

# 論文の内容の要旨

## 論文題目      イミノクマリンを母核に用いた 波長変化型蛍光プローブの開発

氏      名      小松   兼介

### 第1編 広い濃度領域で測定可能な亜鉛蛍光プローブの開発

#### 第1章 序論

亜鉛イオン( $Zn^{2+}$ )は生体内において鉄に次いで多く存在する必須微量元素であり、大部分はタンパク質と強固な結合を形成し、構造保持や酵素の活性中心として働いている。その一方でタンパク質に結合しない、または弱く結合している  $Zn^{2+}$  も多く存在する。特に脳内の  $Zn^{2+}$  の約 10% は遊離した状態であり、神経細胞のシナプス小胞内に局在している。しかし遊離した  $Zn^{2+}$  の生理的な役割に関してはほとんど解明されていない。小胞内の  $Zn^{2+}$  は脱分極刺激によってシナプス間隙に放出されるため、神経伝達に関与している可能性がある。また神経系疾患への関与も示唆されており、現在注目を集めているイオンである。ところが  $Zn^{2+}$  の動態を調べる手段は非常に限られているのが現状である。

この状況下、細胞内の生理活性物質を生きた状態のまま可視化できる蛍光イメージングが近年注目されており、多くの  $Zn^{2+}$  蛍光プローブが開発されている。当教室では  $Zn^{2+}$  選択的蛍光プローブ ZnAF-2 の開発に成功し、生体内の  $Zn^{2+}$  の動態解明に寄与している。ZnAF-2 は  $Ca^{2+}$  や  $Mg^{2+}$  など他の生理的に重要なイオンには全く影響を受けない。また、 $Zn^{2+}$  に対するみかけの解離定数 ( $K_d$ ) は nM オーダーであり、低濃度 (0.1 nM ~ 10 nM) の  $Zn^{2+}$  を検出することができる。しかし私は**中枢神経系において高濃度 (>  $\mu$ M) の  $Zn^{2+}$  が放出される点**に着目した。ZnAF-2 を用いた場合、高濃度では蛍光強度が飽和するため、 $Zn^{2+}$  の存在の有無に関する定性的な評価はできても、詳細な濃度変化を追うことができない。nM 程度の低濃度から mM 程度の高濃度までの広い濃度範囲で  $Zn^{2+}$  濃度変化を測定するためにはプローブを低親和性にする、つまり大きな  $K_d$  値を有するプローブも必要である。そこで  $Zn^{2+}$  に対する選択性を維持したまま親和性を変化させた蛍光プローブの開発を行った。

## 第2章 広い濃度領域で測定可能な亜鉛蛍光プローブ ZnAF 類の開発

Zn<sup>2+</sup>に対する選択性を維持したまま親和性を変化させるために、Fig. 1 に示す ZnAF 類を新たにデザインし、合成した。ZnAF 類の Zn<sup>2+</sup>濃度に対する蛍光強度変化を調べたところ、いずれも ZnAF-2 よりも高濃度の領域で蛍光強度が変化することがわかった (Fig. 2)。これら6種類のプローブを組み合わせて用いれば、10<sup>-10</sup>~10<sup>-3</sup> M と広い範囲にわたる Zn<sup>2+</sup>の濃度変化を捉えられる。また ZnAF 類は Zn<sup>2+</sup>に対する選択性が非常に高いことも確認され、高濃度の Ca<sup>2+</sup>や Mg<sup>2+</sup>に全く影響を受けなかった。

