

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02102

研究課題名(和文)局在型プローブを用いたオルガネラ内のイオンダイナミクスの解明

研究課題名(英文)Analysis of ion dynamics in organelles by using targetable probes

研究代表者

水上 進 (Mizukami, Shin)

東北大学・多元物質科学研究所・教授

研究者番号：30420433

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：オルガネラにおけるMg²⁺とZn²⁺の動態の定量的なイメージング技術を開発した。細胞内Ca²⁺濃度変化の影響を受けない高選択性Mg²⁺プローブを蛋白質ラベル化技術と統合させることで、オルガネラ内のMg²⁺を選択的に可視化する技術を開発し、核内の遊離Mg²⁺濃度は細胞分裂時に変動することを明らかにした。また局在可能な亜鉛定量プローブを開発し、ゴルジ体のZn²⁺はおおよそ数十nMのレベルであることなどを明らかにした。さらに、解離定数の異なる新たなプローブを開発し、細胞質、核、ゴルジ体、小胞体、ミトコンドリアにおける遊離Zn²⁺の定量的なイメージングに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞機能を理解するためには、分子の存在だけでなく、分子がどこにどれくらい存在するか(時空間的かつ定量的な情報)を知ることが重要である。化学的な高選択性プローブを細胞内局所へ局在させることによって、蛋白質プローブや低分子プローブでは得られない時空間分解能を持った金属イオン定量が可能になった。特に、亜鉛イオンの詳細な細胞内濃度マップに関する知見は、亜鉛イオンに関連する疾患機構の解明や治療薬の開発に繋がることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, quantitative imaging techniques of Mg²⁺ and Zn²⁺ dynamics in organelles were developed. By integrating a highly selective Mg²⁺ probe, which is unaffected by changes in intracellular Ca²⁺ concentration, with protein labeling technology, we developed a technique for selectively visualizing Mg²⁺ in organelles and showed that the free Mg²⁺ concentration in the nucleus fluctuates during cell division. We also developed a localizable zinc quantification probe and found that the level of Zn²⁺ in the Golgi is about several tens of nM. Furthermore, we developed new probes with different dissociation constants and succeeded in quantitative imaging of free Zn²⁺ in the cytoplasm, nucleus, Golgi apparatus, endoplasmic reticulum and mitochondria.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：蛍光プローブ Mg²⁺ Zn²⁺ 蛋白質ラベル化 定量

1. 研究開始当初の背景

組織や細胞を破碎し、生体分子を精製してその機能を調べる生化学的手法は、医学・生物学において重要な手法だが、「時空間的情報」や「分子間相互作用」などの重要な情報が失われる。生命の本質を理解するにはこれらの情報を含む生体分子機能解析が必要である。それゆえ、高い時空間分解能を有する蛍光イメージングが近年注目を集めており、超解像蛍光顕微鏡を用いれば数十 nm 程度の空間分解能で細胞内オルガネラの微細構造なども観察できるようになってきた。その一方で、オルガネラ内の生体分子のダイナミクスについてはほとんど分かっていなかった。そこで、「オルガネラ内の生体分子のダイナミクスはどのようになっているか」という問いを明らかにするために、化学的なアプローチをはじめとする様々な新技術開発が求められている。

細胞内金属イオンの解析は、ゲル電気泳動や免疫化学的手法、分子生物学的手法の適用が困難であることから、多くの知見が蛍光イメージング技術によって明らかにされてきた。しかしながら、金属イオンの細胞内動態解析はその可視化プローブの性能に大きく依存し、既に多くの優れたプローブが開発されている Ca^{2+} 以外の金属イオンについては、オルガネラ内の濃度分布や動態はそのほとんどが不明のままになっている。例えば細胞内 Mg^{2+} に関しては、蛋白質プローブが幾つか報告されているものの、汎用技術としては未だ確立しておらず、細胞内 Zn^{2+} に関しても蛋白質プローブの報告はあるものの、オルガネラ内環境では試験管内の環境とは異なる物性を示すことなどが報告されている。オルガネラ内などの細胞内の局所環境は場所によってその pH や生体分子濃度、酸化還元環境などが大きく異なっている。一般的に低分子プローブは適切に設計すれば、蛋白質プローブと比較して周囲の環境の影響を受けにくくすることは可能である。その一方で、蛋白質プローブの特長の一つである細胞局所へのターゲティングは低分子プローブでは容易では無い。それゆえ、低分子プローブと蛋白質プローブ双方の有利な特性を併せ持つハイブリッドプローブは非常に大きなポテンシャルを有しており、そうした多機能性プローブに関する需要は高い。

