

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02849

研究課題名(和文) 超耐光性蛍光色素を利用したオルガネラ連携のマルチカラー超解像ライブイメージング

研究課題名(英文) Multi-color super-resolution imaging of organelle communications using super-photostable fluorescent dyes

研究代表者

多喜 正泰 (TAKI, Masayasu)

名古屋大学・物質科学国際研究センター(WPI)・特任准教授

研究者番号：70378850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では種々のオルガネラ動態を長時間観察するための超耐光性オルガネラ蛍光標識剤を開発した。ホスホールやチオフェン環を含むストークスシフトが大きい色素群、およびホスファキサンテン骨格を基盤とした小さいストークスシフトをもつ近赤外蛍光色素を開発し、それぞれにオルガネラ選択性を付与した。その優れた耐光性を利用することで、非常に強いレーザー光照射を必要とする超解像イメージングにおいて標的オルガネラのタイムラプス観察を達成した。また、これらの蛍光色素を組み合わせることで、複数オルガネラのマルチカラー染色が可能となり、その経時的な変化をリアルタイムで捉えることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生きた細胞においてオルガネラ間に働く相互作用を解析するためには、超解像技術による可視化が有効であり、これを可能にする超耐光性オルガネラ染色剤の開発が必要不可欠である。本研究で得られた成果は、蛍光色素の分子設計において新たな指針を示したのみならず、オルガネラ間連携を解明するうえで強力な技術になるはずである。したがって、生命科学分野、医学・創薬など様々な学問分野への寄与が期待される研究成果であるといえる。

研究成果の概要(英文)：Super photostable organelle fluorescent labeling agents have been developed for long-term observation of various organelle dynamics. We synthesized a series of fluorescent dyes with large Stokes shifts based on a ladder-type  $\pi$ -skeleton containing phosphole or thiophene rings, as well as near-infrared fluorescent dyes based on the phosphaxanthene skeleton, which have a small Stokes shift. Each of these fluorescent labeling agents was given organelle selectivity. By taking advantage of their excellent photostability, time-lapse imaging of target organelles was achieved with super-resolution microscopy, which requires extremely intense laser irradiation. The combination of these fluorophores allowed multi-color labeling of multiple organelles, enabling real-time observation of organelle changes in real time.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：オルガネラ染色剤 蛍光イメージング 耐光性 マルチカラー ミトコンドリア 脂肪滴 超解像イメージング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

細胞の生命維持活動では、効率的な情報伝達を達成するため複数のオルガネラが統合し、互いに連携し合いながら高次機能を発揮している。例えば、小胞体とミトコンドリアの接触領域は、カルシウムの受け渡しや脂質分子の輸送のみならず、ミトコンドリアの分裂の制御やアポトーシスの実行など、多様な機能を有している。このようなオルガネラ連携の形成機構や生物学的役割を多角的に理解することは、様々な病態解明や医薬品開発にも深く関与することから、大きな社会的波及効果をもたらす。超解像顕微鏡を用いた蛍光イメージングは、オルガネラ間で働くダイナミクスを精緻に解析することができる非常に強力な手法である。超解像顕微技術の中でも誘導放出抑制を原理とする STED 顕微鏡は、高い時空間分解能をもつことが特徴であり、共焦点顕微鏡では捉えられなかった微細な細胞構造が可視化できるようになった。しかし、STED イメージングにおいて最も大きな問題となっているのが、強力なレーザー光照射による蛍光色素の著しい褪色である。そのため、同一視野の連続撮像が困難であり、STED 顕微鏡が本来もっている性能を完全に活かしてきていない。

### 2. 研究の目的

本研究ではミトコンドリア、小胞体、脂肪滴、ゴルジ体などに着目し、それぞれを STED 顕微鏡で長時間観察するための超耐光性オルガネラ蛍光標識剤を開発する。これらの分子ツールを用いて生細胞を染色し、オルガネラ接触領域における膜動態をマルチカラーで捉え、オルガネラ連携の形成機構解明に繋げていく。具体的な研究課題は次の3項目である。

#### ①超耐光性蛍光色素群の創製

複数のオルガネラを STED イメージングで同時に観察するため、ストークスシフトが異なる各種  $\pi$  電子骨格を基盤に、多様な光物性をもつ一連の超耐光性蛍光色素群を合成する。

