

# 新規蛍光プローブ **SPiDER-βGal** による 細胞老化マーカー SA-β-gal の迅速検出

Rapid detection of cellular senescence marker SA-β-gal  
by novel fluorescent probe SPiDER-βGal

○野口克也, 大内雄也, 石山宗孝 (株式会社同仁化学研究所)  
○Katsuya Noguchi, Yuya Ohuchi, Munetaka Ishiyama Dojindo Laboratories

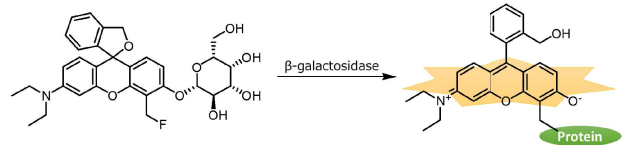
## Introduction

細胞は分裂を繰り返していくと不可逆的に分裂を停止する。これを細胞老化と呼び、がん化を抑制するための防御システムと考えられている。また近年、細胞老化と個体老化の関連が示唆されており、細胞老化研究は活発になっている。

簡便な細胞老化マーカーとして senescence-associated β-galactosidase (SA-β-gal) が用いられている。SA-β-gal を検出するには X-gal を用いた比色法が汎用されているが、この手法の主な問題点として下記の4点がある。

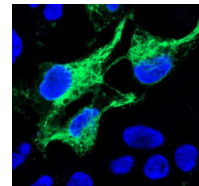
- 1) 染色された細胞とそうでない細胞を目視により判別ため定量性に欠ける。
- 2) 細胞を固定化する必要がある。
- 3) 染色に時間を要する(4~16時間)。
- 4) 加水分解による非特異的な発色。

これらの問題点を解決するため、今回我々はβ-ガラクトシダーゼ活性を検出するための新規蛍光プローブ SPiDER-βGal を使用した SA-β-gal 染色を試みた。SPiDER-βGal は、細胞内のβ-ガラクトシダーゼと反応すると強い蛍光を発する。また同時に、周辺のタンパク質と結合するため細胞外に漏出しにくいという特長を持つ。さらにこの蛍光プローブは細胞膜を透過するため生細胞への適用が可能である。今回、過酸化水素や tert-ブチルヒドロペルオキシドによって細胞老化を誘導した WI-38 細胞に対して本プローブを使用し、蛍光イメージング及びフローサイトメトリーによる SA-β-gal の検出を試みた。



### SPiDER-βGal の特長

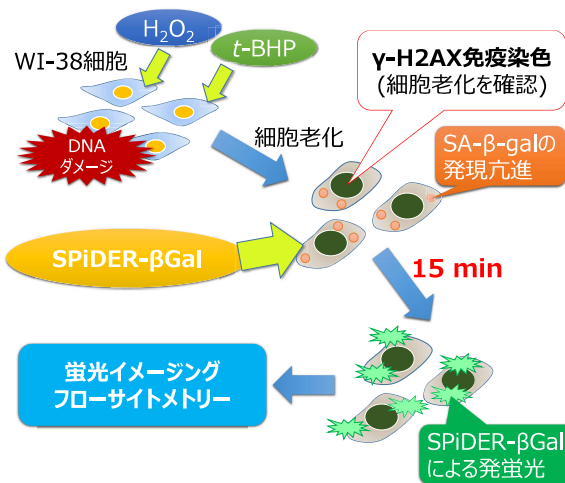
- ✓ 生細胞に適用可
- ✓ 高感度
- ✓ シングルセル解析が可能



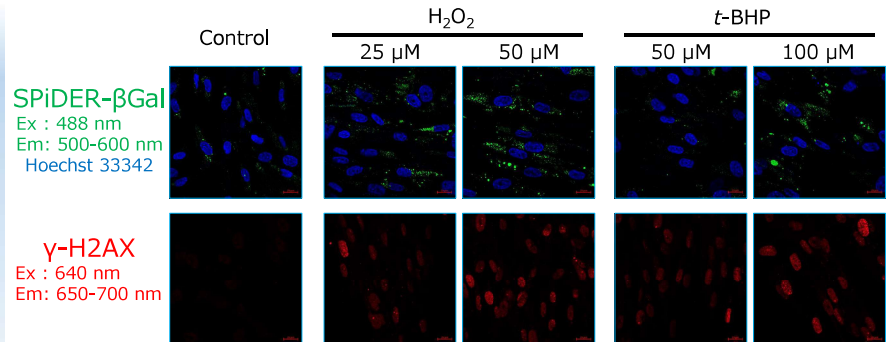
Live imaging of HEK-LacZ(+) cells and HEK-LacZ(-) cells with SPiDER-βGal. (green: SPiDER-βGal, blue: Hoechst 33342)

T. Doura, M. Kamiya, F. Obata, Y. Yamaguchi, T. Y. Hiyama, T. Matsumoto, A. Fukumizu, M. Noda, M. Miura, Y. Urano, "Detection of LacZ-Positive Cells in Living Tissue with Single-Cell Resolution.", *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2018.

## 酸化ストレスによる細胞老化誘導と SPiDER 染色法

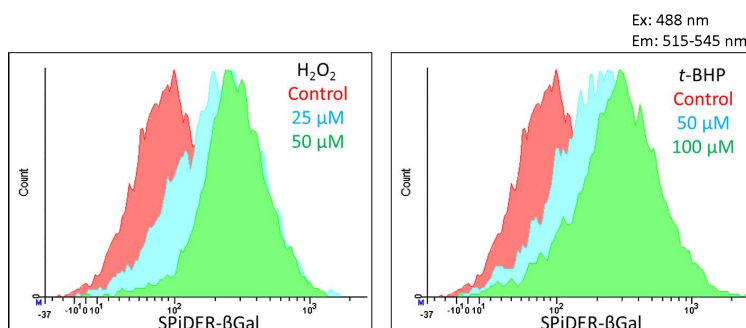


## ライブセル蛍光イメージングによる SA-β-gal の検出



老化誘導した細胞において DNA 損傷を指標とした老化マーカーである γ-H2AX を検出、同時に SPiDER-βGal 由来の蛍光も観察された。

## フローサイトメトリーによる老化細胞の検出



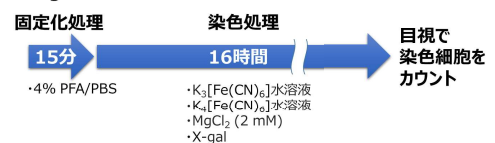
老化誘導した細胞において SPiDER-βGal 由来の蛍光が観察された。

## Conclusion

- 新規蛍光プローブ SPiDER-βGal は、
- ① 老化マーカーである SA-β-gal を簡便かつ短時間(15分間)で検出することができた。
  - ② 生細胞への適用が可能であった。
  - ③ フローサイトメトリーを用いた老化細胞の定量に有用であった。

## X-gal 法との比較

### ○ X-gal 染色



### ○ SPiDER-βGal 染色



	X-gal		SPiDER-βGal
passage	15 min	5 h	15 min
2nd			
14th			

SPiDER-βGal 染色は X-gal 染色より迅速であった。