

審査の結果の要旨

氏名 我部 有

活性窒素種 (RNS) は酸化ストレスを引き起こし種々の疾患、病態に関与する一方、生命活動に必須な情報伝達の役割も担っているといわれている。一酸化窒素 (NO) は RNS の中核を担う二原子分子であり、酸素分子や活性酸素種と反応し多くの活性種を生成する。また NO 自身にも 3 つのレドックス種 (NO ラジカル、NO⁺、NO⁻) が存在しているが、反応性が高く生体内で不安定であることから各々の機能は不透明な部分が多い。蛍光バイオイメージング法は検出対象分子を時空間的に制御した条件で観測できることから RNS 研究において非常に有効な手法の一つであるといえる。そのため、これらの活性種を区別して検出できる実用的な蛍光プローブの開発が待ち望まれている。我部君はこのような中、既存の NO⁺プローブよりもさらに高感度の蛍光プローブの開発、及び NO⁻を蛍光プローブを用いて検知する手法の確立を目指し、研究に着手した。

1. 高感度 NO⁺蛍光プローブの分子設計と応用

NO は主に生体内で酸素による酸化を受け、N₂O₃ を中間体として生成する。N₂O₃ は NO⁺ を供与できる強力なニトロソ化試薬であり、S-ニトロソ化など様々な生体反応に関わっているが、詳細な機能解明までには至っていない。薬品代謝化学教室ではこれまでに、NO⁺の検出プローブとして fluorescein を母核とする DAF 類を開発し、また我部君自身も修士課程において、BODIPY を蛍光骨格とする高感度 NO⁺蛍光プローブ DAMBO 類を開発した。DAMBO は光誘起電子移動 (PeT) の原理に基づいて蛍光の off/on が制御され、DAF-2 に比べて約 5 倍感度良く NO⁺と反応することが示された。しかし、生体内ではチオールなどの NO⁺と反応する分子種が高濃度に存在するため、より高感度で実用的なプローブの開発が重要となる。

DAMBO を更に高感度化するには、NO⁺との反応性を上昇させる、生成物であるトリアゾール体の蛍光量子収率を上昇させる、という 2 つの戦略が考えられる。NO⁺との反応性は反応部位の電子密度に依存しており、また 8 位のベンゼン環の回転を抑制することで蛍光量子収率が高くなることから、この 2 つを同時に満たすプローブとして反応部位である *o*-phenylenediamine 部位に電子供与性のメトキシ基を導入した MAMBO をデザイン、合成した。MAMBO は NO⁺と反応するとトリアゾール体 (MAMBO-T) を生成し、蛍光量子収率が劇的に変化した ($\phi < 0.001 \rightarrow 0.47$)。反応性も、DAF-2 に比べ約 15 倍、DAMBO に比べ約 3 倍高いことがわかった。しかし、MAMBO-T は pH > 9 以降でほとんど消光してしまうことも同時に明らかとなった。その原因を検討した結果、ベンゾトリアゾール部の脱プロトン化によって起こった PeT による消光機構であることが明らかになった。この問題を克服するためには、蛍光団側の電子受容能を低下させ PeT を抑制する方法が考えられる。BODIPY 骨格の 2,6 位に電子供与性基を導入した

だけでは塩基性側の蛍光強度はほとんど回復しなかったので、BODIPY の新たな構造修飾部位として 4 位のフッ素に着目した。フッ素を 2 つメトキシ基に置換すると、BODIPY の分光学的性質をほとんど変えずに酸化電位、還元電位だけを共に約 -0.2 V シフトさせることがわかった。

そこで、MAMBO を最適化した構造として 4 位にメトキシ基を、2,6 位にカルボキシルエチル基を導入した MAMBOO- P^{H} ($\phi=0.005$) をデザイン、合成した。MAMBOO- P^{H} は NO^+ と反応すると MAMBOO- $\text{P}^{\text{H}}\text{-T}$ ($\phi=0.68$) を生成し、pH 4~12 の範囲で十分な強度の蛍光を発することが示され、BODIPY 骨格の 4 位置換も PeT 過程の精密制御に有用であることが初めて明らかとなった。