#### ②超耐光性オルガネラ染色剤の論理的創出

超耐光性蛍光色素と既知のオルガネラ局在性官能基を組み合わせ、超耐光性オルガネラ蛍光染色剤を得る。

#### ③マルチカラーSTED イメージングによるオルガネラ相互作用の膜動態観測

マルチカラーSTED イメージングを実施し、各オルガネラ間で働く膜動態をタイムラプスで観測する。

### 3. 研究の方法

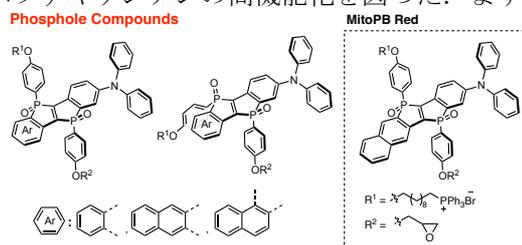
#### ①-1. 大きなストークスシフトを有する超耐光性蛍光色素

架橋部位にホスホリル基をもつ一連のベンゾ[b]ホスホール-P-オキシド誘導体を合成し、その光物性や耐光性について検討した。具体的には、ベンゼン環およびナフタレン環が縮環されたものであり、ナフタレン環に関しては、縮環位置の異なる2種類の化合物を合成した。さらに、それぞれの幾何異性体を単離し、計6種類の蛍光色素について評価した。

また、別の骨格としてチエノ[3,2-b]チオフェン構造を基盤とした蛍光色素開発にも取り組んだ。2種類のチオフェン環に対して酸化位置の異なる3種類の化合物を合成し、それぞれについて光物性や耐光性を評価した。

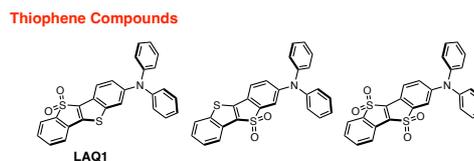
#### ①-2. 小さなストークスシフトを有する超耐光性蛍光色素

これまで開発してきた耐光性近赤外蛍光色素ホスファキサンテンの高機能化を図った。まず、任意のオルガネラに対する局在性を付与できるように、リン原子上のフェニル基へエチニル基を導入する合成法を確立した。また、9位のアリール基を種々変更し、細胞膜透過性および蛍光標識能の向上を図った。



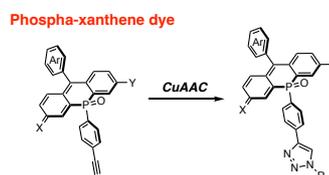
#### ②-1. ミトコンドリア標識剤の開発

上記で合成したビスホスホール骨格に対して、ミトコンドリア局在性を有するトリフェニルホスホニウム基とタンパク質と共有結合可能なエポキシド基をそれぞれ導入し、ミトコンドリア標識剤としての最適化を図った。これらの官能基を連結するリンカー長や種類が異なる一連の化合物を合成、生細胞を用いた共焦点イメージングからミトコンドリア標識に最適な構造を決定した。



#### ②-2. リソソーム標識剤の開発

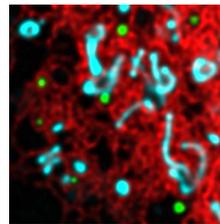
これまで開発してきたナフトホスホール型の骨格に対して、ジメチルアミノ基を連結されること



で、リソソーム局在性を付与し、超耐光性リソソーム染色剤とした。

### ②-3. 脂肪滴染色能の評価

3T3-L1 細胞から分化誘導した脂肪細胞を用いて、チオフェンの酸化位置の異なる3種類の蛍光色素について脂肪滴染色能を評価した。また、種々の蛍光色素を組み合わせて脂肪滴、ミトコンドリア、小胞体のマルチカラーイメージングを行い、それぞれのオルガネラの位置関係を高い空間分解能で捉えた。



