

審査の結果の要旨

氏名 砂原 一 公

環境感受性蛍光プローブは、化学構造の変化を伴うことなく周辺の環境に応じてその蛍光特性が変化する蛍光色素であるが、これまでに開発されてきた蛍光プローブの励起波長は短く、細胞に与える障害を考えると細胞イメージング用蛍光プローブとして応用するには新たなプローブの開発が必要であった。しかし環境感受性蛍光団の蛍光変化に対する知見は乏しく、新規蛍光プローブは試行錯誤的に開発するしか方法がなかった。本論文は、長波長で機能する環境感受性プローブを論理的に開発し、これを応用することで様々な新規事象の計測を実現することを狙ったものである。

本論文ではまず第 1 章で、光誘起電子移動 (PeT) を消光原理とした蛍光プローブの論理的設計法を確立し、boron dipyrromethene (BODIPY) 誘導体のベンゼン環部位のHOMOエネルギーを種々変化させたプローブ群が、溶媒の誘電率に依存して蛍光特性が変化する環境感受性プローブライブラリーとして機能することを明らかにした (Figure 1)。例えば、CH₃CN中では**3**、**7**は蛍光を發し**9**、**11**は無蛍光であるが、溶媒をCH₂Cl₂とすると**3**、**7**、**9**は蛍光を發し**11**は無蛍光へと変化する。さらにBenzene中においては**3**から**11**のすべてが蛍光を持つようになる。このようにPeTを用いることで系統的に環境感受性蛍光プローブを開発することが初めて可能となった。

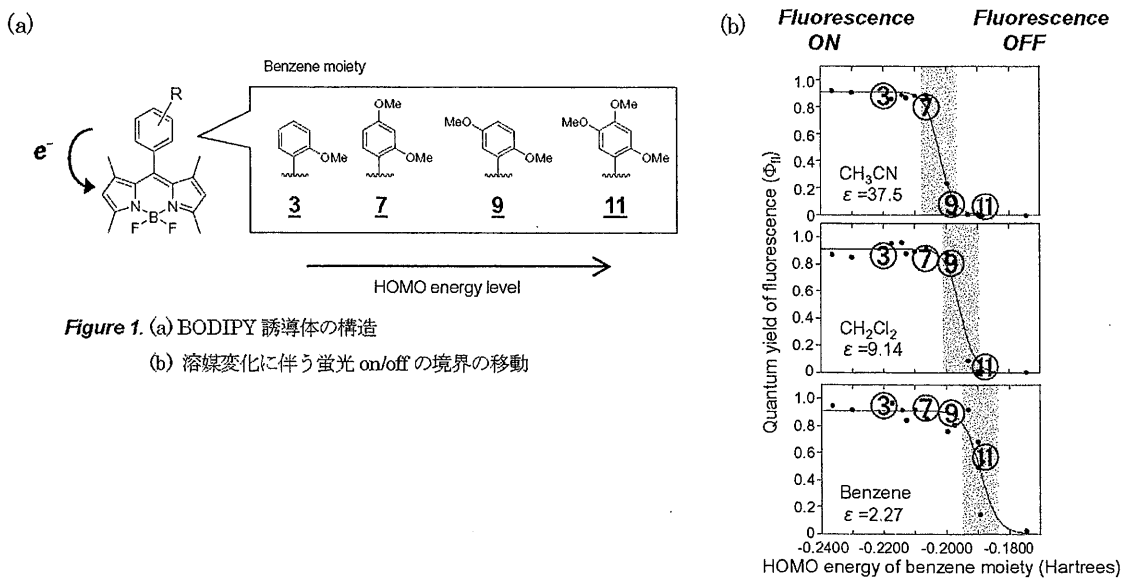


Figure 1. (a) BODIPY 誘導体の構造
(b) 溶媒変化に伴う蛍光 on/off の境界の移動

次に第 2 章では、上述の蛍光プローブライブラリーを用いて BSA 表面環境の検出を試み、BSA 添加による各プローブの蛍光強度変化を精査することで (Figure 2)、BSA 表面環境は acetone 程度と見積もることに成功した。

