

論文の内容の要旨

論文題目 新規亜鉛蛍光プローブの開発と応用

氏名 平野 智也

第1章 序

生体内での亜鉛イオン(Zn^{2+})は、酵素の活性中心や構造保持等の、蛋白質に結合した状態での機能に関する研究が盛んに進められてきた。これに対し近年、蛋白質に結合しないで存在する遊離の Zn^{2+} が生理的に重要な役割を担っていると注目されている。遊離の Zn^{2+} は、染色法等によって、脳、膵臓等の器官に高濃度に存在し、特に脳内では海馬や扁桃体に多いことが明らかになっている。また、脱分極等により細胞外に放出され、グルタミン酸レセプター等の活性を変化させることから、神経伝達への関与も報告されている。この他にも、虚血、てんかん、アルツハイマー病等の疾患への関与も報告されており、医学、薬学の分野においても強い関心が寄せられている金属イオンであるが、その動態、作用機序は不明な点が多い。

生体内に存在する金属イオン、小分子、酵素等の作用機序を明らかにするためには、生きた細胞系を用いて、様々な刺激による濃度（もしくは活性）の時空間的な変化の測定をする必要がある。対象となる分子種と結合もしくは反応することによって、励起波長、蛍光波長、蛍光強度等が変化する蛍光プローブは、生きた細胞内での濃度変化を追跡する最も有用な方法の一つである。 Zn^{2+} と同じ 2 価の金属イオンである Ca^{2+} は、Fura-2 等の優れた蛍光プローブが開発されたことにより、その生理的機能の解析は格段に進展した。同様に、様々な Zn^{2+} を検出する蛍光プローブも開発された。しかし、励起光が細胞障害を与えやすい紫外光領域にあることや、感度が悪い等の問題点があり十分な成果をあげておらず、このことが、 Zn^{2+} の生理的な機能の解析が進展しない原因となっている。そこで私は、これまでのプローブの問題点を解決した、実用的な亜鉛蛍光プローブ分子の開発と、蛍光顕微鏡下で Zn^{2+} の動態をモニターできる実験系の確立を目指して本研究をスタートさせた。

第2章 新規亜鉛蛍光プローブ ACF 類の開発

私は、新規亜鉛蛍光プローブをデザインするにあたり、従来の亜鉛蛍光プローブの問題点をふまえて、

- (1) 励起光が可視光領域にあること。
- (2) 感度がよいこと。(K_dを下げる。ベースラインの蛍光を下げる。)
- (3) 選択性が高いこと。

を目標とした。そこで、蛍光団には励起光が可視光領域にあり水中で蛍光強度の強い Fluorescein 類を、Zn をキレートする構造には、環状ポリアミンを選択した、ACF 類を開発した(Figure 1)。

ACF 類は、中性の緩衝液中で、環状ポリアミンに Zn²⁺が配位することにより蛍光強度が大きく増大した。また、生体内に豊富に存在する Ca²⁺や Mg²⁺では蛍光強度がほとんど変化せず、Zn²⁺を選択的に検出することが可能であった。しかし、キレーター構造である環状ポリアミンが rigid であるために、錯体形成速度が遅く、Zn²⁺の濃度変化をリアルタイムに捉えることが難しいという問題点が生じた。3つのメチル基を除く、環状構造を大きくする等、構造の rigid さを低下させることにより、錯形成速度のある程度の上昇は見込めるものの、環状ポリアミン骨格は生理的条件下でプロトネートしているため、細胞内にロードするときには、細胞膜を透過しにくいという問題点もある。そのため、さらにプローブを改良する必要があった。

