

## 細胞内 Zn をイメージングしたい

### 使用製品

Zinquin ethyl ester [Z215]

### 解析装置



### I はじめに

亜鉛は、ヒトの体内において、鉄に次いで含量の多い必須微量元素である<sup>1)</sup>。しかし、細胞内でフリーの亜鉛イオン ( $Zn^{2+}$ ) として存在するのは通常 nmol/l レベル以下であるとされており、細胞内の殆どの  $Zn^{2+}$  は主にタンパクと強固な結合を作っていると考えられる<sup>2)</sup>。その働きは重要であり、タンパクの構造の維持、酵素活性の制御などが挙げられる。また、転写因子等の DNA 結合タンパクは zinc finger や LIM motif 等の  $Zn^{2+}$  結合性のモチーフを有し、それを介して DNA に結合していると言われている。 $Zn^{2+}$  の欠乏は DNA の転写などに影響を与え、発癌に関与している可能性も示唆されている。

近年では、主に細胞死との関係に着目し、labile  $Zn^{2+}$  の局在や動態を議論した報告が多い。外因性  $Zn^{2+}$  による脳細胞の選択的細胞死や<sup>3-9)</sup>、細胞死と相関の深い酵素の活性制御<sup>10-14)</sup>、酸化ストレスによる酵素活性中心への影響<sup>15-16)</sup> など、様々な研究が精力的に行われ亜鉛の生体内での働きに関する知見が集積されつつあるものの、その動態や局在については未知の部分が多い。

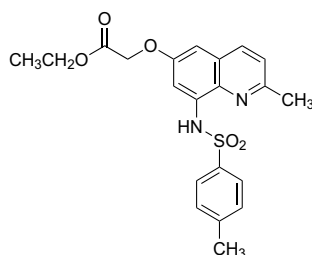
これらの報告において頻用されているのが、 $Zn^{2+}$  蛍光プローブである。 $Zn^{2+}$  蛍光プローブは、labile  $Zn^{2+}$  (つまり free  $Zn^{2+}$  やタンパクに緩く結合した  $Zn^{2+}$ ) と結合して蛍光性錯体を形成する。蛍光を利用しているため、高感度測定が可能である。高選択性の亜鉛蛍光プローブには、Dansylaminoethyl-cyclen、Zinquin ethyl ester がある。

Zinquin ethyl ester<sup>7,8,13,16)</sup> は、 $Zn^{2+}$  選択的蛍光プローブの最初の成功例である TSQ<sup>2-6,17,18)</sup> を元に考案された化合物であり、錯形成によって蛍光強度が約 30 倍に増強する。一旦、細胞内に導入すると、細胞内エステラーゼによってエステル結合が加水分解を受け、水溶性が増し細胞外へ漏れにくくなると言われている。組織染色のほか、浮遊細胞への応用例も報告されている。

Dansylaminoethyl-cyclen<sup>19,20)</sup> は、 $Zn^{2+}$  と 1 対 1 錯体のみを形成することと、水溶性であることが大きな特長である。また、Dansyl 基を有するため、他プローブに比較して蛍光強度が大きいことも有利な点である。 $Zn^{2+}$  の濃度上昇につれ、蛍光強度が約 5 倍まで直線的に増強することが示されており、これまで困難であった定量への応用が期待されている。

これらはどれも  $Zn^{2+}$  選択性が高いが、 $Cd^{2+}$  や  $Cu^{2+}$  等のイオンの妨害を受けるため、注意が必要である。 $Cd^{2+}$  は、選択性は  $Zn^{2+}$  に劣るものの、試薬と蛍光性錯体を形成する。一方、 $Cu^{2+}$  は蛍光消光を引き起す。ただし、これらを初めとする妨害金属イオンは何れも、細胞内濃度を勘案すると影響を無視できる場合が殆どであり、通常の測定に支障を来さない。

