

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクト  
(英語) Brain Mapping by Integrated Neurotechnologies for Disease Studies  
(Brain/MINDS)

研究開発課題名： (日本語) 脳構造・機能の統合的理解に資する革新的光機能性小分子群の創製  
(英語) Development of game-changing light-driven functional small molecule probes for comprehensive understanding of brain structure and functions

研究開発担当者 (日本語) 大学院薬学系研究科 教授 浦野 泰照

所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Professor, Yasuteru URANO

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

① LacZ-activatable & retention 軸索トレーサーの開発

研究代表者らが確立した分子内スピロ環化制御に基づく分子設計法に基づき、lacZ 発現細胞内に取り込まれるとβ-ガラクトシダーゼによって特異的に加水分解され、強蛍光性へと変化すると同時に、求電子性官能基が生成して細胞内タンパク質へと結合する機能を持つ二色の軸索トレーサー蛍光プローブを開発した。開発したプローブを固定脳スライスに適用したところ、lacZ 発現ニューロンの細胞体・軸索・樹状突起などの複雑な構造体の形態が可視化できること、また、脳の蛍光イメージングで多用される蛍光蛋白質 (GFP, RFP) との共染色が可能であることを確認した。

② SNAP-tag Ca<sup>2+</sup>蛍光プローブ・超解像プローブの開発

赤色蛍光を有する Si-rhodamine を母核として、SNAP-tag リガンドおよび Ca<sup>2+</sup>キレーターを導入することで、SNAP-tag にラベル化可能な新規 Ca<sup>2+</sup>蛍光プローブを設計・開発した。合成したプローブの in vitro での機能を評価した結果、精製 SNAP-tag 蛋白との反応性を有し、Ca<sup>2+</sup>との反応により蛍光上昇を示すことを確認した。

研究代表者らが開発した自発的な光明滅を繰り返す超解像イメージングプローブの多色化を目指し、分子内求核基、蛍光団 (求電子基) であるキサンテン環10位元素ならびに3,6位アミノ基の置換基を最適化した結果、488 nmレーザーで励起可能な誘導体の開発に成功した。またこの誘

導体を用い、チオールや脱酸素剤などの添加物を加えない温和な条件下で、固定細胞における微小管の超解像画像を構築できることを確認した。さらに、海馬分散培養細胞におけるシナプス前部 (VGluT1) および後部 (GluR1) を、2色の超解像プローブで免疫染色して超解像観察を行ったところ、VGluT1、GluR1のクラスターが近接したシナプス部位と推定される構造が観察され、シナプス位置の正確な同定に有用であることが示された。

### ③ In vivo でのプローブ機能評価

In utero electroporation により大脳皮質の一部のニューロンだけに lacZ を発現させたマウスを用い、①で開発した lacZ-activatable & retention 蛍光プローブを脳室内投与し、in vivo における性能を評価した。局所投与後に環流固定して脳切片を作製して in vivo 蛍光染色が可能か、またその特異性に関して検討したところ、局所投与部位付近の lacZ 発現ニューロンの細胞体、軸索、樹状突起を特異的かつ高い S/N 比で in vivo 蛍光染色できることを示した。また二光子励起顕微鏡による観察を行った結果、二光子励起でも十分明るい画像が撮影出来、スパインなどの微細構造も観察できることから、今後 in vivo imaging への応用が期待できる。

### ④ プロジェクトの総合的推進

革新脳進捗報告会で研究成果の報告を行い、プログラムディレクター、プログラムオフィサー、プロジェクトリーダーからの助言を仰ぐとともに、プロジェクト全体の推進、中核拠点の技術開発への貢献に関して議論した。また、プロジェクト全体の連携を密としつつ円滑に運営するために班会議を実施し、研究成果の共有と研究方針に関して議論を行った。

## 1. Development of LacZ-activatable and retention axon tracer

By using our molecular design strategy based on the mechanism of intra-molecular spirocyclization, we developed dual color axon fluorescent tracers that exhibit strong fluorescence and generate electrophiles which bind to intracellular protein only when activated by  $\beta$ -galactosidase in lacZ-positive cells. Further, as we applied these developed probes to the fixed brain slice, we could visualize the complicated neuronal morphology such as axons, spines and dendrites of the lacZ expressing neuron, and confirmed that we could use GFP or RFP as fluorescent makers which are frequently used fluorescent protein for fluorescence imaging of brains.

