

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22255

研究課題名（和文）新規化学スイッチ機構を用いた超解像イメージングプローブ

研究課題名（英文）Fluorescent super-resolution imaging probe using novel chemical switching mechanism

研究代表者

菊地 和也（Kikuchi, Kazuya）

大阪大学・工学研究科・教授

研究者番号：70292951

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、特定の波長の光を照射することで蛍光をスイッチングさせるプローブの開発に取り組んだ。優れた光異性化能を有するアリルアゾピラゾール（AAP）を消光基と蛍光色素の位置制御に用いたSCプローブの合成と評価を行い、SC1では約60%、SC2、SC3では約40%の蛍光強度のスイッチングを達成した。さらに、繰り返し光照射を行った際にも安定的に蛍光スイッチングを起こすことが確認され、高い光安定性を有する蛍光スイッチングプローブの開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蛍光スイッチング分子は、光照射により蛍光強度を制御できる性質を持ち、超解像顕微鏡法で、光の回折分解能を越えて生体分子の局在を可視化するために用いられる。これらの分子を用いた超解像顕微鏡による生物学研究への応用においては添加剤の使用や光安定性の欠如など未だ課題があったが、今回開発した分子スイッチングのメカニズムを利用することで、添加剤フリーで蛍光強度が繰り返し変化することが明らかとなり、今後の超解像イメージングに応用することで、長時間の微細構造の観察による生命科学の進展が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed photoswitching fluorescent probes by light irradiation. We synthesized and evaluated a series of photoswitching probes comprised of a fluorophore, a quenching group, and an arylazopyrazole (AAP) as a structural controller. AAP has excellent photochromic property and triggers fluorophore/quencher contact quenching and its recovery upon photoirradiation. The control of fluorescence quenching enabled switching of fluorescence intensity of about 60% for SC1 and about 40% for SC2 and SC3. Furthermore, we demonstrated reversible photoswitching without any additive and resistance to photobleaching and photofatigue after repeated cycles of photoirradiation.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：光スイッチング 蛍光プローブ 光異性化 超解像イメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

蛍光スイッチング分子は光照射により蛍光強度を制御できる性質を持ち、材料分野で応用されているが、近年バイオイメージングの分野においても注目されている分子である。特に、超解像顕微鏡法において、光の回折分解能を越えて生体分子の局在を可視化する際に蛍光スイッチングの原理が利用されている。蛍光スイッチング分子を必要とする超解像顕微鏡法の一つに高い時空間分解能を有する RESOLFT が挙げられる。これまでに、RESOLFT では、蛍光スイッチング分子として、蛍光タンパク質が用いられてきた。一方、蛍光タンパク質は光褪色しやすいため、光照射を繰り返す長時間のイメージングでは蛍光シグナルが徐々に減弱することが問題となっていた。また特に 1 分子ごとに蛍光像を取得する手法において、蛍光蛋白質は発現量のコントロールが難しく、蛋白質分子の大きさに由来する分解能の制限も存在している。この点で化学的に合成された蛍光色素は優れており、可逆的な蛍光スイッチング制御を可能とする。このため、より光安定性の高い合成蛍光色素を用いた蛍光スイッチング分子の開発が期待されている。しかしながら、現在報告されているものとして、シアニン系色素やジアリールエテンがあるが、シアニン系色素は、蛍光スイッチングに細胞毒性のあるチオールを用いる必要があり、ジアリールエテン類は光褪色しやすいことや、生細胞イメージングに必要な水溶性もしくは細胞膜透過性がないことが問題であった。

2. 研究の目的

本研究では、この問題を解決するために、光照射により分子構造を変化するアリルアゾピラゾール (AAP) というフォトクロミック分子に着目した。AAP は、二つの異なる波長の光を照射することで E-Z 異性化反応を引き起こし、その異性化効率率は極めて高い (~98%)。また、光照射後の Z 体は光スイッチング分子として知られるアゾベンゼンと異なり、熱異性化反応がほとんど起こらず、熱安定性に極めて優れている。本研究では、この AAP の分子構造の変化を利用して、蛍光色素の光褪色が起こらず、毒性のある添加物を必要としない蛍光スイッチング分子を開発する。

