

# 固定耐性を持つ緑色点滅蛍光タンパク質の開発と PALM への応用

大菅 光雄

奈良先端科学技術大学院大学

先端科学技術研究科

バイオサイエンスプログラム

主指導教員 : 末次 志郎 教授

分子医学細胞生物学研究室 (バイオサイエンス領域)

令和4年2月9日提出

# 目次

1. 序論.....	4
1.1 超解像顕微鏡.....	4
1.2 局在化法で用いられてきた蛍光タンパク質.....	8
1.3 研究目的.....	12
2. 材料と方法.....	13
2.1 プラスミド.....	13
2.2 PCR プライマー.....	14
2.3 Gibson assembly システムを用いた遺伝子導入.....	15
2.4 部位特異的変異導入によるプラスミド DNA の作製.....	15
2.5 蛍光タンパク質の発現・精製.....	16
2.6 SDS-PAGE.....	18
2.7 CBB 染色.....	18
2.8 タンパク質濃度の定量.....	18
2.9 精製蛍光タンパク質の光学的特性の測定.....	19
2.10 精製蛍光タンパク質の点滅能力の測定.....	20
2.11 精製蛍光タンパク質の固定耐性の測定.....	20
2.12 固定による点滅特性変化の測定.....	21
2.13 細胞培養.....	21
2.14 Lipofectamine™ 3000 によるトランスフェクション及び安定発現株の作製.....	22
2.15 PALM による超解像イメージングと解析.....	22
2.16 PALM により観察した微小管の半値全幅の評価.....	23
2.17 PALM で観察した CLTA クラスターの定量.....	23
2.18 Western Blotting.....	24
2.19 抗体染色を併用した 2 色超解像観察.....	25
3. 結果.....	27
3.1 固定耐性を持つ点滅蛍光タンパク質の構築.....	27

3.2	蛍光タンパク質の発現・精製 .....	28
3.3	精製蛍光タンパク質の蛍光スペクトル.....	29
3.4	精製蛍光タンパク質における蛍光点減能の評価.....	30
3.5	各蛍光タンパク質の光学的特性.....	31
3.6	精製蛍光タンパク質を用いた固定耐性の検証 .....	34
3.7	点滅蛍光タンパク質の化学固定による点滅動態変化の観察 .....	35
3.8	frSkylan-S 融合 $\alpha$ -tubulin による微小管の PALM イメージング .....	39
3.9	frSkylan-S 融合クラスリン軽鎖の PALM イメージング .....	41
3.10	点滅蛍光タンパク質融合 CLTA の PALM 観察における固定耐性の影響.....	43
3.11	抗体染色を併用した frSkylan-S による 2 色での超解像観察 .....	45
3.12	frSkylan-S のゲノムタグによる内在性タンパク質の超解像観察.....	47
4.	考察.....	50
5.	謝辞 .....	55
	<b>Supplemental data1</b> .....	60
	<b>Supplemental data2</b> .....	63

# 1. 序論

## 1.1 超解像顕微鏡

### 1.1.1 超解像顕微鏡法

超解像顕微鏡法は光学顕微鏡を用いる際の障壁となる、アッペの回折限界に由来する分解能の限界を超越し、蛍光顕微鏡による 20 nm 程度の解像度での観察を実現させた。従来の光学顕微鏡の分解能は、レンズの開口数と観察に使用できる光の波長 (約 400 nm) から約 150-200nm が限界となり、それ以下の間隔で並んだ 2 つの物体は解像できず、1 つに見えてしまう (1-5)。この解像限界を上回る解像度での観察を可能にするために、いくつかの超解像技術が開発された。代表的な超解像顕微鏡法は 3 種類ある。

1 つ目は構造化照明顕微鏡法 (Structured Illumination Microscopy, SIM) (2) で、周期的な構造を持つ照明光 (干渉縞など) を方向や位置を変えて照射し、既知のパターンと得られたパターンを統合することでモアレパターンを作り、サンプルの形状を検出する。SIM の長所は、他の超解像顕微鏡法と比較して、光毒性が低く抑えられるのでライブイメージングに適しており、蛍光を検出できれば良いので蛍光分子を選ばず観察が可能な点である。一方で、SIM の短所としては、計算から得られた超解像画像の解像度が、他の超解像顕微鏡法と比較して劣る点である (100 nm 程度)。しかし最近では、点滅蛍光タンパク質による非線形な蛍光を利用して、得られる超解像画像の解像度を向上させた非線形構造化照明顕微鏡法 (NonLinear Structured-Illumination Microscopy, NL-SIM) (6) なども考案されている。

2 つ目は誘導放出抑制顕微鏡法 (STimulated Emission Depletion microscopy, STED) (1,3) で、ドーナツ型の誘導放出用レーザービームを照射して、励起ビームの中心が当たる場所以外を脱励起することで、点広がり関数の有効幅を小さくし、超解像画像を得る方法である。STED の長所としては、誘導放出光のドーナツの穴を小さくし、レーザー強度を強くすることで、理論的には数 nm の解像度で超解像画像を得ることが可能な点で、ライブでの観察も可能である。一方で、STED の短所としては、誘導放出光の強度が解像度に直結するため、高解像度の画像を得るために強いレーザー光を照射すると、蛍光褪色が起こりやすく光毒性も強くなってしまふことである。

また、3 つ目が局在化法 (PhotoActivated Localization Microscopy, PALM (4) または Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, STORM (5) ) で、蛍光分子の蛍光活性を確率的に ON にすることで各々の蛍光分子をばらばらに検出し、それらの重心位

置を計算により求めて再構成することにより、超解像画像を得る方法である。他の超解像顕微鏡法と比較した局在化法の長所は、1分子の局在情報を取得することで、再構成された超解像画像の解像度が最も高いことである。一方、局在化法の短所は、点滅活性等を持つ特定の蛍光分子を観察に使用しなければならない点である。また、一度に観察できる分子数が少なくなるため、ライブイメージングには適していない。局在化法を発展させた技術として、時間変化による蛍光強度の揺らぎから蛍光分子を識別し、超解像画像を再構成する Super-resolution Optical Fluctuation Imaging (SOFI) (7) がある。

これらの技術によって、光学顕微鏡を用いた 200 nm を超える解像度の超解像画像の取得が可能となった。

### 1.1.2 局在化法

超解像顕微鏡法の1つである局在化法は、観察対象となる蛍光分子を~20 nmの精度で識別する方法である(4,5)。局在化法において超解像を達成するためにはまず各蛍光分子を離散的に観察する必要がある。その後、観察された蛍光画像から1分子による蛍光を検出し、ガウス分布をフィッティングすることで各分子の重心位置を求める。これにより1分子の座標が求められる。この求められた重心位置の精度が再構成後の超解像画像の解像度を決定し、その不確実性から約20 nmとなる。

ただし、通常の蛍光観察では目的分子に付加した蛍光分子が一様に蛍光を発するため、1分子毎の座標を求めることができない。そのため、目的分子に由来する多数の蛍光シグナルを判別するためには、目的分子に確率的観察が可能なラベルを付加する必要がある。

現在までに、Alexa シリーズなどの蛍光色素を結合した抗体、Kaede や mEos などのフォトコンバージョン能を持つ蛍光タンパク質、Dronpa や Skyran などのフォトスイッチング能を持つ蛍光タンパク質などが確率的観察のためのラベルとして利用されている(8-10)。これらに微弱な光を照射することで確率的に活性化させ、十分な早さで画像を取得することで付近の蛍光分子の蛍光と時空間的に分離し、個々の蛍光分子を検出する。その後活性化された蛍光分子の蛍光活性をOFFにし、別の蛍光分子を確率的に活性化させる。これを何度も繰り返して全蛍光分子を観察し、それらの重心位置を求め、全ての蛍光分子の重心位置を再構成することで、超解像画像を得ることができる(図1)。

一方、局在化法において多数の目的分子由来の蛍光シグナルを得るには、比較的長時間の観察が必要となるため、観察の際には細胞の化学固定が行われてきた。ただし、大部分の蛍光タンパク質は化学固定によって構造が歪み、蛍光活性を消失すると考えられている(11-13)。

従って、局在化法による超解像観察においては、フォトコンバージョン能またはフォトスイッチング能を有し、かつ固定耐性を持つ蛍光タンパク質が、目的分子をラベルする際に必要である。

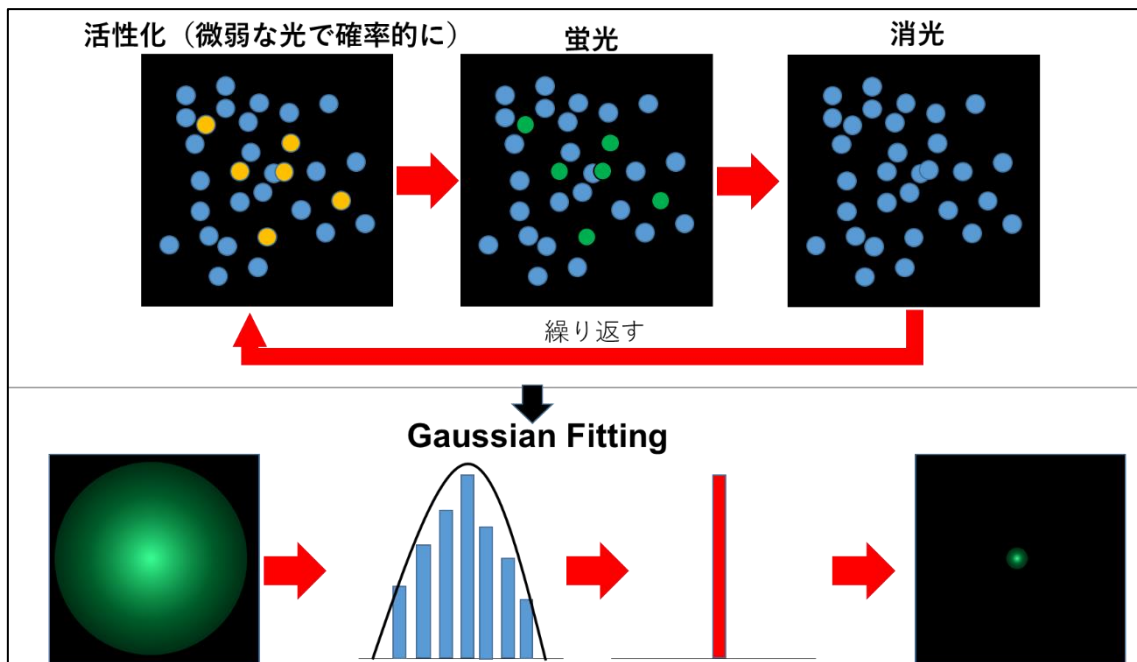


図 1. 局在化法の概要図

局在化法では蛍光分子を微弱な光で確率的に活性化させ、蛍光イメージングを行った後に消光させる過程を繰り返して全蛍光分子を観察する。その後、得られた輝点にガウスフィッティングを行うことで重心位置を求め、全蛍光分子の重心位置を再構成することで超解像画像を得る。

## 1.2 局在化法で用いられてきた蛍光タンパク質

### 1.2.1 mEos4b

mEos2 から派生した mEos4b は、アルデヒドや四酸化オスミウムによる化学固定に耐性を持つため、細胞を化学固定したのちの超解像観察に有効であると報告されている (12)。mEos4b は、紫外光~紫光を照射することで、蛍光が緑色から赤色に確率的、かつ、不可逆的にフォトコンバージョンする。局在化法を用いた観察では、フォトコンバージョン後に強い励起光の照射により、観察と同時に赤色蛍光を褪色・消光させることで、確率的観察が可能となる。しかしながら、これらの理由により、mEos4b は一分子をおおむね一度しか観察できない。また、蛍光の緑色から赤色へのフォトコンバージョンを用いて観察を行うことにより、2色の波長領域を使用するため、多色での局在化法による観察には不向きである。

### 1.2.2 Skylan

Skylan は、フォトコンバージョン能を有する蛍光タンパク質 mEos3.1 を、緑色蛍光の点滅 (フォトスイッチング) を行うことができるように改変した蛍光タンパク質であり、Skylan-S (14) と Skylan-NS (15) が報告されている。Skylan-S は、SOFI (7) を用いた超解像観察を行うために開発された蛍光タンパク質である。Skylan-NS は、弱い光でもフォトスイッチングが可能のため、光毒性が低く、かつコントラスト比の良い蛍光タンパク質であり、生細胞の超解像観察 (特に NL-SIM (6) を用いた観察) に用いるために開発された。



### 1.2.3 蛍光タンパク質の蛍光変換・点滅メカニズム

局在化法に使用可能な蛍光タンパク質における、発色団の蛍光変換・点滅メカニズムについてはいくつか知られており (10,16)、このうち上記の mEos4b 及び Skylan においては、以下の変換・点滅機構が報告されている (図 2)。

mEos4b は緑色から赤色に蛍光を変化させる、フォトコンバージョンを行うことができる蛍光タンパク質である (12)。フォトコンバージョンが起こる際には、紫(外)光の照射によってアミノ酸のバックボーンが切断される必要がある。切断により発色団にヒスチジンのイミダゾール環が加わることで、蛍光が赤色に変わるが、切断個所を元に戻すことができないため、この変化は不可逆的である。従って、おおむね一度しか点滅することができない。

一方 Skylan は、蛍光活性を ON/OFF する、フォトスイッチングを行うことができる。フォトスイッチングは、光異性化を介したチロシン残基の構造変化により行われる (17,18)。励起光を吸収して励起状態になった後、確率的な光異性化により構造が cis から trans に変わり、その後チロシン残基がプロトン化されることで OFF 状態になる。さらに発色団に紫(外)光を照射することで励起状態となり、光異性化によって再度 trans から cis に構造が変化し、その後チロシン残基が脱プロトン化されることで蛍光活性が ON 状態となる。これによって繰り返し蛍光の点滅を行うことが可能となる。Skylan-NS では、光異性化によりフェノール環との二面角 (N—C=C—C) が  $1^\circ$  (cis) から  $171.1^\circ$  (trans) に変わることが結晶構造解析から明らかになった (17)。これによってフェノール環の酸素は  $6.1 \text{ \AA}$  動き、水分子を介した Glu-144 との間接的な水素結合によって安定化する (17)。Skylan-S では結晶構造解析は行われていないが、類似した構造を有することから、同様の光異性化による構造変化を介してフォトスイッチングが行われていると考えられる。

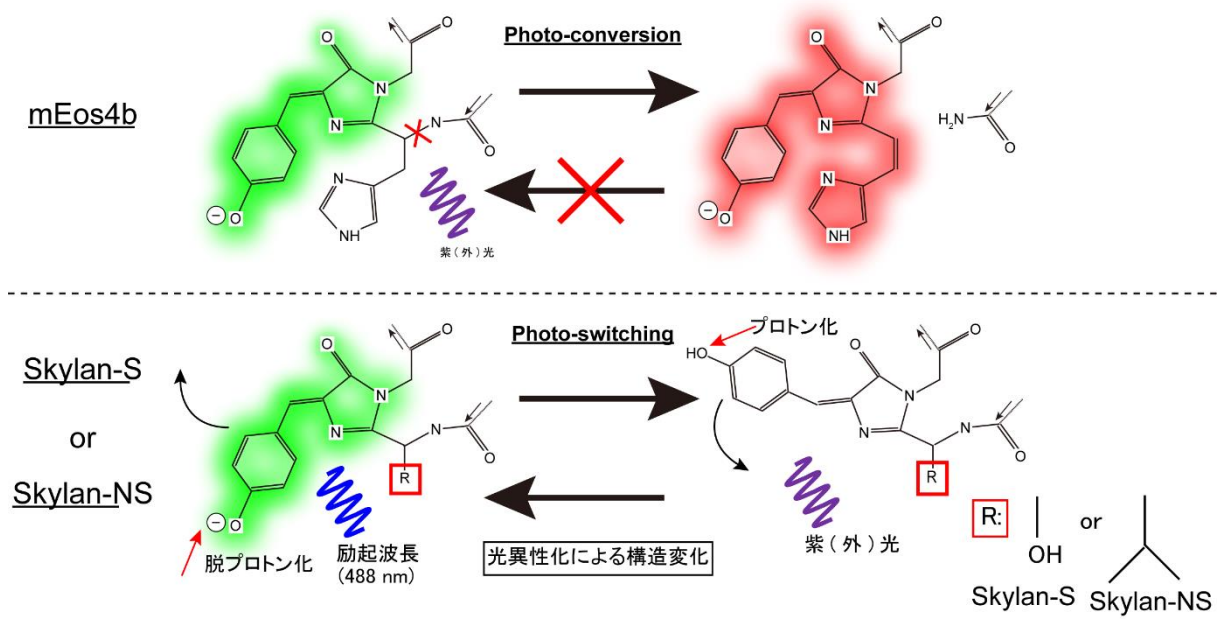


図 2. mEos4b 及び Skylan における蛍光発色団の変換・点滅メカニズム

蛍光タンパク質の発色団の変換・点滅メカニズム。mEos4b のフォトコンバージョンは紫（外）光の照射によってバックボーンを切断し、不可逆的に蛍光の波長を変える。Skylan のフォトスイッチングでは、光異性化を利用して発色団の構造を可逆的に変化させ、連続した点滅を可能とする。



### 1.3 研究目的

本研究では、局在化法による超解像観察に適した、固定耐性を持つ点滅蛍光タンパク質の開発を目的として、固定耐性を有する蛍光変換タンパク質 mEos4b の発色団に点滅蛍光タンパク質 Skyln-S、-NS の発色団のアミノ酸変異を導入した。

局在化法を用いた超解像観察では、上に述べたように細胞の化学固定を行う必要がある。しかし、Skyln を含む大部分の蛍光タンパク質は、化学架橋によりタンパク質構造や蛍光変換・点滅の際の構造変化に異常をきたすため、得られる蛍光シグナル数が減少し、本来のタンパク質分布に近い超解像イメージを再構成できなくなる (図 4)。従って、固定耐性を持つ蛍光タンパク質の開発が必要である。

現在までに固定耐性を持つ蛍光タンパク質として mEos4b が報告されているが、蛍光変換タンパク質であるため繰り返し点滅を行うことができず、また緑色と赤色の 2 波長を使用するため、局在化法による多色観察が難しい。従って、単色蛍光を点滅でき、かつ固定耐性を持つ蛍光タンパク質の開発を目指した。