緑：脂肪滴  
シアン：ミトコンドリア  
赤：小胞体

### ②-4. 合成後期官能基化によるオルガネラ局在性の付与

上記のホスファキサンテン色素に対してクリック反応を利用して、核、リソソーム、およびミトコンドリアへの局在性を有する官能基をそれぞれ連結させた。それぞれの色素を用いて細胞を染色し、オルガネラ局在性を評価するとともに、その動態をライブで追跡した。また、pH変化に対して蛍光応答性を示す新たな蛍光プローブを開発し、これをデキストランと連結させることでリソソームの成熟過程におけるpH変化を可視化した。

### ③-1. ミトコンドリア内膜動態の超解像イメージング

上記過程で最適化したミトコンドリア染色剤 MitoPB Red を用いて細胞を染色し、その様子をSTED顕微鏡により観察した。またミトコンドリア膜のタイムラプス観察を実施し、その動態について検討した。

### ③-2. 脂肪滴動態の超解像イメージング

開発した3種類の脂肪滴染色剤のうち、最も性能が優れていた LAQ1 について脂肪滴形成のタイムラプス観察、および極微小脂肪滴の超解像イメージングを行った。脂肪細胞を LAQ1 で染色し、培地にフォルスコリンおよび IBMX を添加することで細胞内 cAMP 濃度を高めた結果、脂肪滴の分解および新しい脂肪滴の形成を捉えることができた。また、STED顕微鏡により、直径が100 nm程度の脂肪滴を捉えることに成功した。

## 4. 研究成果

### ①-1.

ビスホスホール：合成した一連のビスホスホール化合物はいずれも溶媒の極性に対して高い応答性を有していた。ナフトールを縮環した化合物のうち、2,3位で連結したものは最も高い輝度を示した。アセトニトリルのような極性溶媒中ではほとんど蛍光を示さなかったことから、脂質膜のような低極性環境にある色素を検出するのに適しているものといえる。一方、1,2位で連結したものは最も長波長側に吸収および蛍光極大波長を示したが、モル吸光係数および蛍光量子収率が2,3-縮環体に比べて低く、輝度の大幅な低下が認められた。また、P=Oの向きが同一（シス体）と反対（トランス体）の幾何異性体では光物性に大きな違いが認められなかった。さらに耐光性について評価したところ、いずれのビスホスホール化合物もモノホスホール化合物に比べて高い耐光性を示した。これは、ホスホリル基を2つ導入することにより、化合物の HOMO がさらに安定化したことに起因しているものと考えられる。

チエノベンゾチオフェン：まず、酸化位置の違いが光物性に与える影響について検討した。その結果、2つのチオフェン環の酸化位置では大きな違いが認められなかったが、両方も酸化した場合には、吸収および蛍光スペクトルの大きな長波長シフトと、蛍光量子収率の大幅な減少が認められた。いずれの化合物も高い耐光性をもつことがわかった。

①-2. リン原子上にエチニルフェニル基を有するホスファキサンテン化合物を鍵中間体として得た。これと種々の ArLi 化合物を反応させることで対応するホスファローダミン色素を合成した。また、得られたローダミンを塩基で処理することにより、一方あるいは両方のアミノ基が酸素原子で置き換わったロドールおよびフルオレセイン化合物を得た。

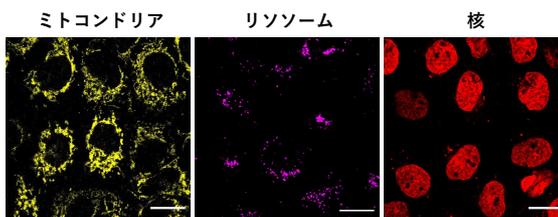
②-1. ビスホスホール化合物のうち、2,3位で縮環した骨格がオルガネラ膜染色剤として最も適切な光物性を示した。さらに、色素と各官能基を繋ぐリンカーの長さや種類について検討した結果、図で示す MitoPB Red がミトコンドリア染色剤として優れた性能を示した。MitoPB Red によって標識されたミトコンドリアは細胞を固定後でも観測されたことから、共有結合を介したミトコンドリアタンパク質の蛍光標識が確認された。

②-2. マルチカラーイメージングを実現するため、波長の異なる色素として以前開発したモノホスホール化合物について、ジメチルアミノ基を導入することにより (LysoPB Yellow)、リソソームへの集積性を高めた。LysoPB Yellow を用いて細胞を染色後、リソソームを STED 顕微鏡で観察したところ、リソソーム膜の構造を生きた細胞で捉えることに成功した。