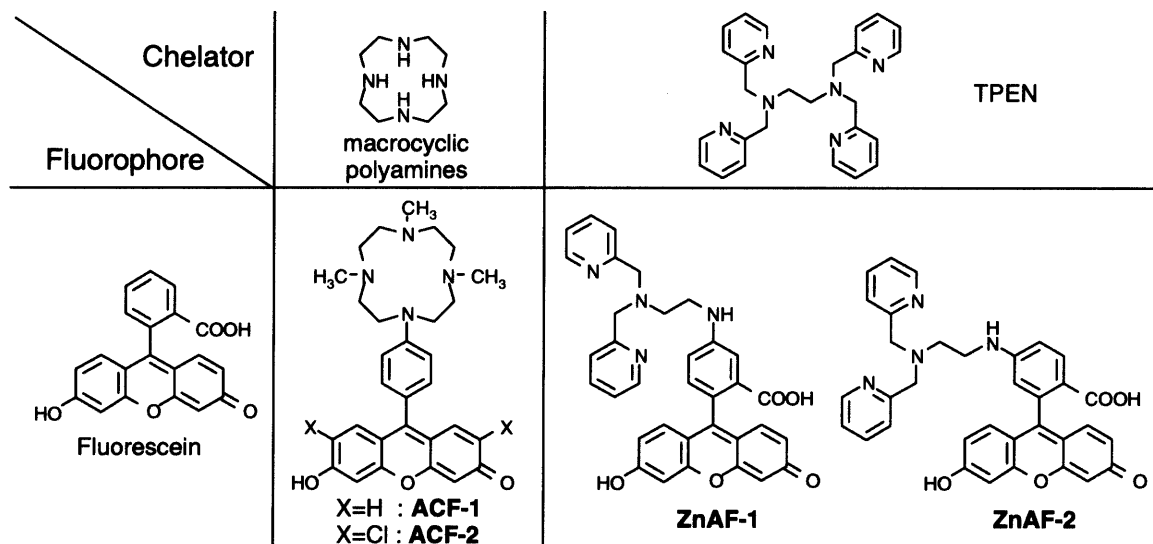


Figure 1. Structures of fluorescent probes for Zn²⁺

第3章 新規亜鉛蛍光プローブ ZnAF 類の開発

私は、Zn²⁺をキレートする構造として、新たに TPEN (*N,N,N',N'*-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine)を選択した。環状ポリアミンの pK_{a1}、pK_{a2}は、10 付近の値であることと比べ、TPEN は、pK_{a1} = 7.19、pK_{a2} = 4.85 と小さく、生理的条件下での荷電が少ない。また、構造も rigid でなく、錯形成速度も速いため、Zn²⁺のキレーター構造として理想的と考えられる。蛍光団には ACF 類と同様に Fluorescein 類を選択して、様々な TPEN 類縁体を持つ化合物を合成し、蛍光特性を検討した結果、TPEN の一部である *N,N*-bis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine を用いた ZnAF 類が、生理的条件下 (100 mM HEPES Buffer (pH 7.4, I = 0.1 (NaNO₃)))で Zn²⁺により蛍光強度が大きく増大した。Zn²⁺との pH 7.4 での見かけの解離定数は ZnAF-1 では 0.78 nM、ZnAF-2 では 2.7 nM となり、nM 付近の低濃度の Zn²⁺を検出することが可能であった(Figure 2a)。Zn²⁺との錯形成速度定数(k_{on})

は、Figure 2b に示すように、 $3 - 4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と算出され、数 100 msec 以内に Zn^{2+} 濃度の増大を、検出することが可能であることが示された。また、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等の生体内に豊富に存在する金属イオンは、 Zn^{2+} と比べて 5000 倍である 5 mM の高濃度で加えても蛍光強度が変化しなかった。さらに、pH を変化させても蛍光強度は増大せず、 Zn^{2+} を選択的に検出することが可能であった。特に ZnAF-1 は、亜鉛蛍光プローブとしては初めて、 Zn^{2+} と同族の金属イオンである Cd^{2+} に対して選択性を示すことに成功した。

