



DOJIN NEWS

2017 No.160

ISSN 0385-1516

ドージンニュース

CONTENTS

●Review

新たなオートファジー機構の発見
東京医科歯科大学
清水 重臣

●Topics on Chemistry

MitoPeDPP を用いた
ミトコンドリア内脂溶性過酸化物の検出
同仁化学研究所 高橋 政孝



表紙撮影：波野村そば畑
photo：永島俊介氏

CONTENTS

Review

新たなオートファジー機構の発見 ●———— [1]

東京医科歯科大学 清水 重臣

Topics on Chemistry

MitoPeDPP を用いたミトコンドリア内脂溶性過酸化物の検出

株式会社同仁化学研究所 高橋 政孝 ●———— [8]

Commercial

マイトファジー検出蛍光プローブ ●—— [7]

ミトコンドリア研究用試薬 ●———— [9]

ミトコンドリア膜脂溶性過酸化物検出蛍光試薬 ●—— [11]

ミトコンドリア局在型一重項酸素検出蛍光プローブ ●———— [11]

抗体・タンパク質 (50-200 µg) 標識キット ●———— [12]

新製品

ミトコンドリア染色試薬 ●———— [10]

少量抗体 (10 µg) 標識キット ●———— [12]

開発中

硫化水素検出用蛍光プローブ ●———— [13]

細胞老化検出キット ●———— [13]

お知らせ

キャンペーンのお知らせ ●———— [9]

試薬比較ページのご案内 ●———— [9]

抗体標識はじめてシリーズ ●———— [12]

β-ガラクトシダーゼ検出プローブ ●———— [14]

※希望納入価格には消費税等は含まれておりません。

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 Biotin Labeling Kit

新たなオートファジー機構の発見

The Discovery of a Novel Autophagy Pathway



清水 重臣

東京医科歯科大学
難治疾患研究所
病態細胞生物
教授

Abstract

Autophagy is a catabolic process by which the contents of cells are digested within lysosomes. Autophagy is a low-level constitutive function, which is accelerated by a variety of cellular stressors such as nutrient starvation, DNA damage, and organelle damage. Basically, autophagy is a protective mechanism that facilitates the degradation of superfluous or damaged cellular constituents. The molecular basis of autophagy was elucidated in autophagy-defective mutant yeasts. The subsequent identification of vertebrate homologs greatly expanded our understanding of the molecular mechanisms of autophagy, in which Atg5 and Atg7 are believed to be essential molecules. However, we discovered that mammalian cells possess an Atg5/Atg7-independent type of autophagy, known as alternative autophagy. This novel type of autophagy is involved in the clearance of mitochondria from reticulocytes during erythrocyte differentiation. Both the conventional and alternative types of autophagy are involved in the protection of various diseases, including Parkinson's Disease.

キーワード : Autophagy, Alternative autophagy, mitochondria, Red blood cell maturation, Parkinson' Disease

1. はじめに

オートファジー（自食現象）とは、細胞内の自己構成成分（例えば、不要なタンパク質や傷害を受けたオルガネラなど）を分解する細胞機能である。オートファジーの中には、①細胞内成分が二重の膜によって周囲から隔離され、リソソームと融合することによって消化されるマクロオートファジー、②リソソーム膜の陥入を介して細胞質成分が消化されるミクロオートファジー、③個別の分子が直接リソソームに運搬されて消化されるシャペロン依存性オートファジーなどが存在するが、この中で、最も生理的、病理的に重要なオートファジーは、マクロオートファジーであり、単にオートファジーと称する場合は、マクロオートファジーを意味する。本稿においても、以後はマクロオートファジーをオートファジーと記す。

オートファジーの研究は、肝細胞の電子顕微鏡観察中に、二重膜を有するユニークな構造体が発見されたことが端緒となって、まず形態学的解析が進められた。オートファジーの初期段階では、隔離膜と呼ばれる小さな二重膜の構造物が形成される。この隔離膜は伸長すると共に湾曲し、細胞質やオルガネラを囲い込み、最終的には両端が融合したオートファゴソームが出来上がる。オートファゴソームが形成されると、その後にリソソームが直接融合し、リソソームの消化酵素によってその内容物が消化される¹⁾(図1)。リソソームには、カテプシンなどのタンパク質分解酵素、酸性リパーゼ、DNA分解酵素など様々な種類の消化酵素が含まれているため、内容物はほぼ完全に消化されることとなる。

上述した形態学的特徴が解析された後に、哺乳動物細胞で見出されたオートファジーが、出芽酵母においても見られることが明らかとなった。この出芽酵母でのオートファジー発見は、オート

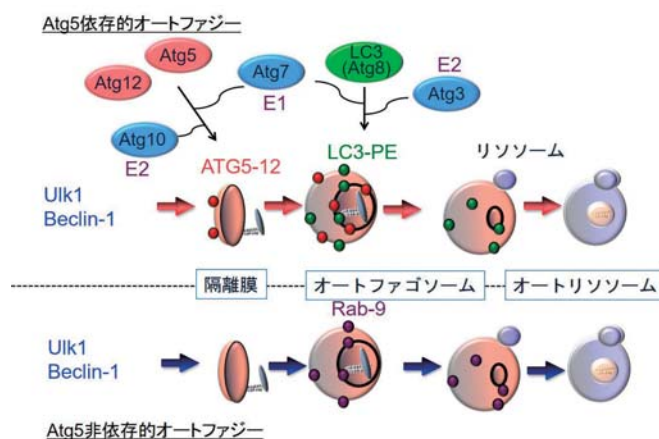


図1 オートファジーの模式図

オートファジーには、Atg5に依存した反応(上段)と依存しない反応(下段)が存在する。どちらの反応も、(1)隔離膜の形成、(2)伸長、(3)オートファゴソームの形成、(4)オートリソソームの形成(リソソームと融合)の順序で進行する。Atg5依存性オートファジーの場合には、ATG5-12複合体が隔離膜の伸長に必須である。LC3-PEはATG5-12複合体依存的に隔離膜に結合し、オートファゴソーム形成に寄与する。ATG5-12複合体の形成にはユビキチン様の反応が必要であり、Atg7がE1、Atg10がE2として働く。また、LC3-PEの形成にもユビキチン様の反応が必要であり、Atg7がE1、Atg3がE2として働く。Atg5非依存的オートファジーの場合には、ゴルジ膜を利用してRab-9依存的にオートファゴソーム形成が進行する。

ファジー研究の進捗を大幅に早めることとなった。即ち、出芽酵母の遺伝学解析によって、オートファジーに関わる分子が次々に明らかにされ、分子生物学的、生化学的解析が容易になったのである²⁾。現在、酵母のオートファジー関連遺伝子を基盤として、哺乳動物におけるオートファジー機構が解き明かされつつあるが、オートファジーに重要な分子はその構造、機能共に酵母から哺乳動物細胞まで保存されている。即ち、オートファジーはあらゆる真核生物に共通に存在する普遍的な細胞機能なのである。これら一連のオートファジー解析の多くは、大隅良典先生とそのグループによるものであり、そのインパクトの大きさから2016年度のノーベル医学生理学賞を受賞した。本稿では、はじめにこのようなオートファジーの一般的な知見を概説し、その後に筆者らが独自に発見した新しいオートファジーに関して詳述する。

2. オートファジーとは何か？

前述のごとく、オートファジーとは自己成分を分解する細胞機能の1つである。では、生体内でオートファジーは、いつ、どこで、どのように機能しているのだろうか？ この点に関しては、現在様々な角度から解明されつつあるが、オートファジー誘導刺激の観点とオートファジー分解物の観点から分類すると理解しやすい(図2)。即ち、誘導刺激に関しては、定常状態でのオートファジー(恒常性オートファジー)と刺激によって誘導されるオートファジー(誘導性オートファジー)に大別でき、分解物に関しては、分解基質を選ばないバルクオートファジーと特定の基質のみを分解するセレクトティブオートファジーに大別できる。例えば、最もよく解析されている栄養飢餓によるオートファジーは、アミノ酸不足による誘導性オートファジーであり、細胞質成分をランダムに分解することからバルクオートファジーに分類できる。このオートファジーは、自己タンパク質を大量に分解し再利用することによって、不足した栄養を補填しているものと考えられている。一方、細胞にDNA傷害などのストレスが加わると、細胞内に傷ついたタンパク質やオルガネラが生じ、誘導性オートファジーがこれらの変性成分を分解する(セレクトティブオートファジー)。生じたアミノ酸は、ストレス応答に必要なタンパク質を合成するために利用される。また、神経や心臓においてオートファジーを欠損させると神経細胞や心筋細胞に不溶性タンパク質が蓄積し神経変性疾患や拡張型心筋症を発症する。即ち、これらの細胞においては恒常性オートファジーが機能しており、変性タンパク質をセレクトティブに分解していることが窺える。このように、オートファジーはストレス応答や恒常性の維持など、生体にとって必要不可欠な生命現象である。

分解物 誘導刺激	バルクオートファジー (細胞成分をランダムに分解)	セレクトティブオートファジー (特定の細胞成分を分解)
恒常性 オートファジー (恒常性の維持)	新陳代謝 ○細胞成分の入替	細胞を守る ○変性蛋白質を分解して 細胞を守る
誘導性 オートファジー (ストレス応答など)	栄養を供給する ○栄養飢餓、 ○ラパマイシン投与	細胞を環境に適応させる ○細胞ストレス(DNA傷害...) ○細胞分化、など