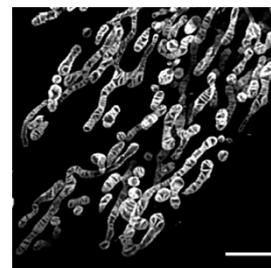
②-3. 脂肪滴選択性および細胞毒性を評価したところ、図に示す LAQ1 が脂肪滴染色剤として最も優れた性質をもつことがわかった。そこで、HeLa 細胞を LAQ1 で染色し、MitoTracker deepred

によるミトコンドリアの染色, および Kusabira-Orange 1 による小胞体染色を同時に行い, その様子を共焦点顕微鏡により観察した. その結果, 微小脂肪滴の周りを小胞体を取り囲んでいる様子を捉えることができた. さらに STED 顕微鏡により極微小脂肪滴を観察することにも成功した.

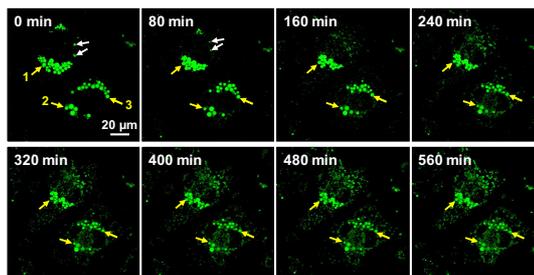
②-4. リン原子上にエチニルフェニル基を有する各種ホスファキサンテン色素に対して, アジド基を有するヘキスト, モルホリン, トリフェニルホスホニウムをクリック反応を介して連結させ, 各色素を培地に添加したところ, それぞれ核, リソソーム, およびミトコンドリアに集積している様子が観察された (右図). これらの修飾は合成後期に可能であることから, 色素の細胞内局在をコントロールできる優れた方法であることが示された. 次に, 2つの pKa 値を有するホスファフルオレセインを合成し, これをクリック反応によってデキストランと連結させた. 2つの pKa 値をもつことによって, pH 5.5 付近の弱酸性領域にあるリソソームを選択的に可視化することができる. これにより, エンドソームの成熟過程に伴う pH の変化を捉えることに成功した.



③-1. MitoPB Red で染色した細胞を STED 顕微鏡により観察した. 520 nm で励起し, 775 nm の STED レーザーを使用したところ, クリステの構造が明瞭に観察された (右図). 次に, 1 fps の速度でタイムラプス観察を実施したところ, 経時的に変化するクリステ動態を捉えることに成功した. しかし, このまま観察を続けていくとミトコンドリア膜が膨潤した. これは, MitoPB Red への光照射により, 活性酸素種が発生し, これがミトコンドリアの脂質膜を酸化したことが原因であると推定される.



③-2. LAQ1 で染色した脂肪細胞に対してフォロスコリンと IBMX を添加すると, 細胞内 cAMP 濃度の上昇に伴ってトリアシルグリセロールの分解反応が進行する様子が捉えられた. この処理を血清を含まない培地で行ったところ, 大きな脂肪滴のサイズの減少とともに, 新たな微小脂肪滴の著しい増加が認められた. これは中性脂肪の加水分解によって生じた遊離の脂肪酸が細胞外に排出されず, 細胞内で再代謝されて小胞体膜内で脂肪滴を形成したためである. また, 3T3-L1 細胞を LAQ1 で染色後, 分化誘導処理を行った際の脂肪滴動態を観察した. その結果, いくつかの微小脂肪滴がクラスターを形成することでサイズが大きくなっていることがわかった.