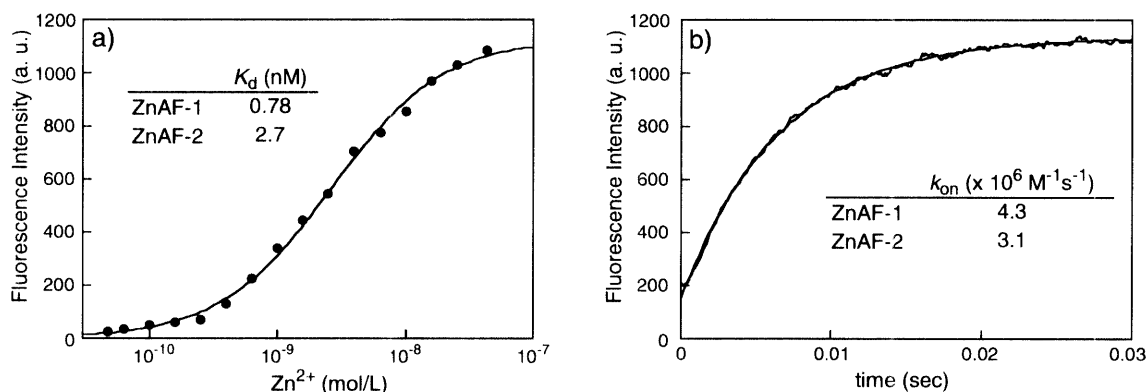


Figure 2. Kinetic analysis of the complex formation with Zn^{2+} . a) Fluorescence intensity of 1 μM ZnAF-2 as a function of the concentration of free Zn^{2+} in 100 mM HEPES Buffer (pH 7.4, $I = 0.1$ (NaNO_3)) containing 10 mM NTA (Nitriilotriacetid acid) and 0 – 9 mM Zn^{2+} . b) Time course measurement of the fluorescence intensity. ZnAF-2 mixed with Zn^{2+} (final concentration: 1 μM ZnAF-2; 50 μM Zn^{2+}) at pH 7.4 (100 mM HEPES buffer, $I = 0.1$ (NaNO_3)) and 25°C.

第4章 ZnAF 類の生細胞系への応用

培養細胞としてマウス由来の macrophage である RAW264.7 を用いて、ZnAF 類の生細胞系への応用を検討した。始めに、ZnAF-2 を含む PBS (phosphate buffered saline) で、細胞をインキュベーションしたが、水溶性の高さから、細胞膜を透過できず細胞内に導入できなかった。そこで、ZnAF 類を非侵襲的に細胞内に局在させることができるようにデザインした、ZnAF-2 DA を新たに合成した。ZnAF-2 DA を含む PBS で細胞をインキュベーションすることにより、細胞内に ZnAF-2 を局在させることに成功した(Figure 3b)。その後、細胞外液に Zn^{2+} の ionophore である pyrithione と Zn^{2+} を加え、細胞内の Zn^{2+} 濃度を上昇させると細胞内領域で蛍光強度の増大が観察された(Figure 3c)。また、膜透過性の Zn^{2+} のキレーターである TPEN を加えて、細胞内の Zn^{2+} 濃度を減少させると蛍光強度も減少した。以上の結果から、ZnAF-2 DA を用いることにより細胞内の Zn^{2+} の濃度変化を検出することが可能であることが示された。

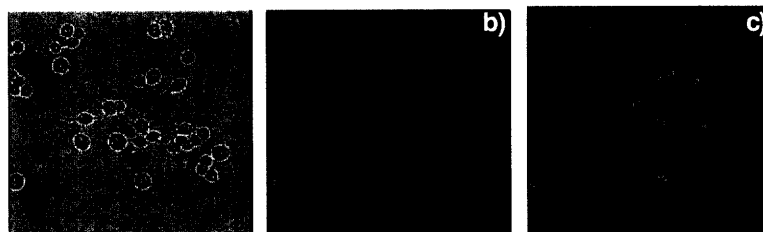


Figure 3. a) Bright-field and b) c) fluorescence images of RAW 264.7 loaded with ZnAF-2 DA. b) Before and c) after addition of 5 μM pyrithione and 50 μM Zn^{2+} .

次に、ラットの海馬スライスに ZnAF-2 DA を含む溶液でインキュベーションした後の蛍光像を Figure 4a に示す。遊離の Zn^{2+} が高濃度に存在することが報告されている、CA3 及び歯状回で強い蛍光が観察された。この蛍光は TPEN を外液に加えることにより減少したことから(Figure 4b)、

Zn²⁺由来と考えられる。染色後、外液中の酸素濃度とグルコース濃度を低下させた虚血刺激を与えると、約3～5分後から CA1 で蛍光強度が増大、すなわち Zn²⁺の濃度の増大が観察された(Figure 5b)。Figure 4 に示した Zn²⁺の静的な分布は、これまでに開発された染色法等によっても検出することが可能であるが、Figure 5 で測定された細胞が生きている状態での Zn²⁺の動的な変化は、ZnAF-2 DA を用いて初めて明らかになった結果であり、ZnAF 類の有用性を示す実験結果である。また、CA1 での選択的な Zn²⁺の濃度上昇は生理的にも重要な意義があると考えられるため、本実験系を用いてさらに検討を進めている。

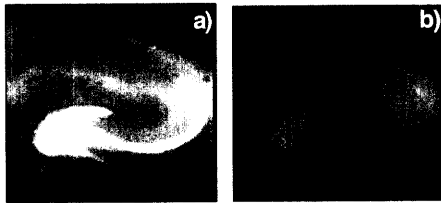


Figure 4. Fluorescence images of ZnAF-2 DA loaded rat hippocampus slices. a) Before and b) after incubation with 150 μMTPEN.

