〔課程-2〕

審査の結果の要旨

氏名　　吉田　昌史

本研究は、老化や癌といった種々の疾患の病態に関係する細胞内のレドックス状態を可視化する事を目的として細胞内の主たる抗酸化物質であるグルタチオン（GSH）をターゲットとする新規蛍光プローブの開発を目指したものであり、下記の結果を得ている。

１．　既存の GSH 感受性蛍光プローブで汎用されてい 2,4-dinitrosulfonyl-benzene 基（DNs 基）を用いたプローブとして、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 DNs-HMRG を開発した。DNs-HMRG は DNs 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、DNs-HMRG は GSH との高い反応性および高い細胞膜透過性を有し、その結果細胞内の蛍光強度上昇速度の差異から生細胞内における GSH 濃度差の検出が可能であることを示した。

２．　DNs-HMRG の持つ、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。具体的にはローダミンの xanthene 環 9 位への GSH の求核付加反応に着目し検討した結果、Si-ローダミンの一つである 2Me SiR600 が生理的濃度の 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。

３．　2Me SiR600 は細胞内 GSH 濃度に依存した蛍光強度変化を示すが、時間とともに細胞内局在がミトコンドリアからライソゾームに移行し、ライソゾームの酸性環境下では GSH との反応が起きず GSH 濃度変化を検出できないといった問題があり、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。そこでミトコンドリアへの集積性の向上および定量性の向上

のためテトラメチルローダミン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)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、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。

以上、既存の GSH 感受性蛍光プローブの問題点を克服した新規プローブ DNs-HMRG の開発にとどまらず、定量性の向上と生細胞の GSH 濃度変化の経時的観察を初めてリアルタイムで可能とした 2Me SiR600-TMR(Me)の開発に成功した。本プローブを用いることで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、学位の授与に値するものと考えられる。