

# 論文の内容の要旨

論文題目 一重項酸素生成の off/on 制御可能な光増感剤の開発  
～ 標的タンパク質・細胞の特異的不活性化システムの開発～

氏 名 余郷 能紀

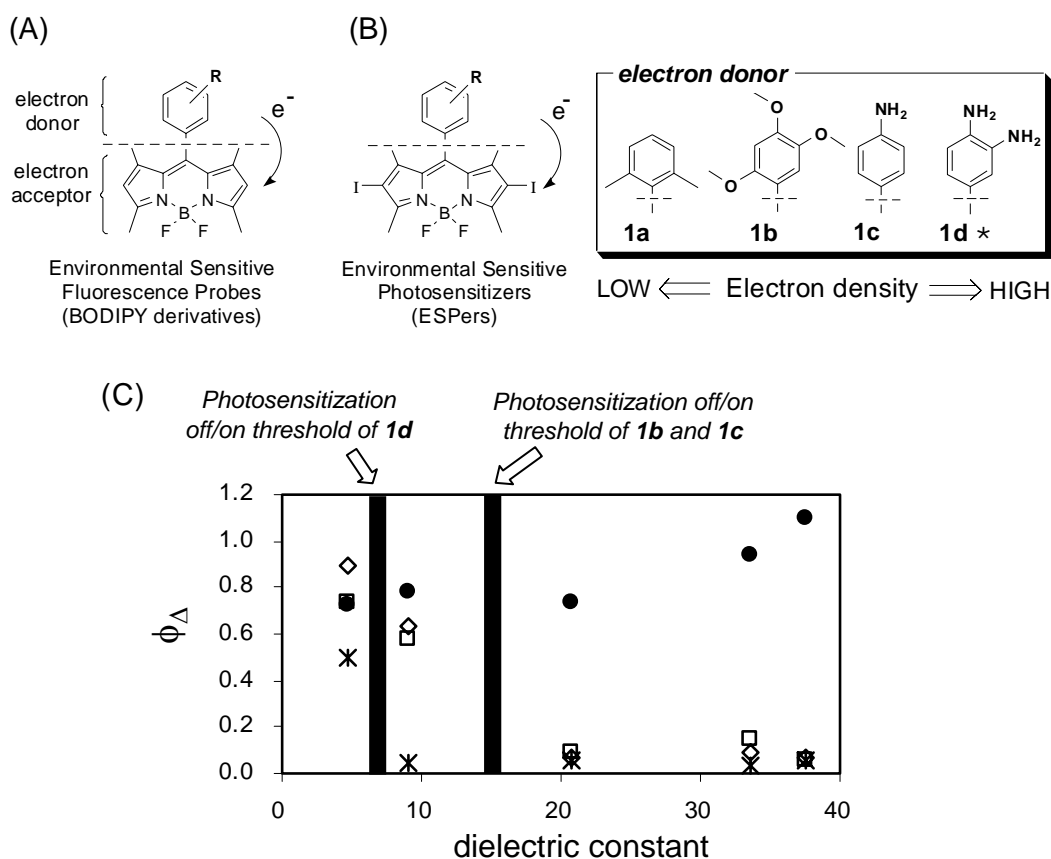
## 【序論】

蛍光プローブは観察対象とする生体分子を可視化し時空間的解析を可能とするツールとして大きな成果を挙げている。当研究室では蛍光の制御原理として光誘起電子移動( photoinduced electron transfer、PeT)を用いることで蛍光プローブの論理的設計法を確立し、多くの生体分子の可視化に成功してきた。一方、光増感剤は光照射に伴い一重項酸素 ( $^1\text{O}_2$ ) などの活性酸素種 (ROS) を生成する色素化合物であり、光増感剤から生成する  $^1\text{O}_2$  も蛍光と同様に励起一重項状態を経由して生成する。この光増感剤の  $^1\text{O}_2$  生成能を制御する原理はほとんど開発されておらず、もし PeT で  $^1\text{O}_2$  生成能が厳密に制御可能であれば多くの光機能性分子を創製できる可能性が秘められている。そこで、PeT を原理として  $^1\text{O}_2$  生成の off/on 制御可能な光増感剤を開発し、更にそれを用いた新たな酸化ストレス負荷システムを構築することを目的に研究を行った。

