

研究ノート

亜鉛イオン応答性ピリジン-ピリドン型蛍光プローブを用いた
細胞内亜鉛分布解析への挑戦（その1）

藤田 英明^{1)*}, 檜崎 彩香¹⁾, 大久保 麻佳¹⁾
 藤井 佑樹¹⁾, 藤原 俊幸¹⁾, 萩森 政頼²⁾
 山口 泰史¹⁾

(¹)長崎国際大学 薬学部 薬学科、²神戸薬科大学 薬学部 薬学科、*連絡対応著者)

Challenges to Detect an Intracellular Localization of Zinc Ion by Zn²⁺ Responsive Fluorescent Probe, a Pyridine-Pyridone Derivative (Part 1)

Hideaki FUJITA^{1)*}, Ayaka NARAZAKI¹⁾, Asaka OHKUBO¹⁾,
 Yuki FUJII¹⁾, Toshiyuki FUJIWARA¹⁾, Masayori HAGIMORI²⁾
 and Yasuchika YAMAGUCHI¹⁾

(¹)Dept. of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki International University,

²Kobe Pharmaceutical University, *Corresponding author)

Abstract

To detect the subcellular localization of labile zinc ions, we applied Bpy-NH₂, a novel zinc responsive fluorescent probe that contains a unique pyridine-pyridone structure. Because of a compact size and physicochemical characteristics of Bpy-NH₂, it passes through a cellular membrane and reach to any intracellular compartments where labile zinc ions are concentrated. In HeLa cells, Bpy-NH₂ localized to the late endosomes and lysosomes as Fluo-Zin3 AM, a known fluorescent zinc probe, did. In the presence of pyrithione, a zinc ionophore, the fluorescent signal of Fluo-Zin3 AM still retained in the late endosomes and lysosomes, suggesting that this probe only can detect zinc ions localized to the acidic compartments. Intriguingly, in the presence of pyrithione, Bpy-NH₂ detected the distribution of labile zinc ions to both the cytoplasm and nucleus. We propose that Bpy-NH₂ may have an unbiased subcellular localization property and thus, it can detect bona fide intracellular localization of zinc ions.

Key words

labile zinc, pyridine-pyridone derivative, subcellular localization, zinc responsive fluorescent probe

要 約

Fluo-Zin3 AM を代表とする従来の亜鉛蛍光プローブは、プローブ自身が持つ細胞内局在特性により、特定の細胞内コンパートメントの亜鉛を検出することができた。しかしながら、異なるコンパートメント間の亜鉛濃度やその動態の解析には適していない。

細胞内の遊離亜鉛の局在・動態を正確に検出する目的で新規の亜鉛イオン応答性ピリジン-ピリドン型蛍光プローブ“Bpy-NH₂”を用いた。親油性分子である Bpy-NH₂ は他の亜鉛蛍光プローブと比較して低分子量であり、容易に細胞膜を透過して細胞内遊離亜鉛を検出できる。HeLa 細胞を用いた解析により、Bpy-NH₂ は Fluo-Zin3 AM と同様に後期エンドソーム・リソソーム顆粒内の遊離亜鉛を検出できることが明らかとなった。亜鉛イオンフォアであるピリチオン存在下では培地中の亜鉛が細胞内に流

入してくるが、Fluo-Zin3 AM は自身が持つ酸性コンパートメントへ集積する性質のため、流入してきた細胞質亜鉛を検出することができなかった。一方、Bpy-NH₂ はピリチオン存在下で細胞質および核内の亜鉛を検出できることが明らかとなった。Bpy-NH₂ を用いることで細胞内の真の亜鉛動態を解析することが可能になることが期待される。

キーワード

遊離亜鉛、ピリジン-ピリドン誘導体、細胞内局在、亜鉛応答性蛍光プローブ

はじめに(1)

蛍光性を示す化合物は、自然界に多く存在している。下村脩博士のノーベル賞受賞で有名になったオワンクラゲの Green Fluorescent Protein (GFP) だけではない。例えば、ホタルなどの昆虫やホタルイカなどの魚介類の蛍光を発するメカニズムも明らかになっている。また多くのキノコも蛍光性の物質を作っており、光を吸収した後、美しい蛍光を発する。これらの発光に関わる分子は、オワンクラゲがタンパク質である GFP を用いているのとは違い、多くが低分子量の有機化合物である。一方、有機化学者は19世紀から蛍光性の有機化合物を人工的に作ることに成功していた。以来、蛍光化合物は多くの分野で使用されてきた。特に化学、生物学、材料科学の世界である。具体的には、染料、塗料、色素、顔料などの工業材料、診断用試薬、研究用の試薬等である。

