

審査の結果の要旨

氏名 辻 俊一

本論文は温度応答性高分子であるアクリルアミド誘導体高分子を用いた細胞内温度計測用の蛍光高分子の開発とその高分子を用いた褐色脂肪細胞の熱産生測定法への応用に関して述べられており、主要な 4 テーマを記述した章から構成されている。

第一章は、細胞内温度計測、特に蛍光法を用いた分析技術課題について述べた序章である。細胞内温度計測に用いる分析技術には、温度変化に対する優れた感度と他の物性変化に応答しない選択性が必要である。低分子蛍光色素や蛍光タンパク質などの幾つかの候補技術の中から、その 2 つの条件を強く充たす技術として、アクリルアミド系高分子と環境応答性蛍光色素を組み合わせた蛍光高分子があることを示している。しかしながら、この蛍光高分子温度計を用いた場合には、分析手法の汎用性という点で課題があった。具体的には、蛍光高分子温度計の細胞内導入に特別な装置・技術を要するマイクロインジェクション法が必要であること、そして精度の高い温度計測に蛍光寿命測定装置を使わなければならないことが、解決すべき課題として掲げられ、それぞれ本論文の第二章と第三章で、その解決に取り組んでいる。

第二章においては、N-アクリルアミド誘導体の感温性モノマーと環境応答性蛍光団ベンゾフラザン骨格を有した蛍光性モノマーを基本構成とした蛍光高分子温度計に新たに 4 級アンモニウム構造を持つカチオン性モノマーを組み込むことによって、混ぜるだけで自発的に細胞内移行する機能を持った蛍光高分子温度計の創出に成功したことが記述されている。細胞内に移行できる蛍光高分子温度計の 1 つである NN-AP2.5 は、25℃から 35℃で蛍光強度が約 2 倍、蛍光寿命も 6.2 ns から 8.6 ns へと変化し、最高で 0.09℃ものわずかな酵母細胞の温度差を検出できるという高い感度を持っていた。酵母細胞のみならず、哺乳類細胞といった幅広い細胞への細胞内温度計測へと適用可能であり、特に酵母細胞内の温度計測は本論文で初めて報告された技術であった。

第三章においては、第二章で開発したカチオン性蛍光温度計を基に検出法の改良を行ったことが述べられている。第二章までの研究では、濃度や励起強度の影響を受けない測定パラメータとして蛍光寿命の選択が不可欠で、高価な蛍光寿命計測装置が必要となるなど汎用性に課題が残っていた。本論文では、蛍光寿命に変わる新たなパラメータとして蛍光強度比を選択し、温度が変化しても一定の蛍光強度を放出するリファレンスとなるような新規の蛍光色素ユニット BODIPY-AA を合成した。第二章で合成したカチオン性蛍光高分子温度計の構成ユニットに加え、BODIPY-AA を追加ユニットとして高分子合成を行い、レシオ型蛍光高分子温度計を完成させた。レシオ型蛍光高分子温度計の MOLT-4 細胞内での温度分解能（区別できる最小の温度差）は、28–44℃の温度範囲で 0.03–0.20℃と非常に高い値を示し、高感度温度計測が可能であることを示している。また、蛍光顕微鏡観察により、HEK293T 細胞の細胞内温度分布測定にも成功しており、核内が細胞質よりも高

温であることを示す像も得ている。レシオ型蛍光高分子温度計の開発により、一般的な蛍光光度計や蛍光顕微鏡を用いて、生細胞内温度や温度分布の高精度計測が可能になったことが示されている。

第四章においては、第三章で開発したレシオ型蛍光高分子温度計を、熱産生を主の機能とする褐色脂肪細胞へと適用した。 β -アドレナリン受容体(β -AR)アゴニストであるノルエピネフリン刺激は、褐色脂肪細胞内温度を、 β 3-AR 特異的アゴニストである CL316.243 刺激時と同程度に上昇させた。対照的に、 β -AR アゴニストはいずれも、未分化細胞において細胞内温度上昇を誘導しなかった。つまり、本論文では、成熟褐色脂肪細胞と未分化細胞との間で、 β -AR アゴニスト刺激に対する細胞内温度応答が異なることを明らかにし、細胞の表現型として細胞内温度の差異があることを明らかにした。

本論文は、以上で示した通り、細胞内温度計測を実用的に行うことができる蛍光高分子を基にした分析技術の構築に成功している。その実用性は、本論文で合成した蛍光高分子が試薬として市販化されていることから実証されている。今後は抗肥満薬の創薬や抗癌治療の最適化といった様々な産業分野で細胞内温度という指標が活用されていくことが期待され、本論文の技術がその発展に大きく寄与するものと考えられる。よって審査委員一同は、博士（医科学）の学位を授与できると認める。

以上 1812 字