図2 オートファジーの分類
オートファジーの機能は、誘導刺激の有無(縦軸)、分解基質(横軸)で分類すると分かりやすい。

3. オートファジーの分子機構

では、このようなオートファジーはどのように実行されるのだろうか？ 前述のごとく、オートファジーの分子機構は、出芽酵母の遺伝学的解析から明らかにされ、これらが哺乳動物細胞に応用される形で研究が進行した。まず、隔離膜形成の初期段階においてはセリン-スレオニンキナーゼであるATG1(哺乳動物ではUlk1)複合体(Fip200などを含む)やPI3キナーゼclassⅢ複合体(Beclin1などを含む)の存在が重要となる(図1)。続いて起こる隔離膜の伸長にはATG8(LC3)システム(ATG3, 4, 7, 8により機能する)とATG5システム(ATG5, 7, 10, 12, 16により機能する)が必須である。これらはいずれも特徴的なユビキチン様の結合システムを用いている。即ち、ATG8(LC3)とフォスファチジルエタノールアミン(PE)、ATG5とATG12の共有結合がそれである。ATG5-12複合体は隔離膜の外膜に偏って分布し隔離膜の伸長に寄与し、オートファゴソームが形成される前後に膜から離脱する。一方、ATG8-PE複合体は、ATG5-12複合体依存的に隔離膜やオートファゴソーム膜に結合し、オートファゴソーム形成に寄与する(図1)³⁾。

ATG5やATG7を欠損したマウス由来の細胞においては、隔離膜の伸長に障害が生じオートファジーが実行されにくくなる。このため、Atg5やAtg7はオートファジー実行に必要な不可欠な分子として考えられてきた。また、酵母ATG8の哺乳類ホモログの一つであるLC3には、細胞質に存在するLC3-Iフォーム(前駆体LC3)と、オートファゴソーム膜に結合したLC3-IIフォーム(LC3-IにPEが結合した形と考えられる)の二つのフォームが存在しており、オートファジーの誘導によりLC3-IからLC3-IIに変換することが知られている(図3A)。このために、LC3の局在変化やLC3-II形成は、オートファジーの良いマーカーとして考えられてきた。

4. 新しい分子機構を介したオートファジーの発見

上述したように、Atg5/Atg7の存在やLC3とPEとの結合は、オートファジーに必要な不可欠であると考えられてきた。しかしながら私たちは、Atg5を欠損したマウスの胎仔には殆ど異常がみられない⁴⁾ことより、Atg5に依存しない代替のオートファジー機構の存在を疑った。

この代替メカニズムの存在を検討するために、野生型マウスとAtg5欠損マウスより細胞を調製し、様々な刺激を加えてみた。すると、ラパマイシン(mTor阻害剤)を投与した時には、野生型細胞でのみオートファジーが観察され、Atg5欠損細胞ではオートファジーは誘導されなかった。一方、エトポシド(DNA傷害誘導剤)を加えた時には、野生型細胞において大規模なオートファジーが観察されたのみならず、Atg5欠損細胞においても同程度の大規模なオートファジーが観察された(図3B)⁵⁾。また、この際に、オートファジーの各ステップ(隔離膜、オートファゴソーム、オートリソソーム)が全て観察できた。即ち、Atg5欠損細胞においても、正常細胞と同様の形態学特徴を持ったオートファジーが実行されているものと思われた。さらに、Atg5欠損細胞におけるオートファジーの存在を確認するために、オートファジーの初期反応の阻害剤である3-methyl adenineをエトポシドと共に添加したところ、オートファゴソーム形成より前のステップでオートファジーが阻害され隔離膜が多数出現した。一方、オートファゴソームとリソソームの融合を阻害するBafilomycinAを投与した

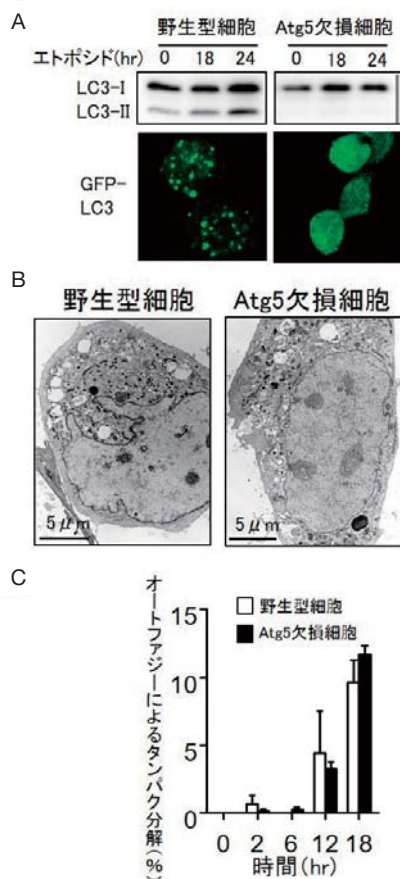


図3 Atg5非存在下で誘導されるオートファジー
 A: Atg5欠損細胞でみられる新規オートファジーには、LC3の脂質化 (LC3-II形成) や GFP-LC3のドット形成は伴わない。(Nishida et al., *Nature*, 2009, 461, 654-658より改変引用)
 B: 野生型およびAtg5欠損MEFをエトポシドで刺激したところ、同程度のオートファジーが誘導された。
 C: エトポシド投与後に、オートファジーによるタンパク質分解活性を測定したところ、野生型MEFとAtg5欠損MEFでは同程度であった。

ところ、オートリソソーム形成の直前のステップで阻害されオートファゴソームが大量に蓄積した。これらの結果は、Atg5欠損細胞においてもオートファジーが実行されていることを示している⁵⁾。

さらに、オートファジーの重要な機能であるタンパク質分解の有無を解析したところ、Atg5欠損細胞においても正常細胞と同様に、エトポシド投与によってオートファジー依存性のタンパク質分解が行われていることが判明した (図3C)。これらの結果より、Atg5を必要としないオートファジーの存在が明らかとなり、このオートファジーを我々は“alternative macroautophagy” (以下、「新規オートファジー」と記す) と命名した⁵⁾。

上述の如く、LC3とPEとの共有結合は、Atg5依存性のオートファジーに重要な反応であり、オートファジーの多寡を示す良い指標として認識されてきた³⁾。そこで、新規オートファジーにおけるLC3の変化を検討した。野生型の細胞にオートファジーを誘導すると、LC3-IIが経時的に増加すると共に、GFP融合LC3 (以下 GFP-LC3) が細胞質から隔離膜に移動し、GFP-LC3がドツ

ト状に観察された。一方、Atg5欠損細胞では、オートファジーを誘導しても、LC3-IIの出現やGFP-LC3の変化は見られなかった (図3A)。さらに、GFP-LC3の蛍光画像と電子顕微鏡像を重ね合わせたところ、①Atg5欠損細胞では、GFP-LC3のドットが無いところにオートファジーが存在すること、②正常細胞では、GFP-LC3のドットを含むオートファジーと、含まないオートファジーが存在することが明らかとなった。これらの実験事実、①新規オートファジーにはLC3の変化は伴わないこと、②正常細胞では、Atg5依存性のオートファジーと新規オートファジーが共存していること、を示している⁵⁾。

5. 新規オートファゴソームはトランス・ゴルジ膜やエンドソームを介して形成される

それでは、このような新規オートファジーはどのようなメカニズムによって実行されるのであろうか？ まず、既知のオートファジー関連分子の中から新規オートファジーに関わる分子を検討したところ、Ulk1, Fip200, Beclin1などオートファジー機構の比較的上流で機能する分子群は、新規オートファジーにおいても重要な役割を果たしていることが判明した (図1)。一方、Atg5, Atg7, Atg9, Atg12, Atg16, LC3の関与はみられなかった。これらの分子は、隔離膜からのオートファゴソーム形成に必須と考えられていることから、この反応の代替機構の存在が想定された。この機構を解析するため、微細構造観察等による検討を行った。その結果、①隔離膜はゴルジ体のトランス側 (トランス・ゴルジ) より伸張してくること、②オートファゴソームの形成は、隔離膜とゴルジ体輸送小胞/エンドソームとの融合によって行われていること、を見出した⁵⁾。実際に、トランス・ゴルジ膜やエンドソームの融合を担っている低分子量Gタンパク質Rab-9は、オートファゴソーム/オートリソソーム上に存在していた。また、Rab-9の発現を抑制すると新規オートファジーの誘導は妨げられた⁵⁾。これらの結果より、新規オートファジーにおけるオートファゴソーム形成は、トランス・ゴルジ膜やゴルジ体輸送小胞膜/エンドソーム膜を利用して行われているものと考えられた (図1)。

6. 新規オートファジーは酵母から保存されている

Atg5依存性のオートファジーの研究が、酵母の解析を端緒として急激に進んだことを踏まえて、我々は酵母における新規オートファジー機構の有無を検討した。具体的には、Atg5欠損酵母細胞に様々な化合物を添加し、オートファジー誘導の有無を位相差顕微鏡と電子顕微鏡を用いて観察した。その結果、抗真菌薬のアンホテリシンB1に新規オートファジー誘導活性が存在することが明らかとなった。即ち、アンホテリシンB1を投与したAtg5欠損酵母細胞の電子顕微鏡像では、①細胞質中のオートファゴソーム形成、②オートファゴソームと液胞 (哺乳動物細胞のリソソームに相当) との融合、が観察され、③western blottingでは、ゴルジ体タンパク質や細胞質局在タンパク質の分解が認められた⁶⁾。

さらに興味深いことに、アンホテリシンB1による酵母細胞の新規オートファジーは、哺乳動物細胞と同様にトランス・ゴルジ膜を必要としていた。酵母細胞のゴルジ体は通常細胞質中に散在しているが、アンホテリシンB1を投与すると、ゴルジ体が集積・多層化 (スタック形成) し、その遠心部でトランス・ゴルジ膜が湾曲して細胞質成分やミトコンドリアを包み込みオートファゴ

ソームを形成していたのである。実際に、ゴルジ体のスタック形成に関わる分子である GRH1 や湾曲に関わる分子である GRASP65 を欠損した酵母細胞では、オートファゴソーム形成が起こらないことが確認できた⁶⁾。また、免疫電顕を用いて、オートファゴソーム膜上にゴルジ体分子が局在することも確認できた。時系列的には、アンホテリシン B1 によるゴルジのスタック形成、トランス・ゴルジ膜の変形によるオートファゴソーム形成、液胞との融合の順で進行するものと考えられた。