GFP および改良され緑色以外の色を示す蛍光タンパク質は、今日では生命科学研究に欠かせない道具である。これら蛍光タンパク質の最大の利点は、ある特定タンパク質の末端に蛍光タンパク質を同時に発現させ、その位置情報や生理学的な条件変化における特定タンパク質の役割等を推測できる点にある¹⁾。しかし、蛍光タンパク質自体が大きな分子量を持つことから、標識されたタンパク質本来の状態を示しているのか、という疑問もある。この問題を回避するために、低分子量の蛍光性有機分子の利用も、生物学研究の有効な手段となっている。つまり、生体成分、細胞、さらには動物個体の可視化を目的とする蛍光プローブである。

低分子量の蛍光プローブは、利用方法の多様

さ、簡便さ、検出感度の高さ、および蛍光による発光色の多さなどの利点を持つ。蛍光発色により、状態の変化、物質、細胞の器官さらには病変などを可視化できる。具体的な検出対象は、タンパク質、金属イオン、pH、酵素活性、一酸化窒素、活性酸素、膜電位等が報告されている²⁾⁻⁹⁾。

蛍光プローブは、標的分子と特異的に相互作用して蛍光強度や蛍光波長の変化を起こすことで、目的とする検出対象を測定することになる。つまり蛍光プローブは、認識部位と蛍光団母核の2つの部位から成り立っている^{10), 11)}(図1)。現在までに多くの蛍光発色色素が開発されている。しかし、そのうち生物学実験に利用されているものは、フルオレセイン、ローダミン、クマリン、シアニン、ピレン等の基本骨格をもつ化合物に限られている。これらを母核とした蛍光プローブも、発色団と認識部位をもつ化合物である。

筆者らは、新規蛍光団母核としてピリジン-ピリドン骨格を開発した。さらにこれを母核としてもつ亜鉛プローブの開発に成功した^{12), 13)}(図2)。この新規亜鉛プローブは、他の亜鉛応答性蛍光プローブ類と大きく異なり、亜鉛認識部を蛍光発色団であるピリジン-ピリドン骨格に一体化して組み込んでいる。したがって、従来の亜鉛プローブに比べ、より低分子量のプローブ開発に成功した。この新規プローブ分子は、低分子であることから、細胞透過性が高いことが期待でき、他の亜鉛応答性プローブとは、異なる性質が期待できる。

