

論文の内容の要旨

論文題目 新規フルオレセイン骨格に基づいた高感度蛍光プローブ
の開発と応用～新しい癌蛍光イメージング法の開発～

氏名 神谷 真子

【序論】

フルオレセインは、水中で高いモル吸光係数・蛍光量子収率を持ち、アルゴンレーザー（488nm）で励起可能であるなどの利点から、多くの蛍光プローブの母核として用いられてきた蛍光団である。当研究室でのこれまでの研究から、フルオレセインやその誘導体は、蛍光団であるキサントレン環部位と、それに直交するベンゼン環部位に分けて考えることができ、そのベンゼン環部位からの分子内光誘起電子移動（Photoinduced Electron Transfer, PeT）により、励起蛍光団からの蛍光が消光することが明らかになった。さらに、本知見を基にフルオレセインの高い量子収率に必須とされていたカルボキシル基を様々な置換基に置換した新規フルオレセイン類（TokyoGreens、以下 TG と略す）の開発にも成功した。本研究では、TG 骨格の分光学的特長を生かした新たな蛍光プローブの論理的設計法を確立することを目標とした。

【本論】

1. 高感度β-ガラクトシダーゼ蛍光プローブ (TG-βGal) の開発

まず、TG 誘導体のヒドロキシル基 ($pK_a = 6.4$) がアニオン型とニュートラル型とで蛍光発光の threshold が異なることに着目し、1) これがキサントレン環部位の電子受容能の変化に起因すること、2) キサントレン環のヒドロキシル基をエーテル化した誘導体はニュートラル型に近い電子受容能を持つことを明らかにした。そこで、この電子受容能の変化をプローブ設計に生かすべく、ニュートラル型では PeT による蛍光消光が起こるのに対しアニオン型では起こらないような TG 誘導体を探索した。その結果、ベンゼン環部位に *m*-OMe toluene を持つ誘導体 (2-Me-4-OMe TG) がアニオン型とニュートラル型とで最も大きな蛍光強度変化を示したことから、*m*-OMe toluene が、キサントレン環部位の電子受容能の変化を最

大限に蛍光強度変化に変換するために最適な電子供与部であることが示された (Figure 1a)。そこでまず、代表的なレポーター酵素であるβ-ガラクトシダーゼに対する蛍光プローブを開発するべく、2-Me-4-OMe TG のヒドロキシル基をβ-ガラクトシド基で保護した **TG-βGal** を開発した (Figure 1b)。その蛍光特性を調べたところ、予想通りβ-ガラクトシダーゼとの反応前後で大きな蛍光強度上昇を示し、フルオレセインを母核とする既存のプローブ FDG (fluorescein di-β-galactopyranoside) よりも速くかつリニアな蛍光上昇を示すことが明らかになった。さらに、生細胞でのβ-ガラクトシダーゼ活性イメージングを試みたところ、β-ガラクトシダーゼを発現した細胞でのみ速やかな蛍光上昇が観測されたことから、開発した TG-βGal は生細胞における *lacZ* 発現を高感度に可視化できるプローブであることが示された (Figure 1c)。

