



DOJIN NEWS

2016 No.159

ISSN 0385-1516

ドージンニュース

CONTENTS

●Review

光線力学療法で発生する
一重項酸素の視覚化のための
蛍光プローブ Si-DMA の開発

大阪大学産業科学研究所
金 水緑、藤塚 守、真嶋 哲朗

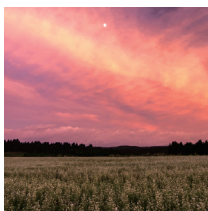
内外分泌細胞における硫化水素を
はじめとしたガス性情報伝達物質の
細胞内 Ca^{2+} 動態に及ぼす作用

北海道大学
葉原 芳昭
Zagazig University
Moustafa Amira

●Topics on Chemistry

活性イオウ分子種による tRNA の
チオメチル化修飾と生理機能

株式会社同仁化学研究所
立中 佑希



表紙撮影：波野村そば畑
photo：永島俊介氏

CONTENTS

Review

光線力学療法で発生する一重項酸素の視覚化のための
蛍光プローブSi-DMAの開発 ●———— [1]

大阪大学産業科学研究所 金 水縁、藤塚 守、真嶋 哲朗

内外分泌細胞における硫化水素をはじめとした
ガス性情報伝達物質の細胞内Ca²⁺動態に及ぼす作用 ●———— [9]

北海道大学 葉原 芳昭

Zagazig University Moustafa Amira

Topics on Chemistry

活性イオウ分子種による tRNA のチオメチル化修飾と生理機能
株式会社同仁化学研究所 立中 佑希 ●———— [12]

Commercial

ミトコンドリア局在型一重項酸素検出蛍光プローブ ●—— [8]

サルフェン硫黄検出用蛍光プローブ ●———— [13]

生体イオウ関連研究用試薬 ●———— [14]

レドックス応答性タンパク質解析キット及び試薬 ●—— [16]

抗体・タンパク質 (50-200 μg) 標識キット ●—— [17]

新製品

ミトコンドリア染色試薬 ●———— [8]

少量抗体 (10 μg) 標識キット ●———— [17]

開発中

硫化水素検出用蛍光プローブ ●———— [13]

お知らせ

試薬比較ページのご案内 ●———— [8]

学会発表ポスターの紹介 ●———— [16]

架橋・標識試薬の選び方、使い方がわかる！ ●———— [17]

27thフォーラム・イン・ドージン開催後記 ●———— [18]

新製品案内

*容量・価格等の詳細は各ページをご覧ください。

ミトコンドリア染色試薬

MitoBright Series

少量抗体 (10 μg) 標識キット

Ab-10 Rapid HiLyte Fluor™ 555

Labeling Kit

Ab-10 Rapid HiLyte Fluor™ 647

Labeling Kit

※希望納入価格には消費税等は含まれておりません。

光線力学療法で発生する一重項酸素の視覚化のための蛍光プローブ Si-DMA の開発 Development of Si-DMA as the Fluorescence Probe to Visualize Singlet Oxygen during Photodynamic Therapy



金 水縁

大阪大学産業科学研究所
励起分子化学分野
特任助教



藤塚 守

大阪大学産業科学研究所
励起分子化学分野
大阪大学大学院工学研究科
准教授



真嶋 哲朗

大阪大学産業科学研究所
励起分子化学分野
大阪大学大学院工学研究科
教授

Abstract

Photodynamic therapy (PDT) is a therapeutic treatment using light and photosensitizer, which generates cytotoxic substances by light irradiation. Singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), a reactive oxygen species generated by photosensitizer in the triplet excited state, plays a key role in cytotoxicity of PDT. Thus, understanding the behavior of intracellular $^1\text{O}_2$ is important in order to elucidate molecular mechanism and improve therapeutic efficacy of PDT. In this review, how to develop a fluorescence probe for visualization of intracellular $^1\text{O}_2$ during PDT is illustrated with a brief introduction of photoinduced electron transfer (PET).

1. はじめに

光線力学療法 (Photodynamic therapy、PDT) は、光励起によって活性酸素種を生成する薬物 (= 光増感剤) を投与し、がんのような体内の有害組織および感染症、皮膚病などの疾病を治療する方法である (図 1)。光を利用する様々な治療法に比べ、酸素存在下で励起状態の光増感剤が生成する活性酸素種が、患部を構成す

る細胞の細胞死をもたらすという治療機構が PDT の特徴である¹⁾。光増感剤として、一重項酸素 (Singlet oxygen、 $^1\text{O}_2$) を生成する有機化合物 (例、ポルフィリン誘導体など、図 2) や酸素ラジカルを生成する無機材料 (例、 TiO_2 などの半導体、励起に紫外光が必要である場合が多く、主に光殺菌に使用) などが使われている。

PDT は、治療機構によってタイプ I と II に分類される。その

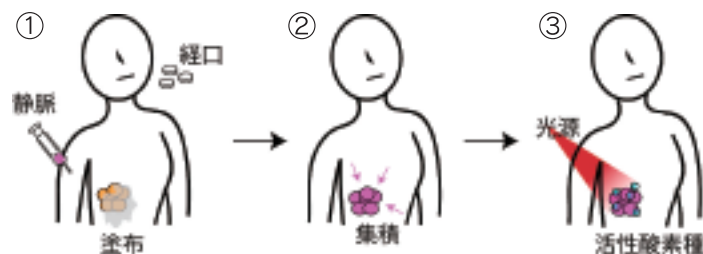


図 1 一般的な PDT の流れ。①治療目的に合わせて適切な薬物 (光増感剤) を投与し、②病理組織に光増感剤が集積されるまで暗室で待機する。その後、③光源 (主に、可視光～近赤外光) で患部を照射すると、励起状態の光増感剤が酸素と反応し高い酸化力をもつ活性酸素種が生成され、有害組織を消去する。

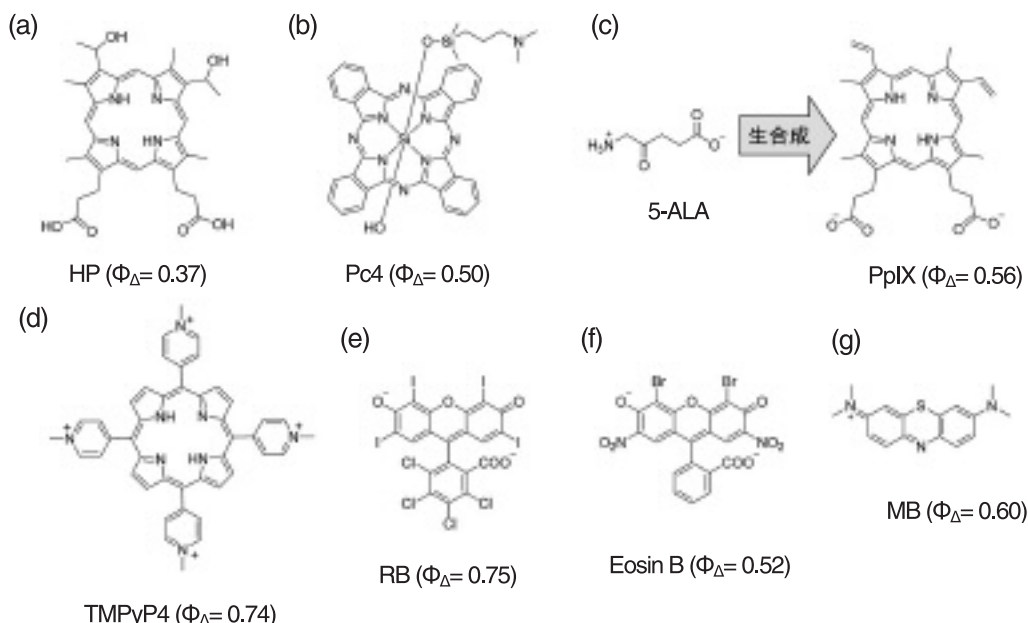


図2 PDTおよび関連研究に使用されている光増感剤とその $^1\text{O}_2$ 生成量子収率(Φ_{Δ})。(a) ヘマトポルフィリン(HP、PhotofrinはHPの誘導体)、(b) ケイ素フタロシアニン(Pc4)、(c) 5-ALA (左) とがん細胞のミトコンドリア内で生合成されるプロトポルフィリン IX(PpIX, 右)、(d) 水溶性のポルフィリン TMPyP4、(e) Rose Bengal (RB)、(f) Eosin B、(g) Methylene Blue (MB)。

定義は、研究分野によって多少異なるが^{2, 3)}、一般的に、光増感剤によって最初に生成される活性酸素種が酸素ラジカルが $^1\text{O}_2$ かによって、前者がタイプⅠ、後者がタイプⅡと呼ばれる。また、生体分子ラジカルが生成される場合もあり、タイプⅠに分類される。現在、FDA (アメリカ食品医薬品局) によって検証されている Photofrin (Porfimer sodium)、5- アミノレブリン酸 (5-ALA、図 2c) などの薬物の多くは、ポルフィリン誘導体が光増感剤として働いている。したがって、医療現場では活性酸素種が $^1\text{O}_2$ であるタイプⅡに基づいた PDT が主流である。

我々は、タイプⅡの治療機構において最も重要な役割を果たす $^1\text{O}_2$ に注目した。 $^1\text{O}_2$ とは、名前の通り一重項状態のスピンを有する励起状態の酸素分子であり、周辺分子の酸化反応を誘起することができる (図 3a)³⁾。スーパーオキシド ($\text{O}_2^{\cdot-}$)、ヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) のような酸素ラジカルが電子移動反応によって発生するのに対し、 $^1\text{O}_2$ は三重項励起状態の光増感剤と三重項基底状態の酸素分子間のエネルギー移動 (三重項-三重項エネルギー移動反応、Triplet-triplet energy transfer、TTET) から発生する (図 3b)。一方、活性酸素種間の連鎖反応 (Haber-Weiss 反応、 $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow ^1\text{O}_2 + \cdot\text{OH} + ^-\text{OH}$) によって $^1\text{O}_2$ が発生する可能性もある。しかし、様々な生体分子が混みあっている細胞内環境で、このような活性酸素種間の二次反応を介して発生する $^1\text{O}_2$ は極めて少量であると考えられる。

$^1\text{O}_2$ は水中で短い寿命 (約 $3 \mu\text{s}$) を持ち、Einstein 式、 $\langle x^2 \rangle = 2Dt$ (x 、 D 、 t はそれぞれ物質の拡散距離、拡散係数、拡散する物質の寿命) から、数百 nm 程度まで拡散することが予想される⁴⁾。さらに、Linker 教授らは、溶媒による $^1\text{O}_2$ の失活速度が速いほど、拡散による自然減衰よりも、 $^1\text{O}_2$ が周辺分子との酸化反応を起こす確率が増加することを明らかにした⁵⁾。つまり、 $^1\text{O}_2$ が急速に失活する水中 ($k_d = 3.2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$) では、Einstein 式で計算した

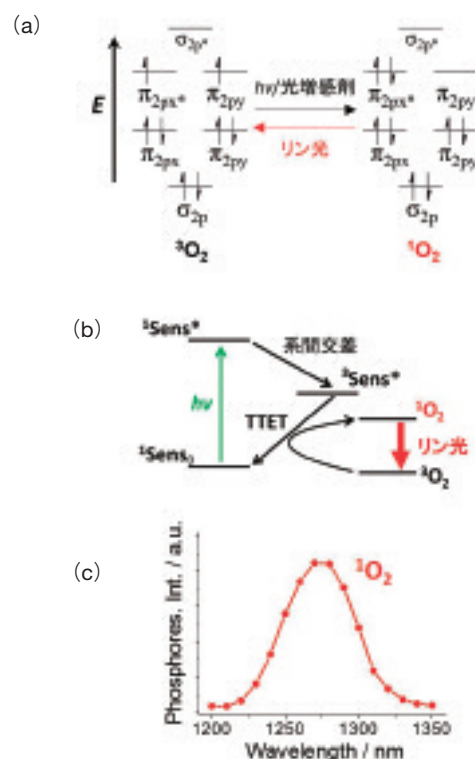


図3 (a) 基底状態の酸素分子 ($^3\text{O}_2$) と $^1\text{O}_2$ の電子配置。 (b) 光増感剤 (Sens) から三重項-三重項エネルギー移動 (TTET) による一重項励起状態の酸素分子 ($^1\text{O}_2$) の生成と (c) そのリン光スペクトル (TMPyP4 の空気飽和水溶液、 $\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$)

表 1 光増感剤の初期位置による PDT 細胞毒性⁶⁾

初期位置	細胞への影響 [†]
ミトコンドリア	ミトコンドリア膜電位の消失 アポトーシス促進因子の放出
小胞体	カルシウム濃度の恒常性変化 タンパク質の変性
ライソソーム	アポトーシス誘発
微小官	細胞形態の変形 細胞有糸分裂に障害
細胞膜	細胞膜破壊 アポトーシス誘発
細胞核	DNA 損傷

