

# 亜鉛触媒反応を応用した細胞内 亜鉛イオンの高感度検出プローブの開発

高嶋一平・高木 晃・奥田健介・

●神戸薬科大学薬化学研究室

## 要 約

生体内で亜鉛は酵素や転写因子の補因子として機能するだけでなく、肥満細胞や脾β細胞、神経細胞のシグナル活動でみられるように遊離した状態の亜鉛イオンがシグナル伝達物質としても機能する。このような亜鉛の挙動の解析は亜鉛が関わる生体内機能の解明において必須であり、特にリアルタイムかつ簡便に解析可能な蛍光プローブが有用と考えられてきた。しかし、開発されてきたこれらの分子は亜鉛が配位すると蛍光応答する配位型の蛍光プローブ分子であり、試験管内では数十倍もの蛍光増強を示す一方で、細胞内では高濃度で存在するグルタチオン等に亜鉛が奪われて蛍光応答変化が著しく小さくなってしまう。本論文で筆者らは、1原子の亜鉛が触媒回転しながら多数の分子と反応することで蛍光シグナルを増強できる新たなプローブ分子を紹介する。本分子はセフェム骨格に亜鉛のリガンド分子を導入しており、亜鉛の触媒反応で生じる連続した電子移動によって消光状態の色素が放出されて発蛍光する。また同時に、残った分子骨格も細かく分解されるために、放出された亜鉛がリサイクルされて別の分子と反応していく。本分子の亜鉛検出能は、細胞内濃度でのグルタチオン存在下でも影響は少なく、亜鉛添加前に比べて40倍以上の大きな蛍光強度変化で感度良く亜鉛を検出可能であった。生細胞系においても従来の蛍光プローブに比べて優れた感度で低濃度域の細胞内亜鉛を検出可能であり、本分子設計が高感度蛍光検出プローブの創製において有用であることを示せた。

KEY WORDS 遊離亜鉛、蛍光プローブ、シグナル増強、セフェム骨格

## 1 はじめに

生体内で亜鉛は必須元素であり、また鉄に次いで豊富に存在する微量金属として知られる。亜鉛は多くの酵素や転写因子の補因子としてタンパク質の構造や機能を維持している。また近年では、遊離した亜鉛イオンはマスト細胞<sup>1)</sup>や脾β細胞<sup>2)</sup>でのシグナル伝達や神経細胞間でのコミュニケーション<sup>3)</sup>に関わるシグナル伝達物質として機能することが報告してきた。これら亜鉛の機能解明において生体中での亜鉛の挙動解析は必須であり、解析ツールの一つとして、生体内的亜鉛を非侵襲的にリアルタイムで解析可能な蛍光プローブが報告

されている。遡れば1960年代には既にキノリン型化合物で亜鉛の蛍光プローブが報告されており<sup>4)</sup>、1980年代にはキノリン型化合物TSQを用いて生体内での亜鉛イメージングに成功した<sup>5)</sup>。その後に、キノリン型化合物以外にもZinpyr-1<sup>6)</sup>、ZnAF-2<sup>7)</sup>といった長波長励起の蛍光プローブが開発されており、現在世界中で用いられている。

ところでこれら蛍光プローブはすべて「配位型」の蛍光プローブ分子である(図1a)。配位型分子は基本的に1:1の化学量論比で亜鉛と錯形成したときに蛍光変化する分子であり、周囲の環境や亜鉛キレーター分子の存在が検出感度に大きく影響する。たとえば細胞内の夾雑な環境ではグルタチオンが1~10 mM存在するので、これら配位型

