

論文の内容の要旨

論文題目

近赤外蛍光消光団の開発およびその消光機構に基づいた近赤外蛍光プローブの開発

氏名 明珍 琢也

【序論】

蛍光プローブを利用した蛍光イメージング技術において、近赤外光領域 (650–900 nm) の光が近年注目を集めている。近赤外光領域の光は、高い組織透過性および低い自家蛍光を示すため、動物個体レベルでのイメージングに適している。さらに、培養細胞レベルにおいても、可視光領域の蛍光色素や蛍光タンパク質とのマルチカラーイメージングに極めて有用である。以上の背景から、これまでに代表的な近赤外蛍光色素であるシアニン色素を母核として、様々な生理活性分子に対する近赤外蛍光プローブの開発が精力的に行われてきた。しかしながら、シアニン色素に適応可能な蛍光の off/on 制御法は限られており、様々な生理応答に対応する近赤外蛍光プローブの開発は十分とは言えない。

そこで、本研究では可視光領域の消光団 QSY 類の消光機構に着目した。QSY 類は Rhodamine 類のキサンテン環 3,6 位の N 原子に芳香環が導入されており、励起状態において芳香環が導入された N 原子近傍の分子回転に由来する無輻射的失活により、溶媒の pH や極性によらず無蛍光性であることが知られている。本研究では、QSY 類の消光機構を近赤外光領域へと応用することで、近赤外光領域での新たな消光団の開発、さらにはその消光機構に基づく蛍光プローブの分子設計法の確立および近赤外蛍光プローブの開発を行った。

【本論】

1. 新たな近赤外光領域消光団の開発とその応用

Förster resonance energy transfer (FRET)とは、energy donor、energy acceptor となる2つの色素が近傍に存在し、かつ donor の蛍光スペクトルと acceptor の吸収スペクトルに良好な重なりがある場合に、donor の励起エネルギーが acceptor へと無輻射的に移動する現象であり、生体内でのプロテアーゼ活性を検出する蛍光プローブの開発に蛍光制御原理として汎用されている。特に FRET の acceptor として無蛍光性の色素である消光団を用いた off/on 型の分子設計法は、バックグラウンド蛍光を低く抑制することで高い S/N を達成できる有用な分子設計法である。しかしながら、既存の近赤外光領域の消光団は報告が少なく、報告されている消光団も pH の低下に伴い蛍光性の化合物へと変化するなどの問題がある。

そこで、本研究では溶媒の pH や極性によって消光能が影響されない新規の近赤外光領域消光団の開発を行った。具体的には、近赤外光領域の蛍光色素である Si-rhodamine (SiR)類においても、キサンテン環 3,6 位の N 原子に芳香環を導入することで無蛍光性になるか検討するため、Si-QSY660, 780 をデザイン・合成し、その光学特性を調べた。その結果、Si-QSY 類の蛍光量子収率は、溶媒の pH や極性に依存せず、0.001 以下の無蛍光性であることが分かった。特に N 原子がインドリン構造を形成している Si-QSY 780 は 650-900 nm と広範囲に吸収波長を有しており、近赤外光領域消光団として優れた特性を持つことが分かった。しかしながら、Si-QSY 780 は水溶性の低さや水中での安定性に問題があった。そこで Si-QSY 780 に構造修飾を加えることで、水溶性や水中での安定性の改善を行い、wsSi-QSY 780 の開発に成功した。

さらに開発した消光団を用いて MMP 活性検出近赤外蛍光プローブを開発した。具体的なプローブのデザインとしては、MMP2,9-14 等による切断されるペプチド配列を介して、ペプチドの N 末端に蛍光色素、C 末端側に導入したリシン残基の側鎖から消光団を結合させたプローブをデザインした。また、生体内での血中滞留性の向上を目指し、C 末端に PEG 鎖を導入した。開発したプローブは酵素反応前には蛍光量子収率が 0.001 以下であり十分に消光されていた。本プローブと MMP による酵素反応を検討したところ、酵素反応後に大きな蛍光上昇を示した。また、実際に本プローブを皮下腫瘍モデルマウスへと応用したところ、腫瘍部位での蛍光上昇を観察することに成功した。

2. キサンテン環 3 位の N 原子への芳香環の導入による消光を利用した分子設計法の確立

A. 芳香環の脱離を利用した hROS 検出近赤外蛍光プローブの開発

上記において、SiR 類のキサンテン環 3,6 位の N 原子に芳香環を導入することで SiR 類を無蛍光性化できることが分かった。そこで、この消光機構を利用し、芳香環の脱離によって蛍光の off/on 制御を行う分子設計法の開発に着手した。標的分子として、酸化力の強い活性酸素種 (highly reactive oxygen species; hROS) を選択した。既存の hROS 検出近赤外蛍光プローブは、反応前のプローブの蛍光が大きく、反応前後での蛍光増大が 20 倍以下と小さいのが問題であった。そこで分子設計として、hROS との反応によりキサンテン環 3 位の N 原子から脱離する芳香環

を導入し、反応前には無蛍光性とし、hROS との反応により芳香環が脱離し蛍光が大きく増大するプローブをデザイン・合成した。合成したプローブ N-Phenol SiR は反応前の蛍光量子収率が 0.001 以下であり、芳香環が一つだけ導入された色素でも無蛍光性となることが明らかとなった。また、OCI⁻や ONOO⁻と反応し、200 倍以上もの大きな蛍光増大を示した。