[†]細胞種と光増感剤の種類によって異なる場合がある。

最大拡散距離 ($^1\text{O}_2$ の寿命分布を考慮し、約 100 ~ 300 nm) よりはるかに近くに存在する生体分子 (数十 nm の範囲) のみ $^1\text{O}_2$ と酸化反応が起こることを示唆する。よって、光増感剤の初期位置が PDT の細胞死過程において最も重要であると考えられる (表 1)⁶⁾。

しかしながら、数十~数百 nm 程度拡散して減衰する $^1\text{O}_2$ が、周辺の生体分子に対してどのような化学反応を誘起し、約 20 μm に達する細胞全体に変化を及ぼすのかについてはまだ解明されていない。特に、 $^1\text{O}_2$ が誘起する初期の生体分子の酸化反応を解明するためには、細胞内 $^1\text{O}_2$ の生成および拡散を実時間視覚化する技術が必要不可欠である。

2. $^1\text{O}_2$ の検出方法

最も直接的に $^1\text{O}_2$ の動的挙動を観測する方法は、 $^1\text{O}_2$ の時間分解リン光測定である (図 3c)⁷⁾。しかし、近赤外光領域である 1270 nm 付近で $^1\text{O}_2$ のリン光を観測するためには、高価な高感度赤外光領域検出器が必要である。さらに、水中 $^1\text{O}_2$ リン光の強度は非常に弱いため、その生成を 2 次元像として観測する際、リン光強度を増幅する工夫をしなければならない。例えば、リン光寿命が長くなる重水の培養条件で、5 秒の露光時間および 1 細胞レベルで $^1\text{O}_2$ 生成を視覚化した報告例がある⁸⁾。しかし、重水で得られた結果に基づいて生体現象を解明することは困難である。また、細胞内での $^1\text{O}_2$ の挙動を理解するためには、0.1 s 以下で、かつ小器官レベルの時空間分解能での $^1\text{O}_2$ の視覚化が必要である。

より簡便に $^1\text{O}_2$ を検出するため、 $^1\text{O}_2$ と選択的に反応する化合物を使用する方法がある (図 4)。 $^1\text{O}_2$ は、Schenck-ene 反応、付加環化反応などの独特な酸化反応を誘起するため、アントラセン (図 5a)、ベンゾフラン (図 5b) などが $^1\text{O}_2$ を選択的に捕捉する化合物として知られている。これらの芳香族分子の吸光度および蛍光強度は、 $^1\text{O}_2$ との反応によって減少し (図 4a)、その変化量から $^1\text{O}_2$ 生成量を準定量的に測定することが可能である。また、 $^1\text{O}_2$ との反応によってラジカル種になる化合物 (2,2,6,6-tetramethylpiperidine、TEMP、図 5c) を使用し、電子スピン共鳴法 (Electron spin resonance、ESR) を用いて検出する方法もある。

1999 年、蛍光色素と消光剤を組み合わせた $^1\text{O}_2$ 蛍光プローブが東大薬学研究科の長野教授らによって提案された (図 5d)⁹⁾。蛍光色素としてフルオレセイン、消光剤としてアントラセン誘導体

(a) $^1\text{O}_2$ が色素を直接酸化するプローブ (蛍光オフ)

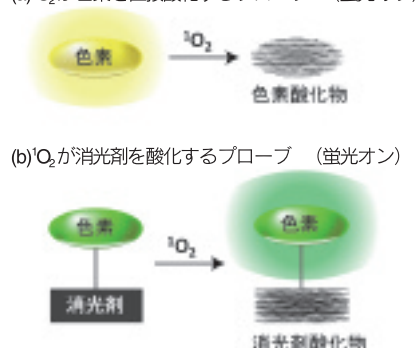


図 4 蛍光色素を利用した $^1\text{O}_2$ プローブ。(a) $^1\text{O}_2$ が色素の酸化反応を誘起し色素酸化物となるため、色素の吸光度および蛍光強度が減少する (蛍光オフ)。(b) 初期状態では、色素と消光剤間で起きる光化学反応 (光誘起電子移動、蛍光共鳴エネルギー移動など) を介し、色素の蛍光が消光される。一方、 $^1\text{O}_2$ が色素に結合している消光剤に酸化反応を誘起し消光剤酸化物となると、色素の発光強度が増加する (蛍光オン)。

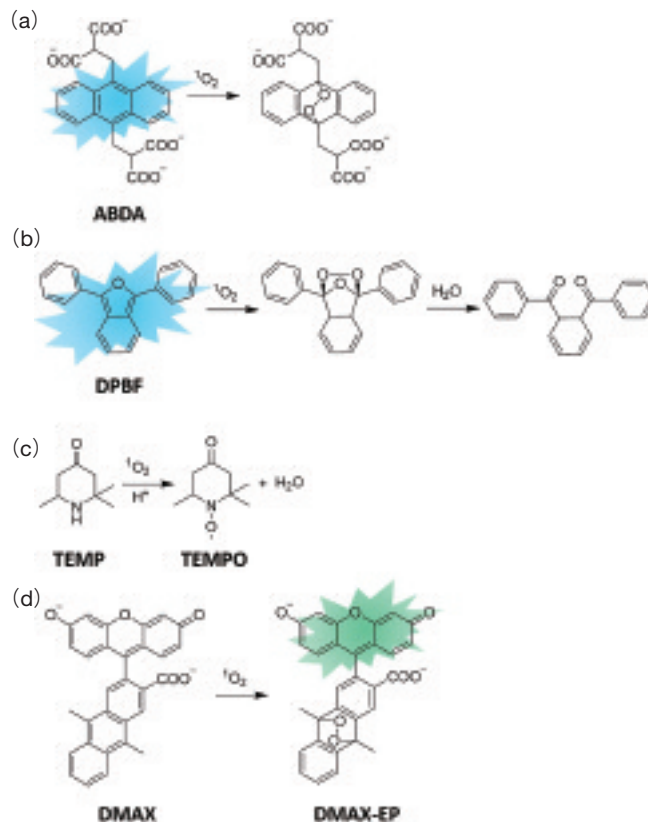


図 5 $^1\text{O}_2$ 検出に使用されている化合物と $^1\text{O}_2$ との酸化反応。(a) 9,10-Anthracenediyl-bis(methylene)dimalonic acid (ABDA) と (b) 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF) のいずれも $^1\text{O}_2$ との酸化反応によって酸化物となるため、吸光度および蛍光強度が減少する。(c) ESR 用プローブ TEMP は $^1\text{O}_2$ との酸化反応によってラジカル TEMPO が発生し ESR で検出できる。(d) 蛍光色素と消光剤が結合したダイアド (DMAX[®]) の蛍光は弱いが $^1\text{O}_2$ との酸化反応によって緑色蛍光が増加する。

を用い、緑色光でフルオレセインを選択的に光励起すると、アントラセン部位からフルオレセインへの電子移動が起こり、蛍光が消光される。従来の有機分子プローブと比べて進歩した点は、 $^1\text{O}_2$ の検出によって蛍光強度が減少するのではなく、蛍光強度の増加が達成できたことである(図4b)。このような蛍光オン型のプローブの場合、より少量のターゲット物質の検出が可能である。次章でこの蛍光プローブの駆動原理となる光誘起電子移動について簡単に紹介する。

3. 光誘起電子移動 (Photoinduced electron transfer, PET)

PETとは、光励起によって誘起される電子移動反応である¹⁰⁾。光励起の対象となる発色団を光励起すると、一つの電子が高いエネルギーの分子軌道に遷移した励起状態になる。そこで発色団は、分子間のエネルギー準位との関係により電子アクセプター(一電子酸化剤)になることもあり(図6a)、また、電子ドナー(一電子還元剤)になることもある(図6b)。PETが起こる反応速度は、マーカー理論に従い、電子移動反応の自由エネルギー変化(ΔG)に大きく依存する。PETの ΔG はRehm-Weller式、 $\Delta G = E_{D/D^+} - E_{A/A^-} - E_{0,0} - E_c$ (E_{D/D^+} 、 E_{A/A^-} 、 $E_{0,0}$ 、 E_c はそれぞれドナーの酸化電位、アクセプターの還元電位、励起される発色団の励起状態のエネルギー、クーロンエネルギー)から計算でき、電子ドナーと電子アクセプターの酸化還元電位の差、周辺溶媒の極性、電子ドナーとアクセプターとの間の距離などがPETの反応速度を決める重要な因子である。

蛍光プローブのオンオフ比を大きくするため、オン状態の蛍光量子収率(Φ_f)を最大に、または、オフ状態の Φ_f を最小にすることが必要である。そこで、 $\Phi_f = k_f / (k_f + k_{nr})$ (k_f 、 k_{nr} はそれぞれ輻射遷移(蛍光)速度、無輻射遷移速度)から考えてみると、一般的な蛍光色素の蛍光寿命($\tau_f = 1 / (k_f + k_{nr})$)である数ナノ秒よりも高速な無輻射失活過程である分子内PETが起こると、より暗いオフ状態のプローブを設計できる。

DMAXの場合(図5d)、蛍光色素を緑色光で励起すると、電子アクセプター性の高いフルオレセインの一重項励起状態が生成し、アントラセンのHOMO(Highest occupied molecular orbital)からフルオレセインのHOMOに分子内PETが起こる(図6a)。したがって、フルオレセインの一重項励起状態は蛍光発光によって失活されず、アントラセンからの電子移動による電荷分離状態の生成により高速に失活する¹¹⁾。一方、アントラセンが $^1\text{O}_2$ と反応しエンドペルオキシドを生成すると、その電子ドナー性が低下し、一重項励起状態のフルオレセインへの電子移動が起こらない。そのため、 $^1\text{O}_2$ が存在する際、DMAXの Φ_f が約0.02から0.81に増加すると説明されている⁹⁾。

4. ケイ素ローダミン-アントラセンダイアドを用いた細胞内 $^1\text{O}_2$ 蛍光プローブの分子設計

$^1\text{O}_2$ の検出のために使われるこれらの化合物(図5)は、細胞実験の用途で開発されているものではないため、細胞透過性を有しない、または、細胞内で非特定な場所を染色することが知られている。したがって、我々はPDT中で発生する $^1\text{O}_2$ を細胞内で視覚化できる蛍光プローブの開発に着手した。その分子設計において、自己蛍光を発生しない遠赤色～近赤外光で励起可能な色素、優れ

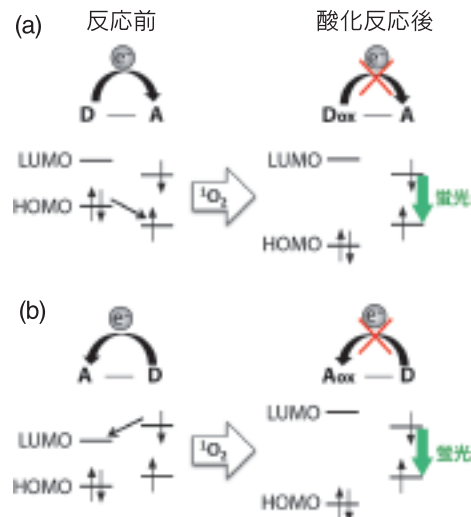


図6 色素部位が分子内PETの電子アクセプター(a)、または、ドナー(b)になる場合の $^1\text{O}_2$ 蛍光プローブの発光原理。色素部位がフルオレセイン、反応部位がジメチルアントラセンであるDMAXは、色素部位が電子アクセプターとして働く(a)。実際、標的物質がドナーとアクセプターのどちらかの分子と選択的に反応を起こすことができれば、一般的に使用可能な蛍光プローブ分子設計である。

た細胞透過性を有する分子構造、 $^1\text{O}_2$ と選択的に反応する捕捉部位の導入の3点を考慮した。

生体イメージングにおいて青～緑色の励起光が問題視されている理由は、細胞の内因性発色団(例、ポルフィリン、フラビン、一部のアミノ酸など)からの自己蛍光を誘起するためである。自己蛍光が強すぎる場合、蛍光プローブからの信号との区別が困難である。よって、細胞小器官レベルで $^1\text{O}_2$ 生成の視覚化を実現するためには、内因性発色団からの自己蛍光が抑制される赤色～近赤外領域に吸収帯をもつ蛍光プローブを利用することが必要である。赤色～近赤外光を吸収および発光する有機蛍光色素としてCy5、Cy7、テキサスレッド、ローダミン800、Aza-BODIPYなどが使用されている。さらに、 Φ_f の大きい(k_f が大きい、 k_{nr} が小さい)蛍光色素をプローブに用いると、より高い発光性のオン状態のプローブが設計できる。一方、系間交差を経て自ら活性酸素種を発生する蛍光色素や、自己酸化や光退色しやすい蛍光色素は、活性酸素種の蛍光プローブの発色団として相応しくない。

