

研究

亜鉛検出用蛍光プローブの開発とその応用

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医薬品情報学分野¹⁾ 長崎大学病院臨床研究センター²⁾

神戸薬科大学薬品物理化学研究室³⁾ 京都大学大学院薬学研究科病態機能分析学分野⁴⁾

萩森政頼¹⁾ 水山奈央子²⁾ 小川昂輝¹⁾ 川上茂¹⁾ 向高弘³⁾ 佐治英郎⁴⁾

要約

亜鉛は重要な生体機能に関与することから、その動態や機能の解明が望まれている。近年、生体内亜鉛イオンの可視化を目的に、様々な亜鉛蛍光プローブが報告されているが、蛍光を發する蛍光団と亜鉛イオンとの反応部位が2つの部分から成ることから分子量が大きくなり、その結果、溶解性や細胞膜透過性が悪くなることが問題となっている。我々は、蛍光団と亜鉛イオンとの反応部位の2つの機能を併せ持つ分子骨格(ピリジン-ピリドン)を見出し、低分子量化により、高い細胞膜透過性が期待できる亜鉛蛍光プローブの開発に成功した。また、官能基を検討することにより、蛍光のオン-オフ機能や亜鉛イオンへの親和性を高める分子設計が可能であることを明らかにした。さらに、開発した亜鉛蛍光プローブを用いて、細胞内の遊離亜鉛イオンの検出や組織透明化法への応用を行った。

KEY WORDS 蛍光プローブ, イメージング, 亜鉛イオン, 低分子量, 細胞膜透過性

はじめに

亜鉛は、生体内において遺伝子発現、酵素触媒作用、免疫システム、神経伝達等に関与することが示唆されており、その機能に注目が集まっている¹⁻³⁾。細胞内において、亜鉛のほとんどはタンパク質と結合しており、タンパク質の構造の保持、酵素活性の制御等に関わっている¹⁾。また、亜鉛は、非常に低濃度(ピコモルオーダー)であるが遊離状態でも存在しており、中枢神経系においては、哺乳類の海馬におけるグルタミン酸作動性神経終末のシナプス小胞内に局在してセカンドメッセンジャーとして機能する等、生体内において重要な役割を担っている^{4,5)}。このように、生体における亜鉛の役割が報告される一方で、依然として亜鉛

の動態や機能に関して不明な部分が多く、それらの解明が望まれている。生物が生きている状態で生体分子を可視化できるイメージング測定は、対象を非侵襲的に解析することが可能であり、亜鉛の動態や機能の解明においても非常に有用な方法となることが期待される⁶⁾。本稿では、亜鉛の動態や機能の視覚的な解析を可能にする亜鉛検出蛍光プローブの開発と応用について、我々の研究成果を紹介したい。