## 【本論】

### 1. 環境感受性 off/on スイッチを有する新規光増感剤の開発

当研究室では、溶媒極性の変化により蛍光量子収率の変化する BODIPY 類 (Figure 1A) が見出され、生体内の疎水的環境を検出する環境感受性蛍光プローブとして応用されている。この BODIPY 類の溶媒極性依存的な蛍光特性の変化は PeT により制御可能であることが示されている。そこで、BODIPY 類にヨウ素原子を導入し光増感剤へ誘導化すれば、溶媒極性依存的に  $^1\text{O}_2$  生成能の変化する環境感受性光増感剤 (Environmental Sensitive Photosensitizer, ESPer) になると考え、Figure 1B に示す化合物群を合成した。次に、ESPer 類の光照射に伴う  $^1\text{O}_2$  生成効率 ( $\phi_\Delta$ ) をジフェニルイソベンゾフラン法で評価した。その結果、ESPer 類の  $\phi_\Delta$  は高極性溶媒 ( $\text{CH}_3\text{CN}$ 、 $\text{MeOH}$  等) では抑制され、低極性溶媒 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 、 $\text{CHCl}_3$  等) で大きくなることが示された。また electron donor の電子密度に依存して  $^1\text{O}_2$  生成能が off から on に切り替わる境界が変化することが明らかになった (Figure 1C)。以上の結果より、ESPer 類は溶媒極性を検知して  $^1\text{O}_2$  生成の off/on 制御が可能な光増感剤であることが示された。



**Figure 1.** (A) Structures of environmental sensitive fluorescence probes. (B) Structures of ESPer library with various electron donor moieties. (C) Relationship between the relative efficiency of  $^1\text{O}_2$  generation ( $\phi_\Delta$ ) of ESPer library (1a-1d) and dielectric constant of solvents. Solvents used in this study were  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $\text{MeOH}$ , acetone,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , and  $\text{CHCl}_3$ , whose dielectric constants were described as 37.5, 33.6, 20.7, 9.14, 4.81, respectively. [filled circle; 1a, open square; 1b, open diamond; 1c, star; 1d].

次に、ESPer 類における  $^1\text{O}_2$  生成の off/on 制御を細胞系に適用し、光分子機能不活性化法 (Chromophore-assisted Light Inactivation: CALI) の新たな展開を図った。CALI は光増感剤が結合したリガンドを細胞内に導入し、標的分子に結合した後、この結合体に光を照射し、光増感剤から生じる ROS により標的分子を不活性化する方法である。CALI は標的分子不活性化の時間的・空間的制御が可能なることから有用性が期待されているが、既存の光増感剤を用いる CALI の実験ではしばしば不活性化したい標的分子以外に非特異的障害が生じることが報告され問題となっている。そこで、CALI の光増感剤として ESPer 類を用いることで  $^1\text{O}_2$  生成の off/on 制御が可能となり、特異性の高い不活性化が行えるのではないかと考えた。CALI の標的分子としてリガンド結合部位近傍に疎水性ポケットが存在することが示唆されているイノシトール三リン酸受容体 (inositol 1,4,5-trisphosphate receptor,  $\text{IP}_3\text{R}$ ) を選択した。まず、 $\text{IP}_3\text{R}$  近傍の環境を環境感受性蛍光プローブである BODIPY 類 (Figure 1A) を用いて検討した。BODIPY 類の結合した  $\text{IP}_3\text{R}$  リガンドを合成し、DT40 細胞に負荷した際の蛍光像と抗  $\text{IP}_3\text{R}$  抗体による蛍光染色像を比較した結果、 $\text{IP}_3\text{R}$  近傍の環境は  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  程度の疎水性を有することが示唆された。