我々は、色素の光安定性、光学的特性、色素分子の大きさ(一般的に、 π 電子共役系が大きくなるほど吸収帯が長波長シフトするが、細胞透過性と水溶性が低下する)などの要素を考慮し、ケイ素ローダミン(SiR)を選んだ。SiRとは、ローダミン色素の酸素がジメチルシランに置換されたローダミン誘導体を総称し(図7a)、超高分解顕微鏡法、*in vivo*イメージングなどの蛍光色素としてよく使われている¹²⁾。Siの低いLUMO(Lowest unoccupied molecular orbital)エネルギー準位により、類似の化学構造を有するテトラメチルローダミンに比べて約100 nm長波長シフトした吸収帯を示す(表2)。さらに、ローダミン系の色素は+1の正味電荷と適度の脂溶性を持っているため、細胞内のミトコンドリアを選択的に染色できるといった利点がある。

アントラセン誘導体が $^1\text{O}_2$ を選択的に捕捉することを利用し、SiRにアントリルフェニレン(An)が結合されたSiR-Anを合成

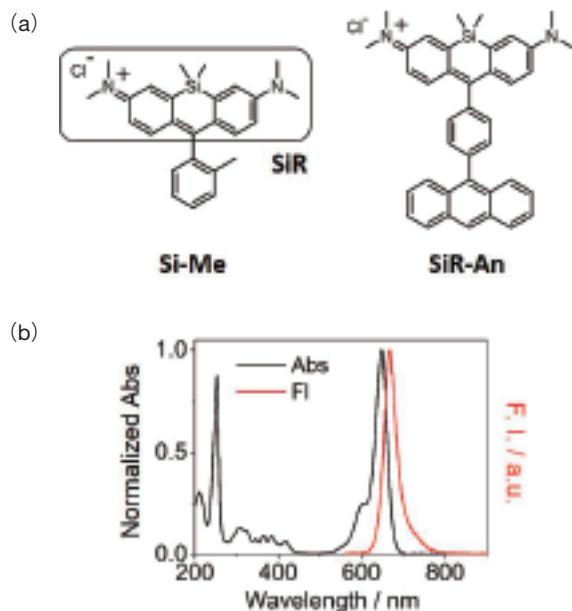


図7 (a) ケイ素ローダミン誘導体 Si-Me とケイ素ローダミン-アントリルフェニレンジアド (SiR-An)、(b) メタノール中 SiR-An の吸収 (黒) および蛍光スペクトル (赤)。

した (図 7a)¹³⁾。その吸収スペクトルから、SiR と An が結合していることを確認し (図 7b)、その Φ_f はケイ素ローダミン誘導体 Si-Me より約 6 倍低い 0.05 であった (表 2)。ただし、SiR-An の $\Phi_f = 0.05$ は、分子内 PET が数ピコ秒～数十ピコ秒の時間帯で起こることから予想される $\Phi_f < 0.01$ に比較して大きい。そこで、アントラセンと SiR の間に本当に PET が起こるかについて、レーザーフラッシュフォトリシスおよびパルスラジオリシスを用いて確認した。これら過度吸収分光法は、パルスレーザーあるいは電子線パルスを試料に照射し、生成される様々な過渡種の吸収スペクトルを時間分解測定する方法である。SiR-An において、SiR の選択的光励起によって分子内 PET が起こるならば、SiR の一重項励起状態 ($^1\text{SiR}^*$) 生成とほぼ同時に、SiR と An のラジカルイオン対 (電荷分離状態) の過渡吸収が観測できると予想される。

まず Si-Me を使い、SiR 部位の一重項励起状態 ($^1\text{Si-Me}^*$) およびラジカルイオン ($\text{Si-Me}^{\bullet-}$ 、 $\text{Si-Me}^{\bullet+}$) の過渡吸収スペクトルを測定した (図 8a)¹⁴⁾。次に SiR-An のフェムト秒レーザーフラッシュフォトリシスにおいて、レーザー照射後 $^1\text{Si-Me}^*$ のみが観測され、分子内 PET が起こらないことを示す (図 8b)。一方、SiR-ジメチルアントラセンダイアド (5. Si-DMA 参考) の場合、 $^1\text{Si-Me}^*$ とラジカルアニオン ($\text{Si-Me}^{\bullet-}$) が同時に観測され、PET による電荷分離状態 ($\text{SiR}^{\bullet-}$ と $\text{An}^{\bullet+}$ 、注：後者は SiR の基底状態の吸収スペクトルと同じ波長領域に吸収を持つため、明確に観測できない)

表 2 ケイ素ローダミン誘導体 Si-Me、およびケイ素ローダミン-アントラセン誘導体ダイアド (SiR-An、Si-DMA) の光学特性 (溶媒はメタノール)

ケイ素ローダミン誘導体	$\lambda_{\text{abs}} / \text{nm}$	λ_f / nm	Φ_f
Si-Me	647	665	0.32
SiR-An	648	667	0.05
Si-DMA	651	678	0.01

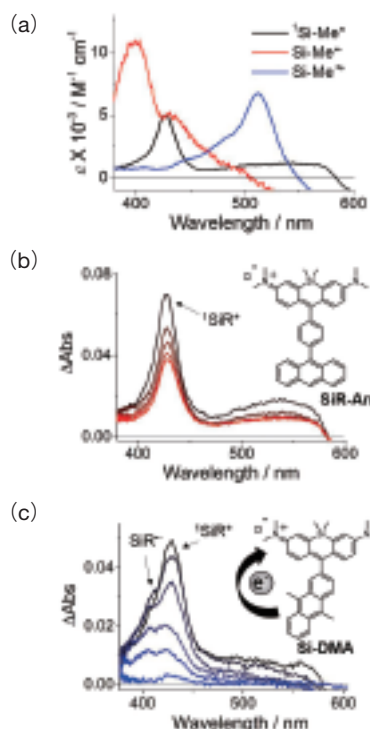


図8 (a) ケイ素ローダミン (SiR) の標準色素として Si-Me を使い、その励起状態 ($^1\text{Si-Me}^*$) およびラジカルイオン ($\text{Si-Me}^{\bullet-}$ 、 $\text{Si-Me}^{\bullet+}$) の吸収スペクトルを測定した。(b) SiR-An (レーザー照射後、0.4、5.2、17、53 および 73 ps 後) と (c) Si-DMA (レーザー照射後、0.4、1.2、3.0、5.2、10.2 および 53 ps) の過渡吸収スペクトルの変化 ($\lambda_{\text{ex}} = 650 \text{ nm}$ 、溶媒はメタノール)

が生成することがわかった (図 8c)^{14,15)}。

これらの実験を通して、次のような SiR-An の特性および $^1\text{O}_2$ 蛍光プローブの開発への課題点が明らかになった。

1. Si-Me に比べて SiR-An の Φ_f が約 6 倍以上減少した。これは、SiR とフェニレンの間の自由回転によって、励起エネルギーが蛍光ではなく、熱として溶媒分子に発散したからである (無輻射遷移)。
2. SiR-An においては、SiR と An の間での PET が起こらない。これは、(1) $^1\text{SiR}^*$ の還元電位と An の酸化電位の関係から、PET の $-\Delta G$ が十分に大きくない、(2) SiR とアントラセン基との間にフェニレン基が存在するため、ドナー (SiR) とアクセプター (アントラセン基) との距離が長くなり、PET が輻射遷移 (蛍光) より遅いことに起因すると考えられる。すなわち、PET を活用した蛍光プローブを分子設計するには、蛍光色素と消光剤が直接結合している分子構造が好ましい。
3. SiR-An は、細胞のミトコンドリアに集積される (図 9)¹³⁾。つまり、SiR-An と同程度の分子の大きさと脂溶性を持ちながら、カチオン性の SiR 色素を利用した蛍光プローブを開発すれば、PDT において重要なターゲットであるミトコンドリアで発生する $^1\text{O}_2$ を検出できると予想される。
4. SiR-An は、 $^1\text{O}_2$ との反応速度が非常に遅く、反応による蛍光増加が確認できなかった。これは、分子内 PET が起こらない、かつ、求電子剤の $^1\text{O}_2$ が SiR-An のアントラセン基と容易に反応しないことを示唆する。したがって、 $^1\text{O}_2$ との反応性を高めるためには、

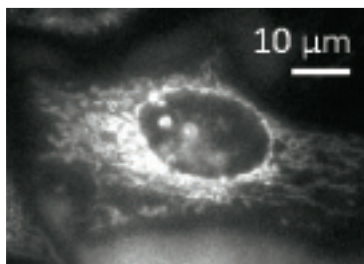


図9 HeLa 細胞のミトコンドリアに選択的に局在化した SiR-An の蛍光写真 ($\lambda_{ex} = 640$ nm)。

アントラセンの 9,10 位に電子供与基を導入し、電子密度を増加させることが必要である。

5. Si-DMA による細胞内 1O_2 の視覚化

SiR-An の結果に基づいて、9,10-ジメチルアントラセンと SiR を直接結合した Si-DMA の開発に成功した (図 10a)¹⁵⁾。 1O_2 が存在しない環境では Si-DMA の Φ_f は約 0.01 であり、Si-Me (表 2) の Φ_f より約 32 倍減少した (図 10a)。一方、 1O_2 が生成されると、Si-DMA の蛍光強度が最大 18 倍増加することを確認した (図 10b)。したがって、アントラセンの 9,10 位に電子供与基であるメチル基を導入することによって 1O_2 との反応性が増加することが示唆された。

そこで、Si-Me に比較し、Si-DMA の Φ_f の約 32 倍の減少が PET に起因するのかを確認するために、 Φ_f の溶媒依存性の検討と過渡吸収測定 (図 8c) を行った。その結果、溶媒の誘電率が小さくなるほど Si-DMA の Φ_f が大きくなることを確認し、PET の電子移動速度が溶媒の誘電率に反比例する特徴と一致した。また、Si-DMA の 650 nm フェムト秒レーザーフラッシュフォトリシスにおいて (図 8c)、 $^1SiR^*$ ($^1Si-Me^*$) とともに SiR^{*-} ($Si-Me^{*-}$) の生成が観測された。よって、Si-DMA は分子内 PET によって蛍光消光されることを示す¹⁴⁾。PET に関して、Si-DMA と SiR-An との差異は、Si-DMA の場合、(1) 電子ドナーとアクセプターとの間の距離が近く、(2) 9,10-ジメチルアントラセン ($E_{ox} = 1.05$ V vs. SCE) がアントラセン ($E_{ox} = 1.19$ V vs. SCE) より酸化されやすいので、PET の $-\Delta G$ が十分に大きく、PET 速度が速くなり、電荷分離状態が高効率で生成することに起因すると考えられる。

次に細胞を使用した実験を行い、約 100 nM 以下の濃度で Si-DMA を 30 分間インキュベーションすると、ミトコンドリアに集積されることを確認した (図 11)¹⁵⁾。Si-DMA を用いてミトコンドリアで生じる 1O_2 を視覚化するためには、その内部に 1O_2 を生成できる光増感剤を導入することが必要である。我々は、市販の PDT 薬剤である 5-ALA を使用した。5-ALA はヘムの前駆体であり、がん細胞内では特異的にノンヘムポルフィリン (PpIX) をミトコンドリアに蓄積させる効能がある (図 2c)。本実験では、HeLa 細胞に 5-ALA を加え 3 時間インキュベーションし、ミトコンドリアに PpIX を生合成させた後、20 ~ 100 nM Si-DMA を加え 30 分間インキュベーションした。そこで、赤色レーザー ($\lambda_{ex} = 640$ nm) を用いて PpIX と Si-DMA を同時に励起した結果、約 20 秒以内に Si-DMA の蛍光が初期値の約 2 倍に増加した (図 12a)¹⁵⁾。

一方、他の細胞内器官 (ライソソーム) に局在化した TMPyP4 の光増感作用によって生成した 1O_2 (図 12b)、ミトコンドリア内

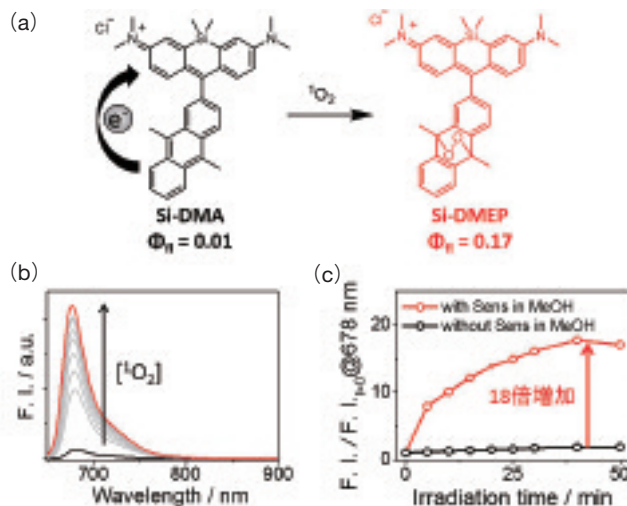


図10 (a) Si-DMA と 1O_2 との付加反応によって生成する Si-DMEP の化学構造とその Φ_f 。(b-c) 光増感剤 (TMPyP4) の光照射 (510-550 nm, 0.07 W cm $^{-2}$) によって発生する 1O_2 との付加反応による Si-DMA の蛍光強度 (F. I.) の増加 ([SiR-An] = 50 μ M, [TMPyP4] = 5 μ M)。