7. 新規オートファジーの細胞機能

では、アンホテリシン B1 を投与したときに機能する新規オートファジーの役割は何であろうか？ アンホテリシン B1 を投与すると、ゴルジ体から細胞膜への蛋白質輸送系あるいは細胞外への分泌系が障害されるため、新規オートファジーはゴルジ体から先に行き場を失った蛋白質を分解している可能性が考えられた。そこで、ゴルジ体から細胞膜、細胞外への輸送に関わる分子を欠損させたり、輸送を阻害する薬剤 CBM [1, 3-cyclohexanebis(methylamine)] を投与させたりしたところ、全ての場合にゴルジ体の変形、オートファゴソーム形成、ゴルジ体タンパク質のオートファジー分解が実行されていた⁶⁾。即ち、新規オートファジーはゴルジ体から細胞膜 / 細胞外への輸送が障害されて細胞内に貯留したタンパク質を分解する役割を果たしているものと考えられた。

また、この機能は、酵母細胞だけでなく哺乳動物細胞でも同様に観察された。インスリンは、膵臓のインスリン分泌細胞 (β 細胞) で合成されゴルジ体を介して分泌されるが、細胞周囲のグルコース濃度が低下すると、更なる低グルコースを防ぐためにインスリン分泌が抑制される。この時 β 細胞内ではインスリンが貯留することになるが、新規オートファジーの活性化によってインスリンの過剰な蓄積は回避されていた⁶⁾ (他に、SINGD と呼ばれるタンパク質分解系も機能する)。即ち、新規オートファジーは、ゴルジ体からの輸送障害が生じた時 (ゴルジ体ストレス) に、不要タンパク質を除去する役割を担っているものと考えられた。

8. 二つのオートファジーの使い分け

これまで、2 種類のオートファジー機構の存在を記してきたが、これらはどのように使い分けられているであろうか？ Atg5 に依存したオートファジーも新規オートファジーも、タンパク質分解やオルガネラ分解を行っている。しかしながら、両方のオートファジーが分解する基質に一定の選択性がみられることが明らかにされつつある (但し、両方のオートファジーが同じ基質を分解するケースもある)。基質選択性が見られる代表として、p62 タンパク質が挙げられる。p62 タンパク質は Atg5 依存的オートファジーの基質としてよく知られているが、新規オートファジーでは分解されない。一方で、前述したゴルジ体からの分泌不全によって蓄積した分子の除去は、主に新規オートファジーによって

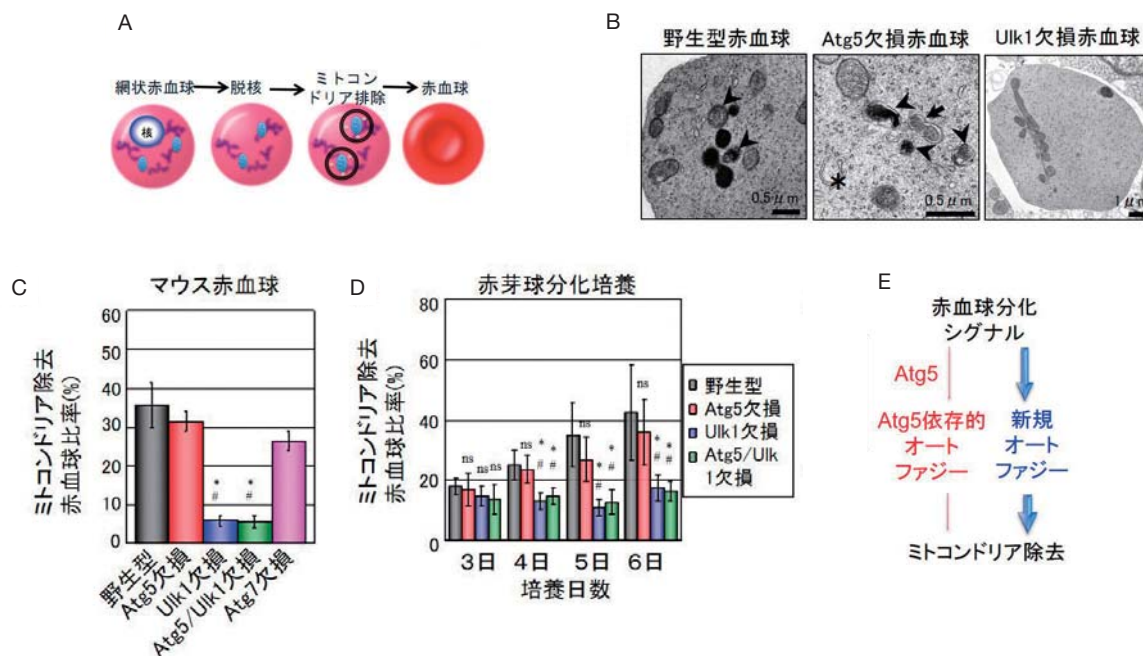


図4 赤血球からのミトコンドリア除去は新規オートファジーが行う

- A: 赤血球の最終分化は、網状赤血球から脱核、ミトコンドリア排除が起って、最終的な成熟赤血球となる。
- B: 野生型、Atg5 欠損、Ulk1 欠損胎仔の赤血球を電子顕微鏡にて観察した。野生型や Atg5 欠損赤血球では、隔離膜 (アスタリクス)、ミトコンドリアの入ったオートリソソーム (矢じり)、オートファゴソーム (矢印) が観察され、ミトコンドリアがオートファジーで分解されている像が取得できた。一方、Ulk1 欠損赤血球では、ミトコンドリアの分解は見られなかった。
- C: 各遺伝子型のマウス胎仔 18.5 日目の肝臓から採取した赤血球におけるミトコンドリア除去赤血球割合。
- D: 各遺伝子型のマウス胎仔 14.5 日目の肝臓から採取した赤芽球を、シャーレで培養して分化を誘導させた。野生型、Atg5 欠損赤芽球では、ミトコンドリア除去赤血球割合が経時的に増加したが、Ulk1 欠損赤芽球、Atg5/Ulk1 二重欠損赤芽球では、ミトコンドリア除去が起らなかった。
- E: 模式図: 赤血球からミトコンドリアが除かれる時には、Atg5 を利用するオートファジーの関与は小さく、Ulk1 を利用する新規オートファジーが関わっている。

実行されている。即ち、1つの細胞の中で、2種類の異なるオートファジー機構が活性化されており、異なる基質を分解しているのである。この基質の認識機構がどのように行われているかに関しては、今後の検討が必要である。

2種類のオートファジーの個体における役割分担に関しても、更なる詳細な解析が必要であるが、現時点で明らかにされている機能の一端を、マイトファジーを例にして紹介したい。マイトファジーとは、セレクトティブオートファジーの1つのタイプであり、ミトコンドリアを選択的に分解するオートファジーを意味する。

9. 新規オートファジーを介したマイトファジー（赤血球分化）

新規オートファジーに関わるマイトファジーの代表は、赤血球の最終分化におけるマイトファジーである。赤血球は、赤芽球、網状赤血球を経たあと脱核とミトコンドリアの除去が行われて成熟赤血球となる（図4A）。ミトコンドリアの除去は、脱核後24時間以内に行われ、これはマイトファジーによって実行されていることが古くから示唆されていた。実際に、我々が電子顕微鏡を用いて正常マウスの網状赤血球を観察したところ、ミトコンドリアを二重の膜で囲んでいるオートファゴソーム、ミトコンドリアの一部を分解しているオートリソソームが観察された（図4B）。即ち、ミトコンドリアの除去がマイトファジーによって行われているのは間違いのないものと確認された。さらに、Atg5を欠損したマウスにおいても、ミトコンドリアを囲んだオートファゴソームやオートリソソームが同程度に観察され⁵⁾（図4B）、このマイトファジーは新規オートファジーによるものであると考えられた。そこで、電子顕微鏡を用いて、ミトコンドリアの多寡を胎仔肝臓（赤血球の造血の場である）と血液で検討したところ、Atg5欠損マウスにおけるマイトファジーは野生型マウスとはほぼ同程度であり、赤血球の多くはミトコンドリアを失っていることが確認された⁷⁾。一方で、新規オートファジー制御に関わっているUlk1を欠損したマウスにおいては、マイトファジーが誘導されず、赤血球内にミトコンドリアが多数残存していた⁷⁾（図4B）。また、Atg5/Ulk1二重欠損マウスでは、Atg5の影響はほとんどなく、Ulk1欠損マウスと同程度にミトコンドリアが残存していた。これらの事実は、胎仔における赤血球マイトファジーが新規オートファジーに大きく依存していることを示している⁷⁾。

赤血球中の残存ミトコンドリアをより定量的に評価するために、赤血球の分化マーカーTer119, CD71とミトコンドリア（Mitotracker deep red）を3重染色してフローサイトメーターにて測定したところ、正常赤血球やAtg5欠損赤血球、Atg7欠損赤血球ではミトコンドリアが除去されていたが、Ulk1欠損赤血球、Ulk1/Atg5二重欠損赤血球ではミトコンドリアが残存していた（図4C）⁷⁾。さらに、野生型マウス、Atg5欠損マウス、Ulk1欠損マウス、Atg5/Ulk1二重欠損マウスから、それぞれ赤芽球を調製し、シャーレの中で血球を分化させたところ、野生型赤芽球とAtg5欠損赤芽球では、脱核後にミトコンドリア除去が行われたが、Ulk1欠損赤芽球とAtg5/Ulk1二重欠損赤芽球では、ミトコンドリア除去は行われなかった（図4D）⁷⁾。これらの解析より、赤血球の最終分化時にみられるミトコンドリア除去は、Atg5依存的なオートファジーではなく、Ulk1に依存した新規オートファジーに依存していることが証明された（図4E）。なお、この赤血球最終分化時のマイトファジーもトランス・ゴルジ膜に依存して実行さ

