

亜鉛イオンを検出する蛍光プローブの開発

平野 智也

亜鉛イオン (Zn^{2+}) をターゲットにした蛍光プローブの開発は1990年代半ばから盛んになり、現在ではかなりの数のプローブが報告されるに至っている。本稿では、こうした亜鉛蛍光プローブの開発研究について、筆者らが行ってきた研究を含めて紹介したい。

生体内の亜鉛イオン

まず生体内での亜鉛イオンの機能に関して概説する。生体内における亜鉛イオンの機能に関する研究の歴史は古く、真核細胞の生育に必須であることが発見されたのは1860年代である。その後、1940年に初めて亜鉛イオンを含有する酵素としてcarbonic anhydraseが報告されて以来、さまざまな酵素に含まれていることが報告され、現在までにその数は300以上にも及ぶ。また数千もの亜鉛イオンを含む転写制御因子の存在も報告されており²⁾、亜鉛イオンの不足は多くのタンパク質の発現に影響を与え、成育障害や味覚障害などの疾患を引き起こすことが知られていた。

さて、これまでに述べたケースでは、亜鉛イオンはタンパク質に強く結合した状態で機能しているが、タンパク質に弱く結合、もしくは遊離の状態が存在する亜鉛イオン (labile, chelatableとも表現される) が脳、脾臓などの器官に多く存在することが、Timm's法³⁾などの組織染色により明らかにされてきた。また、海馬のCA3領域などの神経終末には、高濃度の亜鉛イオンを含む小胞があること、こうした亜鉛イオンが脱分極などの刺激により細胞外へ放出されることも報告された^{4,5)}。さらに、培養細胞を用いた実験で亜鉛イオンがグルタミン酸受容体の機能をコントロールすることや、てんかんや脳虚血などの脳神経系の疾患への関与も示唆され、その生理的な作用が徐々に注目を集めていった。そして、これらの研究を行うために、亜鉛イオンの動態をリアルタイムにとらえたいという要求と、1980年代後半からのカルシウムイオンを検出する蛍光プローブの華々しい成功を受けて、亜鉛イオンをターゲットにした蛍光プローブの開発研究は始まった。

キノリン骨格を持つ蛍光プローブ

筆者が知る限りにおいて、最初に報告された亜鉛蛍光

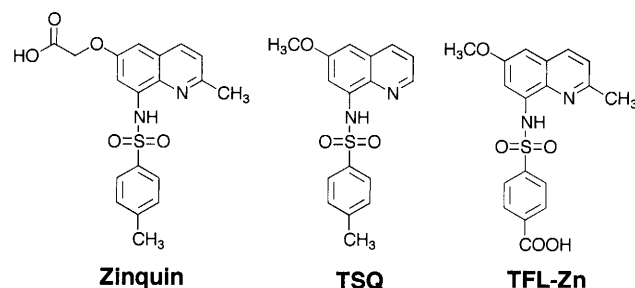


図1. キノリン骨格を持つ亜鉛蛍光プローブの構造

プローブはTSQ⁶⁾であろう (図1)。TSQは、スルホンアミドが脱プロトン化して、亜鉛イオンと1:1もしくは1:2錯体を形成することにより、励起波長367 nm、蛍光波長495 nmの蛍光強度が増大する。また、カルシウムイオンなど、他の金属イオンでは蛍光強度の増大は起こらず、亜鉛イオンを選択的に検出すること可能である。TSQはもともと組織中の遊離の亜鉛イオンを蛍光染色するために用いられてきたが、脂溶性の高い構造であるため水に溶けにくく、また細胞膜に集積してしまうことも報告され、生細胞系に用いることは難しかった。そこで開発されたのが、TSQにカルボキシル基を導入して水溶性を高め生細胞系に適用できるように改良したZinquin、TFL-Znである。Zalewskiらにより開発されたZinquinは、アポトーシス時における細胞内亜鉛イオン濃度の上昇など、生細胞における亜鉛イオンの動的挙動を蛍光顕微鏡下で観察することに成功した⁷⁾。