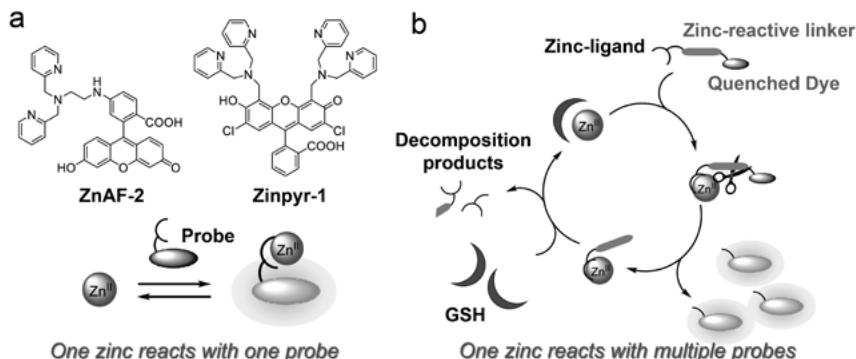


図1 従来の「配位型」と新規概念である「反応型」における亜鉛の検出機構

- a) 配位型蛍光プローブの構造式と亜鉛イオン ( $Zn^{II}$ ) 検出機構の概念図.  
 b) 反応型蛍光プローブの  $Zn^{II}$  検出機構の概念図 (GSH : グルタチオン).

の蛍光プローブは試験管内では数十倍の蛍光強度変化を生じても細胞内では数倍の蛍光変化しか示さない<sup>8)</sup>.

このような背景を踏まえて、本論文では新たに「反応型」の蛍光プローブ分子を紹介する(図1b)<sup>9)</sup>. 本分子は亜鉛と配位することにより亜鉛の触媒反応が進行する結果、消光した色素を切り離して蛍光発光する. さらに分子骨格は細かく分解して、放出された亜鉛が他のプローブ分子に反応することを繰り返すことによってシグナルが増強されることが示された. 本分子を用いたところ、細胞内亜鉛の高感度な蛍光検出に成功したので本論文で合わせて紹介したい.

## 2 分子設計

筆者らは以前に亜鉛の配位水が低い  $pK_a$  (~7) と高い求核性を持っていることを応用した蛍光プローブを開発してきた<sup>10)</sup>. また亜鉛の配位水は多様な酵素で用いられており、その一つとして *B. cereus* 由来の  $\beta$ -lactamase (Ambler-class B, Bush-group 3) が挙げられる<sup>11)</sup>. 本酵素は活性中心にある亜鉛の配位水によって  $\beta$ -ラクタム型抗

生物質の加水分解を行う(図2a). 一方で  $\beta$ -ラクタム構造を含むセフェム骨格は、病原性細菌に対する蛍光プローブの分子骨格として既に用いられている. 本システムでは  $\beta$ -ラクタマーゼによりプローブの開環反応が進行することに伴って消光した色素が放出されて発蛍光する<sup>12)</sup>. これらの知見を組み合わせて、筆者らはセフェム骨格の7位に亜鉛の結合部位を導入すれば、配位した亜鉛の配位水による  $\beta$ -ラクタムの加水分解反応を糸口とした蛍光検出機構を開発できるのではないかと着想した(図2b).

## 3 本分子による亜鉛検出能の評価

設計した分子 Dpa-SoxLC は図3a に記載の合成スキームに従って計8工程、総収率21%で容易に大量合成できた. 合成した分子の亜鉛検出能の評価結果を図3b, 3c に示す. 本分子は塩化亜鉛の添加に伴って約50倍近い蛍光強度の変化を示すことが確認された(図3b). 一方でコバルトに若干の非特異応答を示すものの、他の金属イオンには蛍光応答を示さず、亜鉛を選択的に検出可能であることが判明した(図3c).

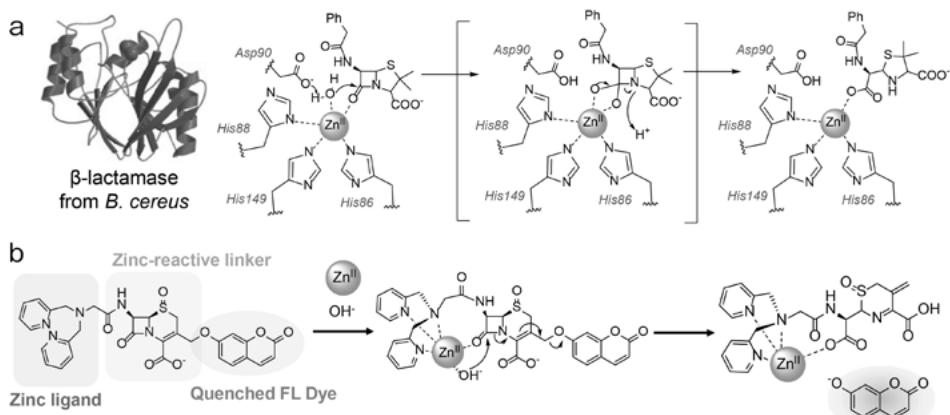


図2 本研究で活用した亜鉛による触媒反応  
ならびに亜鉛を蛍光検出するプローブの分子設計

- a) 予想される $\beta$ -lactamaseにおける $Zn^{II}$ の触媒反応を用いたペニシリンGの分解機構<sup>11)</sup>.  
b) 本研究で設計した蛍光プローブによる $Zn^{II}$ 検出で予想される検出機構.

