

審査の結果の要旨

氏名 平野 智也

従来、生体内での亜鉛イオン(Zn^{2+})は酵素の加水分解活性や構造保持等の機能を有する金属イオンとして知られてきた。これらの Zn^{2+} はいずれも蛋白質に強く結合した状態にある。これに対し近年、蛋白質に結合しない遊離状態で重要な生理機能を担っている Zn^{2+} が注目されている。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。更に、虚血、てんかん、アルツハイマー病等の疾患への関与も示唆されており、 Zn^{2+} は生命科学分野において強い関心が寄せられている金属イオンである。しかしながら、その動態・作用機序は不明な点が多い。

生体内に存在する Zn^{2+} 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）の時空間的な変化を測定する必要がある。このことは Zn^{2+} と同じ 2 価金属イオンである Ca^{2+} の生理的機能の解析が Fura-2 等の優れた蛍光プローブが開発されたことにより、格段に進展したことから窺える。

現在までに数種の Zn^{2+} 検出蛍光プローブが開発されているが、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、感度が極端に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+} の生理的機能の解析が進展しない原因になっている。平野はこれまでのプローブの問題点を解決した実用的な Zn^{2+} 蛍光プローブの開発と生細胞中の 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行った。

(I) 新規亜鉛蛍光プローブ ACF 類の開発

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^{2+} をキレートする構造には、環状ポリアミンを選択した。その結果、中性緩衝液中で、環状ポリアミンに Zn^{2+} が配位することにより蛍光強度が大きく増大するプローブ (ACF 類) の開発に成功した。この ACF プローブは生体内に豊富に存在する Ca^{2+} や Mg^{2+} では蛍光強度は変化せず、 Zn^{2+} 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、 Zn^{2+} 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。そのため、更にプローブを改良する必要があった。

(II) 新規亜鉛蛍光プローブ ZnAF 類の開発

Zn^{2+} をキレートする部位として、新たに TPEN を選択した。環状ポリアミンの生理的条件下での荷電が少なく、構造も rigid ではない。錯形成速度も速いため、 Zn^{2+} 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 の一部を構造に有する ZnAF 類の蛍光強度が生理的条件下で Zn^{2+} により大きく増大した。見かけの解離定数から nM 付近の低濃度の Zn^{2+} を検出することが可能である事が分かった。 Zn^{2+} との錯形成速度定数から数百 msec 以内での応答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 5mM の高濃度に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。

(III) ZnAF 類の生細胞系への応用

はじめに 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 ZnAF-2 DA を新たに合成した。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すると 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、 Zn^{2+} 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 Zn^{2+} の濃度の増大が観察された。測定された細胞が生きている状態での Zn^{2+} の動的な変化は、ZnAF-2 DA を用いて世界で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 Zn^{2+} 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。

これまでに開発した ZnAF 類と Zn^{2+} との K_d は nM オーダーであるため、nM 付近の低濃度域の Zn^{2+} 濃度の測定が可能である。しかし、細胞内の Zn^{2+} 濃度は刺激によっては μ M 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 Zn^{2+} 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。平野はこのような Zn^{2+} に対する親和性を変化させたプローブの開発にも成功している。これらの ZnAF 類をうまく使い分ければ、広い濃度域の Zn^{2+} の濃度を測定することが可能となり、生体内での Zn^{2+} の機能を解析するための有用なツールとなる。

以上、要約すると、本研究では新たに生理的条件下で Zn^{2+} を選択的に検出することが可能な ZnAF 類の開発に成功した。このプローブは感度・特異性等あらゆる点で従来のものをはるかに凌駕しており、培養細胞、組織での Zn^{2+} を可視化することができる。ZnAF 類を用いることにより、これまで不明であった Zn^{2+} の生体内での機能解明が可能となり、この分野が大きく進展することが期待される。この成果は博士（薬学）の学位論文として十分な価値があるものと認められる。