3. 研究の方法

AAP を構造制御分子として用いた蛍光スイッチング分子を設計した。これらの分子には AAP の末端の一つに蛍光色素(F)が繋がれ、もう一方の末端にコンタクトクエンチングを引き起こす消光分子(Q)が連結されている (Figure 1)。AAP が、E 体を形成するとき、蛍光色素と消光分子が空間的に離れ、Z 体のときに両分子が会合し消光すると考えた。異なる構造のリンカーで繋いだ分子を複数設計し、MacroModel を用い、分子力学計算に基づいた構造シミュレーションを行うことでバーチャルスクリーニングした。これらのスイッチング分子を合成し、光照射を行い、AAP の異性化に伴う吸収スペクトルの変化を観察した。加えて、光照射後に蛍光スペクトルを測定し、異性化によって蛍光強度が変調するかどうかを調べた。

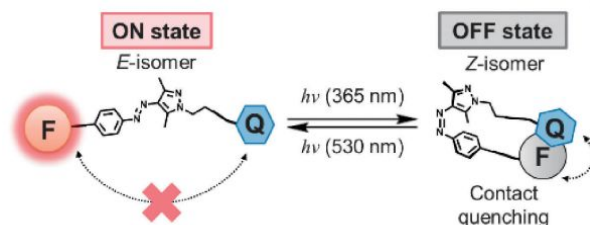


Figure 1. AAP を利用した蛍光スイッチング分子のデザイン

4. 研究成果

蛍光色素としてテトラメチルローダミン (TAMRA) を、消光分子としてジニトロベンゼン (DNB) を選択し、これらの分子を繋ぐ分子を AAP として蛍光スイッチング分子 SC1-3 を設計した (Figure 2)。TAMRA は光褪色に極めて強い有機蛍光色素としてよく知られている。また、DNB はコンタクトクエンチングにより TAMRA の蛍光を強く消光することを申請者のこれまでの研究で明らかにしている。AAP が E 体のときは、TAMRA と DNB が空間的に離れていて、光照射により AAP が Z 体になると、TAMRA と DNB が分子内で会合し蛍光強度が低下すると期待した。これらのプローブは Macromodel による分子力学計算を用いた構造最適化により、E 体では会合せず、Z 体で会合する確率が高いことが示唆された。