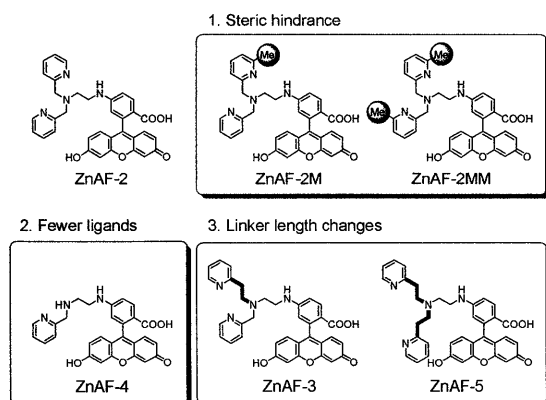


Fig. 1 ZnAF 類の構造

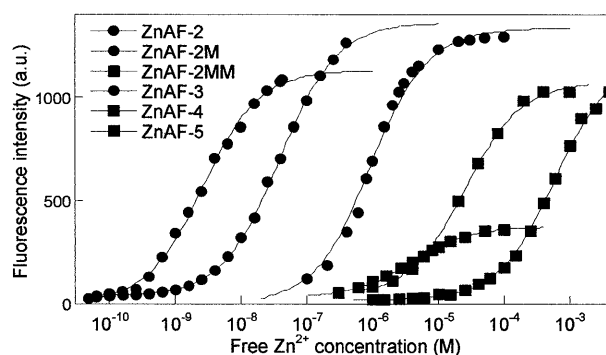


Fig. 2 ZnAF 類の Zn<sup>2+</sup>濃度に対する蛍光強度変化

## 第3章 ZnAF 類の生細胞系への応用

続いて ZnAF 類を用いて、神経細胞から放出される Zn<sup>2+</sup>の蛍光イメージングを行った。海馬スライスに KCl を加えて脱分極刺激したところ、海馬の各領域で蛍光強度が増大した (Fig. 3)。ZnAF-2 (a, K<sub>d</sub>=2.7 nM) では歯状回 (DG)、CA3、CA1 の各領域で蛍光強度が増大したのに対し、ZnAF-4 (c, K<sub>d</sub>=0.79 μM) では DG のみ蛍光強度が増大した。つまり DG ではより高濃度の Zn<sup>2+</sup>が放出されていることが示された。細胞外 Zn<sup>2+</sup>選択的キレーターである CaEDTA を加えたところ、この蛍光上昇は抑えられたので、細胞外の Zn<sup>2+</sup>に由来していることが確認された。

## 第4章 総括

ZnAF-2 の蛍光強度は海馬の各領域で飽和するため、Zn<sup>2+</sup>を検出できても詳細な濃度分布は調べられない。ZnAF 類を組み合わせて用いることで、領域間の Zn<sup>2+</sup>放出濃度の違いが初めて示された。複数のプローブによる Zn<sup>2+</sup>の濃度評価は今回が初めてであり、ZnAF 類の蛍光強度変化の有無のみで検討できる点で、信頼性が高いといえる。現在までに K<sub>d</sub> 値のコントロールを目的としたプローブの開発は全くなされていなかった。本研究では生体内 Zn<sup>2+</sup>が幅広い濃度変化をすることに着目し、様々な K<sub>d</sub> 値を持つ蛍光プローブ、ZnAF 類を開発することで、神経細胞より放出される Zn<sup>2+</sup>の詳細な解析に初めて成功した。

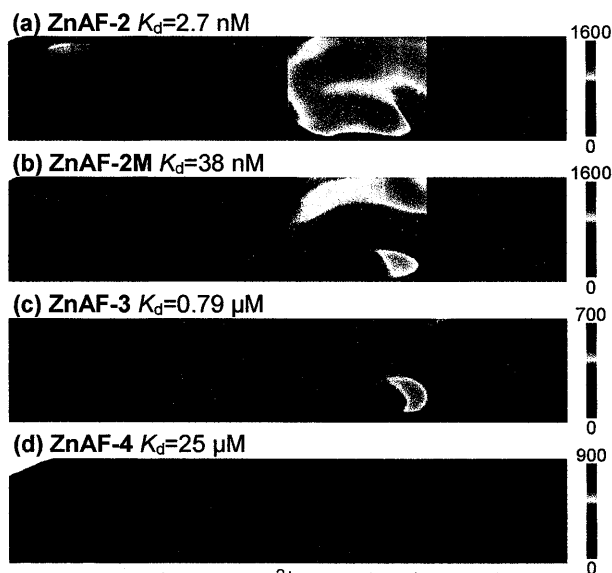


Fig. 3 ZnAF 類による Zn<sup>2+</sup>イメージング ラット海馬スライスを調整し 1 μM ZnAF 存在下イメージングを開始した。1分後に 50 mM KCl 加え、10分後に 50 mM EDTA を加えた。(左より)透過像、蛍光像(0、3、15分後)

