

## 審査の結果の要旨

氏名 上野 匡

蛍光プローブとは、標的分子との反応により蛍光強度等の蛍光特性が変化する機能化された蛍光色素である。これを用いたバイオイメージング法は、細胞内に存在する生理活性物質の時空間的な挙動とその生理的な役割の理解を深めるため、極めて有用な手段である。

一般的に「ニトロ基は蛍光団にとって特殊な消光基であり、ニトロ基を構造中に有するものは蛍光性を持たない」とされているがその機構は明らかになっていない。本研究では電子吸引性基を持つ低蛍光性の誘導体に着目し、この消光機構を解明していくことで、新たな蛍光特性の制御原理・蛍光プローブの設計手法を確立することを目標に研究を行った。本研究ではさらに、得られた知見を応用し、生体分子の酸化・ニトロ化を引き起こす高反応性活性窒素種である peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) を高選択的に検出することが可能な蛍光プローブを開発した。

本研究ではまず、当研究室で合成中間体として得られてきた化合物のうち、benzene moiety に電子吸引性基を有するフルオレセイン誘導体に着目し分光学的特性の検討を行った。その結果、ニトロ基以外の電子吸引性の官能基が benzene moiety に導入された場合にも  $\Phi_{fl}$  の低下が起こるという事実から、この現象が励起蛍光団からの電子移動 (donor excited PeT: d-PeT) によって説明できると考え、この作業仮説を証明する実験を行った。具体的には、電子吸引性の官能基を benzene moiety に導入したフルオレセイン誘導体を種々合成し、benzene moiety の還元電位 ( $E_{red}$ ) と  $\Phi_{fl}$  の相関を検証した。その結果、ニトロフルオレセインの消光機構が励起蛍光団からの電子移動であることが示唆された。

続いて電子受容性の高い化合物と BODIPY との間の分子間消光定数 ( $k_q$ ) の比較を行った結果、ニトロ基は蛍光団に対して特殊な消光基として機能しておらず、消光が d-PeT によってのみ起こっていることが示された。さらにこの消光機構において d-PeT が存在することを直接証明するため、PeT により形成される電荷分離状態の観測を ESR および flash photolysis 法を用いて試みた。その結果、電荷分離状態が観測され、

benzene moiety に電子吸引性基を有する化合物は、励起蛍光団からの電子移動過程 (d-PeT) により消光していることが証明された。

さらに、精緻な分子設計により、ニトロ基を分子内に有しつつ、かつ高蛍光性となる nitroBODIPY の開発に成功した。以上から、ニトロ基の消光過程には特殊な機構は存在せず、ニトロ基が benzene moiety の電子受容性を高めた結果引き起こされる励起蛍光団からの電子移動であることを実証した。

続いてこれまでの知見を応用し、 $\text{ONOO}^-$  を高選択的に検出可能な蛍光プローブの開発を行った。 $\text{ONOO}^-$  は生体内において Superoxide ( $\text{O}_2^-$ ) と Nitric Oxide (NO) との反応によって形成され、酸化ストレス増悪、DNA の損傷、膜障害、タンパク質の損傷を引き起こす活性種である。炎症性疾患部位においては、NO と  $\text{O}_2^-$  が共誘導されることが知られており、これらは拡散律速で  $\text{ONOO}^-$  へ変化し、生体成分の酸化・ニトロ化をもたらす。 $\text{ONOO}^-$  は様々な病理的な生体環境においてその働きが注目されており、 $\text{ONOO}^-$  等の分子を高選択的に検出する手法の開発は  $\text{ONOO}^-$  の生体内における発生・消失のメカニズムやその役割を解明する上で極めて重要な課題である。本研究では  $\text{ONOO}^-$  を高選択的に検出するための蛍光プローブの開発を行った。 $\text{ONOO}^-$  が活性種の中でも分子のニトロ化をもたらすという希な性質を有していることに着目し、ニトロ化されることで高蛍光性となる分子は、 $\text{ONOO}^-$  を高選択的に検出可能であると考え、このような分子の設計を行った。ニトロ化されることで高蛍光性となる分子を開発するにあたり、本研究ではニトロ基の強い電子吸引性を利用し、benzene moiety がニトロ化されることで、これからの電子移動 (a-PeT) を解除するプローブの設計を行った。

種々検討の結果、他の活性種の添加では全く蛍光強度が増加せず、 $\text{ONOO}^-$  を高選択的に検出できるプローブの開発に成功した。 $\text{ONOO}^-$  を高選択的に区別し、蛍光の増大によって検出できる蛍光プローブはこれまで開発されておらず、本プローブは生体内における  $\text{ONOO}^-$  の挙動・役割をより深く理解する上で有用なツールとなる。

以上の結果は、薬学研究において大きな学問的寄与があり、博士(薬学)の学位に値するものと認めた。