

## 審査の結果の要旨

氏名 黄色 大悲

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の波長領域（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*）においても生理応答を高感度に可視化できる。この様な利点から、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た近赤外蛍光プローブの開発研究が精力的に行われてきた。一方で、近赤外色素においては適用可能な蛍光制御原理が限定されており、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プローブを開発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きた。そこで黄色は、本研究で、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を構築することで、新たな蛍光イメージング法の確立に貢献することを目指し研究を行った。

### 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一般的に知られている。黄色はこの性質に着目し、【色素に適切な置換基を導入することでタンパク結合を阻害すれば、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。黄色はまず、仮説検証のため、近赤外領域に吸収蛍光を有するシアニン色素誘導体を系統的に合成し、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、スルホ基など、アニオン性置換基を有するシアニン色素はタンパク結合に伴う顕著な光学特性の変化を呈さないことを見いだした。加えて、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についても精査を行い、スクアリンは水溶性緩衝液中ではほぼ無蛍光性であるのが、適切な濃度のタンパク質共存下では蛍光量子収率にして約 20 倍の増大を示し、強蛍光性となることを見いだした。黄色は続いて、得られた知見に基づくプローブの分子設計手法を考案した。具体的には、蛍光プローブの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抑制し、酵素などの生体分子との反応によりこの抑制を解除する、といった戦略である。

### 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実証すべく黄色は、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を開発した。開発した分子は、導入したリン酸基の負電荷数が増加するにつれて、タンパク質有無での光学特性の差が小さくなることが明らかとなった。この知見から黄色は、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 ALP プローブ、が開発できると考え、新規近赤外蛍光プローブの設計・合成を行った。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として知られる。新規に開発された ALP プローブ（6SqPhos および 6SqmonoPhos）は黄色の設計通り、プローブ構造上のリン酸基によってタンパク結

合が阻害され、適当な濃度のタンパク共存下においても弱蛍光性を示した。系中に ALP を添加すると、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し、かつ ALP の活性に基づく定量的な蛍光増大が得られた。黄色は更に、ALP 標識した抗体を利用するウェスタンブロッティングに適用し、開発したプローブを用いることで標的タンパク質を高感度かつ特異的に蛍光検出可能とした。以上の結果はプローブ設計手法の有用性を実証し、また、開発したプローブの実用性を示している。

### 3. $\beta$ -ガラクトシダーゼプローブの開発と応用

黄色は上述の知見をさらに拡張し、アニオン性官能基のみならず、糖類などの電荷を有さない水溶性置換基もタンパク結合を抑制しうる、という作業仮説を立てた。この仮説が真ならば、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近赤外蛍光プローブによって検出できる。黄色はまず、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  $\beta$ -ガラクトシダーゼ ( $\beta$ -gal) を検出対象として設定し、スクアリン酸色素に  $\beta$ -ガラクトシル基を導入した 6SqGal を設計・合成した。6SqGal は黄色の仮説通り、 $\beta$ -ガラクトシル基によって色素のタンパク結合が阻害されており、適当な濃度のタンパク共存下においても、弱蛍光性であった。一方、 $\beta$ -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の顕著な上昇が得られた。これにより、黄色の仮説が検証され、かつ新規に構築された近赤外プローブの設計手法の汎用性の高さが実証された。続いて黄色は、開発したプローブの生物応用を行った。6SqGal がイメージング法において  $\beta$ -gal の酵素活性を蛍光検出可能かについても検証を行うべく、細胞や個体を用いたイメージングを行った。まず、HEK293 細胞を用い、生細胞イメージングを行ったところ、 $\beta$ -gal をコードする lacZ 遺伝子を導入した細胞から顕著な蛍光増大が観察された。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により検出可能であることが示された。さらに黄色は個体を用いたイメージングについても検討した。ハイドロダイナミクス法を用いて、マウスの肝臓に  $\beta$ -gal 遺伝子を導入した後、開発した 6SqGal を尾静脈より投与したところ、遺伝子を導入した個体において、肝臓から有意な蛍光上昇が観察された。以上、黄色は、開発した 6SqGal を用い、細胞・個体レベルにおいて、近赤外蛍光イメージング法による  $\beta$ -gal の酵素活性検出を達成した。

以上の研究により黄色は、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、タンパク結合に伴う光学特性変化を蛍光制御原理とする近赤外蛍光プローブの新規分子設計手法を確立した。開発した本設計法に基づいて、ウェスタンブロッテ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。これらの成果は博士（薬学）にふさわしい成果と審査委員会で評価された。