

要 約

報告番号	① 乙 第	号	氏 名	柳 下 淳
主 論 文 題 名 Development of Highly Selective Fluorescent Probe Enabling Flow-Cytometric Isolation of ALDH3A1-Positive Viable Cells (フローサイトメーターによるALDH3A1陽性生細胞の分取を可能とする高感度蛍光プローブの開発)				
(内容の要旨) アルデヒドデヒドロゲナーゼ (aldehyde dehydrogenase: ALDH) は幹細胞など特定の細胞集団において高発現している。19のALDHアイソフォームの中でALDH1には蛍光プローブが存在し、幹細胞研究などに用いられている。一方、ALDH3A1蛍光プローブは現在までになく、今回世界で初めてALDH3A1蛍光プローブを開発した。プローブはALDH3A1に比較的特異的なアルデヒドと蛍光色素を結合することで合成した。蛍光色素の種類を変えることでプローブの水溶性の調節を行った。酵素反応による反応性の評価とliquid chromatography/ mass spectrometry (LC/MS) による水溶性の評価を行った。水溶性の評価基準はアルデヒド型プローブが細胞膜透過性 (脂溶性) でALDHにより代謝されたカルボン酸体が膜非透過性 (水溶性) であるかを、この基準を満たしている既存の蛍光プローブ (ALDEFLUOR®) と比較検討することで評価した。これにより、アルデヒド型は膜透過性で細胞内に貯留しないが、ALDHにより代謝され生成したカルボン酸型は膜非透過性であるためにALDH活性の高い細胞内に貯留するようにした。合成した5つのプローブのうち、1つがALDH3A1に対する反応性と水溶性の基準の両方を満たした。この基準を満たしたプローブとALDH3A1陽性コントロール細胞を用い共焦点顕微鏡下で経時的に観察し、プローブの細胞内貯留を評価した。プローブは細胞内に貯留するが、貯留したプローブがトランスポーターにより細胞外に排出されていることが判明した。プローブの構造式から原因となっているトランスポーターを予想し、その阻害剤を数種試用したところ、貯留したプローブの能動的排出を抑制することができた。この阻害剤とプローブを併用し、さらにALDH3A1低発現細胞を作成してALDH3A1陽性コントロール細胞とともに行ったフローサイトメトリーによる検討を行った。ALDHの活性と発現は相関することが知られており、フローサイトメトリーの陽性・陰性の判定が正しく行われていることを、分取した細胞を用いたウエスタンブロッティングによるタンパク質量の評価によっても確認した。この検討において、ALDH3A1陽性コントロール細胞と低発現細胞の識別および分取が可能であることを確認できた。また、実験中、死細胞率の増加も確認されなかった。 以上より、ALDH3A1の活性が高い細胞と低い細胞を生細胞の状態で解析可能であり、さらに細胞を分取し、引き続いて実験を行うことが可能であるALDH3A1蛍光プローブを開発できた。今後はこのプローブを用いてALDH3A1高活性細胞の幹細胞性に関する研究や抗癌剤耐性に関する研究を行う予定である。				