各化合物の特性を理解した上で、目的に応じたプローブを御利用いただきたい。



Zinquin ethyl ester  
M.W.:414.48

### II Zinquin ethyl ester を用いた B lymphoblastoid cell 中の $Zn^{2+}$ の観察<sup>13)</sup>

#### 1. 試薬

- ・ Zinquin ethyl ester (Code: Z215)
- ・ DMSO (Code: LU08)
- ・ Hanks' balanced salt solution (HBSS)

#### 2. 方法

- 1) Zinquin ethyl ester を DMSO に溶解してストック溶液とする。
- 2) B lymphoblastoid cell を HBSS に懸濁し ( $5 \sim 10 \times 10^6$  cells/ml)、Zinquin ethyl ester の終濃度が 25  $\mu\text{mol/l}$  となるようにストック溶液を加える。
- 3) 37°C で 30 分インキュベートする。
- 4) HBSS で 3 回洗浄し、 $2 \sim 5 \times 10^6$  cells/ml の細胞懸濁液とする。
- 5) 細胞懸濁液を、共焦点顕微鏡にて観察する。励起光としては、365 nm の UV レーザーを利用する。apoptosis を起こす細胞において、細胞質中の  $Zn^{2+}$  濃度が上昇し、蛍光強度が大きくなるのが観察できる。

#### 3. 注意事項

- 1) ストック溶液としては、1 mg/ml (2.4 mmol/l) 程度の DMSO 溶液を利用して下さい。冷凍保存で 1 ヶ月以上安定です。
- 2) 細胞内  $Zn^{2+}$  濃度と蛍光強度との相関を求めたい場合には、 $Zn^{2+}$  イオノフォアを用いて、細胞内に  $Zn^{2+}$  を導入して蛍光強度を測定して下さい。文献 13) においては、 $ZnSO_4$  (25  $\mu\text{mol/l}$ ) と sodium pyridithione (0.1  $\sim$  5  $\mu\text{mol/l}$ ) を使用しています。
- 3) 細胞内にロードされた Zinquin ethyl ester の濃度を求めたい場合には、細胞を detergent で処理し一様な溶液とした後、大過剰 (試薬の 1,000 倍程度) の  $Zn^{2+}$  を加えます。飽和蛍光強度から試薬濃度を求めることができます。文献 13) では、50  $\mu\text{mol/l}$  のジギトニンで処理し、細胞内試薬濃度を 3  $\mu\text{mol/l}$  と求めています。

### 参考文献

- 1) 日本化学会編, 微量元素の生体作用, 学会出版センター, 1995.
- 2) T. Tatsumi and H. Fliss, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **1994**, 26, 471.
- 3) J. Koh *et al.*, *Science*, **1996**, 272, 1013.
- 4) N. Tonder *et al.*, *Neurosci. Lett.*, **1990**, 109, 247.
- 5) H. Z. Yin and J. H. Weiss, *Neuroreport*, **1995**, 6, 2553.
- 6) C. J. Frederickson *et al.*, *Brain Res.*, **1988**, 446, 383.
- 7) M. Tsuda *et al.*, *J. Neurosci.*, **1997**, 17, 6678.
- 8) R. D. Palmiter *et al.*, *EMBO J.*, **1996**, 15, 1784.
- 9) H. Manev *et al.*, *Exp. Neurol.*, **1997**, 146, 171.
- 10) Z. Melkova *et al.*, *FEBS Lett.*, **1997**, 403, 273.
- 11) R. D. Lohmann and D. Beyersmann, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1993**, 190, 1097.
- 12) C. Giannakis *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1991**, 181, 915.
- 13) P. D. Zalewski *et al.*, *Chem. Biol.*, **1994**, 1, 153.
- 14) D. K. Perry *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, 18530.
- 15) D. Gergel and A. I. Cederbaum, *Biochemistry*, **1996**, 35, 16186.
- 16) D. Berendji *et al.*, *FEBS Lett.*, **1997**, 405, 37.
- 17) J. G. Reyes *et al.*, *Biol. Res.*, **1994**, 27, 49.
- 18) C. J. Frederickson *et al.*, *J. Chem. Neuroanat.*, **1992**, 5, 521.
- 19) T. Koike *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 12696.
- 20) 木村榮一, 小池透, 現代化学, **1997**, 316, 31.