

〔別紙 2〕

審査の結果の要旨

氏名 岩木 慎平

岩木慎平は「*N*-Ph rhodamine 類の消光機構の解析と蛍光プローブ開発への応用」と題し、以下の研究を行った。Rhodamine とは、キサントレン環の 3,6 位に N 原子が結合した色素の総称である。Rhodamine 類は高い蛍光量子収率、強い光退色耐性とともにも水溶性を併せ持つ蛍光色素であり、蛍光プローブの母核として汎用されてきた。一方、蛍光消光団である QSY 類に代表される rhodamine の N 原子に Ph 基が結合した誘導体(これを *N*-Ph rhodamine 類とする)は、rhodamine と極めて類似した構造であるにも関わらず、無蛍光性であることが知られている。これまで *N*-Ph rhodamine 類について、詳細な消光機構に関しては調べられてこなかった。しかし近年、*N*-Ph rhodamine 類を母核とした蛍光プローブの開発が報告されてきている。本研究において岩木は、この *N*-Ph rhodamine 類の無蛍光性のメカニズムの解析を行い、得られた知見を基に論理的に *N*-Ph rhodamine を母核とした新たな蛍光プローブの開発を行った。具体的には以下の 3 つの研究成果を達成した。

(1) *N*-Ph rhodamine 類の消光機構の解析

N-Ph rhodamine 類は、高粘性溶媒の glycerol 中にて蛍光性になることが知られている。このことから励起状態での分子の立体配座の変化が蛍光消光において重要であると考えた。そこで、時間依存密度汎関数法(TD-DFT)により Ph-DER の励起状態での最安定構造を計算した。その結果、キサントレン環-N 原子間の結合が 90 度ねじれた構造が励起状態での最安定構造となり、その際に強い分子内電荷移動(ICT)状態を形成するという計算結果が得られた。すなわち、 $S_1 \rightarrow S_0$ が CT 遷移になることで振動子強度が 0 となり、結果として無蛍光性になることが示唆された。そこでこの仮説を検証するため、「結合のねじれ(twist)」と「ICT」の二つに着目して誘導体を合成し、それらの光学特性を精査した。まずキサントレン環-N 原子間の結合の「twist」の影響に関して検討を行うため、分子内に架橋構造を導入した誘導体を合成・評価した。その結果、キサントレン環-N 原子間の結合を五員環構造によって架橋した誘導体 Ph-DEIR において強蛍光性になることを見出した。これにより蛍光消光において「twist」が重要であることが支持された。さらに「ICT」の影響について調べるため、分子内電荷移動における donor 構造に相当するアニリン様構造及び acceptor 構造に相当するキサントレン構造を様々に変化させた誘導体群を合成・評価した。その結果、donor 構造の電子供与能が高いほど、また acceptor 構造の電子受容能が高いほど蛍光量子収率が低下することが分かり、蛍光消光において「ICT」が重要であることが支持された。以上の実験結果から、「*N*-Ph rhodamine 類において光励起によってキサントレン環-N 原子間の結合のねじれが生じ

ICT 状態を形成した後、高速の無輻射過程によって素早く基底状態へと戻る」と考察した。

(2) HaloTag 検出赤色蛍光プローブの開発

上記の検討から *N*-Ph rhodamine 類は励起状態における「結合のねじれ」によって消光することが示唆された。この特性を利用することで、標的タンパク質との結合により「結合のねじれ」を抑制し蛍光性へと変化する蛍光プローブの新たな分子設計法になり得ると岩木は考えた。具体的な標的分子として、タグタンパク質として汎用されている HaloTag[®]に着目した。HaloTag とは、クロロアルカン構造 (HaloTag リガンド) を有する有機小分子と共有結合を形成する改変酵素であり、観察したいタンパク質と HaloTag を融合することで標的タンパク質の局在や発現量の変化などを解析できる。HaloTag と結合することで無蛍光性から蛍光性へと変化する蛍光プローブを開発することで、サンプル数の多い生化学実験等においてしばしば問題になる未反応の蛍光プローブの「洗浄操作」を行うことなく、タンパク質の動的な挙動を解析することができる。上記の考えに基づき、*N*-Ph rhodamine の N 原子に HaloTag リガンド構造を導入した Halo rhodamine-2 を分子設計・合成した。Halo rhodamine-2 は HaloTag との反応により約 10 倍の蛍光増大を示したものの、その蛍光量子収率は HaloTag 結合時でも 0.09 と十分な大きさではなかった。この蛍光量子収率の低さを改善するため、消光機構の解析により得られた知見を基に *N*-Ph rhodamine のキサンテン環の構造(acceptor 構造)を変化させた Halo rhodamine-4 を分子設計・合成した。この誘導体化により HaloTag との反応時における蛍光量子収率を 0.33 と向上させることに成功した。さらに HaloTag を細胞表面に一過性に発現させた HEK293T 細胞に Halo rhodamine-4 を添加したところ、10 分程度で HaloTag が選択的に蛍光ラベル化され、洗浄操作を行うことなく蛍光顕微鏡にて HaloTag を観察することに成功した。以上のように、*N*-Ph rhodamine の消光機構を基に実用的な HaloTag 検出蛍光プローブの開発に成功した。

(3) SNAP-tag 検出赤色蛍光プローブの開発

「結合のねじれ」の抑制により標的タンパク質との「結合」を検出する分子設計戦略は、HaloTag のみならず、他の標的生体分子への応用も可能であると考えられた。そこで、この分子設計戦略の汎用性を示すため、汎用されるタグタンパク質の一つである SNAP-tag を検出する蛍光プローブの開発を行った。具体的には SNAP-tag のリガンドである benzylguanine 構造を *N*-Ph rhodamine の N 原子に導入した SNAP rhodamine-4 を分子設計・合成した。SNAP rhodamine-4 は SNAP-tag との反応により約 10 倍の蛍光増大を示し、これを用いて細胞膜表面に発現した SNAP-tag を洗浄操作することなく蛍光顕微鏡下にて観察することに成功した。このように、「結合のねじれ」を制御した分子設計戦略の汎用性を示すことに成功した。

以上、本研究において岩木は、*N*-Ph rhodamine 類の無蛍光性を「キサンテン環-N 原子間の結合のねじれに付随して生じる ICT 状態の形成」により説明できることを見出し、その知見を基に実用的な HaloTag 及び SNAP-tag を検出する蛍光プローブの開発に成功した。*N*-Ph rhodamine 類の「ねじれ」の抑制を利用した分子設計戦略は、内在性のタンパク質、DNA、RNA 等にも応用可能な汎用性の高い手法であり、今後の生命科学研究の発展に貢献

すると期待される。

以上の業績は、薬学分野におけるバイオイメージングの進歩に顕著に寄与するものであり、博士（薬科学）の授与にふさわしいものと判断した。