しかし、こうしたキノリン骨格をベースとした蛍光プローブは励起波長が紫外光領域にあるために、励起光による細胞障害や、細胞内に存在する核酸、ビリジンヌクレオシド (NADH, NADPH) などの内因性の蛍光物質の影響を受けやすいという問題点もあった。

蛍光プローブ開発の隆盛

Zinquinを用いた生細胞での亜鉛イオンイメージングの成功と、その問題点をふまえ、新たな蛍光プローブの開発研究が筆者らのグループなどにより盛んに行われていった。亜鉛蛍光プローブをデザインするにあたり、まず参考にされたのがカルシウムイオン蛍光プローブである。プローブの基本骨格は、カルシウムイオンに選択的

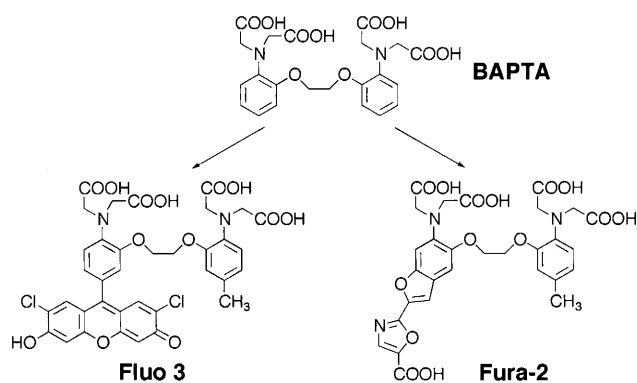


図2. カルシウムイオン蛍光プローブの例

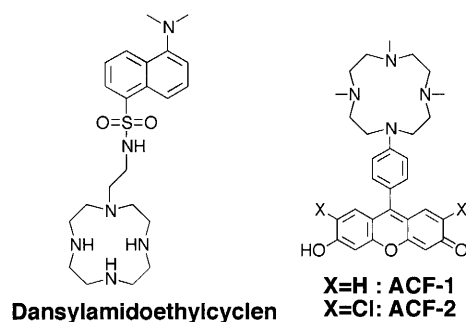


図3. 環状ポリアミン骨格を用いた亜鉛蛍光プローブ。環状ポリアミンのN原子が亜鉛に配位するが、dansylamidoethylcyclenはそれらに加えて脱プロトン化したスルホンアミドも配位する。

に配位するキレーターと蛍光団が結合した構造であり、キレーターとしてはBAPTAが用いられていた。図2に構造を示すように、BAPTA構造の中の一つのベンゼン環を蛍光団に組み込んだFluo-3、Fura-2などが開発されていた。

同様のコンセプトにより、亜鉛イオンを検出する蛍光プローブを開発するためにまず、亜鉛イオンに対するキレーターの選択が行われた。一般に、窒素原子による配位子は、亜鉛イオンや遷移金属イオンに対してコンプレックスを形成しやすく、ナトリウムイオン、カルシウムイオンなどの“hard”な金属イオンとはコンプレックスを形成しにくい。そのため、アミンをベースにしたキレーターを用いれば、生体内に豊富に存在するこれらの金属イオンに対して選択性を獲得できると考え、環状ポリアミンを用いた蛍光プローブとして、筆者らによるACF類⁸⁾や、dansylamidoethylcyclen⁹⁾などが開発された(図3)。

ACF類は極大励起波長が490 nm付近と、キノリン骨格を持つ蛍光プローブより長波長であり、励起波長による問題点をクリアしていた。しかし環状ポリアミンは生理的条件下でプロトン化しやすく、プロトン化に

