

# 論文の内容の要旨

論文題目 タンパク結合を制御原理とした  
新規近赤外蛍光プローブの開発と応用

氏名 黄色 大悲

## 【序論】

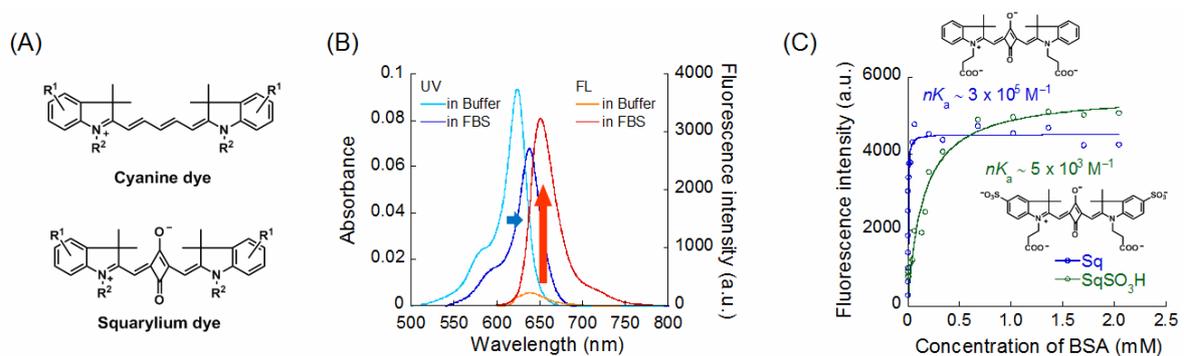
蛍光プローブを利用した蛍光イメージング法は動的な生命現象を時空間分解能高く、安全かつ簡便に可視化する手法として、近年、生命科学研究において汎用されている。特に、生体組織の構成成分による光の吸収や生体分子由来の自家蛍光が少なく、優れた組織透過性を有する近赤外領域の波長（650-900 nm）の光を利用した近赤外蛍光イメージング法は、生きたままの動物体内（*in vivo*）において生理応答を高感度で可視化できる。以上の背景から、代表的な近赤外蛍光色素であるポリメチン色素を蛍光母核として、様々な生理活性分子に対する選択的な近赤外蛍光プローブの開発研究が精力的に行われている。しかしながら、近赤外領域において既存の蛍光制御原理が適用可能な生体分子は限定されており、さらに広範な生体分子を近赤外蛍光イメージング法によって可視化するためには既存の設計法を補完しうる新たな制御原理が求められている。そこで本研究では、まずポリメチン色素の特性を精査することで、新たな制御原理に基づく分子設計手法の構築を目指した。そして、本手法に基づいて、既存の手法が適用困難な生体分子を可視化する新規近赤外蛍光プローブの開発と応用を行った。

## 【本論】

### 1. タンパク結合を制御原理とした新規分子設計手法の構築

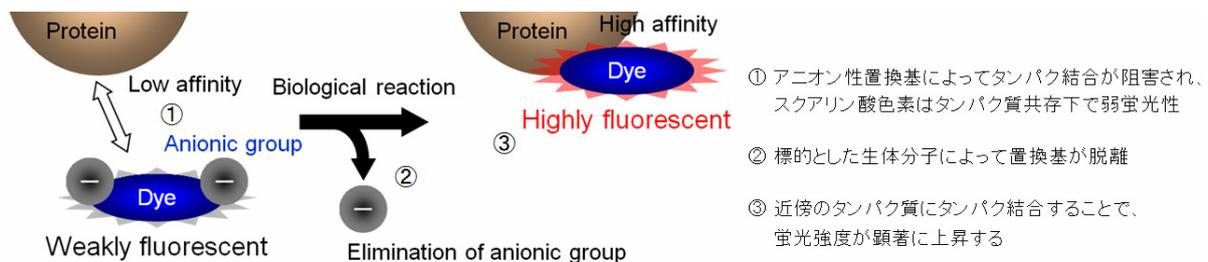
タンパク質共存下において、ポリメチン色素はタンパク結合によって吸収・蛍光波長の長波長化とともに蛍光強度が増大することが知られている。本研究ではこの性質、特に強度の増大に着目し、色素に適切な置換基を導入することでタンパク結合が阻害され、タンパク質共存下において蛍光強度の上昇を抑制できるという作業仮説を立てた。この仮説に従えば、タンパク質共存下、置換基の脱離反応によって、タンパク結合が生じ、蛍光強度が増大する蛍光プローブが開発でき

