

生きた細胞内の脂質秩序を長期間イメージングする蛍光ソルバトクロミックプローブ (Fluorescent solvatochromic probes for long-term imaging of lipid order in living cells)

田中 拓哉,¹ 松本 惇志,² 鶴巻 英治,³ アンドレイ・クリムチェンコ,⁴ 池ノ内 順一,^{*2}
小西 玄一^{*1}

所属: 1. 東京工業大学 物質理工学院 応用化学系、2. 九州大学大学院 理学研究院 物質化学生命系、3. 東京工業大学 理学院化学系、4. ストラスブール大学

Advanced Science DOI: 10.1002/advs.202309721 [Open Access \(Free\)](#)

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/advs.202309721>

要旨:細胞膜における脂質秩序の高分解能な時空間モニタリングは、細胞生理機能を制御する複雑で洗練されたシステムについて視覚的に洞察を深める。ソルバトクロミック蛍光プローブは、細胞膜マイクロドメインの微小環境の秩序を同定するための非侵襲的可視化ツールとして非常に有望である。しかしながら、従来のプローブは、構造解析は可能であるものの、細胞レベルでのライブイメージングに必要な長時間の光安定性に欠けていた。今回我々は、細胞分裂が起こっている期間、脂質秩序をライブイメージングすることができる超耐光性ソルバトクロミック蛍光プローブ 2-*N,N*-ジエチルアミノ-7-(4-メトキシカルボニルフェニル)-9,9-ジメチルフルオレン(FπCM)を開発した。このプローブおよびその誘導体は、従来のソルバトクロミックプローブと比較して、分析に必要な蛍光波長と極性応答性、大きな輝度、低光毒性、生理的条件下での顕著な光安定性を示す。したがって、これらのプローブは、蛍光顕微鏡の限界、特に光退色に関連する限界を克服する可能性を持っている。細胞膜レベルで、細胞プロセスのメカニズムを解明するための貴重なツールとなり得る。

脂質秩序:細胞膜は飽和脂質やコレステロールに富む秩序相と不飽和脂質に富む無秩序相に相分離し、マイクロドメイン構造を形成する。

ソルバトクロミック蛍光プローブ:周囲の極性環境によって蛍光波長が変化する色素。機能性蛍光色素として、バイオイメージングだけでなく、化学センサーとして広く用いられている。

細胞膜マイクロドメイン:流動的な細胞膜の中で、部分的にコレステロール、脂質やタンパク質などの分子が集合したナノメートルスケールの微小領域。

細胞プロセス:がん化、移動、老化、代謝や分泌など細胞の機能が働く過程のこと。

1. 序論

生体膜は、細胞や小器官を周囲の環境から隔てるだけでなく、細胞の形態形成、運動性、物質交換、シグナル伝達など、様々な細胞機能を支配している^[1]。最近の研究では、膜機能における脂質組成と膜タンパク質の重要性が注目を集めている^[2]。脂質の生合成に関連する遺伝子の欠損は遺伝性疾患につながる可能性があり^[3]、脂質代謝の明確な変化は癌細胞の増殖や腫瘍形成を促進するため、脂質機能の根底にあるメカニズムは臨床応用の観点からも注目されている^[4]。脂質組成の影響を受ける膜の秩序と流動性は、膜タンパク質の構造と活性に大きく影響する^[5]。ショットガン質量分析法を用いたリピドミクス解析の発展により、微生物から哺乳類に至るまで、細胞は膜脂質組成を適切なレベルに強固に維持していることが知られるようになった^[6]。しかし、生細胞における局所的な脂質組成の解析は依然として困難であるため、多様な機能を発揮する膜構造を正確に理解するためには、膜の流動性を微視的に解析できる新たなツールの確立が必要である^[7]。

膜タンパク質:微生物から動物、植物に至る全ての細胞や細胞内小器官の膜の中で働くタンパク質

脂質代謝:細胞内での脂質の合成と分解のこと

脂質の時空間的变化を定量化するためには、非侵襲的な蛍光膜プローブを用いて連続的に観察する必要がある。ソルバトクロミック色素は、局所的な膜物性、膜透過性、非侵襲性に対して高感度であるため、細胞膜の液体秩序相 (Lo) と液体無秩序相 (Ld) の空間分布と生物物理学的特性を可視化するための最も有望なツールの一つである。標準的な非侵襲性で小さなソルバトクロミック蛍光膜プローブであるプロダン (prodan) とラウダン (laurdan) は、1979 年に Weber と Farris によって開発された^[8]。これらの欠点は、UV 励起 (350 nm) による細胞損傷、低吸光度、低極性領域 (Φ_{fl} 0.02, *n*-ヘキサン) での低蛍光量子収率 (Φ_{fl})、高濃度染色、低光安定性である。2010 年には、蛍光波長を長波長化し、吸光係数を増加させるために、プロダン類似体であるフルオレン (FR0) を π 系として設計した^[9]。続いて、2013 年には、非極性溶媒 (Φ_{fl} 0.88 *n*-ヘキサン) から極性溶媒 (Φ_{fl} 0.85 メタノール) まで高い蛍光量子収率を維持するために、プロダン類似体であるピレン (PA) も設計した^[10]。PA は 2016 年、モデル膜におけるコレステロールとスフィンゴミエリンクラスターの分布の同定に成功した^[11]。ただし、アルデヒドは細胞内の基質や残基と反応するため、発色団が修飾され、発光特性が失われる^[11,12,13]。そこで、PA のケトン類似体である PK が開発され、細胞や小動物における脂質組織のイメージングへの応用に成功した^[14]。開発が進む一方で解決できていない問題も存在する。FR0、PA、PK は、細胞膜の組成に近い低極性溶媒中では、項間交差 (ISC) を完全に抑制することができない。ISC は光励起された三重項芳香族ケトンの特徴的な挙動であり^[15]、ISC の不完全な抑制は色素の光分解による光退色を引き起こす^[10]。さらに、アルデヒドやケトンが関与する細胞内反応も報告されており、これも光退色を引き起こす。加えて、これらの過程で生成される分解生成物は、イメージングデータにスペクトルノイズをもたらす。

コレステロール:有機化合物の一種で細胞膜の構成成分で細胞の強度維持のための重要な役割を持つ。

スフィンゴミエリンクラスター:細胞膜中に存在するスフィンゴ脂質の一種の集合体

一般に、ソルバトクロミック細胞膜プローブの応用は短時間の測定に限られている^[16]。ナイルレッドプローブに見受けられるように、プローブの使用範囲をより長波長にシフトすることは、光毒性を減少させるための魅力的な選択肢である^[15]。しかしながら、ナイルレッドプローブでさえ、特定の細胞膜に対して強い光毒性を示す^[13]。最近の研究では、誘導放出抑制 (STED) 顕微鏡の強力な励起光を用いた長時間の測定を実現するために、ナイルレッド^[15]や他の色素^[17]をベースにした色素が研究されている^[18]。このアプローチでは、生体膜に対する色素の親和性が低い可能性があり、従来の顕微鏡法ではシグナル強度が低下する^[19]。私たちは、細胞生物学的観点から色素の物理的特性に注目することの重要性を認識した。これらは、発光特性、安定性、非侵襲性の3つのカテゴリーに分類できる(図 1b)。ライブイメージングを実現するためには、光化学と細胞生物学の両方の要求により、これら3つの要素の調和が必須であり、限定され均衡のとれた分子設計が必要である。

誘導放出抑制 (STED) 顕微鏡: 蛍光色素の励起と励起の抑制を利用して超解像画像を得る顕微鏡法。2014 年ノーベル賞受賞。

本研究では、光安定性と低毒性を有し、長時間(60 分以上)の連続観察が可能なソルバトクロミック蛍光細胞膜プローブを報告する。その分子設計には、細胞組織と反応しない芳香族エステルを組み込み、化学的安定性と非侵襲性を確保した。芳香族エステルの光安定性は、エネルギーダイアグラムを用いた光物理学的プロセスで説明することができる^[10,20]。さらに、 π 共役の大きさを微調整することで、光分解を起しやすい三重項への ISC を抑制・操作する戦略を探索した。これらの色素は、生体適合性や侵襲性に直接影響するため、分子サイズと平面性の微妙な均衡を達成することが極めて重要である。我々は、バイオイメージングに適したプローブを開発するために、従来の π 共役構造やその 共役拡張型など、いくつかの色素を検討した。

