



DOJIN NEWS

ドージンニュース

2017 No.161

ISSN 0385-1516

細胞老化・低酸素

—総説—

りん光計測に基づく生体内酸素プローブの開発

群馬大学 吉原 利忠 飛田 成史

細胞老化と個体の老化・老年病

東京大学医科学研究所 城村 由和 中西 真

—注目の研究—

β -ガラクトシダーゼ検出蛍光プローブによる
一細胞レベルでの *lacZ* 発現の検出

株式会社同仁化学研究所 野口 克也

新製品 老化細胞検出キット P.10

新製品 オートファジー検出蛍光試薬 P.12

お役立 老化細胞検出におけるFAQ P.11





表紙撮影：熊本県阿蘇市 阿蘇米塚
photo：永島俊介氏

CONTENTS

Review

りん光計測に基づく生体内酸素プローブの開発 ●———— [1]

群馬大学 吉原 利忠 飛田 成史

細胞老化と個体の老化・老年病 ●———— [6]

東京大学医科学研究所 城村 由和 中西 真

Topics on Chemistry

β-ガラクトシダーゼ検出蛍光プローブによる
—細胞レベルでの *lacZ* 発現の検出

株式会社同仁化学研究所 野口 克也 ●———— [9]

Commercial

マイトファジー検出蛍光試薬 ●———— [12]

β-ガラクトシダーゼ検出プローブ ●———— [13]

新製品

老化細胞検出キット ●———— [10]

オートファジー検出蛍光試薬 ●———— [12]

お知らせ

はじめてシリーズのご案内 ●———— [5]

試薬比較ページのご案内

細胞増殖/細胞毒性測定用試薬 ●———— [5]

β-ガラクトシダーゼ検出用試薬 ●———— [8]

イノベティブ リサーチ センター開設のご案内 ●———— [13]

学会展示・ポスター発表のご案内 ●———— [13]

※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。

老化細胞検出キット

Cellular Senescence Detection Kit -
SPIDER-β Gal

オートファジー検出蛍光試薬

DALGreen - Autophagy Detection

りん光計測に基づく生体内酸素プローブの開発

Development of *in vivo* oxygen probes based on phosphorescence measurements



吉原 利忠

群馬大学大学院理工学府
分子科学部門
准教授



飛田 成史

群馬大学大学院理工学府
分子科学部門
教授

Abstract

Molecular oxygen plays a pivotal role in aerobic organisms as a terminal electron acceptor in the electron transport chain in mitochondria. Oxygen deprivation (hypoxia) in organisms is associated with various hypoxia-related cellular functions and diseases, and thus there is urgent need for accurate techniques to evaluate the intracellular and *in vivo* oxygen status. This review focuses on optical oxygen imaging method using phosphorescent probes. Principles of oxygen sensing by means of phosphorescence quenching, representative phosphorescent oxygen probes and their applications to intracellular and *in vivo* oxygen measurements are described, emphasizing the usefulness of iridium complexes as new biological oxygen probes.

1. はじめに

分子の発光を利用した生体関連化学種のセンシング技術は、近年、生物や医学の研究にとって欠かせない重要な技術となっている^{1), 2)}。対象となる分子（あるいはイオン）は、① K^+ 、 Ca^{2+} などのカチオン、②ハロゲン化物イオン、リン酸イオンなどのアニオン、③糖、グルコースなどの中性分子、さらに、④タンパク質、DNAなどの生体高分子と非常に多岐にわたる。

例えば、金属イオンのセンシングでは、蛍光団を含むレセプターが金属イオンと結合することにより、蛍光団の吸収・発光の強度や波長が変化することを一般に利用している。有機化合物の発光は、通常、励起一重項状態 (S_1) からの発光、すなわち蛍光であるため、これまでの発光プローブはほとんどが蛍光を検出する蛍光プローブであった (図 1)。

一方、最近、蛍光に代わって励起三重項状態 (T_1) からの発光

であるりん光 (図 1 参照) を使った、同様の発光プローブ (りん光プローブ) が開発されつつある³⁾。蛍光に代わってりん光を使う利点は、どこにあるのだろうか。りん光は蛍光に比べて、吸収スペクトルと発光スペクトルのピークのエネルギー差 (Stokes shift) が大きい。そのため、蛍光顕微鏡を用いた発光画像測定の際にフィルターを使って励起光を除去しやすい、という利点がある。また、りん光は、いわゆるスピン禁制遷移であるため、蛍光に比べて励起状態に留まっている平均の時間 (励起寿命) が長い。その結果、りん光プローブを取り込んだ培養細胞などの生体試料を時間幅の短いパルス光で励起すると、自家蛍光は数十ナノ秒以内に減衰して消えてしまうが、りん光は数百ナノ秒あるいは数マイクロ秒以上の間、光り続ける。従って、励起パルスに対して蛍光がほぼ完全に減衰する程度の遅延時間を置いてから発光を測定すれば、自家蛍光を除去してプローブのみの発光を測定感度を上げて観測できる、という大きな利点を有する。

