

〔別紙 2〕

審査の結果の要旨

氏名 鏡味 優

鏡味優は「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」と題し、以下の研究を行った。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蛍光イメージングに有用な長波長蛍光色素である。特にそれら蛍光波長領域は、動物個体での蛍光イメージングやマルチカラーイメージングに有用である。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母核とした蛍光プローブ開発においては、その蛍光団部位であるキサンテン環を非対称に構築することで、キサンテン環部位に蛍光の off/on 制御や生体分子への標識などの複数の機能を組み込むことや、反応後の蛍光上昇を向上させるなど優れた蛍光プローブの分子設計を可能とした。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。そこで鏡味は、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 を母核とした近赤外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) 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と、それよりも電子供与性の高い *N,N*-ジアルキルアニリンを用いて、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。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。以上のように、鏡味は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。これによって、キサンテン環に任意の置換基を非対称に導入可能になったため、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など複数の機能を組み込むことを可能にした。

(2) 非対称 SiR を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ることに鏡味は気付いた。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示す有用な pH 感受性プローブの母核になりうると考えられた。そこで、本母核を用いて、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、①pH 5~7 の範囲でレシオが大きく変化する pK_a を有すること、②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。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、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。また、SiRpH5 はローダミン蛍光色素を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。

(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、本プローブを用いてオルガネラのライブ pH イメージングを行った。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 を測定するためのプローブとして、SiRpH5 をデキストランに結合させた SiRpH5-Dex を作製した。MEF 細胞外液に本プローブを添加し、580 nm と 660 nm の二波長で励起してレシオイメージングを行ったところ、後期エンドソーム及びリソソームのマーカーである Venus-Vamp7 と共局在する部位から酸性を示す高いレシオ値が観測され、さらに NH_4Cl 添加に伴うリソソーム pH の塩基性化の可視化に成功した。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 (EE) からリサイクリングエンドソーム (RE) へと迅速に輸送されることが知られている。Holo-Tfn に SiRpH5 を標識した SiRpH5-Tfn を COS-1 細胞外液に添加してレシオイメージングを行ったところ、RE マーカーである GFP-Rab11 と共局在する部位から中程度のレシオ値が、またその周辺からはより酸性度の高いレシオ値が観測された。固定細胞を用いて pH とレシオ値の検量線を作成し、観測されたレシオ値を基に pH の定量を行ったところ、COS-1 細胞の RE の pH は 5.8 程度であり、その周辺に存在する EE の pH は 5.1 程度であると算出された。

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、EE、RE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が可能であり、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。

以上、本研究において鏡味は、様々な置換基を有する非対称 SiR 類の合成法を確立し、近赤外蛍光プローブの分子設計法の幅を広げること成功した。また、その際に見出した非対称 SiR の光学特性からレシオ型の pH プローブの開発に成功した。開発した pH プローブはローダミン系蛍光色素を母核とした初めてのレシオ型 pH プローブであり、本プローブを用いることで生命現象における長時間に渡る pH 変化の可視化や、その近赤外波長という長い蛍光波長を利用して他の生体分子の挙動と同時に pH 変化を可視化できるため、今後の細胞内 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。

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。