ると考えた。そこで、まず、代表的なポリメチン色素であるシアニン色素について、色素の構造とタンパク結合に伴う光学特性変化の関係を精査した。その結果、いずれのシアニン色素もタンパク質共存下において光学特性が大きく変化する一方で、スルホ基を有するシアニン色素は顕著な変化を示さず、アニオン性置換基によってタンパク結合が阻害されることが示された。また、シアニン色素のポリメチン鎖を架橋したスクアリン酸色素 (**Figure 1. (A)**) についても同様に精査したところ、スクアリン酸色素はシアニン色素と比較して顕著に光学特性が変化し、特に蛍光量子収率に着目すると、緩衝液中においてほぼ無蛍光性であるのに対してタンパク質共存下では約 20 倍の増大を示し、強蛍光性となることが明らかとなった (**Figure 1. (B)**)。さらに、ウシ血清アルブミン (BSA) に対する色素の安定度定数を見積もったところ、色素にスルホ基を導入することでタンパク結合が阻害されることが分かった (**Figure 1. (C)**)。以上の結果は、アニオン性置換基によって色素のタンパク結合が阻害されるという知見を強く支持している。



**Figure 1.** (A) Structures of cyanine dye and squarylium dye. (B) Absorption and fluorescence spectra of 1  $\mu\text{M}$  Sq ( $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$ ) in phosphate buffer or fetal bovine serum (FBS). (C) Fluorescence intensity of squarylium dyes with or without sulfonate groups in various concentrations of BSA solution.

以上の知見に基づいて、**Figure 2.** に示した分子設計手法を考案した。具体的には、蛍光母核としてスクアリン酸色素を選択し、アニオン性置換基を導入することで色素のタンパク結合を阻害することを考えた。ここでタンパク結合が完全に阻害されれば、スクアリン酸色素は生体内のようなタンパク質存在下において緩衝液中と同等の光学特性を示し、ほぼ無蛍光性となる。そして標的とした生体分子によって置換基が脱離すると、近傍に存在するタンパク質に結合することで吸収・蛍光波長の長波長化とともに顕著な蛍光上昇が生じることが期待される。すなわち、この蛍光特性の変化を追跡することで標的分子の検出が可能となる。

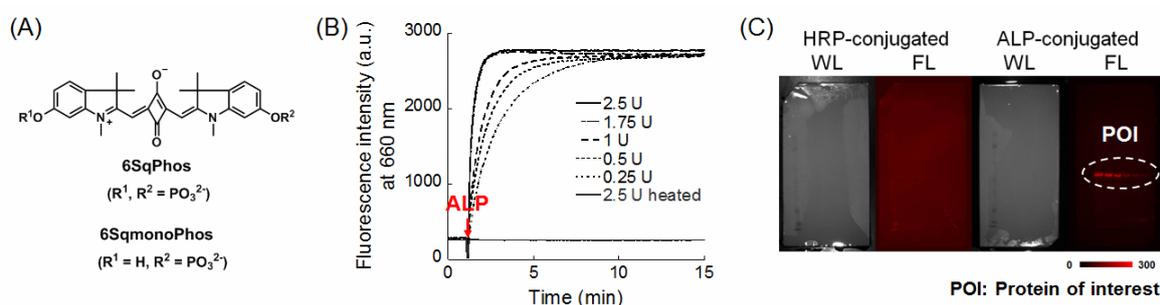


**Figure 2.** Design strategy based on modification of the protein binding affinity of squarylium dye.

## 2. アルカリホスファターゼプローブの開発と応用

1.で構築した分子設計手法をさらに検証するため、アニオン性置換基としてリン酸基を導入したスクアリン酸色素についてタンパク結合に基づく光学特性の変化を調べたところ、導入したリン酸基の負電荷数が増加するにつれて光学特性の変化が抑制されることが明らかとなった。以上の検討から、まずリン酸基の導入によって色素のタンパク結合を阻害し、アルカリホスファターゼ (ALP) によってリン酸基が加水分解されるとタンパク結合が生じ、蛍光強度が上昇するという ALP プローブが開発できると考えた。ALP はマーカー酵素として生命科学研究において汎用されている他、肝機能の指標など臨床診断においても重要な酵素である。そこで、ALP プローブとして **Figure 3. (A)** に示した 6SqPhos および 6SqmonoPhos を設計・合成した。その結果、6SqPhos および 6SqmonoPhos は当初の設計通りにアニオン性のリン酸基によってタンパク結合が阻害され、タンパク質共存下において弱蛍光性を示した。そして、ALP を添加することで吸収・蛍光波長の長波長化とともに蛍光強度が顕著に上昇することが明らかになった (**Figure 3. (B)**)。以上の結果は 6SqPhos および 6SqmonoPhos が *in vitro* において ALP の酵素活性を蛍光検出可能であることを示している。

さらに、開発したプローブを ALP 標識した抗体を利用するウェスタンブロッティング (WB) に適用した。その結果、プローブの ALP による加水分解反応生成物がブロッキング操作を行った転写膜に対して高い吸着性を示すことにより、標的タンパク質を高感度かつ特異的に蛍光検出可能であることが明らかとなった (**Figure 3. (C)**)。以上の結果は開発したプローブが WB において ALP 活性検出蛍光プローブとして利用できることを示している。



