

審査の結果の要旨

氏名 小松兼介

小松兼介の研究成果は以下の2つの内容から構成されている。

1. 広い濃度領域で測定可能な亜鉛蛍光プローブの開発に関する研究

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不明な点が多い。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いる。

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機能解析の観点から注目されており、数種の 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。しかしながら、中枢神経系において高濃度 ($> \mu M$) の Zn^{2+} の放出が示唆されており、ZnAF-2 だけでは 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が必要である。小松君は 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。

種々検討した結果、ZnAF-2 に加えて、 Zn^{2+} に対する親和性が異なる ZnAF-2M、ZnAF-2MM、ZnAF-3、ZnAF-4、ZnAF-5 の6種類のプローブの開発に成功した。これらのプローブを組み合わせることで、 10^{-10} ~ 10^{-3} M と広い範囲にわたる Zn^{2+} の濃度変化を捉えることができるようになった。

これらのプローブ ZnAF 類を神経細胞へ応用し、その有用性も実証した。すなわち、生体内 Zn^{2+} が幅広い濃度変化をすることに着目し、様々な K_d 値を持つ蛍光プローブである ZnAF 類を用いることで、神経細胞より放出される Zn^{2+} の詳細な解析に初めて成功した。

2. 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に関する研究

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有用である。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 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、小松君は新たな蛍光団としてイミノクマリンに着目し、イミノクマリンの優れた蛍光特性を活かすことで、多種類の新規波長変化型蛍光プローブを開発することに成功した。

現在までに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。小松君は、イミノクマリンが蛍光プローブの母核として優れた蛍光特性、すなわち水中で長波長領域（蛍光極大波長 500 nm 超）に強い蛍光（蛍光量子収率：0.63）を有することを明らかにした。クマリン系統の化合物では、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容易に合成できる。これらはイミノクマリンを母核として多種類の優れた波長変化型蛍光プローブを開発することが可能であることを示している。この考えに基づいて、小松君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+} 蛍光プローブの開発を行った。その結果、他の金属イオンに対する選択性が高く、pH 変化の影響を受けず、特異的に Zn^{2+} に高い親和性を有するプローブの開発に成功した。このプローブは細胞内あるいは脳内の Zn^{2+} の濃度変化をレシオイメージングにより検出できることも明らかにした。海馬、CA1 領域に存在する Zn^{2+} のレシオイメージングに成功したのはこれが初めてである。このプローブが Zn^{2+} の動態を解明する非常に有力な手段であることを明らかにした。

さらに、他のイミノクマリン誘導体として波長変化型 pH プローブおよび波長変化型 β -ガラクトシダーゼ蛍光プローブの開発にも成功した。これらのプローブを細胞外に漏出しないように化学修飾することも可能で、細胞内に集積させやすい点もイミノクマリンを蛍光プローブの母核としての長所である。

上記の蛍光イメージングプローブ開発に関する研究は、薬学研究において特筆すべき内容であり、博士（薬学）に値するものと判断した。