に存在する光増感タンパク質 (KillerRed) が生成した酸素ラジカル (図 12c)、または、細胞の酸化バースト過程で生成された酸素ラジカルによっては、ミトコンドリア内の Si-DMA の蛍光増加は観測されなかった。これらの実験結果から、 1O_2 の細胞内拡散距離は、理論通り数十~数百 nm に過ぎないこと、また、酸素ラジカルの二次反応 (Haber-Weiss 反応など) による 1O_2 の生成量は無視できる程度 (= 細胞死に影響しない程度) であることがわかった。このような結果は過去文献の報告とも一致し^{6,16)}、Si-DMA が PDT 中に発生する 1O_2 を視覚化できる蛍光プローブであることを立証した。なお、本研究で開発された Si-DMA は国内外特許出願を経て¹⁹⁾、2016 年 2 月末から世界中で販売開始されている (同仁化学研究所および米国法人 Dojindo Molecular Technologies, Inc., Si-DMA for Mitochondrial Singlet Oxygen Imaging)。

6. おわりに

以上のように、細胞内 1O_2 の視覚化のために必要な蛍光プローブ Si-DMA を開発し、過渡吸収分光法などを用いてその性質調べた。PET の原理を基盤とした蛍光プローブは、分子内 PET の速度を最速にすることによって最も暗いオフ状態を設計でき、 10^3 倍以上のオンオフ比を達成することができる。ただし、溶液中で得られたオンオフ比が細胞内では大幅に低下する場合が多く、蛍光プローブの細胞中での使用において、十分注意しなければならない。これは、溶液中とは異なる細胞内の様々な環境要因 (誘電率、極性、粘度、分子クラウディングなど) が PET 過程に影響を与えたためであると考えられる。

したがって、細胞内での高いオンオフ比を示す蛍光プローブを開発するためには、蛍光共鳴エネルギー移動 (Förster resonance energy transfer, FRET)、凝集誘起発光特性 (Aggregation induced emission enhancement, AIEE)¹⁸⁾、近赤外光励起が可能なアップコンバージョンナノ粒子および二光子吸収発光体などの様々な光化学的原理をプローブの分子設計に採用することが必要である。また、1 細胞内での 1O_2 生成を観測するため、発光プローブのみならず、 1O_2 との反応による色変化 (= 吸収スペクトル

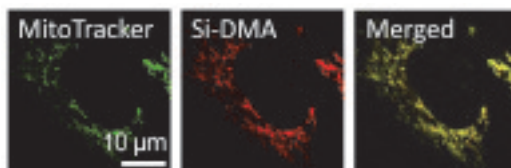


図 11 (左) MitoTracker Green でミトコンドリアを染色、(中) Si-DMA、(右) 左と中の写真を重ねてある。Si-DMA がミトコンドリア内に選択的に局在化することがわかった。

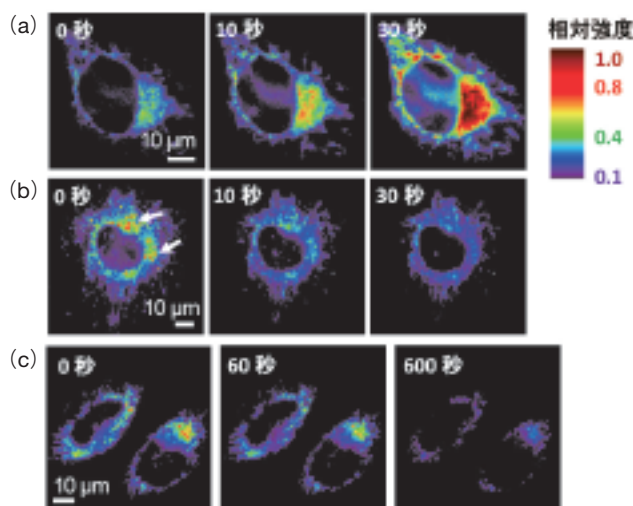


図 12 様々な光増感剤を加えた HeLa 細胞内の Si-DMA の蛍光写真。(a) 5-ALA と Si-DMA を加えた HeLa 細胞に赤色光 ($\lambda = 640$ nm) を 30 秒間照射すると、蛍光強度が約 2 倍増加した。これは低発光性の Si-DMA と 1O_2 との付加反応によって、強発光性の Si-DMEP が生成したことを示す。(b) ライソソームに局在化された TMPyP4 および (c) ミトコンドリアに発現された光増感タンパク質 KillerRed は、Si-DMA の蛍光増加を誘起しなかった。前者は、光増感剤が Si-DMA と数百 nm (1O_2 の細胞内最大拡散距離) より離れている場所で存在する場合、Si-DMA とは酸化反応を起こさないことを示す。一方、後者は、光増感剤と Si-DMA が同じ場所 (ミトコンドリア) に存在しても、光増感剤が主に酸素ラジカルを生成するので Si-DMA の酸化反応を起こさないことを意味する。

変化)¹⁹⁾、ラマン散乱スペクトル変化の測定、または、プラズモン効果を利用した 1O_2 リン光強度の増幅²⁰⁾も検討されている。今後、さらなる 1O_2 高感度定量検出法の進展により、PDT において生成する 1O_2 の視覚化を実現し、より効果的な治療の確立が望まれる。

[参考文献]

- 1) M. R. Hamblin and P. Mroz, *Advances in Photodynamic Therapy: Basic, Translational, and Clinical*; M. R. Hamblin and P. Mróz, Eds.; Artech House: Boston, **2008**, 1.
- 2) D. E. J. G. J. Dolmans, D. Fukumura and R. K. Jain, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, 3, 380; R. W. Redmond, *Advances in Photodynamic Therapy: Basic, Translational, and Clinical*; M. R. Hamblin and P. Mróz, Eds.; Artech House: Boston, **2008**, 41.
- 3) P. R. Ogilby, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 3181.
- 4) E. Skovsen, et al., *J. Phys. Chem. B*, **2005**, 109, 8570.

- 5) M. Klaper, W. Fudickar and T. Linker, *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, 138, 7024.
- 6) N. L. Oleinick, A.-L. Nieminen and S.-M. Chiu, *Advances in Photodynamic Therapy: Basic, Translational, and Clinical*; M. R. Hamblin and P. Mróz, Eds.; Artech House: Boston, **2008**, 115.
- 7) B. Li, et al., *J. Biophoton.*, **2016**, DOI: 10.1002/jbio.201600055; J. W. Snyder, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 14558.
- 8) M. Scholz, et al., *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2014**, 13, 1203.
- 9) N. Umezawa, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, 38, 2899; K. Tanaka, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 2530.
- 10) G. J. Kavarnos and N. Turro, *J. Chem. Rev.*, **1986**, 86, 401.
- 11) T. Miura, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 8666; S. Kim, et al., *J. Phys. Chem. B*, **2013**, 117, 13985.
- 12) Y. Kushida, T. Nagano and K. Hanaoka, *Analyst*, **2015**, 140, 685; J. B. Grimm, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, 55, 1723.
- 13) S. Kim, et al., *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 11580.
- 14) S. Kim, et al., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2016**, 18, 2097.
- 15) S. Kim, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, 136, 11707.
- 16) R. B. Vegh, et al., *Chem. Commun.*, **2011**, 47, 4887.
- 17) T. Majima, S. Kim, T. Tachikawa and M. Fujitsuka, WO 2015194606, A1 (23, Dec., 2015).
- 18) Y. Yuan, et al., *Chem. Sci.*, **2016**, 7, 1862.
- 19) 真嶋哲朗、金水縁、藤塚守、宮田幹二、ハロゲンイオンと一重項酸素の比色分析剤及び一重項酸素検出剤、出願日 H27(2015)6.5. 特願 2015-115290.
- 20) O. Planas, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, 138, 2762.

[著者プロフィール]

氏名：金 水縁 (Sooyeon Kim)

所属：大阪大学産業科学研究所 励起分子化学分野 特任助教

連絡先：〒 567-0047 大阪府茨木市美穂ヶ丘 8-1

TEL : 06-6879-8496 FAX : 06-6879-8499

E-mail : kimsooyeon45@sanken.osaka-u.ac.jp

出身学校：大阪大学工学研究科

学位：博士 (工学)

専門分野：光化学、光生物学

氏名：藤塚 守 (Mamoru Fujitsuka)

所属：大阪大学産業科学研究所 励起分子化学分野

大阪大学大学院工学研究科 准教授

連絡先：〒 567-0047 大阪府茨木市美穂ヶ丘 8-1

TEL : 06-6879-8496 FAX : 06-6879-8499

E-mail : fuji@sanken.osaka-u.ac.jp

出身学校：京都大学工学研究科

学位：博士 (工学)

専門分野：光化学、放射線化学

氏名：真嶋 哲朗 (Tetsuro Majima)

所属：大阪大学産業科学研究所 励起分子化学分野

大阪大学大学院工学研究科 教授

連絡先：〒 567-0047 大阪府茨木市美穂ヶ丘 8-1

TEL : 06-6879-8495 FAX : 06-6879-8499

E-mail : majima@sanken.osaka-u.ac.jp

出身学校：大阪大学工学研究科

学位：博士 (工学)

専門分野：光化学、放射線化学

DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

ミトコンドリア局在型一重項酸素検出 蛍光プローブ

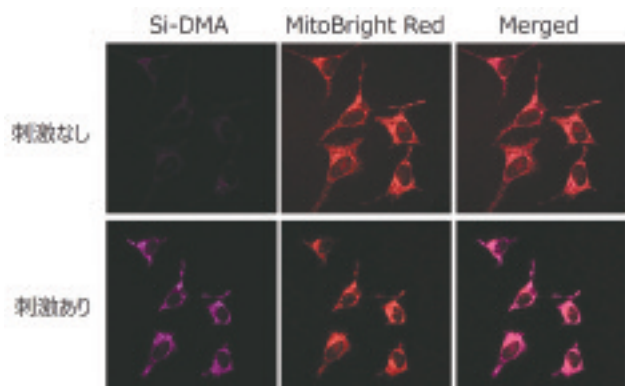
Si-DMA for Mitochondrial Singlet Oxygen Imaging

<特長>

1. 生細胞内の一重項酸素をイメージング
2. ミトコンドリア集積プローブ
3. 蛍光イメージングによる高感度検出

一重項酸素検出試薬 Si-DMA は、容易に細胞膜を透過しミトコンドリアに集積後、選択的に一重項酸素に反応して強い蛍光を発します。このことから Si-DMA は、細胞内一重項酸素のリアルタイムイメージングが可能な蛍光プローブとして、酸化損傷や PDT (光線力学的治療法) などの分野で利用されます。

<実績データ>



生細胞中の一重項酸素検出

HeLa 細胞への刺激 (過酸化水素 100 $\mu\text{mol/l}$ 及び次亜塩素酸 100 $\mu\text{mol/l}$ 添加) の有無で、細胞内に生じた一重項酸素を Si-DMA にて確認した。

励起波長: 600 $\pm$ 25 nm、蛍光波長: 685 $\pm$ 25 nm

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
Si-DMA for Mitochondrial Singlet Oxygen Imaging	2 μg	20,000	MT05

試薬比較ページのご案内

ミトコンドリア研究用試薬の特徴と違いを一覧表で紹介
ミトコンドリア研究用の検出試薬として、マイトファジー検出をはじめ、ROS (活性酸素種) を含む酸化ストレスの検出、更にはミトコンドリア染色および膜電位依存的な各種蛍光プローブの特徴を紹介しています。

QR コード



新製品 DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

ミトコンドリア染色試薬

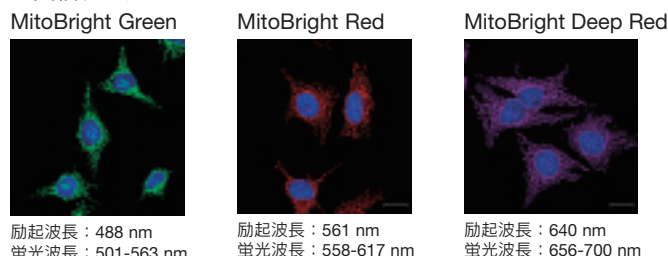
MitoBright Series

<特長>

1. 生細胞のミトコンドリアを特異的に染色
2. ミトコンドリア内での高い滞留性
3. 既存ミトコンドリア染色剤との高い相関

MitoBright は生細胞のミトコンドリアを特異的に染色する蛍光プローブです。MitoBright を用いた染色では、細胞膜透過後に正常なミトコンドリアに集積し蛍光を発します。また集積後ミトコンドリアとの強い相互作用により色素の滞留性が向上しています。

<実績データ>



MitoBright Series によるミトコンドリア染色像

各 MitoBright 染色試薬により HeLa 細胞のミトコンドリアおよび Hoechst 33342 [code: H342] を用いて核 (青) を染色した。