1. 亜鉛蛍光プローブの開発

a. 低分子量亜鉛蛍光プローブ

亜鉛は周期表の第12族に属する金属元素であ

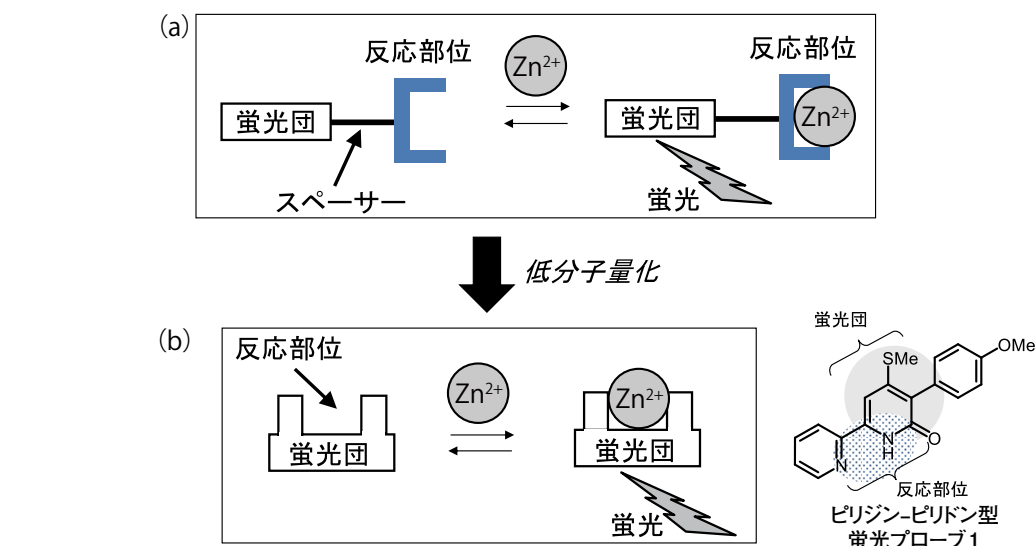


図1 低分子量亜鉛蛍光プローブの設計

り、d軌道が閉殻構造(3d¹⁰4s⁰)をとっているため、他の遷移元素のように、色や吸収スペクトルの変化から亜鉛の反応の追跡、構造予測を行うことは困難である。そのため、亜鉛と選択的に反応し、蛍光強度や蛍光波長が変化する蛍光プローブの開発が活発に行われている^{7,8)}。TSQは、亜鉛蛍光プローブとして初めて報告された蛍光プローブであり、水には難溶性のため、脳や膝ランゲルハンス島の組織切片の染色に用いられている^{9,10)}。Zinquin ethyl esterは、TSQを改良して細胞膜透過性を付与した蛍光プローブであり、細胞内亜鉛の検出に用いることが可能である^{11,12)}。ZP3は、フルオレセインをベースにした蛍光プローブであり、海馬における亜鉛の検出に成功している¹³⁾。しかし、ZP3のバックグラウンド蛍光が強く、細胞膜透過性がやや悪い。これらの亜鉛蛍光プローブは、分子構造において、いずれも蛍光を發する蛍光団と亜鉛イオン(Zn²⁺)との錯体を形成する反応部分がスペーサーによって繋がれた構造をしている。そのため、様々な蛍光団とZn²⁺反応部位を選択することによって、多様な性質を示す蛍光プローブの開発が可能である。その一方で、蛍光団とZn²⁺反応部位の2つの部分から成ることから分子量が大きくなるため、生体内亜鉛を検出する

上で必要な条件である溶解性や細胞膜透過性に影響を及ぼすことが考えられる。特に、分子量が500以上の化合物は細胞膜透過性が悪くなることが懸念される¹⁴⁾。この点を考慮し、筆者らは、蛍光プローブの低分子量化を目指した分子設計を行い、ピリジン環を有する化合物群のスクリーニングから¹⁵⁻²¹⁾、蛍光団とZn²⁺反応部位の機能を持つピリジン-ピリドン型蛍光プローブ1を見出し、分子量の大きな低減化(分子量:324)に成功した(図1)²²⁾。

b. 精密分子設計による亜鉛蛍光プローブの開発

ピリジン-ピリドン型蛍光プローブ1において、Zn²⁺濃度依存的に、490nmの蛍光強度が増大し、Zn²⁺との錯体形成比率は1:1を示したことから、Zn²⁺に対する結合解離定数(K_d)は7μMと算出された²²⁾。また、適度な水溶性を示し、非常に大きなストークスシフト(124 nm)を示したことから、励起光の影響を受けにくく、高感度測定の可能性が期待された。しかしながら、バックグラウンド蛍光が比較的高いことから、バックグラウンド蛍光を可能な限り小さくし、Zn²⁺と結合したときだけ強い蛍光を發するオン-オフ型蛍光プローブを開発することにした。

化合物 No.	R: ピリドン環 3位の官能基	励起波長 (nm)	蛍光波長 (nm)	ストークス シフト (nm)	蛍光量子収率の比 ($\Phi_{Zn(II)}/\Phi_{free}$)	
1	電子供与性	C ₆ H ₄ -OMe (4)	366	490	124	2.9
2		1-Naphthyl	362	470	108	1.6
3		C ₆ H ₅	362	478	116	7.9
4	電子求引性	C ₆ H ₄ -Cl (4)	360	470	110	14.7
5		C ₆ H ₄ -CF ₃ (4)	350	468	118	23.0
6		C ₆ H ₄ -COOMe (4)	346	480	134	17.5

