OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Development of Photochemical Tools for Improvement of Fluorophore Photostability and Control of CREB-Mediated Gene Expression
Author(s)	井元, 琢真
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/81901
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　井元　琢真　）	
論文題名	Development of Photochemical Tools for Improvement of Fluorophore Photostability and Control of CREB-Mediated Gene Expression （蛍光色素の光安定性向上、及びCREBを介した遺伝子発現操作のための光化学ツールの開発）

論文内容の要旨

光は生命科学の分野において非常に重要なツールとなっている。生命科学分野における光の応用として、蛍光イメージングや光操作技術などの手法がある。光は照射する位置、時間を任意に制御することができるため特定の生命活動を観察するため、あるいは制御するために広く用いられている。

蛍光イメージングは、生体試料からの蛍光を観察する手法であり、生体内の特定の分子の動態を観察できる。近年は1分子蛍光イメージングや光の回折限界を越えた超解像イメージングが可能となってきた。しかし、これらのイメージング法では高輝度レーザーの使用により、観察中の蛍光色素が光退色してしまうため、高輝度のレーザーに耐えうる光安定性の高い蛍光色素の開発が求められている。そこで、私は発光性希土類イオンの発光メカニズムに着目して希土類イオンを光安定性向上試薬として用い、光安定性の高い蛍光色素の開発に取り組んだ。

一方で、光操作技術は光を照射した部位における生体分子の機能を制御する手法であり、光感受性のケージド化合物やタンパク質が用いられている。ケージド化合物とは光で脱保護することができる光感受性保護基で生理活性分子を保護し、その活性を一時的に失活させた化合物である。しかし、内在性の遺伝子発現を簡便な操作で制御する手法は開発されていなかった。また、一般的にケージド化合物では光により不活性化された状態の分子が活性化されるが、その逆の応答である、「生理活性を有する分子を光により不活性化する」化合物はこれまでほとんど報告されていない。そこで私は、脳内の長期記憶形成など生体内の様々な生理機能に関わっている内在性遺伝子の転写を調節するタンパク質（転写因子）、cAMP-response element binding protein (CREB)の機能を阻害する化合物に着目した。この化合物に光感受性保護基を導入することで、光照射によりCREBを介した遺伝子発現を抑制することを試みた。また、阻害に関わる部分構造を光感受性保護基に置き換えることで、光不活性化により阻害されたCREB機能を回復できる化合物の開発に取り組んだ。

本博士論文は、以下の3章から構成されている。

第1章では、蛍光色素の光安定性を向上させる希土類イオンの効果とそのメカニズムの解明について述べる。光安定性を向上させるための戦略として、光退色の起点となる励起三重項状態にある蛍光色素を素早く緩和させ基底状態に戻すことが重要となる。希土類イオンが励起三重項状態にある蛍光色素からエネルギーを受け取り、蛍光色素の光安定性が向上するか検討した。希土類イオンの添加により蛍光色素のfluoresceinの光安定性が向上することが分かった。この光安性向上効果のメカニズムを、過渡吸収スペクトル測定、希土類イオンの発光スペクトル測定により検証した。これらの結果よりある種の希土類イオンはfluoresceinの光安定性向上効果を示し、その効果が励起三重項状態にあるfluoresceinから希土類イオンへのエネルギー移動によるものであると示唆された。

第2章では、内在性の転写因子であるCREBを介した遺伝子発現の光制御に可能なケージド化合物の開発を行った。CREBは対となるタンパク質、CBPと結合することでいくつかの遺伝子の転写が活性化されることが知られている。この機能を時空間的に制御するために、CBPとCREBの相互作用を阻害する有機小分子化合物(CBP阻害剤)の構造を基にしたケージド化合物を設計、合成した。阻害剤の適切な部位を光感受性保護基で保護することにより、光照射により阻害剤が活性化されCREBを介した遺伝子発現を光で抑制することが可能となった。

第3章では、CREBの機能の光活性化を目的とした、光不活性化能を有する阻害剤の開発について述べる。阻害剤の光不活性化により、阻害されていたCREBタンパク質機能が回復し遺伝子発現の光活性化が起こるものと考えられる。本章ではCBP阻害剤の構造上の特徴に着目し、部分構造に光感受性の*o* -nitrobenzyl基を組み込むことで、目的とする光不活性化能を有する化合物の開発を行った。合成した化合物はCREBの機能を阻害し、かつ光照射により分解し、不活性化されることが明らかとなった。この光不活性化能を有する阻害剤を用い、光照射によりCREBを介した遺伝子発現を活性化させることが可能になった。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　井元　琢真　）		
	（職）	氏　名
論文審査担当者	主査　教授　菊地　和也	
	副査　教授　中山　健一	
	副査　教授　伊東　忍	
	副査　教授　大政　健史	
	副査　教授　高井　義造	
	副査　教授　坂本　一之	
	副査　教授　渡部　平司	