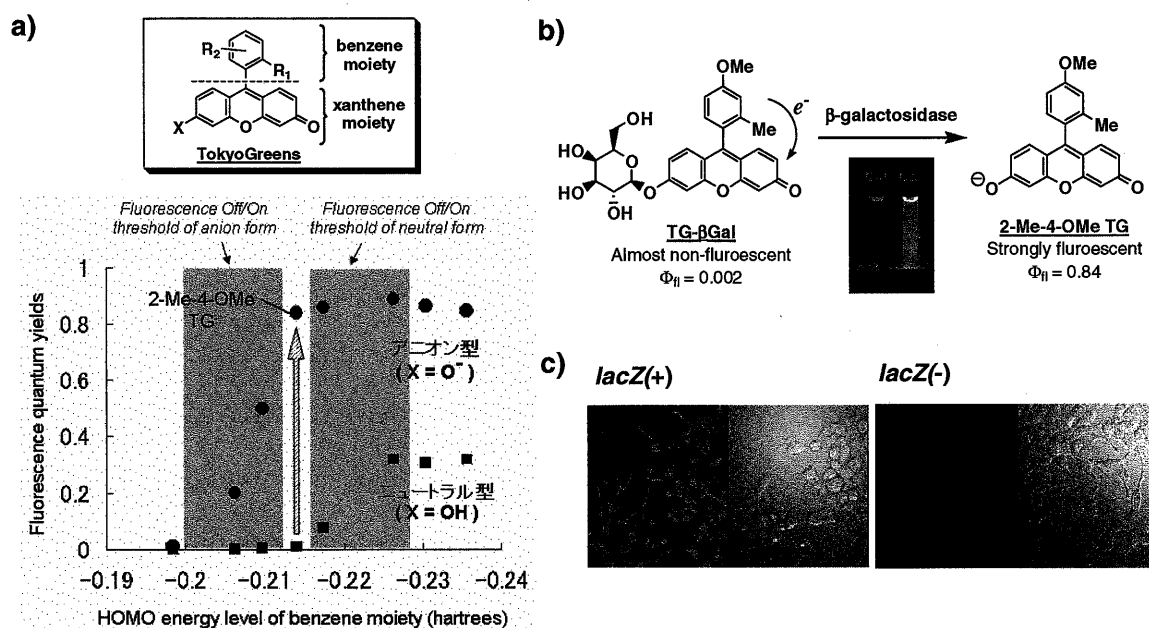


Figure 1. a, Dynamic change of fluorescence quantum yields of TokyoGreen derivatives depending on the HOMO energy level of benzene moieties under basic (black circle) and acidic (black square) conditions. b, Reaction scheme of TG-βGal and photo before and after the reaction with β-galactosidase. c, Visualizing β-galactosidase activity in living cells (*lacZ* (+) or *lacZ* (-)) with TG-βGal.

2. 高感度アルカリフォスファターゼ蛍光プローブ (TG-Phos) の開発

次に、TG-βGal と同様のデザインストラテジーで、プロットティングや ELISA の検出用酵素として汎用されているアルカリフォスファターゼ (ALP) に対するプローブ **TG-Phos** を開発した。開発した TG-Phos は、*in vitro* での検討から TG-βGal 同様優れた蛍光特性を有することが明らかになった (Figure 2a)。さらに、ターゲット蛋白である CYP3A2 を電気泳動・プロットティングし、一次抗体及び ALP 標識した二次抗体で処理した後、TG-Phos または既存の ALP プローブを用いて蛍光検出を試みた。その結果、ALP による加水分解生成物のプロット膜に対する吸着性の差異から、既存のプローブよりも TG-Phos を用いた方が、高感度にターゲット蛋白を検出可能であることが示された。また、TG-Phos とは異なる蛍光波長を有する蛋白ラベル化試薬を用いて、ターゲット蛋白と全蛋白質を同時に染色・検出することにも成功した (Figure 2b)。これらの結果から、TG 骨格に基づき開発した TG-Phos は、ウェスタンプロットティングに適用可能な高感度 ALP 蛍光プローブであることが示された。

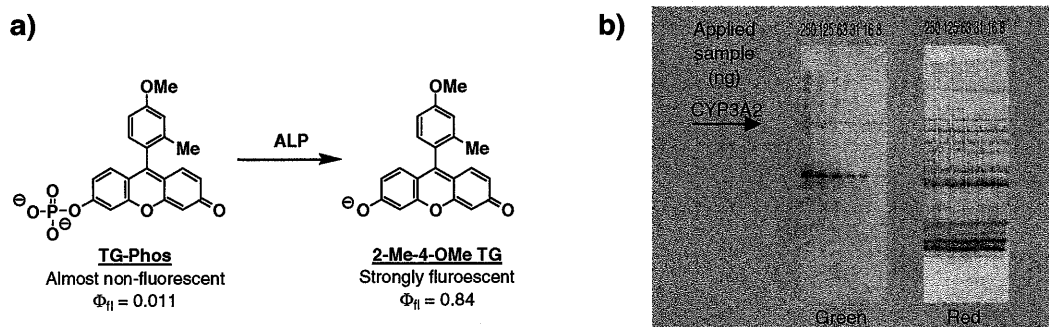


Figure 2. a, Reaction scheme of TG-Phos with ALP. b, Fluorescence detection of CYP3A2 by TG-Phos (Green) and total protein by BODIPY TR-X, SE (Red) on the blotting membranes. The six lanes contain decreasing amounts of CYP3A2 (250, 125, 63, 31, 16, 8 ng).