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Wang Chenguang, Taki Masayasu, Kajiwara Keiji, Wang Junwei, Yamaguchi Shigehiro	4. 巻 2
2. 論文標題 Phosphole-Oxide-Based Fluorescent Probe for Super-resolution Stimulated Emission Depletion Live Imaging of the Lysosome Membrane	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Materials Letters	6. 最初と最後の頁 705 ~ 711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmaterialslett.0c00147	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 Taki Masayasu, Kajiwara Keiji, Yamaguchi Eriko, Sato Yoshikatsu, Yamaguchi Shigehiro	4. 巻 3
2. 論文標題 Fused Thiophene-S,S-dioxide-Based Super-Photostable Fluorescent Marker for Lipid Droplets	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Materials Letters	6. 最初と最後の頁 42 ~ 49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmaterialslett.0c00451	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 Wang Chenguang, Taki Masayasu, Sato Yoshikatsu, Tamura Yasushi, Yaginuma Hideyuki, Okada Yasushi, Yamaguchi Shigehiro	4. 巻 116
2. 論文標題 A photostable fluorescent marker for the superresolution live imaging of the dynamic structure of the mitochondrial cristae	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 15817 ~ 15822
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1905924116	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 Grzybowski Marek, Taki Masayasu, Kajiwara Keiji, Yamaguchi Shigehiro	4. 巻 26
2. 論文標題 Effects of Amino Group Substitution on the Photophysical Properties and Stability of Near Infrared Fluorescent P Rhodamines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemistry ? A European Journal	6. 最初と最後の頁 7912 ~ 7917
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.202000957	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 Kajiwara Keiji, Osaki Hiroshi, Gre?ies Steffen, Kuwata Keiko, Kim Ju Hyun, Gensch Tobias, Sato Yoshikatsu, Glorius Frank, Yamaguchi Shigehiro, Taki Masayasu	4. 巻 13
2. 論文標題 A negative-solvatochromic fluorescent probe for visualizing intracellular distributions of fatty acid metabolites	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2533
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-30153-6	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 Ogasawara Hiroaki, Tanaka Yoshiki, Taki Masayasu, Yamaguchi Shigehiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Late-stage functionalisation of alkyne-modified phospho-xanthene dyes: lysosomal imaging using an off/on/off type of pH probe	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 7902 ~ 7907
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1sc01705e	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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 多喜 正泰
2. 発表標題 細胞内銅一価イオンの検出に向けた蛍光プローブの分子設計戦略
3. 学会等名 日本薬学会第141年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 多喜 正泰
2. 発表標題 Molecular tools for super-resolution imaging of sub-organelle structures
3. 学会等名 第63回 日本神経化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 梶原 啓司, 大崎 博司, 桑田 啓子, Frank Glorius, 多喜 正泰, 山口 茂弘
2. 発表標題 環境応答性蛍光脂肪酸を用いた脂質代謝の可視化
3. 学会等名 日本化学会 第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中良來, 小笠原宏亮, 梶原啓司, 多喜正泰, 山口茂弘
2. 発表標題 多機能化ホスファキサンテン色素の創製と細胞イメージングへの応用
3. 学会等名 第47回有機典型元素化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 梶原啓司, 多喜正泰, 山口茂弘
2. 発表標題 超耐光性を有する脂肪滴染色剤の創出
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masasyasu Taki
2. 発表標題 Phosphorus-containing fluorescent dyes for optical imaging
3. 学会等名 Asian-ChIP 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masasyasu Taki
2. 発表標題 Molecular tools enable super-resolution imaging of mitochondrial dynamics
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 多喜正泰
2. 発表標題 Super-photostable dyes enable detection of ultra-structures of cell organelle
3. 学会等名 2019年度化学系学協会東北大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 多喜正泰
2. 発表標題 有機蛍光色素が導く最先端バイオイメージング技術
3. 学会等名 2019年光化学討論会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masayasu Taki
2. 発表標題 Chemical Tools for Fluorescence Imaging
3. 学会等名 ISABC15（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 架橋型チオフェン色素	発明者 多喜正泰・山口茂弘	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、C20200441	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>細胞が生きたままでミトコンドリアの内膜構造が鮮明に見えた <a href="http://www.nagoya-u.ac.jp/about-nu/public-relations/researchinfo/upload_images/20190724_itbm1.pdf">http://www.nagoya-u.ac.jp/about-nu/public-relations/researchinfo/upload_images/20190724_itbm1.pdf</a></p> <p>生きた細胞内で脂肪酸の代謝産物を3色で染め分け - 脂質代謝を標的とした細胞機能解明と創薬へ - <a href="https://www.nagoya-u.ac.jp/researchinfo/result/upload/20220512_itbm.pdf">https://www.nagoya-u.ac.jp/researchinfo/result/upload/20220512_itbm.pdf</a></p>
---

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
---------	---------