論文審査の結果の要旨

本博士論文は、生命科学研究に応用可能な光を利用した化学ツールについて述べている。光はその照射する時間、空間の制御によって特定の生命現象を観察、あるいは制御するために広く用いられている。生命現象の観察には生体試料からの蛍光を観察する蛍光イメージング法が普及しており、近年は 1 分子蛍光イメージングや光の回折限界を越えた超解像イメージングが可能となっている。しかし、これらのイメージング法では高輝度レーザーの使用により、観察中の蛍光色素が光退色してしまうため、高輝度のレーザーに耐えうる光安定性の高い蛍光色素の開発が求められている。一方で、光操作技術は光を照射した部位における生体分子の機能を制御する手法であり、光感受性のケージド化合物やタンパク質が用いられている。ケージド化合物とは光で脱保護することができる光感受性保護基で生理活性分子を保護し、その活性を一時的に失活させた化合物である。しかし、内在性の遺伝子発現を簡便な操作で制御する手法はこれまでに開発されていない。また、一般的にケージド化合物では光により不活性化された状態の分子が活性化されるが、その逆の応答である、「生理活性を有する分子を光により不活性化する」化合物はこれまでほとんど報告されていない。そこで、本論文ではこれらの課題を解決するため、光反応性を制御するためのデザインを組み込んだ化学ツールの開発に取り組んでいる。本論文は、第 1 章、第 2 章、第 3 章、結論および展望から構成されており、以下に本論文の成果を要約する。

第 1 章では、蛍光色素の光安定性を向上させる希土類イオンの効果とそのメカニズムについて述べている。励起三重項状態にある蛍光色素は光褪色の起因となることが知られている。そこで、希土類イオンが励起三重項状態にある蛍光色素からエネルギーを受け取る性質に着目し、素早く基底状態に戻すことで蛍光色素の光安定性が向上するかどうかを検討している。蛍光色素である fluorescein に希土類イオンを添加していくと、一部の希土類イオン存在下で光安定性が向上することを見出している。この光安性向上効果のメカニズムを、過渡吸収スペクトル測定、希土類イオンの発光スペクトル測定により検証している。これらの結果より、ある種の希土類イオンは fluorescein の光安定性を向上し、その効果が励起三重項状態にある fluorescein から希土類イオンへのエネルギー移動によるものであることが示されている。

第 2 章では、脳内の長期記憶形成など生体内の様々な生理機能に関わっている内在性遺伝子の転写を調節するタンパク質（転写因子）、cAMP-response element binding protein (CREB)を標的としたケージド化合物の開発と、遺伝子発現の光制御について述べている。CREB は対となるタンパク質、CBP と結合することでいくつかの遺伝子の転写が活性化することが知られている。この機能を時空間的に制御するために、CBP と CREB の相互作用を阻害する有機小分子化合物(CBP 阻害剤)の構造を基にしたケージド化合物を設計、合成している。阻害剤の適切な部位を光感受性保護基で保護することにより、光照射によりケージド化合物から阻害剤が放出され、CREB を介した遺伝子発現を光で

抑制することが示されている。

第 3 章では、第 2 章とは逆に CREB の機能の光活性化を目的とした阻害剤の開発について述べている。CBP 阻害剤の特徴的な構造に着目し、光感受性の *o*-nitrobenzyl 基を部分構造に組み込むことで、目的とする光不活性化能を有する化合物の開発を行っている。合成した化合物は CREB 阻害剤としての機能を有するものの、光照射によって分解し不活性化される。この光不活性化能を有する阻害剤を用い、光照射により CREB を介した遺伝子発現を活性化させることが示されている。

以上のように、本論文は光反応性を巧みに制御することで、蛍光色素の高輝度レーザーによる光褪色を克服する、および内在性転写因子である CREB を介した遺伝子発現の光制御を可能とする化学ツールの開発に成功している。これらの成果により、生体分子の動態、微細構造を調べる 1 分子、超解像イメージングへ応用可能な蛍光プローブを拡充し、神経活動に関わる遺伝子の時空間的な操作を可能都市、関連する生命科学研究を大きく発展させると期待される。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。