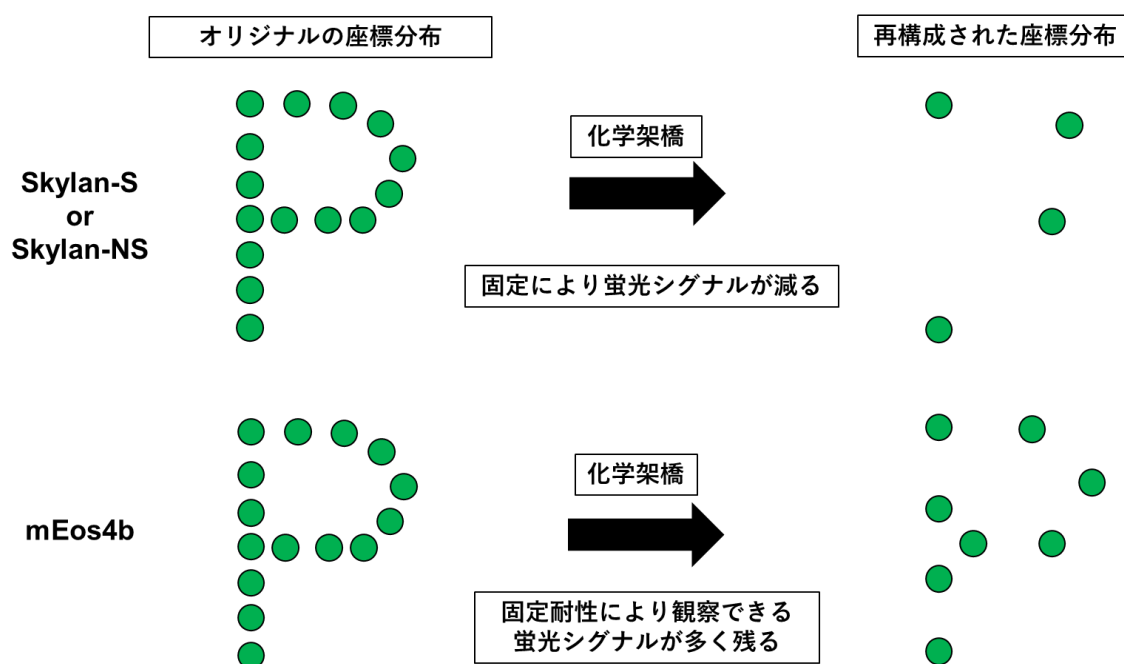


図 4. 局在化法によるタンパク質座標分布の再構成における、化学固定の影響  
多くの蛍光タンパク質はアルデヒドで化学架橋されると機能しなくなり、蛍光シグナルが減少する。局在化法による超解像観察では蛍光シグナル減少によって本来のタンパク質分布を再構成できなくなるため、より固定耐性を持った蛍光タンパク質が必要である。

## 2. 材料と方法

### 2.1 プラスミド

本研究で使用したプラスミド DNA を以下に記載する。

表 1 プラスミドリスト

プラスミド
① pmVenus-C1 (西村珠子助教から譲渡, Addgene, #27794)
② pSkylan-NS-C1 (Gibson assembly システムで作製)
③ pRSET-A-mEos4b (末次志郎教授から譲渡, pRSET-A の BamHI と EcoRI の間に mEos4b を挿入)
④ pRSET-A-mEos4b-H63S (部位特異的変異導入で作製)
⑤ pRSET-A-mEos4b-H63L (部位特異的変異導入で作製)
⑥ pRSET-A-Skylan-NS (Gibson assembly システムで作製)
⑦ pRSET-A-Skylan-S (部位特異的変異導入で作製)
⑧ pEGFP-Tub (Clontech, #6117-1)
⑨ pmEos4b-Tub (Gibson assembly システムで作製)
⑩ pfrSkylan-S-Tub (部位特異的変異導入で作製)
⑪ pEF1-EGFP-CLTA (末次志郎教授から譲渡, Invitrogen, V92020 の pEF1/V5-His A を基に、KpnI と EcoRI の間に EGFP、XbaI と PmeI の間に CLTA を挿入)
⑫ pEF1-mEos4b-CLTA (Gibson assembly システムで作製)
⑬ pEF1-frSkylan-S-CLTA (部位特異的変異導入で作製)
⑭ pEF1-frSkylan-NS-CLTA (部位特異的変異導入で作製)
⑮ pEF1-Skylan-NS-CLTA (Gibson assembly システムで作製)
⑯ pEF1-Skylan-S-CLTA (部位特異的変異導入で作製)
⑰ pGEX-6p-1-EGFP (末次志郎教授から譲渡, supplemental data 1 に表記)
⑱ px459-hIRTKS-cp235 (西村珠子助教より譲渡, Addgene の#62988 の BbsI サイトに、sgRNA 配列”ggccgccggcgagcaagcg”を挿入。)
⑲ pfrSkylan-S-C1-n14IRTKS (Gibson assembly システムで作製, supplemental data2 に表記)

## 2.2 PCR プライマー

本研究で使用したプライマーを表 2 に記載する。

表 2 プライマーリスト

名称	配列	用途
5-pskylanNS-C1 backbone	5' GCGATCCGGACTCAGATCTCGAG 3'	pSkylan-NS-C1 の作製
3-pskylanNS-C1 backbone	5' GGTGGCGACCGGTAGCGC 3'	pSkylan-NS-C1 の作製
5-SkylanNS	5' CCGCTAGCGCTACCGGTC 3'	pSkylan-NS-C1 の作製
3-SkylanNS	5' CTCGAGATCTGAGTCCGGATCGC 3'	pSkylan-NS-C1 の作製
5-mEos4b-SkyS	5' GATATCCTGACCACTGCATTAGTTACG GCAACAGGGTATTC 3'	mEos4b の発色団を Skylan-S の 発色団の配列に変えるため
3-mEos4b-SkyS	5' GAATACCCTGTTGCCGTAAGGAATGCA GTGGTCAGGATATC 3'	mEos4b の発色団を Skylan-S の 発色団の配列に変えるため
5-mEos4b-SkyNS	5' CTGACCACTGCATTCTTTACGGCAACA GGGTATTC 3'	mEos4b の発色団を Skylan-NS の 発色団の配列に変えるため
3-mEos4b-SkyNS	5' GAATACCCTGTTGCCGTAAGGAATGCA GTGGTCAG 3'	mEos4b の発色団を Skylan-NS の 発色団の配列に変えるため
5-pRset-A-sky	5' GACAACGCGAGGCGATAAGAATTCGAA GCTTG 3'	pRSET-A-Skylan-NS の作製
3-pRset-A-sky	5' GTTTGATCGCACTCATGGATCCCCATCG ATCCTTATC 3'	pRSET-A-Skylan-NS の作製
5-skylan	5' CCATGAGTGCATCAAAC 3'	pRSET-A-Skylan-NS の作製
3-skylan	5' TCGCCTCGCGTTGTCTGG 3'	pRSET-A-Skylan-NS の作製
5-SkylanNS-to-SkylanS	5' CATTCTGACAACCTGCGTTTAGCTATGGT AATAGAGTTTTTC 3'	Skylan-NS の発色団を Skylan-S の発色団に変えるため
3-SkylanNS-to-SkylanS	5' GAAAACCTCTATTACCATAGCTAAACGCA GTTGTCAGAATG 3'	Skylan-NS の発色団を Skylan-S の発色団に変えるため
5-pEF-Vector	5' TTCTGCAGATATCCAGCAC 3'	CLTA に付加するタグを mEos4b に変えるため
3-pEF-Vector	5' CATGGTGGCGGTACCAAGC 3'	CLTA に付加するタグを mEos4b に変えるため
5-mEos4b-EF1	5' GCTTGGTACCGCCACCATGGTGAGTGCG ATTAAG 3'	CLTA に付加するタグを mEos4b に変えるため
3-mEos4b-EF1	5' GTGCTGGATATCTGCAGAATCGTCTGGC ATTGTCAG 3'	CLTA に付加するタグを mEos4b に変えるため

### 2.3 Gibson assembly システムを用いた遺伝子導入

表1の②, ⑥, ⑨, ⑫, ⑮のプラスミドの作製には、それぞれ①, ③, ⑧, ⑪, ⑬のプラスミドを用いて、Gibson assembly システムによる遺伝子導入を行った。目的の DNA 配列とベクターの DNA 配列を 15~20 mer 程度ずつ含むプライマーを作成し、それらを用いた PCR によってインサートとベクターの DNA 断片をそれぞれ増幅させた。その後、増幅させた DNA 断片をアガロースゲルから切り出して精製し、ベクターとインサートの物質量がそれぞれ 1:3 の比になるように混合し、Gibson Assembly Master Mix (NEB) を加えて 50 °C で 60 分インキュベーションし、DNA 断片同士を繋ぎ合わせた。その後、反応液で JM109 をトランスフォーメーションし、選択薬剤を含む LB プレートで一晩培養し、コロニーを形成させた。翌日コロニー PCR (EmeraldAmp, タカラバイオ) にて目的のプラスミドを保持する大腸菌を選択した。その大腸菌を培養し、増幅されたプラスミドをミニプレップ (Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System, Promega) で回収した。得られたプラスミドは DNA シーケンシングによって塩基配列を確認した。

### 2.4 部位特異的変異導入によるプラスミド DNA の作製

表1の④, ⑤, ⑦, ⑩, ⑬, ⑭, ⑯のプラスミドを、それぞれ③, ③, ⑥, ⑨, ⑫, ⑫, ⑮のプラスミドをテンプレートとして、変異を含むプライマーを用いた PCR により作製した。テンプレートは制限酵素 Dpn1 を反応させて分解し、分解されなかったプラスミドで JM109 をトランスフォーメーションした。その後、大腸菌コロニーを培養し、増幅されたプラスミドをミニプレップで精製した。得られたプラスミドは DNA シーケンシングによって目的の変異が入ったことを確認した。

## 2.5 蛍光タンパク質の発現・精製

以下の方法でHis<sub>6</sub>タグがN末側に付加された蛍光タンパク質の発現・精製を行った。作製した③, ④, ⑤, ⑥, ⑦のプラスミドでBL21(DE3)株をトランスフォーメーションした。大腸菌プレートからシングルコロニーをとり、LB培地 (glucose : 1% (w/v), ampicillin : 100 μg/mlを含む)に加えて一晩の前培養を行った。前培養液1 mlをAuto-induction用培地1 L (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 6 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 3 g, NaCl : 5 g, tryptone : 20 g, yeast extract : 5 g, glycerol : 0.6%(v/v), glucose : 0.05% (w/v), lactose : 0.2% (w/v), ampicillin : 50 μg/ml, pH 7.2 無調整) (19,20)に加えて、37 °C, 200 rpmで12~16時間培養して蛍光タンパク質を発現させた。以下の操作は4 °Cまたは氷上で行った。培養液から遠心 (BECKMAN COULTER, Avanti HP25, JLA-10.500, 5000 rpm, 10分)により菌体を回収し、PBS (pH 7.4) 40 mlで懸濁した後、再度遠心 (KUBOTA, 5922, AT508C, 6000 rpm, 10分)を行って菌体を回収した。菌体を37.5 mlのNative Lysis buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, HClでpH 8.0に調整) にボルテックスミキサーを用いて懸濁し、超音波ホモジナイザー (Qsonica, Q700) で菌体を破碎した。破碎後の溶液を、遠心 (KUBOTA, 5922, AT508C, 6000 rpm, 10分) して上清を回収し、さらに超遠心 (BECKMAN COULTER, OPTIMA L-90K, 45Ti, 35000 rpm, 35分) して上清を回収した。得られた上清を、Native Lysis bufferで平衡化した1ml Ni-Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare)に加えて混ぜた後、ローテーター (TAITEC, RT-5) で30分回転させた。反応させた溶液をオープンカラム (Bio-Rad, Econo-Pac column)に通し、10 mlのNative Wash buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, HClでpH 8.0に調整) で3回洗浄した。カラムにelution buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 50 mM imidazole, HClでpH 8.0に調整) を500 μl加えて3分インキュベーションし、溶出液を回収する操作を2回繰り返した。その後、imidazoleの濃度を100 mMずつ450 mMまで上げて同様の操作を行った。各溶出液を遠心 (TOMY, kitman-18, 15000 rpm, 10分) して上清を回収した。回収した上清をセルロースチューブ (三光純薬株式会社, UC8-32-25)に入れて、3 LのPBS (pH 7.4) で12時間の透析を3回行った。透析後の溶液は分注して、4°Cで保存して実験に使用した。

また、以下の方法でGSTタグがN末側に付加されたEGFPの発現・GSTの除去・精製を行った。pGEX-6p-1-EGFPのプラスミドを用いてBL21(DE3)株をトランスフォーメーションした。大腸菌プレートからシングルコロニーをとり、LB培地 (ampicillin : 100 μg/mlを含む)に加えて一晩の前培養を行った。前培養液を1LのLB培地に全量加えて、37 °C, 200 rpmで3時間培養した。その後、OD<sub>600</sub>が0.5~0.7になったのを確認し、1MのIPTGを250 μl加えて20°C, 200 rpmで16~20時間培養して蛍光タンパク質を発現させた。以下の操作は4 °Cまたは氷上で行った。培養液から遠心 (BECKMAN



COULTER, Avanti HP25, JLA-10.500, 5000 rpm, 10分) により菌体を回収し、PBS (pH 7.4) 40 mlで懸濁した後、再度遠心 (KUBOTA, 5922, AT508C, 6000 rpm, 10分) を行って菌体を回収した。菌体に37.5 mlのNative binding buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 0.5% (v/v) TritonX-100, NaOHでpH 8.0に調整) を加えてボルテックスミキサーを用いて懸濁し、超音波ホモジナイザー (Qsonica, Q700) で菌体を破碎した。His<sub>6</sub>タグの場合と同様に遠心及び超遠心によって上清を回収した。得られた上清を、Native binding bufferで平衡化した1 mlのGlutathione Sepharose (GE Healthcare) に加えて混ぜ、ローテーター (TAITEC, RT-5) で3時間回転させた。反応させた溶液をオープンチップカラム (SARSTEDT, CC. 07) に通し、15 mlのWash buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, NaOHでpH 8.0に調整) で3回洗浄した。500 µlのWash bufferと5 µlのGST-Precission proteaseを加えてローテーターで一晩回転させた。以降はHis<sub>6</sub>タグの場合と同様に透析を行った。透析後の溶液は分注して、4 °Cで保存して実験に使用した。

## 2.6 SDS-PAGE

各サンプルに 2 ×Sample buffer (0.1 M Tris-HCl (pH 6.8) , SDS 4% (w/v) , 2-mercaptoethanol 12% (v/v) , glycerol 20% (v/v) , BPB 0.012% (w/v) ) を加えて 95 °C で 5 分加熱した後、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した。ゲルは 12% のポリアクリルアミド濃度のものを用いた。

## 2.7 CBB 染色

固定液 (2-プロパノール 25% (v/v) , 酢酸 10% (v/v) ) にゲルを浸して、dye の色が変わるまで振とうしたのち、CBB 染色液 (MeOH 40% (v/v) , 酢酸 10% (v/v) , R-250 0.2% (w/v) ) にて染色。その後脱色液 (MeOH 30% (v/v) , 酢酸 10% (v/v) ) で脱色し、タンパク質のバンドを検出した。

## 2.8 タンパク質濃度の定量

精製したタンパク質の濃度測定には、BCA 法を用いた。BCA 法では、Protein Assay Bicinchoninate kit (Nacalai Tesque) を用いた。まず Working Solution を混ぜた後に、比較のためのウシ血清アルブミン (BSA) を、濃度を 0.1 mg/ml ずつ 5 段階に分けて PBS (pH 7.4) で希釈して用意し、サンプルも含めて 96well MICROPLATE with Lid (IWAKI) にそれぞれ加えて、それぞれに Working Solution を混ぜて 37 °C で 30 分反応させた。その後室温になるまで待ち、10 分以内にマルチモードリーダー TriStar LB942 (BERTHOLD) で吸光度を測定した。サンプルと BSA の吸光度を比較することで、タンパク質濃度を定量した。

続いて精製タンパク質を電気泳動した SDS-PAGE の結果を用いて、精製タンパク質とその他のタンパク質との比率を計算した。計算結果を利用して、BCA 法で求めたタンパク質濃度から本来の精製タンパク質の濃度を求めた。

## 2.9 精製蛍光タンパク質の光学的特性の測定

精製した各蛍光タンパク質の蛍光スペクトルは、精製タンパク質を2  $\mu\text{M}$ となるようにPBS (pH 7.4) に添加したのち、キュベット (THORLABS, CV10Q100FS) に入れて、分光蛍光光度計 (JASCO, FP-6500) にて励起波長430 nmを照射した際の蛍光スペクトルを測定した。

精製した蛍光タンパク質の、成熟した発色団を持つ割合を調べるために、以下のalkali-denaturation法 (21,22) を用いた。まず、目的濃度の2倍のタンパク質濃度に2 $\times$ PBSで希釈した溶液を用意した。希釈した溶液と等量の2M NaOHを混合して、直ちに紫外可視分光光度計 (島津製作所, UV-1800) を用いて吸収スペクトルを測定した。NaOHでdenatureしたavGFPの447 nmでのモル吸光係数は44000  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ であり (23)、今回使用した緑色蛍光タンパク質のNaOH処理後の447 nmのモル吸光係数と等しいと考えられることから、測定で得られた各種タンパク質濃度での447 nmでのAbsorbanceから計算されたモル吸光係数と比較してmature fractionを求めた。

さらに、0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1  $\mu\text{M}$ に希釈した精製タンパク質溶液をキュベット (Hellma, 104-002-50-40) に入れ、紫外可視分光光度計で250~700 nmまでの吸収スペクトルを測定した。その際、ベースラインはPBSを用いた。それぞれの希釈溶液を用いて、分光蛍光光度計を使って450~600 nmまでの蛍光スペクトルを測定した。各蛍光タンパク質の、最大吸収波長でのモル吸光係数を求めるために、成熟した発色団を持つ蛍光タンパク質の濃度を、精製した蛍光タンパク質の濃度にmature fractionを掛けて求めた。この濃度からBeer-Lambert law ( $Absorbance = \epsilon cl$ ,  $\epsilon$ : モル吸光係数,  $c$ : モル濃度,  $l$ : 光路長)を利用して、得られたデータからモル吸光係数を求めた。また各蛍光タンパク質の量子収率を求めるために、蛍光スペクトルの面積と480 nmでのAbsorbanceでグラフを作成した。得られる直線の係数をEGFPと比較し、EGFPの量子収率 (0.60) (24) を用いて各種蛍光タンパク質の量子収率を求めた。またBrightnessはモル吸光係数 $\times$ 量子収率 $\div$ 1000で求めた。

各種蛍光タンパク質の蛍光寿命は、SP8 FALCON共焦点顕微鏡 (Leica) を使用して測定した。蛍光寿命を測定するために、各蛍光タンパク質を付加したクラスリン軽鎖 (CLTA) をトランスフェクションしたHeLa細胞を使用した。観察には405 nmと488 nmレーザーを使用した。蛍光寿命は、n-Exponential Reconvolution modelをexponential componentsを2としてフィッティングすることによって計算した。蛍光寿命は、 $\chi^2$ のフィッティング結果が2未満の際の値を採用した

## 2.10 精製蛍光タンパク質の点滅能力の測定

精製した各種蛍光タンパク質を2  $\mu$ M になるようにPBS (pH 7.4) に添加し、キュベット (THORLABS, CV10Q100FS) に入れて紫外可視分光光度計で吸収スペクトル (ON状態) を測定後、分光蛍光光度計で励起波長488 nmの光を10分照射して時間変化を測定したのち、紫外可視分光光度計で吸収スペクトル (OFF状態) を測定した。

## 2.11 精製蛍光タンパク質の固定耐性の測定

各種蛍光タンパク質 (4  $^{\circ}$ Cで保存) をPBS, 4% paraformaldehyde (PFA) /PBS, 4% PFA/0.2% glutaraldehyde (GA) /PBS, 4% PFA/2% GA/PBS に2  $\mu$ Mになるように添加し、37  $^{\circ}$ Cで30分インキュベーションした。その後、サンプル溶液をキュベット (THORLABS, CV10Q100FS) に入れて分光蛍光光度計にて励起波長430 nmで蛍光スペクトルを測定した。得られたスペクトルデータの最大蛍光強度を用いて、PBSに添加した際の最大蛍光強度を100%としたときの、固定液に添加した際の最大蛍光強度を計算により求めた。固定耐性の有意差検定は以下のようにGraphPad Prism 7.02ソフトウェア (GraphPad.com) を使用して行った。有意差検定には、Tukey多重比較検定を使用した二元配置分散分析を用いた。P値は、sidak法による多重検定に合わせた調整済みの値を使用した。