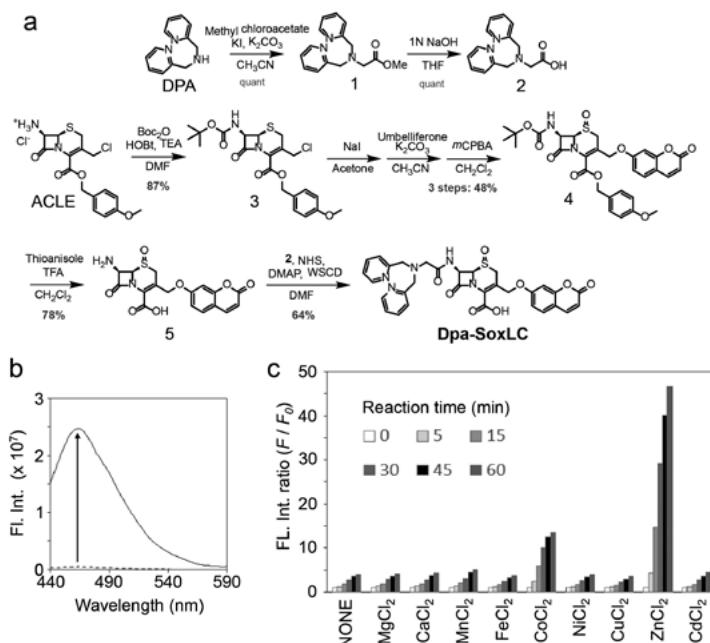


図3 蛍光プローブの合成スキームと試験管内での評価

- a) Dpa-SoxLCの合成スキーム.  
b) 10 μM Dpa-SoxLCに10 μM  $ZnCl_2$ を添加した際の蛍光スペクトル変化  
(点線: 添加前, 実線: 添加1時間後).  
c) 10 μM Dpa-SoxLCにそれぞれ10 μM(または500 μM)  $MgCl_2$ , 2 mM  
 $CaCl_2$ を添加した際の蛍光強度変化( $\lambda_{ex} = 390$  nm,  $\lambda_{em} = 470$  nm), 50  
mM HEPES buffer(pH 7.4), 2 mM グルタチオン, 1% (v/v) DMSO.

次に本分子の亜鉛検出機構を検討するために、少量の亜鉛に対して蛍光プローブを過剰に添加する実験を行った(図4a, b)。配位型の蛍光プローブZnAF-2では亜鉛と配位した錯体の状態でのみ蛍光変化するために、亜鉛の濃度に対して大過剰にプローブ分子を添加しても蛍光強度は飽和して、亜鉛の濃度に依存した限界が見られる(図4a)。しかし、Dpa-SoxLCでは1原子の亜鉛が複数のプローブ分子と反応して蛍光変化をするために、ZnAF-2の際に見られた蛍光強度の飽和は認められずにプローブ分子を添加するほど蛍光強度が増加する様子が確認された(図4b)。本実験においては亜鉛1原子あたりDpa-SoxLCは4.5分子反応していることが蛍光強度から算出された。さらにHPLCによる反応追跡を行ったところ、Dpa-SoxLC(保持時間34分でのフラクション:f34)は亜鉛との反応ののちにウンベリフェロン(f35)を放出すると同時に、分子骨格が細かく分解された破片(f16, f29)を生成することが確認された(図4c)。

以上の結果として、Dpa-SoxLCの亜鉛検出機

構は図4dに示すように予測している。すなわち亜鉛がDpa-SoxLCに配位すると、亜鉛の配位水による加水分解が進行してβラクタム構造が開環し、続く電子移動を介して消光された色素(ウンベリフェロン:umbelliferone)が放出されて発蛍光する。残った分子骨格は細かく分解されることによって亜鉛が放出され、また別の分子と反応することを繰り返すことでシグナルが増強される。ミカエリス・メンテン式での速度論パラメータを算出すると、 $K_m = 6.73 \mu\text{M}$ ,  $V_{max} = 8.65 \times 10^{-3} \mu\text{M s}^{-1}$ であった。