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
MitoBright Green	50 $\mu\text{g} \times 3$	9,800	MT06
MitoBright Red	50 $\mu\text{g} \times 3$	9,800	MT07
MitoBright Deep Red	50 $\mu\text{g} \times 3$	9,800	MT08

関連製品

マイトファジー検出蛍光プローブ

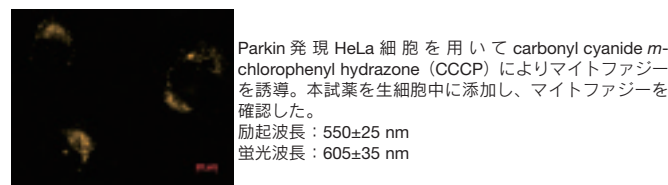
Mitophagy Detection Kit

<特長>

1. 低分子蛍光プローブを用いてマイトファジーを簡便に検出
2. 生細胞を用いたライブイメージングが可能
3. 共有結合によるミトコンドリアへの高い滞留性

マイトファジーは酸化ストレスや DNA 損傷等により不良化したミトコンドリアを選択的に除去するシステムです。本キットの低分子蛍光プローブは、細胞内のミトコンドリアに集積し共有結合により固定化され、マイトファジーが誘導されると蛍光が増強し可視化できます。

<実績データ>



Parkin 発現 HeLa 細胞を用いたマイトファジー染色像

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
Mitophagy Detection Kit	1 set	36,000	MD01

内外分泌細胞における硫化水素をはじめとしたガス性情報伝達物質の細胞内 Ca^{2+} 動態に及ぼす作用 Effects of hydrogen sulfide and other gasotransmitters on intracellular Ca^{2+} dynamics in exocrine and endocrine cells



葉原 芳昭

北海道大学
大学院獣医学研究科
比較形態機能学講座
生理学教室



Moustafa Amira

Zagazig University
Department of Physiology
Faculty of Veterinary Medicine,
Egypt

Abstract

Ca^{2+} plays pivotal roles in regulating a variety of physiological functions in various endocrine and exocrine cells. Stimulation of these cells with specific secretagogues triggers an increase in intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). In addition to these secretagogues, gasotransmitters such as H_2S , NO, and CO also modulate $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Here, we attempted to introduce effects of gasotransmitters on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and presumed intracellular machineries deduced from our recent investigations carried out in pancreatic acinar cells, parotid acinar cells, pancreatic islet β -cells and peritoneal mast cells. Potential interactions among the gases will also be discussed.

キーワード：NO、CO、 H_2S /polysulfide、膵腺房細胞、耳下腺腺房細胞、膵島 β 細胞、肥満細胞、cross-talk、細胞内 Ca^{2+} 、SSP4

1. はじめに

1998年にF. Murad, L. Ignarro, R. Furchgottの3氏に「循環器系における信号伝達物質としての一酸化窒素(NO)の発見」という功績でノーベル生理学・医学賞が授与されてからすでに20年が経とうとしている。この発見は、常温・常気圧で気体で、生体機能に毒性作用をもたらすことはあっても、シグナル分子として生理機能の調節に関わっているとは多くの科学者が予想だにしていなかった時代の秀逸なブレイクスルーであった。今ではNOの血管弛緩・降圧作用の細胞内メカニズムが明らかにされ、内皮細胞・平滑筋細胞ともに細胞内の Ca^{2+} が中心的な役割を担っていることがわかっている。

ところで、気体状態の物質が生理機能を制御している例はNOにとどまらない。NOに続いて、近年、第2のガス性情報伝達物質として一酸化炭素(CO)が、第3のガスとして硫化水素(本稿では H_2S と記載する)が注目されている¹⁻³⁾。いずれについても多彩な生理作用が想定されているが、NOに比較して細胞内 Ca^{2+} 動態との関連については一部の組織を除いて不明な点が多い。

私どもはこれまで様々な内外分泌細胞の開口放出における Ca^{2+} の役割についてもつばら Ca^{2+} 画像解析法によって研究を進めてきている。ここ数年、三種類のガスの細胞内 Ca^{2+} 動態に及ぼす作用について検討を加えていることから、本稿では主に H_2S ならびにポリスルフィドの細胞内 Ca^{2+} 動態に及ぼす作用について最近の知見を中心にまとめてみたい。

2. 膵腺房細胞における H_2S の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に対する作用

酵素原を放出する膵臓の腺房細胞において、細胞内 Ca^{2+} は開

口放出を開始する必須因子である。この細胞にはCBSとCSEが発現していることから、 H_2S の産生と作用が想定されている。 H_2S のドナーであるNaHSを、実験的に作用させたところ、容量依存性で、二相性かつ細胞内外の Ca^{2+} に依存する $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が認められた(図1A)。また、 H_2S の合成基質のひとつであるL-cysteineを加えても $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇した。細胞内の Ca^{2+} 遊離に依存する上昇は、フォスホリパーゼC阻害薬のU73122、 G_q タンパク質拮抗薬のGP2Aおよび IP_3 感受性の Ca^{2+} 遊離を阻害するxestospongin Cによって抑制されたことから、 H_2S による IP_3 産生が関係していると推測された。さらに興味深いことに、 H_2S による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が、非特異的NO合成酵素阻害薬のL-NMMAおよびNO消去剤のcPTIOで抑制されることを見いだした。この結果は、 H_2S の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇作用に一部NOが介在していることを推測させる。実際、NOの蛍光指示薬であるDAF-2を用いてNO産生を調べたところ、容量依存性にNOが産生されていることを示す結果が得られた。また、 H_2S による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は、可溶性グアニル酸シクラーゼ阻害薬のODQおよびプロテインキナーゼ阻害薬のKT5823によって抑制されたことからNOの関与が強く示唆された。以上の結果を基に現在私どもが想定している H_2S の膵腺房細胞内作用経路を図1Bに示した⁴⁾。

3. 耳下腺腺房細胞における H_2S の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に対する作用

膵腺房細胞と構造・機能が類似している耳下腺腺房細胞についても H_2S の作用を検討した。この細胞でもCBSとCSEが発現していた(図2A)。膵腺房細胞同様、 H_2S はこの外分泌細胞でも容量及び細胞内外の Ca^{2+} 依存性に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を上昇させた(図2B)。

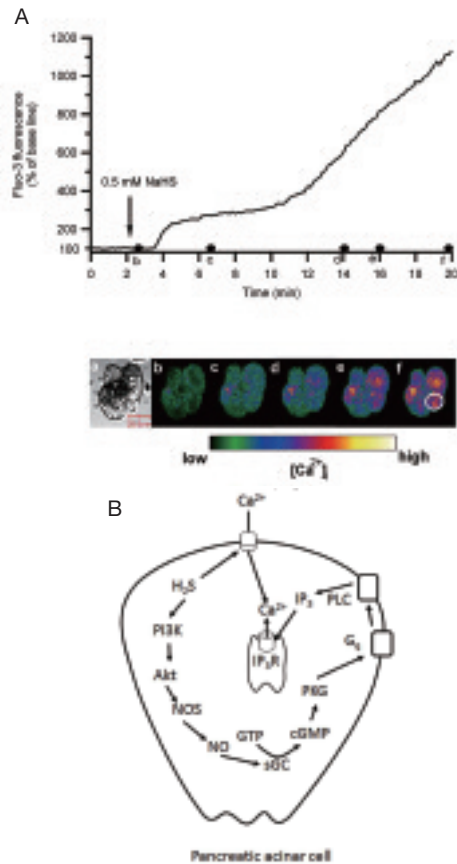


図1 膵腺房細胞におけるH₂SによるFluo 3プローブで捉えた細胞内Ca²⁺濃度上昇の一例
A: 二相性の上昇と疑似カラーで示した膵腺房細胞の細胞内Ca²⁺濃度上昇。B: H₂Sによる細胞内Ca²⁺濃度上昇の細胞経路(作業仮説)。IP₃が主たる細胞内シグナル因子と考えられる。[文献4)を改変]

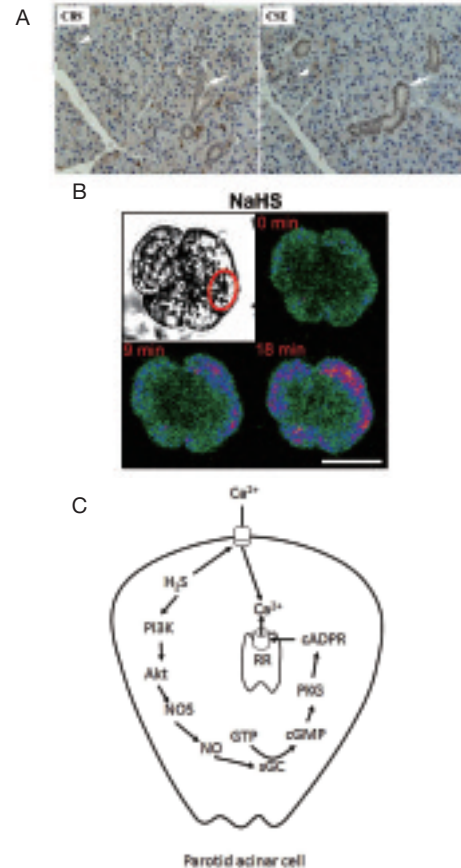


図2 耳下腺腺房細胞におけるH₂SによるFluo 3プローブで捉えた細胞内Ca²⁺濃度上昇の一例
A: H₂S合成酵素の局在。B: 疑似カラーで示した細胞内Ca²⁺濃度上昇の一例。C: H₂Sによる細胞内Ca²⁺濃度上昇の細胞経路(作業仮説)。リアノジン受容体を介してCa²⁺が遊離されると考えられる。[文献5)を改変]

この上昇はH₂Sの消去剤であるハイポタウリンおよびL-NMMAとcPTIOによって抑制された。またDAF-2によりNOの産生も示唆されたことから、一部は膵腺房細胞同様NOを介するものと推測された。なお、本細胞にnNOSとeNOSの発現が認められた⁸⁾。ここまでは膵臓と耳下腺で共通と考えられたが、両者で細胞内経路に大きな違いがあることが浮かび上がった。膵臓では有効であったU73122とxestospongine Cが耳下腺では無効である一方、ODQ、KT5823およびリアノジン受容体阻害薬のルテニウムレッドはH₂Sによる[Ca²⁺]_i上昇を有意に抑制した。この結果は耳下腺腺房細胞では、もっぱらリアノジン受容体チャネルを介するCa²⁺遊離であることを示している(図2C)⁵⁾。

4. 腹腔肥満細胞におけるポリスルフィドとH₂Sの[Ca²⁺]_iに対する作用

肥満細胞でCBSとCSEが認められた(図3)。また、nNOSとeNOSも発現していた⁶⁾。本細胞についてはH₂Sに加え、より低濃度で作用を発揮する事が報告されているポリスルフィド⁷⁾の作用を検討した。ポリスルフィドドナーのNa₂S₄及び、よりゆっくり

りとH₂Sを遊離するGYY4137により、いずれも容量依存性に[Ca²⁺]_iが上昇し、L-NMMAとcPTIOはこれを抑制した。またDAF-2によってNO産生も確認された。このことから、先の二種類の外分泌細胞同様、H₂Sの作用の一部が、産生されたNOによるものであると考えられた。加えて、ポリスルフィドの蛍光プローブであるSSP4を用いてGYY4137およびNOドナーのDEA NONOateによるポリスルフィド生成の可能性を検討したところ、両者ともに容量依存性にポリスルフィドを生成していた⁶⁾。H₂SとNO間のみならず、ポリスルフィドも加わった複雑な細胞内現象が[Ca²⁺]_i動態に関わっているようである。

5. 膵島β細胞におけるH₂Sの[Ca²⁺]_iに対する作用

膵島β細胞で、CSE、CBS、eNOS、nNOSの発現が認められた(図4A)。膵島β細胞でもH₂Sは[Ca²⁺]_iを上昇させ、L-NMMAはこの上昇を抑制し、H₂SによるNO産生も確認された。複雑なことに、H₂Sの作用はCO合成酵素抑制物質のSnPPで阻害されたことからCOも関係している可能性が浮かび上がった。実際、ミ

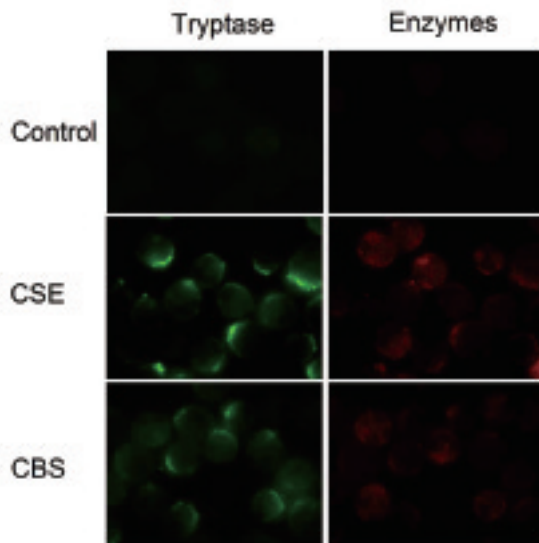


図3 蛍光抗体法による腹腔肥満細胞におけるCSEとCBSの発現。トリプターゼを検出することにより肥満細胞であることを確認し、CSE、CBSを同定した。[文献6)を改変]