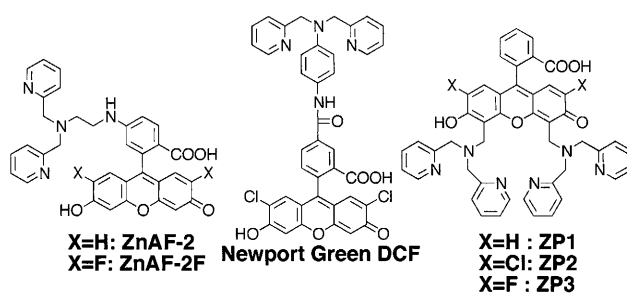


図4. ピリジンを配位子として用いた亜鉛蛍光プローブ。ピリジン環上のN原子とアミンのN原子が亜鉛イオンに配位する。ZP類はフェノール性水酸基も配位に関与する。

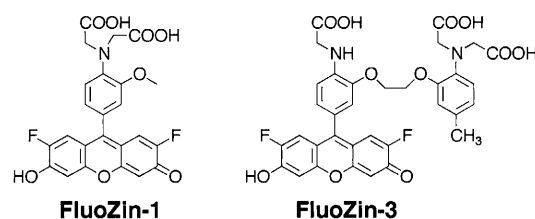


図5. BAPTAの部分構造を配位構造として用いた亜鉛蛍光プローブ。カルボン酸のO原子、アミンのN原子が亜鉛イオンに配位する。

よる亜鉛イオンとのコンプレックス形成速度の遅さなどの新たな問題点が浮上した。

そこで次に開発されたのが、生理的条件下でプロトン化しにくい、ピリジンなどから成るキレーター構造を用いた蛍光プローブである。筆者らのグループによって開発されたZnAF類¹⁰⁾や、Newport Green類¹¹⁾、ZP類¹²⁾がこのグループに属する(図4)。これらのプローブは、環状ポリアミンを用いた蛍光プローブの問題点をクリアしており、細胞内外の亜鉛イオンの動的挙動の変化を、蛍光顕微鏡下で観察することを可能とした¹³⁾。さらに、キレーター構造の一部を修飾することによって、亜鉛イオンとの結合の強さや、解離速度を変化させた化合物も報告されている^{14,15)}。

この他にも、本来カルシウムイオンに対するキレーターであるBAPTAの部分構造を用いた蛍光プローブも報告されている^{11,16)}(図5)。これらのプローブはカルシウムイオンなどに対する選択性がやや悪いが、カルボン酸を多く持つことによる水溶性の上昇などの利点もある。

レシオ測定が可能な亜鉛蛍光プローブ

さて、図1～5に構造を示した化合物は、亜鉛イオンが配位することによって蛍光強度が変化する。こうした強度変化のみを測定する方法は、プローブの局在や励起光強度などの要因の影響を受けやすく、正確な濃度を見積

特 集

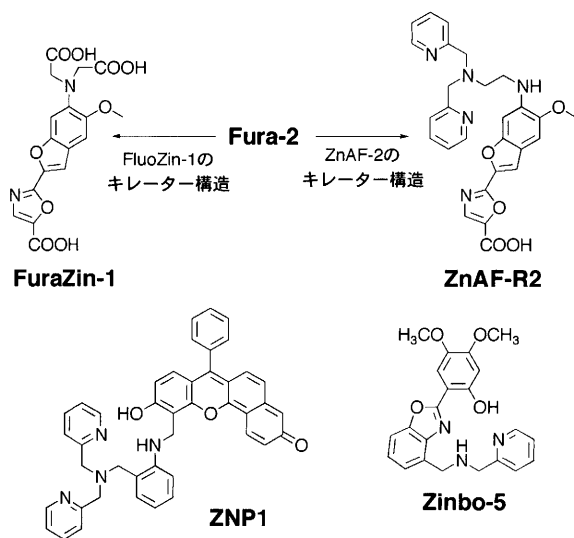


図6. レシオ測定が可能な亜鉛蛍光プローブ

もることが困難であることも多い。これに対して、亜鉛イオンなどの測定対象の分子が結合または反応することによって励起スペクトル、もしくは蛍光スペクトルの形が変化し、特定の二波長での蛍光強度の比の変化により濃度測定を行う、レシオ測定という方法がある。レシオ測定が可能な蛍光プローブは、先に挙げた要因を強度の比を測定することによってある程度キャンセルできるため、より正確な測定が可能となる。カルシウム蛍光プローブにおいても、レシオ測定が可能なFura-2が最も頻繁に用いられおり、こうした経緯からレシオ測定が可能な亜鉛イオン蛍光プローブの開発が行われた。筆者らのグループによるZnAF-R2¹⁷⁾を含めたFura-2の構造を基にしたプローブや¹¹⁾、ZNP1¹⁸⁾やZinbo-5¹⁹⁾などが開発されている(図6)。

