

論文の内容の要旨

論文題目 細胞内レドックス状態の可視化を目指した新規グルタチオン感受性
蛍光プローブの開発

氏名 吉田昌史

生体はその生命機能の維持に際して常に酸化ストレスに曝されている。酸化ストレスとは生命維持のため必須である酸素の一部が活性酸素となり細胞に与える障害の総称であり、老化や癌など多くの病態に関係する。レドックスとはこの酸化ストレスと細胞の持つ抗酸化力とのバランスを表した言葉であり、時々刻々と変化する細胞内のレドックス状態を可視化することはこれらが関与する種々の病態生理の解明に非常に有用である。しかしながら生きた細胞においてレドックス状態をリアルタイムに測定する方法は極めて少ない。そこで本研究においては生きた細胞内のレドックス状態の可視化を達成するべく、細胞内の主たる抗酸化物質である還元型グルタチオン（GSH）をターゲットとした蛍光プローブの開発を目指した。

まず既存の蛍光プローブで汎用されている 2,4-dinitrosulfonylbenzene 基（DNs 基）を用いた GSH 感受性蛍光プローブとしてローダミン誘導体である Hydroxymethylrhodamine green（HMRG）を基本骨格とした新規蛍光プローブ DN_s-HMRG を開発した。DN_s-HMRG は DN_s 基による蛍光の消失および分子内スピロ環化平衡という 2 つの機構により蛍光が制御されており、GSH との反応により蛍光上昇が 7000 倍以上と既存のプローブに比べて非常に高いコントラストを達成できた。また、DN_s-HMRG は GSH との反応性も高く反応後速やかに蛍光上昇が見られることに加え、スピロ環形成により脂溶性が向上し高い細胞膜透過性を有することも示された。その結果細胞内の蛍光強度上昇速度の差異から、生きた細胞内における GSH 濃度差の

検出が可能であること、また、腹腔播種モデルマウスを用いた *in vivo* イメージングで微小癌を選択的に蛍光検出できることを示した。

さらなる発展として、①時間とともにバックグラウンド蛍光が上昇する、②GSH との反応が不可逆反応に基づくため経時的な測定が行えない、といった DNs-HMRG の持つ課題を克服するべく、可逆的な蛍光制御機構を利用したプローブ開発に着手した。具体的には xanthene 環 9 位への GSH の求核付加反応に着目し、Si-ローダミンの一つである 2Me SiR600 の GSH との反応性を検討した結果、生理的濃度の GSH に対し可逆的かつ速やかに蛍光の ON/OFF を示すことを見出した。しかしながら、生きた細胞に適用した結果から、2Me SiR600 は細胞内 GSH 濃度に依存した蛍光強度を示すが、細胞内局在性・細胞内滞留性といった観点から改善点も多く、時々刻々と変化する GSH 濃度を追跡することは困難であった。

そこで、Tetramethylrhodamine (TAMRA) のメチルエステル体を donor、2Me SiR600 を acceptor とする新たな FRET 型プローブ 2Me SiR600-TMR(Me)を設計・開発した。2Me SiR600-TMR(Me)は、上述の 2Me SiR600 に対する GSH の可逆的な求核付加反応を蛍光制御機構として利用しているため生理的濃度範囲の GSH と反応し、また GSH 濃度に依存して緑色と赤色の蛍光強度が変化するレシオ型プローブである。また、GSH との反応速度も非常に速いことから、短い時間で変動する細胞内 GSH 濃度を追跡するのに適した特徴を有する。実際に 2Me SiR600-TMR(Me)を生細胞に適用し共焦点顕微鏡での細胞イメージングを実施した結果から、2Me SiR600 単体に比べて高い定量性を示し、ミトコンドリアへの安定した集積を得られることが示された。さらに、酸化ストレス刺激として過酸化水素を負荷した際の GSH 濃度低下およびそこからの回復過程をリアルタイムに検出することに成功し、細胞内 GSH 濃度の経時変化を可逆的に検出可能であることを示した。過去に報告されている可逆的な蛍光変化を示すプローブにおいては、その酸化還元状態を変化させるのに酸化剤だけでなく還元剤の投与を必要としており生理的なレドックス変動を可視化することが難しいと考えられるが、開発したプローブを用いた場合には、過酸化水素処理後に washout のみで蛍光強度比が回復しており、本来細胞の持つ酸化ストレス耐性機構が検出できていると考えられた。すなわち、本プローブを用いることで、種々の疾患モデルなどにおける生理的条件下でのレドックス状態の変化の観察が可能になったといえる。

本研究により蛍光イメージングによる細胞内 GSH 濃度を通してのレドックス状態の測定が正確かつ経時的に行えるようになり、レドックスに関する新たな知見が得られる事が期待される。