π 共役構造/ π 共役拡張型: 二重結合などの π 結合によって形成される骨格のこと。多環芳香族炭化水素のピレン、ナフタレン、アントラセン、フルオレン、フェナントレンなどが代表例である。代表の骨格にさらに π 結合をつなげた構造を π 共役拡張と呼ぶ。

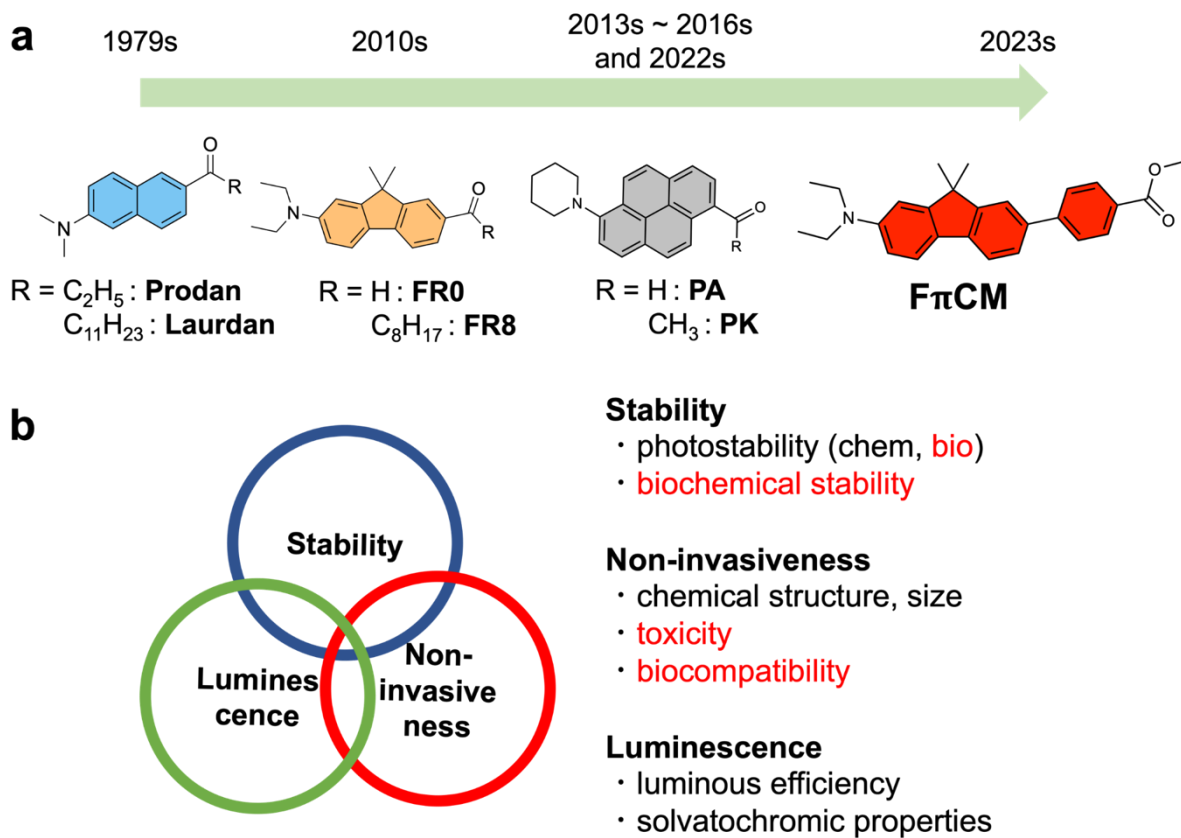


図 1. a、ソルバトクロミック膜プローブの歴史的発展。b、分子設計の概念図。黒字の要素は光化学的に必要であり、赤字の要素は生物学的に必要である。

2. 結果と考察

2.1. 光物性

図 2a および表 1 に示すように、新たに合成した色素の光物性を調べた。プロダンで用いたエステル誘導体(フルオレン^[9] とピレン^[10])とカルボニル誘導体に加えて、双極子モーメント(μ)を大きくするために、分子の長軸方向^[21]に π 共役を伸ばしたフルオレン骨格を検討した。エステル誘導体の光物性は、同じ π 電子骨格を持つアセチル/ホルミル誘導体と同等であり、これを修飾することにより、様々な発光域を持つ強発光色素を創製した。このうち、FCM、F π CMo-F、PCM、PCMst、F π CMst、FstCM はプロダンと同等以上の優れた光物性を示した。FstCMo-F は 700nm 付近の赤色光を発し、細胞膜プローブとして有望である。しかし、すべての色素が細胞イメージングに適していたわけではない: FCM は UV 光で励起され、PCM、F π CMo-F、FstCMo-F は細胞膜との適合性が悪かった(図 S138)。これらの色素と FstCM は、以下に述べる細胞イメージング条件では問題があった。これらの化合物に含まれるフッ素部分は、生体膜適合性の低さの一因となった^[21,22]。様々な試行錯誤の結果、F π CM は効果的な膜プローブであるという結論に達した。プローブとしての F π CM の有用性については後述し、他の化合物の詳細な光物性については、参考情報(セクション S3)に記載されている。

F π CM はトルエン中で大きな(最大)吸収係数を示した($\lambda_{\text{abs-max}}$ 372 nm: $\epsilon \approx 57,100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; 一般的なレーザー光源 405 nm: $\epsilon \approx 26,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)。吸収波長(λ_{abs})は溶媒の極性変化にほとんど依存せず($\lambda_{\text{abs}} \leq 7.0 \text{ nm}$)、基底状態では吸収のソルバトクロミズムは見られなかった。F π CM のジエチルアミンをピペリジン(F π pCM)に置き換えると^[23]、 λ_{abs} のブルーシフトが観測され、エステルの電子吸引性を補うために F π CM のフェニル基にフッ素を導入すると(F π CMo-F)^[24]、波長のレッドシフトが観測された^[25]。フッ素の導入は、中~高極性溶媒中での蛍光スペクトルのレッドシフトに寄与する性質があることも観測された。(図 S69) 計算結果もこの傾向を支持しており、フッ素導入による π 共役の拡大、F π CM と F π CMo-F の HOMO-LUMO エネルギーギャップと吸収スペクトルが確認された(図 S70)。このように、置換基の導入により吸収波長や蛍光波長をチューニングすることができる。

ブルーシフト/レッドシフト: スペクトル線または吸収帯が短波長側にずれることをブルーシフト、長波長側にずれることをレッドシフトと呼ぶ。

エネルギーギャップ: 電子状態間のエネルギーの差

F π CM は、*n*-ヘキサン(比誘電率(ϵ_r) = 1.89)からアセトニトリル(37.5)までの広い極性範囲にわたって、広い蛍光帯(431-564 nm; 5471 cm^{-1})と高い Φ_f (≥ 0.81)を持つソルバトクロミック特性を維持した。蛍光帯(431-564 nm; 5471 cm^{-1})は、プロダン(389-455 nm; 3729 cm^{-1})や PK(473-549 nm; 2927 cm^{-1})よりも大きい。蛍光スペクトルが低極性から高極性に大きくシフトする F π CM では、ある波長における蛍光強度比を分離するレシオメトリック分析において、高分解能の色分離が期待できる。

比誘電率: 溶媒の誘電率と真空の誘電率の比

FπCM 蛍光の溶媒依存性は、従来の色素と比較して特徴的な性質を示した：FπCM の吸収スペクトルと蛍光スペクトルは、配向分極率 (Δf) に対する ストークスシフト の線形依存性を示し、Lippert-Mataga の式 (式 1) と一致した：

$$\Delta\nu = \frac{2(\mu_e - \mu_g)^2 \Delta f}{hca^3} + \text{const. (eq. 1)}$$

ここで μ_e と μ_g はそれぞれ励起状態と基底状態の 双極子モーメント である。 h はプランク定数、 c は光速、 a は Onsager 半径である。式を用いた FπCM の線形近似 (図 S60) から、 $\Delta\mu$ ($\mu_e - \mu_g$) = 17.2 D を与え、これは従来の FR0 のそれよりも約 3.2 D 高い。この結果は、ICT 機構を持つソルバトクロミック色素に特徴的であり、エネルギーギャップ 則で説明されるように、 $\Delta\mu$ が大きい色素ほど励起状態での電荷分離が大きくなる^[26]。高極性領域では、電荷分離が小さい色素に比べて、非放射失活速度定数 (k_{nr}) が内部変換に起因する。例えば、FR0 (14.0 D) の k_{nr} は小さくなる傾向があり、その結果、 Φ_{fl} は大きく減少する^[26,27]。しかし、FπCM の場合、 k_{nr} は極性環境によらずほぼ一定であった。(表 S1) アセチル誘導体 FπA (16.7 D) の場合、アセトニトリル中の k_{nr} はエネルギーギャップの減少に追随し、 $\Phi_{fl} = 0.10$ となった。(表 1)。FπCM の安定で高い Φ_{fl} 値はエステルの大きな利点である。