また、本プローブを培養細胞系へと応用した。培養細胞系としては、HL60 細胞を過酸化水素で刺激した場合に発生する hROS の検出を試みた。本プローブの適用により、過酸化水素添加時のみ HL60 細胞内から顕著な蛍光増大が観察された。一方、過酸化水素非添加時、および MPO の阻害剤添加後に過酸化水素にて刺激した場合には細胞内からの蛍光増大は観察されなかった。このように、本プローブの応用により培養細胞レベルでの hROS の検出に成功し、本分子設計法が近赤外光領域での蛍光プローブ開発に有用であることが示された。

B. 粘度依存性を利用した HaloTag®タンパク質認識近赤外蛍光プローブの開発

非対称型の SiR 類のキサンテン環 3 位の N 原子に芳香環を導入した色素である N-Ph SiR の光学特性を精査したところ、粘度の高い溶媒であるグリセリン中で蛍光量子収率 0.1 以上の高い蛍光量子収率を示し、溶媒の粘度の上昇に伴い蛍光が増大することが明らかとなった。これは励起状態での芳香環に導入された N 原子近傍の回転による無輻射的失活が、溶媒の粘度の上昇によって抑制されることで強蛍光性へと変化していると考えられた。

そこで、この分子回転を抑制することで無蛍光性から強蛍光性へと変化するという特性を利用することで、標的タンパク質との結合時にのみ、N 原子近傍の回転が抑制され、蛍光性へと変化する新たな分子設計法が可能であると考えた。標的分子としては、タグタンパク質として汎用されている HaloTag タンパク質に着目し、HaloTag タンパク質との結合時にのみ蛍光が増大するプローブの開発を行った。具体的には、N-Ph SiR において芳香環が導入された N 原子の近傍に HaloTag リガンドを結合させたプローブ群をデザイン・合成した。その結果、HaloTag リガンドが 3 位の N 原子に直接導入されたプローブが、HaloTag タンパク質との結合により大きな蛍光増大を示すことが分かった。さらに、複数のスルホ基を導入し、他のタンパク質との非特異的な結合による蛍光上昇を抑制することで、HaloTag タンパク質選択的に蛍光増大を示す N-Ph SiR Halo-4 の開発に成功した。また、N-Ph SiR Halo-4 と HaloTag タンパク質のドッキングシミュレーションを行った結果、分子デザイン通りに HaloTag タンパク質のタンパク質表面に N-Ph SiR Halo-4 のキサンテン環部位が存在し、分子の自由な回転が阻害されていることが示唆された。また、本プローブのラベル化速度を検討したところ、これまでの off/on 型のタグタンパク質検出蛍光プローブに比べて速い反応速度を有しており、簡便かつ迅速なタグ標識が可能であることが明らかとなった。

さらに本プローブを培養細胞系へと応用した。培養細胞系として、N 末端側に HaloTag タンパク質を融合した GPCR を用い、これらを一過性に細胞膜上に発現させ、発現した細胞膜上の HaloTag タンパク質の検出を行った。その結果、本プローブ添加後、洗浄を必要とせず、発現細

胞選択的に細胞表面の蛍光上昇の観察に成功した。また、培養細胞系でのラベル化はプローブ添加後 6 分以内に終了しており、培養細胞レベルでも簡便かつ迅速なタグ標識を達成した。また、マルチカラーイメージングにより pulse chase の実験系へと本プローブを応用したところ、プローブ添加後に新たに細胞膜上に発現した HaloTag 融合 GPCR を検出することに成功した。

【結論】

本研究において、近赤外蛍光色素である SiR 類のキサンテン環 3,6 位の N 原子に芳香環が結合することにより SiR 類が溶媒環境によらず無蛍光性となることを見出した。また、本知見を基に新たな近赤外光領域消光団の開発および、それを用いた近赤外蛍光プローブの開発に成功した。

さらに本知見を基に、SiR 類のキサンテン環 3 位の N 原子に結合した芳香環の脱離による分子設計法を確立し、hROS 検出近赤外蛍光プローブの開発を行った。本プローブは hROS との反応前後で 200 倍以上の大きな蛍光増大を示し、近赤外光領域における新たな hROS 検出蛍光プローブの分子設計法を提案した。

また、SiR 類のキサンテン環 3 位の N 原子に芳香環が導入された色素である N-Ph SiR との結合によって励起状態での分子回転を阻害することで強蛍光性となることを見出し、それを基に標的タンパク質選択的に蛍光増大を示す分子設計法の確立を行った。本分子設計法に基づき開発された HaloTag 検出近赤外蛍光プローブは、HaloTag タンパク質選択的に大きな蛍光増大を示し、培養細胞レベルにおいて無洗浄、迅速なラベル化を達成した。

本研究で得られた知見は、プローブ開発手法の乏しい近赤外蛍光プローブにおける有効な蛍光制御法になると考えられ、近赤外光領域での蛍光イメージングの更なる発展に貢献すると期待される。

【参考文献】

(1)Myochin, T.; Kiyose, K.; Hanaoka, K.; Kojima, H.; Terai, T.; Nagano, T., Rational design of ratiometric near-infrared fluorescent pH probes with various pK_a values, based on aminocyanine. Journal of the American Chemical Society 2011, 133 (10), 3401-3409.

(2)Myochin, T.; Hanaoka, K.; Komatsu, T.; Terai, T.; Nagano, T., Design strategy for a near-infrared fluorescence probe for matrix metalloproteinase utilizing highly cell permeable boron dipyrromethene. Journal of the American Chemical Society 2012, 134 (33), 13730-13737.