#### 4 既存の蛍光プローブとの比較評価

次に配位型の蛍光プローブとしてZinpyr-1やZnAF-2、また近年になって開発された反応型の蛍光プローブAc-CM1<sup>13)</sup>とDpa-SoxLCとの亜鉛検出能の比較評価を行った(図5a, b)。配位型の蛍光プローブであるZinpyr-1やZnAF-2では

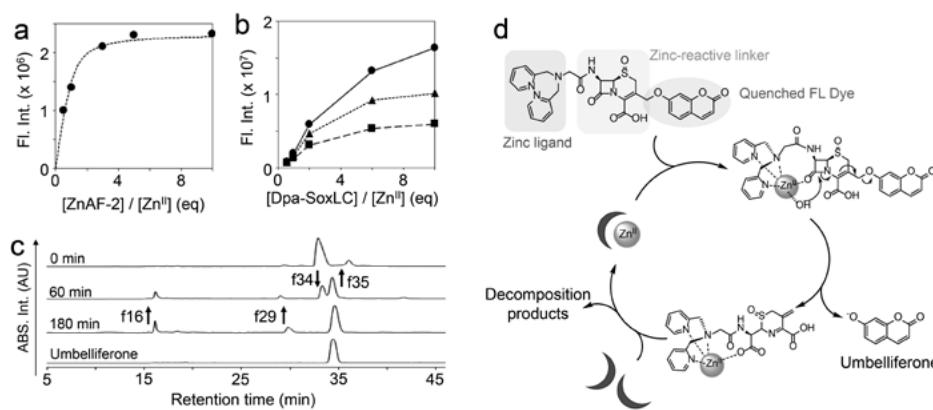


図4 蛍光プローブの検出機構の検討

- a) 1 μM ZnCl<sub>2</sub>の添加後5分での0.5–10 μM ZnAF-2の蛍光強度変化( $\lambda_{ex} = 480 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 610 \text{ nm}$ )。
- b) 5 μM ZnCl<sub>2</sub>の添加後30分(■), 60分(▲), 120分(●)での3–50 μM Dpa-SoxLCの蛍光強度変化( $\lambda_{ex} = 390 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 535 \text{ nm}$ )。
- c) HPLCクロマトグラムでの反応解析( $\lambda_{abs} = 220 \text{ nm}$ )、本反応では1.4 mM Dpa-SoxLC, 1.4 mM ZnCl<sub>2</sub>を50 mM HEPES buffer(2.5% CH<sub>3</sub>CN, pH 7.4)中で36°Cにて反応し、1時間後、3時間後に解析。
- d) 予想されるDpa-SoxLCでの亜鉛触媒反応機構。

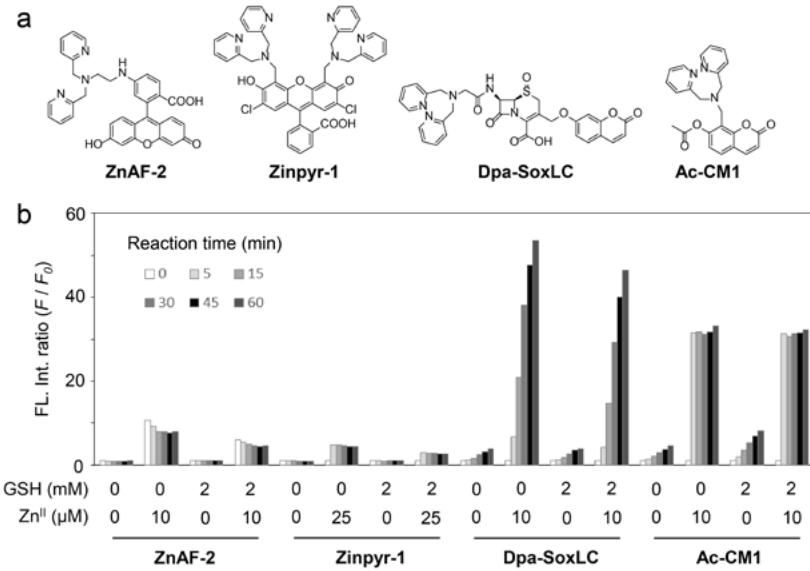


図 5 従来の亜鉛プローブ分子との比較評価

- a) ZnAF-2, Zinpyr-1, Dpa-SoxLC, Ac-CM1の構造式.  
 b) 蛍光強度変化 (ZnAF-2:  $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ , Zinpyr-1:  $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 630 \text{ nm}$ , Dpa-SoxLC:  $\lambda_{\text{ex}} = 390 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$ , Ac-CM1:  $\lambda_{\text{ex}} = 390 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$ ), [probe] = 10  $\mu\text{M}$ , 50 mM HEPES buffer (pH 7.4), 1% (v/v) DMSO.

亜鉛添加の際の蛍光増強変化 ( $F/F_0$ ;  $F_0$ は亜鉛添加前の蛍光強度,  $F$ は亜鉛添加後の蛍光強度) が10に満たず小さい上に、グルタチオンによりこの蛍光増強は半減した。検出限界(detection limit: DL)を求めたところ、グルタチオンが無添加の場合にZnAF-2では16 nM, Zinpyr-1では135 nMと比較的良好な検出限界を示したが、2 mMのグルタチオン存在下ではそれぞれDLは191 nM (ZnAF-2) と585 nM (Zinpyr-1) であり、検出感度が大きく低下することが確認された。一方で、反応型の蛍光プローブであるDpa-SoxLCやAcCM-1では亜鉛添加時の蛍光増強変化 ( $F/F_0$ ) が比較的高く、Dpa-SoxLCでは53, Ac-CM1では33であり、グルタチオン存在下でもこの蛍光変化はほとんど維持されていた。またDLを算出したところ、グルタチオンが無添加の場合にはDLがそれぞれ8.0 nM (Dpa-SoxLC) と14 nM (Ac-CM1) であり配位型の蛍光プローブを凌ぐ優れた

検出感度を持っていることが明らかとなった。その上、2 mMのグルタチオン存在下においてDLはそれぞれ30 nM (Dpa-SoxLC) と25 nM (Ac-CM1) となり、配位型の蛍光プローブと異なり検出感度はさほど損なわれていないことが判明し、グルタチオンが高濃度に存在する細胞内環境においても良好な検出感度を維持することが期待された。

Dpa-SoxLCとAc-CM1とを比較すると、Ac-CM1ではコバルトや鉄への非特異的な蛍光応答を有するが、Dpa-SoxLCではコバルトへの非特異的な蛍光応答が見られるものの鉄への蛍光応答は見られない結果であり、金属イオン選択性はDpa-SoxLCが優れていた。加えて、亜鉛非存在下での蛍光変化を測定するとAc-CM1ではグルタチオン存在下でプローブの分解が促進されて蛍光上昇が見られる一方で、Dpa-SoxLCではグルタチオン存在下でもAc-CM1に比べて比較的分解

は抑えられていた。この結果より、細胞内でのプローブの分解に伴う背景光の増大が引き起こす  $s/n$  比の低下は Ac-CM1 のほうが Dpa-SoxLC よりも深刻であると考えられ、ほかの蛍光プローブに比して生細胞亜鉛イメージングにおける Dpa-SoxLC の優位性が大いに期待された。

## 5 細胞内亜鉛の蛍光検出について

本システムを細胞内亜鉛の検出に応用する上で

は Dpa-SoxLC の細胞膜透過性が乏しい点が問題となつた。そこで筆者らは Dpa-SoxLC の誘導体を複数合成し、生細胞イメージングで最も蛍光応答性の高い Dpa-LBC を見出した（図 6a）。本分子は、細胞内移行したのちに細胞内エ斯特ラーゼによる作用を受けて Dpa-LC へと変換され、水溶性の向上により細胞膜透過性を失つて細胞内に滞留する。別途 Dpa-LC は Dpa-SoxLC と同等の亜鉛検出能を有することも試験管内の評価によって確認した。

Dpa-LBC の細胞毒性は、HeLa 細胞を用いたと

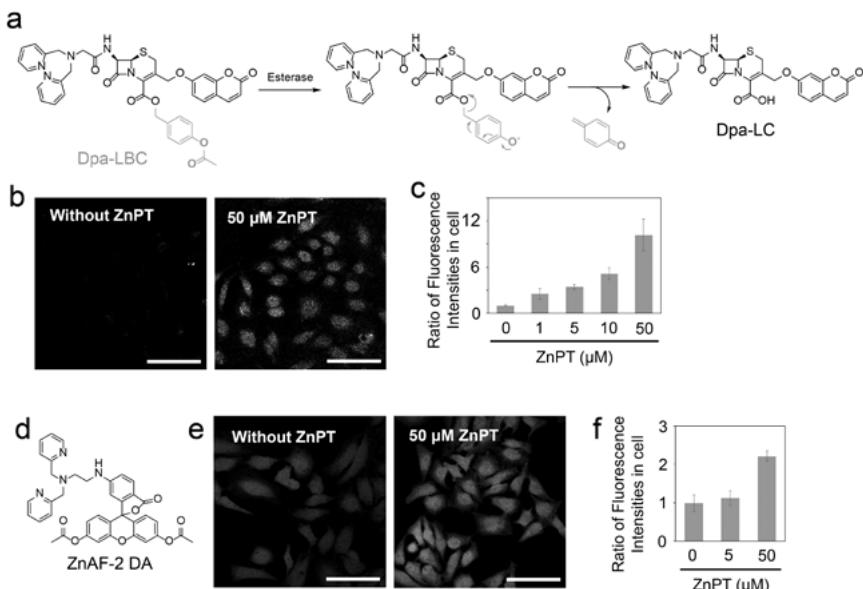


図 6 蛍光プローブを用いた細胞内亜鉛の蛍光検出

- a) 細胞膜透過性を有する Dpa-LBC ならびに細胞内エ斯特ラーゼによる代謝反応の結果生じる Dpa-LC の構造式。
- b) 3 μM Dpa-LBC で染色した HeLa 細胞の蛍光顕微鏡画像 ( $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 420\text{--}530 \text{ nm}$ )，左：Zn非添加，右：50 μM ZnPT 添加。
- c) 3 μM Dpa-LBC で染色した HeLa 細胞に各濃度での ZnPT を作用した際の蛍光強度比 ( $n=5$ , エラーバー：標準偏差)。
- d) 細胞膜透過性を有する ZnAF-2 DA の構造式。
- e) 3 μM ZnAF-2 DA で染色した HeLa 細胞の蛍光顕微鏡画像 ( $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 510\text{--}630 \text{ nm}$ )，左：Zn非添加，右：50 μM ZnPT 添加。
- f) 3 μM ZnAF-2 DA で染色した HeLa 細胞に各濃度での ZnPT を作用した際の蛍光強度比 ( $n=5$ , エラーバー：標準偏差)。スケールバー：100 μm.

ころ  $15 \mu\text{M}$  から顕著に表れることが WST-8 アッセイによる評価で確認された。そこでまず HeLa 細胞の培地中に Dpa-LBC を  $3 \mu\text{M}$  にて添加した。次に亜鉛の細胞内導入剤として亜鉛・ピリチオン錯体 (ZnPT) を  $50 \mu\text{M}$  にて培地中に添加したところ、共焦点蛍光顕微鏡による観察において Dpa-LBC 由来の蛍光強度は 10 倍以上の増強変化を示した (図 6b, c)。さらに ZnPT の培地中濃度を  $1 \mu\text{M}$  まで減らしても 3 倍以上の蛍光強度変化で有意に亜鉛を検出可能であった (図 6c)。加えて、比較のために配位型の蛍光プローブ ZnAF-2 DA (細胞膜透過性を有する ZnAF-2 誘導体、図 6d) を添加した条件での細胞内亜鉛の検出能を評価した。その結果、ZnPT を  $50 \mu\text{M}$  にて添加した場合には共焦点蛍光顕微鏡による観察において、わずかに約 2 倍程度の蛍光強度の増強を示す結果であり (図 6e, f)，さらに ZnPT を  $5 \mu\text{M}$  にまで減らした場合には有意な蛍光強度変化は確認できなかった (図 6f)。以上の結果から、Dpa-LBC は既存の ZnAF-2 DA と比べて細胞内亜鉛の検出感度において優れた蛍光プローブであることが明らかとなった。

## 6 考察

すでに亜鉛の蛍光イメージングを活用することでマスト細胞での亜鉛ウェーブ (zinc wave)<sup>1)</sup> や卵細胞での亜鉛スパーク (zinc spark)<sup>14)</sup> を解析できることが報告されている。一方で、これらの現象で関与する分泌顆粒内の亜鉛濃度は数百  $\mu\text{M}$  であることから、これらの現象での細胞内濃度域

は比較的高いことが予想される<sup>15)</sup>。筆者らは亜鉛がシグナル伝播していく際に末端ではこれまでに考えられているよりもさらに低い濃度で作用する領域が存在するのではないかと予想している。このような低濃度域での亜鉛の有する生体内機能を解析する上で、感度の面で有利な反応型の蛍光プローブは有力な解析ツールとなりうる。

本研究で示したように反応型の蛍光プローブは配位型に比べてはるかに大きい蛍光増強変化を示し、検出限界も優れた特長を有している。加えて亜鉛が触媒回転しながらシグナル増強するシステムを改良することでさらなる高感度化も期待できる。本分子で蛍光色素部位として用いているウンベリフェロンは他の蛍光色素部位に自在に変換可能であり、著者らが確立したシステムに立脚して亜鉛のマルチカラーイメージングが達成できる。特に生体内透過性に優れる近赤外蛍光色素に変換したプローブでは、通常の蛍光色素でしばしば問題となる自家蛍光を回避したさらなる高感度化を伴ったうえで、生体深部での亜鉛イメージングが可能となる。また、亜鉛に対する応答速度の改善も配位子部位の構造の調整を行うことにより見込める。現在これらの点に関する研究を更に進めており、近い将来に当研究会で研究成果を報告する機会をいただけることを楽しみにしている。

## 謝辞

本総説論文の図表の一部は英国王立化学会から出版されている Chemical Communications 誌での発表論文 (doi: 10.1039/d0cc05315e, ref. 9) から複製しているものとなります。

## 文 献

- 1) Yamasaki S, Hasegawa A, Hojyo S, et al. A Novel Role of the L-Type Calcium Channel  $\alpha_{1D}$  Subunit as a Gatekeeper for Intracellular Zinc Signaling: Zinc Wave. *PLoS One* 7 : e39654, 2012
- 2) Li YV. Zinc and insulin in pancreatic beta-cells. *Endocrine* 45 : 178-189, 2014
- 3) Frederickson CJ, Koh J-Y, Bush AI. The neurobiology of zinc in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 6 : 449-462, 2005
- 4) Jensen RE, Rflaum RT. Fluorometric Determination of Zinc. *Anal Chem* 38 : 1268-1269, 1966
- 5) Frederickson CJ, Pérez-Clausell J, Danscher G. Zinc-containing 7S-NGF Complex. Evidence From Zinc Histochemistry for Localization in Salivary Secretory Granules, *J Histochem Cytochem* 35 : 579-583, 1987
- 6) Walkup GK, Burdette SC, Lippard SJ, et al. A New Cell-Permeable Fluorescent Probe for  $Zn^{2+}$ . *J Am Chem Soc* 122 : 5644-5645, 2000
- 7) Hirano T, Kikuchi K, Urano Y, et al. Improvement and Biological Applications of Fluorescent Probes for Zinc, ZnAFs. *J Am Chem Soc* 124 : 6555-6562, 2002
- 8) Sfrazzetto GT, Satriano C, Tomaselli GA, et al. Synthetic fluorescent probes to map metallostasis and intracellular fate of zinc and copper. *Coord Chem Rev* 311 : 125-167, 2016
- 9) Takashima I, Inoue Y, Matsumoto N, et al. A fluorogenic probe using a catalytic reaction for the detection of trace intracellular zinc. *Chem Commun* 56 : 13327-13330, 2020.
- 10) Ojida A, Takashima I, Kohira T, et al. Turn-on Fluorescence Sensing of Nucleoside Polyphosphates Using a Xanthene-Based Zn(II) Complex Chemosensor. *J Am Chem Soc* 130 : 12095-12101, 2008
- 11) Wang Z, Fast W, Valentine AM, et al. Metallo- $\beta$ -lactamase: structure and mechanism, *Curr Opin Chem Biol* 3 : 614-622, 1999
- 12) Xie H, Mire J, Kong Y, et al. Rapid point-of-care detection of the tuberculosis pathogen using a BlaC-specific fluorogenic probe. *Nat Chem* 4 : 802-809, 2012
- 13) Zastrow ML, Radford RJ, Chyan W, et al. Reaction-Based Probes for Imaging Mobile Zinc in Live Cells and Tissues. *ACS Sens* 1 : 32-39, 2016
- 14) Kim AM, Bernhardt ML, Kong BY, et al. Zinc Sparks Are Triggered by Fertilization and Facilitate Cell Cycle Resumption in Mammalian Eggs. *ACS Chem Biol* 6 : 716-723, 2011
- 15) Chabosseau P, Woodier J, Cheung R, et al. Sensors for measuring subcellular zinc pools. *Metallomics* 10 : 229-239, 2018