## 2.12 固定による点滅特性変化の測定

精製した蛍光タンパク質（最終濃度 $39.7\ \mu\text{M}$ ）をAcrylamide/Bis mixed solution (37.5:1, 最終濃度20.3 (w/v) %) と混ぜて、0.1% APS及び0.134% TEMEDにより反応させて、平らに貼り付けたパラフィルム上に滴下後に12 mmの丸形カバーグラスで挟んで40分間固めた。固めたアクリルアミドゲルをPBSまたは4%PFA/PBSに浸して10分間反応させ、PBSに3分間浸すのを2回繰り返して洗浄した。洗浄後、スライドガラスに両面テープを貼って15 mm四方でくり抜いた部分にゲルを入れ、カバーグラスを上から貼ってゲルを挟み、封入した。各蛍光タンパク質の蛍光点滅は、60倍オイル(NA 1.35)対物レンズ、及び38.1 $\mu\text{W}$ の488 nmレーザーと14.6  $\mu\text{W}$ の405 nmレーザーを備えた共焦点顕微鏡 (FV1000, Olympus) を用いて観察された。各蛍光タンパク質は405 nmレーザーの照射によって30秒間隔で活性化され、488 nmレーザーを使用して室温 (25 °C) でモニターされた。488 nmレーザーでモニターされている面積は696.96  $\mu\text{m}^2$ であり、405 nmレーザーによって活性化される面積はその中の136.78  $\mu\text{m}^2$ だった。各点滅サイクルのオフスイッチング曲線には、Excel (Microsoft) のsolverプラグイン及び最小二乗法を使用して、"exponential with offset" ( $y=a \times \exp(-bx) + c$ ) をフィッティングした。ここで、 $b$ はexponential decay constant、 $a + c$ はMAX intensity、 $(a + c) / c$ はON/OFF contrast、 $c / (a + c)$  はbaseline intensity ratioを表す。

## 2.13 細胞培養

ヒト子宮頸がん細胞株HeLaは竹縄忠臣東京大学名誉教授より分与していただいた。培養には、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM, ナカライテスク) (4.5 g/l glucose, L-グルタミン含有) に10% fetal bovine serum (FBS : Invitrogen) とペニシリン-ストレプトマイシン5 unit/mlを添加した培地を用いた。また、Caco-2細胞はATCCから入手し、培養にはDMEM-HAM's F-12培地(ナカライテスク)に10% fetal bovine serum (SIGMA) とペニシリン-ストレプトマイシン5 unit/mlを添加した培地を用いた。培養はいずれも37 °C、5 % CO<sub>2</sub>存在下で行った。

## 2.14 Lipofectamine™ 3000 によるトランスフェクション及び安定発現株の作製

トランスフェクションを行う前日に、あらかじめ HeLa 細胞を 35 mm cell culture dish (Corning, 430165) に  $2.5 \times 10^5$  cells で撒いた。トランスフェクションは以下の方法により行った。1. Opti-MEM® 125  $\mu$ l (Thermo Fisher Scientific) に、Lipofectamine™ 3000 (Thermo Fisher Scientific) 7.5  $\mu$ l を加え、2~3 秒ボルテックスし、スピンドウンした。2. プラスミド DNA 2.5  $\mu$ g を Opti-mem® 125  $\mu$ l に加え、さらに P3000 Reagent を 5  $\mu$ l 加えて 2~3 秒ボルテックスし、スピンドウンした。3. 1.と 2.で作製したサンプルを混ぜて 20 分間インキュベートし、細胞に添加した。5% CO<sub>2</sub> 存在下、37 °C で一晩培養した。トランスフェクションした細胞を Trypsin 処理して剥がし、3 ml の DMEM-10%FBS-PS に懸濁して、1 ml ずつ 5 ml の DMEM-10 %FBS-PS を入れた 10 cm ディッシュ (Corning) に播き、G-418 (Roche) を 400, 600, 800  $\mu$ g/ml となるように添加してセレクションを行った。細胞コロニーの単離には、ろ紙 (Whatman) から自作したクローニングディスクを Trypsin-EDTA に浸したものを用いた。

## 2.15 PALM による超解像イメージングと解析

frSkylan-S のタグを付けた  $\alpha$ -tubulin または frSkylan-S、frSkylan-NS、Skylan-S のタグを付けた CLTA を安定して発現する HeLa 細胞を、ガラスボトムディッシュで培養した。 $\alpha$ -tubulin の場合、細胞を固定液 (4% PFA、0.2% GA、2 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 30 mM HEPES-NaOH (pH 7.4), 0.5% Triton X-100) を用いて室温で 20 分間固定と同時に透過処理した。frSkylan-S-CLTA を安定発現する細胞は、固定液 (4% PFA、0.2% GA、2 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 30 mM HEPES-NaOH (pH 7.4) ) を添加し、室温で 20 分間固定した。続いて、これらの細胞を氷上で 7 分間 0.1% NaBH<sub>4</sub>/PBS とインキュベートし、PBS で洗浄した後、1% (w/v) polyvinyl alcohol/10 mM cysteamine/PBS に浸した。100 $\times$ /1.49 対物レンズ (Apo TIRF100 $\times$ OilDIC N2, Nikon) と EMCCD カメラ (iXon Du-897, ANDOR) を備えた N-STORM (Nikon) 超解像顕微鏡を使用して、256 $\times$ 256 pixels (40.96  $\times$  40.96  $\mu$ m) の画像を 16 msec の間隔で 100,000 枚取得した。405 nm レーザー (CUBE 405-100C, Coherent) および 488 nm レーザー (IMA101065ALS, Melles Griot) を使用して、frSkylan-S を活性化し、その蛍光を検出した。取得した画像は NIS-Elements ソフトウェア (Nikon) で解析した。これらの座標データは ChriSTORM (25) により変換し、ThunderSTORM (26) を使用してフィルタリング、重複の削除、相互相関によるドリフト補正した後に、normalized gaussian によって超解像画像を再構築した。

## 2.16 PALMにより観察した微小管の半値全幅の評価

frSkylan-Sで標識した微小管の半値全幅(FWHM)を測定し、PALMによって再構成された超解像イメージの評価を行った。Vimentinのフィラメントの幅を定量するのに使用された方法(27)を、以下のように変更して使用した。10×10 μmの正方形の5つのセクションを超解像イメージから選択し、各セクションでImageJ(NIH)のsegmented line toolを使用して、15個の微小管をランダムに選択した。続いて、フィラメントを覆うように線幅を300 nmに設定し、次にstraighten toolを使用してフィラメントを直線化した。フィラメントに垂直な方向の平均強度プロファイルを、長さ300 nm、幅1 μmの直線によって取得した。FWHMを計算するために、intensity profileをGaussian curveでフィッティングし、取得したシグマ値に2.35(27)を乗じた。

## 2.17 PALMで観察したCLTAクラスターの定量

超解像観察したfrSkylan-S-CLTAクラスターの直径定量は、以下のようにSR-Tesselerソフトウェアを使用して行った(28,29)。まずVoronoi diagramを各分子間に二等分線を引くことにより生成し、そこから分子密度を計算した。次に、全領域での平均分子密度と比較して、分子密度が平均の2倍を超える領域を選択した。次に、クラスリンのクラスターを、前に選択された領域の平均分子密度と比較して、さらに平均分子密度が2倍を超える領域として定義した。クラスリン被覆ピットの半径を正しく測定するためには、クラスターの半径を50~170 nm(29)の範囲で取得する必要があるため、7,850 nm<sup>2</sup>~115,600 nm<sup>2</sup>の面積のクラスターを選択し、それらの直径を定量した(28)。

CLTA融合タンパク質を安定発現する細胞株ごとの、CLTAクラスターでのシグナル密度を得るために、それぞれのクラスター中のsignals/nm<sup>2</sup>を、クラスターで検出されたシグナル数をクラスターの面積で割ることで計算した。それらを、観察された細胞ごとに値を平均し、細胞ごとのsignals/nm<sup>2</sup>とした。それぞれ10細胞分の値を平均し、図15Bにまとめた。RSFP間の相対的なCLTAクラスターでのシグナル密度の差は、内在性CLTAとRSFP-CLTAの発現量比によって補正し、値をSkylan-S-CLTAでのシグナル密度で正規化することで求めた。

## 2.18 Western Blotting

CLTA融合タンパク質の安定発現株間の発現量比を調べるために、1次抗体として rabbit anti-clathrin light chain抗体 (Proteintech, 10852-1-AP, 1:1000) を、2次抗体として alkaline-phosphatase (AP)-conjugated anti-rabbit IgG (Promega) を用いて Western Blotting を行った。

IRTKS遺伝子座へのfrSkylan-Sノックインについて調べるために、1次抗体として rabbit anti-BAIAP2L1抗体 (ATLAS, HPA023874, 1:1000) を、2次抗体として AP-conjugated anti-rabbit IgG (Promega) を用いて Western Blotting を行った。

発色には、AP発色用Buffer (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, HClでpH 9.5に調整) でリンスした後、発色液 (5-bromo-3-chloro-indolyl phosphate (BCIP, Roche Diagnostics, 0.1875 mg/ml) , 4-nitro blue tetrazolium chloride (NBT, Roche Diagnostics, 0.5 mg/ml) , AP発色用Buffer) を加えて室温でインキュベートし、バンドを検出した。



## 2.19 抗体染色を併用した2色超解像観察

frSkylan-S-CLTAを安定発現するHeLa細胞株は、固定液（4% PFA, 2% GA, 30 mM HEPES-NaOH (pH 7.4) , 100 mM NaCl, and 2 mM CaCl<sub>2</sub>) を用いて20分間室温で固定した。PBSで3回洗った後、氷上で0.1% NaBH<sub>4</sub>/PBSに7分間浸して反応させた。PBSで5分間、3回洗った後、ブロッキング液（3% BSA/0.2% Triton X-100/PBS）を添加して室温で2時間反応させ、透過処理とブロッキングを同時に行った。1次抗体としてmouse anti- $\alpha$ -tubulin抗体（clone DM1A, Cell Signaling Technology, #3873, 1:1,000）を加えて、室温で1時間反応させた。その後、0.2% BSA/0.05% Triton X-100/PBSで5回洗い、2次抗体としてAlexa647標識 F(ab')<sub>2</sub>-Goat anti-Mouse IgG (H+L) 抗体（Invitrogen, A21237, 1:6400）を加えて室温で1時間反応させた。0.2% BSA/0.05% Triton X-100/PBS溶液で5回洗い、PBSで1回洗った後、細胞を1% (w/v) polyvinyl alcohol/10 mM cysteamine/PBSに浸し、超解像観察まで4 °Cに保存した。

抗体染色した細胞は、先行論文の手順（30,31）を改変して超解像観察した。染色した細胞を、観察の直前に10 mM Tris-HCl (pH 7.5) /10% glucose/10 mM cysteamine/50 mM 2-mercaptoethanol/2.5 mM protocatechuic acid/2 mM cyclooctatetraene/50 mM protocatechuic dioxygenase/PBSに浸した。N-STORM (Nikon) 超解像顕微鏡を用いて、frSkylan-S-CLTAの観察に20000枚、染色した $\alpha$ -tubulinの観察に20000枚の蛍光画像を取得した。蛍光分子の活性化に405 nmレーザーを使用し、frSkylan-S-CLTAの観察には488 nmレーザーを、 $\alpha$ -tubulinの観察には647 nmレーザーを使用した。

## 2.20 IRTKS 遺伝子上流への frSkylan-S のノックインとその蛍光顕微鏡観察

ヒト結腸腺癌細胞株 Caco-2 を用いて、I-BAR タンパク質 IRTKS の遺伝子上流に frSkylan-S をノックインし、融合タンパク質を発現する細胞株を作製した。プラスミド DNA px459-hIRTKS-cp235 と pfrSkylan-S-C1-n14IRTKS をそれぞれ等量になるように混合し、Neon Transfection system (Invitrogen) を用いた electroporation によって Caco-2 細胞にトランスフェクションし、10 cm ディッシュ (Corning) に薄く撒き、puromycin (4 または 8  $\mu\text{g/ml}$ ) を含んだ DMEM-Ham's F-12 培地+10% FBS でセレクションを行った。細胞コロニーの単離には、ろ紙 (Whatman) から自作したクロニングディスクを Trypsin-EDTA に浸したものをを用いた。コロニーを増幅した後、Western Blotting および共焦点顕微鏡観察により、ノックインの確認を行った。

作製したノックイン細胞株の共焦点顕微鏡観察は、ガラスボトムディッシュに播いた生細胞を、SP8FALCON 共焦点顕微鏡 (Leica) を使用して行った。観察には 405 nm と 488 nm レーザーを使用した。細胞の Z-stack を、画像内の細胞の上端と下端が全て収まるように 0.3  $\mu\text{m}$  間隔で観察した。観察した Z-stack を、ImageJ (NIH) の sum slice を用いて 1 枚に積算した。

作製したノックイン細胞株の PALM 観察は、N-STORM (Nikon) 超解像顕微鏡を使用して行った。ガラスボトムディッシュで培養した細胞を固定液 (4% PFA, 0.2% GA, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 100 mM NaCl, 30 mM HEPES-NaOH (pH 7.4)) を添加し、室温で 20 分間固定した。続いて、これらの細胞を氷上で 7 分間 0.1%  $\text{NaBH}_4/\text{PBS}$  とインキュベートし、PBS で洗浄した。その後、0.1% Triton X-100/1% BSA/TBS で 5 分間透過処理し、TBS で 3 回洗い、0.3% BSA/TBS + Alexa 647 phalloidin (1:400) と 1 時間インキュベートした。TBS で 5 分間、3 回洗った後、1% (w/v) polyvinyl alcohol/10 mM cysteamine/PBS に浸した。その後、PALM による観察は上に述べた方法で 20,000 枚の画像を取得後、解析して超解像画像を再構成した。

### 3. 結果

#### 3.1 固定耐性を持つ点滅蛍光タンパク質の構築

固定耐性を有する点滅蛍光タンパク質を開発するために、固定耐性を持つ蛍光タンパク質 mEos4b の発色団の His を、構造の類似した緑色点滅蛍光タンパク質 Skylan-S 及び Skylan-NS の発色団において対応するアミノ酸である Ser or Leu に置換して、mEos4b-H63S 及び mEos4b-H63L を作製した。そして、それぞれを、frSkylan-S, frSkylan-NS と名付けて (fr は fixation resistance のイニシャルから)、これらのタンパク質を発現させるためのプラスミドを構築した (図5)。

```

mEos4b      1  MVSAIKPDMRIKLRMEGNVNGHHFVIDGDGTGKPYEGKQTMOLEVKEGGPLPFAPDILTTAFHYGNRVFVKYPDNIQDYF 80
frSkylan-S  1  MVSAIKPDMRIKLRMEGNVNGHHFVIDGDGTGKPYEGKQTMOLEVKEGGPLPFAPDILTTAFSYGNRVFVKYPDNIQDYF 80
frSkylan-NS 1  MVSAIKPDMRIKLRMEGNVNGHHFVIDGDGTGKPYEGKQTMOLEVKEGGPLPFAPDILTTAFYGNRVFVKYPDNIQDYF 80
*****

mEos4b      81  KQSFPKGYSWERSLTFEDGGICNARNIDITMEGDTFYNKVRFYGTNFPANGPVMQKTKLKWEPSTEKMYVRDGVLTGDIEM 160
frSkylan-S  81  KQSFPKGYSWERSLTFEDGGICNARNIDITMEGDTFYNKVRFYGTNFPANGPVMQKTKLKWEPSTEKMYVRDGVLTGDIEM 160
frSkylan-NS 81  KQSFPKGYSWERSLTFEDGGICNARNIDITMEGDTFYNKVRFYGTNFPANGPVMQKTKLKWEPSTEKMYVRDGVLTGDIEM 160
*****

mEos4b      161  ALLEGCNAHYRCDFRTTYKAKEKGVKLPGAHFVDHAIEILSHDKDYNKVLYEHAVAHSGLPDNARR 227
frSkylan-S  161  ALLEGCNAHYRCDFRTTYKAKEKGVKLPGAHFVDHAIEILSHDKDYNKVLYEHAVAHSGLPDNARR 227
frSkylan-NS 161  ALLEGCNAHYRCDFRTTYKAKEKGVKLPGAHFVDHAIEILSHDKDYNKVLYEHAVAHSGLPDNARR 227
*****

```

図5. 開発した frSkylan-S、frSkylan-NS のアミノ酸配列

それぞれの発色団の配列[XYG]を赤枠で示した。この X の部分のアミノ酸を、緑色蛍光点滅タンパク質 Skylan-S および Skylan-NS において対応するアミノ酸である Ser 及び Leu に置換することにより、frSkylan-S 及び frSkylan-NS を作製した。

### 3.2 蛍光タンパク質の発現・精製

構築した蛍光タンパク質 mEos4b, Skylan-S 及び-NS、frSkylan-S 及び-NS を、Auto-induction 法により大腸菌 BL21(DE3)株で発現させ、Ni-Sepharose により精製を行った。これらの精製蛍光タンパク質の純度を調べるためにコントロールの EGFP と共に、SDS-PAGE を行った。クマシー染色の結果、各精製タンパク質は予想された分子量かつ、ほぼ単一のバンドとして検出された (図 6A)。泳動結果のスキャンを行ったところ、メインバンドの純度は EGFP が 93.2%、mEos4b が 91.3%、Skylan-S が 95.8%、frSkylan-S が 91.7%、Skylan-NS が 95.6%、frSkylan-NS が 96.3%であった (図 6B)。

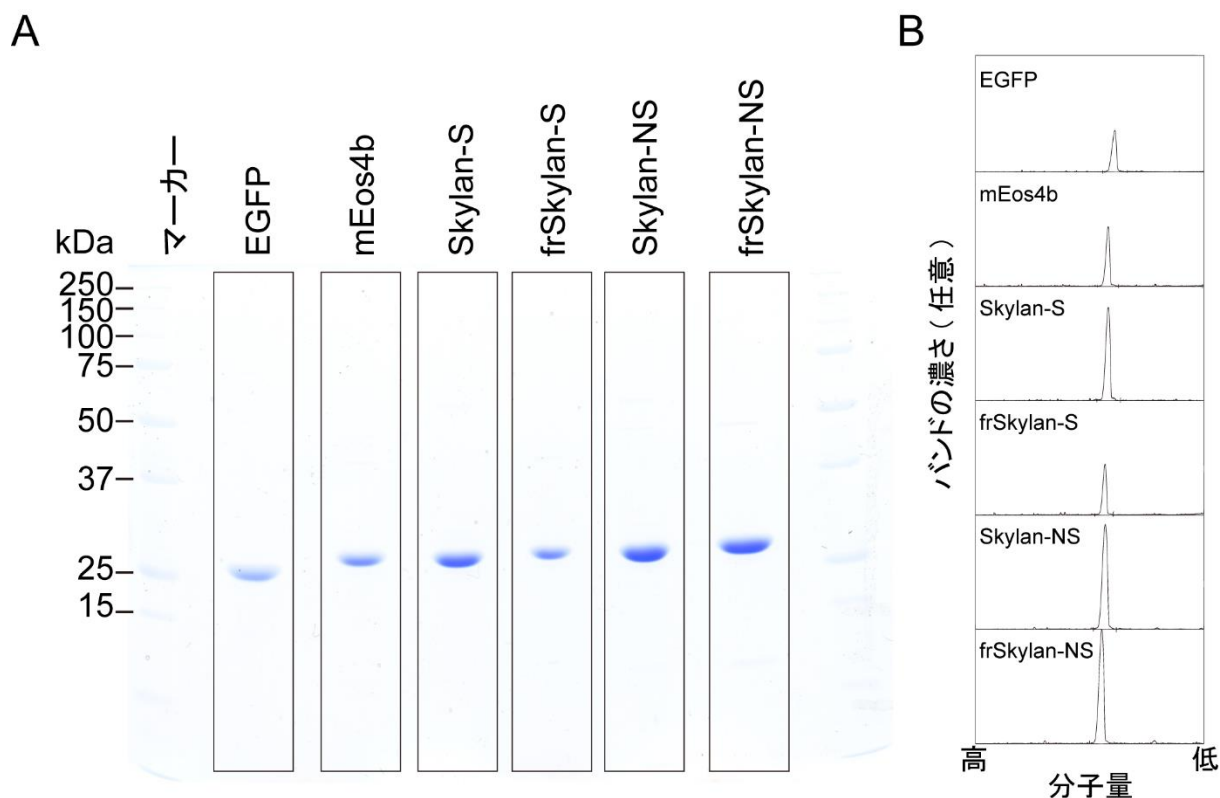


図 6. 精製蛍光タンパク質の SDS-PAGE

(A) 精製した各蛍光タンパク質を分子量マーカと共に電気泳動し、クマシー染色によりタンパク質を検出した。

(B) (A)の各精製蛍光タンパク質の泳動結果を ImageJ によりスキャンし、バンドの濃さの分布を調べた。

### 3.3 精製蛍光タンパク質の蛍光スペクトル

次に、精製蛍光タンパク質 mEos4b、 frSkylan-S 及び frSkylan-NS の蛍光スペクトルを、分光蛍光光度計を用いて測定した。その結果、いずれも類似した蛍光スペクトルを示したが、最大蛍光波長は frSkylan-S で 512.9 nm、frSkylan-NS で 513.3 nm であり、mEos4b の 516.1 nm と比較してやや短波長側へシフトしていた (図 7)。この結果から、frSkylan-S 及び frSkylan-NS は mEos4b と異なる蛍光特性を持つことが示唆された。

