

論文内容の要旨

論文題目 非対称 Si ローダミン蛍光色素群の開発と
レシオ型 pH 感受性蛍光プローブへの応用

氏 名 鏡 味 優

【序論】

ローダミン蛍光色素のキサンテン環 10 位の酸素原子を SiMe_2 に置換した近赤外蛍光団「Si ローダミン (SiR)」類は、高い蛍光量子収率及び高い光褪色耐性を備えたバイオイメージングに有用な長波長蛍光色素である (Figure 1)。そのため、本色素母核を利用した蛍光標識試薬や蛍光プローブが近年盛んに報告されている。これまでにローダミンを色素母核とした蛍光プローブ開発においては、キサンテン環の左右のアミノ基に異なる置換基を有する非対称蛍光団を利用することで、対称な蛍光団を用いるよりも標的分子に対して高い S/N を示す蛍光プローブの開発が可能になっている。一方、Si 原子を含むキサンテン環を非対称に構築する合成法はこれまでに報告されていない。そこで本研究では、近赤外蛍光プローブの分子設計法の拡充を目指し、「非対称 SiR」類の汎用性の高い合成法の開発及び、非対称 SiR を色素母核とした近赤外蛍光プローブの開発を行った。

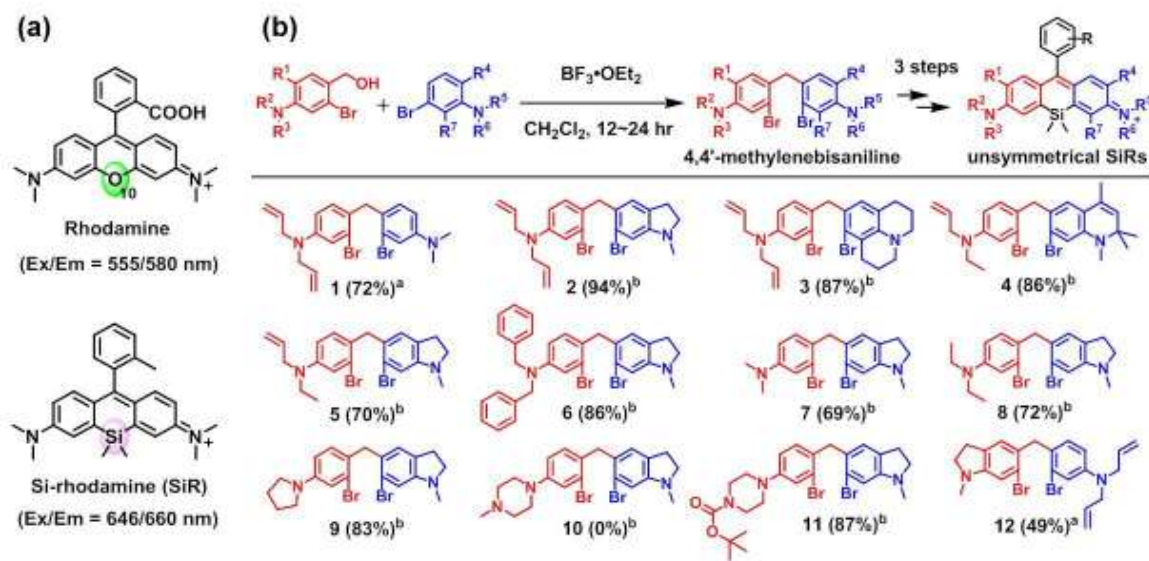


Figure 1. (a) Chemical structures of Rhodamine and SiR. (b) Synthesis of unsymmetrical bisanilines. Reactions were performed at 35°C^a) or r.t.^b), and higher isolated yields were shown.

