

審査の結果の要旨

氏名 余郷 能紀

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。薬品代謝化学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になれば多くの光機能性分子を創製できる事になり、薬学研究においても極めて有用である。

余郷は 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した。以下、その詳細を紹介する。

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

溶媒極性の変化により蛍光量子収率の変化する BODIPY 類が薬品代謝化学研究室で見出され、それに基づいて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が開発された。この BODIPY 類の溶媒極性依存的な蛍光特性の変化は PeT 原理により制御可能であることが示された。この原理は機能性増感剤の設計にも応用可能と考えられる。具体的には、BODIPY 類にヨウ素原子を導入し光増感剤へ誘導化することにより、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) になると考えられる。この考えに基づいて種々の化合物群を合成した。検討の結果、ESPer 類の ϕ_{Δ} は高極性溶媒 (CH_3CN 、 MeOH 等) で抑制され、低極性溶媒 (CH_2Cl_2 、 CHCl_3 等) で大きくなることが示され、さらに 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。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として機能することが示された。

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問題となっていた。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の存在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, IP_3R) を選択した。 IP_3R の近傍の疎水性で $^1\text{O}_2$ 生成能が off から on に切り替わる事が予想される光増感剤を選択し、その増感剤が結合した IP_3R リガンド (ESPer d- IP_3) をデザイン・合成した。種々検討の結果、 IP_3R に ESPer d- IP_3 が結合する事で、環境が親水性から疎水性に変化し、特異的に IP_3R を不活化することが可能となった。すなわち、ESPer 類における $^1\text{O}_2$ 生成の off/on 制御が細胞系で機能することが実証された。

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- β Gal を開発した。TG- β Gal を蛍光プローブから光増感剤へと機能変換することで、*lacZ* 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と考えられる。これが開発できれば、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。デザイン・合成した TGI- β Gal は、electron acceptor として xanthene 環にヨウ素原子を導入した光増感団部位、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- β Gal は β -galactosidase との反応前は、PeT により $^1\text{O}_2$ 生成能が抑制されているが、*lacZ* 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 $^1\text{O}_2$ を生成すると考えられる。検討の結果、当初の予想通り、TGI- β Gal を用いる事により、*lacZ* 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。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。

上記の成果は、薬学研究に極めて大きな寄与があり、薬学 (博士) の学位に値するものと認められた。