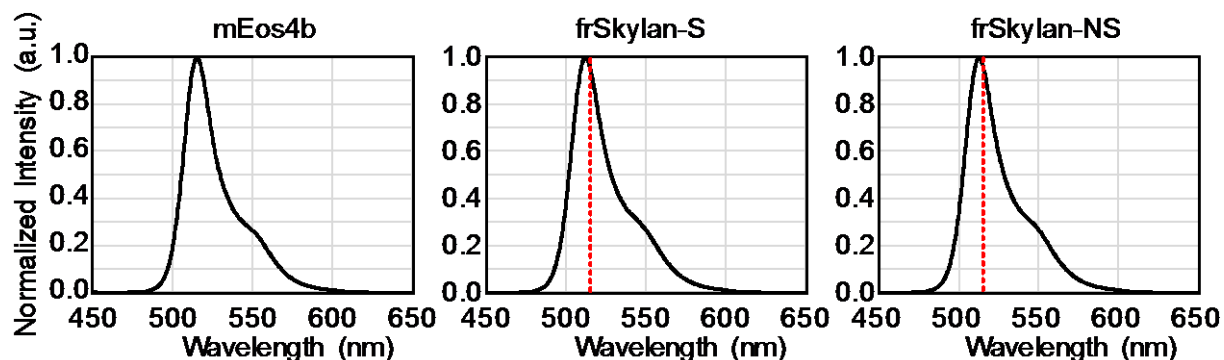


図 7. 精製蛍光タンパク質の蛍光スペクトル

精製蛍光タンパク質の蛍光スペクトルを測定した。精製タンパク質を  $2 \mu\text{M}$  の濃度に調製し、励起波長 430 nm を照射した際の蛍光スペクトルを、分光蛍光光度計で測定した。蛍光スペクトルは、それぞれの蛍光タンパク質の最大蛍光強度で全体を割って、正規化した。赤点線は mEos4b における最大蛍光波長を示す。

### 3.4 精製蛍光タンパク質における蛍光点滅能の評価

次に、精製した frSkylan-S および frSkylan-NS が蛍光点滅能を持つかを調べた。1.2.3 項および図 2 で述べたように、フォトスイッチングでは発色団のチロシン残基の光異性化を介して、488nm の励起光照射により ON 状態から OFF 状態に変化し、紫外光照射により再び ON 状態となることが報告されている (17,18) 。そこで、紫外可視分光光度計を用いて、蛍光活性が ON 状態での吸収スペクトルを測定した後、励起波長 488 nm を 10 分間照射し、蛍光活性を OFF 状態にした際の吸収スペクトルを測定した。その結果、励起光の照射前後において、mEos4b は吸収スペクトルに変化が見られなかったのに対し、Skylan-S,-NS および frSkylan-S,-NS はいずれも励起波長 500 nm 付近の吸光度が減少し、かつ 380 nm 付近の吸光度が増大した (図 8)。これは、励起光の照射により、Skylan-S, -NS および frSkylan-S, -NS が、蛍光の励起波長に相当する光を吸収できなくなり、かつフォトスイッチングの活性化に必要な紫 (外) 光を吸収できるように変化したことによると考えられた。従って、frSkylan-S および-NS は、Skylan-S,-NS と同様の蛍光点滅能力を獲得したことが示唆された。

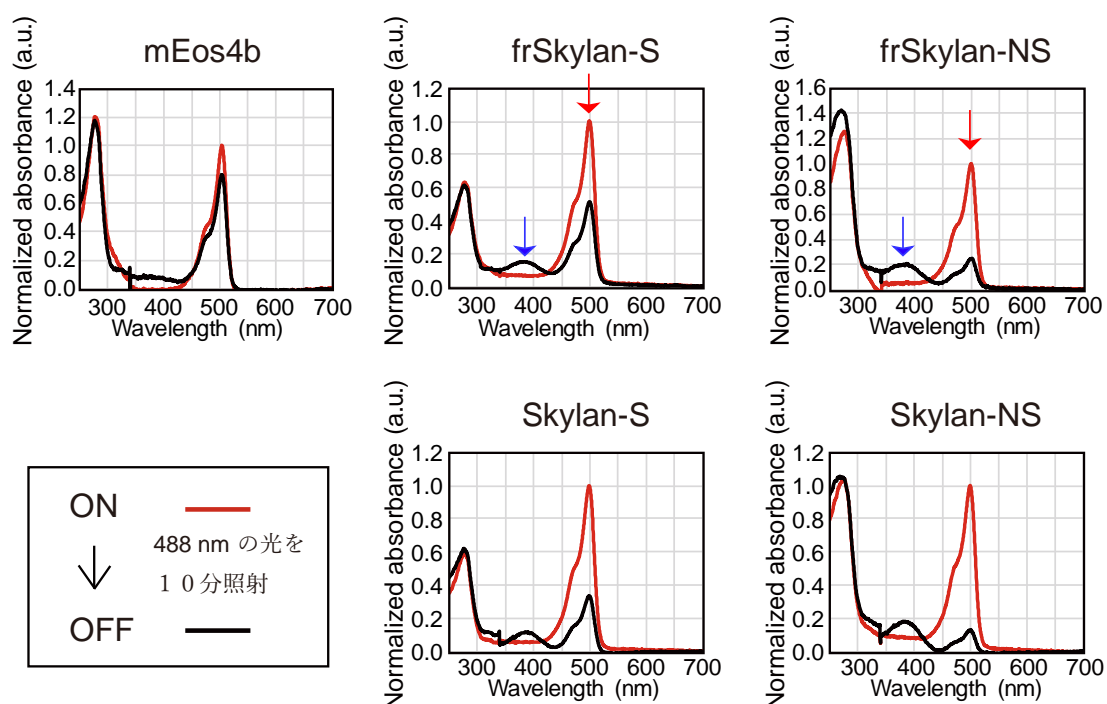


図 8. 精製蛍光タンパク質の蛍光点滅能の評価

精製蛍光タンパク質の蛍光点滅能を、励起光照射時の吸収スペクトルの測定により調べた。精製蛍光タンパク質は 2  $\mu$ M の濃度に調製して使用し、ベースラインには PBS を用いた。吸光度は、各々の蛍光タンパク質の最大吸収波長での吸光度で全体を割り、正規化した。赤矢印は励起光照射時に吸光度が減少した箇所、青矢印は増加した箇所を示す。

### 3.5 各蛍光タンパク質の光学的特性

次に、各蛍光タンパク質の光学的特性を調べた。精製タンパク質をそれぞれ 0.2~1  $\mu\text{M}$  で調整し、480 nm の励起光を用いて蛍光スペクトルを取得し、その濃度での吸収スペクトルを測定した。それぞれ縦軸に各蛍光スペクトルの面積を、横軸に 480 nm での吸収をプロットした(図 9A)。量子収率は EGFP の値 (0.60) (24) を基準にして、 $0.60 \times (\text{対象の傾きの値} / \text{EGFP の傾きの値})$  で相対的に計算した。また、最大吸収波長での吸収を縦軸にし、タンパク質濃度を横軸にプロットした (図 9B)。この傾きが各蛍光タンパク質のモル吸光係数となるが、ここでは精製タンパク質の発色団の成熟度合いを加味していない。そこで、蛍光することのできる発色団を持つ蛍光タンパク質の割合を調べるために、mature fraction を alkali-denaturation 法で測定した(図 9C)。この mature fraction を用いて、成熟度合いを加味したモル吸光係数を求めた。これらの結果から、各蛍光タンパク質の brightness を求めた (表 3)。

また、各蛍光タンパク質の蛍光寿命の測定を行った。各蛍光タンパク質をタグ付けしたクラスリン軽鎖 (CLTA) を HeLa 細胞に過剰発現し、蛍光寿命イメージング機能をもつ共焦点顕微鏡を用いて蛍光寿命を測定した(表 3)。

その結果、量子収率、モル吸光係数、brightness に関しては、frSkylan は mEos4b とほぼ同等であったものの、frSkylan-S の量子収率は 0.80 と最も高い値を示した (表 3)。また、frSkylan-S の brightness は調べた蛍光タンパク質の中で一番高く、EGFP の約 2 倍の明るさを持つことが分かった (表 3)。さらに、frSkylan-S および frSkylan-NS の蛍光寿命は、mEos4b と比較して短いことが分かった (表 3)。

従って、mEos4b における H63S および H63L のアミノ酸変異は、作製された frSkylan-S および-NS の光学的特性に影響を与えたと考えられた。

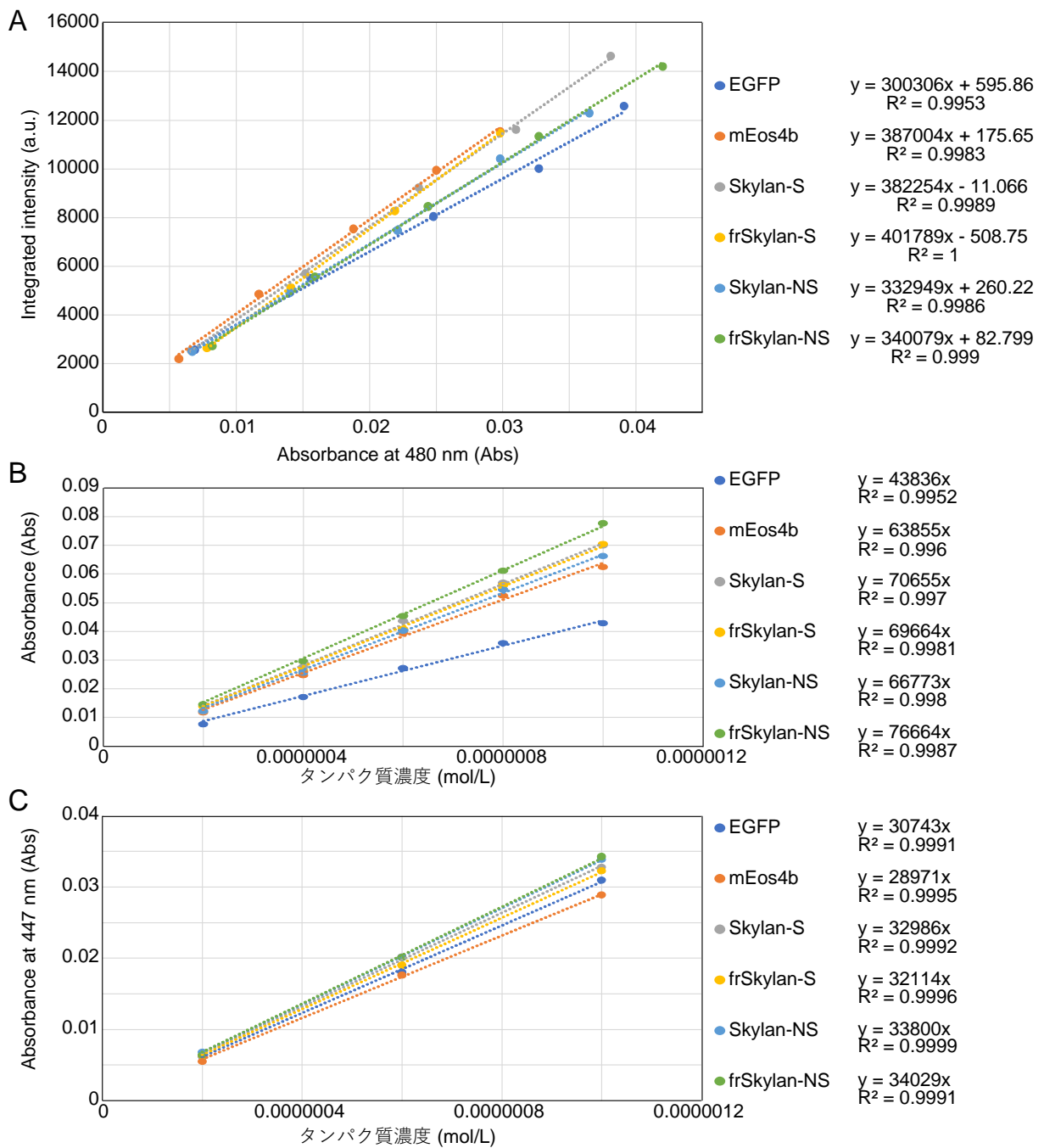


図9. 各蛍光タンパク質の光学的特性の特性

(A)量子収率を求めるために、各蛍光スペクトルの面積と480 nmにおける吸収をプロットした。

(B)モル吸光係数を求めるために、最大吸収波長での吸収とタンパク質濃度をそれぞれプロットした。

(C)各蛍光タンパク質の発色団の成熟度を調べるために、alkali-denaturation法によってdenatureした各精製蛍光タンパク質の447 nmでの吸収とタンパク質濃度をそれぞれプロットした。



表 3. 各蛍光タンパク質の光学的特性

Protein	EGFP	mEos4b (Green)	Skylan- S	frSkylan- S	Skylan- NS	frSkylan- NS
Abs, nm	488.5	504.0	499.0	499.5	499.5	500.0
Emi, nm	510.5	516.1	513.1	512.9	512.7	513.3
QY	(0.60)	0.77	0.76	0.80	0.67	0.68
$\epsilon$ -max, (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	62700	97000	94200	95400	86900	99100
Brightness	37.6	74.7	72.0	76.3	57.8	67.4
Mature Fraction (%)	70	66	75	73	77	77
Lifetime, (ns)	2.55 ±0.015	3.26 ±0.015	2.871 ±0.015	2.93 ±0.010	2.93 ±0.019	2.88 ±0.010

最大吸収波長 (Abs), 最大蛍光波長 (Emi), 量子収率 (QY), 及びモル吸光係数 ( $\epsilon$  -max) は、PBS (pH 7.4) を buffer として ON 状態で測定した。Brightness の計算はモル吸光係数 × 量子収率 ÷ 1000 で求めた。Mature Fraction は、精製タンパク質中の成熟した発色団を持つ割合として計算した。Lifetime は加重平均によって求め、サンプル数は EGFP から順に 5, 3, 8, 5, 3, 4 となった。

### 3.6 精製蛍光タンパク質を用いた固定耐性の検証

次に、精製蛍光タンパク質の固定耐性を調べた。精製タンパク質を 4% PFA、4%PFA/0.2%GA、4%PFA/2%GA、および PBS の存在下で 37℃で 30 分インキュベーションした後、蛍光強度を分光蛍光光度計で測定した。PBS 中で反応した場合の最大蛍光強度を 100%として、固定剤を含む溶液中で反応した場合の最大蛍光強度の割合を求めた。その結果、frSkylan-S および-NS は、Skylan-S および-NS と比較して固定後の蛍光強度の減少が少なかったことから、高い固定耐性を持つと考えられ、mEos4b の表面タンパクが固定耐性の上昇に寄与したと推測された (図 10)。また、frSkylan-S は mEos4b を上回る、frSkylan-NS は mEos4b と同等の固定耐性を示した。従って、frSkylan-S および-NS が固定耐性を獲得したことが示された。

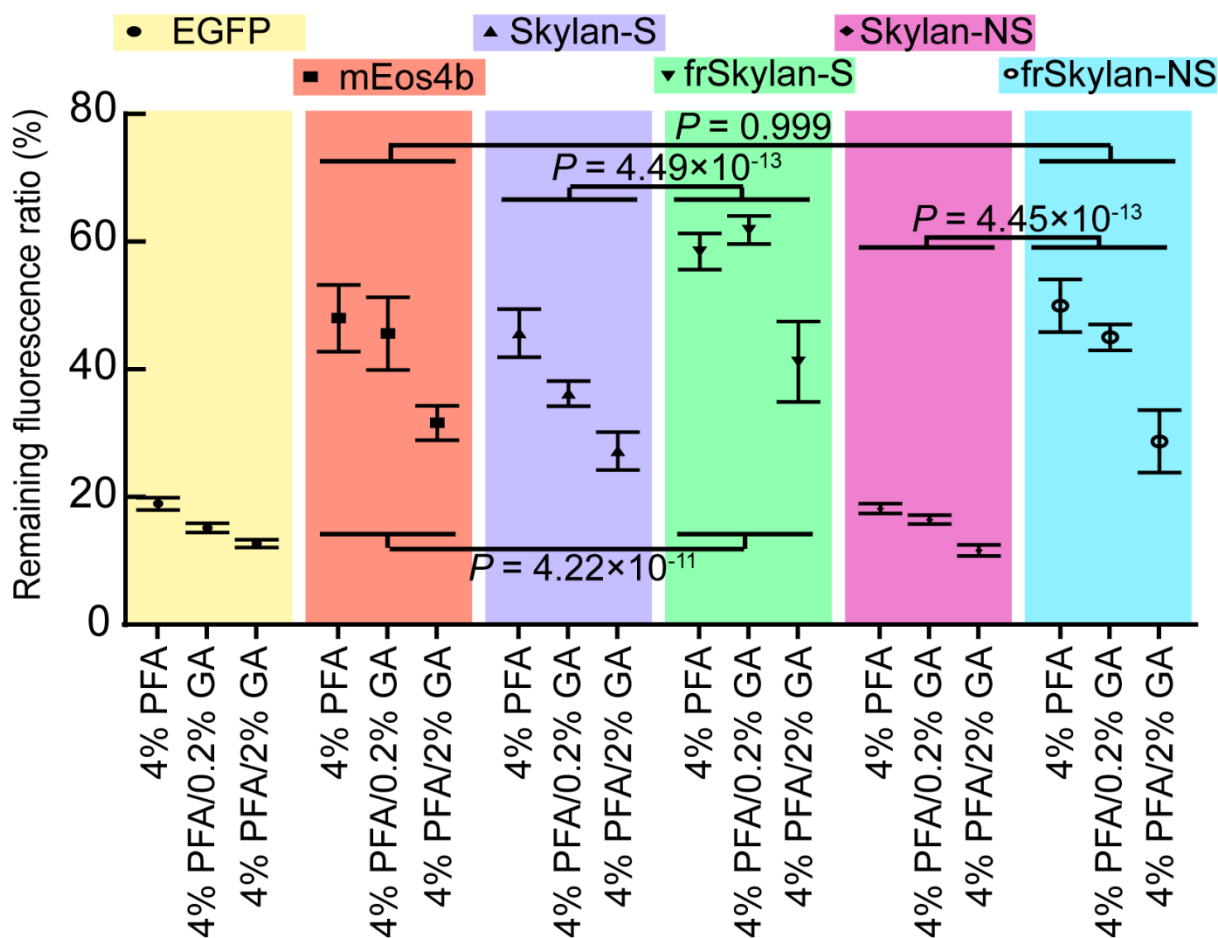


図 10. 精製蛍光タンパク質の固定耐性の評価

精製蛍光タンパク質を PBS 中で反応した場合の最大蛍光強度を 100%として、固定剤を含む溶液中で反応した場合の最大蛍光強度の割合により固定耐性を評価した。精製蛍光タンパク質は 2 μM の濃度に調製して測定した。N = 4、グラフは平均値 ± S.D. P 値は、Tukey 多重比較検定による双方向 ANOVA により、各蛍光タンパク質のグループ間で計算した。