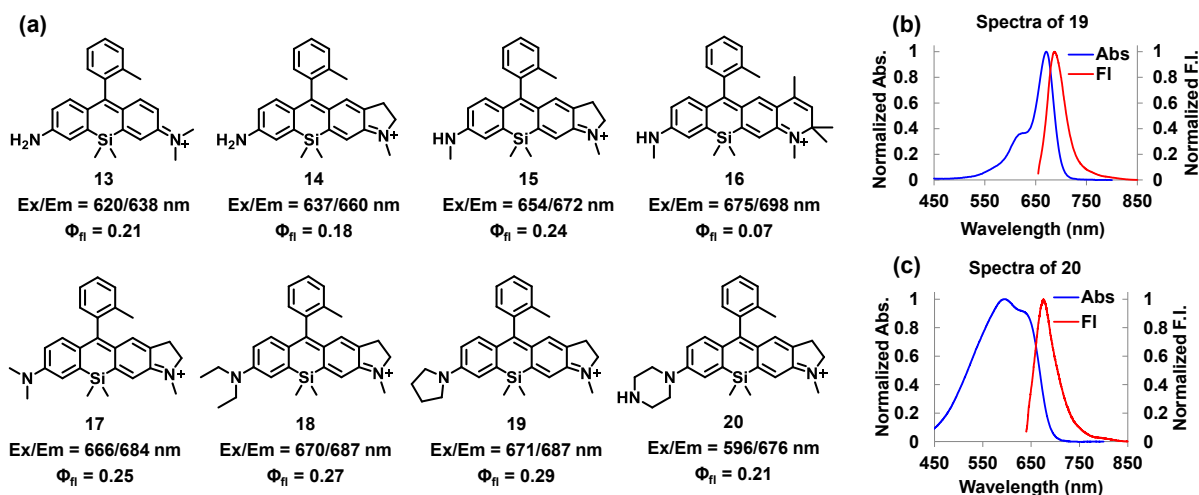


Figure 2. Chemical structures and photophysical properties of unsymmetrical SiRs. (a) Photophysical properties of SiRs and (b,c) normalized absorption and emission spectra of **19** and **20** were measured in 100 mM NaPi buffer (pH 7.4) containing 1% DMSO.

【本論】

1. 非対称 SiR 類の合成法の開発

既存の SiR 合成法を参考に、非対称 SiR 類の中間体となる様々なアルキル置換基を有する 4,4'-メチレンビスアニリン類の合成反応の開発を行った。検討の結果、ヒドロキシメチル基を有するアニリンに対し、*N,N*-ジアルキルアニリンとルイス酸である $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ を添加することで、反応を高収率に進行させることが可能であった (Figure 1b)。本反応を蛍光団構築の鍵反応に利用することで、実際にメチレンビスアニリンから対応する非対称 SiR 類の合成に成功した (Figure 2a)。以上のように、様々な置換基を有する非対称 SiR 類の合成法の確立に成功した。キサンテン環に任意の置換基を非対称に導入できるようになったため、近赤外蛍光プローブの開発において吸収・蛍光波長の制御や生体分子との反応性の最適化が容易に行えるようになった。

2. 非対称 SiR を色素母核としたレシオ型 pH プローブの開発

様々な置換基を有する非対称 SiR の光学特性を精査したところ、キサンテン環の一方のアミノ基にピペラジン環構造を有する化合物 **20** はピロリジン環構造を有する化合物 **19** と比較して、pH 7.4 における極大吸収波長が大きく短波長化していた (Figure 2b,c)。そこで、**20** の吸収・蛍光スペクトルの pH 依存性を調べたところ、ピペラジン環を有する非対称 SiR はピペラジン環の脂肪族アミノ基がプロトン化されることで、蛍光性を保ったまま吸収波長が約 80 nm と大きく短波長化することを見出した。これまでに pH 変化に応じて大きな吸収波長変化を示すローダミン系蛍光色素の報告はなく、本分子はローダミンの特徴である高い光褪色耐性を持った有用な pH 感受性プローブの色素母核となりうると考えた。そこで、本色素母核を用いて、異なる二波長で励起した際の蛍光強度比 (レシオ) の変化を測定することで細胞内の酸性 pH を定量的に測定できる二波長励起一波長測光用のレシオ型 pH プローブの開発を行った。酸性オルガネラの pH 測定を行うための蛍光プローブとしては、pH 5~7 の範囲でレシオが大きく変化する

pK_a を有し、特定の酸性オルガネラにプローブを送達できることが必要である。ピペラジン環アミノ基上に電子求引性置換基を有する誘導体を種々合成し検討した結果、要件を満たす pH プローブ「SiRpH5」の開発に成功した(Figure 3)。SiRpH5 は pK_a の調整部位及び水溶性化部位として 2,4-ジスルホベンジル基を、また特定のオルガネラにプローブを送達するためにタンパク質等の生体高分子への標識部位としてカルボキシ基を有している。SiRpH5 は酸性では 580 nm に、中性では 660 nm に極大励起波長を有し(Figure 3b)、そのレシオ値変化の pK_a は 6.1 と pH 5~7 の酸性オルガネラを可視化するのに適した値であった(Figure 3c)。また、SiRpH5 はローダミンを色素母核としたレシオ型 pH プローブであるため、既存のレシオ型 pH プローブである SNARF-1 や BCECF と比較して光褪色耐性に優れたレシオ型 pH プローブであった(Figure 3d)。

