

新規な反応メカニズムに基づく生体分子検出のための機能性蛍光プローブの開発

川越, 亮介

<https://hdl.handle.net/2324/1931852>

出版情報：九州大学，2017，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	川越 亮介
論 文 名	新規な反応メカニズムに基づく生体分子検出のための機能性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 大嶋 孝志 副 査 九州大学大学院薬学府 教授 山田 健一 副 査 九州大学大学院薬学府 准教授 谷口 陽祐

論文審査の結果の要旨

近年、様々なセンシング機構を基に開発された蛍光プローブにより、生体分子の機能を *in cell* あるいは *in vivo* で解析することが可能となり、生体機能の解明に大きく貢献してきた。しかしながら、これらの蛍光プローブは一部の限られた成功例であり、生体内での機能解析が望まれる生体分子は他にも多数存在する。

これに対して、博士論文申請者の川越亮介氏は、新たな反応メカニズムを組み込んだ蛍光プローブの開発を行うことで、未知の生体機能や今まで検出されていない生体分子の可視化を行うことに着想した。

第一章では、硫化水素 (H_2S)を検出する新しい蛍光センシングシステムの開発を行っている。申請者の研究室において、これまでに蛍光プローブと金属イオン間の相互作用によって蛍光波長が長波長化する新規金属イオンセンシング法を見いだしている。本機構は、蛍光色素に対して金属イオンが接触した状態の錯体を形成し、錯体形成に伴い蛍光波長の大きなレッドシフトを引き起こす特徴を持つ。申請者は、本手法を応用し、 H_2S と金属イオンの硫化物イオン生成に伴い、蛍光プローブと金属イオンの相互作用が解消される現象を利用した H_2S の検出を試みた。本検出系では金属イオン脱離を利用した迅速な検出および定量性に優れた蛍光レシオ検出によりリアルタイムな蛍光イメージングが可能となる。申請者は、蛍光プローブ中のリガンド部位、蛍光色素部位をそれぞれ検討することで H_2S 検出プローブの構造最適化を行い、迅速かつ選択的に H_2S と蛍光応答を示す蛍光プローブを見いだした。本プローブは生細胞蛍光イメージングにも適応可能であり、細胞内で酵素によって産生された微量の H_2S をリアルタイム可視化に成功している。

第二章では、神経伝達制御や抗酸化作用などの生体機能に関与する生体小分子であるパーサルファイド (RSSH)を可逆的に検出する蛍光プローブの開発を行っている。RSSH は細胞内レドックス変動に応じて濃度変動することが知られており、RSSH の動的な生体内挙動を明らかにするには可逆的な蛍光プローブが必要とされる。そこで、申請者は第一章で新たに見出したキサンテン/ピロニン骨格を有する蛍光プローブの特性に着目し、RSSH 濃度変動を可視化する蛍光プローブを新規に開発した。申請者は様々な置換基を有する蛍光プローブをデザインし、反応性のチューニングを行い、得られた結果をもとに細胞イメージングに適した FRET 型の蛍光プローブを開発した。生細胞イメージングにおいて、数 μM レベルのパーサルファイドを定量的に検出が可能であり、さらには細胞内レドックス変動によって生じるパーサルファイド濃度変動をリアルタイムに可視化することを達成した。

第三章では、代謝経路において重要な役割を持つ脂肪酸 β 酸化活性を検出可能な蛍光プローブの開発を行った。これまでに、生細胞で脂肪酸 β 酸化活性を蛍光イメージングした例は報告がなく、代謝関連酵素を標的としたセンシング機構開発自体が手付かずのままである。そこで、申請者は β 酸化関連酵素の基質となる turn-on 型の蛍光プローブの開発を行った。蛍光色素に脂肪酸を導入した蛍光 OFF の蛍光プローブを多数合成し、脂肪酸 β 酸化の基質となる蛍光プローブの開発および構造最適化を行った結果、 β 酸化により蛍光が回復する turn-on となる蛍光プローブを見出した。HepG2 細胞を用いた蛍光イメージングにより、簡便かつ迅速に β 酸化活性を検出することに成功している。

以上のように、申請者の川越亮介氏は新規な反応メカニズムを用いた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代謝酵素活性を検出・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、生体機能解明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。