オグロビンを用いてCO産生を測定したところH₂Sによって容量依存的にCOが産生されていることがわかった。さらに検討を重ねた結果、NOはH₂S/ポリスルフィドとCOの産生を、COはNOとH₂S/ポリスルフィドの産生を促すという、たいへん複雑な相互作用が三種類のガス間に存在している可能性が示唆された(図4B)⁸⁾。NOはインシュリンの基礎分泌を促進し、H₂Sは有意な効果を示さない一方、COはむしろ抑制するという三者三様の結果を得ており、分泌に対する作用についても明かな説明は難しい。

6. おわりに

H₂Sとポリスルフィドは相互変換し、後者は前者の300倍生理作用が強い。NO関連で注目すべきは、H₂SはeNOSのシステイン残基をs-スルフィド化して二量体形成を促進し活性化する。また、PI3K-Akt経路によりeNOSのリン酸化も促進する。このことからNOの産生が促される可能性がある。H₂Sおよびポリスルフィドの作用の一部がNOを経由している可能性がある。H₂SとNOからポリスルフィドが生成され、ここに一酸化炭素も加わり、極めて複雑な細胞内cross-talkがある可能性がある。

[参考文献]

- 1) H. Kimura, *Mol. Neurobiol.*, **2002**, 26, 13-19.
- 2) L. Li, P. Rose and K. Moore, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **2011**, 51, 169-187.
- 3) 渋谷典広、木村英雄, *Dojin News*, **2013**, 146, 1-6.
- 4) A. Moustafa and Y. Habara, *Antiox. Redox Signal.*, **2014**, 20, 747-758.
- 5) A. Moustafa and Y. Habara, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **2015**, 309, C480-C490.
- 6) A. Moustafa and Y. Habara, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **2016**, 310, C894-C902.
- 7) Y. Kimura, Y. Mikami, K. Osumi, M. Tsugane, J.-I. Oka and H. Kimura, *FASEB J.*, **2013**, 27, 2451-2457.
- 8) A. Moustafa and Y. Habara, *Free Rad. Biol. Med.*, **2016**, 90, 47-58.

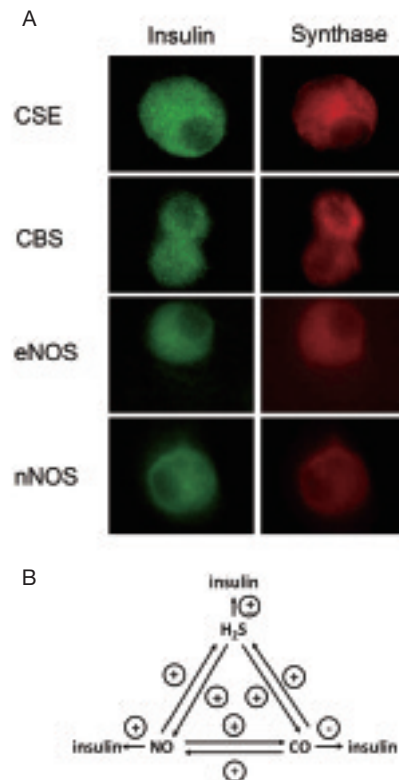


図4 膵島β細胞におけるH₂SとNO合成酵素
A: インシュリンを検出することでβ細胞であることを確認し、CSE, CBS, eNOS, nNOSを同定した。B: H₂S, NO, CO間に想定されたcross-talk。[文献8)を改変]

[著者プロフィール]

氏名: 葉原 芳昭 (Yoshiaki Habara)

所属: 北海道大学 大学院獣医学研究科 比較形態機能学講座 生理学教室 特任教授

連絡先: 〒060-0818 札幌市北区北18条西9丁目

TEL: 011-706-5199 FAX: 011-706-5202

E-mail: habara@vetmed.hokudai.ac.jp

出身大学: 北海道大学獣医学部

学位: 博士(獣医学)

専門分野: 細胞生理学

現在の研究テーマ: 内外分泌細胞の分泌機序

氏名: ムスタファ アミラ (Moustafa Amira)

所属: Zagazig University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Physiology, Associate Professor

連絡先: Zagazig 44519, Egypt

TEL: +20-55-228-4283 FAX: +20-55-228-3683

E-mail: al_mrmr@yahoo.com

出身大学: Zagazig University, Faculty of Veterinary Medicine

学位: 博士(獣医学)

専門分野: 生理学

現在の研究テーマ: ガス性情報伝達物質と細胞内Ca²⁺

Topics on Chemistry

活性イオウ分子種による tRNA のチオメチル化修飾と生理機能

株式会社同仁化学研究所 立中 佑希

DNA のエピジェネティクス修飾やタンパク質の翻訳後修飾のように、RNA にも様々な化学修飾が存在する。特に、トランスファー RNA (tRNA) はタンパク質翻訳を仲介する中心的小分子 RNA である。近年、分析技術の発展により tRNA に多彩な転写後修飾が存在することが明らかになってきている。しかし、哺乳動物では未知の化学修飾が多く、修飾の高次機能や生理意義に未だ不明な点が多い。特に、イオウを含む修飾はアンチコドンループに多く存在していることから、イオウ修飾がタンパク質翻訳における新たな制御機構として注目されている。一方で、高い求核性と強力な抗酸化能を有している活性イオウ分子種 (reactive sulfur species: RSS) が生体内で様々な生理機能を担っており、レドックスシグナル伝達を制御していると考えられている¹⁾。本トピックスでは、このような活性イオウ分子種による tRNA チオメチル化修飾と機能について紹介する²⁾。

チオメチル化修飾は、イオウ原子およびメチル基によって構成される tRNA の転写後修飾である。哺乳動物細胞では 2 種類のチオメチル化修飾、 ms^2t^6A (2-methylthio- N^6 -threonylcarbamoyladenosine) および ms^2t^6A (2-methylthio- N^6 -isopentenyladenosine) が知られている。

CDKAL1 (Cdk5 regulatory subunit associated protein1-like-1) は、細胞質の tRNA^{Lys(UUU)} の 37 位アデノシンをチオメチル化し、 ms^2t^6A を与えるチオメチル化修飾酵素であるが、その反応機構の詳細は不明であった。今回、魏らは活性イオウ分子種であるシステインパースルフィド (CysSSH) に着目し、CDKAL1 による tRNA チオメチル化修飾における CysSSH の潜在的な役割とその生理的意義を明らかにしている。

細胞内の CysSSH 産生は、CBS (cystathionine β -synthase) や CTH (cystathionine γ -lyase) などの合成酵素により調節されているが、tRNA チオメチル化修飾レベルがこれらの酵素や CysSSH によって有意に変動することが明らかとなっている。ちなみに、細胞内 CysSSH 量の変動は、サルフェン硫黄選択的蛍光プローブ SSP4 を用いたイメージングにより解析している。一方

で、硫化水素やシステインでは tRNA チオメチル化修飾レベルに変化が見られなかったことから、活性イオウ分子種である CysSSH が tRNA チオメチル化修飾の調節に選択的に関与することが示唆されている (図 1)。

さらに、CDKAL1 のシステイン残基に CysSSH の活性イオウ原子が転移することが、安定同位体化したシステインパースルフィド (CysS³⁴SH) を用いた質量分析から明らかとなっており、CDKAL のチオメチル化修飾反応には、CysSSH から CDKAL1 のシステイン残基に転移したイオウ原子が関与していることが示されている。

tRNA のチオメチル化修飾は、コドン-アンチコドンの安定化に寄与しており、正確で効率的なタンパク質翻訳に必要とされている。CDKAL1 遺伝子に存在する 1 塩基多型変異が 2 型糖尿病と関連することが明らかにされているが、これは膵 β 細胞においてブロインスリンの翻訳障害が生じ、インスリン分泌が低下するためだと考えられている。今回の報告では、細胞内 CysSSH による tRNA のチオメチル化修飾がインスリン生成を介した糖代謝に大きく寄与することが示されている。

近年、活性イオウ分子種のさまざまな生体内機能が明らかとなっている。今回 tRNA 修飾における活性イオウ分子種の直接的な関与が示されたことによって、今後さらなる活性イオウ研究への展開が期待できるものと考えられる。

[参考文献]

- 1) T. Ida, T. Sawa, H. Ihara, Y. Tsuchiya, Y. Watanabe, Y. Kumagai, M. Suematsu, H. Motohashi, S. Fujii, T. Matsunaga, M. Yamamoto, K. Ono, N. O. Devarie-Baez, M. Xian, J. M. Fukuto and T. Akaike, "Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling", *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **2014**, *111*, 21.
- 2) N. Takahashi, F. Y. Wei, S. Watanabe, M. Hirayama, Y. Ohuchi, A. Fujimura, T. Kaitsuka, I. Ishii, T. Sawa, H. Nakayama, T. Akaike and K. Tomizawa, "Reactive sulfur species regulate tRNA methylthiolation and contribute to insulin secretion", *Nucleic Acids Res.*, **2016**, *44*, 17.

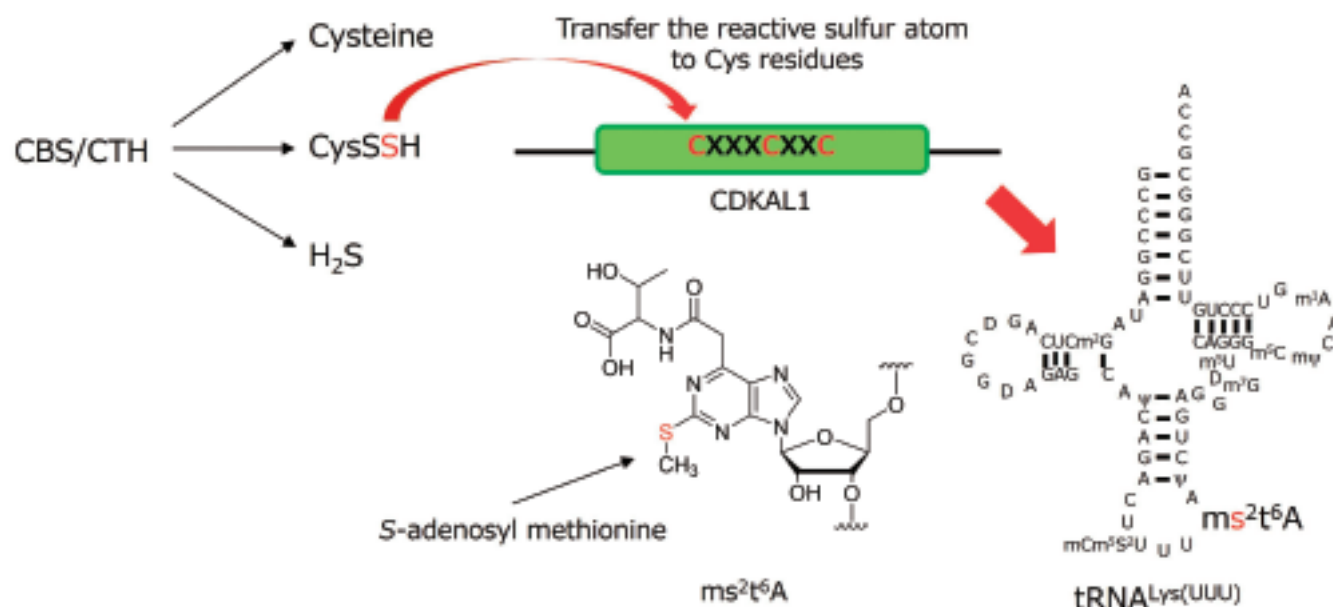


図 1 CBS/CTH による CysSSH の生合成と tRNA のチオメチル化修飾

DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

サルフェン硫黄検出用蛍光プローブ

-SulfoBiotics- **SSP4**

<特長>

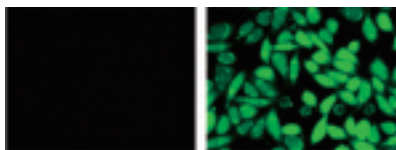
1. サルフェン硫黄と反応して強い蛍光を発する
2. サルフェン硫黄への高い反応特異性
3. 細胞内イメージングへの適用が可能

近年、硫黄原子が連結したパースルフィドやポリスルフィドのようなサルフェン硫黄 (Sulfane Sulfur) を含む分子種が生体内に多く存在していることが明らかにされています。このような分子種は、硫化水素の産生や貯蔵、放出だけでなく、S- スルフヒドリル化などのタンパク質内チオールをターゲットとしたシグナル伝達にも関与していることが示唆されています。SSP4 (Sulfane Sulfur Probe 4) は、サルフェン硫黄と特異的に反応して強い蛍光 (λ_{ex}. 482 nm, λ_{em}. 515 nm) を発する試薬であり、サルフェン硫黄の蛍光検出や細胞内解析に利用することが可能です。