ストークスシフト: 蛍光色素の吸収と蛍光のスペクトルのバンド極大の差。

双極子モーメント: 分子の正負の電荷や磁極をさす双極子の強さを表すベクトル量。

エネルギーギャップ則: エネルギーギャップが小さくなるほど熱振動によって失活する法則。

電荷分離: 中性分子中の励起状態における、電子移動による電荷の偏り。

非放射失活速度定数 (k_{nr}): 励起状態から光を放出せずに基底状態へ失活する過程の速度定数。光を放出して失活する過程の速度定数を放射失活速度定数 (k_r) という。

FπCM は、アモルファス (無定形) と結晶相の固体秩序にかかわらず、同様の蛍光スペクトルと 0.45 という高い量子収率 (Φ_{fl}) を示した (図 2i)。単結晶 X 線構造解析と量子化学計算 (それぞれ図 S90 と S91) により、FπCM は FπA と類似の結晶配列構造を持つことが明らかになったが、 Φ_{fl} の値は大きく異なっていた (FπCM: 0.43 対 FπA: 0.03)。他のエステル化合物も、アセチル誘導体やホルミル誘導体にはない固体状態での蛍光特性を示した (図 S82、セクション S3 および S4)。

FπCM の蛍光輝度 (吸収係数 $\epsilon \times \Phi_{fl}$) は溶媒の極性によらず 21,000 以上という優れた値を示した。細胞膜の極性が低いことを考慮すると、FπCM (22,800) は *n*-ヘキサン中で Prodan (370)^[10] や PK (11,700)^[10,28] よりも効率的であった。このことは、より低濃度 (すなわち低毒性) の FπCM を用いた解析に適した色識別イメージングが可能であることを示唆している。

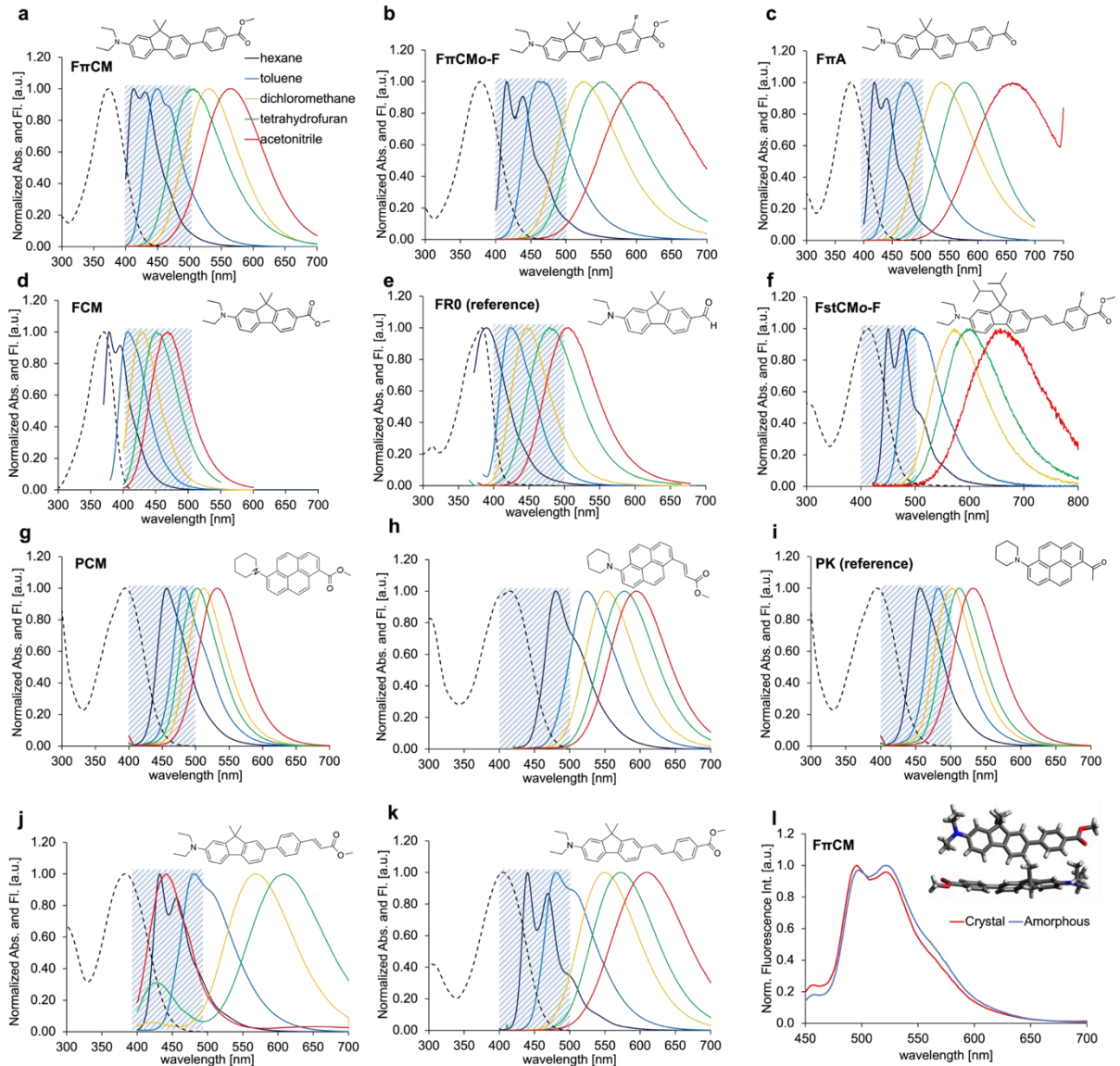


図 2. 分光学的特性。a, FπCM, b, FπCMo-F, c, FπA, d, FCM, e, FR0, f, FstCMo-F, g, PCM, h, PCMst, i, PK, j, FπCMst, k, FstCM の化学構造、吸収スペクトル (破線)、蛍光スペクトル (実線)。l, FπCM の固体状態およびアモルファス状態における蛍光スペクトルと、FπCM の単結晶充填構造。灰色、白色、赤色、青色の球はそれぞれ C、H、O、N を表す。

表 1. FπCM、FπCMo-F、FπA、FCM、FR0[9]、FstCMo-F、PCM、PCMst、PK[10,28]、FπCMst、FstCM、Prodan[10]の各種溶媒および固体状態における分光学的特性。