3. SiRpH5 による細胞内オルガネラのレシオ pH イメージング

細胞内の各オルガネラは固有の pH を持つことで種々の化学反応を制御している。そのため、オルガネラ固有の pH を測定することは細胞内で起きている生命現象の理解のために極めて重要である。そこで、特定のオルガネラに局在する高分子であるデキストラン (Dex) または鉄輸送タンパク質トランスフェリン (Tfn) に SiRpH5 を標識することで、本プローブが生細胞の pH イメージングに適応できるか検討を行った。

デキストランは、細胞内にエンドサイトーシスされることで酸性オルガネラであるリソソームに集積することが知られている。そこで、リソソームの pH の測定プローブとして、SiRpH5 をデキストランに結合させた SiRpH5-Dex を作成し、本プローブを MEF 細胞の外液に添加し、580 nm と 660 nm の二波長で励起

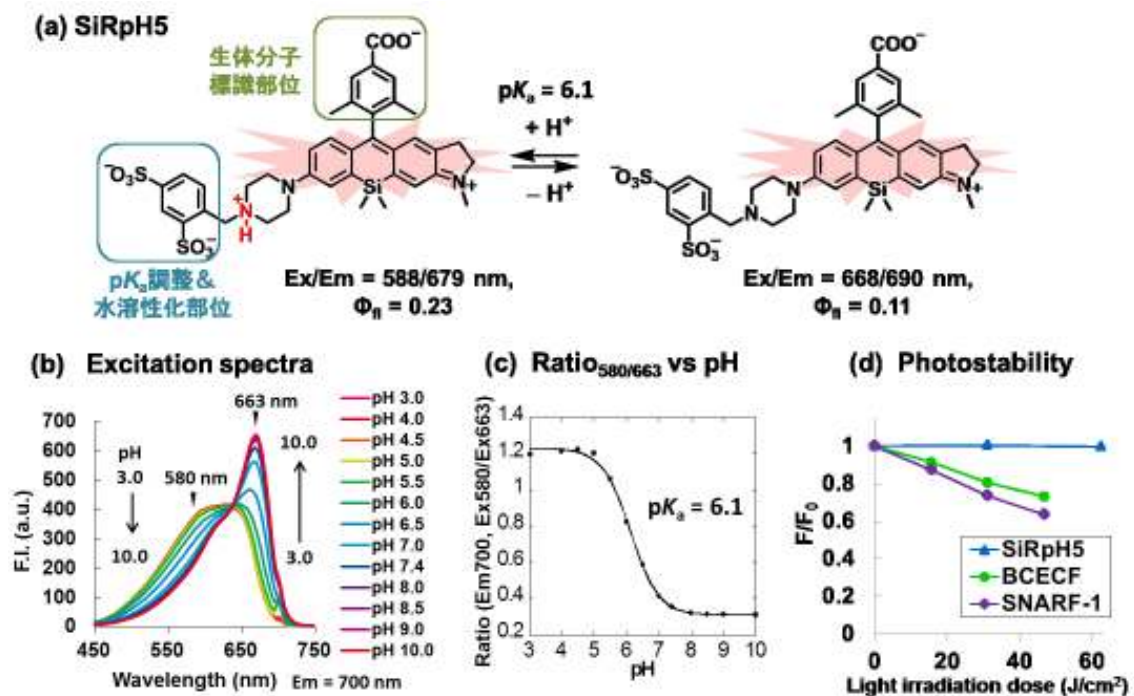


Figure 3. (a) Molecular design of SiRpH5. (b) Excitation spectra and (c) plots of fluorescence ratio of SiRpH5 at various pH values in NaPi buffer. (d) Fluorescence intensity changes of ratiometric pH sensors under the light irradiation in NaPi buffer (pH 7.4).