<原理>



<実績データ>

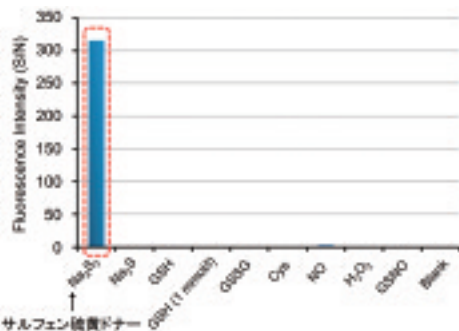


サルフェン硫黄の細胞内イメージング

左図: 処理をしていないCHO 細胞

右図: サルフェン硫黄ドナー (Na₂S₃) で処理した CHO 細胞

*細胞内への SSP4 導入には界面活性剤を使用。



SSP4 の反応特異性

SSP4 10 μmol/l (PBS) 中の各活性種 (100 μmol/l) に対する反応性 (Y 軸: Blank を 1 とした時の蛍光強度比)

<最新論文>

論文	サンプル
Scientific Reports	COS 細胞
Angewandte Chemie	HeLa 細胞
Free Radical Biology and Medicine	膵β細胞
Nucleic Acids Research	HeLa 細胞

最新の論文情報については小社の製品ページにてご紹介しています。下記のキーワードにて検索ください。

SSP4

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
-SulfoBiotics- SSP4	1 mg	29,000	SB10

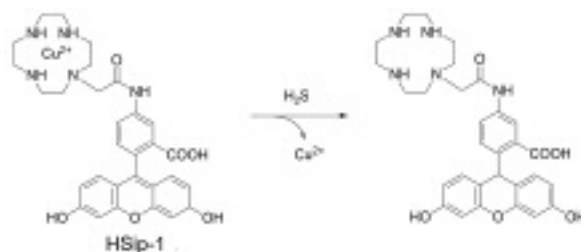
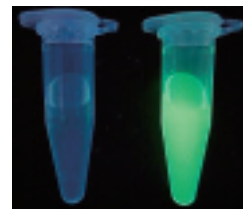
開発中

DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

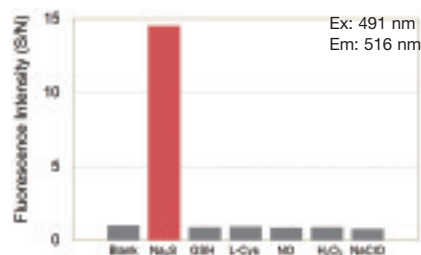
硫化水素検出用蛍光プローブ

-SulfoBiotics- **HSip-1**

HSip-1 は、硫化水素と反応し強い蛍光 (λ_{ex} 491 nm, λ_{em} 516 nm) を生じます。またグルタチオンやシステインとは反応しない硫化水素特異的な蛍光色素です。



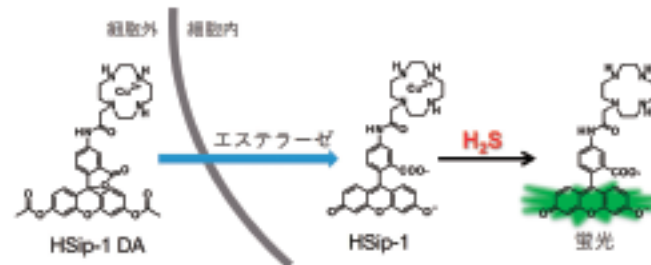
HSip-1 の H₂S 検出原理



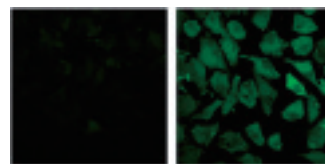
試薬の反応特異性比較

HSip-1 1 mmol/l (30 μmol/l HEPES, pH 7.4) 中の各活性種に対する反応性を確認 (Y 軸: Blank を 1 とした時の蛍光強度比)

-SulfoBiotics- **HSip-1 DA** (細胞イメージング用)



HSip-1 DA の H₂S 検出原理



左図: 未処理の HeLa 細胞
右図: Na₂S* を添加した HeLa 細胞

*Na₂S: 硫化水素ドナー

HSip-1 DA を用いた細胞内 H₂S 蛍光イメージング

本試薬に関するお問い合わせは、info@dojindo.co.jp までご連絡下さい。

生体イオウ関連研究用試薬 -SulfoBiotics- Series



3-MST

H_2S

H_2S_n

NO

Enz-SNO

ニトロシル化

硫化水素放出剤

Na_2S [コード: SB01]

Na_2S (34) [コード: SB05]

GY4137 [コード: SB01]

H_2S donor 5a [コード: SB07]

H_2S donor 8I [コード: SB08]

H_2S donor 8o [コード: SB09]

硫化水素定量

Sulfide-dibimane [コード: SB15]

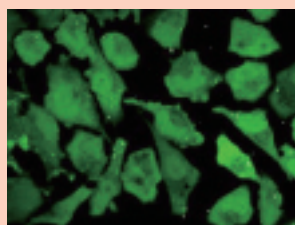
Sulfide dibimane (S34) [コード: SB16]

硫化水素蛍光イメージング

HSip-1 DA *¹ (開発中)

HSip-1 *¹ (開発中)

*¹ 本試薬に関するお問合せは info@dojindo.co.jp までご連絡ください。



HSip-1 DA による検出

サルフェン硫黄放出剤

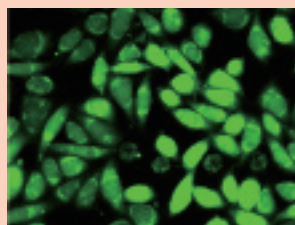
Sodium disulfide (Na_2S_2) [コード: SB02]

Sodium trisulfide (Na_2S_3) [コード: SB03]

Sodium tetrasulfide (Na_2S_4) [コード: SB04]

サルフェン硫黄蛍光イメージング

SSP4 [コード: SB10]



SSP4 による検出

ニトロシル化タンパク質検出

Protein S-Nitrosylation Monitoring Kit [コード: SB14]

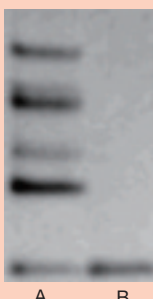
SNO 基数

-SNO × 3

-SNO × 2

-SNO × 1

-SNO × 0



HeLa 細胞溶解液中の GAPDH S- ニトロシル化の解析

A. 1 mmol/l S-Nitrosoglutathione 処理
B. 処理なし

A

B

一酸化窒素 (NO) 放出剤

NOCs、NORs、S-Nitrosoglutathione

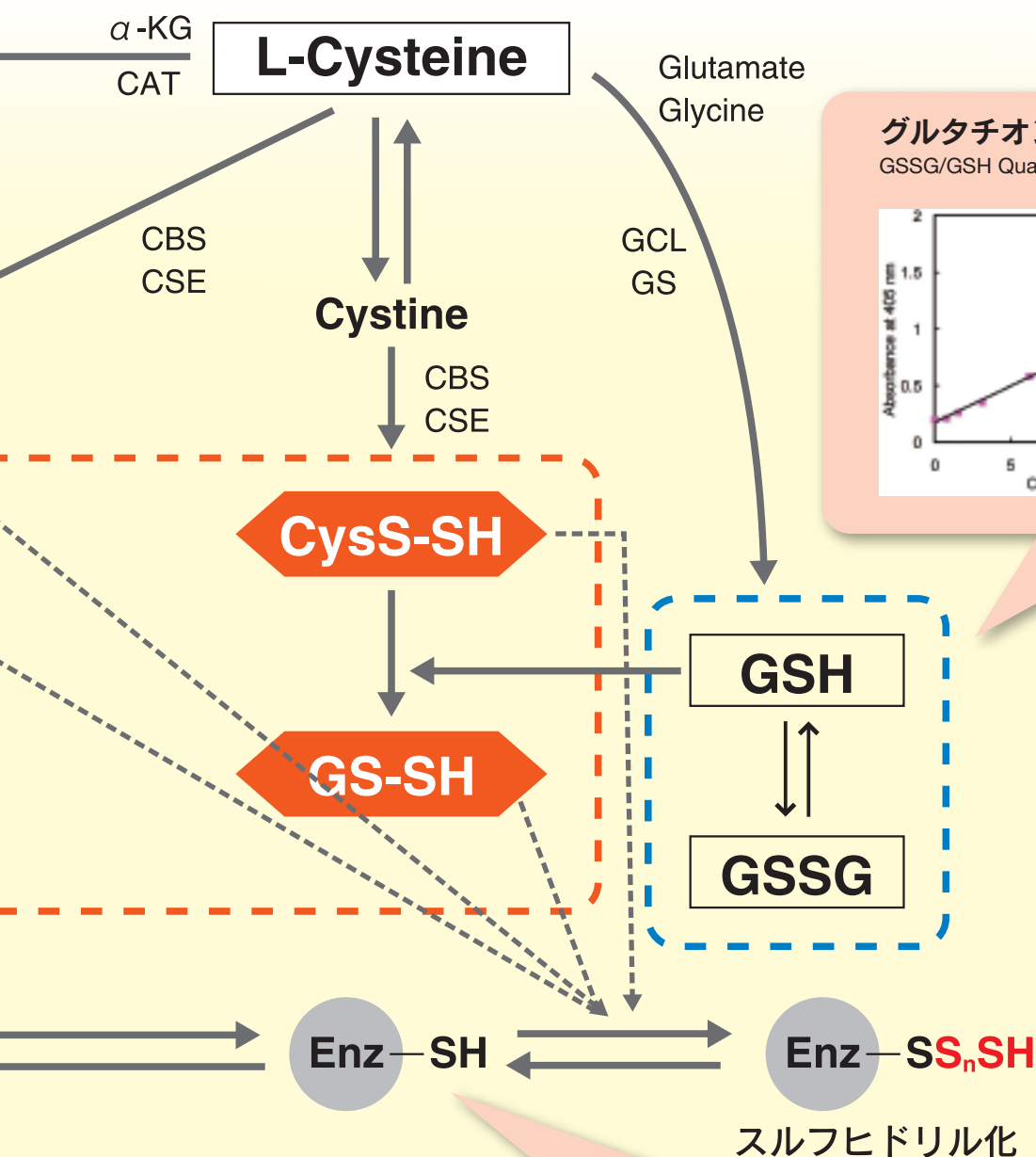
一酸化窒素 (NO) 消去剤

Carboxy-PTIO [コード: C348]

一酸化窒素 (NO) 定量

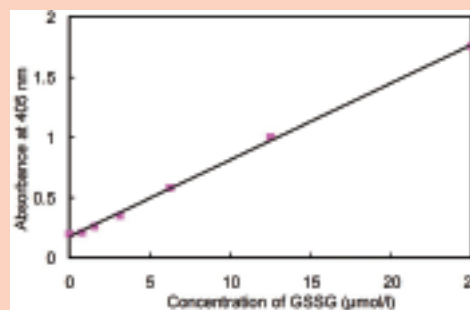
NO_2/NO_3 Assay Kit -C II [コード: NK05]

NO_2/NO_3 Assay Kit -FX [コード: NK08]



グルタチオン定量

GSSG/GSH Quantification Kit [コード: G257]



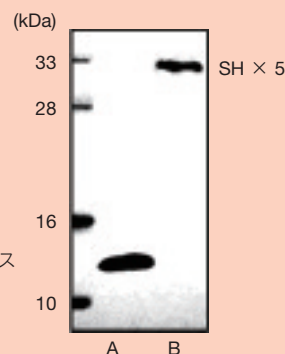
タンパク質チオール修飾解析

Protein Redox State Monitoring Kit *² [コード: SB11]
 Protein Redox State Monitoring Kit Plus *² [コード: SB12]
 PEG-PCMaI *² [コード: SB20]
 Biotin-HPDP (WS) solution [コード: SB17]

*² P. 16 に「よくあるお問い合わせ」を掲載しています
 ので、そちらもご参照ください。

HeLa 細胞中 Thioredoxin のレドックス
 状態を PEG-PCMaI で可視化

A: ラベル化なし
 B: PEG-PCMaI によるラベル化



3-MST: 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase
 CSE: cystathionine γ -lyase
 GS: glutathione synthetase

CAT: cysine aminotransferase
 DAO: D-amino acid oxidase
 α -KG: α -ketoglutarate

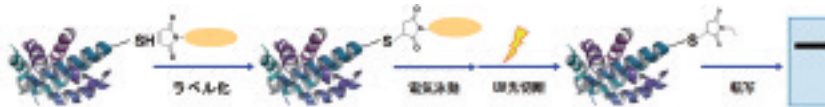
CBS: cystathionine β -synthase
 GCL: glutamate cysteinylase