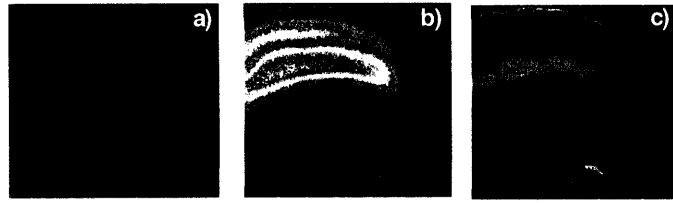


Figure 5. Fluorescence responses of ZnAF-2 DA loaded rat hippocampus slices induced by aglycemia from 2 min to 12 min. Fluorescence images a) at 2 min, b) 12 min and c) 16 min were shown in pseudo-color as ratio images on the basis of initial intensity at the start of measurement.

第5章 ZnAF 類の改良

ZnAF-2 は、選択性及び蛍光特性等多くの面で優れており、実際に生細胞系に適用することにより細胞内の Zn²⁺濃度の変化を検出することが可能である。しかし、Zn²⁺を加えたときの蛍光強度は、pH 7 付近より酸性側で減少する(pK_a = 6.2)性質も示した。細胞内の pH は通常 7.4 付近に保たれているが、細胞がアシドーシス等を起こしたときは pH が弱酸性になることも報告されている。そのため、中性から弱酸性条件下で、pH 変化の影響を受けにくい新たなプローブも必要と考えた。蛍光強度の減少は、蛍光団として用いた Fluorescein の phenol 性水酸基が protonate したことにより、Fluorescein 自身の蛍光強度が減少したためと考えられる。そこで phenol 性水酸基のオルト位を、電子吸引性の F 原子で置換した ZnAF-1F 及び ZnAF-2F を開発した(Figure 6)。ZnAF-1F 及び ZnAF-2F は、F 原子の置換によって、phenol 性水酸基の pK_a が 4.9 と酸性側にシフトしたため、中性から弱酸性条件下で、pH 変化による影響を受けずに Zn²⁺を検出することが可能であった。

これまでに開発した ZnAF 類と Zn²⁺との K_d は nM オーダーであるため、nM 付近の低濃度域の Zn²⁺濃度の測定が可能である。しかし、細胞内の Zn²⁺濃度は刺激によっては μM オーダーまで上昇することも報告されているため、高濃度域の Zn²⁺の濃度を測定することが可能なプローブも必要と考えられる。そこで、Figure 6 に構造を示す、ZnAF-5 を新たに合成した。ZnAF-5 と Zn²⁺との K_d は、25 μM となり、10 μM 付近の高濃度の Zn²⁺の濃度を測定することが可能である。これらの ZnAF 類をうまく使い分ければ、広い濃度域の Zn²⁺の濃度を測定することが可能となり、生体内での Zn²⁺の機能を解析するための有用なツールとなる。

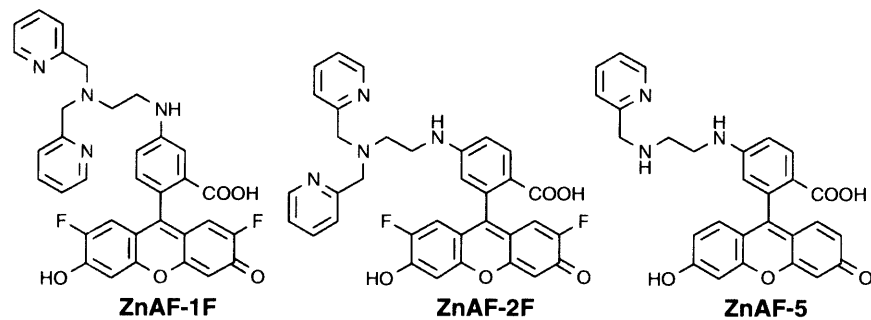


Figure 6. Structures of ZnAFs

第6章 総括

本研究で開発された ZnAF 類は生理的条件下で Zn^{2+} を選択的に検出することが可能であった。また、ZnAF-2 DA を含む溶液で培養細胞、組織のスライスをインキュベーションすると、細胞内に ZnAF-2 を局在化させることができるため、蛍光顕微鏡下で Zn^{2+} の濃度変化を測定することが可能となる。さらに、ZnAF 類を用いることにより、これまでは検出されなかった Zn^{2+} の濃度変化も検出されており、生体内での機能の解明が大きく進展することが期待される。