れていた。

10. Atg5依存性のオートファジーを介したマイトファジー（パーキンソン病の予防）

Atg5依存性のオートファジーを介したマイトファジーの代表として、パーキンソン病の予防があげられる。パーキンソン病は、黒質から線条体に投射するドーパミン性ニューロンの変性脱落により線条体のドーパミン枯渇が主原因と考えられる神経変性疾患で、振戦、固縮、無動、姿勢反射障害を主訴とする疾患である。家族性パーキンソン病の解析から複数の原因遺伝子が同定されているが、この中でParkin(PARK2)とPink1(PARK6)による病態形成にはマイトファジーが関わっている可能性が示されている。これら二つの遺伝子はともに常染色体劣性若年性パーキンソン病の原因遺伝子で、両者の臨床病像は酷似していることが知られている⁸⁾。また、ショウジョウバエを用いた遺伝学的解析から、①ParkinとPink1の欠落はともに、ドーパミン性ニューロンの脱落を示すこと、②Pink1欠損による表現型はParkinの発現によって補填されるが、Parkin欠損による表現型はPink1の発現によって補填されないこと、が明らかになっている。これらの事実は、ParkinとPink1が同じシグナル伝達経路に乗っていてPink1が上流で機能していることを示している^{9,10)}。

Youleらは、HeLa細胞等の培養細胞にCCCP（Carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone；ミトコンドリアの膜電位を枯渇させる薬剤）を添加した際に、マイトファジーが惹起されることを発見した¹¹⁾。さらに、この分子メカニズムは複数のグループによって解析され、以下のステップが明らかとなっている。即ち、①ミトコンドリアは膜電位を失うと、Pink1が外膜に安定的に局在できるようになる、②Parkinは、Pink1の局在依存的にミトコンドリアに集積する、③ユビキチンリガーゼであるParkinの集積により、傷害ミトコンドリアにはユビキチンが付与される。④このユビキチンが認識されマイトファジーが実行される、というシナリオである（図5）^{12,13)}。ParkinやPink1に異常が生じると、このシナリオが破綻し、病的ミトコンドリアが残存することによって、疾患が発症するものと考えられる。実際に、上記のシナリオは正常のParkinにおいては実行されるものの、家族性パーキンソン病患者由来のParkinでは実行されない。これらの事実

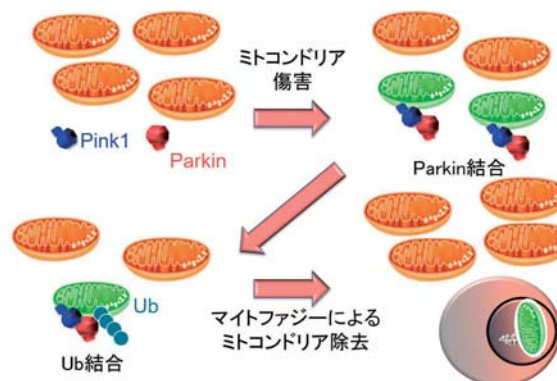


図5 Parkinによるマイトファジー実行機構の概略図
ミトコンドリアは膜電位を失うと、Pink1が外膜に安定的に局在できるようになる。その後、Parkinは、Pink1と結合して、ミトコンドリアに集積する。ユビキチンリガーゼであるParkinは傷害ミトコンドリアにユビキチンを付与し、これを認識してマイトファジーが実行される。

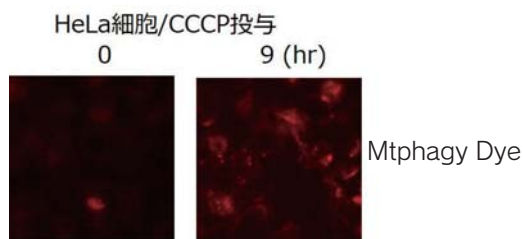


図6 MtpHagy Dye によるマイトファジー検出
HeLa 細胞に CCCP (1 μ M) を投与して、その後のマイトファジーを MtpHagy Dye にて検出した。その結果、CCCP 投与後9時間で、MtpHagy Dye の蛍光は強く検出された。

は、マイトファジーによるミトコンドリアの品質管理の破綻が、パーキンソン病の病態形成に関与していることを示している。この Parkin によるマイトファジーは Atg5 の欠損によって大きく損なわれるため、Atg5 依存性のオートファジーが大きな役割を果たしているものと考えられる。

11. マイトファジーの検出

2つの系統を介したマイトファジーは、更に広範な生命現象に関わっているものと思われるが、これらの解析を進めるためには、マイトファジーを適切に検出することが重要である。現時点では、細胞にマイトファジー感受性遺伝子を導入する方法、マイトファジー感受性化合物を用いる方法、免疫染色や western blot を用いる方法があり、いずれも両方のマイトファジーを検出することができる。マイトファジー感受性遺伝子としては、Keima 遺伝子もしくは GFP-RFP 融合遺伝子のアミノ末端にミトコンドリア局在シグナルを付与した合成遺伝子を用いる。これらを細胞に発現させることにより、Keima タンパク質、GFP-RFP 融合タンパク質をミトコンドリアに局在させることができる。前者は2種類の蛍光ピークを発するタンパク質であり1種類の蛍光波長のみが酸性環境で変化することを利用してオートリソソーム内（酸性環境）のミトコンドリアを検出する。後者は、GFP の蛍光は酸性環境で減弱するが、RFP の蛍光は酸性環境の影響を受けないことを利用してオートリソソーム内のミトコンドリアを検出する。マイトファジー感受性化合物としては、MtpHagy Dye が有用である。MtpHagy Dye はミトコンドリア指向性を有する蛍光化合物で、酸性環境下で初めて蛍光を発する。このため、ミトコンドリアがオートリソソームに取り込まれる時に蛍光が出現する（図6）。免疫染色や western blot を用いる方法では、ミトコンドリア局在タンパク質を可視化/定量することにより、ミトコンドリアの絶対量を検出する。遺伝子や化合物を用いる方法では、ミトコンドリアがオートリソソームに取り込まれるフェーズを検出するのに対し、免疫染色などではミトコンドリアが分解されるフェーズを検出する。このため、両者の結果に乖離が生じる可能性があり、マイトファジー動態を正しく解析するためには、複数のアッセイ法を組み合わせることが望ましい。

12. おわりに

本稿では、Atg5 や Atg7 に依存しない新規オートファジー機構を中心に、オートファジーの生理機能、病理機能に関して概説した。Atg5 依存性のオートファジーに比して、新規オートファジーに関する知見は充分ではない。具体的には、①新規オートファジー実行のメカニズムの詳細、②新規オートファジーの生理機能、③

新規オートファジーの変調による疾患など、今後解決していくべき問題は多い。

[引用文献]

- 1) N. Mizushima, "Physiological functions of autophagy", *Curr. Top Microbiol. Immunol.*, **2009**, 335, 71-84.
- 2) H. Nakatogawa, K. Suzuki, Y. Kamada, et al. "Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast", *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **2009**, 10, 458-467.
- 3) Z. Yang and D. J. Klionsky, "An overview of the molecular mechanism of autophagy", *Curr. Top Microbiol. Immunol.*, **2009**, 335, 1-32.
- 4) A. Kuma, M. Hatano, M. Matsui, et al., "The role of autophagy during the early neonatal starvation period", *Nature*, **2004**, 432, 1032-1036.
- 5) Y. Nishida, S. Arakawa, K. Fujitani, et al., "Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy", *Nature*, **2009**, 461, 654-658.
- 6) H. Yamaguchi, S. Arakawa, T. Kaneseke, et al., "Golgi membrane-associated degradation pathway in yeast and mammals", *EMBO J.*, **2016**, 35, 1991-2007.
- 7) S. Honda, S. Arakawa, Y. Nishida, et al., "Ulk1-mediated Atg5-independent macroautophagy mediates elimination of mitochondria from embryonic reticulocytes", *Nature Commun.*, **2014**, 5, 4004.
- 8) I. Martin, V. L. Dawson and T. M. Dawson, "Recent advances in the genetics of Parkinson's Disease", *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, **2011**, 12, 301-325.
- 9) J. Park, Y. Kim and J. Chung, "Mitochondrial dysfunction and Parkinson's disease genes: insights from Drosophila", *Dis. Model Mech.*, **2009**, 2, 336-340.
- 10) H. Li and M. Guo, "Protein Degradation in Parkinson Disease Revisited: It's Complex", *J. Clinical Invest.*, **2009**, 119, 442-445.
- 11) D. Narendra, A. Tanaka, D. F. Suen, et al., "Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy", *J. Cell Biol.*, **2008**, 183, 795-803.
- 12) D. Narendra, S. M. Jin, A. Tanaka, et al., "PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin", *PLoS Biol.*, **2010**, 8, e1000298.
- 13) N. Matsuda, S. Sato, K. Shiba, et al., "PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy", *J. Cell Biol.*, **2010**, 189, 211-221.

