

氏名(本籍)	せん だ なお こ (千葉県)		
学位の種類	博士(理学)		
学位記番号	博甲第5271号		
学位授与年月日	平成22年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	数理物質科学研究科		
学位論文題目	Development of New Caged Compounds and Fluorescent Dyes Useful for Cell Biology (細胞機能解明に役立つ光機能性分子の開発)		
主査	筑波大学教授	理学博士	新井達郎
副査	筑波大学教授	理学博士	齋藤一弥
副査	筑波大学教授	博士(工学)	寺西利治
副査	筑波大学教授	理学博士	守橋健二

論文の内容の要旨

生命科学分野において、細胞内環境が今まで考えられていたような画一的なものではなく、非常に広大な空間の中に環境の異なる微小な部位が存在していることが明らかにされてきており、その微小環境で起こる様々な分子レベルでの現象やその伝播の解明が、生命科学・医薬研究の進展に重要であると考えられる。そのためには、DNA解析に代表される従来の手法に替わる新しい手法が必要となる。そこで、従来のように生き物を断片化してその働きを調べるのではなく、生きた状態の細胞を可視化して細胞内での化合物の挙動を直接観測するという研究手法が注目されている。これにより今まで解明されなかった細胞内の様々な機構が明らかにされようとしているが、今後は蛍光顕微鏡などのハードに対するソフトとして、生きた細胞の生理機能を直接観測できる様々な機能性低分子の開発が求められる。

細胞内の情報伝達ネットワークの解明という問題に対し、(1) 細胞内で生理活性物質を人為的に局所的、高濃度に発生させる技術と、(2) 細胞内ダイナミクスを捉える技術の二方向からのアプローチが可能である。このような観点から、本研究では、有機物理化学的アプローチにより、(1) に相当するケージド化合物、(2) に相当する蛍光色素について研究した成果を報告している。

第1章では、高機能・高汎用性のケージド化合物の光分解性保護基となりうる水溶性クマリンの開発を行うため、化合物の合成、光反応性、蛍光挙動などを検討し、導入する置換基を工夫することにより可視光による励起が可能で、また水溶性が向上した保護基 BCMACM を設計・合成した。第2章では、この保護基を用いたケージドグルタミン酸及びケージド GABA を合成し、それぞれ 450 nm 付近まで吸収帯が存在するため、細胞にダメージの少ない可視光による励起が可能であることを明らかにした。また、HEPES 緩衝溶液 (pH 7.2) に十分な溶解性を示し、暗所、溶液中での安定性を示したため、細胞実験での実用性は十分であると考えられた。実際、ケージドグルタミン酸およびケージド GABA 溶液に対し光照射を行ったところ、光分解反応が進行し、グルタミン酸および GABA の放出が確認された。また、ケージドグルタミン酸およびケージド GABA の分解効率はそれぞれ $\Phi_f = 0.10, 0.20$ という実用的な値を示した。以上の結果より、汎用性や実用性を兼ね備えた新しいケージド化合物を合成し、その光機能性を明らかにした。

第3章では、400 nm 付近の吸収帯を励起すると 520 nm に極大をもつ蛍光を発する特徴を有する 7-hydroxyquinoline 骨格を用いたイメージングに適応する蛍光色素 TG を合成し、その誘導体を用いて *in vivo* 系への応用に成功した。すなわち、蛍光顕微鏡による観測により、細胞に投与した TG 誘導体は細胞内に留まり、細胞内のみが蛍光を発する様子が確認された。また、フローサイトメトリー (FCM) を用いた測定により、75% の細胞がこの色素により染色されていることがわかった。そして、FCM を用いた細胞毒性テストにより、添加する TG 誘導体の濃度が 10 μ M のとき、12 時間は毒性がないことが証明された。このように、合成した蛍光色素 TG が、1) 細胞膜透過性が制御可能であること、2) 観察に適した波長選択が可能であること、3) 細胞外で無蛍光性、細胞内で蛍光性であること、4) 低い細胞毒性であること、など蛍光プローブに求められる条件を満たし、優れた骨格であることが示された。第4章および5章では、第3章で開発した色素の各種誘導体の水溶液中における基礎的な光化学的挙動について明らかにした。

審 査 の 結 果 の 要 旨

高機能・高汎用性のケージド化合物の光分解性保護基となりうる水溶性クマリンの開発を目的とし、クマリン環を基本骨格にして、導入する置換基を工夫することにより可視光による励起が可能で、また水溶性が向上した保護基 BCMACM を設計・合成することに成功した。さらに、この保護基を用いて神経伝達物質であるグルタミン酸や GABA を光照射により放出するケージドグルタミン酸およびケージド GABA を合成し、保護基の性能を検証した。また、新規蛍光色素を合成し、その光化学を明らかにすると共に、実際の細胞に応用し、細胞膜透過性が制御可能であること、バイオイメージングに適した吸収及び蛍光波長特性が制御可能であること、細胞外で無蛍光性、細胞内で蛍光性であること、細胞毒性が低いことなど蛍光プローブに求められる条件を満たすことを明らかにした。これらの細胞機能解明に役立つ光機能性分子の開発に関する新しい研究成果は、今後のこの分野の研究の発展に寄与するものとして評価された。

よって、著者は博士 (理学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。