		FπCM ($\Delta\mu = 17.2$ D) ^[e]				FπCMo-F ($\Delta\mu = 17.2$ D) ^[e]				FπA ($\Delta\mu = 19.0$ D) ^[e]			
solvent	$\epsilon_r^{[b]}$	ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	λ_{abs} [nm]	λ_{fl} [nm]	$\Phi_{fl}^{[f]}$ [-]	ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	λ_{abs} [nm]	λ_{fl} [nm]	$\Phi_{fl}^{[f]}$ [-]	ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	λ_{abs} [nm]	λ_{fl} [nm]	Φ_{fl} [-]
<i>n</i> -Hexane	1.89	69600	364	431	0.88	65500	368	438	0.90	37200	369	440	0.85
Toluene	2.38	61400	372	450	0.83	57100	378	463	0.89	41500	378	477	0.93
THF	7.60	63200	373	504	0.87	69400	379	524	0.94	34200	377	536	0.98
DCM	9.08	61600	375	531	0.85	58100	379	552	0.84	37500	382	578	0.42
MeCN	37.5	63600	371	564	0.81	59700	376	604	0.77	41800	376	661	0.10
solid	-	-	-	496 ^[c] 496 ^[d]	0.48 ^[c] 0.43 ^[d]	-	-	505 ^[c] 507 ^[d]	0.54 ^[c] 0.23 ^[d]	-	-	492 ^[c]	0.03 ^[c]
		FCM ($\Delta\mu = 13.3$ D) ^[e]				FR0 ($\Delta\mu = 14.0$ D) ^[e]				FstCMo-F ($\Delta\mu = 19.0$ D) ^[e]			
solvent	$\epsilon_r^{[b]}$	ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	λ_{abs} [nm]	λ_{fl} [nm]	$\Phi_{fl}^{[f]}$ [-]	ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	λ_{abs} [nm]	λ_{fl} [nm]	$\Phi_{fl}^{[f]}$ [-]	ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	λ_{abs} [nm]	λ_{fl} [nm]	Φ_{fl} [-]
<i>n</i> -Hexane	1.89	47600	368	379	0.92	42000	387	395	0.11	42300	405	450, 476	0.89
Toluene	2.38	39500	373	407	0.98	43000	395	434	0.98	43800	412	500	0.89
THF	7.60	37900	371	429	0.93	40000	393	462	0.85	39300	412	571	0.85
DCM	9.08	37900	370	452	0.84	40000	399	497	0.75	37500	427	600	0.83
MeCN	37.5	37800	370	469	0.96	35000	394	518	0.56	38300	409	671	0.45
solid	-	-	-	385 ^[c]	0.12 ^[c]	-	-	-	0.02	-	-	522 ^[c] 533 ^[d]	0.09 ^[c] 0.12 ^[d]
		PCM ($\Delta\mu = 9.30$ D) ^[e]				PCMst ($\Delta\mu = 14.5$ D) ^[e]				PK ($\Delta\mu = 9.40$ D) ^[e]			
solvent	$\epsilon_r^{[b]}$	ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	λ_{abs} [nm]	λ_{fl} [nm]	$\Phi_{fl}^{[f]}$ [-]	ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	λ_{abs} [nm]	λ_{fl} [nm]	$\Phi_{fl}^{[f]}$ [-]	ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	λ_{abs} [nm]	λ_{fl} [nm]	$\Phi_{fl}^{[f]}$ [-]
<i>n</i> -Hexane	1.89	19500	392	456	0.89	33200	400	480	0.75	17400	396	473	0.67
Toluene	2.38	19500	391	482	0.96	30300	417	525	0.98	18700	402	504	0.80
THF	7.60	19100	394	503	0.89	31100	415	553	0.97	17000	401	528	0.79
DCM	9.08	18100	398	512	0.92	29700	420	577	0.95	16700	407	538	0.83
MeCN	37.5	18200	394	536	0.77	30500	414	595	0.95	14000	400	549	0.76
solid	-	-	-	522 ^[c] 533 ^[d]	0.09 ^[c] 0.12 ^[d]	-	-	522 ^[c]	0.72 ^[c]	-	-	-	0.01
		FπCMst ($\Delta\mu = 20.5$ D) ^[e]				FstCM ($\Delta\mu = 18.7$ D) ^[e]				Prodan ^[g] ($\Delta\mu = 7.0$ D) ^[e]			
solvent	$\epsilon_r^{[b]}$	ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	λ_{abs} [nm]	λ_{fl} [nm]	$\Phi_{fl}^{[f]}$ [-]	ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	λ_{abs} [nm]	λ_{fl} [nm]	$\Phi_{fl}^{[f]}$ [-]	ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	λ_{abs} [nm]	λ_{fl} [nm]	Φ_{fl} [-]
<i>n</i> -Hexane	1.89	52000	376	432 456	0.79	67600	399	440 469	0.72	18400 ^[h]	340	389	0.02
Toluene	2.38	45100	385	481	0.99	57700	407	502	0.94	-	347	416	0.56
THF	7.60	47100	383	568	0.99	59600	405	552	0.93	-	348	430	0.78
DCM	9.08	45700	386	608	0.24	58200	408	591	0.93	-	355	440	0.98
MeCN	37.5	49200	380	441	0.03	60400	402	626	0.89	-	350	455	0.80
solid	-	-	-	500 ^[c]	0.71 ^[c]	-	-	0.70 ^[c]	525 ^[c]	-	-	-	-

a) 定義: λ_{abs} : 最大吸収波長; λ_{fl} : 最大蛍光波長; Φ_{fl} : 絶対蛍光量子収率; THF: テトラヒドロフラン; DCM: ジクロロメタン; MeCN: アセトニトリル; $\Delta\mu = \mu_e - \mu_g$. b) 誘電率. c) アモルファス固体 d) 多結晶固体 e) Lippert-Mataga 式 (式 1) により推定した $\Delta\mu$ f) 誤差 ± 0.03 g) プロダンのデータは参考文献 10 から得た h) プロダンの吸収係数は参考文献 10 から得た。

2.2. 光安定性

低極性溶媒（モデル）中、酸素存在下での連続光照射による光分解曲線と、生細胞を用いた生理条件下での光分解曲線を測定し、ソルバトクロミック色素の光安定性を評価した。光安定性は、顕微鏡観察条件、観察対象、色素の性質によって大きく異なる。そのため、すべての色素に適用できる標準的な評価法は存在しない。そこで、細胞膜と極性が近いトルエンを溶媒として測定した。F π CM、PK および Prodan の光分解曲線を図 3a および 3b に、その他のエステル化合物の光分解曲線を図 S78 および S79 に示す。すべてのエステル化合物は、3 時間後に最初の蛍光強度の 94% 以上を維持しており、PK (86%)、Prodan (20%)、光安定性が要求される STED 顕微鏡に使用される NR (76%)^[18,29]と比較して優れた光安定性を示している。この結果は、エステル誘導体では項間交差 (ISC) が起こりにくいことを示すエネルギーダイアグラムの結果 (図 S119、S120、S121) と一致している。

これらのエステル誘導体の細胞標識への応用可能性を評価するため、まず、分子構造の異なるこれらの色素 (F π CM、PCM、FstCM、FstCMo-F) を、同一条件下で、EpH4 生細胞を各色素で染色し、観察することにより整体適合性を比較した。その結果、F π CM は他のどの色素よりも著しく高いシグナル強度を示した (図 S138)。F π CM に比べて PCM のシグナルが低いことから、フルオレン発色団はピレンよりも細胞染色に適していることが示唆された。フルオレン誘導体では、観測されたシグナル強度の順序は、F π CM > FstCM > FstCMo-F であった。このことは、化学構造が大きいと、おそらく水溶性が低いために、細胞への色素のアクセスが妨げられる可能性があることを示唆している。したがって、F π CM がこの色素群の中で最も細胞イメージングに適していると結論づけ、以降の解析に採用した。

F π CM がモデル膜や生きた細胞で膜秩序を検出できるかどうかを調べた。生体膜のモデルとして、巨大ユニラメラ小胞 (GUV) を F π CM で染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、液体秩序相 (Ld 相) と液体無秩序相 (Lo 相) を区別する能力を評価した。極性の異なる溶媒中での分光学的特性 (図 2a) と一致して、DOPC からなる Ld 相小胞では高い赤 (> 500 nm) / 青 (< 500 nm) 比が観察されたのに対し、DSPC / Chol からなる Lo 相小胞では低い比が観察された (図 3c および 3d)。次に、生きた細胞内での膜秩序の不均一性を調べた。図 3e に示すように、EpH4 マウス乳腺上皮細胞、L-929 および NIH3T3 マウス線維芽細胞、ヒト由来 HeLa 細胞において、F π CM は飽和脂質、スフィンゴ脂質、コレステロールに富む細胞表面形質膜と不飽和脂質^[5]に富む細胞内小器官の間に顕著な秩序の違いを見出した (図 S137 および 4a)。これらの結果は、以前に PK^[14]で示されたように、F π CM が膜秩序の不均一性を明らかにできることを示している。

共焦点レーザー顕微鏡: サンプル側と検出側に 2 つの焦点を持つ顕微鏡。断層像が得られ、さらに z 方向に操作すると 3 次元の画像構築が可能。光学顕微鏡と比べて高コントラストかつ解像度が高い画像が得られる。

そこで、F π CM、PK およびラウダンの光安定性を生細胞の生理的条件下で比較した。図 3f は、EpH4 細胞内での連続光照射による F π CM、PK およびラウダンの光分解曲線である。トルエン溶媒中での光分解曲線と比較して、PK は測定の初期に発光の大部分を失った。これ

は、光分解に加え、生きた細胞内での基質との反応による蛍光単位の修飾に起因すると考えられる。ラウダンおよび PK は、それぞれ初期の蛍光強度の約 30%および 10%しか維持しなかったのに対し、FπCM は約 80%を維持した。図 3f の減衰曲線から求めた指数近似曲線を図 S136 に示すが、PK とラウダンは約 30 分で完全に消光するのに対し、FπCM は約 5 時間持続する。ここでは、比較的強い共焦点レーザー光 (10%) を用いていることから、FπCM は様々な装置のレーザー光強度に対して耐性があることが示唆される。