[著者プロフィール]

氏名：清水 重臣 (Shigeomi Shimizu)

所属：東京医科歯科大学、難治疾患研究所

病態細胞生物 教授

連絡先：〒113-8510 東京都文京区湯島 1-5-45

TEL：03-5803-4692

FAX：03-5803-4821

E-mail：shimizu.pcb@mri.tmd.ac.jp

出身学校：大阪大学医学部卒業

学位：医学博士（大阪大学）

専門分野：細胞生物学（特に、細胞死、オートファジー、ミトコンドリア）

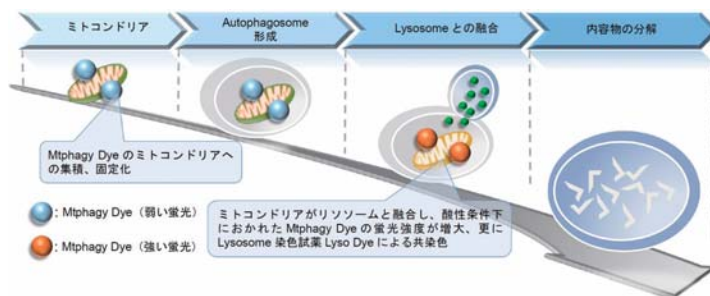
マイトファジー検出蛍光プローブ

Mitophagy Detection Kit

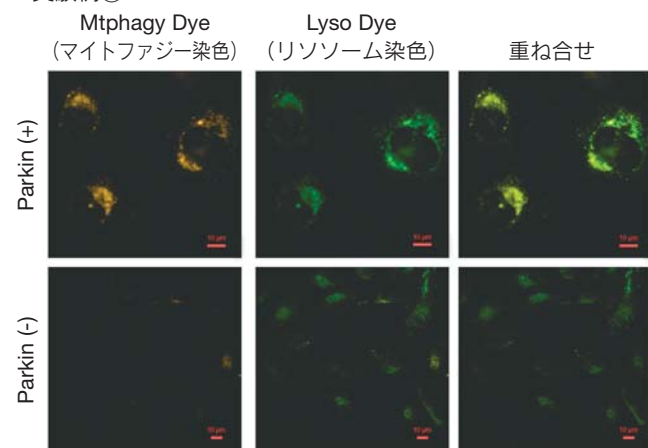
<特長>

1. 低分子蛍光プローブを用いた簡便な検出
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大し可視化できます。



<実験例①>

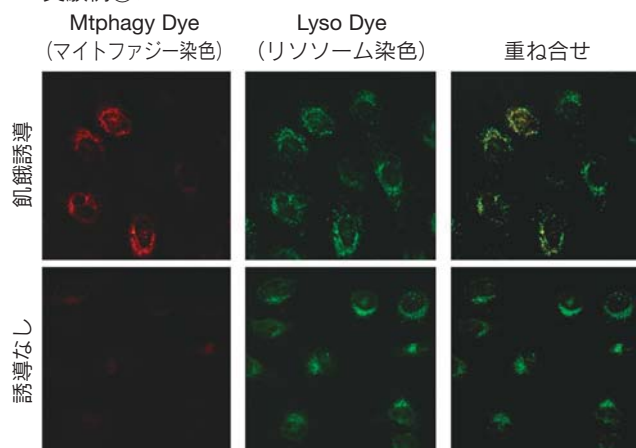


Parkin 発現 HeLa 細胞を用いたマイトファジー検出例
Parkin 発現 HeLa 細胞（上段）および未発現 HeLa 細胞（下段）に CCCP (carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone) を添加した。Parkin を発現した細胞を CCCP で刺激することでマイトファジーを誘導し、蛍光イメージングにより検出した。

Mtpahgy Dye (黄) : 525-575 nm (Ex)、570-640 nm (Em)

Lyso Dye (緑) : 450-490 nm (Ex)、500-550 nm (Em)

<実験例②>



飢餓培養条件下でのマイトファジー検出例
HeLa 細胞に Mtpahgy Dye を添加後、通常培養条件下 (DMEM) および飢餓誘導条件下 (DMEM 培地: アミノ酸不含、Pepstatin A 及び E-64d 含有) で 6 時間インキュベーション、更に Lyso Dye 添加により観察した。飢餓誘導した HeLa 細胞において、Mtpahgy Dye の蛍光強度の増大がみられた。

Mtpahgy Dye (赤) : 561 nm (Ex)、650 LP nm (Em)

Lyso Dye (緑) : 488 nm (Ex)、502-554 nm (Em)

よくあるお問合せ

Q: 既存法に対する利点を教えてください。

A: pH センサー Keima タンパク質を用いた検出方法と比較して、本キットは低分子蛍光試薬を用いるため、蛍光タンパク質を発現させる必要がありません。また、一般的なライブセルイメージング用の蛍光試薬と同様の操作方法で染色、観察することができます。

Q: 蛍光顕微鏡の推奨フィルターを教えてください。

A: 各試薬に応じて以下のフィルターを推奨します。
Mtpahgy Dye : 励起 (500 ~ 560 nm)、蛍光 (670 ~ 730 nm)
Lyso Dye : 励起 (350 ~ 450 nm)、蛍光 (500 ~ 560 nm)
取扱説明書の「励起/蛍光スペクトル」及び「蛍光顕微鏡による測定例」もご参照ください。

Q: 染色前後に細胞の固定は可能ですか？

A: 固定化した細胞では、Mtpahgy Dye がミトコンドリアに集積することができません。また染色後に細胞を固定化すると、リソソームと融合したミトコンドリアは酸性に保たれず、Mtpahgy Dye の蛍光は増大しません。

Q: ミトコンドリアも別試薬で同時に染色できますか？

A: 可能です。小社の MitoBright Deep Red [コード: MT08] を用い Mtpahgy Dye 及び Lyso Dye と共染色することで、細胞中のどのミトコンドリアでマイトファジーがおきているか確認することができます。

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

Topics on Chemistry

MitoPeDPP を用いたミトコンドリア内脂溶性過酸化物の検出

株式会社同仁化学研究所 高橋 政孝

生命は酸素を利用することで、効率的にエネルギーを取り出すことが可能となり大きく進化してきた。しかし、酸素の一部はその代謝過程で活性酸素種（ROS）と呼ばれる分子に変わる。このROSが過剰な状態は「酸化ストレス」と呼ばれ、生体内の様々な器官や細胞が酸化され疾病や老化の引き金となることが知られている。

過剰発生したROSは、その強い酸化能によりDNAやタンパク質、脂質等を酸化し、結果としてニトログアノシンやカルボニルタンパク質、過酸化脂質等の変異体および代謝物が生成される（図1）。これら変異体および代謝物は生体内酸化ストレス状態のマーカーとして測定されており、疾病と酸化ストレスの関連を解明する研究が広く進められている。

小社にて開発したMitoPeDPPはミトコンドリアの脂溶性過酸化物を蛍光検出によりモニターできる試薬である。本稿ではこのMitoPeDPPを実験に供した2報を紹介する。

ROSは神経細胞の細胞死を誘発するが、その詳細なメカニズムは解明されていない。Fukuiらは、神経芽細胞N1E-115を用いて細胞死誘発前の神経突起変性メカニズムの解明を進めている¹⁾。

著者らは種々の濃度のイオノマイシンで処理したN1E-115細胞の神経突起形態を観察し、低濃度イオノマイシン処理により細胞死に至る前に神経突起が変性することを確認した。次いで神経突起変性のメカニズムを解明するため、カルシウムイオン蛍光プローブFluo 4-AMを用いた蛍光イメージング解析を行い、低濃度（1 $\mu\text{mol/l}$ ）のイオノマイシン処理によりカルシウムイオンが細胞内へ即座に流入することを確認した。このカルシウム流入と細胞内酸化ストレスとの関連性を調査するため、ミトコンドリアROS蛍光プローブMitoSOXTMおよびミトコンドリア過酸化脂質蛍光プローブMitoPeDPPを用い、生細胞での蛍光イメージング解析を行った。その結果、MitoPeDPPによる解析では低濃度イオノマイシン処理によりMitoPeDPPの蛍光増大が観察され（図2）、さらには神経突起部位でのMitoPeDPP蛍光増大も観察された。イオノマイシン処理細胞におけるチオバルビツール酸反応性物質（TBARS）の値も高かったことから、低濃度イオノマイシン処理による神経突起変性メカニズムには、細胞内へのカルシウムイオン流入を引き金として細胞内ROSが発生し、更にミトコンドリア過酸化脂質産生が関与していると結論している。

また、Nakabeppuらは、アルツハイマー病（AD）モデルマウスおよびiPS細胞由来のADモデルヒト神経細胞を用い、hTFAM（human mitochondrial transcriptional factor A）がアルツハイマー病の原因となるミトコンドリアDNA（mtDNA）の分解やアミロイド β （ $A\beta$ ）の蓄積を抑制することを明らかにしている²⁾。

著者らはhTFAM発現ADモデルマウスにおいて、シトクロムcオキシダーゼ活性測定やMorris water maze試験によりミトコンドリア障害の抑制や認知機能の改善を確認し、更には蛍光免疫染色により $A\beta$ や8-oxoguanineの蓄積が抑制されていることを確認した。またADモデルヒト神経細胞でのMitoPeDPPによる脂溶性過酸化物の検出では、リコンビナントhTFAM処理した細胞においてMitoPeDPPの蛍光が優位に減少しており、ミトコンドリア過酸化脂質の生成が抑制されていることが確認された。このようにhTFAMがアルツハイマー病の原因因子に与える影響は、今後の新たな治療法開発に繋がる有用な知見である。

このように、発生したROSにより酸化傷害を受けたミトコンドリア内の脂溶性過酸化物のライブセル解析を行うことで、疾病や細胞内イベントのメカニズムを理解することにつながる。各種ROSや酸化ストレスマーカーに選択的で、かつ細胞内オルガネラ選択的に局在化する蛍光プローブは今後の研究に有用なツールとなり得ると考えられる。

【参考文献】

- 1) S. Nakamura, A. Nakanishi, M. Takazawa, S. Okihiro, S. Urano and K. Fukui, *Free Radic. Res.*, **2016**, 50, 11, 1214-1225.
- 2) S. Oka, J. Leon, K. Sakumi, T. Ide, D. Kang, F. M. LaFerla and Y. Nakabeppu, *Sci. Rep.*, **2016**, 6, 37889, doi: 10.1038/srep37889.

