

(続紙 1)

京都大学	博士 (薬 学)	氏名	相田 一樹
論文題目	高感度バイオ蛍光分析のための含ランタニド蛍光試薬の開発に関する研究		
(論文内容の要旨) 蛍光分析法は、生体の組織や細胞を対象として、安全かつ簡便な操作によって、その中の物質の迅速な分析や蛍光顕微鏡による画像解析が可能であることから、近年多用されている。現在、この生体の組織や細胞を対象とするバイオ蛍光分析には有機蛍光試薬が主に用いられているが、この有機蛍光試薬は励起波長と蛍光波長が非常に近いため、励起光に由来するバックグラウンドノイズと蛍光を分離しにくく高感度での蛍光分析が難しいことから、これを可能とする新規蛍光試薬の開発が望まれている。 そこで申請者は、この組織や細胞を対象とする高感度分析用蛍光試薬の開発を計画し、励起光の散乱や屈折に由来するノイズの除去に効果的である大きな励起波長と蛍光波長の差(Stokes' shift)と、時間分解蛍光測定法を用いることによって自家蛍光などの有機蛍光体由来のノイズの除去に効果的である長い蛍光寿命とを有するランタニド元素、特に生体組織由来の自家蛍光および散乱・吸収の寄与が小さい近赤外線領域に蛍光を持つネオジム(Nd) とイッテルビウム(Yb) に着目した。また、含ランタニド蛍光試薬にはランタニド元素へエネルギーを受け渡すアンテナ部が重要な役割を果たすが、申請者は含ランタニド蛍光部とアンテナ部を独立させ、それらの部を適切に組み合わせることで有効な蛍光試薬を開発することを考えた。そこで本研究では、Nd、Ybと安定なキレートを形成する1,4,7,10-tetraazacyclodecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA) との錯体部分を蛍光部とし、Nd、Ybの励起に必要なエネルギーに近い領域に蛍光を発する4-amino-fluorescein (4AMF) または広範な環境下で安定した分光学的特性を示すpyridylazonaphthol (PAN) をアンテナ部とする新規蛍光試薬を開発するとともに、それらの生細胞蛍光分析への応用性を検討した。 第1章 高感度蛍光分析に有効な含ランタニド蛍光試薬の開発 蛍光部、アンテナ部をそれぞれ合成後、アンテナ部にクロロアセチルアミド基を導入し、次いで蛍光部とのN-アルキル化反応により、4種の化合物(4AMF-DOTA(Nd)、4AMF-DOTA(Yb)、PAN-DOTA(Nd)、PAN-DOTA(Yb))を得た。合成した各蛍光試薬の蛍光スペクトルを測定したところ、4AMF-DOTA(Nd)、PAN-DOTA(Yb)はそれぞれNd、Ybに特徴的な近赤外線領域の強い蛍光が検出された。一方、4AMF-DOTA(Yb)、PAN-DOTA(Nd)からは、先の2種に比べると弱い蛍光しか検出されなかった。また、4AMF-DOTA(Nd)とPAN-DOTA(Yb)はそれぞれ$\lambda_{em}=880, 900$または975 nmの近赤外線領域の蛍光を示し、そのStokes' shift はいずれも数百 nm になること、さらに4AMF-D			

OTA (Nd) は一般的な有機蛍光色素の数百倍の蛍光寿命を持つことが認められた。また、4AMF-DOTA (Nd) はアンテナ部のfluorescein の特性から酸性溶液中では蛍光の消失が認められたが、PAN-DOTA (Yb) では蛍光強度にpH 依存性は認められなかった。

以上の結果から、4AMF-DOTA (Nd)、PAN-DOTA (Yb) はいずれも、大きなStokes' shift を利用して高S/N 比を実現するのに十分な蛍光特性を持つことが認められ、組織や細胞での蛍光分析に利用できる可能性が示された。また、4AMF-DOTA (Nd) は、時間分解蛍光測定法を用いることにより高S/N 比が得られたこと、および、Nd に由来する近赤外線領域の蛍光のみでなく、fluoresceinに由来する蛍光が可視領域において同時に検出できたことから、本化合物は近赤外線領域で高S/N比の分析を行い、可視領域で視覚的に画像解析できる、多目的蛍光プローブとしての可能性を持つことも示された。加えて、4AMF-DOTA (Nd) はアンテナ部位の吸光係数が大きく、標識試薬化において有効なカルボキシ基やヒドロキシ基を有することから、蛍光標識試薬化への応用性がPAN-DOTA (Yb) よりも優れていることが認められた。

