

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

氏名：小笠原 宏亮

博士論文の要約：

細胞内外に存在する多くのイオン濃度は精密に制御されており、中でも  $\text{Na}^+$  や  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{H}^+$ などのカチオン種が関与する協奏的な動態は、生体の膜電位制御やタンパク質の構造制御を介してシグナル伝達機構の中樞を担っている。カチオン濃度の変化を光情報に変換する蛍光プローブ（蛍光イオンプローブ）を用いることにより、生きた細胞におけるこれらイオンの物質動態を高い時空間分解能で蛍光イメージングすることができる。ゆえに、様々な蛍光イオンプローブが開発されているが、その多くは古典的な蛍光色素骨格をもとに分子設計されているため、細胞に対する光毒性、自家蛍光による感度の低さ、耐光性の乏しさなどの問題に直面することが多い。これらの問題を根本的に解決するためには、優れた発光特性を有する蛍光色素骨格の開発が求められている。

新たな蛍光色素骨格へのアプローチとして最近注目を集めている方法に、 $\pi$  共役骨格への典型元素の導入がある。典型元素の中でも、リン原子の導入は、効果的な  $\sigma^*-\pi^*$  共役による最低空軌道(LUMO)の安定化により、共役系を広げることなく色素骨格の吸収および蛍光波長の長波長化をもたらす。さらにこれを酸化したホスフィンオキシド ( $\text{P}=\text{O}$ ) は、強い電子求引性に由来して蛍光色素に特異な光物性を与え、耐光性の付与にも有効であることが示されている。このような  $\text{P}=\text{O}$  を含む色素骨格は蛍光イオンプローブへと応用する上で魅力的な性質を有しているものの、生命現象の可視化への応用には至っていなかった。本論文は、 $\text{P}=\text{O}$  を導入した色素骨格を用いて、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{H}^+$ の3つのイオ

ンの動的挙動を追跡できる蛍光イオンプローブの開発についてまとめたものであり、序論、本論三章、結言により構成されている。

第一章では、ごく最近開発された新奇な  $\pi$  骨格である電子受容性のベンゾ[*b*]ホスホール-*P*-オキシドを利用したプローブ創製について述べている。この P=O を含む色素骨格に電子供与性のジアザクラウンエーテル誘導体を導入することで、可視光による励起が可能なレシオ型  $\text{Na}^+$  プローブ NaGY の開発を達成した。一般的な共焦点レーザー顕微鏡に搭載されている 405 nm の励起光を用いた蛍光スペクトルの測定により滴定実験をおこなったところ、 $\text{Na}^+$  添加に伴い、吸収極大は赤色の 656 nm からオレンジ色の 620 nm へと短波長シフトすることが明らかとなった。この短波長シフトは、ジアザクラウンエーテル誘導体が  $\text{Na}^+$  と錯形成し、窒素原子の電子供与性が低下したことに起因する。 $\text{Na}^+$  に対する選択性も高く、細胞内  $\text{Na}^+$  の変化域に適した解離定数 ( $K_d = 14.0 \text{ mM}$ ) を有していたことから、生細胞を用いたイメージング実験をおこなった。NaGY で染色した HeLa 細胞を用い、培地から  $\text{K}^+$  を枯渇させた際の  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ポンプの停止に伴う細胞内  $\text{Na}^+$  濃度の上昇をレシオ法で観測することに成功した。

第二章では、キサントン色素の環内酸素原子を P=O へと置き換えたホスファキサントン色素 (POXs) を用いた  $\text{Ca}^{2+}$  イオンプローブの開発に取り組んだ。POXs は、キサントン骨格への P=O の導入により、深赤色から近赤外蛍光を示し、一般的なキサントン色素に比較して高い耐光性を有することが明らかとなっている。そこで、POXs の中でもホスファフルオレセイン (POF) 骨格の高い水溶性、赤色から深赤色領域での吸収・発光特性に着目し、細胞質の遊離  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化を追跡できる深赤色蛍光プローブ CaPF-1 を開発した。CaPF-1 は、POF 骨格に対し、 $\text{Ca}^{2+}$  選択的配位子である BAPTA 誘導体を導入した構造をもつ。CaPF-1 は、生理的条件下において 636 nm に極大吸収波長を有し、 $\text{Ca}^{2+}$  配

位子をドナーとする光誘起電子移動 (PET) 機構によって蛍光は消光されている。この溶液に  $\text{Ca}^{2+}$  を添加するに従い、663 nm の深赤色蛍光強度が増大する様子が認められた。CaPF-1 は POF 骨格の高い水溶性により細胞質全体に分散するため、細胞質の遊離  $\text{Ca}^{2+}$  を追跡するために適したツールである。そこで、HeLa 細胞に対してヒスタミン刺激をすることで誘導される  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の振動を追跡したところ、起こると予想される  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度振動を、CaPF-1 由来の蛍光強度の振動として 10 分以上 (蛍光画像 1 枚/秒) 連続的に観察することができた。以上より、細胞内への導入が容易であり、かつ深赤色蛍光を示す CaPF-1 が、細胞質の遊離  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化を追跡する有用なツールとなりうることを示した。

第三章では、POXs に複数の機能を同時に付与する手法の確立に取り組んだ。5 価リン原子を組み込んだキサンテン色素の構造的特徴として、 $\pi$  骨格と共役しない *P*-フェニル基に着目し、この部位を足がかりとした化学修飾に取り組み、アルキニル基を導入する手法を確立した。このアルキニル基の銅触媒を用いたアルキン-アジド環化付加 (CuAAC) 反応により、さらなる官能基の導入が可能である。この化学修飾の有用性を示すために、pH 応答性とオルガネラ局在性を付与した新たな POX 色素の開発に取り組んだ。まず、POXs 色素の 9 位にジエチルアミノフェニル基を導入することで、酸性領域において蛍光を発する仕組みを POXs に付与した。ホスファローダミン (POR) を基本骨格とすることにより、アミノ基のプロトン化により酸性領域 ( $\text{pK}_a = 4.9$ ) で蛍光を発する pH プローブを、また、色素骨格そのものが pH に応答する POF を用いることで、弱酸性領域 (pH 4.8–6.2) のみで特異的に発光する pH プローブを開発できた。これらの pH プローブに葉酸部位を CuAAC 反応により導入することで、細胞膜表面の葉酸受容体に結合できるプローブへと変換した。これらのプローブを用いて細胞の染色をおこなったところ、葉酸受容体を介したエンドサイトーシス機構で細胞に取り込

まれ、エンドソーム内に局在化することがわかった。そして、初期エンドソームから後期エンドソームへの成熟に伴いエンドソーム内部の pH が低下する様子を、異なる蛍光検出領域と異なる pH 検出域をもつ POR と POF を同時に使用することで、染め分けることに成功した。複数の機能を付与したプローブの開発は数例報告されているが、官能基許容性や光物性への影響などの制限も多い。これに対し、リン置換基にアルキニル基を導入する本手法は、簡便かつ温和な条件で POXs に対して複数の機能を付与できる手法であり、POXs の幅広い蛍光プローブへの応用の基本手法になるものと期待できる。