レドックス応答性タンパク質解析キット及び試薬

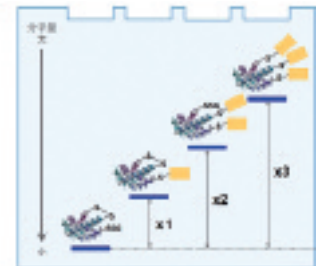
よくあるお問い合わせ

Q. チオール解析の原理を教えてください。

- A. タンパク質チオール (SH 基) を高分子マレイミド試薬でラベル化後、ゲル電気泳動によって分離します。タンパク質 SH 基の数に応じて分子量が大きくなるため、SH 基数が多いほど高分子領域に異なるバンドとして検出することができます。また Protein Redox State Monitoring Kit Plus と PEG-PCMal は、電気泳動後のゲルに UV 照射し、リンカー部位を切断することで、ウェスタンブロットにおけるタンパク質の検出効率を飛躍的に向上できます。



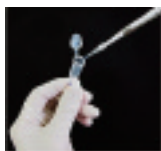
チオール解析の原理



電気泳動による SH 基数の分析

Q. 操作手順を教えてください。

- A. 前処理したサンプルに、ラベル化剤を加え反応させます。ゲル電気泳動後、ゲルに UV を照射しリンカーを切断、メンブランに転写後、抗体を用いてタンパク質を検出します。※詳細は取扱説明書をご参照ください。



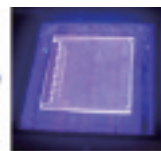
Step 1
サンプル溶液に
試薬添加



Step 2
ラベル化反応



Step 3
ゲル電気泳動



Step 4
UV 照射 (リン
カー切断)



Step 5
メンブランに転写
タンパク質検出

Q. 実績のあるサンプルを教えてください。

- A. SB11、SB12：動物細胞 (HeLa、HL60、K562 細胞)、
精製タンパク質
SB20：動物細胞、動物組織、植物サンプル

Q. 免疫沈降したタンパク質も使用できますか？

- A. 使用できます。しかしながら、免疫沈降後タンパク質を回収する際にタンパク質変性等を行うと、SH 基数が変化する可能性があります。

Q. ポリサルファ化 (-SSnSH) したタンパク質を区別して検出できますか？

- A. 本キット類を用いてポリサルファ化したタンパク質を区別して検出した実績はございません。現在、ポリサルファ化タンパク質を検出するための試薬を開発中です。
※ご興味のある方は info@dojindo.co.jp までご連絡ください。

Q. キット以外に必要な試薬を教えてください。

- A. 電気泳動関連試薬 [ゲル、Loading Buffer、タンパク質染色試薬 (CBB 等)]、ウェスタンブロット関連試薬類 [PVDF 膜など] ※細胞サンプルの前処理には別途アセトン、TCA (トリクロロ酢酸)、エタノールが必要です。

Q. 光切断に使用実績のある装置を教えてください。

- A. トランスイルミネーター
(メーカー：UVP、型番：NTM-15、切断条件：302 nm 15 W で 10 分)
ハンディ UV ランプ
(メーカー：アズワン、型番：SLUV-4、切断条件：365 nm 4 W で 30 分)

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
-SulfoBiotics- Protein Redox State Monitoring Kit	5 samples	18,000	SB11
-SulfoBiotics- Protein Redox State Monitoring Kit Plus	5 samples 20 samples	23,000 50,000	SB12
-SulfoBiotics- PEG-PCMal	1 mg × 1 1 mg × 10	8,000 50,000	SB20

学会発表ポスターの紹介

第 89 回日本生化学会大会にてタンパク質チオール解析に関する下記 2 つのテーマを発表しました。

新規タンパク質チオール解析用試薬 PEG-PCMal [SB20] の開発

タンパク質チオール修飾解析のための新規ビオチンラベル化剤 Biotin-HPDP (WS) [SB17]



上記のポスターは小社 HP でご覧頂けます。

PEG-PCMal/Biotin-HPDP (WS)

検索する



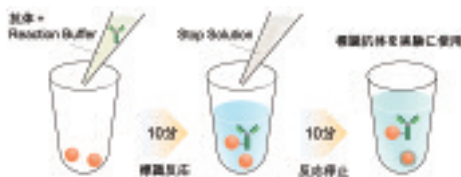
新製品 *DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.*

少量抗体 (10 μ g) 標識キット

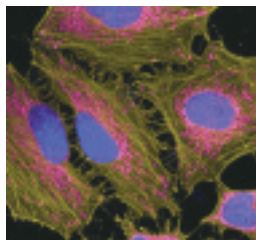
Ab-10 Rapid HiLyte Fluor™ 555 Labeling Kit Ab-10 Rapid HiLyte Fluor™ 647 Labeling Kit

Ab-10 Rapid Labeling Kit シリーズは、10 μ g の抗体に 30 分以内で標識するためのキットです。本キットに含まれる標識剤は、活性エステルを導入しており、抗体と混合するだけで安定な共有結合を形成します。本キットには標識に必要な全ての試薬が含まれています。

* 安定化剤の濃度によっては精製が必要な場合があります。詳細は小社 HP にてご確認ください。



<実績データ>



アクチン (黄): HiLyte Fluor™ 555 標識抗体
ミトコンドリア (赤): HiLyte Fluor™ 647 標識抗体
核 (青): DAPI

抗ミトコンドリア抗体および抗アクチン抗体による二重染色像 (HeLa 細胞)

品名	容量	価格 (¥)	メーカーコード
Ab-10 Rapid HiLyte Fluor™ 555 Labeling Kit	3 samples	24,000	LK35
Ab-10 Rapid HiLyte Fluor™ 647 Labeling Kit	3 samples	24,000	LK36

関連製品

品名	容量	価格 (¥)	メーカーコード
Ab-10 Rapid Fluorescein Labeling Kit	3 samples	24,000	LK32
Ab-10 Rapid Peroxidase Labeling Kit	3 samples	19,000	LK33
Ab-10 Rapid R-Phycoerythrin Labeling Kit	3 samples	28,000	LK34

架橋・標識試薬の選び方、使い方がわかる!



下記のキーワードで検索し小社 HP にお越しください。

cross-linking 同仁

検索する



DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

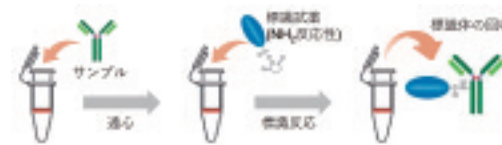
抗体・タンパク質 (50-200 μ g) 標識キット

Dojindo Labeling Kits

Dojindo Labeling Kits は、標識試薬とフィルトレーションチューブ (限外濾過膜)、各種バッファーにより構成されたキットで、抗体やタンパク質、ペプチド等簡単に標識できます。タンパク質サンプル中に含まれる低分子の夾雑物は、反応前のバッファー交換時に除くことが可能なため、標識反応に影響する化合物を除いた上で反応が行えます。

<標識操作>

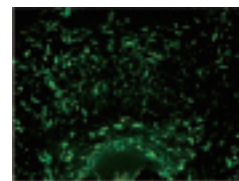
NH₂ 標識タイプ



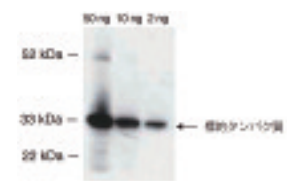
SH 標識タイプ



<実績データ>



Fluorescein 標識抗ラット I-A 抗原抗体を用いた染色
(データ提供: 東京医科歯科大学大学院 歯医学総合研究科歯髄生物学分野 川島伸行先生)



Alkaline Phosphatase 標識抗体によるウェスタンブロット

品名	容量	価格 (¥)	メーカーコード
Fluorescein Labeling Kit - NH ₂	3 samples	22,200	LK01
HiLyte Fluor™ 555 Labeling Kit - NH ₂	3 samples	22,200	LK14
HiLyte Fluor™ 647 Labeling Kit - NH ₂	3 samples	22,200	LK15
ICG Labeling Kit - NH ₂	3 samples	47,800	LK31
R-Phycoerythrin Labeling Kit - NH ₂	3 samples	45,600	LK23
R-Phycoerythrin Labeling Kit - SH	3 samples	43,200	LK26
Allophycocyanin Labeling Kit - NH ₂	3 samples	45,600	LK21
Allophycocyanin Labeling Kit - SH	3 samples	43,200	LK24
Biotin Labeling Kit - NH ₂	3 samples	12,800	LK03
Biotin Labeling Kit - SH	3 samples	12,800	LK10
Alkaline Phosphatase Labeling Kit - NH ₂	3 samples	22,200	LK12
Alkaline Phosphatase Labeling Kit - SH	3 samples	22,200	LK13
Peroxidase Labeling Kit - NH ₂	3 samples	18,200	LK11
Peroxidase Labeling Kit - SH	3 samples	18,200	LK09

この他にも標識用キットを取り揃えております。詳細は小社 HP にてご案内いたしております。

27th フォーラム・イン・ドージン開催後記 「低酸素応答の光と影～エリスロポエチン純化から 40 年～」

第 27 回フォーラム・イン・ドージンが 10 月 28 日、震災で被害を受け一部修復中の熊本市内のホテルキャッスルを会場に開催された。当日は、あいにくの雨にもかかわらず非常に多くの参加者が集まり、活発な質疑応答がみられた。今年のテーマは、「低酸素応答の光と影～エリスロポエチン純化から 40 年～」である。副題のエリスロポエチン純化とは、バイオ医薬品として最も普及しているエリスロポエチンを、2.5 トンの尿から精製・単離し、臨床応用への道を開いたのが、40 年前に熊本で行われたのを記念してのことである。当時の熊本大学・血液内科の宮家、河北の二人の医師によってなされた研究は、透析医療のありかたも一変させ、現在、多くの人がその恩恵に浴している。フォーラム当日は河北先生（熊本第一病院理事長）が、長年の苦勞のすえに 10 mg の純品をやっと得ることができ、それを誰も信用しなかったことなどを紹介された。会場には宮家先生もお見えになり、世界に誇れる研究が熊本の地で行われたことを実感でき、復興まっただ中にある熊本にとっては大きな励みにもなった。



続いて講演された山本雅之先生（東北大学医学部）は、そのエリスロポエチンが腎臓のどこで産生され、どのように働くのか、分子生物学的なアプローチによって解明されている。低酸素応答は HIF で制御されるが、血中酸素濃度の変化を感知してエリスロポエチンが産生される部分は、完全には明らかになっていないようである。続く名古屋大学の藤田祐一先生の講演では、シアノバクテリアが酸素に脆弱なニトロゲナーゼによる窒素固定と、二酸化炭素を固定し酸素を発生する光合成とを同時に行っている、いわゆる“酸素パラドックス”について話された。このパラドックスを克服すべく、植物は幾つかの巧みな戦略をとっている。因みに、熊本原産のスイゼンジノリもシアノバクテリアの仲間であることを初めて知った。午前中のセッションでは一般市民の方の来場もあり、あらかじめ用意した席だけでは足りなくなるほどだった。



午後のセッションは三浦恭子先生（北海道大学）のハダカデバネズミの話である。ハダカデバネズミは長寿モデルの動物として、今ではすっかり有名になっている。250 頭飼育されているらしく、今後さらに面白い発見が期待できそうだ。今回の演者のなかでは最も遠方から来られたが、意外にも熊本との縁は最も深い方だった。熊本大学の魏（ウェイ）范研先生は、tRNA のチオメチル化修飾とその破綻によっておこる疾病の話で、チオメチル化修飾が Fe-S クラスターを介して低酸素の影響を受け、タンパク質翻訳の精度が向上するという興味深い内容だった。さらに、この修飾に GysSSH が関与していることが、小社との共同研究で明らかにされている。

エリスロポエチンが低酸素応答の光の部分だとすると、がん細胞の放射線抵抗性や浸潤・転移の亢進は影の部分かも知れない。最後のセッションでは、原田浩先生（京都大学）が HIF-1 依存的ながんの悪性化のメカニズムについて最近の研究成果を報告された。特に、IDH3 や UCHL1 が強く関わっていることが分かり、転移の抑制や予後の診断への応用が期待されている。フォーラム最後の演者である東大循環器内科の武田憲彦先生は、臨床の立場から低酸素による心筋組織の線維化などについて話された。

そもそも、生体は酸素分子を利用して大きなエネルギーを産み出すが、エネルギー産生以外にも、HIF のように酸素分子を固定するような反応は非常に多い。気体である酸素分子を基質としてプロリン残基を水酸化する反応は、DNA やヒストンの脱メチル化反応を司る TET や KDM もまったく同様で、低酸素や酸化ストレスの影響を受けている。今回のフォーラムではそのような生体と酸素の関わりについて、光と影の両面から議論する貴重な機会となった。4 月には熊本地震があり、今回のフォーラム開催も危ぶまれたが、関係者の熱意によって開催にこぎつけることができた。復興のひとつの証になれば幸いである。（佐々本 一美）



要旨集の残部がございますので、ご希望の方は小社マーケティング部までお問い合わせください。

ホームページアドレス

URL : <http://www.dojindo.co.jp/>

E-mail : info@dojindo.co.jp

フリーファックス

0120-021557

フリーダイヤル

0120-489548