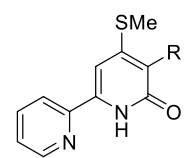


図2 ピリドン環の3位の官能基の検討

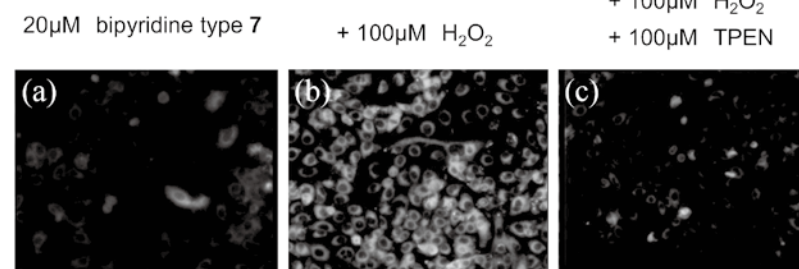
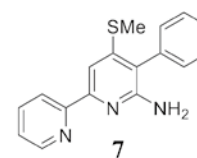
ピリジン-ピリドン骨格への官能基の検討を行ったところ、ピリドン環の3位での電子密度の変化が蛍光強度に大きく変化することがわかった^{23,24}。特に、トリフルオロメチル基のような強い電子求引性の官能基を導入した化合物5においては、蛍光発現部位への電子の移動が抑えられるためバックグラウンド蛍光がほぼ消失した。一方、Zn²⁺添加時においては、蛍光発現部位への電子の移動が回復することから、Zn²⁺存在/非存在下での蛍光量子収率の比($\Phi_{Zn(II)}/\Phi_{free}$)は23倍に増強した。本分子設計によって、分子量を大きく変えることなく、蛍光のオン-オフ制御が可能であることがわかった(図2)。そこで、水溶性を考慮し、ピリドン環の3位に電子求引性のカルボキシル基を導入した化合物を用いて細胞膜透過性について検討を行ったところ、化合物に由来するバックグラウンド蛍光は確認されず、Zn²⁺添加時のみ非常に強い蛍光が観察された²³。

ピリジン-ピリドン型亜鉛蛍光プローブでは、分子内の電荷移動を制御することによって蛍光のオン-オフ機能を持ち、低分子量であるため良好な細胞膜透過性を示した。しかしながら、溶液中において、Zn²⁺との錯体形成に関わるピリドン環がケト-エノール互変異性化することから、Zn²⁺との結合に関与しない異性体の存在によりZn²⁺に対して十分な親和性を得られていないことが推察された。細胞内において微量に存在するZn²⁺を検出するには、さらにZn²⁺への親和性の高い(K_d の低い)化合物の開発は必須である。そこで、

Zn²⁺との錯体形成部位の互変異性化を抑えた亜鉛蛍光プローブとして、第一級アミンまたは第二級アミンの導入によりピピリジン型とした誘導体を設計・合成したところ、溶解性や大きなストークスシフト等の性質は保持したままで、Zn²⁺に対する親和性はnMレベルまでに向上した²⁵。第一級アミンを導入した化合物7においては、Zn²⁺との錯体形成後の蛍光波長は40 nm程度長波長側にシフトし、波長変化型蛍光プローブとしての性質を示した。波長変化型の蛍光プローブは、Zn²⁺との反応に起因する蛍光変化をバックグラウンドとは異なる波長域での検出が可能になるため高感度の測定が期待できる。筆者らはこの蛍光プローブを用いてマウスマクロファージ様細胞におけるZn²⁺のイメージング測定を行い、市販の蛍光プローブよりもZn²⁺を高感度に測定できることを明らかにしている²⁵。

