

京都大学	博士（工 学）	氏名	水澤 圭吾
論文題目	Development of Fluorescent Turn-on Self-assembled Nanoprobes for Imaging Specific Proteins under Live Cell Conditions. (生細胞での蛍光オフオン型蛋白質イメージングを可能とする自己組織化ナノ集合体の開発)		
(論文内容の要旨)			
蛋白質は生体内において物質変換・運搬・情報伝達などといった生命維持のための重要な役割を担う生体分子である。蛋白質機能の異常により疾病が引き起こされることもあるため、蛋白質の可視化は生命現象の解明だけでなく疾病診断などの応用にも繋がる。内在性蛋白質をイメージングするために、蛍光色素を修飾した抗体やリガンドといった標的蛋白質に対し高い親和性を有する蛍光プローブが用いられているが、その多くは常時蛍光を発するために洗浄操作などの煩雑な操作を伴うため、高感度な可視化は困難である。そのため、標的蛋白質のみに応答して蛍光を発するようになる蛍光オフオン型プローブおよび手法の開発は魅力的である。しかし、そのような手法原理およびプローブ設計戦略は未だ不十分である。本論文は、標的蛋白質を選択的に蛍光オフオン型で検出およびイメージングする新たな手法原理を開発し、本手法を生細胞条件下での蛋白質イメージング法へと展開した結果をまとめたものであって、3章からなっている。 第1章では、蛋白質リガンドと蛍光色素を連結した両親媒性プローブの自己会合／解離を作動原理とした新規蛍光オフオン型蛋白質検出法を開発した。一般的に蛍光色素は会合することによって消光することが知られている。そのため、プローブの親水部に蛋白質リガンドを、疎水部には疎水性蛍光色素を用いた両親媒性の蛍光プローブを用いることで、標的蛋白質非存在下では、プローブが集合体を形成し蛍光オフ状態となる。これに対して標的蛋白質存在下では、プローブのリガンド部位が蛋白質によって認識されることで、会合体の崩壊を引き起こし、それに伴い蛍光が回復する。具体的に、ヒト由来炭酸脱水酵素(human carbonic anhydrase; CA)の阻害剤である benzenesulfonamide と疎水性蛍光色素である BODIPY558/568 をリンカーで連結した両親媒性プローブを合成し種々の評価を行った結果、そのプローブ単独では水中で約 100 nm サイズの球状会合体を形成し殆ど蛍光を発していないことが明らかとなった。一方で、その溶液に CA を添加すると、蛋白質のリガンド認識駆動によって会合体が崩壊し、蛍光強度が約 38 倍増大した。さらに、プローブのリガンド部位を Avidin に親和性のある biotin や Trypsin に親和性のある benzamidine に変更したプローブでも同様に、それぞれの標的蛋白質を蛍光オフオン型で検出することが可能であることを示した。それにより、様々な標的蛋白質に対する自己会合型蛍光オフオンプローブの創製が可能であることを実証した。また、どのプローブも標的蛋白質のみにしか蛍光応答を示さなかったことから、これらのプローブは高い選択性と高感度検出能を兼ね備えたプローブであることが明らかとなった。 第2章では、本手法を生細胞表層の膜蛋白質の蛍光オフオン型イメージング法へと展開した。まず、癌細胞の表層に過剰発現することが知られている葉酸受容体(Folate receptor; FR)を標的蛋白質として選択し、FR リガンドでありジヒドロ葉酸還元酵素(dihydrofolate reductase; DHFR)の阻害剤でもある methotrexate(MTX)と BODIPY 色素を連結した自己会合型蛍光プローブを作製した。そのプローブは試験管内において DHFR			

