

論文内容の要旨

申請者氏名 大菅光雄

超解像顕微鏡は、光の回折限界を超えて、高精度で蛍光タンパク質の局在を決定する技術である。超解像顕微鏡技術には、蛍光の確率的活性化によって1分子の蛍光タンパク質の局在座標を同定し、座標を積算することでタンパク質局在を示す画像を再構築する光活性化局在顕微鏡(PALM)が含まれる。PALM 観察では、蛍光タンパク質と融合タンパク質とした観察対象のタンパク質を発現させ、観察する。PALM による単一分子局在化の決定では、1分子が十分に分離可能な蛍光輝点画像を取得し、観察された蛍光輝点にガウス分布をフィッティングすることで、その重心位置を分子の座標として求めるために、画像ごとに分析できる分子の数は、限られている。したがって、細胞内の多数の分子の局在座標を得るには、多くの画像の取得が必要で、時間を要するために、観察対象の細胞の化学固定がよく用いられている。しかし、ほとんどの蛍光タンパク質は化学固定時に蛍光を減弱するため、PALM による分子局在の再構築の障害となっていた。

PALM に用いられる蛍光タンパク質の多くは、Eos タンパク質の派生型(変異体)である。緑色の可逆的にフオトスイッチ可能であるが、化学固定耐性のない蛍光タンパク質 **Skylan-S**、および、固定耐性を持つ緑から赤の光変換蛍光タンパク質 **mEos4b** が、知られており、これらはともに Eos タンパク質の派生型である。一方で、固定耐性を持つ緑色の可逆的にフオトスイッチ可能なタンパク質は知られていなかった。

本研究では、**Skylan-S** と **mEOS4b** のアミノ酸置換を組み合わせ、緑色の可逆的にフオトスイッチ可能かつ固定耐性のある **EOS** 派生型を開発し、**fixiation-resisitant (fr) Skylan-S (frSkylan-S)**とした。**frSkylan-S** タンパク質は、**Skylan-S** と同様に励起光によって蛍光を発すると同時に不活性化されるが、紫外光による照射によって再活性化され、さらに、**Skylan-S** よりもアルデヒド化学固定後に蛍光を保持した。**frSkylan-S** 融合タンパク質の α -チューブリンとクラスリン軽鎖は、化学固定を用いた PALM 観察において十分な質の再構成画像をもたらした。さらに、**frSkylan-S** は、抗体染色と組み合わせることができた。

以上の結果から、本研究で開発した **frSkylan-S** は、アルデヒド化学固定条件下での PALM イメージングに適した緑色蛍光タンパク質であると考えられた。

やむを得ない事由[図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ()]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】

論文審査結果の要旨

申請者氏名 大菅光雄

超解像顕微鏡法は、光学顕微鏡を用いてアッベ (Abbe) の光の回折限界を超える精度の観察を可能とする顕微鏡法であり、分子局在を同定する光学顕微鏡法として重要であることから、その改良を目指した研究は、価値が高い。超解像顕微鏡には、明滅できる蛍光タンパク質が必要である。これまでに知られている蛍光タンパク質には、多数の画像取得に必要な観察時間を得るための化学固定耐性を持つものは、緑から赤へのフोटスイッチ能を持つもののみであり、広い波長を占有するという問題があった。一方で、緑の波長で明滅するものには化学固定耐性がないことが知られていた。そこで、これらを組み合わせ、緑の波長で明滅し、かつ、化学固定耐性を持つタンパク質を見出すことは、超解像顕微鏡観察を容易にする上で重要である。

本研究の第一の発見は、frSkylan は Skylan と同様の点滅能力を有し、かつ、400nm の光を照射することで蛍光活性が回復するという Skylan の性質を保持したまま、パラホルムアルデヒドなど固定剤存在下で機能することを見出したことにある。これらの知見は、大腸菌を用いて発現精製したタンパク質を用いて frSkylan の性質を調べることにより得られた。

本研究の第二の発見は、frSkylan と α -tubulin やクラスリン軽鎖との融合タンパク質を安定発現する HeLa 細胞株を作製し、観察を行ったところ、微小管を~66nm の幅で測定でき、クラスリン被覆ピットの直径~120nm のリングを観察することに成功し、十分な PALM 用の蛍光タンパク質としての性質を示したことにある。また、固定細胞でのクラスリン被覆ピット中での蛍光輝点の点密度は、frSkylan の方が、Skylan よりも増加していた。さらに frSkylan が単色で点滅できることを利用し、Alexa Fluor 647 での抗体染色を併用した 2 色での超解像観察にも成功した。

以上のように、本論文の研究で新たに開発した frSkylan は、アルデヒドによる固定に対して既存の Skylan よりも高い耐性を持ち、固定条件下の超解像 PALM 観察に有用な緑色点滅蛍光タンパク質であることが示されたことから、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。

やむを得ない事由 [図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ()] により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】