## 第2編 イミノクマリンを母核に用いた新規波長変化型蛍光プローブの開発

### 第1章 序論

生体内に存在する金属イオン、酵素等の作用機序を明らかにするための手段として蛍光プローブを用いたイメージング法が汎用されている。蛍光プローブとは、標的分子と反応もしくは結合することにより、励起波長、蛍光波長、蛍光強度等の蛍光特性が変化する機能性分子である。蛍光プローブを用いて細胞または組織中の生理活性物質を可視化する場合、目的とする応答以外にも蛍光団の周りの環境(pH、溶媒の極性、温度など)や蛍光プローブ自身の局在、濃度変化、退色などの要因による蛍光強度の変化が頻繁に観測される。これらの要因の影響を受けにくくする方法として波長変化型プローブを用いた**レシオ測定**が一般的に用いられる。レシオ測定とは、励起波長あるいは蛍光波長を変えて同じ試料の測定を行い、その蛍光強度比を検出する測定法である。しかしレシオ測定を可能とする波長変化型プローブの多くは紫外光励起であり、また水中での蛍光量子収率も充分でないなどプローブの骨格として満足のいくものではなかった。例えば可視光励起が可能な波長変化型  $\text{Ca}^{2+}$  プローブとしてクマリンを母核に用いたBTCが市販されているが、量子収率が0.1よりも小さく汎用されるにはいたっていない。このような状況下、本研究では新たな蛍光団として**イミノクマリン**に着目した。イミノクマリンの優れた蛍光特性を活かすことで、新規波長変化型蛍光プローブを開発することを目標とした。

### 第2章 母核となる蛍光団 –イミノクマリン–

クマリンは蛍光色素として数多くの研究がなされ、様々な分野に応用されているのに対し、イミノクマリンに関する研究はほとんどない。しかしイミノクマリンは蛍光プローブの母核として優れた蛍光特

性を持っていることが判明した。具体的には、Fig. 4に示すクマリン(1, 2)とイミノクマリン(3, 4)を合成し、水中 pH 7.4 での蛍光スペクトルを比較した。その結果、イミノクマリン4のみが強い蛍光を有していた。蛍光量子収率は0.63と算出され、さらに吸収、

及び蛍光極大波長は500 nmを超えていた(Table 1)。クマリン系統の化合物では、4の様に水中で**長波長領域に強い蛍光を持つものは知られていない**。またイミノクマリンはイミノ基を介して様々な誘導体を合成することも可能である。そこでイミノクマリン4を母核に用いることで、さらに優れた波長変化型蛍光プローブの開発を目指した。

### 第3章 波長変化型亜鉛蛍光プローブの開発

波長変化型蛍光プローブの開発を目指し、イミノ基を修飾した化合物5を新たに合成した(Fig. 5a)。プローブのターゲットは生体内での役割が注目されている  $\text{Zn}^{2+}$  を選び、キレーターとの配位によって波長が