### 3.7 点滅蛍光タンパク質の化学固定による点滅動態変化の観察

次に、アルデヒド固定が点滅蛍光タンパク質の点滅動態に影響を与えるかどうかを調べた。そこで、精製タンパク質をアクリルアミドゲルに包埋し、4% PFA/PBS または PBS と反応させた後、洗浄した。そして、紫(外) 光照射により各蛍光タンパク質を定期的に活性化した際の平均蛍光強度の変化を共焦点顕微鏡下で測定し、固定の有無における点滅のカイネティクスを測定した (図 11)。

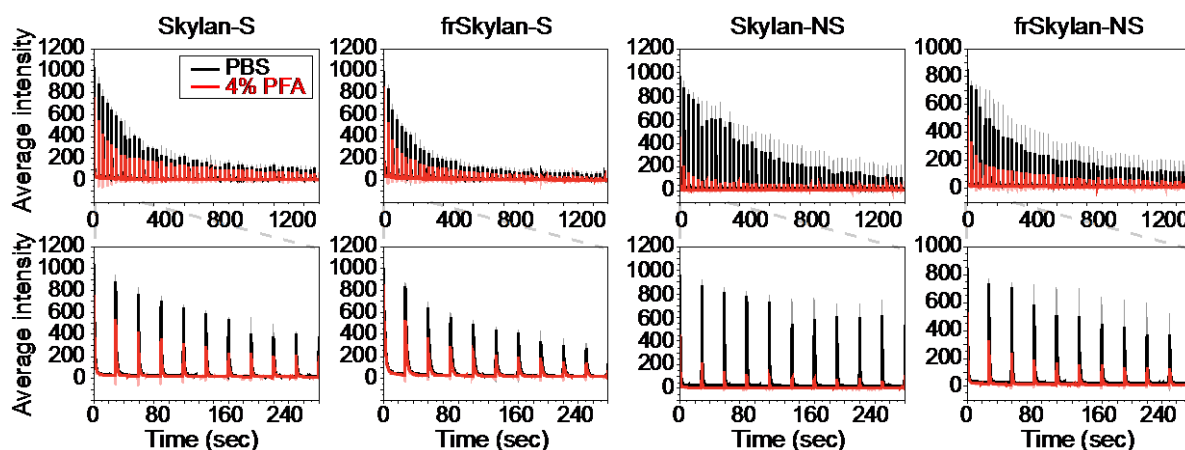


図 11. 点滅蛍光タンパク質の点滅動態における化学固定の影響

アクリルアミドゲルに包埋した精製蛍光タンパク質の点滅サイクルを測定した。精製タンパク質をアガロースゲルに包埋し、PBS または 4 %PFA/PBS で 10 分間インキュベートした後、共焦点顕微鏡で観察した。蛍光画像は 488 nm レーザーを使用して連続取得しながら、405 nm レーザーを 30 秒間隔で定期的に照射して蛍光タンパク質を活性化させた。最初の 300 秒間に取得されたグラフの拡大図を下に示した。グラフは 3 回の測定の平均値  $\pm$  S.D で示した。

この結果を基に、exponential decay equation ( $y=a \times \exp(-bx) + c$ ) をフォトスイッチング曲線にフィッティングさせることにより、各点滅パラメータの点滅サイクルの増加に伴う変化を追跡した。

まず、各点滅サイクルにおける  $(a+c)$ 、すなわち MAX intensity の、点滅毎の変化をモニターした。その結果、点滅を繰り返すことによる蛍光強度の減少、すなわち点滅疲労に関しては、固定した場合には、frSkylan-S 及び Skylan-S が、frSkylan-NS 及び Skylan-NS と比較して耐性を示した(図 12A)。なお、点滅疲労により MAX intensity が初期の 50%以下になったサイクル数を、表 4 にまとめた。

また exponential decay constant ( $b$ ) は点滅の早さを示し、固定しない場合にはいずれの蛍光タンパク質においても点滅サイクルの増加とともに直線的に増加した(図

12B)。また、frSkylan-S の exponential decay constant は蛍光タンパク質の中で最も値が低く、frSkylan-S の点滅速度が最も遅いことが示唆された (図 12B)。一方、固定した場合には、図 10 で固定耐性を示した frSkylan-S, frSkylan-NS ではほとんど変化が見られなかったのに対し、Skylan-S ではわずかに増加し、Skylan-NS では減少傾向を示した (図 12B)。他のフォトスイッチング能を持つ蛍光タンパク質でも PFA 固定によるスイッチングへの影響が報告されている (22)。これらの結果から、固定耐性の高い蛍光タンパク質 frSkylan-S では、固定による点滅速度の変化が抑制されることが示唆された (図 12B)。

また、 $(a+c) / c$  により示される点滅の ON/OFF によるコントラストに関しては、他の蛍光タンパク質では固定の有無に関わらず点滅を繰り返すと低下したのに対し、frSkylan-S では固定した場合に点滅を繰り返すとコントラストが向上した (図 12C)。

さらに、コントラストの逆数である  $c / (a+c)$  により点滅毎のベースラインの割合を調べたところ、固定しない場合には各蛍光タンパク質で点滅を繰り返すことによりベースラインの割合が上昇したのに対し、固定した場合には frSkylan-S でのみ点滅を繰り返すとベースラインの割合が減少した (図 12D)。

これらの結果から、frSkylan-S では、固定後に点滅を繰り返すと ON/OFF のコントラストが向上するが、それは OFF 状態でのバックグラウンドが点滅を繰り返すことによって減少したことによると考えられた (図 12C,D)。

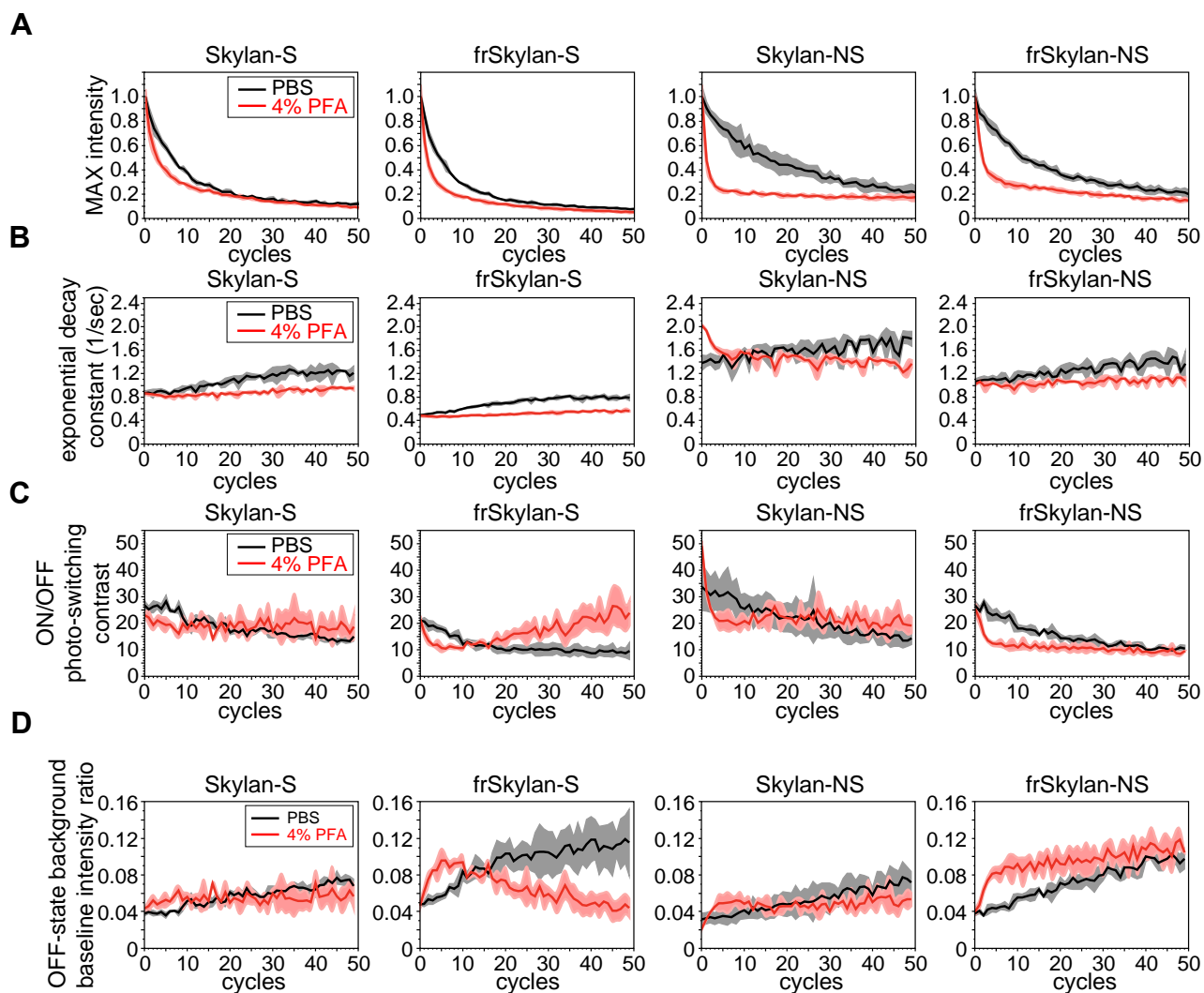


図 12. 点滅蛍光タンパク質の点滅パラメータに対する化学固定の影響

図 11 の各蛍光タンパク質の点滅サイクルに exponential decay equation ( $y = a \times \exp(-bx) + c$ ) をフィッティングして点滅パラメータを算出し、繰り返し点滅による変化を調べた。N=3, グラフは平均値  $\pm$  S.D。

(A) 各蛍光タンパク質の点滅サイクル毎の MAX intensity ( $a + c$ ) の繰り返し点滅による変化。各蛍光タンパク質の最初の点滅サイクルの値で正規化した。

(B) 各蛍光タンパク質の点滅サイクル毎の exponential decay constant ( $b$ ) の繰り返し点滅による変化。

(C) 各蛍光タンパク質の ON/OFF contrast ( $(a+c) / c$ ) の繰り返し点滅による変化。

(D) 各蛍光タンパク質の baseline intensity ratio ( $c / (a+c)$ ) の繰り返し点滅による変化。

表 4. 各蛍光タンパク質の点滅疲労の比較

Protein	EGFP	mEos4b (Green)	Skylan-S	frSkylan-S	Skylan-NS	frSkylan-NS
Photofatigue half decay without fixation (cycle)	N/A	N/A	7	5	16	11
Photofatigue half decay with fixation (cycle)	N/A	N/A	3	2	1	2

固定の有無による各蛍光タンパク質の点滅疲労動態の変化をまとめた。それぞれ、初期の MAX intensity の値を 100% として、点滅を繰り返したときにどれだけの cycle 数で MAX intensity の値が 50% 以下になるのかを示している。

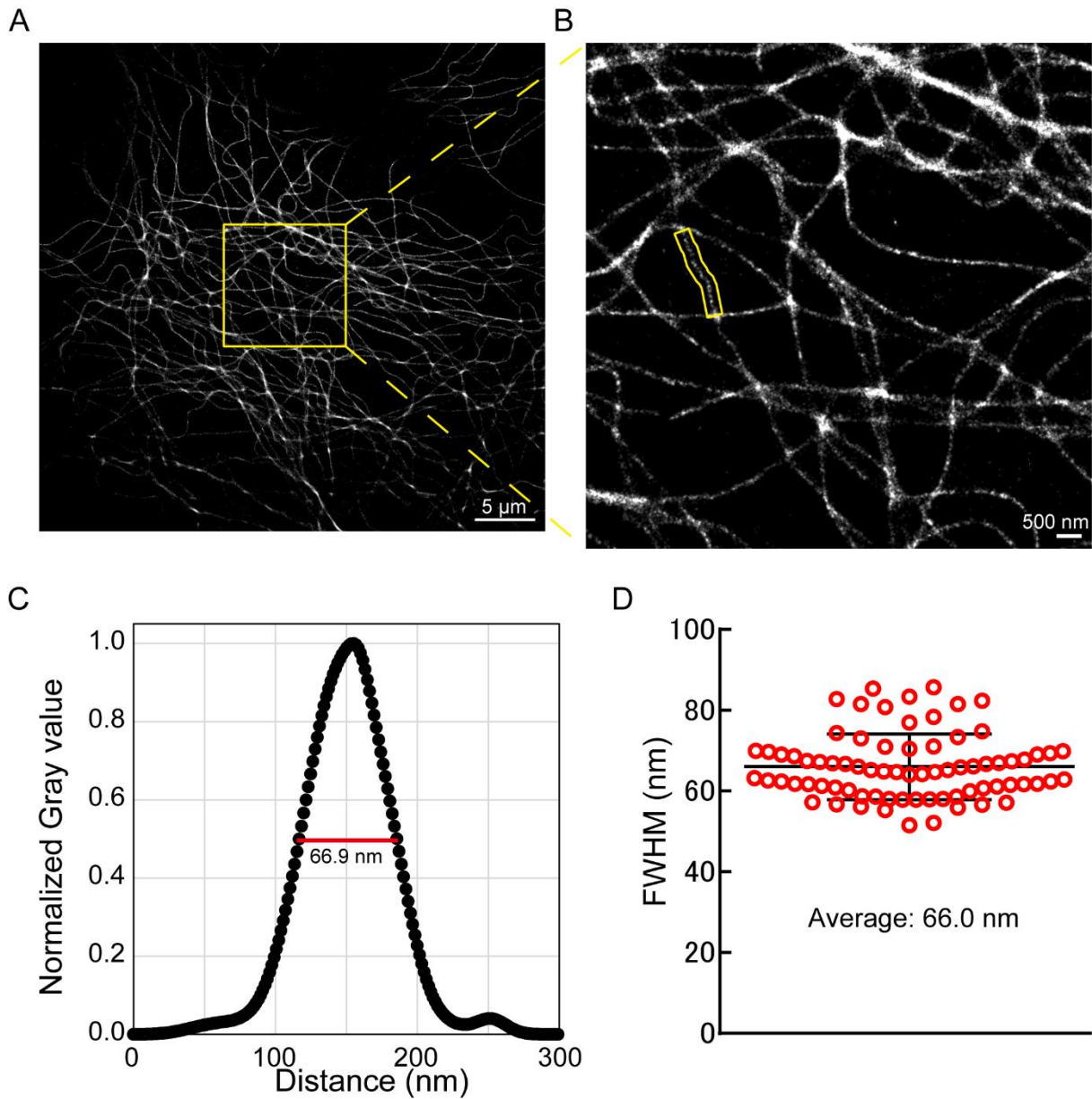
### 3.8 frSkylan-S 融合 $\alpha$ -tubulin による微小管の PALM イメージング

次に、frSkylan-S が目的タンパク質のタグ分子として、超解像顕微鏡観察において有用であるかを評価するため、frSkylan-S のタグを付けた  $\alpha$ -tubulin を安定発現する HeLa 細胞を作製し、局在化法 (PALM) による観察を行った。細胞の固定には 4% PFA / 0.2% GA 溶液を使用した。

PALM イメージングを行ったところ、frSkylan-S- $\alpha$ -tubulin は各蛍光シグナルの局在を決定するのに十分なコントラストで点滅したため、取得した分子の座標を再構築することにより、微小管の超解像画像を得ることができた (図 13A、B)。

得られた微小管画像の解像度を評価するために、微小管の長軸に垂直に Gaussian function をフィッティングすることで、各微小管の半値全幅 (FWHM) を算出した (図 13C、D)。この結果から、frSkylan-S- $\alpha$ -tubulin の PALM 画像から算出した微小管の平均 FWHM は  $66.0 \pm 8.1$  nm であり、これまでに報告されている mEos3.2- $\alpha$ -tubulin の観察により得られた値 (中央値 109.713 nm (32)) よりも優れていることがわかった。

従って、frSkylan-S は、微小管の PALM による超解像観察に十分使用可能であることが示された。



**図13. frSkylan-S- $\alpha$ -tubulinを発現した細胞のPALMイメージング**

(A) PALM によって得られた frSkylan-S- $\alpha$ -tubulin の超解像画像。 HeLa 細胞で安定発現している frSkylan-S- $\alpha$ -tubulin を観察した。

(B) (A) の拡大画像。 黄色の線でマークされた微小管フィラメントは、(C) に示した FWHM 定量の代表例である。

(C) (B) で示した微小管の代表的な強度プロファイル。

(D) FWHM による、再構築された微小管フィラメントの定量。再構成した超解像画像から 75 本のフィラメントを分析してプロットした。グラフは平均値  $\pm$  S.D.