その他の蛍光プローブ

さて、これまで紹介した亜鉛蛍光プローブは合成小分子から成る構造をとるが、この他にもペプチド鎖の亜鉛イオンに対する認識を利用した蛍光プローブも報告されている²⁰⁾。すなわち、Zn-Fingerやcarbonic anhydraseの亜鉛イオン含有タンパク質の、亜鉛イオン結合部位の適切な位置に蛍光団でラベル化し、亜鉛イオンが配位したことによる構造変化を、蛍光団の蛍光変化というアウトプットに変換して測定を行う。

さらに最近、新たなタイプとして、長寿命の蛍光を持つランタノイド錯体を蛍光団として用いた蛍光プローブも報告された²¹⁾。

以上、TSQより始まり現在までに開発されてきたさまざまな亜鉛蛍光プローブの中のいくつかを抜粋して紹介した。これらのプローブの多くは、細胞外液に加えると細胞外の亜鉛イオン濃度変化を、細胞膜透過型誘導体(ZnAF-2 DA など)を用いると、細胞内の亜鉛イオン濃度変化を検討することが可能である。さらに、プローブによっては同じ細胞内であっても、細胞質、ミトコンドリア、亜鉛イオンが局在している小胞といったように、細胞内局在が異なることも報告されている。これらのプローブをうまく使い分けていけば、亜鉛イオンの詳細な動態を解析することも可能であり、未だ不明な点が多い亜鉛イオンの生理作用に関する研究を大きく進展させるであろう。

本稿で紹介した筆者らによる亜鉛蛍光プローブに関する研究は、東京大学大学院薬学系研究科・長野哲雄教授と、現大阪大学大学院工学系研究科・菊地和也教授の御指導の下で行っていた研究であり、先生方にはこの場を借りて厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) da Silva, J. J. R. F. and Williams, R. J. P.: *The Biological Chemistry of Elements: The Inorganic Chemistry of Life*, 2nd ed.; Oxford Univ. Press, Oxford (2001).
- 2) Coleman, J. E.: *Annu. Rev. Biochem.*, **61**, 897 (1992).
- 3) Timm, F.: *Dtsch. Z. Gesamte. Gerichth. Med.*, **46**, 706 (1958).
- 4) Assaf, S. Y. and Chung, S. H.: *Nature*, **308**, 734 (1984).
- 5) Howell, G. A. et al.: *Nature*, **308**, 736 (1984).
- 6) Frederickson, C. J. et al.: *J. Neurosci. Methods*, **20**, 91 (1987).
- 7) Zalewski, P. D. et al.: *Biochem. J.*, **296**, 403 (1993).
- 8) Hirano, T. et al.: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**, 1052 (2000).
- 9) Koike, T. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 12696 (1996).
- 10) Hirano, T. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 10650 (2000).
- 11) Haugland, R. P.: *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, 9th ed., Molecular Probes, Inc. Eugene, OR (2002).
- 12) Walkup, G. K. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 5644 (2000).
- 13) Hirano, T. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 6555 (2002).
- 14) Komatsu, K. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 10197 (2005).
- 15) Nolan, E. M. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 16182 (2005).
- 16) Gee, K. R. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 776 (2002).
- 17) Maruyama, S. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 10650 (2002).
- 18) Chang, C. A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 1129 (2004).
- 19) Taki, M. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 712 (2004).
- 20) Shults, M. D. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 10591 (2003).
- 21) Hanaoka, K. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 12470 (2004).