

京都大学	博士 (工学)	氏名	麻植 雅裕
論文題目	Development of Enzyme-Responsive Turn-on Fluorescence Probes Based on Activator-Induced Quencher-Detachment for Bioimaging (activator-induced quencher-detachment に基づいたバイオイメーjingのための酵素応答性 turn-on 型蛍光プローブの開発)		
(論文内容の要旨)			
<p>本学位論文は、色素の一部である官能基がカルボキシ基(activator)を生じることで消光基(quencher)がπ共役系を形成するように脱離する activator-induced quencher-detachment (AiQd) 機構を考案し、細胞内または生体内においてエステラーゼ・アセチルコリンエステラーゼ (AChE)・アルデヒド脱水素酵素 (ALDH) を検知する新しいタイプの turn-on 型蛍光プローブの開発に関する研究成果をまとめたものであり、序論と本論 6 章からなっている。</p> <p>序論では、酵素応答性 turn-on 型プローブの先行研究の紹介に続いて、生体内酵素を検出する新しいプローブの設計指針と新手法が臨床応用可能な高性能プローブの開発に必要であることが述べられている。</p> <p>第 1 章では、バイオイメーjingに汎用されているシアニン色素 Cy5 の分子内に求核性官能基のメルカプト基、ヒドロキシ基、アミノ基を導入することにより、Cy5 の π 共役イミニウム炭素への求核付加反応に基づいて、それぞれ 1,3-チアジナン、1,3-オキサジナン、ヘキサヒドロピリミジンを有する非発光性の閉環体が形成することを見出した。さらに、それぞれは環内の硫黄、酸素、窒素原子がプロトン化されることにより発光性の開環体を形成することを見出し、さらに閉環体と開環体の変換が可逆であることを明らかにしている。</p> <p>第 2 章では、1,3-チアジナンを有する消光型の閉環体に導入されたエステル基が加水分解されることによりカルボキシ基 (activator) に変換されると、メルカプト基 (quencher) が脱離し、π 共役系の拡張により蛍光がオンとなる activator-induced quencher-detachment (AiQd) 機構を新たに提唱している。AiQd の駆動力は、カルボキシ基の硫黄原子へのプロトン供与と、その結果生じるカルボキシラート基と Cy5 のイミニウム基との静電相互作用による開環体の熱力学的安定化であることを明らかにしている。また、この AiQd 機構を利用して、エステラーゼに迅速に応答する新しいタイプの turn-on 型プローブ CyME4 を開発し、生細胞内エステラーゼを検出できることを示している。さらに、立体的に嵩高い蛍光色素から基質のエステル基をアルキル鎖を介して遠隔配置することにより、酵素活性中心が基質に接近しやすくなり、プローブの酵素応答性が格段に向上することを明らかにしている。</p> <p>第 3 章では、AiQd 機構に基づいたコリンエステル基を有する AChE 応答性プローブの開発について述べられている。従来の AChE 用 tun-on 型プローブでは、蛍光色素のフェノール部位をカルバモイル基で保護することで消光し、AChE によりそのカルバモイル基が加水分解されると蛍光がオンとなるが、酵素との反応過程で毒性をもつ副生成物のジメチルアミンを生じる問題があった。開発したプローブ CyCE2 は基質としてコリンエステルを有するため、副生成物の問題が解決されることにより従来よりも細胞毒性が減弱することが明らかにされている。また、酵素基質と色素母骨格を適切に配置した CyCE2 は、AChE に対する応答性に優れていることをミカエリス・メンテン式を用いた酵素反応の速度論解析により明らかにしている。さらに、対アニオンのスルホナ</p>			