### 3.9 frSkylan-S 融合クラスリン軽鎖の PALM イメージング

クラスターを形成するタンパク質の超解像観察における frSkylan-S の有効性を評価するために、クラスリン軽鎖 (CLTA) にタグ付けした frSkylan-S を安定発現する細胞株を作製し、PALM による超解像観察を行った。これまでに行われた局在法による観察では、クラスリン被覆ピットとプラーク様の構造が報告されており (33)、frSkylan-S-CLTA の再構成された超解像画像でも同様の構造が観察された (図 14A、B)。frSkylan-S-CLTA の超解像観察より、一部を拡大した 2D 画像 (図 14B) および厚さ 50 nm の z 軸に沿ったスライス画像 (図 14C) として再構成した。図 14C を拡大したところ、クラスリン被覆ピットを形成するリング状の構造が認められた (図 14D)。このリング状構造の line profile を測定したところ、クラスリン被覆ピットで報告されている直径 (33,34) とほぼ同等の値 (121.5 nm) を示した (図 14E)。さらに、SR-Tesseler ソフトウェアを用いたクラスター解析により、CLTA クラスターの定量を行ったところ、frSkylan-S-CLTA で観察された CLTA クラスターの直径は  $129.2 \pm 35.5$  nm の間に分布していることが示された (図 14F)。この値は、先行論文で報告されたクラスリン被覆ピットの直径 (100~200 nm) (33,34) とほぼ一致していた。

これらの結果から、frSkylan-S はアルデヒド固定時における PALM 観察に適していることが示唆された。

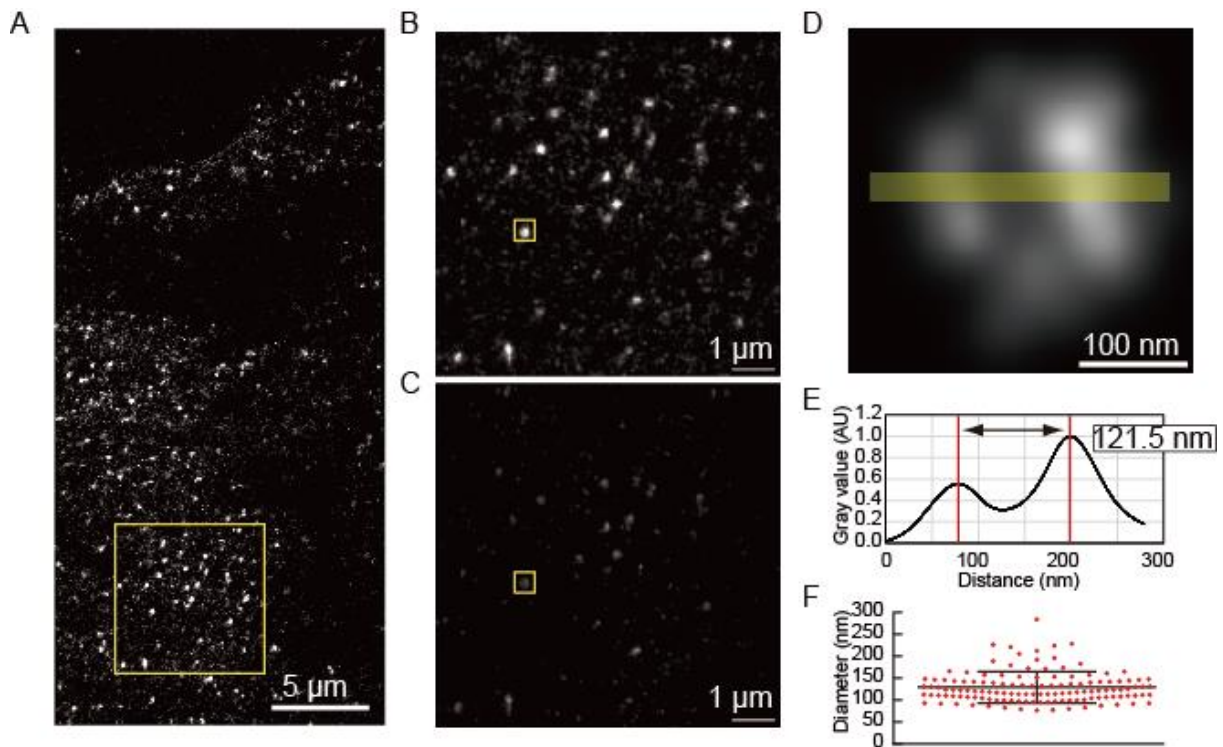


図 14. PALM による frSkylan-S-CLTA の超解像観察

frSkylan-S-CLTA 発現 HeLa 細胞の PALM 観察により再構成された超解像画像。

(A) 細胞の全体像。

(B) (A) の黄色で囲んだ領域の拡大 2D 画像。

(C) (A) の黄色で囲んだ領域の z 軸に沿った厚さ 50nm のスライス画像。

(D) (C) の黄色四角の領域の拡大画像。黄色線は (E) の intensity profile の測定領域を示す。

(E) (D) の黄色線に沿った intensity profile で、リング状構造の直径を示す。

(F) 観察されたクラスリンクラスターの直径の分布。エラーバーは S.D. 解析には、超解像画像のクラスター分析に使用される SR-Tesseler ソフトウェアを使用した。

### 3.10 点滅蛍光タンパク質融合 CLTA の PALM 観察における固定耐性の影響

PALM による超解像観察における、点滅蛍光タンパク質の固定耐性の影響を比較するために、frSkylan-S に加え、Skylan-S 及び frSkylan-NS でも同様に CLTA 融合タンパク質を安定発現する HeLa 細胞株を作製し、PALM により観察を行った。細胞の固定は、4% PFA/2% GA で行った。その結果、frSkylan-S-CLTA において、他の点滅蛍光タンパク質融合 CLTA と比較してより明るいクラスリン被覆ピットが観察された (図 15A)。

また、それぞれの細胞株で 10 回ずつ観察を行って超解像画像を再構成し、観察ごとに得られたクラスリン被覆ピットを構成する点の密度平均を算出し、さらに平均した (図 15B)。その結果、frSkylan-S を用いた観察において、他の点滅蛍光タンパク質の場合と比較して、クラスリン被覆ピット中でより多くの分子座標を得ることができた (図 15B)。

ただし、図 15B では安定発現株毎の蛍光タンパク質融合 CLTA の発現量を考慮していなかった。そこで、ウェスタンブロッティングで各々の点滅蛍光タンパク質融合 CLTA の安定発現株における発現量を調べた (図 15C)。その結果、Skylan-S および frSkylan-S との融合タンパク質は発現が同程度だったのに対し、frSkylan-NS との融合タンパク質は発現が高いことが分かった (図 15C)。

図 15C の結果を加味して、内在性の CLTA の発現量と融合タンパク質の発現量の比から、一定の融合タンパク質の発現量に対する相対的なクラスリン被覆ピット中での検出分子座標密度を求めた (図 15D)。その結果、Skylan-S を用いた際の分子座標密度を 100% とすると、frSkylan-S では約 150%、frSkylan-NS では 50% となった (図 15D)。このことから、frSkylan-S を用いた CLTA の PALM 観察では、Skylan-S を用いた際の約 1.5 倍、frSkylan-NS を用いた際の約 3 倍の分子座標数がクラスリン被覆ピット中で検出できることがわかった (図 15D)。

従って、frSkylan-S は、最も高い固定耐性により、PALM 観察において Skylan-S および frSkylan-NS と比較してより多くの蛍光分子座標を得ることが可能であり、より本来のタンパク質分布に近い画像を再構成できることが示唆された。

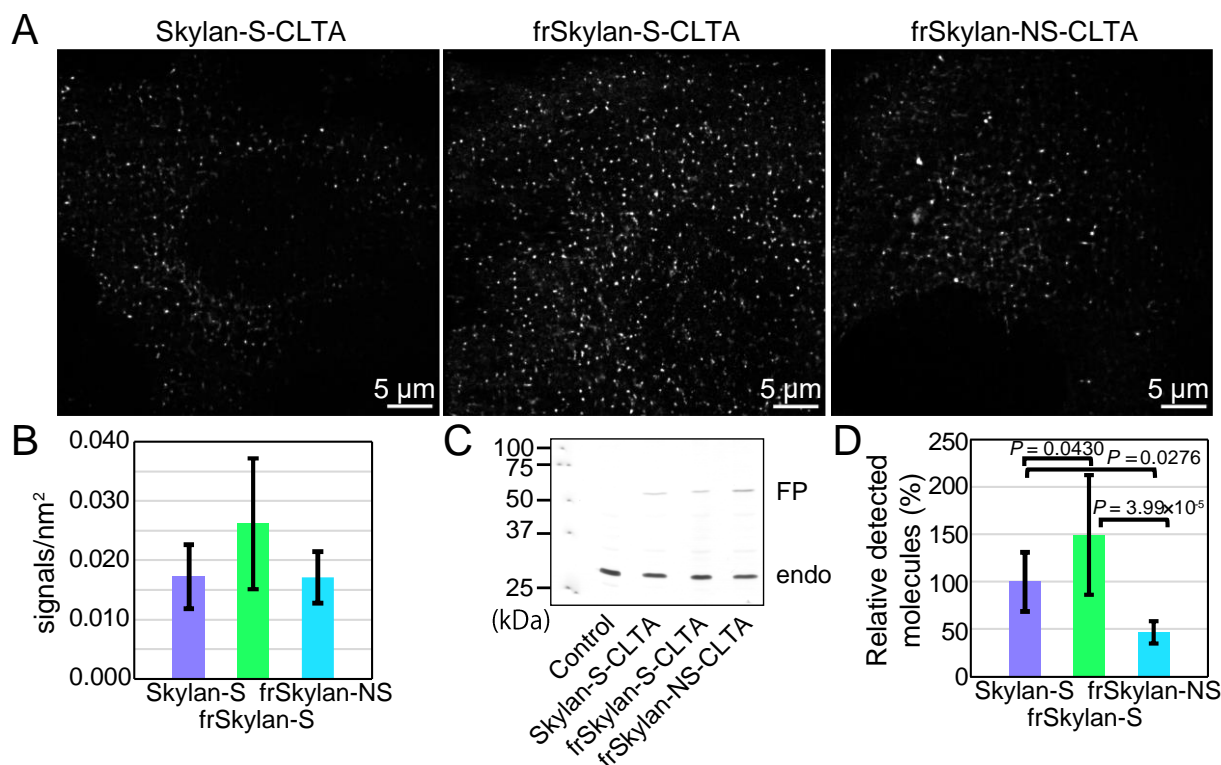


図 15. PALM による点滅蛍光タンパク質の固定耐性の評価

(A) それぞれの点滅蛍光タンパク質融合 CLTA を安定発現する細胞株の、代表的な PALM 画像。

(B) 各超解像画像でのクラスリン被覆ピットにおいて検出した分子座標密度平均の平均値。N=10, グラフは平均値  $\pm$  S.D.

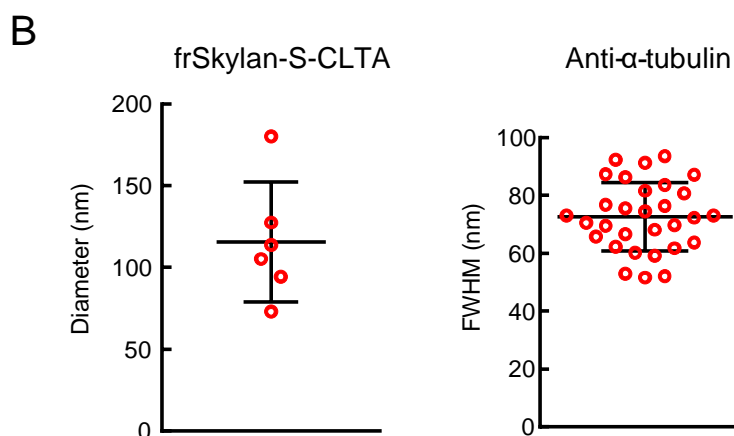
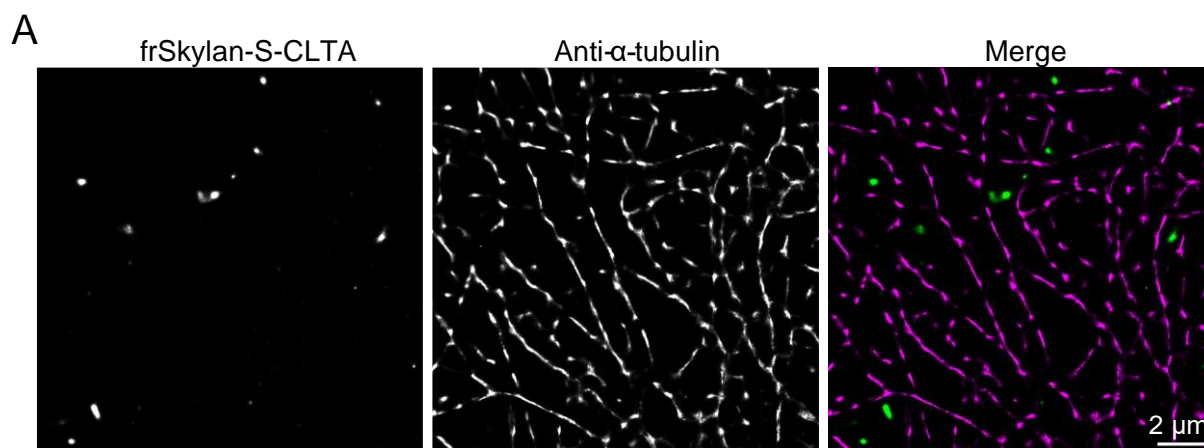
(C) 各安定発現株における CLTA の Western Blotting。それぞれの細胞株において、内在性 CLTA と点滅蛍光タンパク質融合 CLTA の発現量を調べた。FP は蛍光タンパク質融合 CLTA を、endo は内在性 CLTA を表す。

(D) 図 C での発現量比を加味した相対的な分子座標数の比較。図 B の値を基に、図 C を用いて求めた融合タンパク質の発現量が同じ場合の検出数比を、Skylan-S の値を 100% として求めた。N=10, グラフは平均値  $\pm$  S.D.

### 3.11 抗体染色を併用した frSkylan-S による 2 色での超解像観察

これまでの結果から、frSkylan-S がその点滅特性や固定耐性によって、PALM での観察に有用であることが示唆された。そこで次に、単色での点滅活性を活かし、抗体染色を併用した 2 色での超解像観察を試みた。作製した frSkylan-S-CLTA 安定発現株を 4% PFA/2% GA で固定した後、抗  $\alpha$ -tubulin 抗体および Alexa 647 標識 2 次抗体による抗体染色を行い、超解像観察を行った (図 16A)。

その結果、抗体染色に伴う固定や透過処理を経ても、frSkylan-S-CLTA は十分に観察できることがわかった (図 16A)。また、図 16A で観察されたクラスリン被覆ピットの直径および微小管の FWHM を定量したところ、図 13 及び図 14 で得られた値と同程度の測定結果を得ることができた (図 16B)。このことから、frSkylan-S は抗体染色を併用した多色超解像観察においても有用であることが示唆された。



**図 16. frSkylan-S-CLTA と抗体染色とを併用した 2 色超解像観察**

(A) frSkylan-S-CLTA と  $\alpha$ -tubulin の抗体染色 (Alexa 647 標識 2 次抗体で検出) を併用した超解像観察。frSkylan-S-CLTA を安定発現する HeLa 細胞を 4% PFA/2% GA/HEPES で 20 分間固定した後、抗  $\alpha$ -tubulin 抗体及び Alexa 647 標識 2 次抗体 (Fab)<sub>2</sub> 抗体で抗体染色し、超解像観察を行った。

(B) (A) の CLTA クラスターの直径、及び微小管幅の FWHM の定量。グラフは平均値  $\pm$  S.D を示した。

### 3.12 frSkylan-S のゲノムタグによる内在性タンパク質の超解像観察

次に、frSkylan-S を内在性タンパク質の超解像観察に応用する目的で、frSkylan-S を I-BAR ドメインタンパク質の遺伝子上流へノックインしたゲノムタグ細胞の作製及びその超解像観察を試みた。I-BAR ドメインは細胞膜に結合し多量体を形成することにより細胞膜の変形を行い、それらを持つ I-BAR タンパク質は細胞膜の突出 (35)、一部のエンドサイトーシス経路 (36)、細胞外小胞の産生 (37) などに関わっている。I-BAR タンパク質の 1 つに insulin receptor tyrosine kinase substrate (IRTKS, または BAIAP2L1) があり、ラメリポディアやフィロポディアで主に観察されている (35,38)。IRTKS は I-BAR ドメイン以外にも src-homology 3 (SH3) ドメインや、WW-binding (WWB) ドメイン、アクチン結合ドメインである WASP-Homology 2 (WH2) ドメインを持つ (図 17A)。そこで、IRTKS を高発現する結腸がん細胞株 Caco2 細胞において、IRTKS 遺伝子上流に、homology-independent targeted integration (HITI) 法 (39) を用いて frSkylan-S の cDNA をノックインし、超解像観察によってその詳細な細胞内分布を可視化することを試みた (図 17A)。ノックインコンストラクトを導入した Caco2 細胞で、細胞株の単離を試み、Western Blotting を行った。その結果、内在性の IRTKS に frSkylan-S がタグ付けされた目的分子が検出されたものの、タグ付けされていない内在性 IRTKS 分子も検出されたことから、片方の IRTKS 遺伝子のみに frSkylan-S がノックインされたか、あるいはノックイン細胞とノックインされていない細胞が混在していることが示唆された (図 17B)。この結果から、最も融合タンパク質の発現レベルが高い試行 3 の細胞を共焦点顕微鏡で観察したところ、frSkylan-S-IRTKS は細胞間接着に局在しており (図 17C)、本研究室での先行研究で見出された内在性 IRTKS の抗体染色による観察結果が裏付けられた。

次に、試行 3 の細胞を用いて PALM による超解像観察を行った。その結果、細胞間接着およびラメリポディアに IRTKS が分布している超解像画像を再構成することができた (図 17D)。従って、frSkylan-S のゲノムタグにより、内在性 IRTKS の分布が PALM で詳細に観察できる可能性が示唆された (図 17D)。さらに、得られた超解像画像から、内在性の IRTKS が細胞間接着およびラメリポディアにおいて、微小なクラスターを形成することが示唆された (図 17D)。

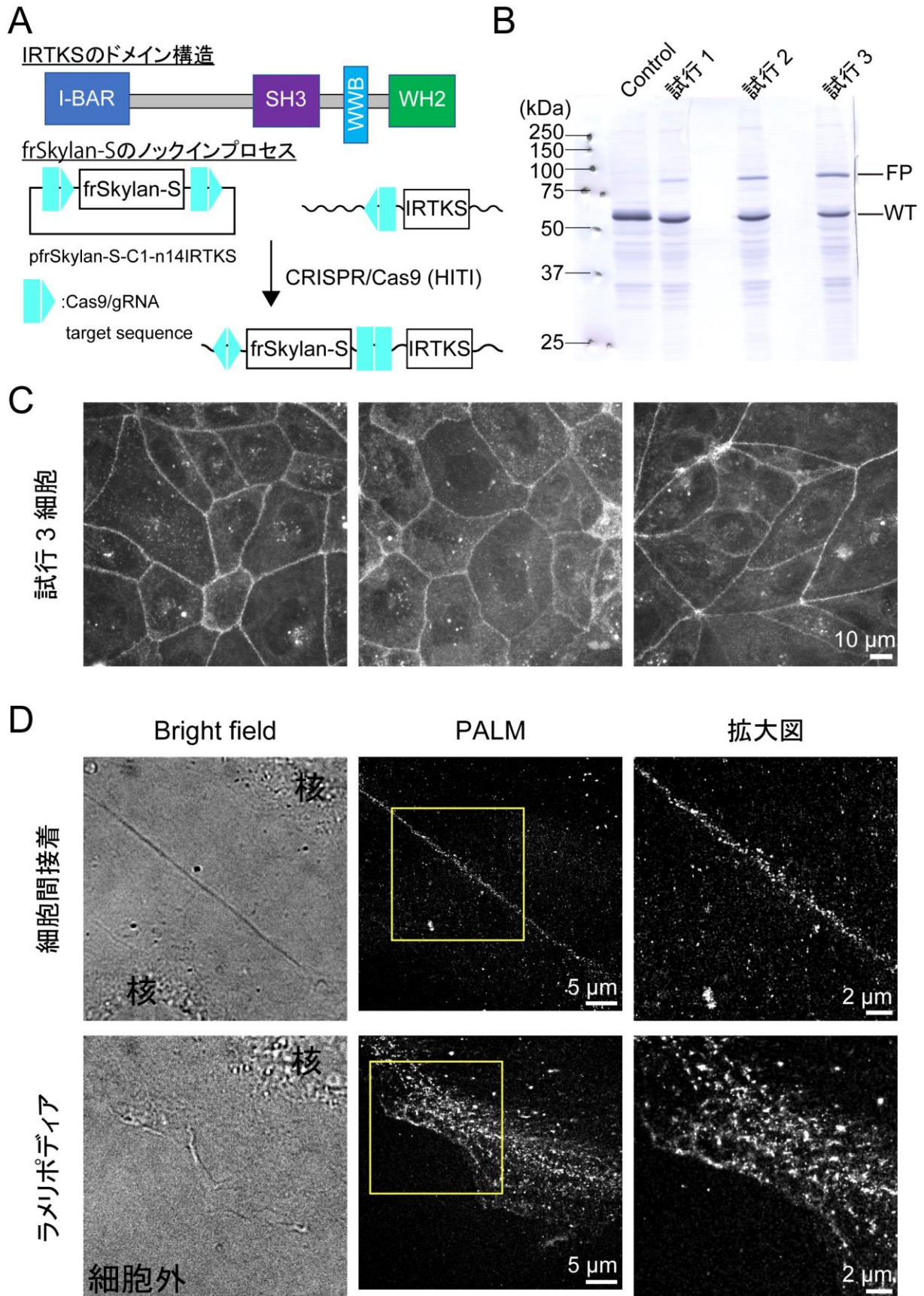


図17. frSkylan-Sのゲノムタグによる内在性IRTKSの超解像観察



(A) IRTKS のドメイン構造及び frSkylan-S のゲノムノックイン方法。frSkylan-S の cDNA を、HITI 法により Caco-2 細胞の IRTKS 遺伝子上流にノックインした。水色のシンボルは、長方形がターゲット配列、三角形が PAM 配列を表す。

