

## 審査の結果の要旨

氏名 花岡 健二郎

La (ランタン) から Lu (ルテチウム) までの希土類元素であるランタノイドは、その3価イオンの外側電子配置はすべて  $5s^2 5p^6$  で同じであり、その内側に4f軌道がある。この4f軌道の不完全な電子配置が、希土類元素の特徴的な性質の根元と考えられている。花岡はこのような希土類金属錯体が有する特性を医療や生命科学研究へ応用することを目的に(1)新規機能性MRI造影剤と(2)新規長寿命蛍光プローブの開発を行った。

### 1. $\beta$ -galactosidase 応答性 MRI プローブ

光(電磁波)の個体内イメージング技術への応用の1つである Magnetic Resonance Imaging (MRI) は、磁場中の原子核や電子が特定の周波数の電波のエネルギーを吸収する Nuclear Magnetic Resonance (NMR) 現象を用いて生体の断層画像を得る方法である。

$\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) はレポーター遺伝子として汎用されており、このレポーター遺伝子の発現を個体レベルでイメージングすることは、医学や生化学の分野で極めて意義ある技術となると考えられる。そこで、今回 $\beta$ -galの酵素活性を認識して水溶液の縦緩和時間( $T_1$ )を短縮し、それによってMR信号を高める新たな機能性MRIプローブのデザイン・合成を試みた。この $T_1$ の短縮は、MRIにより $T_1$ 強調画像として撮影することでMR信号強度の増大としてイメージングできる。このような個体での生体内イメージングを可能とする機能性MRIプローブの開発研究は世界において緒についたばかりであり、実際に生体内イメージングに成功した機能性MRIプローブはほとんど報告されていない。

ガドリニウムイオン( $Gd^{3+}$ )は7個の対電子を持つため、非常に大きなスピン磁気モーメントを示す。そのため、プロトンに与える磁気効果が大きく、プロトンの $T_1$ を大きく短縮する。それにより、 $Gd^{3+}$ 錯体はMRI造影剤として汎用されている。今回、 $\beta$ -gal活性を検出する新たなMRIプローブのデザインとして Receptor Induced Magnetization Enhancement (RIME) 現象に着目した。RIME現象とは、 $Gd^{3+}$ 錯体が albumin などの巨大分子と結合することで分子回転が非常に遅くなり、その結果として周囲の水分子に対し大きなプロトンの $T_1$ の短縮を引き起こす現象である。この $T_1$ の短縮がMR信号強度の増大へとつながる。

この考えに基づき検討した結果、galactopyranosyl基の高い極性に着目し、 $\beta$ -galの酵素活性により $T_1$ が短縮しMR信号が変化する機能性MRIプローブの開発に成功した。このプローブは更なる改良によって、生物学研究などにおいて有用な機能性MRIプローブの開発につながると考えられる。

### 2. 長寿命 $Zn^{2+}$ 蛍光プローブ

蛍光ユウロピウムイオン( $Eu^{3+}$ )錯体の特徴として、通常の生体成分の蛍光寿命はナノ秒オーダーであるのに対し、蛍光寿命が長いこと(サブミリ秒)があげられる。そのため、 $Eu^{3+}$ 錯体を利用した時間分解蛍光イムノアッセイ (Time-Resolved Fluoroimmunoassay: TRFIA) 法は、他の蛍光性化合物の蛍光を高効率で分離し、高いS/N比を得ることを可能とする。TRFIA法とは、パルス励起光から蛍光測定を行うまでの蛍光を測定しない時間 (Delay time, 数 10  $\mu$ sec) と、そのDelay Timeの後に数 100  $\mu$ secの蛍光を測定する時間 (Gate Time) とを合わせることで、バックグラウンド蛍光を取り除き $Eu^{3+}$ の蛍光のみを検出する方法である。この測定法は、測定感度はラジオイムノアッセイの検出感度と同程度にまで達する。本研究では、生体分子との反応で蛍光強度が大きく変化する機能性蛍光 $Eu^{3+}$ 錯体の開発を行い、これを用いて生

物試料で時間分解蛍光イメージングを行うことを目的とする。このような研究は未だ報告例がなく、蛍光顕微鏡に応用することで、TRFIA法と同様な高いS/N比が得られると期待される。

$\text{Eu}^{3+}$ はそれ自身では蛍光が弱く、適切なchromophoreをもつ配位子と錯体化させることで、その蛍光強度を強めることができる。時間分解蛍光顕微鏡への応用を目指した蛍光 $\text{Eu}^{3+}$ 錯体の開発にあたり、chromophoreとしてquinoline構造に着目した。Quinoline構造の利点としては、(1)  $\text{Eu}^{3+}$ に効率良くエネルギー移動を起こし、(2) 比較的長波長励起が可能であり、(3)合成的に多種の置換基の導入が可能であることなどがあげられる。そこでまず、quinoline構造をchromophoreの基本骨格とした $\text{Eu}^{3+}$ 錯体群をデザイン・合成し、それらの分光学的性質を調べた。さらにこれまでの知見を基に、 $\text{Zn}^{2+}$ 長寿命蛍光プローブをデザイン・合成した。遊離の $\text{Zn}^{2+}$ は細胞内や組織内での動態、作用機序が近年注目されている生体内分子である。

さらに、独自に時間分解顕微鏡を立ち上げ、まず時間分解蛍光イメージングが可能であることを確かめた。新規蛍光 $\text{Eu}^{3+}$ 錯体をHeLa細胞にマイクロインジェクションし、時間分解して蛍光イメージングを行ったところ、細胞由来の自家蛍光を取り除くことができた。開発したプローブをHeLa細胞に応用し、この時間分解蛍光顕微鏡を用いて細胞内 $\text{Zn}^{2+}$ 濃度の時間分解蛍光イメージングを行った。その結果、バックグラウンド蛍光を低く抑え、高い精度で細胞内 $\text{Zn}^{2+}$ 濃度変化を検出することに成功した。本研究により、 $\text{Eu}^{3+}$ 錯体を用いた時間分解蛍光イメージングを行うことで低いノイズレベルでイメージング解析が可能であることを示すことに成功した。

本研究において、希土類金属錯体の配位子をデザインすることで、生理活性分子を認識する機能性MRIプローブおよび長寿命蛍光プローブの開発が可能であることを示した。これらの化合物は生体や生細胞への応用の可能性を持ち、今後、臨床の分野においては画像診断薬として、生化学の分野においては高感度イメージング試薬としての可能性を持っている。これらの成果は薬学における顕著な業績として、高く評価でき、博士(薬学)に値するものと判断できる。