研究代表者らは、これまでに機能性低分子を蛋白質に修飾する独自の蛋白質ラベル化技術(BL-tag)などを開発してきた(S. Mizukami *et al.*, *JACS* 2009, 131, 5016; S. Mizukami *et al.*, *Acc. Chem. Res.* 2014, 47, 247)。また、市販の HaloTag を利用して Mg^{2+} 蛍光プローブ MGH を細胞内に固定することにより長時間測定を可能とし、アポトーシス時の細胞内 Mg^{2+} の濃度変化を経時的にモニタリングできることを報告している(Y. Matsui *et al.*, *Chem. Sci.* 2017, 8, 8255)。そこで、これらの技術を発展させ、新たな機能性分子開発と合わせて、細胞内金属イオン動態の定量的な解析技術の開発とその応用研究に取り組んだ。

2. 研究の目的

(1) 細胞内 Mg^{2+} を選択的に可視化・定量するプローブの開発

細胞内 Mg^{2+} のダイナミクスを定量的に可視化する技術を開発する。これまでにタグ蛋白質結合型 Mg^{2+} プローブ MGH を開発し、24 時間に渡る長時間イメージング、および Mg^{2+} プローブのオルガネラへの局在化を達成した。さらに、 Mg^{2+} に高選択的な配位子を創製し、細胞内 Ca^{2+} の濃度変動に全く影響されない Mg^{2+} プローブ MGQ を開発した。これら二つの研究を融合・発展させ、高選択性・局在性を兼ね備えた低分子・蛋白質ハイブリッド型蛍光プローブを開発し、細胞の有糸分裂時における核内 Mg^{2+} の経時的モニタリングを行う。

(2) 細胞内 Zn^{2+} を選択的に可視化・定量するプローブの開発

細胞内局所に標的化可能かつ Zn^{2+} に対して選択的に蛍光応答を示す新規プローブを開発する。また、このプローブを用いて細胞内局所における遊離 Zn^{2+} イオンの濃度を定量する技術を開発する。

3. 研究の方法

(1) 細胞内 Mg^{2+} を選択的に可視化・定量するプローブの開発

我々が見出した Mg^{2+} 高選択性配位子 2,8-dicarboxyquinoline (DCQ) を有する蛍光プローブ MGQ-2 に HaloTag リガンドを修飾した局在型 Mg^{2+} プローブ MGQ-2H (図 1) およびその細胞膜透過性誘導体 MGQ-2H(AM) を設計・合成した。In vitro における MGQ-2H および MGQ-2H を HaloTag に共有結合させたハイブリッドプローブの物性測定を行った後、HaloTag を発現させた生細胞に投与し、蛍光イメージング実験を行った。