2. 亜鉛蛍光プローブの応用

蛍光プローブの開発における細胞実験では、細胞の外部からZn²⁺を加えることによって、実際に亜鉛蛍光プローブとして機能するか検討してきた。しかしながら、本研究の目的は内在性のZn²⁺の可視化である。亜鉛はがん細胞のアポトーシス制御に密接に関与しており、アポトーシスにおいて、細胞内の遊離亜鉛濃度が上昇することが報告されている²⁶。そこで、過酸化水素によりアポトーシスを誘導したヒト肺癌細胞株 A549に

図3 ヒト肺癌由来細胞(A549)におけるアポトーシス誘導後の細胞内遊離 Zn²⁺の検出

- (a)ピピリジン型プローブ7のみを加えた細胞
(b)100 μM H₂O₂を加えて25時間インキュベートしてアポトーシスを誘導した後にピピリジン型プローブ7を加えた細胞
(c)(b)の後に、さらに100 μM TPENを加えた細胞

において、ピピリジン型亜鉛蛍光プローブ7を用いて内在性のZn²⁺を検出できるか検討を行ったところ、過酸化水素処理したがん細胞でのみ蛍光の増強が認められた。また、亜鉛キレート剤であるTPEN (*N,N,N',N'*-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine)の処理によって細胞内の蛍光が消失したことから、開発した蛍光プローブは細胞内Zn²⁺を特異的に認識して蛍光を発現していることが明らかとなった(図3)。

亜鉛の動態や機能は、分子レベルから細胞レベル、さらには組織レベルからの解明が必要である。従来、組織における亜鉛の動態や機能は、組織の凍結切片やパラフィン切片を用いて行われており、脳の神経系や膝ランゲルハンス島等にZn²⁺が局在していることが明らかとなっている²⁷⁻²⁹。近年、厚みのある組織をそのままの形状で観察できる組織透明化技術が開発され、蛍光色素と共焦点レーザー顕微鏡とを組み合わせることによって、対象を3次的にイメージングすることが可能になり網羅的、空間的な解析が行われている³⁰。筆者らは、開発した亜鉛蛍光プローブの組織透明化法への応用として、脳内のZn²⁺のイメージングを行った。透明化試薬としては界面活性剤の濃度の低いScaleSを用い³¹、波長変化型のピピリジン型亜鉛蛍光プローブとともに脳を浸漬したのちに、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。そ

の結果、脳の神経細胞の細胞体では蛍光が見られず、細胞体から伸びた神経終末付近において蛍光が観察された。脳内において、Zn²⁺はグルタミン酸作動性神経終末の小胞に存在し、そこから放出されることが明らかとなっており、本結果はこれと一致するものであった。しかしながら、亜鉛蛍光プローブの組織透明化法への応用としては途上であり、今後も検討を重ね、最適な条件等を検討していく必要がある。

おわりに

亜鉛の動態や機能の視覚的な解析を可能にする蛍光プローブの開発を目的に、蛍光団とZn²⁺反応部位の2つの機能をもつ分子骨格に着目して低分子量亜鉛蛍光プローブを開発した。低分子量にすることにより、高い細胞膜透過性が期待でき、また、官能基の導入によって蛍光のオン-オフ制御やZn²⁺に対する親和性の向上等が可能であった。さらに、開発した亜鉛蛍光プローブを用いて、細胞内の遊離亜鉛イオンの検出が可能であり、組織透明化法への応用の可能性が示された。今後、本亜鉛蛍光プローブを用いたイメージング測定による生体内亜鉛の動態や機能の解明を期待するとともに、蛍光波長の長波長化等を目指した蛍光プローブの開発を進めていく予定である。

謝 辞

本研究の一部は、平成 25 - 27 年度財団法人サントリー生物有機化学研究所 研究助成 (SUMBOR GRNT)、平成 28 年度財団法人コニカミノルタ画像科学振興財団奨励賞研究費の助成を受けて行いました。