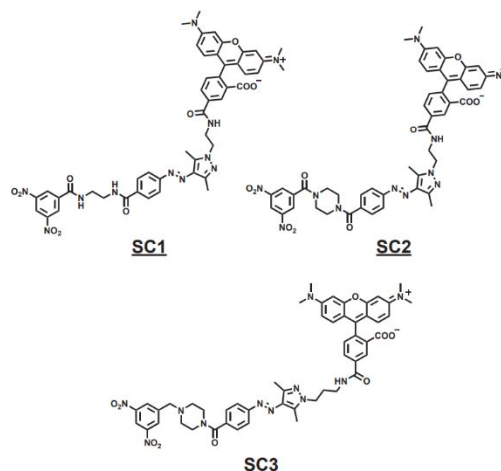


Figure 2. SC1-3 の化学構造

SC1-3 の光照射に伴う吸収スペクトル変化を測定したところ、365 nm の光照射、続く 530 nm の光照射により 330 nm 付近のスペクトルが変化した。これはそれぞれ、AAP の Z 体、E 体へと変化と対応しており、いずれのプロープにおいても光照射に伴う AAP の E-Z 異性化反応が起きていると確認された (Figure 3)。一方で、蛍光色素由来のピークである 550 nm 付近のピークにおいて光照射に伴う変化は見られず、遊離の蛍光色素と比較しても大きなシフトは見られなかった。したがって、DNB と TAMRA との会合は起きていないと考えられる。また、SC1-3 の光照射に伴う蛍光スペクトルの変化を測定したところ (Figure 3) SC1 においては E 体での蛍光強度に対して Z 体の蛍光強度は 58% 低下した。SC2、SC3 においては E 体での蛍光強度に対して Z 体の蛍光強度は 43% 低下した。したがって、いずれの分子も光照射に伴う蛍光のスイッチングを起こすことができたと言える。また、蛍光スイッチングプロープをイメージングに応用する際には繰り返し光照射を行うため、繰り返し光照射を行った際の光安定性を検証した。スイッチングに用いる 365 nm の光と 530 nm の光を交互に、蛍光強度の変化がなくなるまで照射し、その際の蛍光強度を照射回数に応じてプロットした (Figure 4)。SC1-3 のいずれにおいても照射回数によって蛍光強度の変化は一定であり、蛍光強度の増大や蛍光褪色は見られなかった。したがって、今回開発したスイッチングプロープは共に高い光安定性を有し、複数回繰り返し蛍光スイッチングが可能なプロープであると示された。

今回開発した光スイッチング分子 SC1-3 は添加剤なしで光照射により蛍光強度を変化させることが示され、繰り返しの光照射に対して褪色することなく蛍光強度の変調が可能であることが示された。この性質を利用すれば、RESOLFT を利用した超解像イメージングによって、生体分子の微細構造の観察に応用できるものと考えられる。さらに蛍光スイッチング分子の性能向上と、生体分子へのコンジュゲーションを含めた応用研究を進めることで、化学分子デザインの先導による生命科学と顕微鏡開発への貢献が期待できる。

