

新しい分子デザインに基づいた細胞機能リアルタイム解析のための蛍光プローブの開発

押川, 祐二

<https://hdl.handle.net/2324/1654810>

出版情報：九州大学, 2015, 博士（創薬科学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）



氏 名	押川 祐二
論 文 名	新しい分子デザインに基づいた細胞機能リアルタイム解析のための 蛍光プローブの開発
論文調査委員	主 査 九州大学大学院薬学府 教授 王子田 彰夫 副 査 九州大学大学院薬学府 教授 古賀 登 副 査 九州大学大学院薬学府 教授 佐々木 茂貴 副 査 九州大学大学院薬学府 准教授 麻生 真理子

論文審査の結果の要旨

近年、高い検出感度、簡便性、生体適合性の高さから多くの蛍光プローブが開発され、生物学研究を始め様々な研究の進歩に大きく貢献してきた。しかしながら、これらのプローブは一部の限られた成功例であり、多くの生理活性物質や生理現象に対する蛍光プローブ開発は未だ手つかずのまま残っている。

これに対して、博士論文申請者の押川祐二氏は、蛍光プローブの開発において鍵となる分子デザインに着目し、新しい分子デザインに基づいた蛍光プローブの開発によって、これまで可視化が困難であった生理活性分子や生理現象の可視化を行うことを着想した。

第一章では、光誘起電子移動（Photo-induced Electron Transfer : PET）を用いた新しい蛍光センシングシステムの開発を行っている。PETにおいては、電子リッチなアミンから蛍光団へと電子移動が起きると蛍光が消光する。このアミンがプロトン化され、電子供与性を失ったアンモニウムではPETは解除され蛍光発光を示す。一方、塩基として知られるアミンの pK_a は、アミノ基上の置換基構造により大きく影響される。例えばグリシンのアミノ基の pK_a は9.6だが、グリシンメチルエステルでは7.9であり、僅かな構造の違いがプロトン受容能に100倍近い差を生じさせる。申請者は、アミノ基上に様々な置換基を有する蛍光プローブを用いて、酵素反応によりアミノ基上の置換基が変換されることに伴いアミンの pK_a が変化し、あるpHにおいてPETのオンオフ（蛍光オフオン）が変化する蛍光センシングシステムの開発を行っている。本章では、センシングシステムの構築という基礎検討から、酵素反応の検出という応用まで行われている。特に、これまで基質の開裂を伴わないことから開発が困難だった官能基変換を触媒する酵素活性も、シンプルな蛍光プローブデザインのみで開発している。さらに、生細胞イメージングにも応用し、 pK_a の制御により弱酸性で加水分解を受けた時のみ蛍光のオフオンが変化するようにデザインされた蛍光プローブを用いて、リソソーム内エステラーゼ活性の可視化にも成功している。

第二章では、クロライドイオンに蛍光応答を示すものの、膜透過性が低いために実用的ではなかった蛍光プローブの改良を行っている。この際、汎用される誘導体化では膜透過性の向上が不十分であることから、新規の膜透過性を向上させる疎水性タグをデザインし、その機能評価を行っている。

第三章では、免疫細胞の一つであるマスト細胞が脱顆粒時に放出する高濃度のヒスタミンに着目し、脱顆粒を可視化出来る蛍光プローブの開発を行っている。蛍光センシングには、金属リガンド部位を有する蛍光プローブと金属により初期蛍光をオフとし、ヒスタミン存在下ではリガンド交換的に金属イオンが脱離し、蛍光がオンとなるIndicator Displacement Assayを用いている。このセンシングシステムで

は、ヒスタミン非存在下では錯体を形成し、ヒスタミン存在下では蛍光プローブのリガンド部位から金属が迅速に脱離するリガンドデザインが必要となる。申請者はリガンドの選択のためにリガンド部位を有する蛍光プローブを多数合成してスクリーニングを行い、得られた結果をもとに細胞イメージングに適したシアニン（Cy5）色素にリガンドを導入している。この Cy5 誘導体とコバルトとの錯体は、脱顆粒をヒスタミン検出に基づいて可視化するために十分なヒスタミン応答能および選択性を示している。さらに、実際の細胞イメージングにおいてはプローブ内に細胞膜固定のためのリンカーを導入し、コバルトとの錯体での処理のみで細胞膜上に固定している。このコバルト錯体は、マスト細胞モデルとして汎用される RBL-2H3 細胞の脱顆粒やラット腹腔由来マスト細胞の抗原抗体反応あるいは抗原抗体反応に依存しない脱顆粒をリアルタイムに、1 細胞レベルで可視化できている。

以上のように、申請者の押川祐二氏は分子デザインに基づいて蛍光プローブを開発することで、これまで可視化が困難であった生理活性分子や生理現象を検出・可視化できる有用な分子ツールを創出した。これらの結果は、免疫学の基礎研究から創薬スクリーニングのような応用研究に至るまで有用な研究成果である。従って、博士（創薬科学）の学位に値すると認める。