



Title	Light Responsive Molecular Probes for In Vivo Visualization and Activation of Cellular Functions
Author(s)	橋本, 龍
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/96034
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 (橋 本 龍)

論文題名

Light Responsive Molecular Probes for In Vivo
Visualization and Activation of Cellular Functions
(in vivoで細胞機能可視化および活性化できる光応答性分子プローブの開発)

論文内容の要旨

光は、非侵襲的かつ遠隔性を持ち、エネルギー量を容易に調整できることから、高い空間的・時間的分解能により生体システムを観察・制御する能力に優れている。光は、これまで光活性のあるレポーターやトリガーを組み込んだ合成化合物によって、生体機能を調査する非侵襲的なツールを提供してきた。そのような機能を持ったツールの一つである蛍光プローブは、吸収した光を蛍光に変換することで微小環境を直接可視化し、目的の生体分子の局在や量に関する動的情報を明らかにすることができる。特に有機小分子ベースの蛍光プローブは有機化学合成によるフレキシブルな分子デザイン戦略によって構築され、細胞活性に関連する様々な生理的因子（イオン、活性酸素種、酵素など）を検出できる機能を付与することができる。光によって生命機能の可視化が可能である一方、生命機能を制御することも可能である。この生命機能を制御する技術の一つが、光で生理活性の制御を行うケージド化合物である。ケージド化合物は生理活性物質を光分解性保護基で保護し一時的に不活性化させた化合物であり、光を照射することで光分解性保護基が外れ、瞬時に元の生理活性物質を出現させることができる。これまで、セカンドメッセンジャーや神経伝達物質、受容体のアゴニストやアンタゴニストのケージド化合物が報告されている。これらを利用することで神経伝達、細胞内シグナル伝達、あるいは、遺伝子の機能発現を始めとして、多様な生理機能を高い時間及び空間分解能で制御可能になる。本研究では、光の高い時空間的な分解能と非侵襲性を利用し、それに応答する有機小分子をデザインすることで生命機能の可視化及び制御を可能にするシステムの開発を目指した。

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、骨組織内部に存在する骨細胞の活性を生体内で検出可能な小分子プローブの開発を行った。骨組織深部に送達が可能なりガンドであるリセドロネート酸をpH応答性の蛍光色素に結合させることによって、骨組織深部に存在する骨細胞の作り出すpH環境を可視化できる蛍光プローブの合成を行った。開発したプローブにより、骨細胞が持つ骨細胞性骨溶解という現象を生きたマウスの生体内で可視化することに成功し、骨のリモデリングのメカニズムに関する新たな知見を得た。

第2章では、生体組織へのダメージの少ない長波長の光による活性化が可能なケージド化合物の開発を行った。緑色領域に吸収帯を有するThiazole Orangeをベースとした緑色光応答型光分解性保護基であるHydroxylated Thiazole Orange (HTO)を合成し、評価を行った。神経伝達物質をHTOで保護したSu1-HTO-Gluは従来の可視光応答型光分解性保護基よりも優れた光分解効率を示し、グルタミン酸受容体であるNMDA受容体の機能を可視光で制御できることを、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた電気生理、人由来の細胞を用いたカルシウムイメージングにより明らかにした。またマウス脳スライスの神経細胞機能の制御を980 nmの2光子励起光により成功した。

第3章では、第2章で開発した可視光応答型光分解性保護基(HTO)の分子デザインのチューニングを行い、光分解効率を向上させることでCreER^{T2}/loxPシステムによる遺伝子組み換えの光制御を達成した。HTOのベンゾチアゾール基に電子供与基または求引基を導入したHTO誘導体を合成し、光分解効率の比較を行った。また量子化学計算により光励起による電子密度変化の計算を各HTO誘導体に対して行った。光分解効率の算出と量子化学計算の結果からベンゾチアゾール基からの電子供与が光励起による分子内電荷移動を促進し、光分解効率を向上させることが示唆された。そして最も光分解効率の高いHTO分子で遺伝子組み換え制御を行う小分子(Ind)を保護したケージド化合物(DiMeO-HTO-Ind)を合成した。DiMeO-HTO-Indを用いることで生細胞での可視光による遺伝子組み換えが効率よく制御できることが生細胞イメージングまたはフローサイトメトリーにより示された。

