

〔別紙2〕

審査の結果の要旨

氏名 小嶋 良輔

小嶋良輔は「生体内イベントの可視化・コントロールを目指した新規機能性生物発光基質の開発」と題し、以下の研究を行った。生物発光は、発光基質である luciferin と発光酵素である luciferase が反応することによって光子が放出されるユニークな現象であるが、これまでのところ生物発光は luciferase の量を native な luciferin を用いて定量する目的で用いられることが殆どであり、その特性が最大限活用されているとは言い難い。そこで、本研究においては、1. 新規発光制御原理に基づく生物発光プローブの開発及び、2. 機能発揮に外部からの光照射（励起光）を必要としない光機能性分子の開発することにより、生命科学研究における研究ツールとしての生物発光の応用の可能性を拡張することを行った。以下に、具体的な研究内容について記す。

1. 新規発光制御法に基づく生物発光プローブの開発

種々の生理活性分子の機能を解明するため、これまで様々な蛍光プローブが開発されてきたが、検出に励起光を必要とする蛍光法は、自家蛍光によるバックグラウンドノイズや光の組織透過性の問題から生体深部でのイメージングに適用することは困難であった。一方、光子の放出に励起光を必要としない生物発光法は、上記の問題を解決できるポテンシャルを持っているが、生物発光分子の発光制御法は十分に確立されておらず、様々な生理活性分子を検出可能な生物発光プローブを開発することは困難であった。そこで、小嶋はこの問題を解決し、生物発光イメージングの可能性を拡張することを行った。

a) BioLeT を利用した NO 検出生物発光プローブの開発

小嶋の所属する研究室では、蛍光プローブの蛍光制御原理として汎用されている電子移動による励起発光中間体の quenching が生物発光基質においても起き得ることを見出し、これを Bioluminescent- enzyme induced electron transfer (BioLeT) と命名していた。しかしながら、BioLeT を発光制御原理として用いた生物発光プローブは殆ど開発されておらず、BioLeT の有用性・汎用性を真に示すには至っていない。そこで、BioLeT を用いることで初めて開発可能となる NO probe の開発を行った。NO と反応することによって triazole を形成し、その HOMO energy level が大きく低下することが知られている 1,2-diaminobenzene 部位を発光団近傍に組み込んだ DALs を開発した結果、分子構造を最適化した DAL4 は NO との反応によって狙い通りに triazole 体を生成し、反応させた NO の量と比例した、BioLeT の解除に伴う大きな発光上昇を示した。また、本プローブ

は NO 選択的な発光上昇を示し、生細胞イメージングにも応用可能であった。さらに、本プローブを用いてラット腹腔内で NO 徐放剤から発生する NO を剃毛・開腹することなく可視化することにも成功した。このことから、BioLeT を用いることで、光誘起電子移動制御による蛍光プローブ開発と同様の戦略で、生物発光プローブを開発可能であることを明らかにした。

b) In vivo での高感度な hROS 検出を可能とする生物発光プローブの開発

小嶋の所属する研究室では、高い反応性をもつ活性酸素種 (hROS) と特異的に反応し脱アリル化する aminophenoxy 部位を持つ hROS プローブ、APL の開発に成功している。このプローブは嵩高い分子構造の脱離と BioLeT の解除によって発光上昇を示す生物発光プローブであるが、このプローブを luc TG rat 急性腹膜炎モデルにおいて好中球から発生する hROS の in vivo imaging に応用したところ、未反応のプローブ由来のバックグラウンド発光が大きいため、生体内で発生する少量の hROS を可視化することは困難であった。そこで、hROS との反応前後で、基質の細胞膜透過性も同時に制御することで、バックグラウンドを低減させ大きな発光の activation ratio を達成可能になると考え、aminophenoxy 部位の amino 基をスルホアルキル化した SO₃H-APL を開発した。その結果、SO₃H-APL は生細胞中において、約 1/100 の量の hROS を APL と同じ activation ratio で検出することがわかり、実際に luc TG rat の急性腹膜炎モデルにおいても、刺激に応じて好中球から発生する hROS を剃毛・開腹することなく明瞭に検出可能であった。このように、生物発光量子収率の制御と、luciferase と probe の局在の制御という複合して働く独立した発光制御原理を 1 つのプローブに組み込むことで、大きな activation ratio を達成可能な実用性の高い生物発光プローブの開発に初めて成功した。

2. 生体内における光機能性分子の励起エネルギー源としての生物発光利用法の開発

さらに小嶋は、生体内イベントを可視化するのみならず、コントロールする手法としても生物発光を活用することを目指した。光照射によって周囲の細胞を殺傷する光増感剤や、生理活性物質を放出する caged 化合物といった光機能性分子は、光照射によって生体システムに摂動を与えることが可能な強力なツールである。しかしながらこれらの分子の機能発揮には励起光が必須であり、体表からの光の到達が困難な生体深部での使用には制限があった。そこで、光子の放出に励起光を必要としない生物発光は生体深部における励起源として利用可能であると考え、これと光機能性分子を組み合わせることで、生体深部でも利用可能な光機能性分子の創出を行った。

Luciferin は修飾によってその発光特性を容易に喪失することから、この発光特性を維持したまま光機能性分子を結合することは困難であったが、小嶋は本学修士課程において、aminoluciferin(AL) の発光特性を維持したままこれに嵩高い分子構造を結合し、Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET)によって発光エネルギーを光機能性分子へと転送する分子設計法の開発に成功している。そこで博士課程においては、この設計法に則り、生体深部での高感度なシグナル検出を可能とし得る、生きた動物個体内で利用可能な近赤外生物発光基質の開発を行った。様々な近赤外蛍光団を BRET acceptor として AL に結合し、その発光特性を精査したところ、AL の発光エネルギーは高い効率で BRET acceptor に転送され、その発光極大波長はこれまで報告

されていない組織透過性に優れる 670 nm-800 nm 周辺の近赤外領域で自由にチューニング可能であった。さらに、血清に対する安定性を確保しつつ、基質の細胞膜透過性、基質と luciferase の局在のマッチングを精密に制御することで、生細胞内、および生きた動物個体内で近赤外生物発光イメージングを行うことに成功した。本結果は、開発が望まれていた近赤外生物発光基質の開発に成功したのみならず、原理的には **BRET acceptor** を変更することで、動物個体内で励起光を照射することなく利用可能な新規光機能性分子を自由に開発可能であることを示すものである。

これら研究成果は、生物発光の生命科学研究ツールとしての可能性を大きく拡張するものであり、今後様々な生命現象を可視化・コントロール可能な生物発光基質が開発され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（薬学）の授与にふさわしいものと判断した。