3・細胞内滞留型β-ガラクトシダーゼ蛍光プローブ (AM-TG-βGal) の開発と癌イメージング

次に、TG-βGal に構造修飾を施すことで、細胞内滞留性を高めた新たなプローブを設計することを考えた。具体的なアプローチとしては、TG-βGal に水溶性基であるカルボン酸を組み込み、さらにそのカルボン酸を細胞内エステラーゼ感受性の保護基 (e.g. Acetoxymethyl (AM) 基) で保護したプローブを開発することを考えた。まず始めに、TG-βGal の 4 位の OMe 基を OCH₂COOMe 基に置換した **1^{Me}-βGal** をデザイン・合成した。この蛍光特性を精査した結果、酵素との反応前の蛍光量子収率 (Φ_{fl}) が 0.069 となり、TG-βGal ($\Phi_{fl} = 0.002$) と比較して 35 倍程高いバックグラウンド

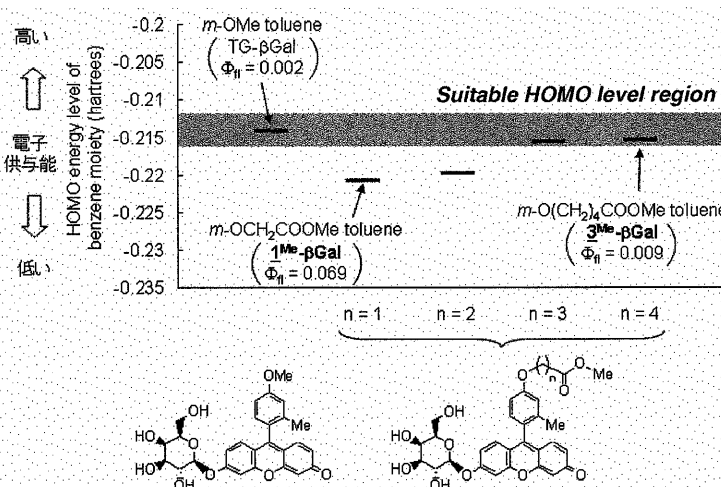
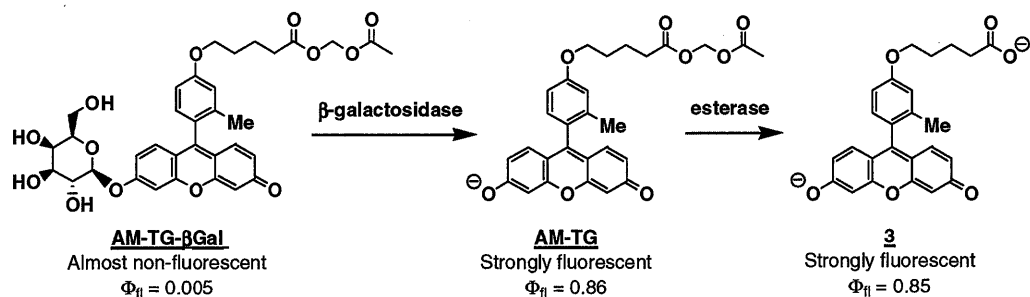


Figure 3. Relationship between the calculated HOMO energy level of the benzene moiety and Φ_{fl} of TG-βGal, **1^{Me}-βGal**, and **3^{Me}-βGal**.

蛍光を有することが明らかになった。この原因を究明するべく、**1^{Me}-βGal** のベンゼン環部位 *m*-OCH₂COOMe toluene について、電子供与能の指標である HOMO エネルギーレベルの算出を行った。その結果、OMe 基から OCH₂COOMe 基に置換することでベンゼン環部位の電子供与能が低下し、PeT による十分な消光が起こらなくなったことが示された (Figure 3)。そこで、OCH₂COOMe 基の methylene 鎖の長さを伸長することで COOMe 基の電子吸引効果を和らげることができるのではないかと考え、methylene 鎖の長さ (n) を 1 ~ 4 と変えたベンゼン環部位に関して HOMO エネルギーレベルを算出した。その結果、n が 4 ならば COOMe 基による電子吸引効果がほぼなくなることが示唆されたため、ベンゼン環部位に *m*-O(CH₂)₄COOMe toluene を有する **3^{Me}-βGal** をデザイン・合成した (Figure 3)。その蛍光特性を精査した結果、予想通り、β-ガラクトシダーゼとの反応前のバックグラウンド蛍光を十分低く抑えることに成功した ($\Phi_{fl} = 0.009$)。さらに、**3^{Me}-βGal** の methylester を細胞内エステラーゼでより加水分解の受けやすい AM ester に変換した **AM-TG-βGal** を開発した (Scheme 1)。開発した AM-TG-βGal は、β-ガラクトシダーゼと反応することで大きな蛍光上昇を示し、さらに細胞内のエステラーゼと反応することで水溶性が上昇するため、TG-βGal と比較して細胞内滞留性が向上していることが示された。



