

## 生体分子の簡易検出を目指した凝集誘起発光色素ラベル化プローブの開発と検出メカニズムの解明

著者	河村 浩司
学位名	博士(理工学)
学位授与機関	甲南大学
学位授与年度	平成27年(2015年度)
学位授与番号	34506甲第96号
URL	<a href="http://doi.org/10.14990/00001758">http://doi.org/10.14990/00001758</a>

氏名・本籍	河村 浩司 (兵庫県)
学位の種類	博士 (理工学)
報告番号	甲第 96 号
学位授与の日付	平成 28 年 3 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当者
論文題目	生体分子の簡易検出を目指した凝集誘起発光色素 ラベル化プローブの開発と検出メカニズムの解明
審査委員	(主査) 教授 村嶋 貴之 (副査) 教授 川上 純司 (副査) 教授 藤井 敏司

## 論文内容の要旨

バイオイメージングやバイオマーカーの検出による診断には蛍光色素が汎用されるが、そうした手法にはいくつかの問題点がある。その中でも、濃度消光の問題は一般の蛍光色素においては本質的なデメリットであり、このことが検出感度の壁となっている場合が多い。そこで、本研究では、濃度消光とは逆に凝集によって蛍光強度が劇的に増大する凝集誘起発光 (AIE) 色素を用いて疾患の診断を行う手法の開発を行い、その検出メカニズムを明らかにすることを目的とした。ターゲットとする疾患として、罹患者数が多く社会的影響が大きいガンとアルツハイマー病 (AD) を選び、それぞれのバイオマーカーと考えられるテロメア鎖およびアミロイド  $\beta$  ( $A\beta$ ) の検出を行った。

テロメア鎖に対するプローブとして、AIE 色素で修飾した相補鎖 DNA または PNA を用いたところ、どちらのプローブでも高い感度でテロメア鎖の定量が可能であることが示された。しかし、プローブが DNA の場合にはテロメア量に比例して蛍光強度が増加するのに対し PNA をプローブとした場合には、逆に濃度依存的に蛍光強度が弱くなった。これは、PNA の疎水性によりプローブ自身が凝集することで生じた強い蛍光が、二重鎖形成とともに分散して消光されたためであることを明らかにした。また、DNA プローブを用いた結果の考察から、AIE 色素の周辺に分子運動を阻害するダングリグエンドまたは二重鎖が存在することが、蛍光増大の要件であることが示唆された。

次に、AD のマーカーである  $A\beta$  の検出を行った。プローブとして、アミロイド繊維化促進ペプチド (AFPP) に AIE 色素を結合させた化合物 (AIE-AFPP) を用いた。AIE-AFPP は AFPP 自身と同様に  $A\beta$  の繊維化を促進するとともに、 $A\beta$  と共凝集することで濃度依存的に AIE の蛍光増大が観測され、短時間で容易に  $A\beta$  の定量が可能であることが示された。この手法による  $A\beta$  の検出限界は 4.2 nM であり、この値は ELISA には及ばないが、プローブ合成および assay の簡便性や、測定者に高いスキルを要求しない点において優れた手法である。

本研究の結果は、AIE 色素をシグナル発信部位としてもつプローブを用いることで、生体分子を高感度かつ簡便に定量可能であることを示している。また、本研究で明らかにされた蛍光増大のメカニズムは、ターゲットにあわせたプローブの分子

設計と、安価・簡便・高感度・ハイスループットな検出システムの構築のための指針を与えると考えられる。

## 審査結果の要旨

申請者は、ガンやアルツハイマー病などの社会的影響の大きい疾患の早期診断に有用な、凝集誘起発光 (AIE) 色素をシグナル発信部位としてもつプローブを用いた生体分子簡易検出法の開発に取り組んだ。これまで利用されてきた一般の蛍光色素は、退色や濃度消光といった本質的な問題を有しており、とくに高濃度域での利用は困難であったことから、生体分子検出においてダイナミックレンジが狭くなる、高感度化のために蛍光色素量を増やすことができない、という難点があったが、申請者が新たに開発した AIE 色素ラベル化プローブの利用により、低濃度域から高濃度域まで一つのプローブで生体分子の定量が可能となった。さらに AIE 色素ラベル化プローブを用いた検出において蛍光強度が増加する場合 (Signal ON 型検出) と減少する場合 (Signal OFF 型検出) があることを発見し、そのメカニズムを明らかにした。これらの結果は、これまでの蛍光色素プローブの課題を解決し、新たな疾患をターゲットとしてプローブを設計する際の指針を示している。

これらの手法は、いずれも簡便な有機合成的手法で得られる AIE 色素を用いており、また生体分子認識部位である DNA、PNA、ペプチド等は固相合成により合成できるため、プローブの合成が容易であり、さらに検出の際の操作もサンプルにプローブを添加して蛍光を測定するだけという極めて簡便なものであるため、測定者の技量を問わないことから、専門の検査機関でなくても実施可能な検査法として幅広い展開が期待される。

これらの成果は、国際的専門誌である、Org. Biomol. Chem. (2014), Int. J. Med. Nano Res. (2015), J. Pharm. Med. Res. (2015) において発表され、計 3 報の論文として公表されている。また学会において 20 件 (うち招待講演 1 件、国際学会 3 件) の発表によりこれらの成果を報告しており、高い評価を受けている。

平成 28 年 1 月 29 日、本学の学位規程に従い公開講演会を行い、本論文に関する説明と質疑応答を行った。申請者の説明はきわめて明快であり、応答内容も十分満足できるものであった。

以上により審査委員は本論文提出者 (河村浩司) の博士論文の審査、試験及び学力の認定を行った結果、本論文提出者が博士 (理工学) の学位を授与せられるに充分なる資格をもつものであると認める。