

博士論文 (要約)

光誘起電子移動の制御に基づいた生体機能の光操作／  
カルボキシペプチダーゼ活性蛍光検出のための  
有機小分子プローブ開発

河谷 稔

## 論文の内容の要旨

論文題目 光誘起電子移動の制御に基づいた生体機能の光操作  
／カルボキシペプチダーゼ活性蛍光検出のための有機小分子プローブ開発

氏名 河谷 稔

特定の生体機能の可視化や操作を可能とするケミカルプローブの開発は、生命現象の解明や新規診断技術の開発に繋がると期待される。特に、蛍光プローブやケージド化合物といった光化学的知見を活用したケミカルプローブは、非侵襲的に高い時間・空間分解能で対象を観察したり、細胞に摂動を与えたりすることが可能なため、基礎研究や臨床研究において非常に有用である。従って、光機能性ケミカルプローブの設計手法を確立することは、これら研究の進展に大きく貢献する。

本論文では、光化学反応の一つである光誘起電子移動 (Photo-induced electron transfer: PeT) に着目し、PeT の制御に基づいた分子設計を詳細に検討することで、現状のケミカルプローブでは達成できていない課題を解決した新しいケミカルプローブを開発することを目指した。具体的には、第一章で PeT について概説し、続く章で以下の2つの研究テーマについて、それぞれ検討を行った。

(1) 緑色蛍光団 BODIPY を母核とした高いアンケージ量子収率を有する可視光分解性ケージ基の開発 (第二章)

(2) カルボキシペプチダーゼ活性を検出する蛍光プローブの開発 (第三章)

(1) 緑色蛍光団 BODIPY を母核とした高いアンケージ量子収率を有する可視光分解性ケージ基の開発

生理活性物質を光照射依存的に放出し、活性化することができるケージド化合物は神経科学分野などにおいて欠かすことのできない研究ツールとなっている。しかしながら、従来のケージド化合物に用いられる光分解性保護基 (ケージ基) は、解除光として細胞毒性が高い波長 400 nm 以下の紫外光を必要としていたため、長時間や高頻度の刺激が難しいという欠点を抱えていた。執筆者が所属する研究グループではこれまでに、緑色蛍光団 BODIPY を母核としたケージ基 (BODIPY ケージ基) を開発し、一光子励起による解除光波長を 500 nm 以上まで長波長化することに成功した。本ケージ基は鋭い吸収スペクトルや高いモル吸光係数といった特徴を持つ一方で、アンケージ量子収率は最大でも 0.1%程度と、従来の紫外光で励起可能なケージ基と比較して大幅に小さい値に留まっており、細胞機能に対して効果的に摂動を与えることが難しいという課題が存在した。そこで本研究で

は、BODIPY ケージ基のアンケージ量子収率の向上を目指した。

これまでの検討から、BODIPY ケージ基のアンケージ量子収率は4位アリル部位から蛍光団へのPeTを初発とした電荷分離状態を経由して反応が進行すると考えられる。従って、アンケージ量子収率はPeT速度および競合する逆電子移動(BeT)速度に依存する電荷分離状態の寿命によって変化すると考えられる。電子移動を記述するマーカス理論から、BODIPY ケージ基のPeT速度およびBeT速度はPeTの自由エネルギー変化に依存して変化すると考えられ、最適なPeTの自由エネルギー変化と脱離能の高い脱離基を有する誘導体を探索することで、アンケージ量子収率を向上させたBODIPY ケージ基を設計することができると期待される。

そこで、上記作業仮説に則り、4位アリル部位のHOMOエネルギーと蛍光団のLUMOエネルギーを様々に変化させた異なるPeTの自由エネルギー変化および異なる脱離能を持つと考えられるBODIPY誘導体群を設計・合成した。これらの光化学特性を精査した結果、密度汎関数理論(DFT)計算によって求められるPeTの自由エネルギー変化の指標 $[\Delta G_{\text{PeT}} + w]$ が一定付近で、BODIPY ケージ基のアンケージ量子収率は高い値を示すことを見出した。さらに、Et基やH基が蛍光団へ導入されたBODIPY誘導体はCl基やCOOAM基が導入された誘導体よりも高い値を示す傾向が見られた。合成した各誘導体のうち、もっとも高いアンケージ量子収率は0.54%と従来の約2.1倍高い値であった。

続いて、BODIPY ケージ基が細胞内において局在化しやすい小胞体膜などの低極性環境におけるアンケージ反応を検討した。溶媒極性はPeT速度に影響を与えることから、アンケージ量子収率も変化すると予想される。実際に低極性環境中においてアンケージ量子収率は大幅に向上し、特にヘキササン中においてアンケージ量子収率は1.5%に達した。