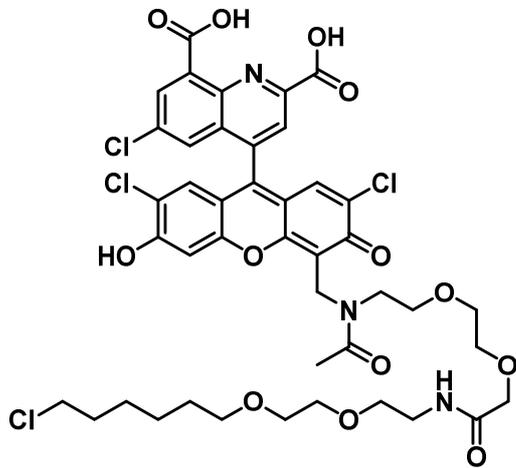


図 1. MGQ-2H の分子構造

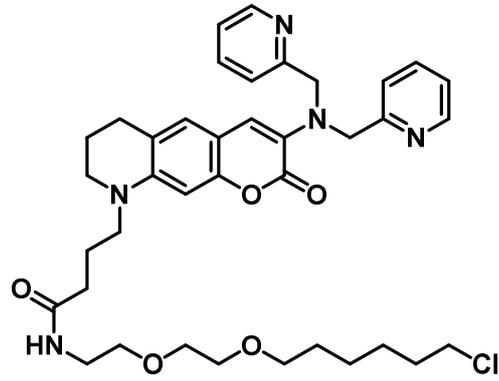


図 2. ZnDA-1H の分子構造

(2) 細胞内 Zn^{2+} を選択的に可視化・定量するプローブの開発

細胞膜透過性を有し、細胞内で発現させた HaloTag に結合するように設計された Zn^{2+} 検出蛍光プローブ ZnDA-1H を合成した。ZnDA-1H (図 2) と HaloTag 蛋白質ヘラベル化した分子 (ハイブリット分子) の吸収および蛍光スペクトル並びに pK_a と金属イオン選択性、 Zn^{2+} に対する解離定数などの各種物性を測定した。また、生細胞オルガネラ内に HaloTag を発現させ、内部標準蛍光色素であるテトラメチルローダミン修飾 HaloTag リガンド (TMR-HTL) と同時ラベリングにより、プローブ蛍光と内部標準蛍光の比を取ることで Zn^{2+} イオン濃度を定量する手法を開発し、オルガネラ内の遊離 Zn^{2+} 濃度を定量的に可視化した。また、解離定数が異なる誘導体プローブの開発を行った。

4. 研究成果

(1) 細胞内 Mg^{2+} を選択的に可視化・定量するプローブの開発

HaloTag リガンドを修飾した高選択的 Mg プローブ MGQ-2H は、既報の MGQ-2 のメチルエステル体から Mannich 反応で HaloTag リガンドを結合、エステル加水分解により合成した。合成した MGQ-2H および HaloTag に結合させた Halo-MGQ-2H の吸収・蛍光スペクトル変化から Mg^{2+} に対して高選択的であることを確認した。HaloTag を細胞質、核、細胞膜、小胞体それぞれ発現させることにより、MGQ-2H をそれぞれのコンパートメントに標的化できることが各オルガネラマーカーとの共局在画像により示された。また、核内に HaloTag を発現させた HEK293 細胞に対して、MGQ-2H (AM) と内部標準である近赤外蛍光色素 HTL-Sara を共局在させ、長時間イメージングによって核内 Mg^{2+} 濃度の長時間にわたる変動を計測した。

さらに、MGQ-2H を核に局在させ、長時間の核内 Mg^{2+} イメージングを試みた。核に発現させた HaloTag に結合させることで、MGQ-2H は細胞外への排出が大きく抑制され、数日間に渡るイメージング実験が可能となる。有糸分裂期の核内 Mg^{2+} 動態をイメージングした結果、間期には Mg^{2+} 濃度の顕著な変化は見られなかったが、分裂前期・中期では大きく上昇し、後期で極大値をつけた後、終期で減少を開始し、最終的に間期と同等程度の濃度レベルに戻った。 Mg^{2+} 濃度変化は上昇開始から元のレベルに戻るまでおよそ 100 分程度であった。

(2) 細胞内 Zn^{2+} を選択的に可視化・定量するプローブの開発

合成した ZnDA-1H は吸収極大波長を 440 nm、蛍光極大波長を 506 nm に持ち、 Zn^{2+} 添加に伴い約 16 倍の蛍光強度増大を示した。また、pH 7.4 における Zn^{2+} に対する解離定数は $0.24 \mu M$ であった。また、細胞内 pH (pH 5.5 - 8.0) の範囲では pH 変化に伴う顕著な蛍光強度変化は見られなかった。HaloTag を HEK293T 細胞の細胞質、核、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体に発現させ、ZnDA-1H によるラベリングを行ったところ、標的オルガネラから ZnDA-1H 由来の蛍光シグナルが観測された。さらに、生理的な定常状態の Zn^{2+} 濃度の定量解析を行ったところ、ゴルジ体内の遊離 Zn^{2+} 濃度は約 20 nM と見積もられた。一方、その他のオルガネラや細胞質の Zn^{2+} 濃度の定量に適用するには ZnDA-1H は十分な結合親和性を有していなかった。そこで、 Zn^{2+} への解離定数が異なる誘導体プローブを開発し、ゴルジ体以外の細胞内局所亜鉛濃度マッピングに取り組んだ。

配位子の構造を ZnDA-1H の 3 座配位子のジピコリルアミン (DPA) から 4 座配位子のジピコリルアミノエチルアミン (DPEA) に変えることで、より Zn^{2+} 結合能の高い蛍光プローブ ZnDA-2H ($K_d = 6.0 nM$) および ZnDA-3H ($K_d = 0.16 nM$) を開発した。いずれのプローブを用いても、HeLa 細胞内局所に発現させた HaloTag ヘラベル可能であり、ZnDA-3H を用いて各オルガネラ内の遊離 Zn^{2+} 濃度を定量した結果、核・細胞質には約 0.1 nM、小胞体・ミトコンドリアには約 0.03 nM の