低分子量のプローブが、もし細胞の中で均一の濃度で存在していれば、標的とする分子(例えば、亜鉛イオン)の存在濃度に比例し、蛍光

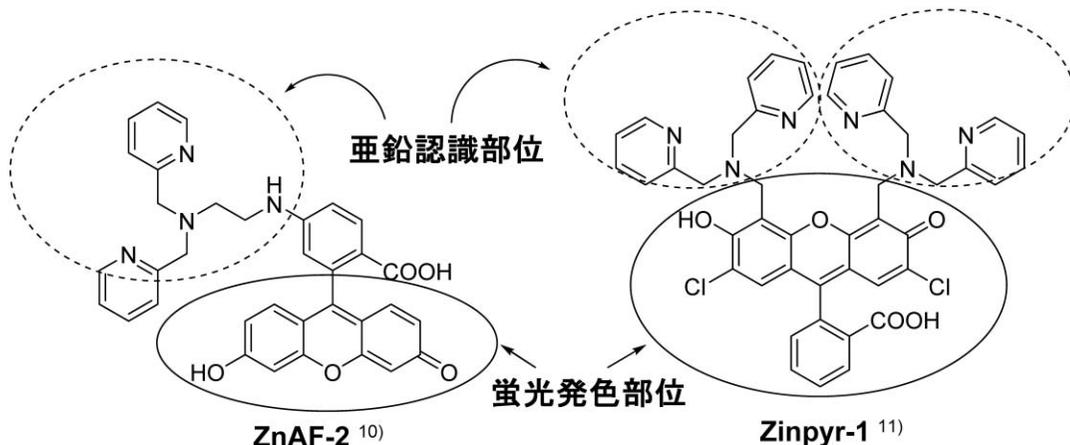


図1. 従来型亜鉛応答性蛍光プローブの構造
 蛍光発色部位と亜鉛認識部位が別々に存在するため分子構造が比較的大きい。

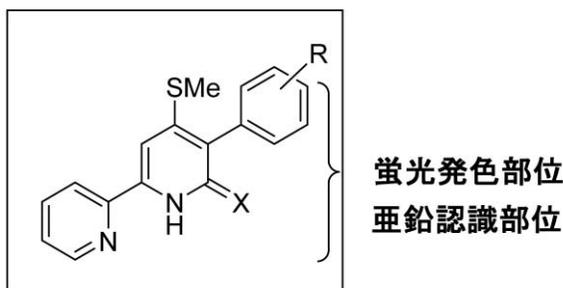


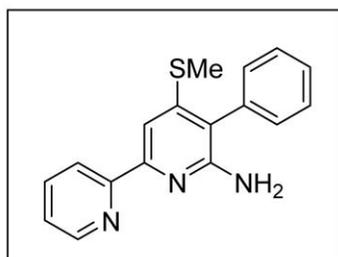
図2. 新規亜鉛応答性蛍光プローブの構造
 ピリジン-ピリドン型亜鉛応答性蛍光プローブは、光発色部位と
 亜鉛認識部位が一体化しているため、より低分子化された。

を発するはずである。しかし、有機分子は、その極性や pKa などの物性により、細胞中で偏って存在する。したがって、蛍光プローブが細胞のどの部分に存在しやすいのか、あらかじめ明らかにすることは、重要なことである。なぜなら、他の蛍光プローブとの違いを明白にし、実験目的別のプローブ使い分けにも必要な情報だからだ。

この論文では、ピリジン-ピリドン骨格をもつ亜鉛応答性蛍光プローブ分子 Bpy-NH₂ (図3) の細胞内局在特性を明らかにしたので報告する。

はじめに(2)

微量必須金属である亜鉛 (Zn²⁺) は、転写因子をはじめとする多数の亜鉛結合タンパク質の高次構造形成・機能発現において重要である¹⁴⁾。細胞内の亜鉛濃度は、細胞外からの亜鉛取込みに働く輸送体 ZIP ファミリータンパク質と、排出に働く輸送体 ZnT ファミリータンパク質により調節されている¹⁵⁾。細胞内に流入した亜鉛はカルシウム (Ca²⁺) 同様にセカンドメッセンジャーとして機能していることも明らかとなっている¹⁶⁾。細胞内において大部分の亜鉛は亜鉛結合タンパク質に結合した状態で存在し、遊離亜鉛の濃度は極めて低い (数 nM?) と考えられている。しかしながら、報告されている細胞



Bpy-NH₂

Kd = 2.2 nM

$\Phi_{Zn(II)} / \Phi_{free} = 8.6$

図3. 4-(methylsulfanyl)-5-phenyl-2,2'-bipyridin-6-amine (Bpy-NH₂) の構造、Zn²⁺ への結合定数 (Kd) と Zn²⁺ 存在下/非存在下における量子収率比 ($\Phi_{Zn(II)} / \Phi_{free}$) (Bpy-NH₂) の構造式と亜鉛イオンに対する応答性指標を示した。

内の遊離亜鉛濃度はその測定方法により大きく異なるため (数10 μ M-1 pM)、その実態は明らかとなっていない¹⁷⁾。さらに、各細胞内小器官における遊離亜鉛濃度についても十分な解析がなされていない。

細胞内亜鉛濃度の測定は亜鉛応答性蛍光プローブ分子を用いた解析が主たる方法となっている^{18), 19)}。これまで開発された亜鉛応答性プローブ分子の一つである Fluo-Zin3 AM は細胞内の酸性コンパートメントに集積することから、エンドソーム・リソソーム内腔や神経細胞における分泌顆粒内腔の亜鉛検出に良く用いられている。しかしながら、細胞質や他の細胞内小器官 (オルガネラ) の遊離亜鉛を検出する有用な亜鉛応答性蛍光プローブ分子の報告は少ない。そこで我々は新規に開発したピリジン-ピリドン骨格をもつ亜鉛応答性蛍光プローブ分子 Bpy-NH₂ がどの細胞内小器官に局在する亜鉛を検出可能かについて、HeLa 細胞を用いて解析を試みた。

