

審査の結果の要旨

氏名 國府田 絹子

本研究は、蛍光強度イメージング法に比べて実験条件による影響が少ない蛍光寿命を画像化する蛍光寿命イメージング法 (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy; FLIM) により、細胞内微小環境における酸性 pH の可視化・評価を可能とする、一波長励起一波長測光型の有機小分子蛍光寿命イメージングプローブを新たに開発し、生細胞における細胞内小胞の pH をより正確に測定する手法を確立したものであり、下記の結果を得ている。

1. pH 変化に伴い適切な蛍光寿命変化を示す蛍光プローブの蛍光寿命制御法として、光誘起電子移動 (Photoinduced Electron Transfer; PeT) に着目し、PeT による消光の度合いを調整することにより、プロトン化前後の各分子フォームが検出可能な蛍光量子収率を保持するような設計を行い、各分子フォーム固有の蛍光寿命及びその存在割合から算出した平均蛍光寿命 $\langle\tau\rangle$ と pH を対応させることにより、プローブの周囲環境 pH の定量を実現した。
2. 新規開発蛍光プローブは、PeT を動作原理として、光褪色耐性に優れているローダミン骨格を持つ蛍光団に pH 感受性の電子供与基として各種アニリンを導入した一連の誘導体である。各種アミンを、細胞膜透過型のプローブとして 5-TAMRA に、また細胞膜非透過型のプローブとして Alexa488 に導入した一連の誘導体を有機合成し、その特性を精査した結果、適度な消光を生じさせる電子供与基にはアニリン誘導体が適しており、また、アニリン誘導体の窒素上置換基及びその配向性により、PeT による消光の度合い、 $pK_a$  及び蛍光寿命特性が大きく変化することを見出した。
3. 特に、電子供与基として *N,N*-ジメチルアニリンを 5-TAMRA に導入した *p*-DiMeNTMR 及び Alexa488 に導入した誘導体 *m*-DiMeNAF488 と *o*-DiMeNAF488 は、pH 4~6 程度の酸性下において十分に明るく、蛍光寿命測定から算出した  $pK_a$  は、アミノ基の配向性により  $pK_a = 4.5\sim 5.0$  の値を示すことから、生体内における酸性環境の FLIM 測定に適した特性を有することが示された。
4. 5-TAMRA 誘導体である *p*-DiMeNTMR を用いて、HeLa 細胞、A431 細胞、Vero 細胞、Cos-7 細胞の 4 種の細胞についてリソソームを含む酸性小胞内 pH の FLIM 測定を実施し、また、酸性小胞を標識する Lyso Tracker Green DND-26、Dextran-Alexa488 と共染色した細胞を用いた FLIM 測定によっても、酸性小胞内腔の pH 測定を行うことが可能であることが示

された。さらに、V-ATPase 阻害剤 Bafilomycin A1 及び Concanamycin A の添加前後における細胞内小胞の pH 変化観測から、*p*-DiMeNTMR を用いた FLIM 測定により、細胞種及び細胞のコンディションによって異なる酸性小胞 pH の違いを検知できる可能性が示された。

5. 貪食能を持つ RAW264.7 細胞を用いて、Alexa488 誘導体である *m*-DiMeNAF488 を Zymosan と共にエンドサイトーシスの機構を利用することで細胞内に取り込ませ、Zymosan 及び *m*-DiMeNAF488 を含んだファゴソーム内の pH について FLIM 測定を実施した。また、V-ATPase 阻害剤 Bafilomycin A1 及び Concanamycin A の添加前後におけるファゴソーム内 pH の変化を観測可能であることが示された。さらに、FLIM によるタイプラプス測定により、Zymosan を含むファゴソーム内が、小胞形成直後の pH = 6.2~6.5 から、8 分後には pH = 5.6~5.8、20 分後には pH = 5.3 まで酸性化されていく様子を観測することに成功した。これらの結果より、*m*-DiMeNAF488 を用いた FLIM 測定により、ファゴサイトーシスの動態を pH の定量と共にライブイメージング観測できることが示された。

以上のように、本論文は、蛍光寿命イメージング法 (FLIM) による pH 測定に最適化した有機小分子蛍光寿命イメージングプローブを開発することにより、ライブイメージング FLIM 測定によるリソソーム及びファゴソーム内腔の pH 測定が可能であることを示し、定量性の高い細胞内小胞の pH 測定法を確立することに成功した。今後、本手法を用いた生細胞内及び生体内の極小領域における pH 観測は、定量性の高さから多様な生物学研究に重要な貢献を成すと考えられ、学位の授与に値すると考えられる。