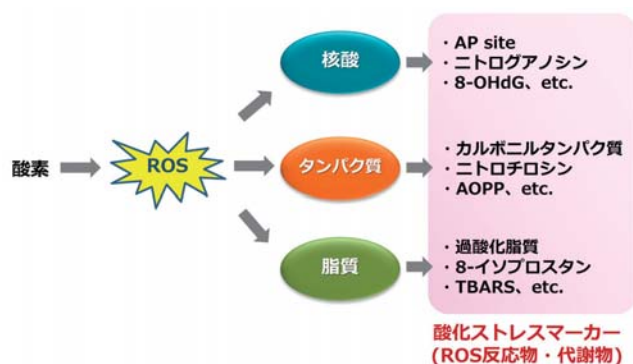


図1 活性酸素と酸化ストレスマーカー

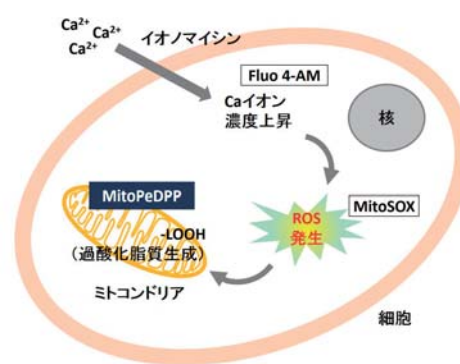
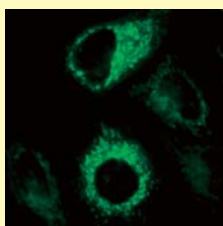


図2 イオノマイシンによるミトコンドリア過酸化脂質生成メカニズム

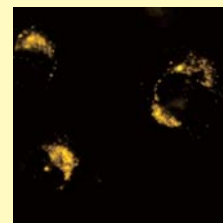
ミトコンドリア研究用試薬

脂溶性過酸化物の検出 MitoPeDPP

ROSにより酸化障害を受けたミトコンドリア中の脂溶性過酸化物を検出できます。詳細は、11ページをご覧ください。

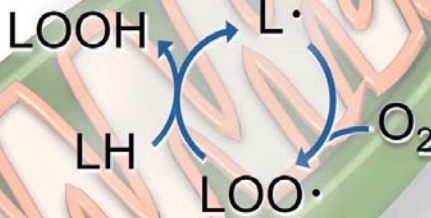


マイトファジーの検出 Mitophagy Detection Kit

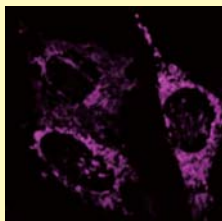


低分子蛍光プローブにより生細胞中のマイトファジーを簡単に検出できます。詳細は、7ページをご覧ください。

UV照射

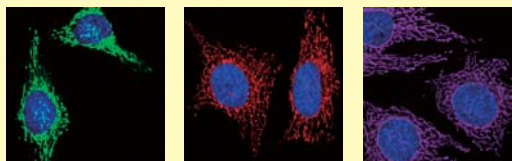


一重項酸素のライブセルイメージング Si-DMA for Mitochondrial Singlet Oxygen Imaging



ミトコンドリア内で発生した一重項酸素をリアルタイムにイメージングすることができるのは初めての試薬です。詳細は、11ページをご覧ください。

ミトコンドリア染色試薬 MitoBright Series



細胞内のミトコンドリアを特異的に染色できます。また実験に応じた蛍光波長の選択が可能です。詳細は、10ページをご覧ください。

キャンペーンのお知らせ

期間中にミトコンドリア研究用試薬をご購入のお客様へミトコンドリア染色試薬 (MitoBright series) をご提供

<対象製品：ミトコンドリア研究用試薬>

- ・ Mitophagy Detection Kit (コード：MD01)
- ・ MitoPeDPP (コード：M466)
- ・ Si-DMA for Mitochondrial Singlet Oxygen Imaging (コード：MT05)

※キャンペーン期間：2017年5月31日まで

※ご希望の方は、対象製品ご購入の際に添付されているチラシを確認の上お申し込みください。

E-mail: info@dojindo.co.jp

フリーダイヤル：0120-489548

MitoBright Series に関する詳細情報は、10ページをご覧ください。

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。

マイトファジー検出試薬		ROS検出試薬		ミトコンドリア染色試薬		膜電位依存性蛍光プローブ	
試薬名	検出対象	試薬名	検出対象	試薬名	検出対象	試薬名	検出対象
Mitophagy Detection Kit	マイトファジー	MitoPeDPP	脂溶性過酸化物	MitoBright series	ミトコンドリア	MitoTracker series	膜電位
検出原理	低分子蛍光プローブにより生細胞中のマイトファジーを簡単に検出	ROSにより酸化障害を受けたミトコンドリア中の脂溶性過酸化物を検出	ROSにより酸化障害を受けたミトコンドリア中の脂溶性過酸化物を検出	ミトコンドリア特異的な蛍光色素によりミトコンドリアを染色	ミトコンドリア特異的な蛍光色素によりミトコンドリアを染色	膜電位依存性蛍光色素により膜電位を染色	膜電位依存性蛍光色素により膜電位を染色
検出波長	488nm	488nm	488nm	488nm	488nm	488nm	488nm
検出装置	蛍光顕微鏡	蛍光顕微鏡	蛍光顕微鏡	蛍光顕微鏡	蛍光顕微鏡	蛍光顕微鏡	蛍光顕微鏡
検出時間	リアルタイム	リアルタイム	リアルタイム	リアルタイム	リアルタイム	リアルタイム	リアルタイム
検出範囲	細胞内	細胞内	細胞内	細胞内	細胞内	細胞内	細胞内
検出感度	高感度	高感度	高感度	高感度	高感度	高感度	高感度
検出精度	高精度	高精度	高精度	高精度	高精度	高精度	高精度
検出コスト	低コスト	低コスト	低コスト	低コスト	低コスト	低コスト	低コスト
検出安全性	安全	安全	安全	安全	安全	安全	安全
検出操作性	簡単	簡単	簡単	簡単	簡単	簡単	簡単
検出信頼性	信頼性	信頼性	信頼性	信頼性	信頼性	信頼性	信頼性
検出再現性	再現性	再現性	再現性	再現性	再現性	再現性	再現性
検出安定性	安定性	安定性	安定性	安定性	安定性	安定性	安定性
検出柔軟性	柔軟性	柔軟性	柔軟性	柔軟性	柔軟性	柔軟性	柔軟性
検出拡張性	拡張性	拡張性	拡張性	拡張性	拡張性	拡張性	拡張性
検出保守性	保守性	保守性	保守性	保守性	保守性	保守性	保守性
検出廃棄性	廃棄性	廃棄性	廃棄性	廃棄性	廃棄性	廃棄性	廃棄性
検出回収性	回収性	回収性	回収性	回収性	回収性	回収性	回収性
検出再利用性	再利用性	再利用性	再利用性	再利用性	再利用性	再利用性	再利用性
検出再処理性	再処理性	再処理性	再処理性	再処理性	再処理性	再処理性	再処理性
検出再検査性	再検査性	再検査性	再検査性	再検査性	再検査性	再検査性	再検査性
検出再評価性	再評価性	再評価性	再評価性	再評価性	再評価性	再評価性	再評価性
検出再報告性	再報告性	再報告性	再報告性	再報告性	再報告性	再報告性	再報告性
検出再承認性	再承認性	再承認性	再承認性	再承認性	再承認性	再承認性	再承認性
検出再発行性	再発行性	再発行性	再発行性	再発行性	再発行性	再発行性	再発行性
検出再配布性	再配布性	再配布性	再配布性	再配布性	再配布性	再配布性	再配布性
検出再販売性	再販売性	再販売性	再販売性	再販売性	再販売性	再販売性	再販売性
検出再譲渡性	再譲渡性	再譲渡性	再譲渡性	再譲渡性	再譲渡性	再譲渡性	再譲渡性
検出再贈与性	再贈与性	再贈与性	再贈与性	再贈与性	再贈与性	再贈与性	再贈与性
検出再売却性	再売却性	再売却性	再売却性	再売却性	再売却性	再売却性	再売却性
検出再買取性	再買取性	再買取性	再買取性	再買取性	再買取性	再買取性	再買取性
検出再交換性	再交換性	再交換性	再交換性	再交換性	再交換性	再交換性	再交換性
検出再返品性	再返品性	再返品性	再返品性	再返品性	再返品性	再返品性	再返品性
検出再キャンセル性	再キャンセル性	再キャンセル性	再キャンセル性	再キャンセル性	再キャンセル性	再キャンセル性	再キャンセル性
検出再キャンセル性	再キャンセル性	再キャンセル性	再キャンセル性	再キャンセル性	再キャンセル性	再キャンセル性	再キャンセル性

下記のキーワードで検索し小社 HP へお越しください。

ミトコンドリア 比較 同仁

検索

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

品名	λ_{ex}	λ_{em}	生細胞染色	染色後の PFA* 固定	固定後の染色	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
MitoBright Green	493 nm	508 nm	○	○	×	50 μ g x 3	9,800	MT06
MitoBright Red	547 nm	563 nm	○	○	×	50 μ g x 3	9,800	MT07
MitoBright Deep Red	643 nm	663 nm	○	○	×	50 μ g x 3	9,800	MT08

*PFA: Paraformaldehyde

製品サンプルお試しキャンペーンのお知らせ

ミトコンドリア研究用の対象製品※を期間中にご購入頂いたお客様へ、MitoBright Series (Green, Red, Deep Red) の中からご希望の色素 (50 μ g x 1 本) をご提供させていただきます。サンプルご希望の方は、ご購入製品に添付されているチラシをご確認の上お申し込みください。

