



Title	Studies on Single-Molecule Analysis and Visualization of Biological Phenomena Using Fluorescence Probes
Author(s)	金, 水縁
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52126
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (金 水 縁)

論文題名

Studies on Single-Molecule Analysis and Visualization of Biological Phenomena Using Fluorescence Probes
(蛍光プローブを用いた生命現象の単一分子分析及び可視化に関する研究)

論文内容の要旨

本論文では、市販品及び新規合成した蛍光プローブを利用し、様々な分光学的な手法を通じて生命現象の分析と視覚化に関する研究を行った。生命現象の代表するモデルとして、DNAの一般的な右巻き二重らせん構造以外の形を意味する non-B DNAの構造と光線力学的療法(Photodynamic therapy; PDT)中に発生する活性酸素種である一重項酸素($^1\text{O}_2$)を選び、その蛍光測定を通じて今まで知られていなかった性質を明らかにすることを研究目的とした。

第1-2章では、蛍光共鳴エネルギー移動が起こる色素ペアに修飾されたDNAオリゴマーの多様な構造とその分布を単一分子分光学を用いて調べた。酸性条件下で、シトシン(cytosine; C) DNAオリゴマーとアデニン(adenine; A) DNAオリゴマーは一般的な右巻き二重らせんではなく、それぞれC $\cdot$ C $^+$ 塩基対とA $^+$ A $^+$ 塩基対によるDNAの2次構造を形成することが知られ、前者をi-motif、後者をA-motifと呼ぶ。その結果、Cオリゴマーの場合、転移pH(pH 5.8)及び中性環境でi-motifとランダムコイルの一本鎖構造以外に、部分的に折り畳んでいる一本鎖構造が存在することがわかった。また、Aオリゴマーの場合、酸性条件下の極低濃度(数nM)では鎖間のA $^+$ A $^+$ 塩基対になっている構造が解離され、鎖内のA $^+$ A $^+$ 塩基対によって形成されるヘアピンと似たようなshrunk構造(S-form)を持つことがわかった。

第3-5章では、PDT中で発生する細胞内の $^1\text{O}_2$ 生成を視覚化することを目指し、新規蛍光プローブの合成と蛍光顕微鏡観察を行った。PDTとは、光照射によって活性酸素を発生する光増感剤を体内に導入し、がん細胞のような有害組織を除去する治療方法である。一般的に使われる光増感剤の場合、光照射によって $^1\text{O}_2$ を発生させるが、その細胞内の発生や拡散を効果的に視覚化させる蛍光プローブが未だに報告されていなかった。まず、市販品の $^1\text{O}_2$ 蛍光プローブであるSinglet Oxygen Sensor Green(SOSG)の光化学的特性を検討し、光照射によるSOSGの自己酸化はフルオレセインの三重項励起状態の失活とともに生成される $^1\text{O}_2$ が原因であることを明らかにした。さらに、フルオレセインは緑色の短波長励起光が必要であり、細胞の自己蛍光を起こすため、細胞内の $^1\text{O}_2$ 生成を検知する蛍光プローブとして適していないことがわかった。そこで、遠赤色の蛍光を発光するケイ素を含んだローダミンとアントラセン誘導体のダイアドを二つ新規合成した。その内、ケイ素を含んだローダミンとジメチルアントラセン誘導体のダイアドであるSi-DMAを用いて細胞内の $^1\text{O}_2$ 生成を遠赤色の蛍光信号で視覚化することに成功した。その結果から、以前の報告の通り、細胞内の $^1\text{O}_2$ は数百nm程度にしか拡散しない、また、酸素ラジカル種を発生させるとで知られている光増感剤タンパク質、キラーレッドは $^1\text{O}_2$ をほとんど発生しないことを確認した。