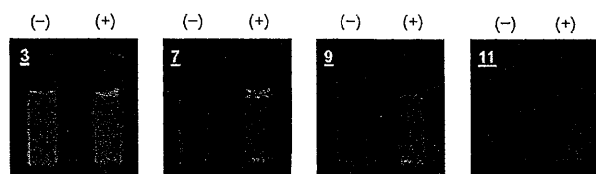


Figure 2. BSA の有無による BODIPY 誘導体の蛍光変化

本結果は、環境感受性プローブライブラリーを用いることで初めて得られる知見であり、その有用性が示された。

さらに第3章では、リガンド-レセプター相互作用による周辺環境変化に適切な蛍光プローブを選択することで、高感度グルタミン酸可視化蛍光バイオセンサーの開発を行った。L-グルタミン酸 (Glu) は中枢神経系において主要な興奮性神経伝達物質であり、学習・記憶や神経細胞死などの重要な働きを担っているが、イメージングに使えるプローブの報告例はほとんどない。そこで名古屋大医学部廣瀬研究室と共同して、グルタミン酸受容体 (GluR) にL-Gluが結合した際に起こる構造変化を、最大の蛍光変化として観察可能なプローブの開発を行った。環境感受性蛍光プローブライブラリーのベンゼン環電子密度、リンカーの長さ等を種々検討し、**25**をGluRにラベル化したセンサー**ER-25**(Figure 3b)が最も大きな蛍光変化(75%上昇)を示すことを見いだした。最終的には**ER-25**を神経細胞表面へと固定し、シナプス間隙のGluイメージングを行い、電気刺激に伴うGlu放出による蛍光上昇の検出に成功した (Figure 4)。

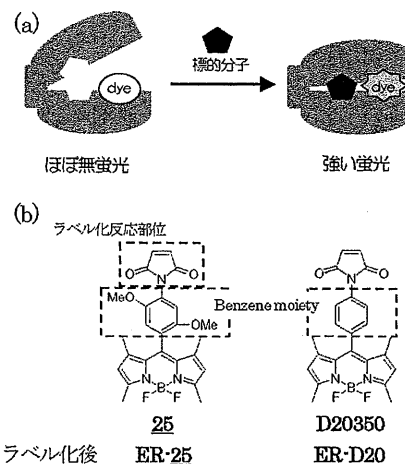


Figure 3. (a) 一般的なバイオセンサーの模式図
(b) BODIPY 誘導体の構造

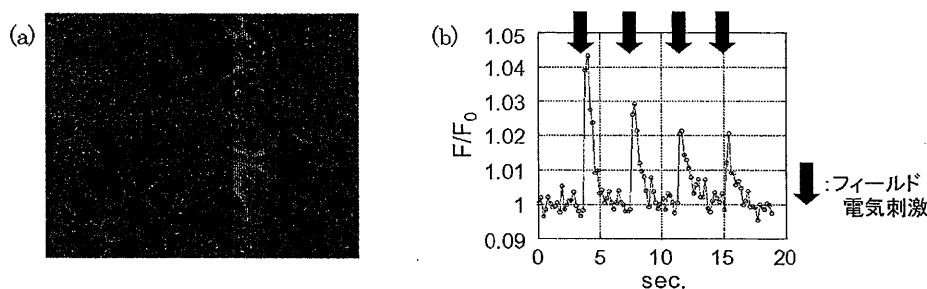


Figure 4. (a) 神経細胞表面に固定化した**ER-25**の蛍光イメージング像 (b) 電気刺激に伴うGluの蛍光検出

第4章では、近年開発されたタンパク質ラベル化手法であるプロメガ社のHaloTag テクノロジーに環境感受性プローブを適用し、HaloTagタンパク質との結合に必要な Reactive linkerを持ち、ベンゼン環部位には異なる置換基を有する化合物を種々開発した。これらのプローブ類を、HaloTagタンパク質を発現したHeLa細胞に適用した結果、視野全体に広がった細胞のうち限られた細胞のみが染色され、HaloTagタンパク質に認識され、タグ化後タンパク質表面環境を認識してその蛍光特性が変化することが明らかとなった。さらに、開発したプローブの中でも**28**は、HaloTagタンパク質を発現した細胞だけが光り、既存の試薬であるdiAcFAMのように周辺細胞からの蛍光が観察されなかったことから、**28**はS/N比よくHaloTagタンパク質発現細胞を観察可能な、極めて有用な蛍光プローブであることが明らかとなった (Figure 5)。

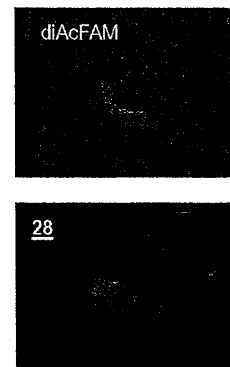


Figure 5. **28**を用いた高S/N比細胞蛍光標識の実現

以上本研究は、PeTを蛍光制御原理とすることで環境感受性蛍光プローブライブラリーの構築が可能であることを明らかにし、また開発したライブラリーを活用することで(1)タンパク質(BSA)の表面環境の計測、(2)大きな蛍光強度変化を示す新規グルタミン酸可視化蛍光バイオセンサーの開発、(3)S/N比の高い新規 HaloTag リガンドの開発、にそれぞれ成功したものである。プローブ開発原理の確立から、プローブの合成・開発、各種生物系への適用まで幅広く研究した論文であり、博士(薬学)の授与に値するものであると判断された。