次に、 $\text{IP}_3\text{R}$  の近傍の疎水性で  $^1\text{O}_2$  生成能が off から on に切り替わる光増感剤として **1b** を選択し、**1b** の結合した  $\text{IP}_3\text{R}$  リガンド (ESPer d- $\text{IP}_3$ ) をデザイン・合成した。また、環境感受性スイッチを持たず常に  $^1\text{O}_2$  生成能を有する光増感剤の結合した  $\text{IP}_3\text{R}$  リガンド (Con d- $\text{IP}_3$ ) も ESPer 類の比較対象として合成した (Figure 2)。まず、ESPer d- $\text{IP}_3$ 、Con d- $\text{IP}_3$  それぞれを細胞に負荷し、光照射した際の非特異的酸化ストレスを  $^1\text{O}_2$  蛍光プローブ (DMAX-2) により検討した。その結果、ESPer d- $\text{IP}_3$  は Con d- $\text{IP}_3$  とは異なり高極性環境である細胞質において  $^1\text{O}_2$  生成せず、非特異的障害が抑制されていることが示唆された (Figure 3)。次に、細胞質では  $^1\text{O}_2$  生成しない ESPer d- $\text{IP}_3$  が受容体結合による環境変化を認識して  $^1\text{O}_2$  を生成し  $\text{IP}_3\text{R}$  の不活性化を引き起こせるか検討した。DT40 細胞の  $\text{IP}_3\text{R}$  活性を測定した後に、ESPer d- $\text{IP}_3$  を負荷し光照射を行った。その後再び  $\text{IP}_3\text{R}$  活性を測定し、光照射前の活性と比較したところ、顕著な受容体活性の低下が観察された (Figure 4)。この受容体活性の低下は  $^1\text{O}_2$  の quencher である  $\text{NaN}_3$  の添加で抑制されたことから  $^1\text{O}_2$  関与であることが示された。以上の結果より、ESPer 類における  $^1\text{O}_2$  生成の off/on 制御が細胞系でも機能することが示された。

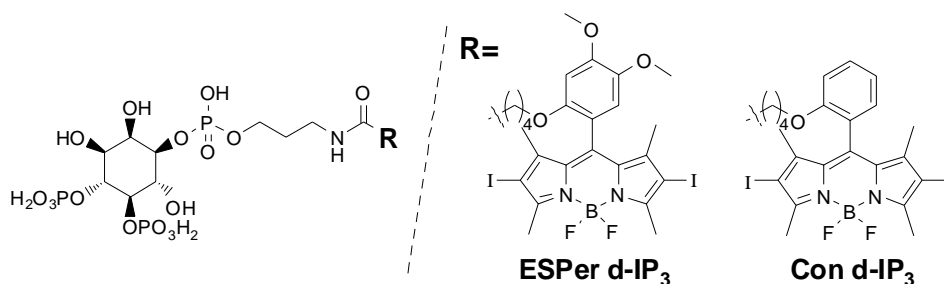
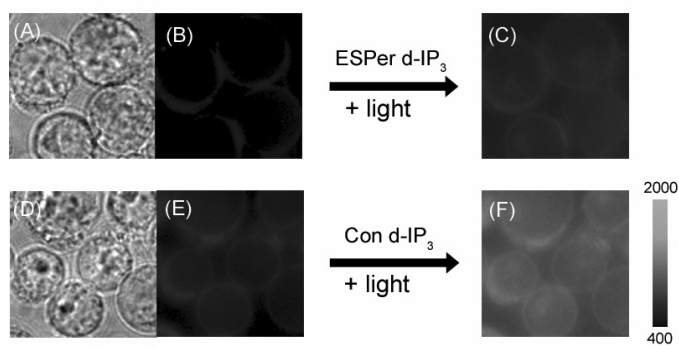
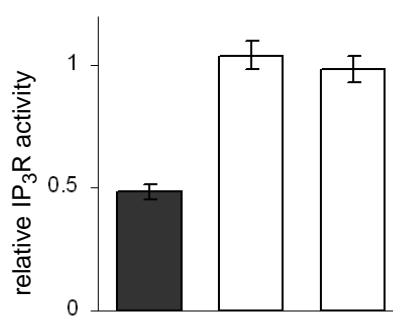


Figure 2. Structures of ESPer-conjugated  $\text{IP}_3$  derivatives.