遊離 Zn^{2+} が存在することが示唆された。今後、開発したプローブを用いた細胞内亜鉛動態観察に取り組むことで、細胞内亜鉛シグナリングの詳細解明が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kowada Toshiyuki, Watanabe Tomomi, Amagai Yuta, Liu Rong, Yamada Momo, Takahashi Hiroto, Matsui Toshitaka, Inaba Kenji, Mizukami Shin	4. 巻 27
2. 論文標題 Quantitative Imaging of Labile Zn ²⁺ in the Golgi Apparatus Using a Localizable Small-Molecule Fluorescent Probe	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1521 ~ 1531.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chembiol.2020.09.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kowada Toshiyuki, Watanabe Tomomi, Liu Rong, Mizukami Shin	4. 巻 2
2. 論文標題 Protocol for synthesis and use of a turn-on fluorescent probe for quantifying labile Zn ²⁺ in the Golgi apparatus in live cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100395 ~ 100395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2021.100395	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kowada Toshiyuki, Arai Keisuke, Yoshimura Akimasa, Matsui Toshitaka, Kikuchi Kazuya, Mizukami Shin	4. 巻 60
2. 論文標題 Optical Manipulation of Subcellular Protein Translocation Using a Photoactivatable Covalent Labeling System	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 11378 ~ 11383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202016684	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mashita Takato, Kowada Toshiyuki, Takahashi Hiroto, Matsui Toshitaka, Mizukami Shin	4. 巻 20
2. 論文標題 Light Wavelength Based Quantitative Control of Dihydrofolate Reductase Activity by Using a Photochromic Isostere of an Inhibitor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 1382 ~ 1386
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.201800816	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計26件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 10件）

