

## 審査の結果の要旨

氏名 瀬月内 健一

活性酸素種 (ROS) は炎症、老化、動脈硬化といった各種疾患や情報伝達系への関与が示唆されており注目を集めている小分子群である。ROS の生体内での役割を明らかにするために ESR 法、吸光法、蛍光法、化学発光法等種々の検出法が開発されてきた。この中でも蛍光法は感度良く検出できる、蛍光顕微鏡の普及により実験が簡便に行えるといった理由によりよく用いられる優れた検出法である。そのため、2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) をはじめとする ROS 蛍光プローブがこれまでに数種開発されてきた。しかしながら、これら既存の ROS 蛍光プローブは ROS 間での選択性がない、光による自動酸化に対して極めて弱いという致命的な問題点を抱えており実用性に乏しかった。そのため、これらの問題点を克服した新規 ROS 蛍光プローブの開発が待ち望まれていた。瀬月内健一君は、上記問題点を克服した蛍光プローブの開発を目指した研究を行い、二種の新規 ROS 蛍光プローブ HPF、APF の開発に成功した。以下、論文内容を簡単に概説する。

ある分子を選択的に検出する蛍光プローブを開発するためには、その分子と選択的に起こる化学反応の前後で蛍光特性が大きく変わるようにデザインする必要がある。

瀬月内君は、蛍光物質 fluorescein の 6'-位の

phenol 性水酸基を電子密度の高い phenyl 基で保護することにより蛍光量子収率を大きく

下げることができることを見出した。そこで、この 6'-O-arylfluorescein の蛍光特性と ROS の中でも $\cdot\text{OH}$  や peroxidase 酸化活性種等の酸化力の強い ROS (hROS) でのみ進行し、 $\text{O}_2^-$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$  のようなその他の ROS では進行しない aryloxyphenol 類の ipso 置換反応の二点を組み合わせて新規 ROS 蛍光プローブ HPF、APF をデザイン、合成した (Figure 1)。HPF、APF は fluorescein の 6'-位の水酸基が電子密度の高い hydroxyphenyl 基、aminophenyl 基で保護されているのでほぼ無蛍光であるが、hROS 選択的に置換 phenyl 基が脱保護され、強い蛍光を有する fluorescein を生成することを検出原理とするものである。

開発した HPF、APF の ROS との反応性を最も広く用いられている既存の ROS 蛍光プローブ DCFH と比較したところ (Table 1)、DCFH は全ての ROS に対して反応性を有するのに対して、HPF では $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{ONOO}^-$ と、APF では $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{ONOO}^-$ 、 $\text{OCl}^-$  と反応して蛍光強度が増大したが、その他の ROS では蛍光強度が変わらなかった。従って、HPF、APF は ROS 間での選択性に欠けるといった既存の ROS 蛍光プローブの問題点を克服していた。さらに、HPF と APF を併用することに

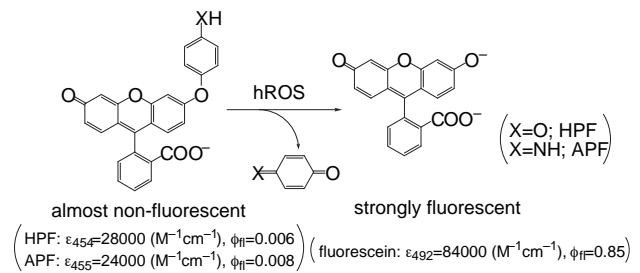


Figure 1. Scheme of O-dearylation reaction of HPF and APF with hROS.  $\epsilon$  means the molar absorptivity, and  $\phi_{fl}$  means the relative quantum efficiency of fluorescence.