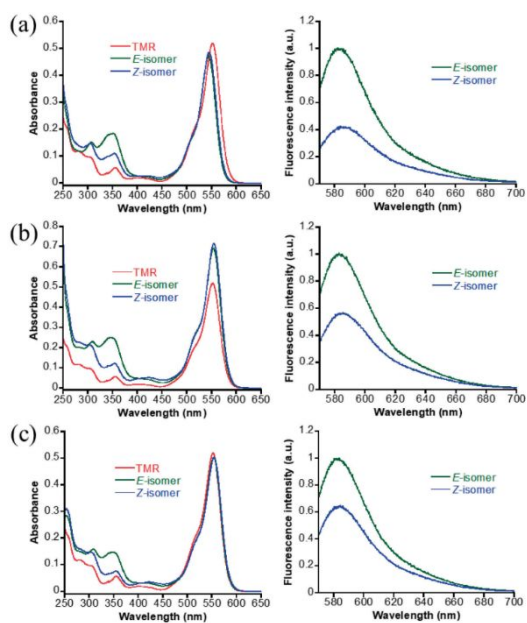


Figure 3. SC1-3 (a-c)の光照射による吸収スペクトル(左)と蛍光スペクトル(右)の変化

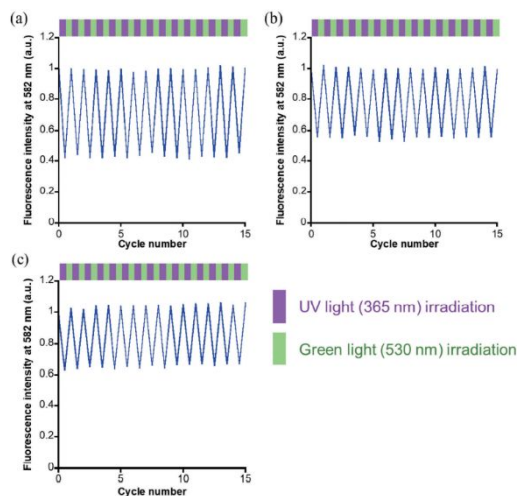


Figure 4. SC1-3 (a-c)の繰り返し光照射による蛍光強度の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件 / うち国際共著 7件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Kowada Toshiyuki, Arai Keisuke, Yoshimura Akimasa, Matsui Toshitaka, Kikuchi Kazuya, Mizukami Shin	4. 巻 60
2. 論文標題 Optical Manipulation of Subcellular Protein Translocation Using a Photoactivatable Covalent Labeling System	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202016684	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hori Yuichiro, Nishiura Miyako, Tao Tomomi, Baba Reisuke, Bull Steven D., Kikuchi Kazuya	4. 巻 12
2. 論文標題 Fluorogenic probes for detecting deacylase and demethylase activity towards post-translationally-modified lysine residues	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 2498 ~ 2503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0SC06551J	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Imamura Hiromi, Sakamoto Shuichiro, Yoshida Tomoki, Matsui Yusuke, Penuela Silvia, Laird Dale W, Mizukami Shin, Kikuchi Kazuya, Kakizuka Akira	4. 巻 9
2. 論文標題 Single-cell dynamics of pannexin-1-facilitated programmed ATP loss during apoptosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e61960
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.61960	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hashimoto Ryu, Minoshima Masafumi, Kikuta Junichi, Yari Shinya, Bull Steven D., Ishii Masaru, Kikuchi Kazuya	4. 巻 59
2. 論文標題 An Acid Activatable Fluorescence Probe for Imaging Osteocytic Bone Resorption Activity in Deep Bone Cavities	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 20996 ~ 21000
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202006388	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Imoto Takuma, Minoshima Masafumi, Yokoyama Tatsushi, Emery Ben P., Bull Steven D., Bito Haruhiko, Kikuchi Kazuya	4. 巻 6
2. 論文標題 A Photodeactivatable Antagonist for Controlling CREB-Dependent Gene Expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Central Science	6. 最初と最後の頁 1813 ~ 1818
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscentsci.0c00736	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tomczyk Mateusz Michal, Boncel Slawomir, Herman Artur, Krawczyk Tomasz, Jakobik-Kolon Agata, Pawlyta Mirosława, Krzywiecki Maciej, Chrobak Artur, Minoshima Masafumi, Sugihara Fuminori, Kikuchi Kazuya, Kuznik Nikodem	4. 巻 15
2. 論文標題 Oxygen Functional Groups on MWCNT Surface as Critical Factor Boosting T2 Relaxation Rate of Water Protons: Towards Improved CNT-Based Contrast Agents	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Nanomedicine	6. 最初と最後の頁 7433 ~ 7450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/IJN.S257230	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Wyskocka-Gajda Marzena, Przepis Lukasz, Olesiejuk Monika, Krawczyk Tomasz, Kuznik Anna, Nawara Krzysztof, Minoshima Masafumi, Sugihara Fuminori, Kikuchi Kazuya, Kuznik Nikodem	4. 巻 211
2. 論文標題 A step towards gadolinium-free bioresponsive MRI contrast agent	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 113086 ~ 113086
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejmech.2020.113086	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kumar Naresh, Hori Yuichiro, Nishiura Miyako, Kikuchi Kazuya	4. 巻 11
2. 論文標題 Rapid no-wash labeling of PYP-tag proteins with reactive fluorogenic ligands affords stable fluorescent protein conjugates for long-term cell imaging studies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 3694 ~ 3701
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0SC00499E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Torii Kenji, Hori Yuichiro, Watabe Keiichiro, Kikuchi Kazuya	4. 巻 93
2. 論文標題 Development of Photoswitchable Fluorescent Molecules Using Arylazopyrazole	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 821 ~ 824
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20200077	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Reja Shahi Imam, Minoshima Masafumi, Hori Yuichiro, Kikuchi Kazuya	4. 巻 12