Scheme 1. Reaction scheme of AM-TG-βGal with β-galactosidase and esterase.

そこで、開発に成功した AM-TG-βGal を用いて、以下に示す二段階のストラテジーにて動物個体における癌の蛍光イメージングを行った。癌のモデルとしては、腹腔内にヒト卵巣癌由来の SHIN3 癌細胞を播種したマウスを用いた。まず一段階目として、SHIN3 細胞表面に提示されている lectin に認識される Avidin と β-ガラクトシダーゼとの複合体 (Avi-βGal) をマウスに腹腔内投与し、β-ガラクトシダーゼを癌にターゲティングした。二段階目として、AM-TG-βGal を腹腔内投与し、ターゲティングされた β-ガラクトシダーゼ活性を蛍光可視化した (Figure 4a)。投与した AM-TG-βGal は、まず始めに細胞表面にある β-ガラクトシダーゼにより蛍光性の AM-TG に変換され、さらに癌細胞内に取り込まれて細胞内エステラーゼと反応することで細胞内滞留性のある蛍光性生成物 **3** に変換されると考えた。マウス腹腔内における蛍光イメージングを行った結果、癌においてのみ強い蛍光シグナルが観察され (Figure 4b)、また、腸間膜に付着した 200 μm 程度の微小な癌をも蛍光可視化できることが明らかになった。以上、二段階のストラテジーを用いることで、癌細胞でのみ蛍光が増強され、高感度に癌を検出可能な新規癌イメージング法を確立することに成功した。本手法は、癌の摘出手術時に癌を可視化する技術 (イメージガイダンス) として医療の分野で応用される可能性を秘めている。

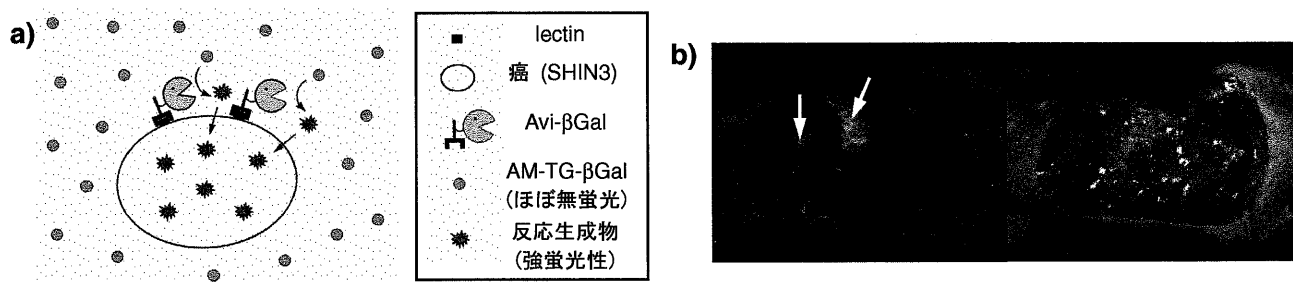


Figure 4. a, Two-step strategy for imaging tumors by using Avi-βGal and AM-TG-βGal. b, *In vivo* fluorescence imaging of SHIN3 tumor (arrows). Left; Unmixed fluorescence image, Right; white light image.

【結論】

本研究において私は、新規フルオレセイン類 (TG) のベンゼン環部位の置換基を適切に選択することにより、キサントレン環の電子受容能の変化を最大限に蛍光変化へ変換することが可能であることを見だし、これを蛍光発光の制御原理に用いた新たなプローブ設計法を確立することに成功した。さらに、確立した設計法に則り開発したプローブは、既存のプローブでは成し得なかった特長を有し、生命科学的研究及び医療の分野において真に実用的な解析・診断ツールとなりうることが示された。