京都大学	博士（工学）	氏名	麻植 雅裕
<p>ートや電子求引性のクロロ基をプローブ分子内に導入することにより、AiQd 機構を制御できることを明らかにしている。</p> <p>第4章では、シアニン色素 Cy5 または Cy7 の色素骨格にメルカプト基 (quencher) と酵素基質のホルミル基を導入した新規プローブを合成し、がん幹細胞 (CSC) マーカーである ALDH1A1 に応答する turn-on 型プローブの開発に成功している。従来のプローブは可視光領域の吸発光特性を有するが、開発した新規プローブは近赤外光領域の吸発光特性を有するため、生体関連物質からの自家蛍光が減弱するため、高コントラストな撮像が得られることを明らかにしている。開発した Cy5 誘導体 C5S-A を用いることにより、すい臓がん細胞 SUIT-2 中に存在する CSC を ALDH センサーのゴールドスタンダードの ALDEFLUOR よりも高コントラストに可視化することに成功している。さらに、C5S-A は蛍光活性化セルソーティング (FACS) による SUIT-2 細胞中の CSC の分取にも応用できることを示すとともに、C7S-A を用いて、担癌マウスにおける CSC を多く含む腫瘍の選択的な可視化を達成している。</p> <p>第5章では、第4章で述べた C5S-A の 1,3-チアジナンの 5 位にメチル基を導入した β-C5SA の水中における熱力学的安定性が増大すること、および β-C5SA を用いることにより、ALDH1A1 に対する応答性の指標となる signal/noise (S/N) 比が、C5S-A の場合と比較して格段に改善されることを明らかにしている。また、β-C5SA の閉環体の熱力学的安定性の向上により、生体内チオールと quencher のメルカプト基との反応が抑制されるため、ALDH1A1 酵素以外の反応による偽陽性を回避できることを明らかにしている。</p> <p>第6章では、生体内の ALDH1A1 と β-ガラクトシダーゼ (β-gal) の二つの酵素との反応によって初めて蛍光がオンになるプローブの開発について述べられている。ALDH1A1 などのがん幹細胞マーカーは通常幹細胞 (NSC) にも発現しているため、第4章で開発した C5S-A、C7S-A プローブや従来のプローブでは、CSC と NSC の識別が困難であった。開発した β-ガラクトシル基とホルミル基を有するヘミシアニン色素 CHO_βGal は、ALDH1A1 と β-gal のどちらか一方の酵素のみでは発光しないが、両方の酵素が存在すると強く発光することを見出している。生細胞実験において、ALDEFLUOR や C5S-A は通常細胞に存在する ALDH 発現性 NSC と CSC を識別できないが、CHO_βGal は CSC のみを検出できることを明らかにしている。</p> <p>以上本論文は、色素の発光のオン・オフを精密に制御し得る新たな AiQd 機構の概念に基づく、生体内マーカーとして重要な意味を持つ酵素群を検出できる酵素応答性 turn-on 型蛍光プローブの開発について述べられている。その研究成果は、多くの学術的な新知見を与えるとともに、臨床応用が期待される蛍光プローブの開発に新機軸をもたらすものである。</p>			

氏名

麻植 雅裕

(論文審査の結果の要旨)

本学位論文は、カルボキシ基 (activator) と求核性官能基 (quencher) を利用した酵素応答性 turn-on 型蛍光プローブに関する研究成果をまとめたものであり、得られた主な成果は以下のとおりである。

第1章では、バイオイメージングで汎用されているシアニン色素 Cy5 の分子内に求核性官能基のメルカプト基、ヒドロキシ基、アミノ基を導入し、Cy5 の π 共役イミニウム炭素への求核付加反応により非発光性の閉環体を形成することおよび可逆的な開環反応が起こることを見出した。第2章では、メルカプト基を有する Cy5 の分子内に導入されたエステル基が加水分解によりカルボキシ基 (activator) へと変換されることにより、メルカプト基 (quencher) が脱離し、 π 共役系が拡張することで蛍光がオンとなる activator-induced quencher-detachment (AiQd) 機構を提唱した。この AiQd 機構を応用し、エステラーゼに迅速に応答する turn-on 型プローブ **CyME4** を開発した。第3章では、酵素基質と quencher との距離の調節や分子内への対アニオンと電子求引性官能基の導入により AiQd 機構を制御できることを見出し、AiQd 機構に基づくアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 応答性プローブ **CyCE2** を開発した。さらに、開発したプローブは細胞毒性が低く、AChE に対する高い親和性と応答性を有することを明らかにした。第4章では、がん幹細胞 (CSC) マーカーであるアルデヒド脱水素酵素 (ALDH1A1) に応答する近赤外蛍光プローブ **C5S-A** および **C7S-A** を開発し、**C5S-A** および **C7S-A** が *in vitro* や *in vivo* での CSC イメージングおよび蛍光活性化セルソーティングによる CSC の分取に極めて高精度に応用できることを示している。第5章では、ALDH1A1 応答性プローブ **C5S-A** の 1,3-チアジナンの 5 位にメチル基を導入することで、非発光性環構造の熱力学的安定性が向上し、それによる蛍光のオン・オフの S/N 比が格段に向上することを見出している。さらに、同安定性により、生体内チオールによる偽陽性も回避できることを明らかにした。第5章では、生体内 CSC イメージングを指向した β -ガラクトシル基とホルミル基を有するヘミシアニン色素 **CHO β Gal** を開発し、ALDH1A1 と β -ガラクトシダーゼの両方の酵素の存在下でのみ蛍光がオンになることを実証した。

以上本論文は、分子プローブの一部官能基が酵素との反応により変換され activator が生じることで quencher 部分が開環し、色素 π 共役系が復活する AiQd 機構の提案とその検証に続いて細胞および生体内の重要酵素の活性を検知できる turn-on 型蛍光プローブの創製と発展的応用についてまとめたものであり、学術的、实际的に寄与するところが大きい。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。また、令和4年2月16日、論文内容とそれに関連した事項について諮問を行い、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規定第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公開可能日： 2022年 5月 1日以降