

審査の結果の要旨

氏名 正田 卓司

正田は生体への応用を目的とした多種類の蛍光プローブ開発研究を行った。具体的には、細胞内で重要な生理機能を担っている Mg^{2+} 、有用な蛍光プローブが報告されていない Cu^+ 、およびタンパク質を特異的にラベル化できる機能性蛍光プローブの開発を行った。

1. Mg^{2+} 蛍光プローブのデザイン・合成

細胞内で Mg^{2+} は高濃度（約 10^{-3} M）で存在し、その機能はタンパク質、核酸、膜等の構造安定化、酵素活性の発現、イオンチャネルの制御等多岐にわたる。しかし遊離の Mg^{2+} （ 10^{-4} ~ 10^{-3} M）の詳細な動態については不明な点が多い。これまでのイメージングはプローブとしてAPTRA（*o*-aminophenol-*N,N,O*-triacetic acid）をキレーター構造に持つmagfura-2等を用いて行われてきたが、 Ca^{2+} に対する親和性が高く、 Mg^{2+} のイメージングには適切ではない。選択的かつ実用的な Mg^{2+} 蛍光プローブの開発が求められていた。

本研究ではキレーターとして β -ケト酸を選択した。このキレーターを蛍光プローブに組み込むことで細胞内における Mg^{2+} を検出する際に、細胞内に低濃度で存在する Ca^{2+} による影響は受けないと考えられる。まず、クマリン骨格に β -ケト酸を組み込んだ蛍光プローブを合成した。この蛍光特性を検討した結果、 Mg^{2+} に対して Ca^{2+} よりも高い親和性を有することが示された。

次に長波長励起が可能なフルオレセインを蛍光団とした Mg^{2+} 蛍光プローブ（2'-CF）の開発を行った。フルオレセインのカルボニル基に着目し、その*o*-位にカルボキシル基を導入した。蛍光特性を検討した結果、 Ca^{2+} に比べて Mg^{2+} に対する親和性が10倍以上高いことが示された。細胞内における Ca^{2+} 濃度は 10^{-9} ~ 10^{-4} Mであることから、2'-CFは細胞内における Mg^{2+} を選択的に検出できることが明らかとなった。

2. 蛍光強度増加型銅イオン蛍光プローブのデザイン・合成

重金属イオンを検出する蛍光プローブの多くは金属イオン添加によって消光（蛍光の消失）する。この消光機構の原因にはエネルギー移動、電子移動、スピン-軌道相互作用などが考えられている。しかしながら、 Zn^{2+} や Cd^{2+} は最外殻 d 軌道が閉殻であるため上述の金属イオンに由来する消光原因の寄与は小さい。本研究では Cu^+ も同じく最外殻 d 軌道が閉殻であることに着目し、PeTを蛍光制御原理とした蛍光プローブTXsのデザイン・合成を行った。

TXsは蛍光団にフルオレセイン、金属イオン配位部位に Cu^+ の選択的配位子を有し、 Cu^+ が配位することで蛍光強度が増加するようにデザインされたものである。TXsを合成し、その蛍光特性を検討した結果、TXsは水系溶媒中、可視光による励起が可能な蛍光強度増加型銅イオン蛍光プローブとして機能することが明らかになった。

3. タンパク質を高感度かつ特異的にラベル化可能な機能性蛍光プローブの開発

生きたままの状態では細胞や組織中のタンパク質の局在や動的挙動を直接イメージングすることは、タンパク質の生理機能を解明する上で極めて重要である。従来、GFPとの融合タンパク質を用いる手法がとられてきたが、GFP自身のサイズや蛍光団形成のタイムラグ、

さらには目的タンパク質の挙動を正確に追跡できないなどの問題があった。そこでタグとなる小分子ペプチドと反応して、蛍光を発するプローブの開発を計画した。

タンパク質との反応点としてマレイミド基を有する蛍光ラベル化試薬に着目した。この試薬の蛍光強度は SH 基との反応後、大きく増加するが、その発蛍光メカニズムは不明であった。正田はマレイミド基の有する消光能は PeT によるものであると考え、量子化学計算および還元電位の測定を行ったところ、PeT が起こりうることを示す結果を得た。すなわちマレイミド基を有する蛍光ラベル化試薬は電子受容能の高い二重結合が SH 基と反応することで電子受容能の低い反応付加物へと変化し、その結果 PeT が解消され、蛍光強度が大きく増加したと考えられる。

この原理に基づき、より効率の良い蛍光ラベル化プローブの開発を行った。水溶液中で蛍光量子収率 (~ 0.9) の高い 7-hydroxycoumarin を蛍光団としたマレイミド基を有する化合物を数種類合成し、光学特性を検討したところ、Cys の添加前では蛍光を発せず、添加後に蛍光量子収率が劇的に増加 ($\Phi = 0.02 \rightarrow 0.75$) することを見出した。この結果を踏まえて次にペプチドとの選択性を高めるデザインを行った。具体的には分子内に反応点であるマレイミド基を 2 箇所有する多点認識方式を採用した。合成した CcnCM2 は分子内に SH 基を 2 個有するペプチドに対して速やかに反応し、蛍光強度の増加が示された。以上、マレイミド基を有する蛍光ラベル化試薬のデザインとして PeT 原理による蛍光制御が可能であることを明らかにし、それに基づいた蛍光ラベル化プローブの開発に成功した。

正田は生体中の機能性分子をイメージングできる 3 種類の新規機能性蛍光プローブの開発を行った。蛍光団の pH 依存的な変化を利用した Mg^{2+} 蛍光プローブは選択性が高く、細胞内における Mg^{2+} を検出することが可能であった。続いて、PeT を蛍光制御のメカニズムとした Cu^{+} 応答性蛍光強度増加型の Cu^{+} 蛍光プローブの開発に成功した。更に、タンパク質ラベル化プローブについては、マレイミド基による蛍光ラベル化試薬の蛍光消光メカニズムに PeT が関与していることを明らかにし、その原理を応用することで、多点認識を利用した CcnCM2 の開発に成功した。これらの成果の薬学研究に対する寄与は大きく、博士(薬学)の業績にふさわしいものと評価できる。