1. 発表者名 劉熔, 小和田 俊行, 松井 敏高, 水上 進
2. 発表標題 Quantitative Mapping of Cellular Labile Zn ²⁺ via Development of Hybrid Fluorescent Probes
3. 学会等名 日本化学会 第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水上進
2. 発表標題 細胞機能を探索するための 光応答性プローブの開発
3. 学会等名 日本薬学会第141年会一般シンポジウム「タンパク質高速分子動画に向けた光薬理学の新展開」（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水上進
2. 発表標題 蛋白質ラベル化に基づく 細胞内分子の計測と制御
3. 学会等名 新学術領域「生命金属科学」領域会議第1回地方巡業（仙台）（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小和田俊行, 渡邊朝美, 天貝佑太, 劉 熔, 山田 桃, 高橋泰人, 松井敏高, 稲葉謙次, 水上 進
2. 発表標題 細胞小器官局在化蛍光プローブの開発と細胞内遊離亜鉛の定量イメージング
3. 学会等名 第29回日本バイオイメーjing学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 劉 熔, 小和田 俊行, 松井 敏高, 水上 進
2. 発表標題 Quantitative Mapping of Organellar Labile Zn ²⁺ via the Development of Hybrid Fluorescent Probes
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水上 進
2. 発表標題 蛋白質ラベル化技術を用いた生体分子の可視化と機能制御
3. 学会等名 32回XFEL構造生物学ミーティング(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomomi Watanabe, Toshiyuki Kowada, Rong Liu, Toshitaka Matsui, Shin Mizukami
2. 発表標題 Quantitative analysis of free zinc ion concentration in living cells using novel targetable fluorescent probe
3. 学会等名 15th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rong Liu, Toshiyuki Kowada, Tomomi Watanabe, Toshitaka Matsui, Shin Mizukami
2. 発表標題 Development of Fluorescent Probes for Visualization and Quantification of Zn ²⁺ in Organelles
3. 学会等名 Tohoku University's Chemistry Summer School 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小和田 俊行, 劉 熔, 渡邊 朝美, 松井 敏高, 水上 進
2. 発表標題 細胞内小器官における亜鉛イオン濃度解析のための蛍光プローブの開発
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shin Mizukami
2. 発表標題 Development of chemical probes for investigating biomolecular dynamics in living cells
3. 学会等名 10th RSC-CSJ Joint Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rong Liu, Toshiyuki Kowada, Tomomi Watanabe, Toshitaka Matsui, Shin Mizukami
2. 発表標題 Quantitative Mapping of Cellular Labile Zn ²⁺ via Development of Hybrid Fluorescent Probes
3. 学会等名 第19回東北大学多元物質科学研究所研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshiyuki Kowada, Tomomi Watanabe, Rong Liu, Toshitaka Matsui, Shin Mizukami
2. 発表標題 Development of fluorescent probes for visualization and quantitative analysis of free zinc ion in intracellular organelles
3. 学会等名 Chemical Biology and Physiology Conference 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 劉熔, 小和田俊行, 渡邊朝美, 松井俊高, 水上進
2. 発表標題 Quantitative imaging analysis of labile Zn ²⁺ in intracellular organelles via the development of hybrid fluorescent probe
3. 学会等名 理学・生命科学研究所合同シンポジウム 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 劉熔, 小和田 俊行, 渡邊 朝美, 松井 敏高, 水上 進
2. 発表標題 Quantitative Mapping of Cellular Labile Zn ²⁺ via Development of Hybrid Fluorescent Probes
3. 学会等名 日本化学会 第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊 朝美, 小和田 俊行, 松井 敏高, 水上 進
2. 発表標題 細胞内オルガネラにおける亜鉛イオン動態の可視化
3. 学会等名 第28回金属の関与する生体関連反応シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤 理紗, 小和田 俊行, 松井 敏高, 水上 進
2. 発表標題 細胞内局所のpH定量を目的としたイメージングプローブの開発
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊朝美, 小和田俊行, 松井敏高, 水上進
2. 発表標題 細胞内オルガネラにおける亜鉛イオンの可視化
3. 学会等名 第18回多元研研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshiyuki Kowada, Tomomi Watanabe, Toshitaka Matsui, Shin Mizukami
2. 発表標題 Live-cell fluorescence imaging of zinc ions using localizable small-molecule probe
3. 学会等名 5th CWRU-Tohoku Joint Workshop (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Risa Ito, Toshiyuki Kowada, Shin Mizukami
2. 発表標題 Development of fluorescent probes for real-time and quantitative measurement of local pH changes in cell
3. 学会等名 Tohoku University's Chemistry Summer School 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shin Mizukami
2. 発表標題 Development of Photofunctional Tools Based on Chemistry and Biology
3. 学会等名 The 2nd International Symposium on Chemical Communication (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomomi Watanabe, Toshiyuki Kowada, Toshitaka Matsui, Shin Mizukami
2. 発表標題 Development of fluorescent probes for visualization of zinc ion in intracellular organelles
3. 学会等名 Tohoku University's Chemistry Summer School 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keisuke Wakabayashi, Toshiyuki Kowada, Shin Mizukami
2. 発表標題 Development of fluorescent probe for visualizing intracellular Mg ²⁺ dynamics
3. 学会等名 Tohoku University's Chemistry Summer School 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小和田 俊行、荒井 啓介、吉村 彰真、松井 敏高、菊地 和也、水上 進
2. 発表標題 蛋白質ラベル化技術を利用した蛋白質二量体化の光制御
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊朝美, 小和田俊行, 松井敏高, 水上 進
2. 発表標題 生体内オルガネラにおける亜鉛イオンの可視化
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshiyuki Kowada, Tomomi Watanabe, Toshitaka Matsui, Shin Mizukami
2. 発表標題 Development of fluorescent probe for visualization and quantitative analysis of zinc ion in intracellular organelles
3. 学会等名 The 2nd Symposium for World Leading Research Centers (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshiyuki Kowada, Toshitaka Matsui, Shin Mizukami
2. 発表標題 Development of light-switchable protein-protein interaction system for protein degradation
3. 学会等名 The 1st International Symposium on Chemical Communication (ISCC2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 小和田俊行・水上進	4. 発行年 2018年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 147-149
3. 書名 イメージングの選び方・使い方100+ (監修: 原田慶恵、永井健治)	

1. 著者名 水上進	4. 発行年 2018年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 151-160
3. 書名 有機フッ素化合物の最新動向 (監修: 今野勉)	

1. 著者名 Priya Ranjan Sahoo, Toshiyuki Kowada, Shin Mizukami	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Humana, New York, NY	5. 総ページ数 237-243
3. 書名 Methods in Molecular biology 2274	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 光応答性化合物	発明者 水上進, 間下貴斗, 小和田俊行, 松井敏 高	権利者 国立大学法人東 北大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-165991	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

http://www2.tagen.tohoku.ac.jp/lab/mizukami/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	小和田 俊行 (Kowada Toshiyuki)		
研究協力者	松井 敏高 (Matsui Toshitaka)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------