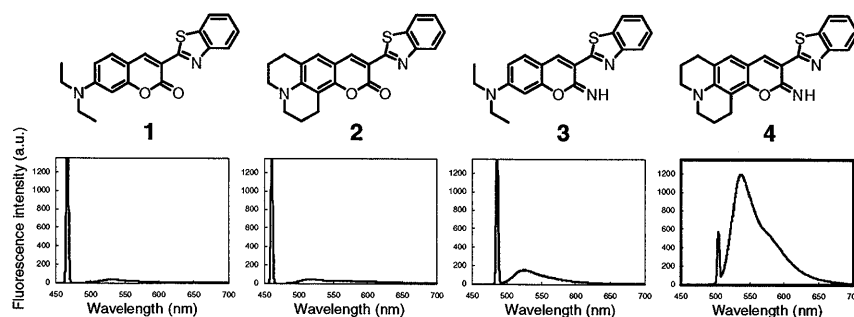


Fig. 4 クマリンとイミノクマリンの水中 pH 7.4 での蛍光スペクトル

Table 1 各化合物の水中 pH 7.4 での蛍光特性

Dye	Absorption Maximum $\lambda_{\text{max}}$ [nm]	Extinction Coefficient $\epsilon$ [ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ]	Emission Maximum $\lambda_{\text{max}}$ [nm]	Relative Quantum Yield
1	492	15000	520	0.08
2	467	25000	530	0.10
3	487	28000	524	0.07
4	503	32000	537	0.63

### 第3章 波長変化型亜鉛蛍光プローブの開発

波長変化型蛍光プローブの開発を目指し、イミノ基を修飾した化合物5を新たに合成した(Fig. 5a)。プローブのターゲットは生体内での役割が注目されている  $\text{Zn}^{2+}$  を選び、キレーターとの配位によって波長が

変化することを期待した。**5** に  $Zn^{2+}$  を添加したところ、蛍光波長が長波長側にシフトすることがわかった (Fig. 5b)。励起波長は 500 nm を超えており、水中での量子収率は  $Zn^{2+}$  配位前後で、0.80、0.76 と非常に高い値を示した (Table 2)。この結果より、**5** は水中で強い蛍光を持ち、かつ長波長励起が可能な波長変化型  $Zn^{2+}$  蛍光プローブとして機能することが明らかとなった。

**5** の他の金属イオンに対する選択性は非常に高く、生体内で遊離の状態で大량に存在する  $Na^+$ 、 $K^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  に対して全く影響を受けなかった (Fig. 6a)。そして pH 変化の影響を受けずに  $Zn^{2+}$  を検出できることも示された (Fig. 6b)。また  $Zn^{2+}$  との解離定数は 1.3 pM と算出され、これまで報告されたいの  $Zn^{2+}$  プローブと比べても極めて強い親和性を持っていた。

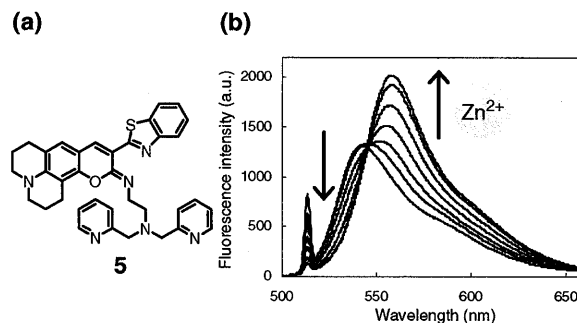


Fig. 5 (a)  $Zn^{2+}$  プローブの構造 (b)  $Zn^{2+}$  による波長変化

Table 2  $Zn^{2+}$  プローブ **5** の水中 pH 7.4 での蛍光特性

Dye	Absorption Maximum $\lambda_{max}$ [nm]	Extinction Coefficient $\epsilon$ [ $M^{-1}cm^{-1}$ ]	Emission Maximum $\lambda_{max}$ [nm]	Relative Quantum Yield
<b>5</b>	<b>513</b>	39000	543	<b>0.80</b>
<b>5</b> ( $Zn^{2+}$ )	<b>524</b>	48000	559	<b>0.76</b>

