

[別紙 2]

## 審査の結果の要旨

氏名 沼澤 宏治

沼澤宏治は「生細胞におけるローダミン色素の局在コントロールとその蛍光プローブ開発への応用」と題し、以下の研究を行った。ローダミン類とは、キサンテン環の3,6位に窒素原子が結合した色素の総称であり、高い蛍光量子収率や高い光退色耐性、高い水溶性に加えて、その分子構造を修飾することによって幅広い蛍光波長を有するという特長を持つ。そのため、これまでに様々な蛍光プローブの母核や蛍光ラベル化試薬として用いられてきた。特にキサンテン環の10位のO原子を他の原子に置換したローダミン類は、近赤外にまで達する長い蛍光波長を有し、動物個体への応用や複数の観察対象を同時に可視化する技術であるマルチカラーイメージング技術に貢献している。本研究において沼澤は、ローダミン類を用いた蛍光プローブの分子設計の拡充及び、それを用いた新たな近赤外蛍光プローブの開発を行った。具体的には以下の2つの研究成果を達成した。

### (1) 細胞質集積性近赤外蛍光 $\text{Ca}^{2+}$ プローブの開発

カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) は神経伝達や筋収縮など様々な生命現象におけるセカンドメッセンジャーとして重要な役割を担っており、細胞質における  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度変動を可視化することは生命現象を解明する上で極めて重要である。 $\text{Ca}^{2+}$  が関わる生命現象には多く生体分子が関与するため、近赤外蛍光を有する細胞質集積性の  $\text{Ca}^{2+}$  プローブはマルチカラーイメージングへと大きく貢献すると考えられる。しかしながら、近年当研究室にてこれまでに開発された近赤外蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  プローブ CaSiR-1 はリソソームへの局在性を示している。そこで、細胞質集積性を示す近赤外蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  プローブの開発を行った。

まず、その前段階として細胞質に集積するローダミン色素の開発に着手した。一般にローダミン類はキサンテン環のカチオンによりミトコンドリアに集積することが知られている。しかしながら、近年、ベンゼン環2位にカルボキシ基を有する Si-ローダミン類を母核とした蛍光プローブが細胞質に存在するがん関連タンパク質を染色するとの報告がされており (*Bioconjugate Chem.*, 2015, 26, 1513-1518.)、色素分子全体の電荷を0にしたことが細胞質への集積に効果的であったと考えた。そこで、ベンゼン環の様々な位置にカルボキシ基を導入した Si-ローダミン類を合成し生細胞へと応用したところ、ベンゼン環部位2位にカルボキシ基を有する Si-ローダミン類は分子内に水溶性置換基であるカルボキシ基を有するにもかかわらず、細胞膜透過性が高いことが分かった。また、この色素はベンゼン環部位2位にメチル基を有する色素よりも水溶液中における吸光度及び蛍光強度が小さいことから、この色素の膜透過性の高さはスピロ環化体を形成するためであると考えた。これら知見を

もとに、構造修飾によってローダミン類を細胞質へと集積させることを試みた。分子デザインとして、蛍光色素の分子全体の電荷を 0 にするためにベンゼン環部位 2 位にカルボキシ基の導入を行った。また、色素分子の細胞内への導入効率と細胞内滞留性の向上のため、アセトキシメチル基 (AM 基) で保護したイミノ二酢酸部位を導入した。AM 基によって保護された色素はその脂溶性から細胞膜透過性が向上するとともに、細胞内へと導入された後は細胞内エステラーゼにより AM 基が切断され、細胞外への漏出性が低下し細胞内に滞留する分子設計となっている。これらローダミン蛍光色素を HeLa 細胞へと応用し蛍光イメージングを行ったところ、期待通りに細胞質から強い蛍光が観察された。一方、ベンゼン環部位 2 位にメチル基を導入したローダミン色素はミトコンドリア及びリソソームへと集積性を示したことから、ベンゼン環部位のカルボキシ基の導入はローダミン色素の細胞内局在において重要な影響を与えたと考えられた。