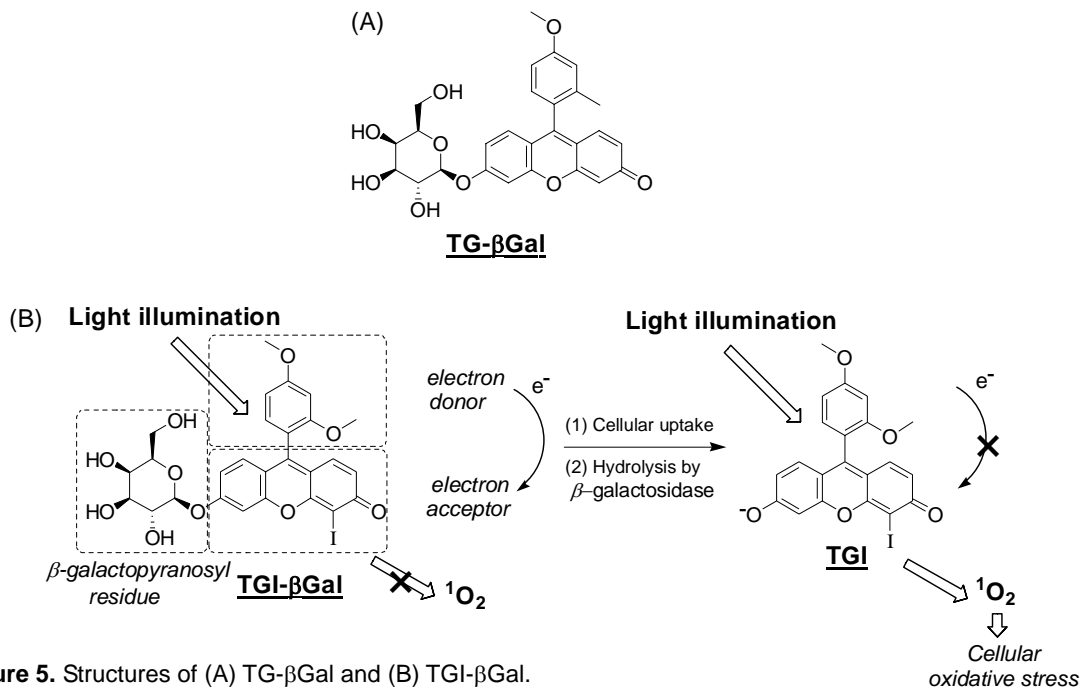
**Figure 3.** Imaging of non-specific cytosolic damage of ESPer d-IP<sub>3</sub>, compared with that of Con d-IP<sub>3</sub> using fluorescence probe for <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (DMAX-2). Permeabilized DT40 cells (wt) were loaded with ESPer d-IP<sub>3</sub> (or Con d-IP<sub>3</sub>) and DMAX-2, followed by light illumination. (A)-(C) Single DT40 cells under transmitted light (A) and fluorescence image excited with blue light before (B) and after (C) excitation of ESPer d-IP<sub>3</sub> by green light. (D)-(F) Single DT40 cells under transmitted light (D) and fluorescence image excited with blue light before (E) and after (F) excitation of Con d-IP<sub>3</sub> by green light. Scale bar indicates 10 μm.