## 2. Development of SNAP-tag-activatable fluorescent probes for calcium ion and fluorescent probes for super resolution imaging

We designed and developed a novel fluorescent probe for calcium ion which can be labeled to SNAP-tag, by introducing SNAP-tag ligand and calcium chelator into red fluorescent Si-rhodamine scaffold. As we evaluated the optical properties of the synthesized probe in vitro, it was confirmed that it has reactivity to the purified SNAP-tag protein and shows a fluorescence increase upon binding to calcium ion.

We aimed at expanding color variation of our spontaneously blinking fluorophores for super-resolution imaging, and we successfully prepared a candidate derivative which can be excitable with 488 nm laser by optimizing intramolecular nucleophiles, 10<sup>th</sup> atom and amino-substituents of xanthene ring (electrophiles). By using this derivative, we confirmed that super-resolution

images of microtubules in fixed cells can be constructed under mild conditions without adding additives such as thiols and oxygen scavengers. Furthermore, we performed super-resolution imaging after immunostaining presynaptic terminal (VGluT1) and posterior terminal (GluR1) in the primary cultures of murine hippocampal neurons with super-resolution imaging probes in two colors. As a result, clusters of VGluT1 and GluR1 were closely related which are presumed to be a synapses structure, demonstrating the usefulness for accurate identification of synaptic positions.

### 3. In vivo evaluation of the developed probes

In vivo performance was evaluated by intracerebroventricular administration of the developed lacZ-activatable and retention fluorescent probes to mice in which lacZ was expressed only in the cerebral cortex by in utero electroporation. By fluorescence imaging of the brain slices made after perfusion fixation, it was confirmed that it is possible to perform in vivo fluorescent staining of cell body, axon and dendrite of lacZ expressing neuron near the site of local administration with high specificity and high signal-to-noise ratio. Moreover, we could observe fine structure such as spine with sufficient brightness by two-photon fluorescence microscopy, suggesting that in vivo imaging by using our probes could be feasible in the future.

### 4. Comprehensive promotion of the projects

By presenting research results at the annual progress report meetings and group meetings, we discussed with program director, program officer, project leader, and group members about how to promote the whole project and contribute to development of core technology.

## III. 成果の外部への発表

### (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1 件、国際誌 1 件）

1. 堂浦智裕, 神谷真子, 浦野泰照. 生体組織中の lacZ 発現細胞のライブ蛍光検出. 実験医学. 2016, 34, 3197-3201.
2. Doura T, Kamiya M, Obata F, Yamaguchi Y, Hiyama TY, Matsuda T, Fukamizu A, Noda M, Miura M, Urano Y. Detection of LacZ-Positive Cells in Living Tissue with Single-Cell Resolution. Angew. Chem. Int. Ed. 2016, 55, 9620-9624.

### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 細胞内グルタチオンとの求核付加・解離平衡反応を利用した超解像蛍光イメージングプローブの開発, 口頭, 両角明彦, 神谷真子, 宇野真之介, 梅澤啓太郎, 吉原利忠, 飛田成史, 浦野泰照, 第24回日本バイオイメージング学会 学術集会, 2015/9/28, 国内.
2. 細胞内グルタチオンとの求核付加・解離平衡反応を利用した超解像蛍光イメージングプローブの開発, 口頭, 両角明彦, 神谷真子, 宇野真之介, 梅澤啓太郎, 吉原利忠, 飛田成史, 浦野泰照, 日本化学会 第96春季年会, 2016/3/26, 国内.
3. 自発的に明滅する蛍光プローブの開発とライブセル超解像蛍光イメージングへの応用, ポスター, 宇野真之介, 神谷真子, 吉原利忠, 菅原皓, 岡部弘基, Mehmet C. Tarhan, 藤田博之, 船津高志, 岡田康志, 飛田成史, 浦野泰照, 日本ケミカルバイオロジー学会 第10回年会, 2015/6/12, 国内.
4. 化学蛍光プローブの精密設計による革新的バイオイメージングツールの創製, 口頭, 神谷真子,

日本薬学会 第136年会, 2016/3/29, 国内.

5. Analysis of spine structure and stability by two-photon in vivo imaging. ポスター、田中慎二、岡部繁男、日本解剖学会総会・全国学術集会、2016/3/29、国内.
6. In vivo two-photon imaging of synapse dynamics in mouse models of autism、ポスター、田中慎二、一色真明、栗生俊彦、田淵克彦、内匠透、岡部繁男、EAMC2、2015/11/25、国内
7. マウス大脳皮質におけるスパイン安定性の解析、ポスター、田中慎二、岩崎広英、岡部繁男、日本神経科学大会、2015/7/29、国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 光る分子で細胞の働きを明らかにする！, 小松徹, 神谷真子, サイエンスアゴラ 2015, 2015/11/13-15, 国内.

(4) 特許出願

該当なし