◆萩森政頼略歴

2001 年	長崎大学薬学部卒業
2003 年	京都大学大学院薬学研究科 修士課程修了 万有製薬株式会社 (現 MSD) 研究員
2006 年	長崎国際大学薬学部 助手・助教
2011 年	博士 (薬学) 京都大学
2012 年	神戸薬科大学 講師
2016 年	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 准教授

◆文 献

- 1) Maret W : Zinc biochemistry: from a single zinc enzyme to a key element of life. *Adv Nutr* 4 : 82, 2013
- 2) Prasad AS : Zinc in human health: effect of zinc on immune cells. *Mol Med* 14 : 353, 2008
- 3) Hojyo S, Fukada T : Roles of zinc signaling in the immune system. *J Immunol Res* 2016 : 6762343, 2016
- 4) Pochwat B, et al : Relationship between zinc (Zn^{2+}) and glutamate receptors in the processes underlying neurodegeneration. *Neural Plast* 2015 : 591563, 2015
- 5) Takeda A : Insight into glutamate excitotoxicity from synaptic zinc homeostasis. *Int J Alzheimers Dis* 2011 : 491597, 2011
- 6) 萩森政頼, 佐治英郎 : イメージングによる生体内微量元素の分析. *Biol Trace Elem Res* 23 : 221, 2012
- 7) Jiang P, Guo Z : Fluorescent detection of zinc in biological systems: recent development on the design of chemosensors and biosensors. *Coord Chem Rev* 248 : 205, 2004
- 8) Nolan EM, et al : Synthesis and characterization of zinc sensors based on a monosubstituted fluorescein platform. *Inorg Chem* 43 : 2624, 2004
- 9) Reyes JG, et al : A fluorescence method to determine picomole amounts of Zn(II) in biological systems. *Biol Res* 27 : 49, 1994
- 10) Meeusen JW, et al : TSQ (6-methoxy-8-p-toluenesulfonamido-quinoline), a common fluorescent sensor for cellular zinc, images zinc proteins. *Inorg Chem* 50 : 7563, 2011
- 11) Coyle, P, et al : Measurement of zinc in hepatocytes by using a fluorescent probe, zinquin: relationship to metallothionein and intracellular zinc. *Biochem J* 303 : 781, 1993
- 12) Rudolf E, et al : Zinc has ambiguous effects on chromium (VI)-induced oxidative stress and apoptosis. *J Trace Elem Med Biol* 18 : 251, 2005
- 13) Chang CJ, et al : Bright fluorescent chemosensor platforms for imaging endogenous pools of neuronal zinc. *Chem Biol* 11 : 203, 2004
- 14) Lipinski CA : Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J Pharmacol Toxicol Methods* 44 : 235, 2000
- 15) Mizuyama N, et al : Synthesis and steady-state spectroscopic study of 5-aryl-2,2'-bipyridyls. New fluorescent compounds in solid state. *Bull Chem Soc Jpn* 79 : 602, 2006
- 16) Mizuyama N, et al : Synthesis and fluorescence of 4-methylsulfanyl-6-pyridyl-2H-pyran-2-ones in solid state. *Heterocycles* 71 : 399, 2007
- 17) Hagimori M, et al : Novel synthesis of 4H-quinolizine derivatives using sulfonyl ketene dithioacetals. *Eur J Org Chem* 2009 : 5847, 2009
- 18) Hagimori M, et al : Synthesis of fluorescent pyrrolo[3,4-b]quinolizine derivatives and evaluation as a protein-labeling probe. *Heterocycles* 83 : 1983, 2011
- 19) Hagimori M, et al : Synthesis of 6-(4-diethylamino)-phenyl-2-oxo-2H-pyran-3-carbonitrile derivatives and their fluorescence in solid state and in solutions. *Dyes Pigm* 92 : 1069, 2012
- 20) Shigmitsu Y, et al : Theoretical interpretations of electronic and fluorescence spectra of new 2(1H)-pyridone derivatives in solution and solid state. *Dyes Pigm* 99 : 940, 2013
- 21) Hagimori M, et al : 2-Pyridone-based fluorophores containing 4-dialkylamino-phenyl group : Synthesis and fluorescence properties in solutions and in solid state. *Dyes Pigm* 124 : 196, 2016
- 22) Hagimori M, et al : A novel small molecule fluorescent sensor for Zn^{2+} based on pyridine-pyridone scaffold. *Talanta* 83 : 1730, 2011
- 23) Hagimori M, et al : Fluorescence ON/OFF switching Zn^{2+} sensor based on pyridine-pyridone scaffold. *Sens Act B* 181 : 823, 2013
- 24) Hagimori M, et al : A low-molecular-weight fluorescent sensor with Zn^{2+} dependent bathochromic shift of emission wavelength and its imaging in living cells. *Dyes Pigm* 103 : 205, 2015
- 25) Hagimori M, et al : A high-affinity fluorescent Zn^{2+} sensor improved by the suppression of pyridine-pyridone tautomerism and its application in living cells. *Sens Act B* 213 : 45, 2015
- 26) Franklin RB, Costello LC : The important role of the apoptotic effects of zinc in the development of cancers. *J Cell Biochem* 106 : 750, 2009
- 27) Suh SW, et al : Release of synaptic zinc is substantially depressed by conventional brain slice preparations. *Brain Res* 879 : 7, 2000
- 28) Wagner GF, McKeown BA, Popham DJ : The autoradiographic localization of zinc within the pancreatic islets of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Histochemistry* 72 : 113, 1981
- 29) Baskin DG : A historical perspective on the identification of cell types in pancreatic islets of langerhans by staining and histochemical techniques. *J Histochem Cytochem* 63 : 543, 2015
- 30) Richardson DS, Lichtman JW : Clarifying tissue clearing. *Cell* 162 : 246, 2015
- 31) Hama H, et al : ScaleS : an optical clearing palette for biological imaging. *Nat Neurosci*, 18 : 1518, 2015