材料と方法

亜鉛応答性蛍光プローブ

4-(methylsulfanyl)-5-phenyl-2,2'-bipyridin-6-amine (Bpy-NH₂) は、参考文献に従い合成した^{12), 13)}。Fluo-Zin3 AM は、ライフテクノロジーから購入した。

細胞培養

HeLa 細胞は独立行政法人医薬基盤研究所細胞バンクより購入した。DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 培地はライフテクノロジーから購入した。

蛍光顕微鏡観察

ガラスカバースリップ上に一晚培養後した HeLa 細胞を各種薬物で処理後、4% paraformaldehyde で30分固定後、0.05% saponin を含む 1% BSA/Tris-HCl buffer (pH 7.0) 溶液で5分間可溶化を行い、抗ヒト Lamp1 抗体 (マウスモノクローナル抗体、国立がんセンター、古田耕博士より分与) および Cy3 標識抗マウス抗体 (ヤギ抗体、Molecular Probe 社より購入) を用いて免疫染色を行った。蛍光顕微鏡観察はオリンパス社 Fluoview FV10i を用いて行った。

実験結果

Bpy-NH₂ を用いた HeLa 細胞内遊離亜鉛の検出

HeLa 細胞を DMSO (Control)、Bpy-NH₂ (100 μ M)、Bpy-NH₂ (100 μ M) + Pyrithione (100 μ M) を含む培地でそれぞれ30分培養、細胞を固定後、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。Bpy-NH₂ 単独で細胞内の遊離亜鉛が検出されたが、亜鉛イオンフォアである Pyrithione を共存させるとその蛍光シグナルは

増強した（図4）。このことは Pyrrhione 共存により培地中の遊離亜鉛が細胞内へと流入したことを示唆している。

さらに Bpy-NH₂ の細胞内局在を詳細に観察すると、Bpy-NH₂ 単独では細胞内の顆粒状コンパートメントに局在していることが明らかとなった（図5(A)）。抗ヒト Lamp1 抗体による免疫染色の結果、このコンパートメントの少なくとも一部は後期エンドソーム・リソソームであることが明らかとなった。しかしながら、Pyrrhione 共存では細胞質に加えて、核内に蛍光シグナルの集積が認められた（図5(B)）。

次に Bpy-NH₂ と Fluo-Zin3 AM により検出される亜鉛の局在を同時に比較するため、HeLa 細胞を Bpy-NH₂ (100 μM) + Pyrrhione (100 μM) + Fluo-Zin3 AM (100 μM) を含む培地で30分培養、細胞を固定後、抗ヒト Lamp1 抗体による免疫染色、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った（図6）。その結果、Bpy-NH₂ では細胞質および核内の遊離亜鉛が検出されたのに対して、Fluo-Zin3 AM では後期エンドソーム・リソソーム内の遊離亜鉛が検出された。

考 察

Bpy-NH₂ はその分子量や化学的特性から細胞膜を速やかに透過し、細胞内の遊離亜鉛濃度に依存した局在を示すと考えられる。定常状態の細胞内において Bpy-NH₂ が Fluo-Zin3 AM 同様、後期エンドソーム・リソソーム内に検出されたことから、遊離亜鉛は後期エンドソーム・リソソーム内に多いことが示唆された。一方、Bpy-NH₂ による染色は、Lamp1 ポジティブの顆粒以外にも認められた。この事は後期エンドソーム・リソソーム以外の細胞内コンパートメントにも亜鉛が存在する事を示唆している。顆粒の形態から初期エンドソームの可能性が考えられる。今後詳細な解析を行う予定である。興味深いことに Pyrrhione 存在下では、Fluo-Zin3 AM の局在に大きな変化は認められなかった。このことから、Fluo-Zin3 AM は後期エンドソーム・リソソーム内に集積する遊離亜鉛の検出には有用であるものの、細胞質や他の細胞内小器官の遊離亜鉛の検出には適さないことが明らかとなった。一方、Pyrrhione 存在下で Bpy-NH₂ が細胞質および核内に検出されたことは、培地

