

## 学位論文題名

## 細胞内で選択的に活性化される機能性分子プローブの開発

## 学位論文内容の要旨

今世紀初頭までに、ヒトゲノムプロジェクトによりヒトをはじめとする様々な生物の設計図である遺伝子情報の解読が完了した。これらのゲノム解読研究から得られた遺伝子情報を生命科学や医療の現場で活用することが期待されている。一方で、生きている状態では、遺伝子情報に書かれた分子が特定の場所・時間で機能していることから、遺伝子情報だけでは、これらの動態を正確に解析することは不可能である。また、組織や細胞から、タンパク質などの構成成分を抽出し、それを電気泳動やクロマトグラフィーで分析するような手法だけでは、生命を十分に理解することができない。そのため、生命現象を解明するためには、生きたままの状態での解析することが重要となる。生きたままの状態での、特定の条件下のみシグナルが“オン”になるようなオフ/オン制御可能な分子の開発は、生命科学研究や診断・創薬への研究展開のために極めて重要となる。そこで、筆者は、細胞内で選択的に活性化される機能性分子プローブの開発を目的とし、下記に示す2つの研究テーマを遂行した。

## (1) 細胞内酵素によって活性化される機能性分子プローブの開発

細胞内グルタチオントランスフェラーゼ (GST) は、薬物代謝酵素として生体内で重要な役割を果たしている。抗癌剤等の求電子基を有する疎水性化合物は、GSTによって触媒されたグルタチオン (GSH) の求核置換反応によってGSH抱合体を形成する。GSH抱合体は速やかに細胞外へと排出される。このGSH/GST反応機構は抗癌剤等の薬物耐性の一因にもなっている。一方で、GSTは癌細胞で高発現していることから、癌マーカーとしての利用も期待される。また近年では、GSTは新規制癌薬の標的タンパク質としても有望である。そのため、いまだ確立されていない生体内 GST 検出法は癌診断技術や創薬スクリーニングへの応用が期待できる。そこで、筆者は、GSTの反応活性を検出・イメージングするための新規分子プローブの開発に着手した。

GSTは、求電子性の化合物が結合する部位とGSHが結合する部位を有する。GSHは結合部位においてプロトンが引き抜かれチオアニオンとなる。求核性が増大したGSHは、GSTに結合した求電子性化合物に対して求核攻撃を起こし、その結果、グルタチオン抱合体が生成される。筆者は、このGSTの反応メカニズムに注目し、チオアニオンと反応し脱保護される求電子性芳香族スルフォニル基を制御ユニットとして用いることでGSTを検出するための分子プローブを設計した。すなわち、蛍光性化合物であるローダミン(Rh)のアミノ基にジニトロベンゼンスルフォニル(DNs)基を制御ユニットとして導入することで、無蛍光性化合物(DNs-Rh)に変換できる。DNs-Rhは、GSH/GST溶液で処理したところ、その制御ユニットがGST触媒作用によるGSHの求核置換反応により除去され、Rhに変換されることで蛍光発光した。本知見から、DNs基などの求電子性芳香族スルフォニル基を制御ユニットとして導入することで、化合物の機能をオフにして、GST触媒作用によってオンにする分子プローブの設計原理が確立した。この設計原理を用いて、GSTを検出するための多色蛍光プローブ、生物発光プローブ、

MRI (核磁気共鳴イメージング) プローブを開発した。蛍光化合物のクレシルバイオレット (CV) に制御ユニット(DNs 基)を導入した DNs-CV は、既存の GST 検出プローブと比較して高感度かつ検出プローブとしての有用性を示した。DNs-CV を用いて、乳癌細胞やゼブラフィッシュ初期胚の GST イメージングに成功した。さらに、GST を検出するための生物発光プローブおよび  $^{19}\text{F}$  MRI プローブをそれぞれ設計・合成した。生物発光プローブは、不安定なジオキセタン中間体に制御ユニットを導入することで安定化し合成できる。この生物発光プローブは、GST 触媒作用で制御ユニットが除去されることで発光した。 $^{19}\text{F}$  MRI プローブは、トリフルオロメチル基を有するクマリン誘導体に制御ユニットを導入することで合成した。 $^{19}\text{F}$  MRI プローブは GST 触媒作用で制御ユニットが除去され、 $^{19}\text{F}$  MRI シグナルの変化を画像化できた。さらに、大腸菌にそれぞれ生物発光プローブや  $^{19}\text{F}$  MRI プローブを導入したところ、それぞれのシグナルに基づいて細胞内 GST 活性を観測できた。

