

審査の結果の要旨

氏名 井上 大輝

井上 大輝は「光誘起電子移動を作用原理とする可視光励起光ラベル化剤群の開発」と題し、以下の研究を行った。

光ラベル化剤とは、暗所では安定であるが光照射を受けると活性種を産生し、タンパク質などの生体分子と反応して共有結合を形成する分子である。代表的な光ラベル化剤として、アジド、ジアジリン、ベンゾフェノンが挙げられ、薬剤と相互作用するタンパク質の同定法である **photoaffinity labeling** に利用されている。既存の光ラベル化剤は、いずれも活性種酸性に紫外光を要するため、DNA 損傷や ROS 産生など細胞への障害が避けられない。可視光で機能する光ラベル化剤が開発されれば、より温和な条件での光ラベル化となるだけでなく、異なる波長の光によって複数の時空間での光ラベル化も可能となり、生命化学研究に有用なケミカルツールになり得ると考え、本研究において可視光励起光ラベル化剤群の研究を目指した。

ジアゾ基は、紫外光により励起され活性種カルベンを産生することが知られている。修士課程で井上は、ジアゾ基の共役系を **coumarin** に組み込んだ光ラベル化剤を開発し、400 nm の光で機能することを示した。更なる長波長化を目指し、**coumarin** よりも長波長光を吸収する **rhodamine** や **rhodol** を母核とした誘導体の開発を目指したが、暗所での安定性に問題があるためか、共役系を延長することでは更なる長波長化は達成できなかった。そこで井上は、あらたな長波長化戦略として、ジアゾ基が一電子還元によってカルベンを産生することに着目した。ジアゾ基は、分子間の1電子還元を初発としてカルベンを産生することが知られている。また井上の所属研究室では、**fluorescein** や **rhodamine** に代表されるような **xanthene** 系色素は、可視光を吸収する **xanthene** 部位と9位に結合する **benzene** 部位が共役系として独立しており、**benzene** 部位の還元電位に依存して、励起 **xanthene** 部位からの電子移動が起こることを見いだしてきた。これらの2つ知見から井上は、ジアゾ基からのカルベン産生は、**xanthene** 系色素の”分子内光誘起電子移動”による1電子還元によっても進行すると考え、可視光励起光ラベル化剤を開発することとした。

上述の分子設計に則り、**benzene** 部位にジアゾ構造を付与した **5A2Me-Fluor** および **5DA2Me-Fluor** を設計、合成した。光学特性を精査したところ、ジアゾの付与前後で可視光

領域の吸収スペクトルに変化は認められず、ジアゾ化により低蛍光性となることがわかった。光誘起電子移動による消光のため、Fluorescein 誘導体における benzene 部位の LUMO エネルギーレベルと蛍光量子収率の間には相関関係があることが知られており、5DA2Me の LUMO エネルギーレベルは光誘起電子移動が起こる閾値を超えていることから、ジアゾ化による消光は、光誘起電子移動によることが強く示唆された。続いて、493 nm の光照射によって光反応が進行するかを検証したところ、光照射依存的に 5DA2Me-Fluo が消失し、ジアゾ基がヒドロキシ基となった光反応生成物が認められた。また、各光照射時間ごとに蛍光スペクトルを取得したところ、光照射時間依存的に蛍光強度が増大することが明らかとなった。これは低蛍光性の 5DA2Me-Fluo から、強蛍光性の光反応生成物が生成したことに起因すると考えられる。最後に、タンパク質を光ラベル化できるかを精製タンパク質 BSA を用いて検証した結果、光照射を行った場合にのみ BSA のバンドから蛍光が認められ、5DA2Me-Fluo が光反応性基として機能することが明らかとなった。また、更なる長波長化を目指し、色素母核を rhodamine または Si-fluorescein に変更したところ、それぞれ 550 nm, 600 nm の光で機能する光反応性基の開発に成功した。

井上は次に、開発した光反応性基が photoaffinity labeling に適用できるかを検証した。標的タンパク質は CA II, リガンドは sulfonamide を採用し、リンカー長の異なる光ラベル化剤を計 3 種類合成した。合成したラベル化剤を精製 CA II と混合し、光照射を行ったところ、リンカー長 $n = 1$ の光ラベル化剤で最も強い蛍光が認められた。続いて、living RBCs (red blood cells) の内在性 CA II の選択的光ラベル化を試みた。その結果、living RBCs の内在性 CA II を選択的に光ラベル化することができ、そのバンドは阻害剤 EZA (ethoxzolamide) の存在下で消失することを確認し、開発した光反応性基が生細胞に適用できることが示された。

更に井上は、5DA2Me-Fluo は光照射依存的に蛍光性を回復し、同時にタンパク質をラベル化する (Figure 2-h) 特性を有することを利用し、一細胞蛍光標識に応用できると考えた。HeLa cells に 5DA2Me-Fluo を添加した後、一細胞だけに 488 nm 光照射を行うことで、一細胞を選択的に蛍光標識できることを示した。さらに、得られた蛍光シグナルは洗浄操作や固定操作に対して耐性があり、細胞内のタンパク質を網羅的に光ラベル化することで細胞内滞留性を獲得していることが示唆された。

以上のように井上大輝は、光誘起電子移動を駆使し、500~600 nm の可視光で機能する光反応性基の開発に成功した。さらに、開発した光反応性基が photoaffinity labeling および一細胞蛍光標識に応用できることを示した。これにより、異なる時刻、空間での光ラベル化によるオミックス解析や、細胞系譜解析などに応用可能となり、生命科学の発展へと寄与することが強く期待されることから、博士(薬科学)の授与にふさわしいものと判断した。