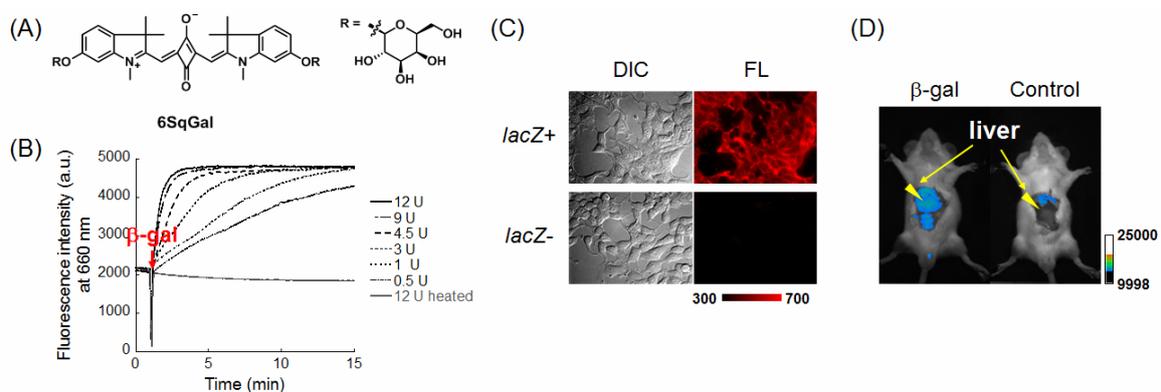
**Figure 3.** (A) Structures of 6SqPhos and 6SqmonoPhos. (B) Time courses of fluorescence intensity observed with 1 μM 6SqPhos in Tris buffer containing 1% w/v BSA after addition of various amounts (units, U) of ALP. (C) Western blotting detection using HRP (left) or ALP (right) conjugated secondary antibody with 6SqmonoPhos.

## 3. β-ガラクトシダーゼプローブの開発と応用

1.で構築した分子設計手法をさらに拡張し、糖類などの水溶性置換基もタンパク結合を阻害するという作業仮説を立てた。この仮説に従えば、糖類を蛍光プローブの反応部位とすることが可能であり、糖類の加水分解反応を担うグリコシダーゼの酵素活性が検出できると考えた。そこで本研究ではβ-ガラクトシダーゼ (β-gal) に着目し、スクアリン酸色素にβ-ガラクトシル基を導入した 6SqGal を設計・合成した (**Figure 4. (A)**)。β-gal は外部遺伝子導入時のレポーター酵素として生命科学研究において汎用されている重要なグリコシダーゼである。6SqGal は当初の仮説通りにβ-ガラクトシル基によってタンパク結合が阻害され、タンパク質共存下において弱蛍光性を示した。そして、β-gal を添加することで吸収・蛍光波長の長波長化とともに蛍光強度が顕著に上

昇することが明らかになった (**Figure 4. (B)**)。以上の結果は 6SqGal が *in vitro* において  $\beta$ -gal の酵素活性を蛍光検出可能であることを示している。

次に、開発したプローブの生物応用を行った。まず、 $\beta$ -gal をコードする *lacZ* 遺伝子を安定発現させた HEK293 細胞を用いた生細胞イメージングについて検討した。その結果、**Figure 4. (C)** に示したように、遺伝子導入細胞から顕著な蛍光が観察された一方で、遺伝子導入していない細胞からはほとんど蛍光が観察されず、6SqGal が  $\beta$ -gal の酵素活性を生細胞イメージング可能であることが示された。さらに *in vivo* 蛍光イメージングについて検討した。 $\beta$ -gal 遺伝子を挿入したプラスミド DNA をハイドロダイナミクス法を用いてマウスの肝臓に導入した後、6SqGal を尾静脈より投与したところ、肝臓から顕著な蛍光上昇が観察された (**Figure 4. (D)**)。一方で、コントロールプラスミドを導入した場合には顕著な蛍光上昇は認められなかった。以上の結果は 6SqGal が  $\beta$ -gal の酵素活性を *in vivo* において蛍光イメージング可能であることを示している。



**Figure 4.** (A) Structure of 6SqGal. (B) Time courses of fluorescence intensity observed with 1  $\mu$ M 6SqGal in phosphate buffer containing 1% w/v BSA after addition of various amounts (units, U) of  $\beta$ -gal. (C) Fluorescence (FL) and differential interference contrast (DIC) images of *lacZ*-positive or *lacZ*-negative HEK293 cells loaded with 6SqGal. (D) Comparison of the mice inoculated with plasmid DNA encoding  $\beta$ -gal or control plasmid.

## 【結論】

本研究では、ポリメチン色素のタンパク結合性を精査することにより、蛍光制御原理としてタンパク結合を利用した近赤外蛍光プローブの新規分子設計手法の確立に成功した。そして本設計法に基づいて、ウェスタンブロットィングに適用可能な ALP 活性検出蛍光プローブおよび遺伝子発現の *in vivo* 蛍光イメージングが可能な  $\beta$ -gal 活性検出蛍光プローブの開発に成功した。これらのプローブは生命科学研究における実用的ツールとして有用であるとともに、本設計法は既存の分子設計法の欠点を補完しうる手法であり、近赤外蛍光プローブの開発研究において本研究が広範な生体分子を可視化するための端緒になると期待される。