(B) frSkylan-S のノックインコンストラクトを導入した Caco-2 細胞の Western Blotting。抗 IRTKS 抗体を用いて、IRTKS の発現について調べた。FP は frSkylan-S ノックインにより生じた frSkylan-S-IRTKS のバンド、WT は野生型 IRTKS のバンドを表す。

(C) (B)における試行 3 の細胞を用いた共焦点顕微鏡によるライブ観察像。Z-stack を積算した画像を示した。

(D) (B)における試行 3 の細胞を用いた、内在性 IRTKS の PALM イメージング。細胞を 4% PFA/0.2% GA/HEPES で 20 分間固定した後、PALM 観察を行った。上段は高密度培養細胞の細胞間接着、下段は低密度培養細胞のラメリポディアにおける内在性 IRTKS の分布を示した。左図は明視野画像。中央図は PALM 観察で得られた超解像画像。右図は、超解像画像の黄色枠で囲んだ部分の拡大図。

## 4. 考察

タンパク質は、アルデヒド等の化学固定により、構造や活性が損なわれることが多い (11-13,40,41)。蛍光タンパク質の場合、固定液との反応は、蛍光褪色だけではなく、フォトコンバージョンまたはフォトスイッチング能力の喪失も引き起こし (11-13)、PALM における分子座標決定の精度低下につながる。従って、化学固定に耐性を持つ蛍光変換タンパク質 mEos4b の開発により、PALM で再構成した超解像画像の品質は大幅に向上した (12)。本研究では、mEos4b のアミノ酸配列に基づいて、固定耐性を持ち、かつ PALM での多色観察に応用可能な、緑色の点滅蛍光タンパク質 frSkylan-S および frSkylan-NS を開発した。

### 固定耐性における発色団のアミノ酸配列の影響

frSkylan-S は、frSkylan-NS 及び mEos4b と比較してアルデヒド固定による蛍光強度の減少が小さかった (図 10)。frSkylan-NS と frSkylan-S のアミノ酸配列における違いは、発色団を形成する 63 番目のアミノ酸のみであり、frSkylan-NS ではロイシン (<sup>63</sup>LYG<sup>65</sup>)、frSkylan-S ではセリン (<sup>63</sup>SYG<sup>65</sup>) である (図 5)。これらのアミノ酸はサイズと構造が非常に似ているため、発色団の違いは、極性または疎水性の側鎖の特性によるものと考えられる。したがって、frSkylan-S では、極性を有するセリンを発色団に持つことによって、発色団が周辺残基と新たな水素結合を形成し、発色団の安定性に寄与した可能性が考えられる。

### 点滅特性におけるアルデヒド固定の影響と発色団の安定性

化学固定による蛍光タンパク質の点滅への影響を評価する実験では、固定によって各蛍光タンパク質の点滅疲労が加速する結果が得られた (図 12A)。ただしその程度には差があり、非固定時に点滅疲労に耐性を示した Skylan-NS 及び frSkylan-NS において、固定時により顕著に点滅疲労が増加する結果となった。これは、frSkylan-NS が *in vitro* 実験において mEos4b に匹敵する固定耐性を示したことに矛盾するよう見えるが、それらは固定時の蛍光強度についてであり、点滅疲労における固定耐性は低いと考えられる。前述の通り、frSkylan-S と frSkylan-NS の固定耐性の差は発色団のアミノ酸配列による安定性の違いによりもたらされたと考えられる。この発色団の安定性の違いが、点滅疲労における固定耐性にも寄与した可能性がある。frSkylan-S 及び frSkylan-NS は、蛍光点滅時に光異性化により発色団のチロシン残基が構造変化するが、この構造変化は、発色団自身や周辺残基にも影響すると推察される。すなわち、蛍光点滅時には毎回周辺構造に対して負荷がかかり、構造変化や歪みを誘発すると考えられる。これらの影響が点滅疲労の一因であると考えられるが、元々の発色団の安

定性が低いと予想される frSkylan-NS では、固定による化学架橋により、光異性化による構造変化ができないほどの周辺の変化を引き起こすと考えられる。一方、frSkylan-S では発色団の安定性が高いために、そのような構造変化が起きにくいと考えられる。これらの仮説については、今後アミノ酸変異等による検証が必要である。

また各蛍光タンパク質の点滅パラメータの変化を調べたところ、点滅速度への固定の影響も見られた (図 12B)。Skylan-NS 以外の点滅蛍光タンパク質では、点滅を繰り返すことによる点滅速度の増加が、固定後には抑制された。一方、Skylan-NS では、固定により点滅速度が上昇し、点滅を繰り返すと点滅速度が低下するという、他の分子とは異なる挙動を示した。これは、in vitro 実験において、Skylan-NS の固定耐性が著しく低いことに関連すると考えられる。Skylan-NS の場合、固定によって発色団が影響を受けやすいと考えられ、発色団の不安定さが素早い蛍光点滅にもつながると推測される。

### frSkylan-S を局在化法に用いる利点と多色超解像観察への展望

frSkylan-S は、in vitro 実験及び PALM による観察において、調べた点滅蛍光タンパク質の中で最も高い固定耐性を示し、超解像イメージングでは解像度の高い再構成画像を得ることができた。PALM において解像度の高い超解像画像を得ることは、個々の蛍光シグナルの分離と、蛍光分子の発する強い蛍光がもたらす分子座標の決定精度に依存する (4)。frSkylan-S は、表 3 に示したように蛍光輝度が高く、かつ点滅速度が他の蛍光タンパク質と比較して遅いことが明らかとなった (図 12B)。蛍光タンパク質は蛍光を発する際に光子を放出するが、点滅した時期が画像取得のタイミングとずれた場合、検出された光子の数が少なくなることが起こりうる。そのため、点滅速度が遅いと、画像取得時に蛍光分子が蛍光している時間が増加し、コントラストが向上する可能性が考えられる。また、frSkylan-S の高い固定耐性および点滅特性も、解像度の向上に寄与していると考えられる。複数回点滅ができる点滅蛍光タンパク質でも、画像取得中に点滅疲労や蛍光褪色により観察できる蛍光分子の数が減少すると、良い精度で検出できなかった蛍光シグナルを利用しなければならない事態も招くことが予想される。その結果として、再構成された超解像画像の解像度の低下につながるため、固定耐性の上昇によって観察できる蛍光分子の数が増加することは、高解像度を達成するために役立つと考えられる。

また frSkylan-S は、PALM 観察に用いる点滅蛍光タグとして、フィラメント形成タンパク質  $\alpha$ -tubulin (図 13) およびクラスター形成タンパク質 CLTA (図 14) の両者において、超解像イメージングに利用できることが示された。また、抗体染色を伴った 2 色での超解像観察にも有用であることが分かった (図 16)。従って、標的タンパ

ク質が観察のために強いアルデヒド固定を必要とする場合、抗体による免疫染色が困難である場合など様々な状況において、タンパク質の PALM イメージングに frSkylan-S は有用であると考えられる。また frSkylan-S の活用により、局在化法による多色観察において、精度の高い観察を行うことができると期待される。

### 緑色の蛍光色素と frSkylan-S の比較

frSkylan-S は同色の蛍光を発する EGFP と比較して約 2 倍程度の明るさを示した(表 3)。同じ基準で比較した場合に、緑色の蛍光を発する蛍光色素 Alexa Fluor 488 の明るさは、モル吸光係数が 73000 で量子収率が 0.92 (Thermo Fisher Scientific) であることから 67.2 となり、frSkylan-S の明るさ (Brightness: 76.3) を下回る。従って、アルデヒドで細胞を固定し、蛍光分子の蛍光点滅を用いた超解像観察を行う上では、frSkylan-S は緑色の蛍光波長を持つ蛍光色素よりも、明るさで優越していると言える。蛍光分子の明るさは、STORM や PALM において重心位置の同定精度に直結するため、明るい蛍光分子を使うことは再構成された超解像画像の解像度向上に寄与すると考えられる。従って、frSkylan-S は、その固定耐性も加味すると、局在化法に用いることのできる緑色の蛍光分子中では最適な蛍光分子であると考えられる。

### frSkylan-S の更なる機能向上への方策

frSkylan-S は明るい蛍光タンパク質でアルデヒド固定に耐性を持つが、明るさでは mNeonGreen (21) に劣り、アルデヒド固定に対しても 100%の耐性を持つわけではない。従って、frSkylan-S には更なる性能向上の余地があると考えられる。そのための方法として第一に考えられるのが、frSkylan-S のアミノ酸配列にランダム変異を導入することである。ランダム変異を導入し多数の成果物を評価することで、より良い蛍光タンパク質を得ることが期待できる (42)。しかしながら、この方法は多大な労力と時間を要し、どの程度続ければより良い蛍光タンパク質が得られるのかは定かではない。

次に考えられる方法は、既知の蛍光タンパク質のアミノ酸配列を基に、導入するアミノ酸変異の効果を予想することである。この方法では、既知の蛍光タンパク質の情報から、どのような蛍光タンパク質が得られるのかを予測することで、開発に必要な時間を大幅に短縮できる可能性がある。この場合、明るい蛍光タンパク質である mNeonGreen 等と frSkylan-S を、発色団周辺の構造情報などから比較検討し、アミノ酸変異の導入により更に明るい蛍光タンパク質の開発を目指す。あるいは、mEos4b で行われたように、frSkylan-S のタンパク質表面に位置するアミノ酸に新たな変異を導入することで、アルデヒド等への反応性を低下させることで、更に高い固定耐性を獲

得させることも考えられる。一方、蛍光タンパク質の立体構造やアミノ酸配列が余程似通っていなければ、同様の位置に同じアミノ酸変異を導入したとしても、同様の結果を得ることは難しい。例えば frSkylan-S の発色団はアミノ酸配列が等しいことから、avGFP と同様であると考えられるが、avGFP は点滅蛍光タンパク質ではない(43)。このように、アミノ酸の位置と種類に依存した様々な相互作用により蛍光タンパク質の特性が決まることため、アミノ酸配列上の一部分を模倣したとしても同様の結果が得られるとは限らない。ただし、同様の結果が得られた場合には同様のメカニズムが存在することが推測されるので、特に大きくアミノ酸配列に差がある場合には、論理的に蛍光タンパク質をデザインするための一助になることが期待できる。

また、frSkylan-S に新たな能力を獲得させて汎用性を高めることも考えられる。例えば蛍光色素とは異なり、蛍光タンパク質ではゲノム編集によるノックインで (39)、目的タンパク質のラベル率を上げることができる。またトランスジェニック動物やノックイン動物を作り、組織レベルでの分子の観察にも用いることができる。一方、細胞は内部が酸性のオルガネラ（被覆小胞、エンドソーム、リソソーム、シナプス小胞、分泌小胞、ゴルジ体など）を持ち、蛍光タンパク質は一般的に酸性条件下で蛍光を失うことが知られている。このような酸性条件下でも蛍光を発する耐酸性蛍光タンパク質として、Gamillus (23) や rsGamillus (22) が報告されている。Gamillus と frSkylan-S はアミノ酸配列で 71%の類似性があるが、Gamillus の発色団は trans 状態で蛍光を発することから、構造は大きく異なると考えられる。しかしながら、Gamillus においては、結晶構造解析から、発色団が trans 状態において近傍の水分子やセリン側鎖との水素結合により安定化していることが報告されている (23)。また点変異導入実験により、発色団のフェノール環と平行に並ぶ近傍のグルタミンが、Gamillus の耐酸性に重要であることなどが明らかとなっている。そのため、アミノ酸変異導入により同様の発色団の周辺環境を frSkylan-S に適用することができれば、固定耐性と耐酸性を併せ持つ点滅蛍光タンパク質を開発することができる可能性がある。

### 超解像観察による IRTKS とアクチンフィラメントの分布比較と今後の展望

本研究では、frSkylan-S を I-BAR ドメインタンパク質 IRTKS の遺伝子上流にノックインし、内在性 IRTKS 分子の超解像顕微鏡法による可視化を試みた。その結果、共焦点顕微鏡では観察できなかった IRTKS の微細な分布を観察することができた (図 17)。今後の展望としては、細胞の突出膜における IRTKS とアクチンフィラメントの分布の間隔を超解像観察により調べ、様々な情報を得ることを考えている。I-BAR ドメインを細胞に発現すると、フィロポディア状の細胞膜突起を形成するが (44)、I-BAR ドメインタンパク質 IRSp53 の I-BAR ドメイン単体と全長とで形成される細胞

膜突起の直径が異なることが、超解像観察により明らかとなっている (45)。すなわち、I-BAR ドメイン単体の分布直径はアクチンフィラメント束と同程度であったのに対し、全長 IRSp53 の分布直径はアクチンフィラメント束よりも一回り大きいことが示された。この現象は、IRSp53 の SH3 ドメイン結合タンパク質の相互作用によるものか、あるいは IRSp53 の disorder 領域によるものと予想された。IRTKS にも SH3 ドメインが存在するため、同様の現象が観られる可能性がある。また、関連する例として、超解像観察により focal adhesion のレイヤー構造が見出されている (46)。このように、タンパク質間の位置関係を超解像観察によって知ることができれば、新たな知見を得ることができる。そこで、まずは IRTKS とアクチンフィラメントの位置関係を IRSp53 の場合と比較検討し、WAVE2 や N-WASP 等の SH3 ドメイン結合タンパク質の位置と比較することで細胞膜突起におけるタンパク質複合体の構造解明に発展させたいと考えている。

## 5. 謝辞

本研究を進めるにあたり、私を分子医学細胞生物学研究室の学生として迎え入れ、本研究実施の機会を与えて下さり、これまでご指導いただきました末次志郎教授に、深く御礼申し上げます。また西村珠子助教には様々な場面でご指導、ご鞭撻頂き、感謝申し上げます。北又学博士、矢倉加代子補佐員には、多くの実験手技についてご指導いただきましたことを感謝いたします。また、実験に使用した HeLa 細胞株を譲っていただいた竹縄忠臣東京大学名誉教授に感謝申し上げます。

また、アドバイザーである神経システム生物学研究室の稲垣直之教授、構造生命科学研究室の塚崎智也教授には、本研究への助言を頂いたことに感謝申し上げます。

最後に、これまでの5年間の研究生活を支えて下さった、分子医学細胞生物学研究室の皆様に、御礼申し上げます。

## 6. 参考文献

1. Hell, S. W., and Wichmann, J. (1994) Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett* **19**, 780-782
2. Gustafsson, M. G. (2000) Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J Microsc* **198**, 82-87
3. Klar, T. A., Jakobs, S., Dyba, M., Egnér, A., and Hell, S. W. (2000) Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8206-8210
4. Betzig, E., Patterson, G. H., Sougrat, R., Lindwasser, O. W., Olenych, S., Bonifacino, J. S., Davidson, M. W., Lippincott-Schwartz, J., and Hess, H. F. (2006) Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* **313**, 1642-1645
5. Rust, M. J., Bates, M., and Zhuang, X. (2006) Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Methods* **3**, 793-795
6. Lu-Walther, H. W., Hou, W., Kielhorn, M., Arai, Y., Nagai, T., Kessels, M. M., Qualmann, B., and Heintzmann, R. (2016) Nonlinear Structured Illumination Using a Fluorescent Protein Activating at the Readout Wavelength. *PLoS One* **11**, e0165148
7. Dertinger, T., Colyer, R., Iyer, G., Weiss, S., and Enderlein, J. (2009) Fast, background-free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI). *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 22287-22292
8. Lippincott-Schwartz, J., and Patterson, G. H. (2009) Photoactivatable fluorescent proteins for diffraction-limited and super-resolution imaging. *Trends Cell Biol* **19**, 555-565
9. Schermelleh, L., Heintzmann, R., and Leonhardt, H. (2010) A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *J Cell Biol* **190**, 165-175
10. Sydor, A. M., Czymmek, K. J., Puchner, E. M., and Mennella, V. (2015) Super-Resolution Microscopy: From Single Molecules to Supramolecular Assemblies. *Trends Cell Biol* **25**, 730-748
11. Joosen, L., Hink, M. A., Gadella, T. W., and Goedhart, J. (2014) Effect of fixation procedures on the fluorescence lifetimes of *Aequorea victoria* derived fluorescent proteins. *J Microsc* **256**, 166-176
12. Paez-Segala, M. G., Sun, M. G., Shtengel, G., Viswanathan, S., Baird, M. A., Macklin, J. J., Patel, R., Allen, J. R., Howe, E. S., Piszczek, G., Hess, H. F., Davidson, M. W., Wang, Y., and Looger, L. L. (2015) Fixation-resistant photoactivatable fluorescent proteins for CLEM. *Nat Methods* **12**, 215-218, 214 p following 218
13. Johnson, E., and Kaufmann, R. (2017) Preserving the photoswitching ability of standard fluorescent proteins for correlative in-resin super-resolution and electron microscopy. *Methods Cell Biol* **140**, 49-67
14. Zhang, X., Chen, X., Zeng, Z., Zhang, M., Sun, Y., Xi, P., Peng, J., and Xu, P. (2015) Development of a reversibly switchable fluorescent protein for super-resolution optical



- fluctuation imaging (SOFI). *ACS Nano* **9**, 2659-2667
15. Zhang, X., Zhang, M., Li, D., He, W., Peng, J., Betzig, E., and Xu, P. (2016) Highly photostable, reversibly photoswitchable fluorescent protein with high contrast ratio for live-cell superresolution microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 10364-10369
  16. Bourgeois, D., Regis-Faro, A., and Adam, V. (2012) Photoactivated structural dynamics of fluorescent proteins. *Biochem Soc Trans* **40**, 531-538
  17. Hutchison, C. D. M., Cordon-Preciado, V., Morgan, R. M. L., Nakane, T., Ferreira, J., Dorlhiac, G., Sanchez-Gonzalez, A., Johnson, A. S., Fitzpatrick, A., Fare, C., Marangos, J. P., Yoon, C. H., Hunter, M. S., DePonte, D. P., Boutet, S., Owada, S., Tanaka, R., Tono, K., Iwata, S., and van Thor, J. J. (2017) X-ray Free Electron Laser Determination of Crystal Structures of Dark and Light States of a Reversibly Photoswitching Fluorescent Protein at Room Temperature. *Int J Mol Sci* **18**
  18. Woodhouse, J., Nass Kovacs, G., Coquelle, N., Uriarte, L. M., Adam, V., Barends, T. R. M., Byrdin, M., de la Mora, E., Bruce Doak, R., Feliks, M., Field, M., Fieschi, F., Guillon, V., Jakobs, S., Joti, Y., Macheboeuf, P., Motomura, K., Nass, K., Owada, S., Roome, C. M., Ruckebusch, C., Schirò, G., Shoeman, R. L., Thepaut, M., Togashi, T., Tono, K., Yabashi, M., Cammarata, M., Foucar, L., Bourgeois, D., Sliwa, M., Colletier, J. P., Schlichting, I., and Weik, M. (2020) Photoswitching mechanism of a fluorescent protein revealed by time-resolved crystallography and transient absorption spectroscopy. *Nat Commun* **11**, 741
  19. Studier, F. W. (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* **41**, 207-234
  20. Grabski, A., Mehler, M., and Drott, D. (2005) The Overnight Express Autoinduction System: High-density cell growth and protein expression while you sleep. *Nature Methods* **2**, 233-235
  21. Shaner, N. C., Lambert, G. G., Chammas, A., Ni, Y., Cranfill, P. J., Baird, M. A., Sell, B. R., Allen, J. R., Day, R. N., Israelsson, M., Davidson, M. W., and Wang, J. (2013) A bright monomeric green fluorescent protein derived from *Branchiostoma lanceolatum*. *Nat Methods* **10**, 407-409
  22. Shinoda, H., Lu, K., Nakashima, R., Wazawa, T., Noguchi, K., Matsuda, T., and Nagai, T. (2019) Acid-Tolerant Reversibly Switchable Green Fluorescent Protein for Super-resolution Imaging under Acidic Conditions. *Cell Chem Biol* **26**, 1469-1479.e1466
  23. Shinoda, H., Ma, Y., Nakashima, R., Sakurai, K., Matsuda, T., and Nagai, T. (2018) Acid-Tolerant Monomeric GFP from *Olindias formosa*. *Cell Chem Biol* **25**, 330-338.e337
  24. Sarkisyan, K. S., Goryashchenko, A. S., Lidsky, P. V., Gorbachev, D. A., Bozhanova, N. G., Gorokhovatsky, A. Y., Pereverzeva, A. R., Ryumina, A. P., Zherdeva, V. V., Savitsky, A. P., Solntsev, K. M., Bommarius, A. S., Sharonov, G. V., Lindquist, J. R., Drobizhev, M., Hughes, T. E., Rebane, A., Lukyanov, K. A., and Mishin, A. S. (2015) Green fluorescent protein with anionic tryptophan-based chromophore and long fluorescence lifetime. *Biophys J* **109**, 380-389
  25. Leterrier, C., Potier, J., Caillol, G., Debarnot, C., Rueda Boroni, F., and Dargent, B. (2015) Nanoscale Architecture of the Axon Initial Segment Reveals an Organized and Robust Scaffold.