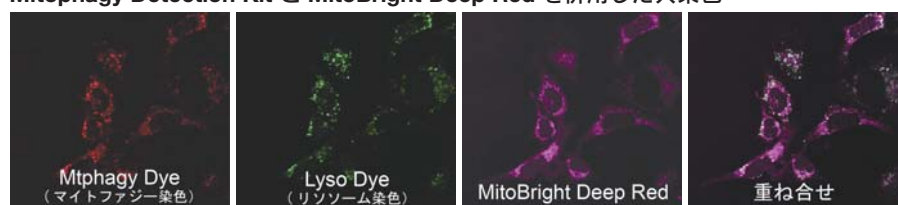
キャンペーン期間：2017 年 2 月 1 日～2017 年 5 月 31 日

※対象製品

- ・ Mitophagy Detection Kit [Code: MD01]
- ・ MitoPeDPP [Code: M466]
- ・ Si-DMA for Mitochondrial Singlet Oxygen Imaging [Code: MT05]

マイトファジー検出

Mitophagy Detection Kit と MitoBright Deep Red を併用した共染色



Mtpahgy Dye: 561 nm (Ex)、650 LP nm (Em)
Lyso Dye: 488 nm (Ex)、502-554 nm (Em)
MitoBright Deep Red: 575-625 nm (Ex)、
660-710 nm (Em)

Parkin 発現 HeLa 細胞に CCCP (carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone) を添加することでマイトファジーを誘導し、マイトファジーを検出した。ミトコンドリア染色色素 (MitoBright Deep Red: MT08) と共染色することにより、リソソームに取り込まれたミトコンドリア (白色) と取り込まれていないミトコンドリア (紫色) を識別することが可能となった。

脂溶性過酸化物質検出

MitoPeDPP と MitoBright Deep Red を併用した共染色

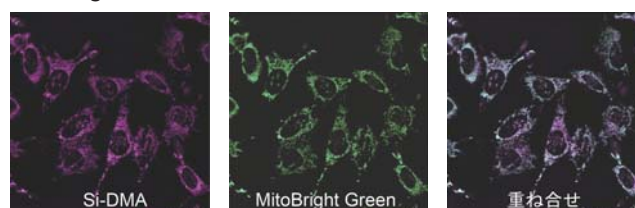


HeLa 細胞へ *tert*-Butylhydroperoxide の添加により細胞内で強制的に ROS を発生させ、ミトコンドリアにおける脂溶性過酸化物質を検出した。ミトコンドリア染色試薬 (MitoBright Deep Red: MT08) との共染色により大部分のミトコンドリアで脂溶性過酸化物質が生じていることが確認された。

MitoPeDPP: 450-490 nm (Ex)、500-525 nm (Em)
MitoBright Deep Red: 575-625 nm (Ex)、660-710 nm (Em)

一重項酸素検出

Si-DMA for Mitochondrial Singlet Oxygen Imaging と MitoBright Green を併用した共染色



HeLa 細胞への刺激 (過酸化水素 100 μ mol/l 及び次亜塩素酸 100 μ mol/l 添加) により細胞内に生じた一重項酸素を Si-DMA により検出した。ミトコンドリア染色色素 (MitoBright Green: MT06) との共染色により、ミトコンドリアにおける一重項酸素を特異的に検出していることを確認した。

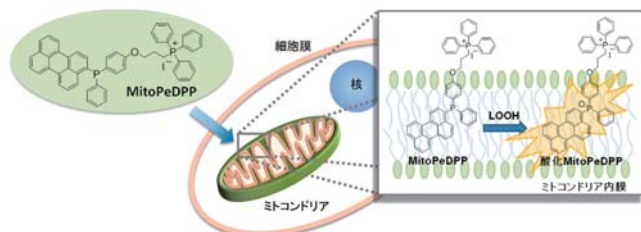
Si-DMA: 575-625 nm (Ex)、660-710 nm (Em)
MitoBright Green: 488 nm (Ex)、501-563 nm (Em)

ミトコンドリア膜脂溶性過酸化物検出蛍光試薬

MitoPeDPP

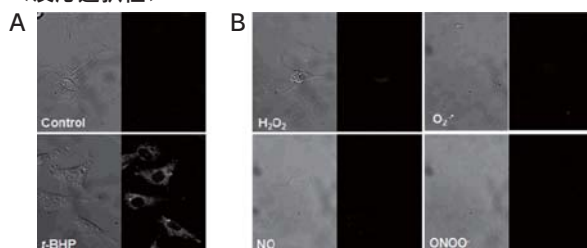
<特長>

1. 細胞小器官であるミトコンドリア特異的に集積
2. ミトコンドリア膜中の脂溶性過酸化物を選択的に検出
3. 励起波長 488 nm、蛍光波長 535 nm で測定可能



MitoPeDPP は、ミトコンドリアに局在化するカチオン性のトリフェニルホスホニウム基を分子内に持つため、細胞膜を透過してミトコンドリアに集積します。ミトコンドリアに集積した MitoPeDPP は、膜中の脂溶性過酸化物によって特異的に酸化され蛍光を発します。酸化 MitoPeDPP の励起および蛍光波長はそれぞれ 452 nm、470 nm で、測定試料への光によるダメージや試料由来の自家蛍光の影響を軽減できることから、蛍光顕微鏡を用いた脂溶性過酸化物のイメージングが可能です。

<反応選択性>



MitoPeDPP の反応選択性

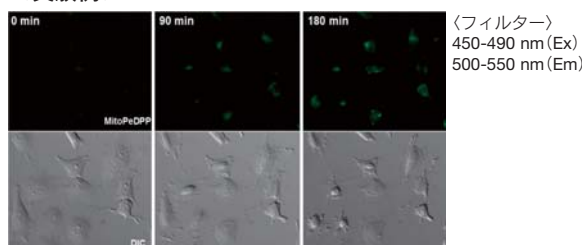
A: HepG2 細胞中で MitoPeDPP を 15 分インキュベート後、100 $\mu\text{mol/l}$ t-BHP を添加、更に 15 分のインキュベート後、顕微鏡画像を取得。B: HepG2 細胞中で MitoPeDPP を 15 分インキュベート後、各種 ROS、RNS 発生剤を添加 (H_2O_2 、NO、ONOO $^-$ は各発生剤の濃度を 100 $\mu\text{mol/l}$ 使用、 O_2^- は PMA (phorbol myristate acetate) により発生させ 10 $\mu\text{mol/l}$ の濃度で使用する)。

細胞内でミトコンドリアに集積した MitoPeDPP は脂溶性過酸化物により酸化を受けて蛍光を発した (A)。一方、他の ROS、RNS との反応性は低いことが確認された (B)。

※写真は位相差画像 (左) と蛍光画像 (右) を示す。

※フィルター: 450-490 nm (Ex)、500-550 nm (Em)

<実験例>



Rotenone を用いた脂溶性過酸化物の検出例

Rotenone 添加直後 (左)、添加 90 分後 (中)、添加 180 分後 (右) の HeLa 細胞を観察。添加 90 分後より MitoPeDPP により脂溶性過酸化物を検出した。

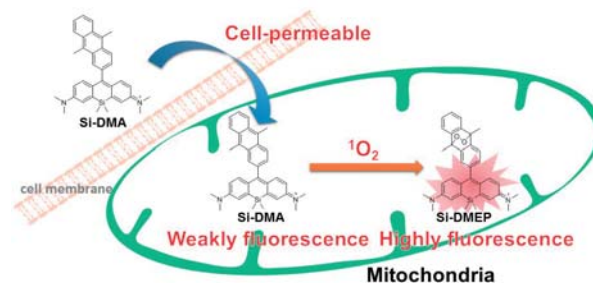
品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
MitoPeDPP	5 μg x 3	18,000	M466

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

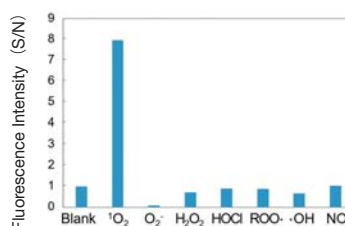
<特長>

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。

<反応選択性>



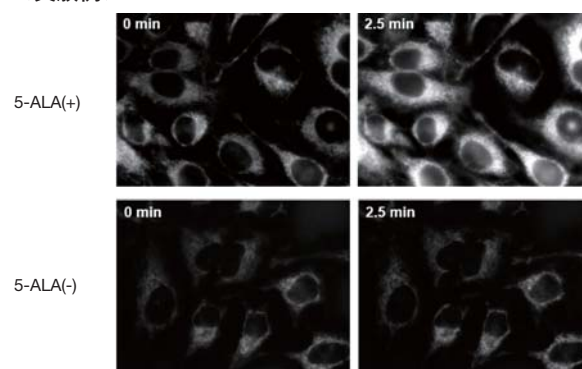
<比較条件>

PBS (pH7.4): メタノール = 1:1
Si-DMA: 終濃度 1 $\mu\text{mol/l}$
ROS: 10 mmol/l
RNS: 10 mmol/l

Si-DMA の反応選択性

各種活性酸素種および活性窒素種への反応性を比較したところ、Si-DMA は一重項酸素に選択的に反応を示し、蛍光強度比が 8 倍以上増加することが確認された。

<実験例>



5-ALA で処理した HeLa 細胞の Si-DMA による一重項酸素の検出

HeLa 細胞への 5-aminolevulinic acid (5-ALA) 処理により、ミトコンドリア内でプロトポルフィリン IX を生成。蛍光顕微鏡の励起光照射により発生した一重項酸素に Si-DMA が反応したことを確認した。

フィルター: 575-625 nm (Ex)、650-710 nm (Em)

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

新製品 **DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.**

少量抗体 (10 µg) 標識キット

Ab-10 Rapid Biotin Labeling Kit

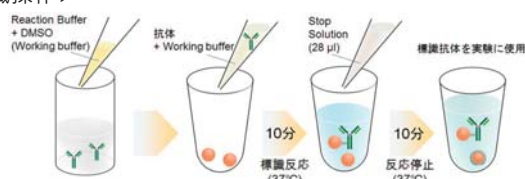
<特長>

1. 少量の抗体で標識抗体を調製できる
2. 抗体と標識剤を混ぜるだけで標識できる
3. 30 分以内に標識できる

Ab-10 Rapid Labeling Kit シリーズは、10 µg の抗体に 30 分以内に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。