上記の検討から、BODIPY ケージ基は細胞内膜から生理活性物質を放出する系に活用することで、効果的に細胞へ摂動を与えることができると期待される。そこで、細胞内膜から生理活性物質を放出し、実際に細胞に対して摂動を与えることが可能であるかを検証するため、生理活性物質カプサイシンのアナログであるpelargonic acid vanillylamide (PAVA)をBODIPY ケージ基で保護したケージド化合物、BODIPY ケージドカプサイシン (BDP-CAP)を設計・合成した。BDP-CAPのアンケージ効率 $は 1.3 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ と十分に高い値を示し、また細胞内膜に局在する様子が観察された。さらに、TRPV1を発現させた生細胞において、500 nm前後の解除光照射依存的にTRPV1を活性化できることが示された。

## (2) カルボキシペプチダーゼ活性を検出する蛍光プローブの開発

ペプチダーゼは様々な生命現象や疾患において関連性が報告されており、その活性を高感度に検出可能な蛍光プローブは強力な疾患イメージングツールとなりうる。これまでに、アミノペプチダーゼやエンドペプチダーゼの活性を検出可能なturn-on型蛍光プローブの分子設計手法が確立され、様々なアミノペプチダーゼ・エンドペプチダーゼ活性を標的とした蛍光プローブが開発されてきた。この結果、がんや膵液漏などに対する蛍光による

迅速イメージングが可能となった。一方で、ペプチド鎖の C 末端アミノ酸を分解する酵素であるカルボキシペプチダーゼも、がんや神経性疾患をはじめとして様々な生命現象や疾患との関連性が報告されているものの、カルボキシペプチダーゼが触媒するアミドからカルボン酸への加水分解を高感度に検出する蛍光プローブは分子設計が難しく、その活性を生細胞で迅速に検出可能な turn-on 型可視光励起蛍光プローブは開発されていなかった。これまでに、ヒプリルアミノ酸構造を活用した分子内スピロ環化平衡制御に基づく分子設計が考案されているが、一部のカルボキシペプチダーゼとの反応性が乏しいことや、基質部位を 2 箇所導入する必要があることなどの課題があり、別アプローチによる分子設計法の確立が求められていた。本研究では、前立腺がん等で高発現しており、がんマーカーとして臨床的にも重要なカルボキシペプチダーゼである PSMA (Prostate Specific Membrane Antigen) を標的とし、自発的脱炭酸・脱窒素反応と PeT 制御に着目し、これらを活用した新規 PSMA 活性検出蛍光プローブの開発を目指した。

まず、反応前後で大きな電子密度変化を引き起こし、しかも PSMA 基質となるような分子骨格を探索した。その結果、酵素反応に伴い特徴的な生成物を与えることが報告されているアゾホルミル基を有するベンゼン誘導体が PSMA の基質となることを見出した。続いて、酵素反応前後での大きな電子密度変化を利用した蛍光プローブの分子設計を、DFT 計算を活用した PeT による消光の予測に基づき行った。具体的にはフルオレセインのベンゼン環部位に上記基質構造を導入することで新規 PSMA 活性検出蛍光プローブ 6-fluAFGlu を設計した。設計した分子を合成し、光学特性を精査したところ、本プローブは期待された通り、蛍光量子収率が 0.002 と PSMA との反応前は強く消光していた。さらに PSMA との反応に伴い基質アミノ酸が遊離すると、引き続き脱炭酸、脱窒素反応によりアゾホルミル基が脱離して強蛍光性のフルオレセインが産生することで、400 倍以上の蛍光強度上昇を示すことが明らかになった。

続いて、PSMA 活性に基づき、前立腺がん細胞の検出が可能かを検討した。PSMA の発現量は、前立腺がんの悪性度と強く相関しており、PSMA 活性検出蛍光プローブ 6-fluAFGlu を用いることで迅速かつ高感度な前立腺がんの診断が可能になると期待される。

まず、PSMA を高発現する前立腺がん細胞株 LNCaP および PSMA 非発現前立腺がん細胞株 PC3 の細胞ライセートと 6-fluAFGlu と反応させたところ、LNCaP 細胞ライセートのみ大幅な蛍光増大が見られた。また、その蛍光増大は PSMA 特異的阻害剤 (2-PMPA) で抑制されたことから、様々な酵素やタンパク質などが夾雑する細胞ライセート中においても、特異的かつ高感度に PSMA 活性を検出可能であるということが示された。続いて、培養した LNCaP 細胞および PC3 細胞に対して、6-fluAFGlu 溶液を添加し、その蛍光を経時的に観察したところ、LNCaP 細胞では PC3 細胞と比較して大幅な蛍光上昇が見られた。LNCaP 細胞での蛍光増大は PSMA 特異的阻害剤で抑制されたことから、6-fluAFGlu は生細胞においても PSMA 活性を検出できることが明らかとなった。さらに、がんを含むヒト前立腺切除検体に 6-fluAFGlu 溶液を添加したところ、がんを含まないヒト前立腺切除検体と比較して、大きな蛍光上昇を示す傾向が観察された。

本論文では、PeT 制御を活用した分子設計を検討することで、長波長光で効率よくアンケージ可能な新規ケージド化合物や、PSMA 活性を検出する新規蛍光プローブといった有用な特性を有するケミカルプローブの開発に成功した。これらの分子は、生物学研究や診断技術開発において有用なツールとなり得ると期待される。