

## 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 小笠原 宏亮

論 文 題 目 Phosphine Oxide-Containing Fluorescent Ion Probes for Live-Cell Imaging

(ホスフィンオキシドを含む蛍光イオンプローブの創製とライブセルイメージングへの応用)

### 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) 山口 茂弘

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) 伊丹 健一郎

委 員 名古屋大学理学研究科  
教 授 博士(薬学) 阿部 洋

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  
特任准教授 博士(理学) 佐藤 良勝

## 論文審査の結果の要旨

細胞内では様々なイオンが協奏的に働き、生命活動が維持されている。このようなイオン動態を細胞が生きたままの状態で見えるため、申請者はホスフィンオキシド (P=O) を鍵とする蛍光色素骨格を基盤とした蛍光プローブの創製に取り組んだ。具体的には、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{H}^+$ の濃度変化を高精度で検出することができる蛍光プローブ開発について、分子設計、合成、物性評価、さらに細胞内イメージングによる機能評価を実施し、得られた成果を本章にまとめている。

異なる二波長の蛍光強度比を計測するレシオイメージングは、細胞内金属イオン濃度変化を定量的に評価できる有用な手法である。しかし、従来のレシオ型  $\text{Na}^+$ プローブは、蛍光イメージングにおいて細胞毒性が高い紫外光による励起が必要であった。この課題に対し申請者は、可視光励起が可能なベンゾホスホール P-オキシドに着目し、これを骨格とした蛍光プローブ開発に着手した。本プローブは、 $\text{Na}^+$ 選択的な蛍光応答を示し、濃度上昇に伴う蛍光波長の短波長シフトが認められた。実際に、細胞内  $\text{Na}^+$ 濃度変化をレシオイメージングによって検出することにも成功し、ツール分子としての高い有用性を示した。

次に、申請者は、赤色蛍光色素として P=O 含有フルオレセイン誘導体を採用し、長波長励起が可能な  $\text{Ca}^{2+}$ 蛍光プローブの開発を行った。赤色蛍光色素を用いた場合は、光誘起電子移動機構に基づいた蛍光プローブの創製は本質的に困難である。しかし、P=O の高い電子受容性によって色素骨格の還元電位が高くなり、光誘起電子移動による蛍光消光が効率的に進行することを見出した。プローブの蛍光強度は  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度依存的に増大し、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化を検出するために十分な変化量を示した。本プローブの高い耐光性と低い光毒性を踏まえ、ヒスタミン刺激に応答した反復的な細胞内カルシウムの濃度変化（カルシウム振動）を長時間に渡り検出することに成功した。

さらに、P=O を含む一連のキサントン色素に対する新たな構造修飾法を考案し、高機能 pH プローブの開発を行った。生体イオンの動態解析には、細胞内オルガネラでおこる局所的なイオン濃度変化を高精度で検出できる新しい技術が必要である。しかし、蛍光プローブをオルガネラ特異的に集積させるためには、煩雑な合成を要する場合が多い。そこで、申請者は  $\pi$  共役系に直接関与しないリン原子上のフェニル基に着目し、オルガネラ標識部位の容易な導入法を確立した。実際、2つの  $\text{pK}_a$  を有する pH プローブをエンドソームに取り込ませることにより、エンドソーム成熟過程における pH 変化を可視化することに成功した。

以上のように、申請者は P=O の電子のおよび構造的な特性に着目し、既存技術とは一線を画す優れた特性をもった新たな蛍光プローブ創製を達成した。開発した蛍光プローブの有用性は、細胞イメージングにより実証した。これら一連の成果は、プローブ開発において新たな分子設計指針を示すだけでなく、ケミカルバイオロジーや生物学の発展にも大きく寄与するものである。よって、申請者は博士（理学）の学位を授与される資格があるものと認められる。