京都大学	博士（工 学）	氏名	水澤 圭吾
検出用自己会合型蛍光オフオンプローブとして機能する一方で、プローブの細胞膜への非特異的吸着および膜透過によって生細胞表層 FR の選択的イメージングは困難であることが明らかとなった。そこで、プローブの細胞膜に対する非特異的吸着や透過性を最小限に抑えるために、親水性蛍光色素でありアニオン性蛍光色素である Fluorescein を本手法に適用可能とする新たな分子設計指針を考案した。具体的には、プローブの色素部位近傍に疎水性骨格を会合部位として導入することによって、Fluorescein を有する自己会合型蛍光オフオンプローブの開発を行った。種々の疎水性骨格を導入したプローブを合成し試験管内評価を行った結果、Fluorescein を有する自己会合型蛍光オフオンプローブの創製が可能であることを示した。また、その疎水性骨格の疎水力が集合体の安定性を制御しており、標的蛋白質に対するプローブのシグナル応答能を決定付けていることを明らかにした。なお、その試験管内において DHFR 検出用自己会合型蛍光オフオンプローブとして機能したプローブを用いることによって、洗浄操作を行うことなく生細胞表層 FR 選択的に自己会合／解離に基づいた蛍光オフオン型でイメージングすることに成功した。また、低酸素条件下において癌細胞表層に過剰発現することが知られている膜貫通型 CA を標的蛋白質とした自己会合型蛍光オフオンプローブの作製にも成功し、本手法の一般性を実証した。また、膜貫通型 CA イメージング用自己会合型蛍光オフオンプローブと CA 結合阻害剤との競合阻害実験によって、生細胞条件下での膜貫通型 CA に対する阻害剤の IC_{50} 値を蛍光イメージング画像の解析から算出することに成功し、阻害剤スクリーニング法における本プローブの有用性を示した。 第3章では、本手法による生細胞内蛋白質を標的とした蛍光オフオン型イメージングを行った。具体的には、大腸菌由来 DHFR(eDHFR)を標的蛋白質として選択し、高感度緑色蛍光蛋白質 (enhanced green fluorescent protein; EGFP) を融合した eDHFR(eDHFR-EGFP)を定常的に発現している HeLa 細胞を用いて、生細胞内における本手法の適用性について検討を行った。まず、第2章において確立した分子設計に基づいて、親水性蛍光色素である tetramethylrhodamine と MTX を連結した自己会合型蛍光オフオンプローブを作製した。本プローブは試験管内において eDHFR 検出用自己会合型蛍光オフオンプローブとして機能することが明らかとなり、本手法における適用可能な色素種の拡張に成功した。さらに、細胞にプローブ溶液を添加するのみで、洗浄操作を行うことなく生細胞内 eDHFR-EGFP の蛍光オフオン型イメージングが可能であり、夾雑な細胞内環境下においても本手法原理が適用可能であることを明らかにした。また、プローブの細胞内移行を評価するために、プローブ添加直後からの細胞内におけるプローブ蛍光の経時変化観察およびプローブとエンドサイトーシス阻害剤との併用実験によって、プローブはエンドサイトーシスを介して細胞内に移行していることを明らかにした。			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、標的蛋白質選択的な蛍光オフオン型での検出およびイメージングする新たな手法原理を考案し、膜蛋白質および細胞内蛋白質を標的とした生細胞での蛍光イメージング法への展開を目標に研究した結果についてまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. 親水性リガンドと疎水性蛍光色素である **BODIPY** 色素を連結した両親媒性プローブの自己会合／解離を作動原理とした新規の蛍光オフオン型蛋白質検出法を開発した。標的蛋白質に応じてプローブのリガンド部位を変更することによって、様々な標的蛋白質に対する自己会合型蛍光オフオンプローブの創製が可能であり、本手法の一般性を示した。それらのプローブは均一溶液中において標的蛋白質以外の蛋白質には応答せず、標的蛋白質を選択的かつ高感度検出を可能にする自己会合型蛍光オフオンプローブとして機能することを確認した。
2. 会合モジュールとして色素近傍に疎水性骨格を導入することにより、親水性蛍光色素である **Fluorescein** にも適用可能とする蛋白質検出用自己会合型蛍光オフオンプローブの新たな分子設計指針を見出した。プローブに導入した疎水性骨格の構造によっては標的蛋白質に対するシグナル応答能が異なり、構造の最適化によりプローブの自己会合／解離を制御することが可能であることを示した。それにより、新しく合成した親水性 **Fluorescein** 色素を有する自己会合型蛍光オフオンプローブを用いることで、洗浄操作を行うことなく生細胞表層の葉酸受容体や膜貫通型炭酸脱水酵素といった癌細胞マーカー蛋白質を本手法原理に基づいた蛍光オフオン型でイメージングすることに成功した。さらに、自己会合型蛍光オフオンプローブと阻害剤との競合阻害によって、生細胞条件下での膜蛋白質に対する阻害剤の IC_{50} 値を算出することに成功した。
3. 新たな分子設計指針に基づいて、親水性 **tetramethylrhodamine** 色素を有する自己会合型蛍光オフオンプローブを開発した。そのプローブを用いることで、プローブを洗浄することなく生細胞内の標的蛋白質の選択的な蛍光オフオン型イメージングに成功し、細胞内環境においても本手法原理の適用が可能であることを示した。さらに、プローブはエンドサイトーシスによって細胞内へと移行していることを明らかにした。

本論文は、上記の通り、自己会合型ナノプローブによる新規蛍光オフオン型蛋白質検出法の開発を行い、その手法による生細胞表層膜蛋白質および細胞内蛋白質を標的とした蛍光オフオン型イメージングを達成しており、学術上、實際上寄与するところが少なくない。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、平成25年2月27日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、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。