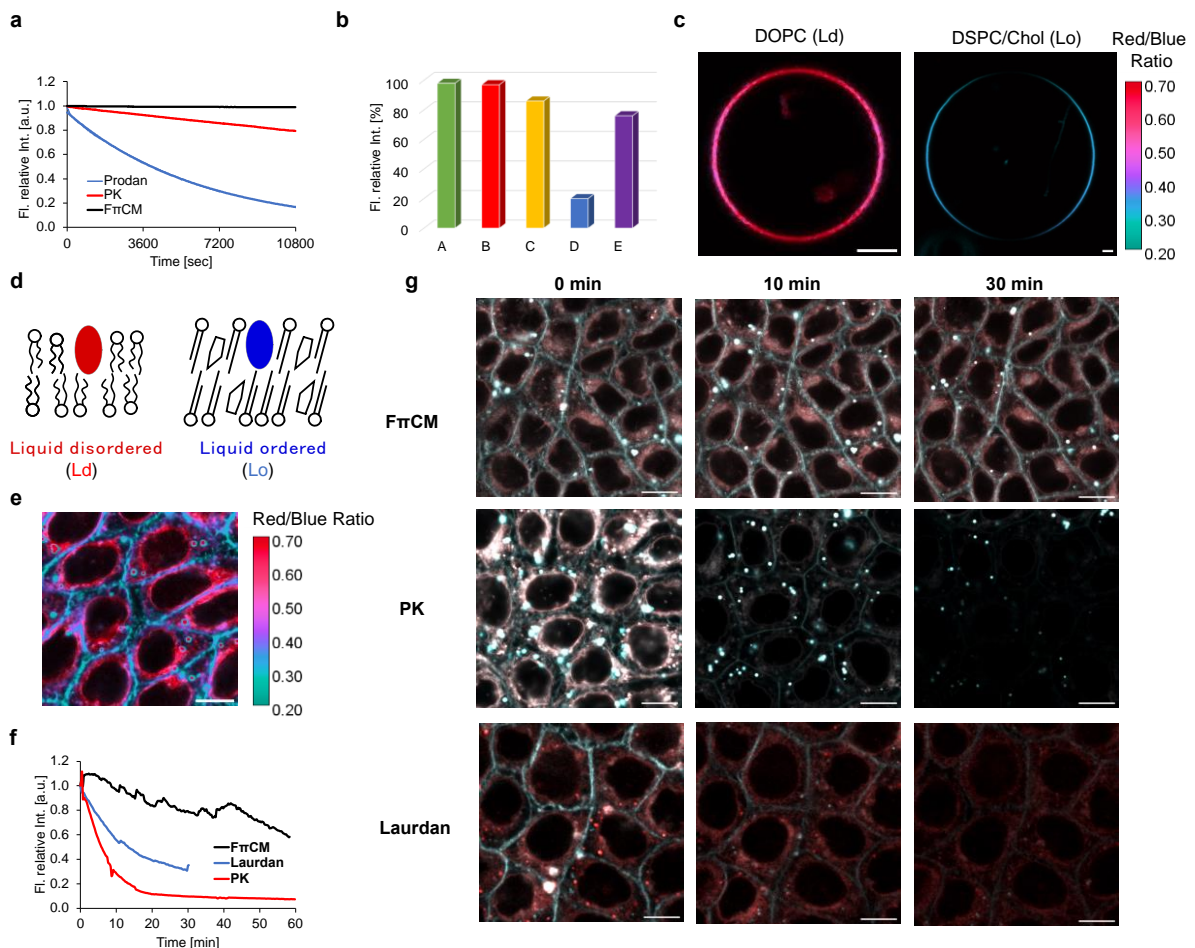


図 3. a, 酸素雰囲気下でのトルエン (1.0×10^{-5} M) 中における FπCM, PK, Prodan の光分解曲線。励起波長 (λ_{ex}) は 375 nm。b, 酸素雰囲気下トルエン (1.0×10^{-5} M) 中、初期蛍光強度と 3 時間光照射後の蛍光強度比の比較。A: FπCM, B: FstCMo-F, C: PK, D: Prodan, E: NR。NR のデータは文献 28 から得た。c, FπCM で染色した GUV の Ld 相と Lo 相を示す共焦点蛍光画像。GUV は DOPC (Ld) と DSPC/Cho (Lo) から構成されていた。赤チャンネル (>500 nm) と青チャンネル (<500 nm) の比を色で表示し (右のバー)、両チャンネルの平均シグナル強度を明るさで表示した。スケールバー: 5 nm。d, モデル膜における液体無秩序相 (Ld) と液体秩序相 (Lo) の模式図。e, FπCM で染色した EpH4 の共焦点像。f, 連続光照射下の細胞膜における時間の関数としての FπCM, PK, Laurdan の光分解曲線。 $\lambda_{ex} = 405$ nm。g, 連続光照射下の細胞膜における FπCM, Laurdan, PK の蛍光色素のタイムラプス画像。100 μ L のハンクス平衡塩溶液 (HBSS) 中、37°C で 5 分間、10 μ M プローブで細胞を染色した。その後、1 mL の HBSS で希釈した。 $\lambda_{ex} = 405$ nm Laser, 10%。スケールバー: 5 nm。

2.3. バイオイメージング・アプリケーション

この光安定性膜プローブである F π CM が、生細胞の時間経過観察において PK よりも優れているかどうかを検討した(図 4;補足ビデオ 1 および 2)。F π CM も PK も HeLa 細胞の膜秩序の不均一性を明らかにし(図 4a)、F π CM で観察された細胞膜領域のシグナル強度がわずかに高い以外は、基本的に同じレシオメトリック画像であった。ここでも、秩序の高い細胞膜と秩序の低い細胞内小器官との間の不均一性が観察された。細胞内領域でも顕著な比率の不均一性が観察されたが、F π CM が脂肪滴マーカーであるナイルレッドと共局在したことから(図 4a)、その大部分は中性脂質からなる低極性の油状オルガネラである脂質滴からのシグナルに起因すると考えられる。

オルガネラ/細胞内小器官:細胞内で一定の機能を持つ小器官の総称

細胞内の生理的整合性の維持の指標として、細胞分裂の進行を選択した。核の形態を可視化するために、mCherry を結合させたヒストン H2B タンパク質を HeLa 細胞にトランスフェクトし、F π CM/PK では 405 nm の励起光で、mCherry では 561 nm の励起光で、それぞれの光学セクションについて順次画像を取得した。図 4b に示すように、F π CM と PK はともに膜秩序の不均一性を検出し、細胞膜では赤/青のシグナルの値が低く、内膜では比の値が高かった。405 nm で励起される蛍光タンパク質 mCherry からのシグナルは、これらのレシオメトリック分析の結果に影響を与えず、561 nm で励起される F π CM からのシグナルはごくわずかであった。細胞生理への影響については、細胞分裂が進行したのは F π CM を用いた観察中のみであり、PK を用いた観察中には細胞分裂は進行しなかった。一視野内の複数の細胞で細胞分裂が進行していることから(補足ビデオ 1)、この観察条件では F π CM の細胞毒性はほとんどないことが示唆された。また、時系列観察による間期細胞の形態への影響を比較した(図 4c)。F π CM 観察時には顕著な形態変化は見られなかったが、PK 観察時にはアポトーシスの進行に伴って観察されるような大きな膜ブリープが形成された(補足ビデオ 2)^[29,30]。以上のことから、F π CM はこれまでに報告されている PK よりも低毒性であり、蛍光タンパク質を用いた同時観察による細胞過程の時間追跡解析に適している。図 4b に示すように、異なるオルガネラ間(例えば、細胞膜と小胞体間)の膜秩序の差は、単一の連続膜内(例えば、細胞膜内)の不均一性よりもはるかに大きく、連続膜内の秩序の時空間差を解析することを困難にしていた。この困難を克服する一つの方法は、特定の官能基を用いた色素のオルガネラ特異的局在化である^[30,31]。そこで我々は、双性イオン性基と長い疎水性鎖からなるリンカーを結合させ、細胞膜に選択的に局在化させる技術を利用した^[17,32]。ケトンベースのプローブと比較して、エステルベースの F π CM の修飾法は十分に報告されており、高い収率で生成物 F π CM-SO₃ が得られた(図 5b;補足情報セクション S2 も参照)。図 5b に示すように、GUV の膜秩序に対する感受性は、両親媒性アンカー基によって妨げられることはなかった。光の偏光の影響は、蛍光団が脂肪酸鎖に平行に配向していることを示している。生細胞を F π CM-SO₃ で染色すると、いずれの内膜からのシグナルも、親 F π CM (図 4b)と比較して著しく減少した(図 5c)。細胞膜ターゲティングは高い毒性を引き起こす傾向があるが^[13]、F π CM-SO₃ の観察によって細胞分裂は影響を受けなかった。これらの結果は、新たに合成したエステル型プローブ F π CM が、より毒性の低いオルガネラターゲティング観察にも応用可能であ

