる。O の蛍光量子収率は 0.73 と強い蛍光を発するのに対して、C の蛍光量子収率は 0.001 以下とほとんど蛍光を示さない。これは GFP 以外で蛍光の光スイッチを実現したはじめての分子である。また、浦野らは強い蛍光を示す開環体構造と蛍光を示さない閉環体構造が、室温下

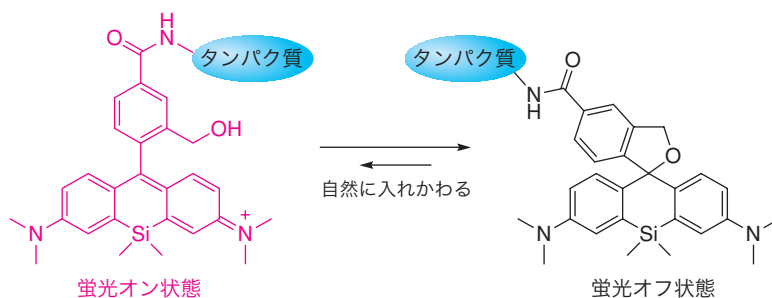


図4 自然に蛍光スイッチするローダミン誘導体

で可逆的に変換され自然に明滅するローダミン誘導体を開発した(図4)。この分子は約1%のみが同時に蛍光を発生し、約300 ms 間蛍光を発生したのちに蛍光が消え、また別の分子が光するという性質をもっている。さらに、この分子を用いたPALMにより微小管(細胞中に存在する管状の構造物)の超解像蛍光イメージングを50 nmの空間分解能で成功した⁹⁾。このような熱平衡型の蛍光スイッチ分子では、レーザー照射の必要がなく、温和な条件で生きた細胞の連続観察が可能となることから、新しい範疇の蛍光色素として今後の発展が期待される。



超解像蛍光イメージング技術を用いて、細胞内のタンパク質を含む生体物質の時空間動態をリアルタイムで追跡することは、複雑な生命現象を理解するために重要な研究課題である。しかし、STED顕微鏡やPALMなどの超解像蛍光顕微鏡の歴史はまだ浅く、測定に利用できる蛍光色素も限られているのが現状である。生命科学研究に新しい進展をもたらす高性能蛍光色素の開発は有機化学者に委ねられている。今後

の新規蛍光色素の開発にあたっては、蛍光スイッチ機能だけでなく、タグ融合タンパク質の蛍光ラベル化を意識した分子設計が必要となる。また、高速フォトクロミック分子をPALMに利用した例も報告されており¹⁰⁾、今後はSTED顕微鏡やPALMに最適化されたフォトクロミック分子の開発が期待される。

参考文献

- 1) S. W. Hell, J. Wichman, *Opt. Lett.*, **19**, 780 (1994).
- 2) E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H. F. Hess, *Science*, **313**, 1642 (2006).
- 3) J. Hotta, E. Fron, P. Dedecker, K. P. F. Janssen, C. Li, K. Müllen, B. Harke, J. Bückers, S. W. Hell, J. Hofkens, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 5021 (2010).
- 4) K. Kolmakov, V. N. Belov, J. Bierwagen, C. Ringemann, V. Müller, C. Eggeling, S. W. Hell, *Chem. Eur. J.*, **16**, 158 (2010).
- 5) G. Lukinavičius, D. Lavogina, M. Orpinell, K. Umezawa, L. Reymond, N. Garin, P. Gönczy, K. Johnsson, *Curr. Biol.*, **23**, 265 (2013).
- 6) R. M. Dickson, A. B. Cubitt, R. Y. Tsien, W. E. Moerner, *Nature*, **388**, 355 (1997).
- 7) R. Ando, H. Mizuno, A. Miyawaki, *Science*, **306**, 1370 (2004).
- 8) M. Irie, T. Fukaminato, T. Sasaki, N. Tamai, T. Kawai, *Nature*, **420**, 759 (2002).
- 9) S. Uno, M. Kamiya, T. Yoshihara, K. Sugawara, K. Okabe, M. C. Tarhan, H. Fujita, T. Funatsu, Y. Okada, S. Tobita, Y. Urano, *Nature Chem.*, **6**, 681 (2014).
- 10) E. Deniz, M. Tomasulo, J. Cusido, I. Yildiz, M. Petriella, M. L. Bossi, S. Sortino, F. M. Raymo, *J. Phys. Chem. C*, **116**, 6058 (2012).