以上のように本論文では、蛍光プローブと様々な分光学的な手法を用いて、インビトロの生体分子構造を単一分子レベルで分析することと、細胞内の $^1\text{O}_2$ の発生を明確に視覚化することに成功した。本論文で明らかにした生体分子の構造不均一性と活性酸素発生と光増感剤の場所依存性は、それぞれ単一分子分光学と新規蛍光プローブの開発が不可欠であった。したがって、生命現象をより正確で深い理解を得るためには、単一分子分光学の技術面と測定方法の発展に見合う蛍光プローブ開発の同時進歩が重要であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (金 水 縁)			
論文審査担当者		(職)	氏 名
	主 査	教 授	真嶋 哲朗
	副 査	教 授	井上 佳久
	副 査	教 授	関 修平
	副 査	教 授	三浦 雅博
	副 査	教 授	茶谷 直人
	副 査	教 授	明石 満
	副 査	教 授	安田 誠
	副 査	教 授	神戸 宣明
	副 査	教 授	生越 専介
	副 査	教 授	安蘇 芳雄
	副 査	教 授	芝田 育也

論文審査の結果の要旨

本論文では、市販品及び化学合成した蛍光プローブを利用し、様々な分光学的な手法を通じて生命現象の分析と視覚化に関する研究を行い、今まで観察できなかったnon-B DNAの非均一的構造の分布や光線力学的療法中に発生する細胞内一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) の視覚化などについて述べたものであり、得られた主な結果は次の通りである。

(1) 蛍光共鳴エネルギー移動が起こる色素ペアに修飾されたDNAオリゴマーの多様な構造とその分布を単一分子分光学を用いて調べた。その結果、シトシンオリゴマーの場合、転移pH(pH 5.8)及び中性環境でi-motifとランダムコイルの一本鎖構造以外に、部分的に折り畳んでいる一本鎖構造が存在することを明らかにした。また、アデニンオリゴマーの場合、酸性条件下の極低濃度(数 nM)では鎖間の $\text{A}^+ \cdot \text{A}^+$ 塩基対になっている構造が解離され、鎖内の $\text{A}^+ \cdot \text{A}^+$ 塩基対によって形成されるヘアピンと似たようなshrunk構造 (S-form) を持つことを明らかにした。

(2) 光線力学的療法中で発生する細胞内の $^1\text{O}_2$ 生成を視覚化することを目指し、新規蛍光プローブの合成と蛍光顕微鏡観察を行った。光線力学的療法とは、光照射によって活性酸素を発生する光増感剤を体内に導入し、がん細胞のような有害組織を除去する治療方法である。一般的に使われる光増感剤の場合、光照射によって $^1\text{O}_2$ を発生させるが、その細胞内の発生や拡散を効果的に視覚化させる蛍光プローブが未だに報告されていなかった。まず、市販品の $^1\text{O}_2$ 蛍光プローブであるSinglet Oxygen Sensor Green(SOSG)の光化学的特性を検討し、光照射によるSOSGの自己酸化はフルオレセインの三重項励起状態の失活とともに生成される $^1\text{O}_2$ が原因であることを明らかにした。さらに、フルオレセインは緑色の短波長励起光が必要であり、細胞の自己蛍光を起こすため、細胞内の $^1\text{O}_2$ 生成を検知する蛍光プローブとして適していないことを明らかにした。そこで、ケイ素を含んだローダミンとジメチルアントラセン誘導体のダイアドであるSi-DMAを用いて細胞内の $^1\text{O}_2$ 生成を遠赤色の蛍光信号で視覚化することに成功した。その結果から、以前の報告の通り、細胞内の $^1\text{O}_2$ は数百nm程度にしか拡散しない、また、酸素ラジカル種を発生させることで知られている光増感剤タンパク質、キラーレッドは $^1\text{O}_2$ をほとんど発生しないことを明らかにした。

以上のように、生体分子の構造不均一性と、活性酸素発生と光増感剤との場所依存性の解明には、それぞれ単一分子分光学と、新規蛍光プローブの開発が不可欠であることを本論文で明らかにした。したがって、生命現象をより正確に理解するためには、単一分子分光学の技術面と測定方法の発展と、それに見合う蛍光プローブ開発の同時進歩が必要であることを明示した。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。