ることを示している。

間期細胞:細胞周期は、分裂が行われる分裂期とそれ以外の間期(準備期間)のふたつからなる

アポトーシス:分子機構によって制御された細胞死のこと。分子機構の無い物理的・化学的な損傷による死をネクローシスという。

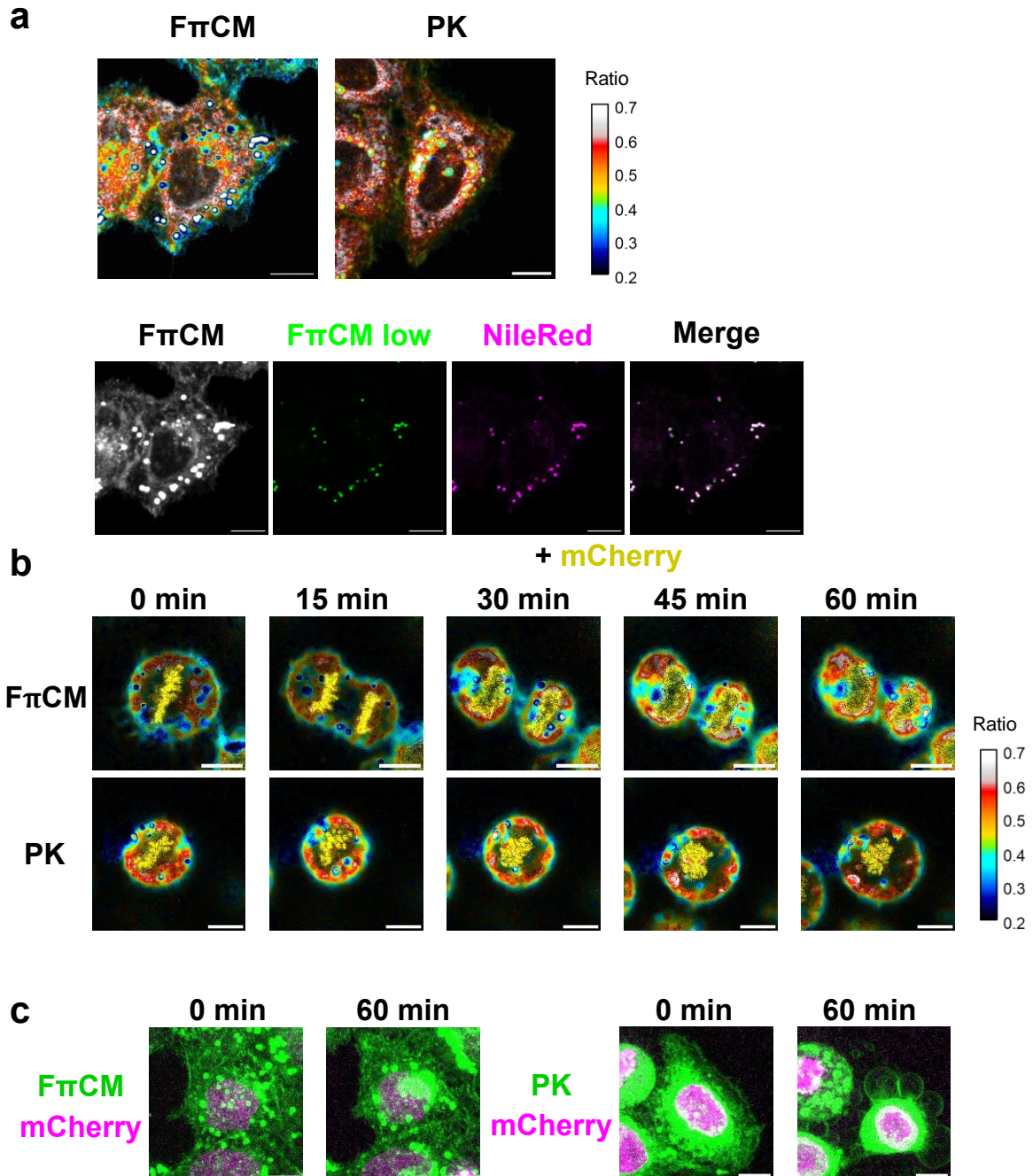


図 4. a, 上段、1 μ M F π CM + 100 nM NileRed、または 1 μ M PK で染色した生きた HeLa 細胞。赤/青の比率とシグナル強度は図 3c と同様に表示されている。青色(=低比率)の円形輪郭を持つ細胞内の白色(=高比率)粒子は脂肪滴であることに注意。下段、F π CM の明るい粒子と脂肪滴(NileRed)の共局在。b-c、生細胞におけるソルバトクロミック色素と蛍光タンパク質の同時観察: b、HeLa 細胞の分裂の進行に対する F π CM と PK の効果の比較。擬似色は赤チャンネル(500-700 nm)と青チャンネル(400-500 nm)の強度比を表し、明るさは 2 チャンネルの平均強度を表す。染色体形態は mCherry 標識 H2B で同時に観察し

た。細胞は $1\mu\text{M}$ の色素とともに 10 分間インキュベートされた。405 nm レーザー：5%、561 nm レーザー：1%。スケールバー：10 μm 。注目すべきは、図 2 の光安定性観察よりも低いレーザー強度を用いたことである。レシオメトリー結果の統合を容易にするため、強度は手動で調整した。c, 間期細胞形態への影響の比較。F π CM または PK (緑) の青チャネルからのシグナル、および mCherry シグナルを示す。スケールバー：10 μm 。