## (2) 細胞内環境変化によって活性化される蛍光分子プローブの開発

脂肪組織に存在する脂肪細胞などでは、トリアシルグリセロールの形で内部に脂質を蓄積する。その結果、脂肪滴が細胞内部で形成される。脂肪滴の形成はエネルギー貯蔵手段である。しかしながら、肥満などにあるようにその過度の蓄積は、生体に様々な支障をきたす。脂肪滴の形成・成長・分解のメカニズムが詳細に解明されることによって、これらの疾患の診断・治療に寄与する新たな研究展開が期待される。そのため、細胞レベルから個体臨床レベルにわたって脂肪研究は、精力的に展開されている。脂肪滴の蛍光イメージングプローブはその研究の強力な手段となる。そのため、筆者らは、実用性のある脂肪滴イメージングプローブの開発に着手した。

脂肪滴検出プローブを開発するに当たり、二つの重要な性質に注目した。一つは、脂肪滴への分布特異性の高い分子を設計することである。これは、脂溶性の高い構造設計をすることで可能になる。二つ目は、疎水性環境下で蛍光が増強するオフ/オン機能である。これは、シグナル・バックグラウンド比の高い画像を得るのに重要である。今回、筆者は市販の蛍光性化合物ナイルブルー(NB)の 5 位アミノ基に芳香族スルフォニル基を制御ユニットとして導入することで、疎水性環境下でのみ蛍光増強を起こす分子設計を可能にした。芳香族スルフォニル基の求電子性を DNs 基、モノニトロベンゼンスルフォニル(MNs)基、トシル(Ts)基へと段階的に弱くすることで、NB の非極性溶媒クロロホルムに対する蛍光応答性は増大した。脂肪滴の誘電率に近い疎水性環境で応答性を示し、かつ適度な脂溶性を有する MNs-NB が最もよいプローブとなった。ここで、制御ユニットは、NB の励起状態構造の安定性に寄与していると考えられる。NB は、分子内電荷移動のメカニズムで蛍光発光することが知られている。その励起構造のうち、ジエチルアミノ基が NB の母核に対して平面である場合 (平面型分子内電荷移動状態) は放射緩和による蛍光性を示すが、直角である場合 (ねじれ型分子内電荷移動状態) は無放射緩和による非蛍光性を示す。NB 誘導体の蛍光寿命の解析から、それぞれの緩和過程の速度定数を算出した。これら物理化学パラメーターの解析から、制御ユニットの求電子性は、ねじれ型分子内電荷移動状態の安定化に寄与していることが示唆された。

次に、細胞内脂肪滴のイメージングを検討したところ、MNs-NB はこれまで報告されているイメージングプローブの BODIPY 493/503 やナイルレッドと比べて高い解像度と定量性を示した。また、マウス生体内での脂肪組織イメージングも可能であった。

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	周東	智
副査	教授	松田	彰
副査	准教授	有澤	光弘
副査	客員准教授	阿部	洋 (連携分野)

## 学位論文題名

# 細胞内で選択的に活性化される機能性分子プローブの開発

## 博士学位論文審査等の結果について (報告)

本論文は、細胞内で選択的に活性化される機能性分子プローブの開発を目的とした以下の研究課題に関するものである。

### 1. 細胞内酵素によって活性化される機能性分子プローブの開発

グルタチオントランスフェラーゼ (GST) は、薬物代謝酵素として生体内で重要な役割を果たす。抗癌剤等の求電子基を有する疎水性化合物は、GST によって触媒されたグルタチオン (GSH) の求核置換反応によって GSH 抱合体を形成し、速やかに細胞外へと排出される。この GSH/GST 反応機構は抗癌剤等の薬物耐性の一因にもなっている。一方で、GST は癌細胞で高発現していることから、癌マーカーとしての利用も期待される。また近年では、GST は新規制癌薬の標的タンパク質としても有望である。そこで著者は、GST の反応活性を検出・イメージングするための新規分子プローブの開発に着手した。

