

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 平林 和久

平林和久は「Si 置換フルオレセインの化学平衡の解析および蛍光プローブ開発への応用」と題し、以下の研究を行った。フルオレセインはその高い水溶性、高い蛍光量子収率、確立された蛍光の off/on 制御法などから、蛍光プローブの母核として汎用されている代表的な緑色蛍光団である。その分子構造において、ベンゼン環部位 2 位のカルボキシ基は、高い水溶性を付与するとともに、弱酸性環境においてキサンテン環部位の 9' 位への求核攻撃によって分子内スピロラクトン環を形成し、無色・無蛍光の互変異性体を生じる。このような分子構造の変化は多くの研究者の興味を引き、古くから互変異性と酸塩基平衡を含むフルオレセインの化学平衡は研究されてきた。本研究では、フルオレセインのキサンテン環 10 位の O 原子を Si 原子に置換した Si 置換フルオレセイン、すなわち、ベンゼン環部位 2 位にカルボキシ基を有する TokyoMagenta (TM) 類 (2-COOH TM) に着目し、そのフルオレセインとは大きく異なる pH 依存的な化学平衡の解析および、その特徴を活かした新たな蛍光プローブの分子設計法の確立を行った。

まず、2-COOH TM の化学平衡式の解析を行った。2-COOH TM を合成し、その光学特性の精査を行った結果、フルオレセインは酸性から中性において吸収スペクトルの形状が大きく変化するのに対し、2-COOH TM は酸性から中性においては可視光領域には光の吸収を持たず、塩基性になるに従い 580 nm の吸光度が上昇するという特徴的な吸収スペクトル変化を示した。特に、2-COOH TM は鋭い pH 依存的な吸光度変化を示すことが分かった。この吸光度の変化は二相性のフィッティング式で解析でき、pH7-9 の間に 2 段階の酸解離 ($pK_{a1} = 8.2$ 、 $pK_{a2} = 7.9$) かつ $pK_{a1} > pK_{a2}$ であることが、pH 依存的な鋭い吸光度変化の原因であった。ただし、ここでいう pK_{a1} は総電荷 0 の構造の濃度の和と総電荷-1 の構造の濃度の和が等しいときの pH、 pK_{a2} は総電荷-1 の構造の濃度の和と総電荷-2 の構造の濃度の和が等しいときの pH を示す値である。これら pK_{a1} 、 pK_{a2} は、キャピラリー電気泳動法を用いた解析からも同じ値が算出された。

そこで、上記の特性をさらに調べるため、2-COOH TM の化学平衡式の決定を行った。まず、2-COOH TM のベンゼン環部位 2 位のカルボキシ基を Me 基に置換した 2-Me TM

の吸収スペクトルを測定した。その結果、582 nm に極大吸収を持つ anion form と 472 nm に極大吸収を持つ neutral form の 1 段階の酸解離 ($pK_a=6.8$) が存在し、pH 7 においても大きな 582 nm の吸収を示した。したがって、酸性から pH 7 において 2-COOH TM が可視光領域に吸収を持たないのは、ベンゼン環部位 2 位のカルボキシ基に起因する分子内スピロラクトン環構造の形成のためと考えられた。一方、pH 10 以上において、2-COOH TM の吸収極大波長およびモル吸光係数が 2-Me TM と等しかったことから、pH 10 以上においては、2-COOH TM のキサテン環部位は 2-Me TM の anion form と同じ構造であると推定された。また、neutral form と monoanion form 間の化学平衡のモデルとして 2-COOH TM のメチルエーテル体の化合物の pH 依存性を測定したところ、そのモル吸光係数は小さいながらも、2-Me TM の neutral form に対応する 472 nm に吸収極大を示す吸収スペクトルが観察された。つまり、monoanion form において二つのフォーム form I と form II の平衡が存在することが考えられた。以上の測定結果から、2-COOH TM の化学平衡式を推定し、 pK_{a1} および pK_{a2} 、monoanion form の form I と form II の平衡定数 K を決定した。

さらに、キサテン環部位における置換基の効果を検討した。具体的にはキサテン環部位に Cl 基または F 基を導入した化合物を合成し、それらの pH 依存的な吸光度変化を測定した。その結果、2-COOH TM のキサテン環部位にこれら電子吸引性基を導入することで、2つの見かけの酸解離定数 pK_{a1} 、 pK_{a2} を低下させ、生理的 pH においても強い赤色光領域の吸収および蛍光を示すことが分かった。また、一般に 2-Me TM のように、1 段階の酸解離を示す化合物において、pH が pK_a 周辺で 1 変化した際の吸光度変化は約 3-5 倍程度にあるのに対して、2-COOH DCTM は pH が 6 から 7 に 1 変化するだけで約 13 倍の大きな吸光度変化を示すことが分かった。次に、2-COOH DCTM のベンゼン環部位における置換基の効果を検討した。2-COOH DCTM の 5 種類の誘導体を合成し、その pH 依存的な吸光度変化を測定した。その結果、導入した置換基のベンゼン環部位の 2 位カルボン酸に対する Hammett 定数 σ に依存して pK_{a2} は 1.3 もの大きな変化を示したのに対し、 pK_{a1} は大きな変化を示さず、また pK_{a2} の上昇した誘導体では、吸光度の pH 依存的な変化は緩やかになることを明らかとした。

次に、2-COOH DCTM の蛍光プローブへの応用を行った。生理的条件下 (pH 7.4) において強い可視光の吸収および蛍光を持つ 2-COOH DCTM を赤色蛍光プローブへと応用した。まず、代表的な蛍光制御原理である光誘起電子移動を原理とした Ca^{2+} 蛍光プローブを開発し、生細胞での細胞内 Ca^{2+} 濃度変動を高感度に検出することに成功した。次に、2-COOH DCTM のフルオレセインには見られなかった特性である分子内ラクトン環の形成のし易さを利用して、レポータータンパク質として汎用されている β -ガラクトシダーゼ活性の検出蛍光プローブの開発を行った。開発したプローブは生理的 pH においてほぼ無色・無蛍光性の分子内スピロラクトン環構造を示し、 β -ガラクトシダーゼとの

反応によって基質部位が切断されることで、大きな吸光度および蛍光強度の上昇を示すことに成功した。

以上、本研究において平林は、Si 置換フルオレセインである 2-COOH TM がフルオレセインとは大きく異なる特徴的な化学平衡を示すことを見出し、さらに、生理的条件下で強い吸収・蛍光を示す 2-COOH DCTM が赤色蛍光プローブへと応用できることを示した。今後、本分子のこれまでにない特徴的な構造変化を活かし、新たな蛍光プローブが開発され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（薬学）の授与にふさわしいものと判断した。