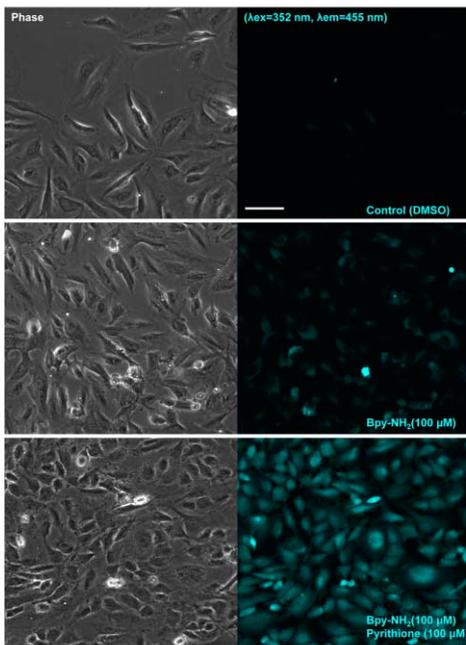


図4. Bpy-NH₂ は細胞内遊離亜鉛と結合して蛍光を発する。

HeLa 細胞を DMSO (Control)、Bpy-NH₂ (100 μM)、Bpy-NH₂ (100 μM) + Pyrrhione (100 μM) を含む培地で30分培養、細胞を固定後、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。Bpy-NH₂ 単独で細胞内の遊離亜鉛が検出されたが、Pyrrhione を共存させるとその蛍光シグナルは増強した。Bars = 20 μm

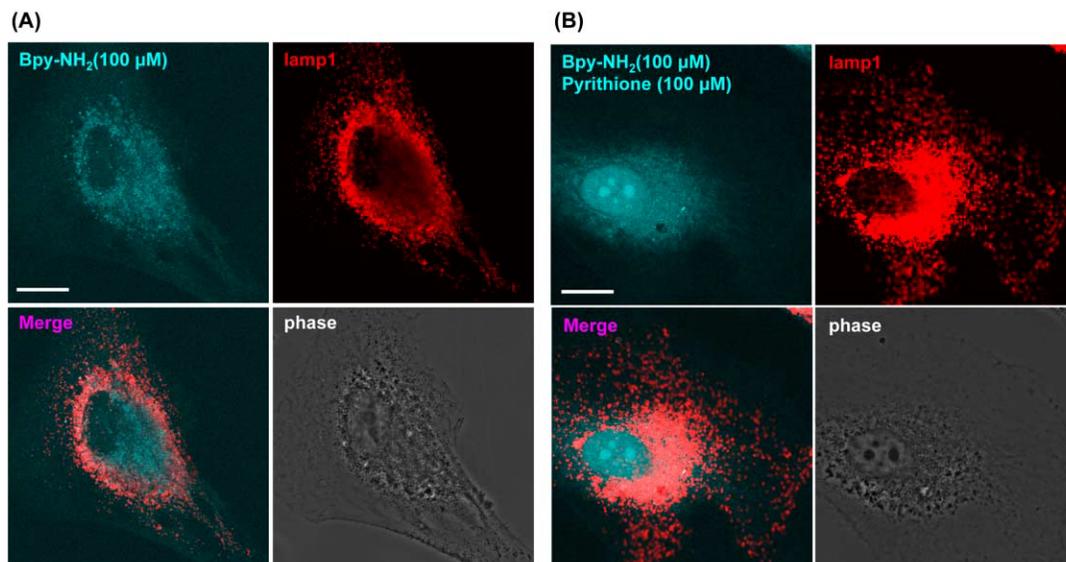


図5. Bpy-NH₂ の細胞内局在

- (A) HeLa 細胞を Bpy-NH₂ (100 μM) を含む培地で30分培養、細胞を固定後、抗ヒト Lamp1 抗体による免疫染色、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。Bpy-NH₂ により、後期エンドソーム・リソソーム内の遊離亜鉛が検出された。
- (B) HeLa 細胞を Bpy-NH₂ (100 μM) + Pyrithione (100 μM) を含む培地で30分培養後、(A)と同様の免疫染色観察を行った。Pyrithione 存在下では、細胞質および核内の遊離亜鉛が検出された。 Bars=10 μm