26. Ovesný, M., Křížek, P., Borkovec, J., Svindrych, Z., and Hagen, G. M. (2014) ThunderSTORM: a comprehensive ImageJ plug-in for PALM and STORM data analysis and super-resolution imaging. *Bioinformatics* **30**, 2389-2390
27. Virant, D., Traenkle, B., Maier, J., Kaiser, P. D., Bodenhöfer, M., Schmees, C., Vojnovic, I., Pisak-Lukáts, B., Endesfelder, U., and Rothbauer, U. (2018) A peptide tag-specific nanobody enables high-quality labeling for dSTORM imaging. *Nature Communications* **9**, 930
28. Levet, F., Hosity, E., Kechkar, A., Butler, C., Beghin, A., Choquet, D., and Sibarita, J. B. (2015) SR-Tesseler: a method to segment and quantify localization-based super-resolution microscopy data. *Nat Methods* **12**, 1065-1071
29. Staszowska, A. D., Fox-Roberts, P., Hirvonen, L. M., Peddie, C. J., Collinson, L. M., Jones, G. E., and Cox, S. (2018) The Rényi divergence enables accurate and precise cluster analysis for localization microscopy. *Bioinformatics* **34**, 4102-4111
30. Olivier, N., Keller, D., Gönczy, P., and Manley, S. (2013) Resolution doubling in 3D-STORM imaging through improved buffers. *PLoS One* **8**, e69004
31. Tachikawa, M., Morone, N., Senju, Y., Sugiura, T., Hanawa-Suetsugu, K., Mochizuki, A., and Suetsugu, S. (2017) Measurement of caveolin-1 densities in the cell membrane for quantification of caveolar deformation after exposure to hypotonic membrane tension. *Sci Rep* **7**, 7794
32. Khan, A. O., Simms, V. A., Pike, J. A., Thomas, S. G., and Morgan, N. V. (2017) CRISPR-Cas9 Mediated Labelling Allows for Single Molecule Imaging and Resolution. *Sci Rep* **7**, 8450
33. Leyton-Puig, D., Isogai, T., Argenzio, E., van den Broek, B., Klarenbeek, J., Janssen, H., Jalink, K., and Innocenti, M. (2017) Flat clathrin lattices are dynamic actin-controlled hubs for clathrin-mediated endocytosis and signalling of specific receptors. *Nat Commun* **8**, 16068
34. Ehrlich, M., Boll, W., Van Oijen, A., Hariharan, R., Chandran, K., Nibert, M. L., and Kirchhausen, T. (2004) Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits. *Cell* **118**, 591-605
35. Zhao, H., Pykäläinen, A., and Lappalainen, P. (2011) I-BAR domain proteins: linking actin and plasma membrane dynamics. *Curr Opin Cell Biol* **23**, 14-21
36. Li, L., Baxter, S. S., Zhao, P., Gu, N., and Zhan, X. (2019) Differential interactions of missing in metastasis and insulin receptor tyrosine kinase substrate with RAB proteins in the endocytosis of CXCR4. *J Biol Chem* **294**, 6494-6505
37. Nishimura, T., Oyama, T., Hu, H. T., Fujioka, T., Hanawa-Suetsugu, K., Ikeda, K., Yamada, S., Kawana, H., Saigusa, D., Ikeda, H., Kurata, R., Oono-Yakura, K., Kitamata, M., Kida, K., Hikita, T., Mizutani, K., Yasuhara, K., Mimori-Kiyosue, Y., Oneyama, C., Kurimoto, K., Hosokawa, Y., Aoki, J., Takai, Y., Arita, M., and Suetsugu, S. (2021) Filopodium-derived vesicles produced by MIM enhance the migration of recipient cells. *Dev Cell* **56**, 842-859.e848
38. Scita, G., Confalonieri, S., Lappalainen, P., and Suetsugu, S. (2008) IRSp53: crossing the road of membrane and actin dynamics in the formation of membrane protrusions. *Trends Cell Biol*

39. Suzuki, K., Tsunekawa, Y., Hernandez-Benitez, R., Wu, J., Zhu, J., Kim, E. J., Hatanaka, F., Yamamoto, M., Araoka, T., Li, Z., Kurita, M., Hishida, T., Li, M., Aizawa, E., Guo, S., Chen, S., Goebel, A., Soligalla, R. D., Qu, J., Jiang, T., Fu, X., Jafari, M., Esteban, C. R., Berggren, W. T., Lajara, J., Nuñez-Delicado, E., Guillen, P., Campistol, J. M., Matsuzaki, F., Liu, G. H., Magistretti, P., Zhang, K., Callaway, E. M., and Belmonte, J. C. (2016) In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature* **540**, 144-149
40. Beckstead, J. H. (1994) A simple technique for preservation of fixation-sensitive antigens in paraffin-embedded tissues. *J Histochem Cytochem* **42**, 1127-1134
41. Alelú-Paz, R., Iturrieta-Zuazo, I., Byne, W., Haroutunian, V., García-Villanueva, M., Rábano, A., García-Amado, M., Prensa, L., and Giménez-Amaya, J. M. (2008) A new antigen retrieval technique for human brain tissue. *PLoS One* **3**, e3378
42. Grotjohann, T., Testa, I., Leutenegger, M., Bock, H., Urban, N. T., Lavoie-Cardinal, F., Willig, K. I., Eggeling, C., Jakobs, S., and Hell, S. W. (2011) Diffraction-unlimited all-optical imaging and writing with a photochromic GFP. *Nature* **478**, 204-208
43. Tsien, R. Y. (1998) The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **67**, 509-544
44. Suetsugu, S., Murayama, K., Sakamoto, A., Hanawa-Suetsugu, K., Seto, A., Oikawa, T., Mishima, C., Shirouzu, M., Takenawa, T., and Yokoyama, S. (2006) The RAC binding domain/IRSp53-MIM homology domain of IRSp53 induces RAC-dependent membrane deformation. *J Biol Chem* **281**, 35347-35358
45. Sudhaharan, T., Hariharan, S., Lim, J. S. Y., Liu, J. Z., Koon, Y. L., Wright, G. D., Chiam, K. H., and Ahmed, S. (2019) Superresolution microscopy reveals distinct localisation of full length IRSp53 and its I-BAR domain protein within filopodia. *Sci Rep* **9**, 2524
46. Kanchanawong, P., Shtengel, G., Pasapera, A. M., Ramko, E. B., Davidson, M. W., Hess, H. F., and Waterman, C. M. (2010) Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature* **468**, 580-584

## Supplemental data1

pGEX-6p-1-EGFP の DNA 配列

**ATG**: EGFP の開始コドン

**TAA**: EGFP の終止コドン

EGFP

>pGEX-6p-1-EGFP

```
ACGTTATCGACTGCACGGTGCACCAATGCTTCTGGCGTCAGGCAGCCATCGGAAGCT
GTGGTATGGCTGTGCAGGTCGTAAATCACTGCATAATTCGTGTTCGCTCAAGGCGCAC
TCCCGTTCTGGATAATGTTTTTTGCGCCGACATCATAACGGTTCTGGCAAATATTCTG
AAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGAT
AACAATTTACACAGGAAACAGTATTCATGTCCCCTATACTAGGTTATTGGAAAATTAA
GGGCCTTGTGCAACCCACTCGACTTCTTTTGAATATCTTGAAGAAAAATATGAAGAG
CATTTGTATGAGCGCGATGAAGGTGATAAATGGCGAAACAAAAAGTTTGAATTGGGTT
TGGAGTTTCCCAATCTTCCTTATTATATTGATGGTGATGTTAAATTAACACAGTCTAT
GGCCATCATACTGTTATATAGCTGACAAGCACAAACATGTTGGGTGGTTGTCCAAAAGAG
CGTGCAGAGATTTCAATGCTTGAAGGAGCGGTTTTGGATATTAGATACGGTGTTTCG
AGAATTGCATATAGTAAAGACTTTGAAACTCTCAAAGTTGATTTTCTTAGCAAGCTAC
CTGAAATGCTGAAAATGTTTGAAGATCGTTTATGTCATAAAACATATTTAAATGGTGA
TCATGTAACCCATCCTGACTTCATGTTGTATGACGCTCTTGATGTTGTTTTATACATG
GACCCAATGTGCCTGGATGCGTTCCCAAATTAGTTTGTTTTAAAAAACGTATTGAAG
CTATCCCACAAATTGATAAGTACTTGAATCCAGCAAGTATATAGCATGGCCTTTGCA
GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGGTGGCGACCATCCTCCAAAATCGGATCTGGAAGT
TCTGTTCCAGGGGCCCTGG
```

```
TCGACGGTACCGCGGGCCCGGGATCCATCGCCACCAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC
TGTTACACGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACA
AGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGA
AGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCT
GACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTC
TTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACG
ACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACC
GCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGC
TGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGG
CATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCC
GACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACC
ACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACAT
GGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTA
```

CAAGTAA

CCCGBAATTCCCGGGTTCGACTCGAGCGGCCGCATCGTGACTGACTGACGATCTGCCT  
CGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGT  
CACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGC  
GGGTGTTGGCGGGTGTTCGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAG  
TGTATAATTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGT  
CATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGG  
AACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAAT  
AACCCGTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTT  
CGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTTCGGCATTTCCTTCCCTGTTTTTGTCTACCCAG  
AAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACA  
TCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTT  
TCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGAC  
GCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAG  
TACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCA  
GTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGG  
AGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTT  
GATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGA  
TGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCT  
AGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTT  
CTGCGCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAG  
CGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATC  
GTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCG  
CTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATA  
TATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCC  
TTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTC  
AGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATC  
TGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAG  
AGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATAC  
TGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCT  
ACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGT  
GTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCT  
GAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGA  
GATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGG  
ACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAG  
GGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCCGGTTTTCCGCACCTCTGACTTGAGC  
GTTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACG  
CGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGCTGGCCTTTTGTCTACATGTTCTTTCCTGC

GTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCT  
CGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGC  
CTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATAAATTCGG  
ACACCATCGAATGGTGCAAAACCTTTCGCGGTATGGCATGATAGCGCCCGGAAGAGA  
GTCAATTCAGGGTGGTGAATGTGAAACCAGTAACGTTATACGATGTCGCAGAGTATG  
CCGGTGTCTCTTATCAGACCGTTTCCCGCGTGGTGAACCAGGCCAGCCACGTTTCTG  
CGAAAACGCGGGAAAAAGTGGAAGCGGCGATGGCGGAGCTGAATTACATTCCCAACC  
GCGTGGCACAACAACCTGGCGGGCAAACAGTCGTTGCTGATTGGCGTTGCCACCTCCA  
GTCTGGCCCTGCACGCGCCGTCGCAAATTGTGCGGCGGATTAAATCTCGCGCCGATC  
AACTGGGTGCCAGCGTGGTGGTGTGCGATGGTAGAACGAAGCGGCGTCGAAGCCTGTA  
AAGCGGCGGTGCACAATCTTCTCGCGCAACGCGTCAGTGGGCTGATCATTAACTATCC  
GCTGGATGACCAGGATGCCATTGCTGTGGAAGCTGCCTGCACTAATGTTCCGGCGTT  
ATTTCTTGATGTCTCTGACCAGACACCCATCAACAGTATTATTTTCTCCCATGAAGAC  
GGTACGCGACTGGGCGTGGAGCATCTGGTTCGATTGGGTCACCAGCAAATCGCGCTG  
TTAGCGGGCCCATTAAGTTCTGTCTCGGCGCGTCTGCGTCTGGCTGGCTGGCATAAA  
TATCTCACTCGCAATCAAATTCAGCCGATAGCGGAACGGGAAGGCGACTGGAGTGCCA  
TGTCCGGTTTTTCAACAAACCATGCAAATGCTGAATGAGGGCATCGTTCCCACTGCGAT  
GCTGGTTGCCAACGATCAGATGGCGCTGGGCGCAATGCGCGCCATTACCGAGTCCGG  
GCTGCGGTTGGTGC GGATATCTCGGTAGTGGGATACGACGATACCGAAGACAGCTC  
ATGTTATATCCCGCCGTCAACCACCATCAAACAGGATTTTCGCCTGCTGGGGCAAACC  
AGCGTGGACCGCTTGCTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGTGAAGGGCAATCAGCTG  
TTGCCCCTCTCACTGGTGAAAAGAAAAACCACCCTGGCGCCCAATACGCAAACCGCCT  
CTCCCCGCGGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCAGCAGGTTTCCCGACTGG  
AAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCC  
AGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAAC  
AATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTAC  
AACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACATCC  
CCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAG  
TTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTTTTCCGGCACCAGAAGCGGTG  
CCGAAAGCTGGCTGGAGTGCGATCTTCTGAGGCCGATACTGTCGTCGTCCCCTCA  
AACTGGCAGATGCACGGTTACGATGCGCCATCTACACCAACGTAACCTATCCCATTA  
CGGTCAATCCGCCGTTTGTTCACGGAGAATCCGACGGGTTGTTACTCGCTCACATT  
TAATGTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATTATTTTTGATGGCGT  
TGGAATT

## Supplemental data2

pfrSkylan-S-C1-n14IRTKS の DNA 配列

h-IRTKS-Cas9/gRNA target sequence: **ccg**cgcttgctcgcggcgggcc

(complimentary:) **ggccg**ccgggagcaagc**cg**

(compli+compli:) **ccg**cgcttgctcgcggcgggcc

赤系統: PAM 配列

青系統: ターゲットシーケンス

frSkylan-S

フレーム合わせのための補完

>pfrSkylan-S-C1-n14IRTKS

```
catgcattagttataatgaatcaattacggggtcattagttcatagcccATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACT
TACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCAATA
ATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGG
AGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTAC
GCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATG
ACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCA
TGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGG
GATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAATCA
ACGGGACTTTCCAAAATGTTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGG
CGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCGC
TAGCGCTACCGGTC
```

**ggccg**ccgggagcaagc**cg**

```
GCCACCATGGTGAGTGCGATTAAGCCAGACATGAGGATCAAACTCCGTATGGAAGGCAACGTA
AACGGGCACCACTTTGTGATCGACGGAGATGGTACAGGCAAGCCTTATGAGGGAAAACAGACC
ATGGATCTTGAAGTCAAAGAGGGCGGACCTCTGCCTTTTGCCTTTGATATCCTGACCACTGCAT
TCAGTTACGGCAACAGGGTATTCGTGAAATATCCAGACAACATACAAGACTATTTTAAGCAGTC
GTTTCCTAAGGGGTATTCGTGGGAACGAAGCTTGACTTTCGAAGACGGGGGCATTTGCAATGCC
AGAAACGACATAACAATGGAAGGGGACACTTTCTATAATAAAGTTCGATTTTATGGTACCAACT
TTCCCGCCAATGGTCCAGTTATGCAGAAGAAGACGCTGAAATGGGAGCCCTCCACTGAGAAAA
TGATGTGCGTGATGGAGTGCTGACGGGTGATATTGAGATGGCTTTGTTGCTTGAAGGAAATGC
CCATTACCGATGTGACTTCAGAACTACTTACAAAGCTAAGGAGAAGGGTGTCAAGTTACCAGG
CGCCCACTTTGTGGACCACGCCATTGAGATTTTAAAGCCATGACAAAGATTACAACAAGGTTAAG
CTGTATGAGCATGCTGTTGCTCATTCTGGATTGCCTGACAATGCCAGACGA
```

**TC****ggccg**ccgggagcaagc**cg**

```
CCGGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCGAATTCTGCAGTCGACGGTACCGCGGGCC
CGGGATCCACCGGATCTAGATAACTGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGT
```

TTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATG  
CAATTGTTGTTGTTAACTTGTATTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAG  
CATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTTGTCCA  
AACTCATCAATGTATCTTAACGCGTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTTGTTAAAATTCGC  
GTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCC  
CTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAACAA  
GAGTCCACTATTAAGAAGCTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAG  
GGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGC  
CGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAA  
AGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGG  
GCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCACCCCGCCGCGCTTAAT  
GCGCCGCTACAGGGCGCGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCT  
ATTTGTTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTG  
ATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTCCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGT  
GGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTA  
TGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCC  
AGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCC  
CTAACTCCGCCCATCCCGCCCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCATTCTCCGCCCATG  
GCTGACTAATTTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATT  
CCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAGATCGATCAAG  
AGACAGGATGAGGATCGTTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTC  
CGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCT  
GCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCA  
AGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCAGCGCGGCTATCGT  
GGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGG  
GAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACC  
TTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGC  
TTGATCCGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACG  
TACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGG  
GCTCGCGCCAGCCGAACTGTTTCGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCCCGACGGCGAGGA  
TCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCG  
CTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACAT  
AGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTT  
CCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTT  
CTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGC  
CCAACCTGCCATCACGAGATTTGATTCCACCGCCGCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTT  
CGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCT  
GGAGTTCTTCGCCACCCTAGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAAGGAGACAATACC



GGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACGGTGTGG  
GTCGTTTGTTCATAAACGCGGGGTTTCGGTCCCAGGGCTGGCACTCTGTCGATACCCC  
ACCGAGACCCCATTTGGGGCCAATACGCCCGCGTTTCTTCCTTTTCCCCACCCACCCC  
CCAAGTTCGGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGCGGCAGGCCCTGCC  
ATAGCCTCAGGTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAATTTAA  
AAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAG  
TTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATC  
CTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGT  
GGTTTGTGTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGC  
AGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCA  
AGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGC  
TGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGA  
TAAGGCGCAGCGGTTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGC  
GAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCT  
TCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGA  
GCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCCGGTT  
TCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCT  
ATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTT  
GCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGC