

別紙 4

報告番号	※ 甲 第 号
------	---------

主 論 文 の 要 旨

論 文 題 目

Development of New Fluorescent DNA-Staining Cyanine Dyes for Live Imaging of Cell Nucleus
(細胞核ライブイメージングに向けた新規蛍光性 DNA 染色シアニン色素の開発)

氏 名

宇野 何岸

論 文 内 容 の 要 旨

DNA (deoxyribonucleic acid)は、生物の遺伝情報を担う生体高分子であり、DNA を高感度に検出する蛍光性 DNA 染色色素は、分子生物学や遺伝学など生命科学を支える必須な研究ツールである。細胞生物学分野においては、光学顕微鏡および検出器技術の目覚ましい発展に伴い、ライブイメージングによる分子の動的挙動が注目されている。しかしながら、生細胞 DNA イメージングに使用される蛍光性 DNA 染色色素は、生細胞には適さない紫外光励起を必要とする分子や、可視光で励起可能なものの DNA 選択性に乏しい分子に頼っているのが現状である。最先端の光学顕微鏡技術を活かす蛍光性 DNA 染色色素に求められる条件として、(1) DNA 選択的に顕著な蛍光増幅を示すこと、(2) 優れた耐光性を有していること、(3) 優れた細胞透過性を有すること、(4) 生細胞の活動に顕著な影響を及ぼさないこと、(5) 生細胞に吸収されにくい可視光領域で励起可能であることが挙げられ、これらの条件を満たす分子が待ち望まれている。本論文は、以上に示した性質をすべて満たす理想的な DNA 蛍光染色色素の開発とその機能発現に関するものであり、3 章より構成されている。

第一章では、蛍光性 DNA 染色色素である市販試薬 SYBR-Green I に着目し、その構造と蛍光特性の相関を明らかにした。SYBR-Green I は現在の分子生物学に必須なツール、例えば q-PCR、DNA 電気泳動、生細胞の核染色で頻繁に使用される蛍光量子収率が極めて高い蛍光性 DNA 染色色素である。申請者は、様々な SYBR-Green I の部分骨格を有する分子を合成及び DNA 存在下での光学特性を評価し、キノリンの 2 位に結合したジアルキルアミノ基が高い蛍光量子収率に必須であることを明らかにした。この知見をもとに、ヘテロ原子置換やシアニンの共役拡張を施すことで、吸収・蛍光波長の長波長化を実現し、可視光領域を幅広く網羅する一連の非対称型 DNA 染色色素の開発に成功した。また、合成した分子が、固定細胞の核染色や DNA 電気泳動にも応用できることを明らかにした。

第二章では、可視光レーザー (514 nm 以上) で光励起可能かつ DNA を高選択的に染色できる色素の開発を行った。第一章で明らかにしたように、モノメチン部位を有するシアニン色素は初期状態の蛍光量子収率が低く、DNA 存在下で顕著な蛍光増幅を示すことから、モノメチン部位を有するシアニン色素骨格をもつ分子を基盤に、吸収・蛍光波長の長波長化を図った。申請者はシアニ

ン共役が拡張されたピリドシアニン骨格に着目し、様々なアリール基を有するピリドシアニン誘導体を設計・合成し、それらの DNA・RNA 存在下での蛍光特性の評価を行った。得られた一連の *N*-アリールピリドシアニンは、そのアリール基の電子供与能を増大させることにより、DNA 結合時の蛍光量子収率を減衰させることなく 532 nm 及び 561 nm のレーザー源に吸収領域に適合させることに成功した。また、合成した *N*-アリールピリドシアニンの DNA 結合時の蛍光増幅能は数千倍であり、耐光性においても同吸収帯の市販試薬 SYTO 80, SYTO 82, SYTO 84 と比し同等もしくはそれ以上の特性を有していることが明らかとなった。さらに、一般にシアニン色素は、DNA 選択性に乏しい。これに対し、*N*-アリールピリドシアニン誘導体は、非常に高い DNA 選択性 ($I^{dsDNA}/I^{RNA} = 32$) を有し、この値は DNA 選択性が優れるとされる DAPI や Hoechst などの値を大幅に上回った。このことは、*N*-アリールピリドシアニンが、多量の RNA 分子が存在する生細胞内においても DNA を選択的に染色できる可能性を示唆した。実際、生細胞核染色を行ったところ、合成したこれら一連の分子群は HeLa 細胞だけでなく、市販試薬では染色困難なシロイヌナズナ組織 (葉・根) やヒメツリガネゴケなどの植物細胞の核を固定化することなく高選択的に染色した。染色された HeLa 細胞において細胞分裂期特異的に細胞死が誘発されたが、その他に関しては生細胞 DNA 染色プロトコルに必要とされる条件 (1)~(5) をすべて兼ね備えた分子群であることが明らかとなった。

第三章では、第二章で独自に開発した蛍光性 DNA 染色色素を基盤として、さらなる機能性分子へと昇華させるため、光照射により蛍光強度が大きく上昇する分子、すなわち光活性化型 DNA 染色色素の開発を行った。光照射により蛍光強度が変換する分子は、生細胞内の動的挙動の解明に極めて有効な細胞生物学的ツールとなっている。生細胞核のイメージングについては、光活性化型蛍光タンパク質を用いて盛んに行われている。しかし、蛍光タンパク質には、分子量が大きいこと、遺伝子導入に長い時間を有すること、遺伝子導入できる生物種が限られていることなどの問題点があり、これらの問題を回避できる有機小分子で構成される光活性化型 DNA 染色色素の開発が求められてきた。申請者は、ジフェニルピリドシアニンのモノメチン部位の水素原子をハロゲン原子 (臭素原子、塩素原子) に置換することで、脱ハロゲン化に伴う光活性化能を付与させることを目指した。単一原子の置換による本分子設計では、光照射前後での構造変化および電子的性質は最小限に抑えられている。このため、消光状態のハロゲン化フェニルピリドシアニンは、フェニルピリドシアニンの吸収領域である可視光により光活性化されること、およびフェニルピリドシアニンの核局在性を保持していることが期待された。試験管内実験より、ハロゲン化ジフェニルピリドシアニンは、DNA 存在下 561 nm の光照射に伴い効率的な蛍光増幅が確認され、その光照射後の蛍光スペクトルは、フェニルピリドシアニンのスペクトル波形と一致した。これらの結果から、ハロゲン化フェニルピリドシアニンの光活性化は、脱ハロゲン化反応を介して起こっていることが示唆された。また、任意の細胞核の全体または一部分を 560 nm で光照射できる共焦点レーザー顕微鏡を用いて生細胞染色による細胞核イメージングを行ったところ、光照射部位特異的に光活性化状態を誘起することに成功した。

以上、本申請者は、生細胞核イメージングに適した、新しい蛍光性 DNA 染色シアニン色素を開発した。本研究で開発した蛍光性 DNA 蛍光色素は、モデル生物にとられることなく多くの生物材料に活用され、生命科学分野の進展に大きく貢献することが期待される。