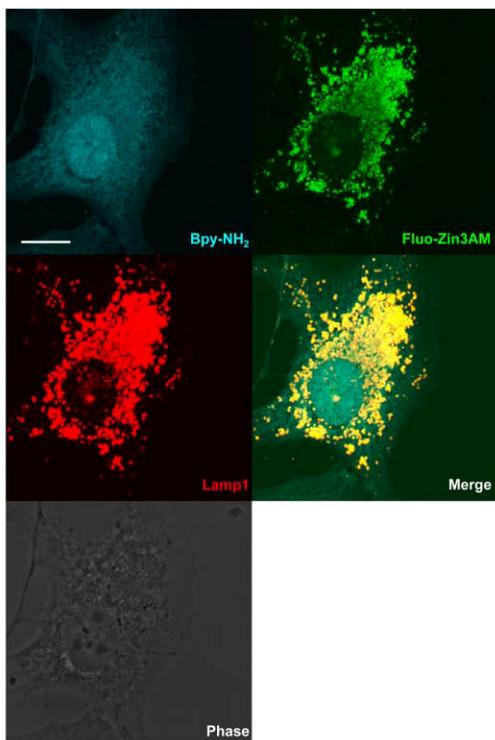


図6. Bpy-NH₂と Fluo-Zin3 AM の細胞内局在

HeLa 細胞を Bpy-NH₂ (100 μM) + Pyrithione (100 μM) + Fluo-Zin3 AM (100 μM) を含む培地で30分培養、細胞を固定後、抗ヒト Lamp1 抗体による免疫染色、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。Bpy-NH₂ により細胞質および核内の遊離亜鉛が検出された。Fluo-Zin3 AM により後期エンドソーム・リソソーム内の遊離亜鉛が検出された。 Bar=10 μm

中の遊離亜鉛あるいは Bpy-NH₂・Pyrithione に結合した亜鉛が細胞膜を何らかの形で通過して、後期エンドソーム・リソソーム内より高い濃度で細胞質および核内に集積していることを示している。このような亜鉛の核内への集積は、細胞が何らかの刺激により、細胞外あるいは細胞内小器官から ZIP トランスポーターを介して細胞質へと流入した亜鉛がセカンドメッセンジャーとして核内で機能することを示唆する現象かもしれない。これまで核内での遊離亜鉛の詳細な役割は報告されていないが、ゴルジ体から細胞質への亜鉛輸送に関与する ZIP13 ノックアウトマウス由来の細胞では、コントロール細胞と比較して核内の亜鉛濃度が低下していることが報告されている²⁰⁾。Bpy-NH₂を用いた遊離亜鉛の検出・解析を行うことで、どのような生理的条件下で亜鉛の細胞質への流入が起こるのかを今後明らかにすることが可能である。さらに核内に集積した遊離亜鉛がどのような機能を果たしているかを明らかにすることで、亜鉛の新たな生理的機能が解明されることが期待される。

一方、Bpy-NH₂を用いた細胞内遊離亜鉛の検出原理についてはいくつかの不明な点が残る。細胞内では多くの亜鉛は亜鉛結合性タンパク質に結合した形で存在していると考えられる。Bpy-NH₂は亜鉛結合時に蛍光強度の増大が認められるが、検出された細胞内コンパートメント内の遊離亜鉛と結合したのか、あるいは亜鉛結合タンパク質から解離した亜鉛に結合したのかについては明らかではない。また、Pyrithione 存在下で、培地中亜鉛がどのようにして細胞内へ移動するのか、さらに Pyrithione の有無が、Bpy-NH₂と亜鉛の結合にどのような影響(競合阻害?)を及ぼすかについても不明である。今後、これらの検出原理を明らかにした上で、Bpy-NH₂を用いた細胞内亜鉛動態の詳細な解析に取り組む予定である。