2. 論文標題 Near-infrared fluorescent probes: a next-generation tool for protein-labeling applications	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 3437 ~ 3447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0SC04792A	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Minoshima Masafumi, Kikuta Junichi, Omori Yuta, Seno Shigeto, Suehara Riko, Maeda Hiroki, Matsuda Hideo, Ishii Masaru, Kikuchi Kazuya	4. 巻 5
2. 論文標題 In Vivo Multicolor Imaging with Fluorescent Probes Revealed the Dynamics and Function of Osteoclast Proton Pumps	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Central Science	6. 最初と最後の頁 1059 ~ 1066
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscentsci.9b00220	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Gao Jingchi, Hori Yuichiro, Shimomura Takashi, Bordy Mathieu, Hasserodt Jens, Kikuchi Kazuya	4. 巻 21
2. 論文標題 Development of Fluorogenic Probes for Rapid High Contrast Imaging of Transient Nuclear Localization of Sirtuin3	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 656 ~ 662
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.201900568	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Gao Jingchi, Hori Yuichiro, Takeuchi Osamu, Kikuchi Kazuya	4. 巻 31
2. 論文標題 Live-Cell Imaging of Protein Degradation Utilizing Designed Protein-Tag Mutant and Fluorescent Probe with Turn-Off Switch	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chemistry	6. 最初と最後の頁 577 ~ 583
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.9b00696	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Imoto Takuma, Kawase Akihiro, Minoshima Masafumi, Yokoyama Tatsushi, Bito Haruhiko, Kikuchi Kazuya	4. 巻 22
2. 論文標題 Photolytic Release of a Caged Inhibitor of an Endogenous Transcription Factor Enables Optochemical Control of CREB-Mediated Gene Expression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 22 ~ 25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.9b03568	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Benson Sam, Fernandez Antonio, Barth Nicole D., de Moliner Fabio, Horrocks Mathew H., Herrington C. Simon, Abad Jose Luis, Delgado Antonio, Kelly Lisa, Chang Ziyuan, Feng Yi, Nishiura Miyako, Hori Yuichiro, Kikuchi Kazuya, Vendrell Marc	4. 巻 58
2. 論文標題 SCOTfluors: Small, Conjugatable, Orthogonal, and Tunable Fluorophores for In Vivo Imaging of Cell Metabolism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 6911 ~ 6915
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201900465	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Kazuya Kikuchi
2. 発表標題 in vivo Imaging Probes to Clarify Cellular and Molecular Functions
3. 学会等名 RSC Tokyo International Conferences 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kikuchi Kazuya
2. 発表標題 New Biological Findings which were Revealed by Designed Fluorescent Probes
3. 学会等名 Chemical Biology & Physiology Conference 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kikuchi Kazuya
2. 発表標題 In vivo Multicolor Imaging with Fluorescent Probes Revealed Dynamics and Function of Osteoclast Proton Pumps
3. 学会等名 16th International, Methods & Applications of Fluorescence (Roger Y Tsien Memorial Symposium) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kikuchi Kazuya
2. 発表標題 In vivo Chemical Probes for MRI and Fluorescence Imaging
3. 学会等名 ICBIC-19, International Conference on Biological Inorganic Chemistry (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kikuchi Kazuya
2. 発表標題 Development of Multifunctional ¹⁹ F MRI Contrast Agents Based on Fluorine-encapsulated Silica Nanoparticle
3. 学会等名 The Future of Molecular MR: A Cellular and Molecular Imaging Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊地 和也
2. 発表標題 イメージングプローブのデザイン・合成によるケミカルバイオロジー研究
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会 合同年次学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 袁島維文、菊地和也	4. 発行年 2020年
2. 出版社 講談社	5. 総ページ数 576
3. 書名 核酸科学ハンドブック（第5章2 MRIプローブ）	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ケージド化合物から化合物を放出させる方法	発明者 袁島維文、橋本龍、菊地和也	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-022014	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------