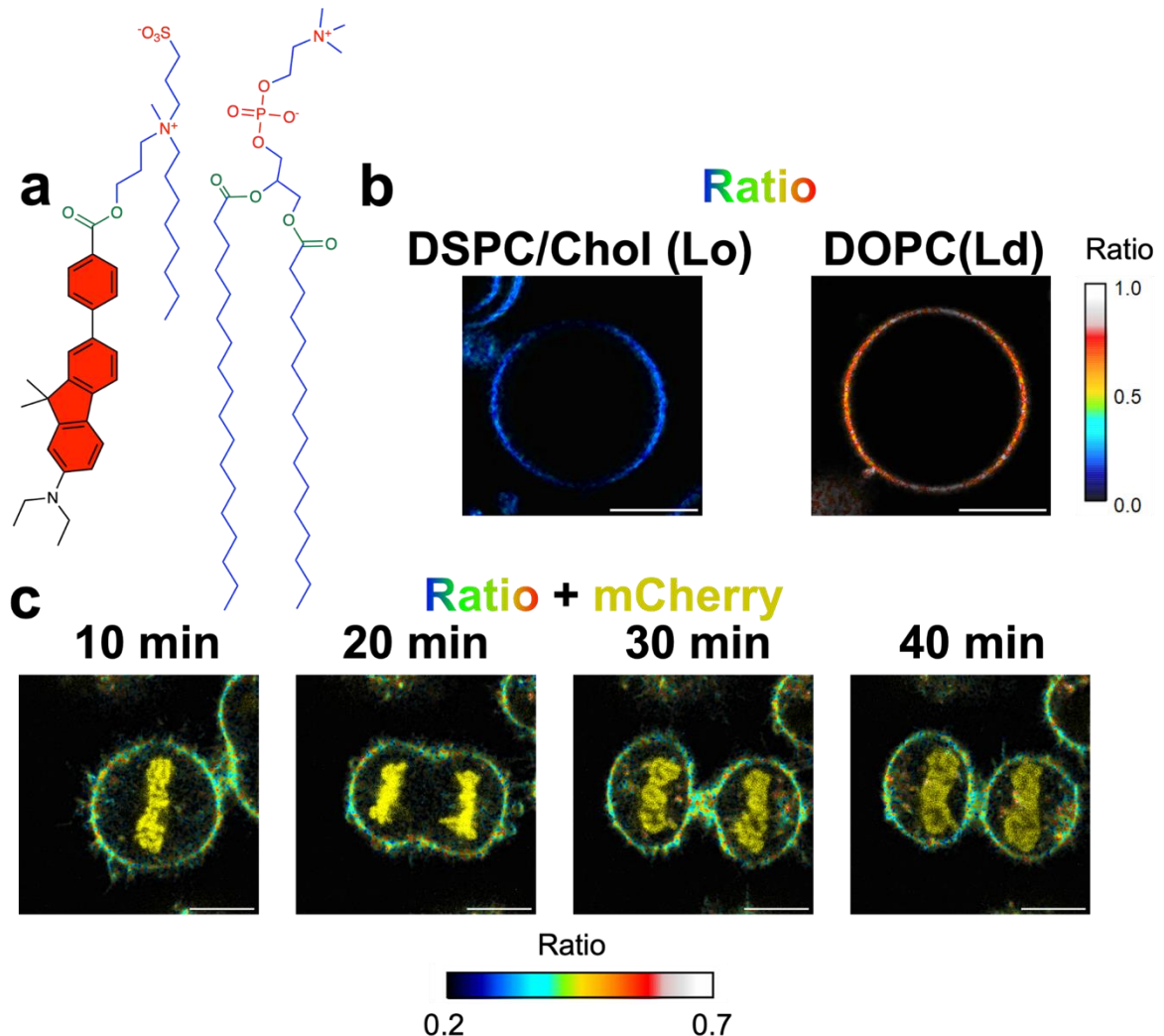


図 5. a, F π CM-SO3 の構造. b, F π CM-SO3 で染色した Lo 相 (左, DSPC:コレステロール=2:1) と Ld 相 (右, DOPC) の巨大一枚膜小胞 (GUV) のレシオメトリック画像。405 nm レーザー：2.8% (左) および 1.5% (右)。スケールバー：10 μm 。c, F π CM-SO3 で染色したヒストン 2B-mCherry を発現する HeLa 細胞のレシオメトリック画像を図 4b と同様に表示した。405 nm レーザー：1%、561 nm レーザー：1%。スケールバー：10 μm 。補足ビデオ 3 を参照。

3. 結論

我々は従来のソルバトクロミック色素の設計から逸脱し、安定性、発光特性、低細胞毒性を有する実用的な脂質膜プローブを開発した。重要な戦略として、エステル基をアクセプターとした、ドナー- π アクセプター型の ICT 蛍光色素を採用した。このエステル基は、アルキルカルボニル基よりも弱い電子求引性を持っている。しかし、適切な π 電子系骨格にエステル基を導入することで、アルキルカルボニル基に匹敵する蛍光ソルバトクロミック特性と優れた光

安定性を実現した。さらに、F π CM は高い構造安定性を示し、酸素雰囲気下で室温保存が可能であるため、酸素に弱いカルボニル化合物に比べて格段に取り扱いが容易である。適切な π 電子系骨格とエステル基の組み合わせは、ソルバトクロミック色素にとどまらず、今後、幅広い有機蛍光色素、ソフトマテリアル、有機-無機ハイブリッド材料への応用が期待される。

F π CM は生体親和性、光安定性、低毒性を有するため、生体細胞膜における脂質秩序の不均一性を非侵襲的、長期的に観察することが可能であり、様々な生命現象を研究することができる。細胞膜プローブを細胞内小器官に局在させる方法が確立されていることから^[30,31]、F π CM-SO₃ のような小器官特異的な F π CM 誘導体の作製は容易である。F π CM はソルバトクロミックプローブの応用に革命をもたらす可能性がある。なぜなら、F π CM は、従来のプローブを用いた断片化された画像やイメージング質量分析法でも得られなかった、膜の秩序不均質性の時間分解情報を捉えることができるからである。細胞外/細胞内刺激に応答した膜タンパク質の活性化と、時空間的な膜流動性遷移との相関を調べることは、未開拓の領域であり、多様な膜機能の根底にあるメカニズムの解明につながる。F π CM およびオルガネラ特異的誘導体を用いたライブイメージングは、従来の共焦点顕微鏡で容易に行えるため、膜秩序は、膜形態学と同様に、細胞生物学者にとって標準的で広く利用可能な情報源となる可能性がある。

キーワード:ソルバトクロミック蛍光色素、光安定性、膜プローブ、生物物理学、生物化学、生物学的手法、膜組織

4. 参考文献

- [1] a) S. J. Singer, G. L. Nicolson, *Science* **1972**, 175, 720. b) J. Ikenouchi, *Tissue Barriers* **2018**, 6, e1502531.
- [2] a) T. Harayama, H. Riezman, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, 19, 281. b) D. M. Owen, C. Rentero, A. Magenau, A. A-Siniyeh, K. Gaus, *Nature Protocols* **2012**, 7, 24. c) M. Tian, Y. Liu, Y. Sun, R. Zhang, R. Feng, G. Zhang, L. Guo, X. Li, X. Yu, J. Z. Sun, X. He, *Biomaterials* **2017**, 120, 46.
- [3] F. Lamar, F. Mochel, F. Sedel, J. M. Saudubray, *J. Inherit. Metab. Dis.* **2013**, 36, 411.
- [4] M. T. Snaebjornsson, S. Janaki-Raman, A. Schulze, *Cell Metab.* **2020**, 31, 52.
- [5] I. Levental, E. Lyman, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2023**, 24, 107.
- [6] K.R. Levental, M. Eric, J. L. Symons, Y-Y, Fan, R. S. Chapkin, R. Ernst, I. Levental, *Nat. Commun.* **2020**, 11, 1339.
- [7] a) K. Kajiwara, H. Osaki, S. Greßies, K. Kuwata, J. H. Kim, T. Gensch, Y. Sato, F. Glorius, S. Yamaguchi, M. Taki, *Nat. Commun.* **2022**, 13, 2533. b) M. Collot, S. Pfister, A. S. Klymchenko, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2022**, 69, 102161. c) H. Zhu, J. Du, X. Peng, *Acc. Chem. Res.* **2016**, 49, 2115. d) P. S. Sherin, I. López-Duarte, M. R. Dent, M. Kubánková, A. Vyšniauskas, J. A. Bull, E. S. Reshetnikova, A. S. Klymchenko, Y. P. Tsentlovich, M. K. Kuimova, *Chem. Sci.* **2018**, 8, 3523. e) Y. Niko, A. S. Klymchenko, *J. Biochem.* **2021**, 170, 163. f) A. Sharma, J. Sun, I. Singaram, A. Ralko, D. Lee, W. Cho, *ACS Chem. Biol.* **2020**, 15, 1913. g) V. V. Shyknkar, A. S. Klymchenko, C. Kunzelmann, G. Duportail, C. D. Muller, A. P. Demchenko, J-M. Freyssinet, Y. Mély. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 2187. h) O. A. Kucherak, S. Oncul, Z. Darwich, D. A. Yushchenko, Y. Arntz, P. Didier, Y. Mély, A. S. Klymchenko, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 4907. i) A. S. Klymchenko, *Acc. Chem. Res.* **2017**, 50, 366. j) S. Cao, X. Tian, M. Cao, J. Wang, G. Niu, B. Z. Tang, *Chem. Mater.* **2023**, 35, 2472. k) C-J. Wu, X-Y. Li, T. Zhu, M. Zhao, Z. Song,

