

博士論文要旨

生体内鉄動態の解明を目的とした

二価鉄イオン蛍光プローブの開発に関する研究

丹羽 正人

鉄は、生体内で最も多く存在する遷移金属元素で、主に酸素運搬や電子伝達等を担うタンパク質の補因子である他に、タンパク質非結合鉄（自由鉄）も恒常的に存在している。自由鉄は、細胞内の還元的環境で主に二価で存在し、特にその生物学的意義が注目される。二価鉄イオンは、フェントン反応を介して高反応性の活性酸素種を生成し細胞傷害を引き起こすため、鉄ホメオスタシスの崩壊は神経変性疾患や発がんを招く。このような自由鉄の病理学的重要性にもかかわらず、これまで二価鉄イオンを検出する有力な手段がなかったため、その詳細な挙動は未解明であった。一方、当研究室では、先に *N*-オキシドの二価鉄選択的脱酸素化反応を基盤とした二価鉄イオン検出プローブ RhoNox-1 を開発した (*Chem. Sci.*, 2013, 4, 1250)。本研究では、細胞内鉄動態を解明すべく、この *N*-オキシドの化学を基盤として、光学特性及び機能性を向上させた新しい二価鉄イオン蛍光プローブの開発を行った。

1. 分子内スピロ環化平衡の制御を基盤とした二価鉄蛍光プローブの開発

RhoNox-1 は、二価鉄イオンへの応答性および off-on コントラストが不十分であったため、それらを改善すべく分子設計を行った。まず、RhoNox-1 には弱い背蛍光があったが、非蛍光性のスピロ環構造の安定化を図ることで減弱させた。すなわち蛍光団

をローダミンからヒドロキシメチルローダミン誘導体へと変換し、さらに、*N*-オキシド周囲の立体障害を低減させることで、二価鉄イオンへの反応速度の向上を図った。以上にに基づき種々のプローブ分子を合成し、それぞれについて評価したところ、*N,N*-ジメチルアリールアミン *N*-オキシド構造を有する HMRhoNox-M において、最も高い off-on コントラストと反応速度が得られた。生細胞蛍光イメージングを実施したところ、HMRhoNox-M はリソソーム局在性を示し、外部から加えた二価鉄イオンのみならず、細胞内在性の微量の二価鉄イオンも検出できることがわかった。さらに、HMRhoNox-M を用いて、トランスフェリン刺激により蓄積した二価鉄イオンの検出にも成功した。

2. 細胞膜アンカリング型二価鉄蛍光プローブの開発

近年、トランスフェリン受容体やフェロポルチンを初め、鉄の細胞膜輸送に関わる様々な分子が同定され、鉄イオン動態制御の解明が急速に進んでいる。そこで、細胞膜を介した鉄の小胞輸送の可視化を目指し、細胞膜上で二価鉄イオンを検出する蛍光プローブの開発に着手した。*N*-オキシド化ローダミン骨格に、細胞膜にアンカリングして留まらせるための脂質構造及びカルボキシレート基を導入したプローブ Mem-RhoNox を設計し、8段階で合成した。まず、本プローブが、二価鉄イオン選択的に反応し、生細胞の細胞膜上で二価鉄イオンに応答して、蛍光を発することを明らかにした。続いて、トランスフェリンエンドサイトーシスによる鉄の小胞輸送を解析するべく、本プローブで処理した細胞にトランスフェリンを添加し、タイムラプス蛍光イメージングを実施した。その結果、まずエンドソーム様の蛍光シグナルが観察され、次いで細胞膜上に粒状の蛍光シグナルが現れる様子が観察された。以上の結果、本プローブによって、エンドサイトーシスを介した鉄イオンの取り込みと、そのリサイクリング過程を可視化することに成功した。さらに、本プローブを用いて、マウス由来海馬神経細胞におけるトランスフェリンエンドサイトーシスの解析を行ったところ、神経細胞の細胞体と突起に沿って粒状の蛍光が観察された。以上より、これら新規プローブは、生体の鉄動態解明研究の有用なツールとなることが示唆された。

論文審査結果の要旨

氏名（本籍）	丹羽 正人 (岐阜県)
学位の種類	博士（薬科学）
学位記番号	甲 第 1 1 号
学位授与年月日	平成 3 0 年 3 月 1 0 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当者
学位論文の題名	生体内鉄動態の解明を目的とした二価鉄イオン蛍光プローブの開発に関する研究
論文審査委員	(主査) 伊藤 彰近
	(副査) 宇野 文二
	(副査) 澤間 善成

タンパク質非結合鉄（自由鉄）は一般に二価として存在しており、神経変性疾患やがん等に繋がる病理学的重要性が示されている。しかし、二価鉄イオンを検出する有力な手段が皆無であったため、その詳細な挙動に関しては多くの点が未解明である。このような背景において、申請者は、*N*-オキシドの二価鉄選択的脱酸素化反応に基づく蛍光プローブ RhoNox-1 を基に、二価鉄イオンへの応答性及び off - on コントラスト向上を目的とし、「分子内スピロ環化平衡の制御」及び「*N*-オキシド周囲の立体障害低減」の観点から複数の改良型プローブを設計した。その一つである HMRhoNox- M は、二価鉄イオンに対して高い反応速度及びリソソーム局在性を示し、細胞内在性の二価鉄イオンをより高感度で検出することに成功している。さらに、細胞膜アンカリング構造を導入した細胞膜局在型プローブ Mem-RhoNox を設計、合成し、トランスフェリン陽性エンドソーム中で過渡的に放出される遊離二価鉄イオンを、タイムラプスイメージングにより直接可視化することに世界で初めて成功している。以上、本研究で開発された二価鉄イオン蛍光プローブは細胞内鉄代謝機構の解明のみならず、鉄の関与する様々な重要疾患に対する創薬研究に寄与するものと期待でき、博士（薬科学）論文として価値あるものと認める。