

審査の結果の要旨

氏名 見 目 勝

蛍光分析法は高感度かつ簡便な手法として、最も広く用いられている代表的な分析法の一つである。なかでも蛍光バイオイメージングは本来視覚的に捉えることが出来ない分子の挙動を時空間分解能を伴った情報として得る事が出来る手法であり、生命科学分野において非常に重要な役割を果たしている。Fluorescein, rhodamine 等の xanthene 系蛍光分子は長波長の励起・蛍光極大、水溶液中における高い蛍光量子収率などの特長からバイオイメージングに汎用されてきた。これら xanthene 系蛍光分子の 9 位は高い求電子性を持つ為、9 位に carboxyl, amide が求核攻撃をすることで lactone, lactam などの spiro 環を形成し xanthene の共役系が解消され、可視領域における吸光度、蛍光強度が可逆的に変化する。このような spiro 環の開環/閉環によって無蛍光性から蛍光性へと変化する機能を獲得した蛍光プローブは多数開発されているが、検出対象の適用範囲は限られている上に、生理的な pH の水溶液中で機能する実用的なものはほとんど知られていない。

問題点は、蛍光の OFF/ON 制御に利用可能な xanthene 系蛍光分子の spiro 環状骨格が lactone、lactam 以外にこれまで検討されてこなかったことに起因すると考えられる。本研究では xanthene 系蛍光分子の spiro 環の開環/閉環に基づく蛍光の OFF/ON 制御を lactone、lactam 以外の spiro 環骨格に拡張し、この spiro 環の開環/閉環に基づいて生理的な pH において生体内分子（特に酸化活性種；ROS）検出可能な実用的蛍光プローブの開発を行った。

はじめに、見目君は水溶液中において fluorescein に匹敵する優れた蛍光特性を持つ TokyoGreen (TG) 類の一種である hydroxymethylTokyoGreen (HMTG) を開発し、HMTG の特徴的な溶媒依存性を明らかにした。HMTG は aprotic 溶媒、塩基性溶媒及びアルカリ性水溶液中において TG 骨格に特徴的な可視吸収および蛍光が可逆的に減少した。生理的 pH の水溶液中においてより環化性の高い誘導体を見出す為、HMTG の種々の誘導体を合成した。その結果、環化性の高い誘導体としてカチオン性の HMTMR を開発した。HMTMR の spirodihydrofuran フォームは X 線結晶構造解析によって決定した。また、HMTMR の hydroxymethyl 基を求核性の高い mercaptomethyl 基に置換した化合物も合成した。これは、(1) 環化性を更に高め、水溶液中において pH 非依存的に完全に無色・無蛍光とすると同時に、(2) 閉環型である dihydrothiophene 環の sulfide 部分が酸化剤との反応点になるように分子設計されたものである。これを基盤として、生体内で産生される ROS との反応で環状構造が開裂し蛍光が増大するプローブ HySOx を開発した。HySOx は spiro 環の dihydrothiophene 環状構造を形成しており、pH に対して非依存的に無色・無蛍光であった。生体内で産生される重要な ROS に対する HySOx の pH 7.4 の水溶液中における ROS の選択性を調べた結果、HySOx は次亜塩素酸ナトリウムの添加によって大きく蛍光が増大し、その他の ROS を添加しても蛍光は増大しないことが分かった。HySOx は HOCl と反応し、sulfonate 体 (HySO₃H) を生成することも明らかにした。HySOx と次亜塩素酸の pH 7.4 のおける反応は速やかかつ定量的であり、また、HySOx、HySO₃H とともに蛍光強度が pH の影響を受けにくいので、HySOx は非常に実用性の高

いHOCl 検出プローブである。

このプローブの生体系への応用も検討した。好中球はサイトカインによる刺激または phagocytosis によって活性化され ROS を産生することが知られている。HySOx をブタ好中球に負荷し、phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA)により刺激活性化を行うことで発生した HOCl を捉えて HySOx の蛍光が増大した。更に PMA 刺激によるこのような蛍光増大をフローサイトメトリー、蛍光イメージングでも観察する事に成功した。また、zymosan にオプソニン化を施しブタ好中球に接触させることで phagocytosis によって zymosan が取り込まれ、phagosome 内部で産生される HOCl を捉え HySOx の蛍光が増大する様子を、ビデオとして動的に可視化する事に成功した。

以上、Rhodamine 系蛍光色素の spiro 環化性を制御することにより世界で初めて HOCl 特異的蛍光プローブ HySOx を開発した。HySOx は HOCl 特異性、感度、定量性、蛍光強度の pH 非依存性、光褪色耐性などの実用面において非常に優れたプローブである。

HySOx を用いることで PMA 刺激または phagocytosis によって産生される HOCl を可視化することに成功した。HySOx を用いることで HOCl が関与する生理現象に新たな知見が得られるものと期待される。この成果は、薬学研究において極めて意義のある高度の内容と評価でき、博士(薬学)に値するものと判断した。