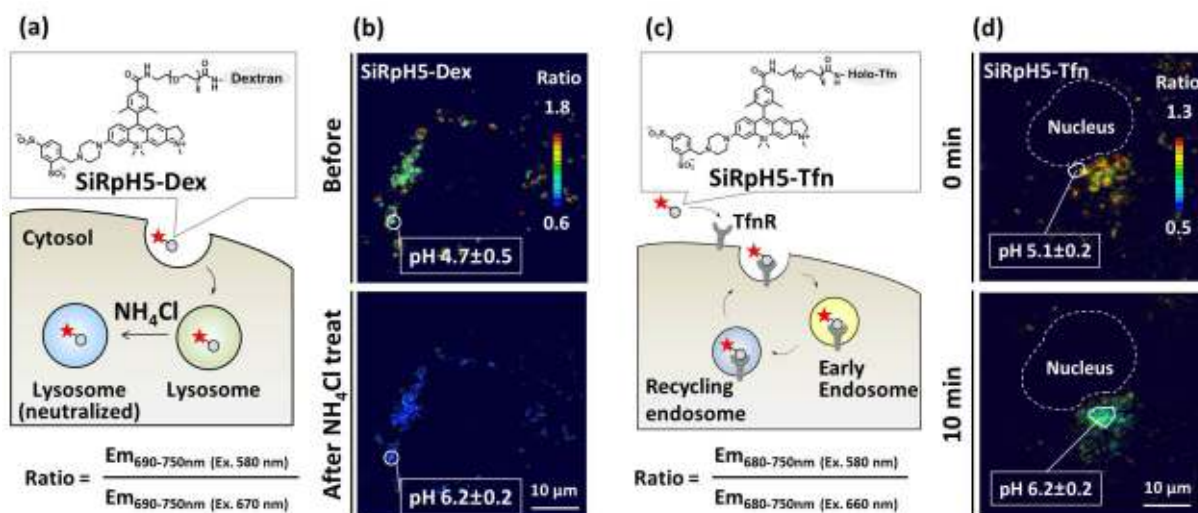


Figure 4. (a,b) Measurement of lysosomal pH changes with SiRpH5-Dex. (c,d) Measurement of pH changes in the trafficking of transferrin.

してレシオイメージングを行った(Figure 4a)。固定細胞を用いて pH の検量線を作成し、観測されたレシオ値を基に pH の定量を行ったところ、リソソーム塩基性化試薬である NH_4Cl の添加に伴い、リソソームの pH が約 4.7 から約 6.2 まで塩基性化する様子を可視化することに成功した(Figure 4b)。

一方、Tfn は Tfn 受容体(TfnR)を介してエンドサイトーシスされ、初期エンドソームからリサイクリングエンドソームへと迅速に輸送されることが知られている(Figure 4c)。そこで、鉄結合型の Holo-Tfn に SiRpH5 を標識した SiRpH5-Tfn を作成し、本プローブを COS-1 細胞外液に添加して Tfn の輸送過程のタイムラプスイメージングを行った。固定細胞を用いて pH の検量線を作成し、pH の定量を行ったところ、Tfn は輸送開始直後には pH が約 5.1 の初期エンドソームに局在し、10 分間かけて pH が約 6.2 のリサイクリングエンドソームへと輸送される様子を可視化することに成功した(Figure 4d)。

以上のように、開発したプローブを用いることで、リソソーム、初期エンドソーム、リサイクリングエンドソーム等のオルガネラの pH を定量的に測定することに成功した。また、本プローブは近赤外蛍光性であるため、GFP、YFP といった汎用される緑色から黄色の蛍光タンパク質と同時に用いることが可能である。それによって、様々な生体分子の挙動と pH 変化を同時に可視化することで、pH に関わる生命現象の解明へと貢献することが期待される。

【結論】

私は本研究において、様々な置換基を有する非対称 SiR 類の合成法を確立することにより、近赤外蛍光プローブの分子設計の幅を広げることに成功した。今後、非対称 SiR を色素母核とした S/N の高い近赤外蛍光プローブの開発が期待される。また、ピペラジン環を有する非対称 SiR が pH に依存した吸収波長変化を示すことを見出し、その特性を利用することでローダミン系蛍光色素を母核としたレシオ型 pH プローブの開発に世界で初めて成功した。今後、細胞内 pH の関わる様々な生命現象の解明に本プローブが貢献することが期待される。