



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Development of solvatochromic fluorophores incorporating boron complex and application for biothiols detection in live-cell imaging [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	張, 帥
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(環境科学)
Dissertation Number	甲第16209号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94903
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	ZHANG_Shuai_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士 (環境科学)

氏 名 張 帥

審査委員 主査 准教授 山田 幸司
副査 教授 沖野 龍文
副査 教授 野呂 真一郎
副査 准教授 豊田 和弘

学 位 論 文 題 名

Development of solvatochromic fluorophores incorporating boron complex and application for biothiols detection in live-cell imaging

(ホウ素複合体を含むソルバトクロミック蛍光色素の開発と生体内細胞イメージングにおける生体チオール検出への応用)

蛍光色素は、超高感度で、空間的・時間的分解能が高く、低侵襲であるため、蛍光顕微鏡を用いた細胞イメージングで主に医学分野・生命分野で広く用いられている。そのため、蛍光色素の性能は、蛍光顕微鏡像の信頼性に直結する。蛍光色素の性能として主なものは、吸収や蛍光波長・モル吸光係数・蛍光量子収率などがあるが、その他にストークスシフトは重要な要素である。ストークスシフトは、吸収極大波長と蛍光発光極大波長の差を意味する。蛍光顕微鏡は、励起光ノイズを光学フィルターで除去するため、ストークスシフトが大きい方が低ノイズの顕微鏡像を得られる可能性が高いが、一般にストークスシフトが大きい色素は輝度が小さい。一方、当研究室で開発されたチオフエンを母骨格とするソルバトクロミック蛍光色素は、溶媒極性で発光波長がシフトする機能性色素で、極性の高い水環境中だと大きなストークスシフトが実現できる。申請者は、このソルバトクロミック蛍光色素を改良し、電子求引基であるピリジン環、芳香環であるチオフエン環、電子供与基であるN-フェニルピペラジンを鈴木-宮浦クロスカップリングで連結し、テトラキス（ペンタフルオロフェニル）ボロンと錯形成した新規色素を創製した。この色素は、水溶性が従来の色素よりも向上し、シアニン骨格の導入やボロンとの錯形成によってストークスシフトをさらに増大させ、200nmを超えるような優れた蛍光色素であることが分かった。吸収・蛍光発光スペクトルの解析の結果、水溶液環境でも実用応用に十分な輝度があることも分かった。

また、当研究室で開発された従来のソルバトクロミック蛍光色素は、認識部位を持たず細胞内でのべつ幕無しに発光し、蛍光顕微鏡像の解析を困難にする原因になっていた。申請者は、色素のピペラジン骨格を利用して電子アクセプター部位を導入し、光誘起電子移動

(Photoinduced Electron Transfer; PET) 機構を利用して細胞内の選択的蛍光染色を試みた。ジニトロベンゼンスルホニル (Dinitrobenzene Sulfonyl; DNBS) 基は強力な電子アクセプターで、励起した蛍光色素からPET及び電荷再結合が起こって熱的に基底状態に戻るため、蛍光発光はほぼ消光する。しかし、DNBS基がチオールと反応すると、結合が分解され電子アクセプターとの距離が遠くなり、結果的にPETが起こりにくくなるので、蛍光色素本

来の発光が復活する。申請者は、この色素がPETを起こしほぼ消光されること、DNBS基が加水分解されると蛍光が復活することを密度汎関数法 (Density Functional Theory; DFT) から理論的に明らかにした。また、実際この色素が、生体に含まれるグルタチオン

(GSH)、ホモシステイン (Hcy)、システイン (Cys) と反応し、分解されることを核磁気共鳴分光法と質量分析法から明らかにし、蛍光発光強度がそれぞれ80倍、40倍、40倍となることを、蛍光発光スペクトル分析から明らかにした。さらに、生体に含まれる各種アミノ酸やアニオン・カチオンなどがこの分解反応を阻害しないことも明らかにした。先行研究で得られた同種の機能を持つ他骨格を持つ蛍光色素と比べても、ストークスシフト、反応時間、検出下限などの面で優れていることも分かった。

さらに申請者は、ヒトの表皮癌由来の上皮細胞様接着細胞であるA431細胞に、この色素を導入し、細胞イメージング実験をおこなった。この色素を細胞に導入する最適条件を検討し、この色素の細胞毒性は低く、細胞イメージング実験で使う濃度では生理学的に影響がほとんどないことが分かった。また、他の蛍光プローブも用いたマルチ染色の実験より、他の細胞小器官選択的なプローブと異なった領域が蛍光染色されていることが分かった。さらに、生体チオール阻害剤であるN-エチルマレイミドの添加実験から、蛍光が復活しないことも分かった。これらの実験から、本研究で開発された色素は、細胞内で生体チオール濃度が高い領域を選択的に蛍光染色することが示唆された。

本研究の成果として得られたストークスシフトが極めて大きい蛍光色素の開発やPET機構の実用応用は、生体チオールの検出だけでなく、ピペラジンに連結する認識部位を付け替えることで、様々な生体分子のイメージングへの実用応用が期待される。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ、申請者が博士（環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。