## Development of a sensitive fluorescent probe detecting intracellular zinc through zinc-catalyzed hydrolysis

Ippei Takashima, Akira Takagi, and Kensuke Okuda\*

Laboratory of Bioorganic & Natural Products Chemistry, Kobe Pharmaceutical University

Intracellular zinc functions not only as an enzyme co-factor but also as a signal mediator in its labile form. The analyses of zinc-concentrations are essential to understanding the signaling pathways and cellular functions related to fluctuations in labile zinc. Fluorescent probes give real-time imaging of zinc localization and have proved to be useful for the study of zinc-related cellular events. Existing zinc probes are “recognition-based” probes, which brightly fluoresce in a 1:1 stoichiometric manner with zinc *in vitro*. However, the fluorescence response of these probes diminished dramatically *in cell* because intracellular chelators such as abundant glutathione and metallothionein interfere with zinc coordination. Here we report a “reaction-based” probe for fluorescent detection of zinc. In this system, one zinc ion acts as a catalyst to react with many probe units, leading to a stark increase in signal similar to those observed in amplification systems. The cellular experiments indicated that this probe has high sensitivity to monitor trace of zinc with a large fluorescence increase even in a complex intracellular environment. This system may be useful for the detection of intracellular zinc which may be involved in signaling pathways at low concentrations.

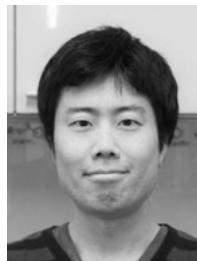
**Keyword:** Labile zinc, fluorescent probe, signal amplification, cephem scaffold

*Address for correspondence*

Laboratory of Bioorganic & Natural Products Chemistry, Kobe Pharmaceutical University,  
4-19-1 Motoyama-kita, Higashinada, Kobe 658-8558 Japan.  
E-mail address: okuda@kobepharma-u.ac.jp

■ 高嶋一平 略歴

2006 年 ● 京都大学工学部 卒業  
2008 年 ● 京都大学大学院工学研究科修士課程 修了  
東レ株式会社 総合職 I  
2015 年 ● 九州大学薬学府  
博士課程 中途退学,  
博士号取得  
京都大学化学研究所／  
iCeMS 研究員  
2018 年 ● ノースカロライナ州立大学化学科 研究員  
2019 年 ● 神戸薬科大学薬化学研究室 特任助教



■ 奥田健介 略歴

1994 年 ● 東京大学薬学部 卒業  
1996 年 ● 東京大学大学院薬学研究科修士課程 修了  
1998 年 ● 東京大学大学院薬学系研究科博士課程 中途退学  
岡山大学薬学部薬化学講座 助手  
2001 年 ● 博士（薬学）東京大学  
2002 年 ● Yale大学 molecular biophysics and biochemistry 学科  
博士研究員（兼任）（～2004 年）  
2007 年 ● 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科  
医薬品開発科学講座 医薬化学分野 助教  
2008 年 ● 岐阜薬科大学創薬化学大講座 薬化学研究室 講師  
2012 年 ● 岐阜薬科大学創薬化学大講座 薬化学研究室 准教授  
2016 年 ● 神戸薬科大学薬化学研究室 教授