以上の知見をもとに、ベンゼン環部位 2 位にカルボキシ基を持つ Si-ローダミンを蛍光団母核として細胞質の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変動を可視化するプローブ CaSiR-2 の分子設計・合成を行った。開発したプローブは  $\text{Ca}^{2+}$  の存在によって 26 倍の蛍光上昇を示した。次に、その AM 保護体である CaSiR-2 AM を HeLa 細胞へと応用したところ、期待通りに細胞質及び核へと集積し、リソソームへの集積はほとんど見られなかった。また、本プローブはヒスタミン刺激による細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変動を高い S/N 比で捉えることに成功した。さらに、CaSiR-2 AM をラット脳スライスへと応用したところ、CaSiR-1 AM と比較して神経細胞の自然発火を S/N 比高く捉えることに成功した。CaSiR-1 AM はラット脳スライスにおいてもリソソームへと局在することが観察されることから、ラット脳スライス切片における CaSiR-2 AM の高い S/N 比は蛍光プローブを細胞質に集積させたことによるものと考えられた。

## (2) 葉酸受容体検出蛍光プローブ FolateSiR-1 の開発と応用

ローダミン類を細胞質以外に集積させる試みとして、細胞膜上に発現する葉酸受容体を可視化する蛍光プローブの開発を行った。葉酸受容体は、卵巣がんや子宮内膜がんにおける過剰発現やマウス神経管閉鎖部での部位特異的な発現が報告されており、臨床医学・生命科学研究において重要なターゲットである。蛍光プローブの分子デザインとしては、蛍光団母核として動物個体への応用を考慮して近赤外光領域に蛍光を有する Si-ローダミン類を用い、葉酸受容体に対するリガンドである葉酸と蛍光団とを水溶性の高いペプチドリンカーで結合させた分子をデザイン・合成した。また、Si-ローダミン色素の構造として、ベンゼン環部位 2 位にカルボキシ基を持つ色素を母核とした FolateSiR-1 と、同じく 2 位にメチル基を持つ色素を母核とした FolateSiR-2 を合成した。両プローブを葉酸受容体が過剰発現している KB 細胞へと応用した結果、FolateSiR-1 は細胞膜上のみから蛍光が観察された。また、この蛍光は 1 mM 葉酸による競合阻害によって消失したため、FolateSiR-1 は葉酸受容体を選択的に可視化していると考えられた。一方、FolateSiR-2 は細胞膜上の蛍光に加え、細胞内からも点状の蛍光が観察された。この点状の蛍光は葉酸競合実験においても消失しないことから、一部の FolateSiR-2 は葉酸受容体非依存的に細胞内に取り込まれていると考

えられた。また、これら両プローブの蛍光団母核に相当する色素を、ジオキサンを加えた水溶液で吸収スペクトルを測定したところ、FolateSiR-2 の蛍光団母核の色素ではジオキサンの濃度上昇に伴い吸光度の変化が生じなかったのに対し、FolateSiR-1 の蛍光母核の色素ではジオキサンの濃度上昇に伴い吸光度が低下したことから、FolateSiR-1 は細胞内へ取り込まれた場合に、その脂溶性環境によってスピロ環化体を形成するために細胞内から蛍光が観察されないものと考えられた。

さらに、開発したプローブをより高次の系へと応用した。具体的には、マウス胚の染色へと応用したところ、FolateSiR-2 においては胚全体から点状の蛍光が観察されたのに対し、FolateSiR-1 は folate receptor  $\alpha$  が高発現していると報告されている神経管閉鎖部において強い蛍光が観察された。また、KB 細胞を用いた腫瘍モデルマウスへと応用したところ、FolateSiR-2 は投与後 6 時間経過後も組織非特異的なバックグラウンド蛍光が観察された一方で、FolateSiR-1 はバックグラウンド蛍光の消失が早く、プローブ投与後わずか 30 分で高い S/N 比で腫瘍の蛍光観察が可能であった。

以上、本研究において沼澤は、ベンゼン環部位 2 位にカルボキシ基を有するローダミン色素の構造を利用することで、従来のローダミン色素とは異なる細胞内での局在を示す蛍光プローブの開発に成功した。具体的には、細胞質において  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度変動を S/N 比高く捉えることができる実用的な近赤外蛍光プローブ及び、細胞膜上の葉酸受容体を選択的に可視化できる近赤外蛍光プローブの開発に成功した。本研究における知見は、標的とする生体分子を生細胞の適切な場所で可視化することがより実用的な蛍光プローブの開発へとつながることを示すものであり、今後、蛍光プローブ開発に大きく貢献していくことが期待される。

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。