第2章 生細胞蛍光分析への含ネオジム蛍光試薬4AMF-DOTA (Nd) の応用

4AMF-DOTA (Nd) を生細胞蛍光分析へ利用するための標識試薬化について検討した。標識試薬化するにあたり、4AMF-DOTA (Nd) にチオール基選択的に結合可能なマレイミドを組み込んだ新規蛍光標識試薬(M-AMF-DOTA (Nd)) を合成し、それを用いてavidin を修飾したAvidin-AMF-DOTA (Nd)を得た。蛍光分析によりAvidin-AMF-DOTA (Nd) は4AMF-DOTA (Nd) と同等の蛍光特性を認め、M-AMF-DOTA (Nd) は標識試薬化により蛍光特性を失わず、avidinの蛍光標識試薬として有効であることが認められた。さらに、Avidin-AMF-DOTA (Nd) のbiotinへの結合能を非標識avidin と比較したところ、結合能は非標識avidinとほぼ同等であった。また、Avidin-AMF-DOTA (Nd) のがん細胞への取り込みをfluorescein isothiocyanate (FITC) 標識avidinと比較したところ、取り込み量に有意差はなかった。さらに、Avidin-AMF-DOTA (Nd) を取り込んだ細胞において、Fluorescein 領域(490～600 nm)とNd 領域(870～910 nm)でのS/N比を算出したところ、Nd領域のS/N比はFluorescein 領域の10倍以上高い値を示した。これらの結果から、M-AMF-DOTA (Nd) は標識対象分子の化学的特性を変化させることなく、高いS/N比が得られる蛍光標識試薬として有用であることが認められた。

以上本研究は、ランタニド元素であるNdとYbの錯体を用いることにより組織や細胞を対象とする高感度蛍光分析用試薬の開発に成功したものであり、生体試料中の微量物質を対象とする蛍光分析、高コントラスト・低バックグラウンドの蛍光画像解析、更には近赤外光の高い生体組織透過性を利用した生体蛍光イメージング法の開発に有益な情報を提供するものと期待される。

(論文審査の結果の要旨)

生体の組織や細胞を対象とするバイオ蛍光分析において、現在用いられている有機蛍光試薬は励起波長と蛍光波長が非常に近いために高感度分析が難しいという問題がある。そこで、本論文はこの問題点を解決する高感度分析用蛍光試薬の開発を計画したものである。

そのため申請者は、①励起光の散乱や屈折に由来するノイズの除去に効果的な大きな励起波長と蛍光波長の差(Stokes' shift)と時間分解蛍光測定法が可能であること、②生体組織由来の自家蛍光および散乱・吸収の寄与が小さい近赤外線領域に蛍光を持つという条件を満たすランタニド元素、ネオジム(Nd)およびイッテルビウム(Yb)に着目し、試薬の分子設計においては、含ランタニド蛍光部とランタニド元素へエネルギーを受け渡すアンテナ部を独立的に考案し、二つの部を適切に組み合わせることで有効な蛍光試薬を開発することを考えた。そこで本論文は、Nd、Ybと安定なキレートを形成する1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA) との錯体部分を蛍光部、NdおよびYbの励起に必要なエネルギーに近い領域に蛍光を発する4-amino-fluorescein (4AMF) または広範な環境下で安定した分光学的特性を示すpyridylazonaphthol (PAN) をアンテナ部とする新規蛍光試薬を開発し、それらの生細胞蛍光分析への応用性を検討したものである。

そこで、4種の候補化合物(4AMF-DOTA(Nd)、4AMF-DOTA(Yb)、PAN-DOTA(Nd)、PAN-DOTA(Yb))を合成し、各蛍光試薬の蛍光スペクトルを測定した結果、①4AMF-DOTA(Nd)、PAN-DOTA(Yb)が高S/N比を実現できる蛍光特性を持つこと、②4AMF-DOTA(Nd)が時間分解蛍光測定により高S/N比を得ること、③4AMF-DOTA(Nd)はNdに由来する近赤外線領域およびfluoresceinに由来する可視領域に同時に蛍光を有すること、④4AMF-DOTA(Nd)はアンテナ部位の吸光係数が大きく、標識試薬化において有効なカルボキシ基やヒドロキシ基を有することを認め、4AMF-DOTA(Nd)が生体の組織や細胞を対象とする高感度バイオ蛍光分析試薬として最も有効であることを見出した。

次に、4AMF-DOTA(Nd)を生細胞蛍光分析へ利用するための標識試薬化について検討するために、チオール基選択的に結合可能なマレイミドを4AMF-DOTA(Nd)に組み込んだ新規蛍光標識試薬(M-AMF-DOTA(Nd))を合成し、それを用いてavidinを修飾したAvidin-AMF-DOTA(Nd)を得た。得られたAvidin-AMF-DOTA(Nd)について、①biotinへの結合能を測定したところ結合能は非標識avidinとほぼ同等であること、②がん細胞への取り込みはfluorescein isothiocyanate (FITC)標識avidinと有意差はないこと、③Avidin-AMF-DOTA(Nd)を取り込んだ細胞において、可視のFluorescein領域と近赤外のNd領域でのS/N比を算出したところ、Nd領域のS/N比がFluorescein領域の10倍以上高いことを認め、M-AMF-DOTA(Nd)が高感度蛍光分析用試薬として有

用であることを見出した。

以上本研究は、ランタニド元素であるNdとYbの錯体を用いることにより組織や細胞を対象とする高感度蛍光分析用試薬の開発に成功したものであり、生体試料中の微量物質を対象とする蛍光分析、高コントラスト・低バックグラウンドの蛍光画像解析、更には生体蛍光イメージング法の開発に有益な情報を提供するものと評価される。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成22年1月28日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降