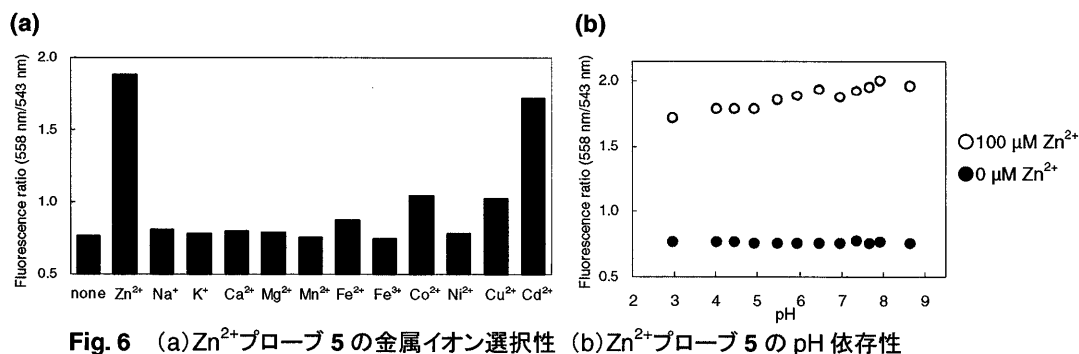


Fig. 6 (a)  $Zn^{2+}$  プローブ **5** の金属イオン選択性 (b)  $Zn^{2+}$  プローブ **5** の pH 依存性

$Zn^{2+}$  プローブ **5** を生細胞内  $Zn^{2+}$  のレシオイメージングに応用した。**5** は細胞膜透過性があり、**5** を含む溶液中で細胞 (HEK293) をインキュベーションした結果、細胞内に **5** が局在した。その後、2種類の蛍光画像 (565-605 nm、510-550 nm) を取得し、それをもとにしたレシオイメージングを行った (Fig. 7)。細胞外液に  $Zn^{2+}$  のイオノフォアである 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のレシオの増大が観察された。また、膜透過性の  $Zn^{2+}$  キレート剤である TPEN を加えて、細胞内の  $Zn^{2+}$  の濃度を減少させるとレシオも減少した。以上の結果から、**5** は細胞内  $Zn^{2+}$  の濃度変化をレシオイメージングによって検出可能であることが示された。

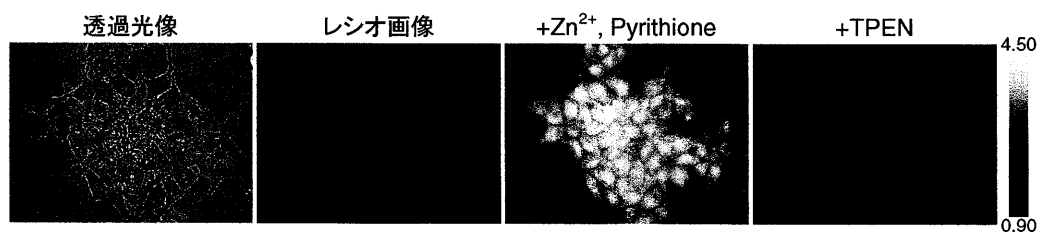


Fig. 7 培養細胞を用いた  $Zn^{2+}$  のレシオイメージング

続いて **5** を用いたレシオイメージングによって、脳内の  $Zn^{2+}$  を検出できるかを検討した。ラット海馬スライスの **5** による染色画像を Fig. 8 に示す。蛍光像では図左下に強い蛍光がみられたが、レシオをとることで、そうした色素の局在の影響を受けずに脳内の  $Zn^{2+}$  を検出できた。イメージングの結果、 $Zn^{2+}$  は歯状回

(DG)とCA3の他に、CA1でも検出されていることがわかった。確認のためにTPENを外液に加えて細胞内の $Zn^{2+}$ 濃度を減少させるとレシオ値が減少したので、**5**は脳内の $Zn^{2+}$ を検出しているといえる。

**海馬に存在する $Zn^{2+}$ のレシオイメージングに成功したのは今回が初めてである。**そして蛍光イメージングによってCA1領域の $Zn^{2+}$ を検出することに成功したのも今回が初めてである。**5**は $Zn^{2+}$ の動態を解明する非常に有力な手段になると考えられる。

