

論文審査の結果の要旨および担当者

| | |
|------|---------|
| 報告番号 | ※ 甲 第 号 |
|------|---------|

氏 名 宇野 何岸

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)

論文審査担当者

主 査 名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所
教授 博士(工学) 伊丹 健一郎

委 員 名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所
教授 博士(工学) 山口 茂弘

委 員 名古屋大学大学院理学研究科
教授 博士(工学) 齋藤 進

論文審査の結果の要旨

別紙 1 - 2

DNA 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。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、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実施し、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 *N*-アリアルピリドシアニンの開発を行った。種々の誘導体を合成し、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。*N*-アリア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と比し同等もしくはそれ以上の特性を有している。さらに、*N*-アリア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。また、合成した一連の分子群は 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 染色プローブ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、*N*-アリア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、脱ハロゲン化に基づく光活性化能を付与させることに成功した。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 の光照射によってフェニルピリドシアニンの生成に伴う効率的な蛍光増幅が確認された。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い、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、モデル生物にとらわ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。以上の理由により、申請者は博士(理学)の学位を授与される十分な資格があるものと認められる。