BODIPY は中性分子であるため細胞内では疎水的環境に存在すると予想される。実際、DAMBO 類の細胞内局在を調べたところ、ゴルジ体をはじめとする疎水性部位に局在することがわかった。これは細胞質局在性プローブの DAF 類と大きく異なる点である。NO や酸素も中性分子のため疎水的環境に高濃度で存在し、その反応生成物である N_2O_3 も高濃度で働いていると予想される。DAMBO 類が疎水的環境下で蛍光プローブとして機能するかどうか確かめるため細胞外から NO 放出剤を添加したところ、蛍光の上昇が見られた。DAF-2 DA の場合は NO^+ と反応すると細胞外の蛍光も大きく上昇していくのに比べ、DAMBO 類では生成したトリアゾール体は細胞外に漏れにくい性質を持つことが明らかとなった。

次に、ウシ大動脈血管内皮細胞より産生される生理的 NO を捉えるために高感度プローブである MAMBO を用いてイメージングを試みたところ、Bradykinin 刺激により素早い蛍光の上昇が見られた。NO 合成酵素阻害剤である L-NAME で蛍光上昇が見られなかったことと光学異性体の D-NAME で阻害がかからなかったことから、確かに内因性の NO を捉えていることが示唆された。細胞質局在性の DAF 類でも細胞内での蛍光上昇が見られたが、細胞外の蛍光も同時に上昇した。このように MAMBO は細胞内を高い S/N 比でイメージングできるとともに、漏れにくい性質から細胞内外を区別して NO の挙動を観察できる利点を有している。また、MAMBO に目立った細胞毒性のないことも確認している。

BODIPY を蛍光団とした実用的蛍光プローブの報告はほとんど無く、MAMBO は疎水性部位に局在する実用的な蛍光プローブであることが示された。MAMBO は様々な細胞系に応用可能であり、親水性プローブと組み合わせて用いることで、局在という概念を含んだ NO^+ の新たな知見を得ることができると期待される。

2. 蛍光法による HNO の検出

HNO は NO の 1 電子還元種であり、反応性が高く生体内では速やかに代謝される。HNO の研究は、徐放剤である Angeli s salt ($\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$) を用いたものと、生体内での N_2O の検出を根拠に議論されているが、HNO がどのような形で生体に作用しているかはほとんどわかっていない。そこでまず、HNO を選択的に検出できる方法を探索した。

化学的にみると、HNO の電子配置は一重項酸素と等しいので、当教室で一重項酸素蛍光プローブとして開発された DMAX 類を適用できないかと考えた。DMAX-2 に無酸素下で Angeli s salt を添加すると強い蛍光が見られた。HPLC で生成物を追跡すると、

主に2つの化合物が生成していた。これらの化合物を同定したところ、HNOがアントラセンに架橋した epoxyimin(EI)体の2つの異性体であることが確認された。また、DMAX-2-EIは強い蛍光を発するため、高感度にHNOを検出できることも明らかになった。このように、HPLCでのDMAX-2-EIの検出はHNO生成の直接的証拠であると考えられることから、高感度で信頼性の高いHNO検出法であることがわかった。

以上のように我部君は、生細胞中あるいは *in vitro* 系での蛍光法によるRNS検出法の確立に成功した。高感度 NO⁺蛍光プローブ開発においては、多種多様な構造修飾により PeT を精密に制御するという設計法を駆使し、真に実用的な NO⁺蛍光プローブの開発に成功したばかりでなく、実際に生細胞において、その局在性を最大限に活用して細胞内外を区別して対象分子を捉えることができた点も高く評価できる。また本結果は、BODIPYを母核とした実用的な蛍光プローブの設計法の観点からも大きな意義を持つものと考えられる。さらに、HNOという研究が未だ進展していない新たなRNSを高感度に検出する手法の確立に成功したことも、当該分野発展に大きく寄与するものである。すなわち HNO 反応部位を有する蛍光プローブである DMAX-2 は、水溶液中で HNO と特徴的な EI 構造を形成し、強い蛍光を発することが明らかとなった。HPLC を用いることで特異的に HNO を検出でき、HNO の代謝分解過程を検証するツールとして有効であることが示唆された。以上の結果は、バイオイメージング手法の適用範囲を大きく拡大させるものであり、博士(薬学)の学位に値するものと認めた。