より $\cdot\text{OCl}$  を選択的に検出可能であることがわかった。また、DCFH では光により容易に自動酸化され顕著な蛍光増大が起こったが、HPF、APF では全く蛍光増大が起こらなかった。このように、HPF、APF は光による自動酸化に対して弱いという既存の ROS 蛍光プローブの問題点を克服しており、高い信頼性をもって hROS を検出できる ROS 蛍光プローブであることが示された。

Table 1. Fluorescence increase of HPF, APF and DCFH in various ROS-generating systems.<sup>a</sup>

ROS	HPF	APF	DCFH
$\cdot\text{OH}^b$	730	1200	7400
$\text{ONOO}^{-c}$	120	560	6600
$\cdot\text{OCl}^d$	6	3600	86
$^1\text{O}_2^e$	5	9	26
$\text{O}_2^{-f}$	8	6	67
$\text{H}_2\text{O}_2^g$	2	<1	190
$\text{NO}^h$	6	<1	150
$\text{ROO}^i$	17	2	710
Autoxidation <sup>j</sup>	<1	<1	2000

<sup>a</sup> Dyes (final 10  $\mu\text{M}$ ; 0.1 % DMF as a cosolvent) were added to sodium phosphate buffer (0.1 M; pH 7.4). The fluorescence intensities of HPF, APF and DCFH were measured at 515, 515, 520 nm with excitation at 490, 490 and 500 nm, respectively. DCFH was obtained by the hydrolysis of DCFH-DA with base. <sup>b</sup> Ferrous perchlorate (100  $\mu\text{M}$ ) and  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM) were added at room temperature. <sup>c</sup>  $\text{ONOO}^-$  (final 3  $\mu\text{M}$ ) was added at 37 °C. <sup>d</sup>  $\text{NaOCl}$  (final 3  $\mu\text{M}$ ) was added at 37 °C. <sup>e</sup> EP-1 (100  $\mu\text{M}$ ) was added and the mixtures were stirred at 37 °C for 30 min. <sup>f</sup>  $\text{KO}_2$  (100  $\mu\text{M}$ ) was added and the mixtures were stirred at 37 °C for 30 min. <sup>g</sup>  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100  $\mu\text{M}$ ) was added and the mixtures were stirred at 37 °C for 30 min. <sup>h</sup>  $\text{NOCl}_3$  (100  $\mu\text{M}$ ) was added and the mixtures were stirred at 37 °C for 30 min. <sup>i</sup> AAPH (100  $\mu\text{M}$ ) was added and the mixtures were stirred at 37 °C for 30 min. <sup>j</sup> Dye solutions were placed under a fluorescent lamp for 2.5 hr.

次に HPF、APF をブタ好中球に load し、NADPH oxidase を活性化する PMA で好中球を刺激した時の細胞内蛍光変化を共焦点顕微鏡で観察した。その結果、HPF を load した好中球に比べ、APF を load した好中球では顕著な蛍光増大が見られ、かつその蛍光増大は顆粒状であった。HPF、APF の化学反応性からこの蛍光増大は $\cdot\text{OCl}$  によると考えられ、世界で初めて $\cdot\text{OCl}$  の生成を時空間的に可視化することに成功した。さらに両プローブの種選択性の高さを生かすことで、 $\text{O}_2^-$  と CAT が協調して酸化ストレスを増悪させる事実を見いだした。この結果は、 $\text{O}_2^-$  が  $\text{H}_2\text{O}_2$  生成のための単なる前駆体ではなく、CAT や xanthine oxidase 等の酵素により酸化力の強い活性種に変換されることにより生体内で重要な役割を果たしていること、SOD が抗酸化酵素 CAT による  $\text{O}_2^-$  の毒性を抑える重要な役割を担っていることを強く示唆するものであり、酸化ストレスとその消去酵素の概念に一石を投じる重要な知見である。

以上のように瀬月内健一君の研究は、全く新しい機能を持つ蛍光プローブの開発という化学的な側面と、この応用による酸化ストレス分野での新たな発見という生物学的な側面を合わせ持ち、さらに関連分野への波及効果も大きく、薬学研究に寄与するところも大きい。よって博士(薬学)の学位を授与するに値すると判断した。