**Figure 4.** ESPer d-IP<sub>3</sub>-mediated photoinactivation of IP<sub>3</sub>R.

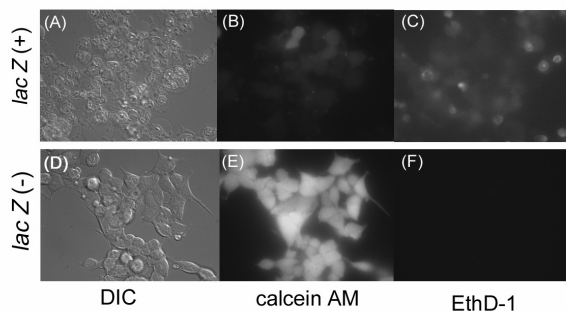
## 2. β-galactosidase を認識して酸化ストレス負荷が可能な新規光増感剤の開発

当研究室では fluorescein 誘導体の PeT 過程を精査することで、代表的なレポーター酵素である β-galactosidase に対する蛍光プローブ、TG-βGal (Figure 5A) を開発した。そこで次に、TG-βGal を蛍光プローブから光増感剤へと機能変換することで、*lac Z* の発現した細胞にのみ酸化ストレスを付与し、選択的な細胞死を誘導できる新たなプローブになるのではないかと考えた。以上のシステムが完成すれば、特定の種類の細胞機能を光によってノックダウンする新しい loss of function の手法や、がん細胞等の特定の細胞種だけを殺傷し治療する医療応用、など幅広い展開が期待できる。具体的には、Figure 5B に示す TGI-βGal をデザイン・合成した。TGI-βGal は、electron acceptor として xanthene 環にヨウ素原子を導入した増感団部位、electron donor として電子供与能を有するベンゼン環部位、酵素反応部位として β-galactopyranosyl 基、の 3 つの構造からなる。TGI-βGal は β-galactosidase との反応前は、PeT により <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 生成能が抑制されているが、*lac Z* 発現細胞に取り込まれ、β-galactosidase により β-galactopyranosyl 基が切断されて TGI に変換されると、electron acceptor の還元電位が変化しベンゼン環部位から電子移動が起こらなくなり <sup>1</sup>O<sub>2</sub> を生成すると考えられる (Figure 5B)。



**Figure 5.** Structures of (A) TG-βGal and (B) TGI-βGal.

まず、TGI-βGal 及び TGI の光照射に伴う  $^1\text{O}_2$  生成能をヨウ化物イオン酸化反応により評価した。その結果、TGI-βGal は光を照射してもほとんど  $^1\text{O}_2$  を生成せず、 $\beta$ -galactosidase との反応後の TGI は TGI-βGal と比較して約 20 倍の  $^1\text{O}_2$  生成能を有することが示された。次に、TGI-βGal を *lac Z* を発現した細胞、発現していない細胞、それぞれに負荷し光照射を行ったところ、*lac Z* を発現し、かつ光照射を行った細胞においてのみ細胞死を誘導することに成功した (**Figure 6**)。



**Figure 6.** Selective killing of  $\beta$ -galactosidase expressing cells using TGI-βGal. (A-C) DIC and fluorescence images of HEK 293 cells (*lacZ*(+)) loaded with calcein AM (living cell marker) and EthD-1 (dead cell marker) after photosensitization with TGI-βGal. (D-F) HEK 293 cells (*lacZ*(-)) was not affected by photosensitization with TGI-βGal.

## 【結論】

PeT 型蛍光プローブを光増感剤へと機能変換することで、 $^1\text{O}_2$  生成能の off/on スイッチを有する光増感剤を開発した。さらにこれら新規光増感剤を培養細胞に適用し、細胞内の疎水性環境、あるいはレポーター酵素の発現などの特定の条件によって光増感剤の機能を変化させることに成功した。光増感剤の  $^1\text{O}_2$  生成能の制御はほとんど報告例がなく、このような off/on スイッチを有する光増感剤が細胞レベルで機能することを示したのは世界で初めてである。