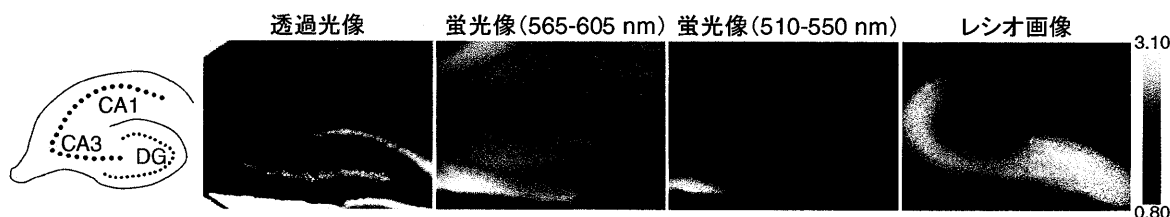


Fig. 8 ラット海馬スライスを用いた $Zn^{2+}$ のレシオイメージング

#### 第4章 イミノクマリンの蛍光特性解明と蛍光プローブへの応用

7位に水酸基を持つイミノクマリン**6**も優れた蛍光特性を持っていた(Fig. 9a)。**6**はそのクマリン類縁体と比べて約7倍の蛍光強度を有しており、量子収率は0.74、モル吸光係数は $53000 (M^{-1}cm^{-1})$ と算出された。蛍光プローブの母核として優れているといえる。

その上**6**の励起スペクトルは酸性側で大きく変化し、波長変化型pHプローブとして機能することが明らかとなった(Fig. 9b)。今後波長変化型pHプローブとして**6**の生体応用が期待できる。

また**6**は $Zn^{2+}$ プローブ**5**と同様に、細胞内に局在する性質を持っていた。**6**を母核に用いた $\beta$ -ガラクトシダーゼ蛍光プローブ**7**を新たに開発したところ(Fig. 10)、酵素反応によって蛍光強度が約500倍に増加した。そしてプローブ**7**を細胞に応用した結果、*lac Z*を発現した細胞のみ選択的に染色することに成功した。染色された細胞では色素が細胞外に漏れ出すことはほとんどなく、長時間強い蛍光を保っていた。このように細胞内に集積する点もイミノクマリンを蛍光プローブの母核として用いるメリットの一つと考えられる。

#### 第5章 総括

本研究ではイミノクマリンが蛍光プローブの母核として優れた性質を持っていることを新たに見出した。そしてイミノクマリンを用いることで、蛍光特性に優れた波長変化型 $Zn^{2+}$ 蛍光プローブ**5**を開発することに成功した。**5**は生細胞系への応用が可能であり、**海馬に存在する $Zn^{2+}$ をレシオイメージングによって検出することに成功したのは世界で初めてである。**本研究は $Zn^{2+}$ だけでなく、様々な分子を標的とする波長変化型蛍光プローブ開発の端緒になると考えている。

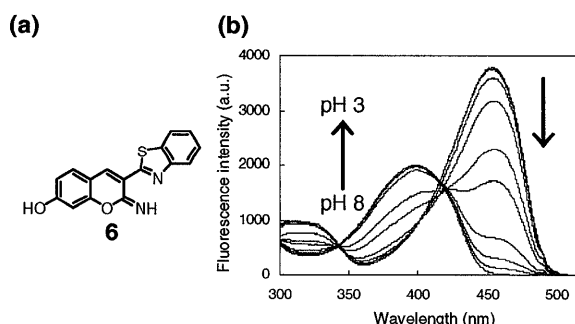


Fig. 9 (a)7位に水酸基を持つイミノクマリンの構造 (b)イミノクマリン**6**の励起スペクトル

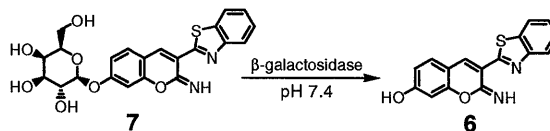


Fig. 10  $\beta$ -ガラクトシダーゼ蛍光プローブ