著者は、GST の反応メカニズムに注目し、チオアニオンと反応し脱保護される求電子性芳香族スルフォニル基を制御ユニットとして用いることで GST を検出する分子プローブを設計した。すなわち、蛍光性化合物であるローダミン(Rh) のアミノ基にジニトロベンゼンスルフォニル (DNs) 基を制御ユニットとして導入することで、無蛍光性化合物 (DNs-Rh) に変換できる。DNs-Rh は、その制御ユニットが GST 触媒作用による GSH の求核置換反応により除去され、Rh に変換されることで蛍光発光した。本知見から、芳香族スルフォニル基を制御ユニットとして導入することで、化合物の機能を off にして、GST 触媒作用によって on にする分子プローブの設計原理が確立した。この設計原理を用いて、GST を検出するための多色蛍光プローブ、生物発光プローブ、MRI (核磁気共鳴イメージング) プローブを開発した。蛍光化合物のクレシルバイオレット (CV) に制御ユニット (DNs) を導入した DNs-CV は、既存の GST 検出プローブと比較して高感度な検出プローブとしての有用性を示した。さらに、GST を検出するための生物発光プローブおよび  $^{19}\text{F}$  MRI プローブをそれぞれ設計・合成した。不安定なジオキセタン中間体に制御ユニットを導入することで安定化した発光プローブは、GST 触媒作用で制御ユニットが除去されることで発光した。 $^{19}\text{F}$  MRI プローブは、トリフルオロメチル基を有するクマリン誘導体に制御ユニットを導入することで合成し、GST 触媒作用で制御ユニットが除去され、 $^{19}\text{F}$  MRI シグナルの変化を画像化できた。さらに、大腸菌において細胞内 GST 活性を観測できた。

### 2. 細胞内環境変化によって活性化される蛍光分子プローブの開発

脂肪滴の形成はエネルギー貯蔵手段であるが、その過度の蓄積は生体に様々な支障をきたす。脂肪滴の形成・成長・分解のメカニズムが詳細に解明されることによって、疾患の診断・治療に寄与する新たな研究展開が期待される。脂肪滴の蛍光イメージングプローブはその研究の強力な手段であり、実用性のある脂肪滴イメージングプローブの開発に着手した。

脂肪滴検出プローブを開発するに当たり鍵となるのは、脂肪滴への分布特異性が高いことと、疎水性環境下で蛍光が増強する off/on 機能である。著者は蛍光性化合物ナイルブルー(NB)の5位アミノ基に芳香族スルフォニル基を制御ユニットとして導入することで、疎水性環境下でのみ蛍光増強を起こす分子設計を可能にした。芳香族スルフォニル基の求電子性をジニトロベンゼンスルフォニル (DNs)、モノニトロベンゼンスルフォニル(MNs)、トシル (Ts) へと段階的に弱くすることで、NBの非極性溶媒クロロホルムに対する蛍光応答性は増大した。脂肪滴の誘電率に近い疎水性環境で応答性を示し、かつ適度な脂溶性を有する MNs-NB が最もよいプローブとなった。ここで、制御ユニットは、NBの励起状態構造の安定性に寄与していると考えられる。物理化学パラメーターの解析から、制御ユニットの求電子性は、構造の安定化に寄与していることが示唆された。

次に、細胞内脂肪滴のイメージングを検討したところ、MNs-NBはこれまで既存のイメージングプローブ、BODIPYや Nile Red と比べて高い解像度とを示した。また、マウス生体内での脂肪組織イメージングも可能であった。

以上述べたように、著者は、細胞内で選択的に活性化される機能性分子プローブに関する新知見を得たものであり、創薬化学において貢献するところ大なるものがある。よって、北海道大学博士(薬科学)の学位を授与される資格あるものと認める。