Development and application of fluorescent probes for Zn^{2+}

Masayori Hagimori¹⁾, Naoko Mizuyama²⁾, Koki Ogawa¹⁾, Shigeru Kawakami¹⁾, Takahiro Mukai³⁾, Hideo Saji⁴⁾

- 1) Department of Pharmaceutical Informatics, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
- 2) Clinical Research Center, Nagasaki University Hospital
- 3) Department of Biophysical Chemistry, Kobe Pharmaceutical University
- 4) Department of Patho-Functional Bioanalysis, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

Zn^{2+} is known to play important roles in biological processes. To investigate physiological roles of Zn^{2+} , a variety of fluorescent probes has been developed recently. Most of the fluorescent Zn^{2+} probes possess a fluorescent core and a separate part for binding to Zn^{2+} within the molecule, so that the molecules are hydrophobic and the molecular weight is usually large. In this paper, we described novel low-molecular-weight fluorescent Zn^{2+} probes based on pyridine-pyridone structure. Modification of pyridine-pyridone core structure brought about a marked improvement such as aqueous solubility, affinity toward Zn^{2+} , and fluorescence ON/OFF switching. Fluorescence images of Zn^{2+} in A549 cells indicated that novel fluorescent Zn^{2+} probes could be used to image endogenous Zn^{2+} . We also assessed the application of fluorescent Zn^{2+} probes to tissue clearing techniques.

Keyword : Fluorescent probe, Imaging, Zn^{2+} , Low-molecular-weight, Cell permeability

Address for correspondence

M Hagimori, Department of Pharmaceutical Informatics, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University, 1-7-1 Sakamoto, Nagasaki 852-8501, Japan

E-mail address

Masayori Hagimori :	hagimori@nagasaki-u.ac.jp
Naoko Mizuyama :	uzty7bg@gmail.com
Koki Ogawa :	k.ogawa.nagasaki.u@gmail.com
Shigeru Kawakami :	skawakam@nagasaki-u.ac.jp
Takahiro Mukai :	tmukai@kobepharm-u.ac.jp
Hideo Saji :	hsaji@pharm.kyoto-u.ac.jp