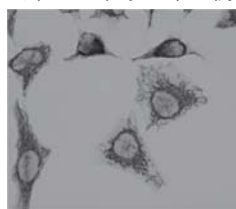
* 安定化剤の濃度によっては精製が必要な場合があります。詳細は小社 HP にご確認ください。

<標識操作>



<実績例>

ミトコンドリア染色例



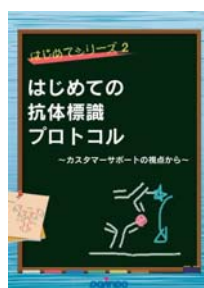
Biotin 標識抗ミトコンドリア抗体を固定化後の HeLa 細胞に添加し免疫反応後、Peroxidase 標識ストレプトアビジン及び DAB [code: D006] 添加によりミトコンドリアを染色した。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Ab-10 Rapid Biotin Labeling Kit	3 samples	18,000	LK37

関連製品

品名	容量	希望納入価格(¥)	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
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

抗体標識はじめてシリーズ



直接標識法の利点や実施例などを分かりやすくまとめました。はじめて抗体を標識される方にご覧いただきたいプロトコルです。

下記のキーワードで検索し小社 HP へお越しください。

はじめて 抗体 [検索](#)

DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

抗体・タンパク質 (50-200 µg) 標識キット

Dojindo Labeling Kits

<特長>

1. 高分子から低分子まで標識できる
2. NH₂ 標識と SH 標識が選択できる
3. 限外ろ過膜による簡便なバッファー交換と反応

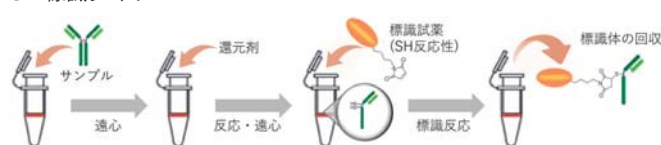
Dojindo Labeling Kits は、標識試薬とフィルトレーションチューブ (限外濾過膜)、各種バッファーにより構成されたキットで、抗体やタンパク質、ペプチド等簡単に標識できます。

<標識操作>

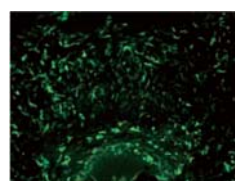
NH₂ 標識タイプ



SH 標識タイプ



<実績例>



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 歯学総合研究科歯髄生物学分野 川島伸行先生)

<蛍光標識キット>

品名	容量	希望納入価格(¥)	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。

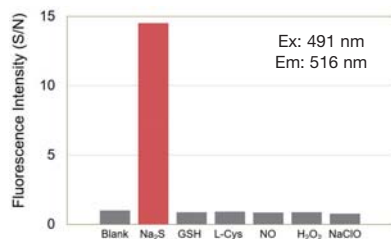
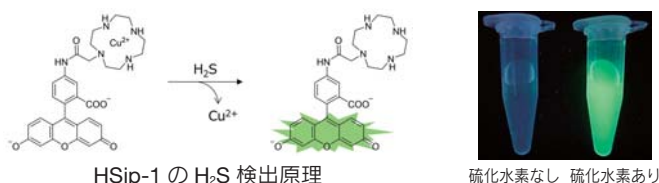
開発中 **DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.**

硫化水素検出用蛍光プローブ

-SulfoBiotics- **HSip-1**

近年、硫化水素 (H_2S) が、血管拡張や細胞保護、インスリン分泌や神経伝達調節など様々な生理活性を示すことが明らかにされ、硫化水素を中心とした硫黄の生体内機能の解明が待ち望まれています。

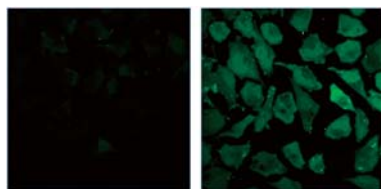
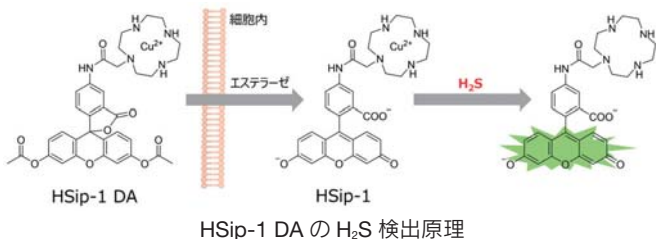
-SulfoBiotics- HSip-1 は、硫化水素と反応し強い蛍光 (λ_{ex} : 491 nm, λ_{em} : 516 nm) を発する蛍光プローブです。本プローブは、生体内に豊富に存在するグルタチオンやシステインとは反応しないため、生体試料中の特異的な硫化水素検出に有用です。また、細胞膜透過型の HSip-1 DA は細胞内 H_2S の蛍光イメージングに適用可能です。



HSip-1 の反応選択性比較

HSip-1 1 μ mol/l (30 mmol/l HEPES, pH7.4) 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)



左図: 未処理の HeLa 細胞
右図: Na₂S * 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 H_2S 蛍光イメージング
フィルター: 488 nm (Ex)、500-550 nm (Em)

本製品に関するお問い合わせは、info@dojindo.co.jp まで。

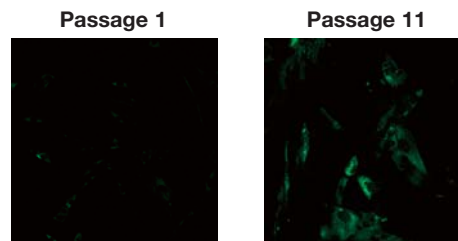
開発中

細胞老化検出キット

Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER- β Gal

本キットには、 β -ガラクトシダーゼ特異的な蛍光基質 (SPiDER- β Gal) が含まれており、一般的な X-gal 染色に比べ簡便かつ迅速に老化細胞を検出することができます。またフローサイトメーターを用いた定量解析への応用も可能です。

<測定例①>

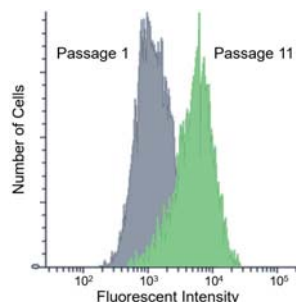


継代数に応じた SA- β -gal 発現の確認

継代を 1 回および 11 回行った WI-38 細胞 (ヒト胎児肺細胞) の SA- β -gal を蛍光イメージングにて解析。11 回継代を行った細胞において顕著な SA- β -gal 活性に伴う蛍光増大が確認された。

フィルター: 488 nm (Ex)、500-600 nm (Em)

<測定例②>



<フィルター>
Ex: 488 nm
Em: 515-545 nm

フローサイトメトリ解析例

上記イメージング実験に使用した細胞を、フローサイトメトリにて解析。

本キットに関するお問い合わせは、info@dojindo.co.jp まで。

関連製品

細胞毒性測定キット

Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST

<特長>

- ・ CCK-8 や MTT 等の毒性評価の裏付けデータとして使用できる。
- ・ 2 つの操作法から選択できる。
 - ー 試薬を直接培地に添加する簡便法
 - ー 培養上清を使い細胞が再利用できる測定法
- ・ 試薬の安定性が高い。

お求めやすい容量にて準備しておりますので、是非ご検討ください。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST	100 tests	9,600	CK12
	500 tests	25,400	
	2000 tests	38,000	

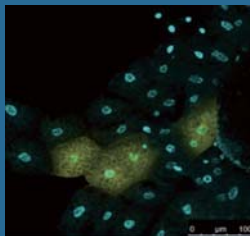
試薬を通して最新研究をサポート

DOJINDO

β-ガラクトシダーゼ検出プローブ SPiDER-βGal

優れた膜透過性と細胞内滞留性により
β-ガラクトシダーゼを高感度に検出

組織のライブイメージング



未固定のショウジョウバエ組織を 10 μmol/l SPiDER-βGal と 16 μmol/l Hoechst 33342 にて 20-30 分間染色後、共焦点顕微鏡にて観察。

黄色：SPiDER-βGal

青色：Hoechst 33342

β-ガラクトシダーゼ発現細胞に隣接する未発現細胞に全く影響を及ぼすことなく、β-ガラクトシダーゼ発現細胞のみを特異的に染色した。

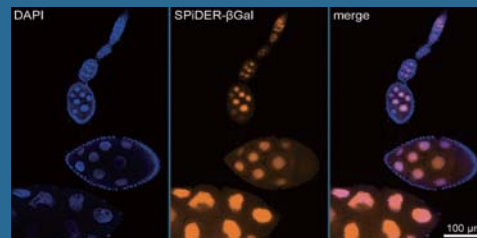
(データ提供：東京大学大学院医学系研究科 浦野泰照教授)

固定化後の組織イメージング

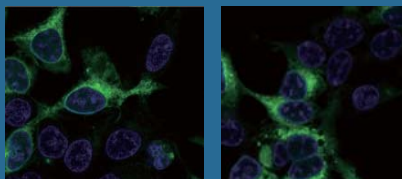
ショウジョウバエ生殖細胞をホルマリン固定後、SPiDER-βGalとDAPIにて染色後、蛍光顕微鏡にて観察。

生殖細胞中の核に発現したβ-ガラクトシダーゼをSPiDER-βGalにより確認した。

(データ提供：熊本大学発生医学研究所 中村輝教授)



固定化前後の細胞イメージング



固定化前

固定化後

HEK293細胞および β-ガラクトシダーゼ安定発現HEK/LacZ 細胞を1:1となるよう混合培養し、固定化前後で SPiDER-βGal による染色を行い共焦点顕微鏡で観察。

緑色：SPiDER-βGal

青色：Hoechst 33342

固定化後も固定化前と比較して、同様のイメージング像が得られた。

同仁化学 SPiDER

検索

WEBでもっと詳しく!!



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