参考文献

- 1) Giepmans, B. N. G., Adams, S. R., Ellisman, M. H., Tsien, R. Y., (2006) 'The Fluorescent Toolbox for Assessing Protein Location and Function.' *Science*, 312(5771), PP.217-224.
- 2) Pretzera, E., Wiktorowicz, J. E., (2008) 'Saturation fluorescence labeling of proteins for proteomic analyses.' *Anal Biochem*, 374(2), PP.250-262.
- 3) Ranasinghe, R. T., Brown, T. (2005) 'Fluorescence based strategies for genetic analysis.' *Chem. Commun.*, (44), PP.5487-5502.
- 4) Kay, A. R., Rumschik, S. M., (2011) 'Differential transition metal uptake and fluorescent probe localization in hippocampal slices.' *Metallomics*, 3(8), PP.829-837.
- 5) Fabbrizzi, L., Gatti, F., Pallavicini, P., Parodi, L., (1998) 'An 'off-on-off' fluorescent sensor for pH based on ligand-proton and ligand-metal-proton interactions.' *New J. Chem.*, 22(12), PP. 1403-1407.
- 6) Kostov, Y., Gryczynski, Z., Rao, G., (2002) 'Polarization oxygen sensor: A template for a class of fluorescence-based sensors.' *Anal. Chem.*, 74(9), PP.2167-2171.
- 7) Kojima, H., Nakatsubo, N., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., Hirata, Y., Nagano, T., (1998) 'Detection and Imaging of Nitric Oxide with Novel Fluorescent Indicators: Diaminofluoresceins.' *Anal. Chem.*, 70(13), PP.2446-24531.
- 8) Nakahara, R., Kashitani, S., Hayakawa, K., Kitani, Y., Yamaguchi, T., Fujita, Y., (2009) 'Fluorophotometric Determination of Hydrogen Peroxide with Fluorescein in the Presence of Cobalt (II) and Reaction Against Other Reactive Oxygen Species.' *J. Fluoresc.*, 19(5), PP.769-775.
- 9) Baker, B. J., Mutoh, H., Dimitrov, D., Akemann, W., Perron, A., Iwamoto, Y., Jin, L., Cohen, L. B., Isacoff, E. Y., Pieribone, V. A., Hughes, T., Knöpfel, T., (2008) 'Genetically encoded fluorescent sensors of membrane potential.' *Brain Cell Biol.*, 36(1-4), PP.53-67.
- 10) Hirano, T., Kikuchi, K., Urano, Y., Nagano, T., (2002) 'Improvement and Biological Appli-

- cations of Fluorescent Probes for Zinc, ZnAFs.' *J. Am. Chem. Soc.*, 124(23), PP.6555–6562.
- 11) Walkup, G. K., Burdette, S. C., Lippard, S. J., Tsien, R. Y., (2000) 'A New Cell-Permeable Fluorescent Probe for Zn²⁺.' *J. Am. Chem. Soc.*, 122(23), PP.5644–5645.
- 12) Hagimori, M. (2013) 'Development of Zn(2+) selective fluorescent probes for biological applications.' *Yakugaku Zasshi*, 133(10), PP.1087–1092.
- 13) Hagimori, M. *et al.*, *submitted*.
- 14) Kambe T., Hashimoto A., Fujimoto S. (2014) 'Current understanding of ZIP and ZnT zinc transporters in human health and diseases.' *Cell Mol Life Sci.*, 71(17), PP.3281–3295.
- 15) Fukada T., Kambe T., (2011) 'Molecular and genetic features of zinc transporters in physiology and pathogenesis.' *Metallomics.*, 3(7), PP.662–674.
- 16) Fukada T., Yamasaki S., Nishida K., Murakami M., Hirano T., (2011) 'Zinc homeostasis and signaling in health and diseases: Zinc signaling.' *J Biol Inorg Chem.*, 16(7), PP.1123–1134.
- 17) Eide D. J., (2006) 'Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc.' *Biochim Biophys Acta.*, 1763(7), PP.711–722.
- 18) Dean K. M., Qin Y., Palmer A. E., (2012) 'Visualizing metal ions in cells: an overview of analytical techniques, approaches, and probes.' *Biochim Biophys Acta.*, 1823(9), PP.1406–1415.
- 19) Qin Y., Miranda J. G., Stoddard C. I., Dean K. M., Galati D. F., Palmer A. E., (2013) 'Direct comparison of a genetically encoded sensor and small molecule indicator: implications for quantification of cytosolic Zn(2+).' *ACS Chem Biol.*, 8(11), PP.2366–2371.
- 20) Fukada T., Civic N., Furuichi T., Shimoda S., Mishima K., Higashiyama H., Idaira Y., Asada Y., Kitamura H., Yamasaki S., Hojyo S., Nakayama M., Ohara O., Koseki H., Dos Santos H. G., Bonafe L., Ha-Vinh R., Zankl A., Unger S., Kraenzlin M. E., Beckmann J. S., Saito I., Rivolta C., Ikegawa S., Superti-Furga A., Hirano T., (2008) 'The zinc transporter SLC39A13/ZIP13 is required for connective tissue development; its involvement in BMP/TGF-beta signaling pathways.' *PLoS One.*, 3(11): e3642.