- S. Li, G-G. Shan, G. Niu, *Anal. Chem.* **2022**, *94*, 3881. k) Y. Arita, S. Nishimura, R. Ishitsuka, T. Kishimoto, K. Ishii, M. Umeda, S. Matsunaga, T. Kobayashi, M. Yoshida, *Chem. Biol.* **2015**, *22*, 604.
- [8] G. Webber, F. J. Farris, *Biochemistry* **1979**, *18*, 3075.
- [9] O. A. Kucherak, P. Didier, Y. Mély, A. S. Klymchenko, *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 616.
- [10] a) Y. Niko, Y. Hiroshige, S. Kawauchi, G. Konishi, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 6177. b) Y. Niko, P. Didier, Y. Mély, G. Konishi, A. S. Klymchenko, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 18870. c) Y. Niko, S. Sasaki, S. Kawauchi, K. Tokumaru, G. Konishi, *Chem. Asian J.* **2014**, *9*, 1797.
- [11] S. K. Rajagopal, A. R. Mallia, M. Hariharan, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 28225.
- [12] Q. Zheng, M. F. Juette, S. Jockusch, M. R. Wasserman, Z. Zhou, R. B. Altman, S. C. Blanchard, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 1044.
- [13] N. Sakai, S. Matile, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 11438.
- [14] J. Valanciunaite, E. Kempf, H. Seki, D. I. Danylchuk, N. Peyriéras, Y. Niko, A. S. Klymchenko, *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 6512.
- [15] a) F. Liu, D. I. Danylchuk, B. Andreiuk, A. S. Klymchenko, *Chem. Sci.* **2022**, *13*, 3652. b) Q. Zheng, S. Jockusch, Z. Zhou, R. B. Altman, J. D. Warren, N. J. Turro, S. C. Blanchard, *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, *16*, 2200. c) Q. Zheng, L. D. Lavis, *Current Opinion in Chemical Biology* **2017**, *39*, 32. d) T. Imoto, M. Muramatsu, H. Miyasaka, S. Mizukami, K. Kikuchi, *Chem. Lett.* **2019**, *48*, 1181. e) K. Torii, Y. Hori, K. Kikuchi, *Anal. Chem.* **2023**, *95*, 8834. f) Q. Zheng, S. Jockusch, Z. Zhou, R. B. Altman, J. D. Warren, N. J. Turro, S. C. Blanchard, *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 2200.
- [16] C. Wang, A. Fukazawa, M. Taki, Y. Sato, T. Higashiyama, S. Yamaguchi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 15213.
- [17] S. Q. Xu, X. Y. Sie, J. I. Hsu, K. T. Tan, *Anal. Chem.* **2023**, *95*, 15549.
- [18] a) C. Spahn, J. B. Grimm, L. D. Lavis, M. Lampe, M. Heilemann, *Nano Lett.* **2019**, *19*, 500. b) A. D. Thompson, M. H. Omar, F. Rivera-Molina, Z. Xi, A. J. Koleske, D. K. Toomre, A. Schepartz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 10408.
- [19] P. Carravilla, A. Dasgupta, G. Zhurgenbayeva, D. I. Danylchuk, A. S. Klymchenko, E. Sezgin, C. Eggeling, *Biophysical Reports* **2021**, *1*, 10023.
- [20] a) Y. Niko, S. Kawauchi, G. Konishi, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 9760. b) Y. Niko, Y. Cho, S. Kawauchi, G. Konishi, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 36480. c) Y. Niko, S. Sasaki, K. Narushima, D. K. Sharma, M. Vacha, G. Konishi, *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 10794.
- [21] a) H. Kotaka, G. Konishi, K. Mizuno, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 181. b) M. A. miller, E. M. Sletten, *Org. Lett.* **2018**, *20*, 6850. c) A. Matsumoto, H. Adachi, I. Terashima, Y. Uesono, *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, 10471.
- [22] S. Kanezaki, H. Kawakami, S. Nagaoka, S. Kubota, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2003**, *14*, 469.
- [23] a) J. Shaya, F. F. Vivi, B. Y. Michel, A. Burger, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 10627. b) J. Shaya, P. R. Corridon, B. Al-Omari, A. Aoudi, A. Shunnar, M. I. H. Mohideen, A. Qurashi, B. Y. Michel, A. Burger, *J. Photochem. Photobiol. C* **2022**, *52*, 100529.
- [24] F. Babudri, G. M. Farina, F. Naso, R. Ragni, *Chem. Commun.* **2007**, 1003.
- [25] a) H. Lu, Y. Zheng, X. Zhao, L. Wang, S. Ma, X. Han, B. Xu, W. Tian, H. Gao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 155. b) Y. Li, J-J. Liang, H-C. Li, L-S. Cui, M-K. Fung, S. Barlow, S. R. Marder, C. Adachi, Z-Q. Jiang, L-S. Liao, *J. Mater. Chem. C* **2018**, *6*, 5536. c) S. Kothavale, W. J. Chung, J. Y. Lee, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 18730.
- [25] a) J. V. Caspar, T. J. Meyer, *J. Phys. Chem. A* **1983**, *87*, 952. b) J. Shaya, M. Collot, F. Bénailly, N. Mahmoud, Y. Mély, B. Y. Michel, A. S. Klymchenko, A. Burger, *ACS. Chem. Bio.* **2017**, *12*, 3022. c) Q. Qiu, P. Xu, Y. Zhu, J. Yu, M. Wei, W. Xi, H. Feng, J. Chen, Z. Qian, *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 15983. d) R. Miao, J. Li, C. Wang, X. Jiamg, Y. Gao, X. Liu, D. Wang, X. Li, X. Liu, Y. Fang, *Adv. Sci.* **2022**, *9*, 2104609. e) Y. Zhang, D. Li, J. Yu, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 2710.

- [26] T. Chen, Z-Q. Chen, W-L. Gong, C. Li, M-Q. Zhu, *Mater. Chem. Front.* **2017**, *1*, 1841.
- [27] K. Inoue, R. Kawakami, M. Murakami, T. Nakayama, S. Yamamoto, K. Inoue, T. Tsuda, K. Sayama, T. Imamura, D. Kaneno, S. Hadano, S. Watanabe, Y. Niko, *J. Mater. Chem. B* **2022**, *10*, 1641.
- [28] a) D. I. Danylchuk, S. Moon, K. Xu, A. S. Klymchenko, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 14920. b) K. Aoki, S. Sato, S. Harada, S. Uchida, Y. Iwasa, J. Ikenouchi, *Mol. Biol. Cell.* **2020**, *31*, 833. c) K. Aoki, S. S. Harada, S. Uchida, J. Ikenouchi, *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 480.
- [29] a) H. Shi, R. T. K. Kwok, J. Liu, B. Xing, B. Z. Tang, B. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *43*, 17972. b) D. I. Danylchuk, P. H. Jouard, A. S. Klymchenko, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 912. c) C. W. T. Leung, Y. Hong, S. Chen, E. Zhao, J. W. Y. Lam, B. Z. Tang, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 62. d) S. Chen, Y. Hong, Y. Zeng, Q. Sun, Y. Liu, E. Zhao, G. Bai, J. Qu, J. Hao, B. Z. Tang, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 4315.
- [30] a) X-X. Chen, F. Bayard, N. Genzalez-Sanchis, K. K. P. Pamungkas, N. Sakai, S. Matile, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62*, e202217868. b) W. Xu, Z. Zeng, J-H. Jiang, Y-T, Chang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 13658.
- [31] a) A. Colom, E. Derivery, S. Soleimanpour, C. Tomba, M. D. Molin, N. Sakai, M. González-Gaitán, S. Matile, A. Roux, *Nature Chem.* **2018**, *10*, 1118. b) K. Straková, J. L-Andarias, N. J-Pojo, J. E. Chambers, S. J. Marciniak, H. Riezman, N. Sakai, S. Matile, *ACS Cent. Sci.* **2020**, *6*, 1376. c) H. Wang, Q. Li, P. Alam, H. Bai, V. Bhalla, M. R. Bryce, M. Cao, C. Chen, S. Chen, X. Chen, Y. Chen, Z. Chen, D. Dang, D. Ding, S. Ding, Y. Duo, M. Gao, W. He, X. He, X. Hong, Y. Hong, J.-J. Hu, R. Hu, X. Huang, T. D. James, X. Jiang, G. Konishi, R. T. K. Kwok, J. W. Y. Lam, C. Li, H. Li, K. Li, N. Li, W.-J. Li, Y. Li, X.-J. Liang, Y. Liang, B. Liu, G. Liu, X. Liu, X. Lou, X.-Y. Lou, L. Luo, P. R. McGonigal, Z.-W. Mao, G. Niu, T. C. Owyong, A. Pucci, J. Qian, A. Qin, Z. Qiu, A. L. Rogach, B. Situ, K. Tanaka, Y. Tang, B. Wang, D. Wang, J. Wang, W. Wang, W.-X. Wang, W.-J. Wang, X. Wang, Y.-F. Wang, S. Wu, Y. Wu, Y. Xiong, R. Xu, C. Yan, S. Yan, H.-B. Yang, L.-L. Yang, M. Yang, Y.-W. Yang, J. Yoon, S.-Q. Zang, J. Zhang, P. Zhang, T. Zhang, X. Zhang, X. Zhang, N. Zhao, Z. Zhao, J. Zheng, L. Zheng, Z. Zheng, M.-Q. Zhu, W.-H. Zhu, H. Zou, B. Z. Tang, *ACS Nano* **2023**, *17*, 14347.