結論では、以上の結果について総括し、今後の展望について記した。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (橋 本 龍)		
論文審査担当者	(職)	氏 名
	主 査	教授 菊地 和也
	副 査	教授 平野 康次
	副 査	教授 木田 敏之
	副 査	教授 松崎 典弥
	副 査	教授 安田 誠
	副 査	教授 正岡 重行
	副 査	教授 生越 専介
	副 査	教授 鳶巢 守
	副 査	教授 伊東 忍
	副 査	教授 藤塚 守
	副 査	教授 家 裕隆
	副 査	教授 芝田 育也

論文審査の結果の要旨

本博士論文は、有機小分子ベースの光応答性分子プローブの開発研究を主軸とし、骨組織深部に存在する骨細胞の機能を可視化する pH 応答性蛍光プローブの開発と可視光から近赤外光の照射で生理活性の制御を行うケージド化合物の開発について述べている。生体試料に対して低侵襲な手法で、その機能を生きたまま調査できる化学ツールは非常に限られており、有用性の高い光応答性分子プローブの開発が求められている。本研究では、光の高い時空間的な分解能と非侵襲性を利用し、それに応答する有機小分子をデザインすることで生命機能の可視化及び制御を可能にするシステムの開発に取り組んでいる。本論文は序論、第 1 章、第 2 章、第 3 章、結論及び展望で構成されたものであり、以下に本論文の成果を要約する。

第 1 章では、骨組織内部に存在する骨細胞の活性を生体内で検出可能な小分子プローブの開発について述べている。骨組織深部に送達が可能なりガンドであるリセドロネート酸を pH 応答性の蛍光色素に結合させることによって、骨組織深部に存在する骨細胞の作り出す pH 環境を可視化できる蛍光プローブの合成を行っている。開発したプローブにより、骨細胞が持つ骨細胞性骨溶解という現象を生きたマウスの生体内で可視化を達成し、骨のリモデリングのメカニズムに関する新たな知見を得ることに成功している。

第 2 章では、生体組織へのダメージの少ない長波長の光による活性化が可能なケージド化合物の開発について述べている。緑色領域に吸収帯を有する Thiazole Orange をベースとした緑色光応答型光分解性保護基である Hydroxylated Thiazole Orange (HTO) を合成し、評価を実施している。神経伝達物質を HTO で保護した Sul-HTO-Glu は従来の可視光応答型光分解性保護基よりも優れた光分解効率を示し、グルタミン酸受容体である NMDA 受容体の機能を可視光で制御できることを、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた電気生理、人由来の細胞を用いたカルシウムイメージングにより明らかにしている。またマウス脳スライスの神経細胞機能の制御を 980 nm の 2 光子励起光により成功している。

第 3 章では、第 2 章で開発した可視光応答型光分解性保護基(HTO)の分子デザインのチューニングを行い、光分解効率を向上させることで CreERT²/loxP システムによる遺伝子組み換えの光制御について述べている。本章では HTO のベンゾチアゾール基に電子供与基または求引基を導入した HTO 誘導体を合成し、光分解効率の比較を実施している。また量子化学計算により光励起による電子密度変化の計算を各 HTO 誘導体に対して行った。本論文により、光分解効率の算出と量子化学計算の結果からベンゾチアゾール基からの電子供与が光励起による分子内電荷移動を促進し、光分解効率を向上させることが示唆されている。そして最も光分解効率の高い HTO 分子で遺伝子組み換え制

御を行う小分子(Ind)を保護したケージド化合物(DiMeO-HTO-Ind)を合成し、DiMeO-HTO-Ind を用いることで生細胞での可視光による遺伝子組み換えが効率よく制御できることが生細胞イメージングまたはフローサイトメトリーにより示されている。

以上のように、本論文では、有機小分子ベースの新規光応答性分子プローブの開発に成功している。第 1 章でのプローブは骨疾患のメカニズム解明のためのツールとして使用されることが期待される。また 2,3 章で開発した長波長光応答型のケージド化合物を使用することで生体深部の生命機能を調査することが可能となり、in vivo イメージングと組み合わせることで生命科学研究を飛躍的に発展できると期待される。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。