一方、りん光寿命が数マイクロ秒以上の励起分子では、励起寿命の間に拡散によって周囲の酸素分子との衝突が可能となるため、酸素分子にエネルギーを渡して励起分子が失活するりん光消光が起こる (図 1)。その結果、りん光強度が減少するとともに、りん光寿命が短くなる。この酸素によるりん光消光反応を利用すると、生体内の酸素レベルをリアルタイムで検出することが可能になる⁴⁻⁸⁾。本報では、このりん光プローブを用いた生体内酸素計測について、現在我々の研究室で行っているイリジウム錯体をりん光性酸素プローブとして用いた細胞や組織内の酸素計測を中心に紹介したい。

2. りん光計測に基づく酸素測定

酸素分子は、図 2 に示すように、エネルギー的に低い位置に二つの電子的励起状態を有する。これらの状態は、電子状態を表す記号を用いて、 $^1\Sigma_g^+$ 、 $^1\Delta_g$ 状態と表記される。ここで、左上の 1 は、分子内の電子のスピン状態が一重項状態であることを示している。

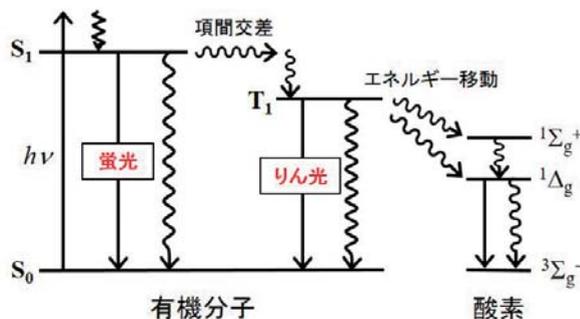


図 1 有機分子のエネルギー状態図と酸素分子の励起状態へのエネルギー移動
図中の実線矢印は光を放出する放射過程、波線矢印は光を放出しない無放射過程を表す。

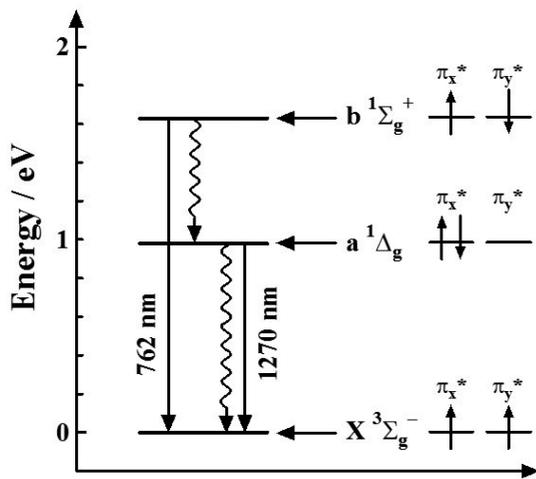


図2 酸素分子の基底状態 ($^3\Sigma_g^-$) と励起状態 ($^1\Delta_g, ^1\Sigma_g^+$) の電子配置とエネルギー準位

酸素の励起状態の中でエネルギー的に最も低い $^1\Delta_g$ 状態は、一般に一重項酸素と呼ばれ、いわゆる活性酸素の一種としてよく知られている。 $^1\Delta_g$ 状態のエネルギー (0.98 eV) は、通常の芳香族有機分子の励起三重項状態のエネルギーに比べてかなり低いため、酸素分子は励起分子と衝突するとそのエネルギーを受け取って、励起分子を失活させる性質をもっている (図1)。この過程は、一般にエネルギー移動消光と言われる。さらに、酸素分子は電子を受け取りやすい性質をもつため、電子を放出しやすい励起分子と衝突すると、酸素分子への電子移動反応によっても消光を起こし得る。この過程は、電子移動消光と呼ばれる。

酸素によるイリジウム錯体のりん光消光反応の機構は、配位子の構造によって異なる。三重項エネルギーが低く電子を放出しづらい錯体では、主にエネルギー移動によって消光が起こり、三重項エネルギーが高く電子を放出しやすい錯体では、エネルギー移動と電子移動の両過程によって消光が起こる⁹⁾。

溶液中では、脱酸素した状態のりん光寿命 τ_p^0 (または、りん光強度 I_p^0) と酸素存在下のりん光寿命 τ_p (または、りん光強度 I_p) は、酸素濃度 $[O_2]$ または酸素分圧 pO_2 と、次に示す Stern-Volmer の式に従うことが知られている。

$$\frac{\tau_p^0}{\tau_p} = \frac{I_p^0}{I_p} = 1 + k_q \tau_p^0 [O_2] = 1 + k_q' \tau_p^0 pO_2 \quad (1)$$

ここで、 k_q (k_q') は消光速度定数と呼ばれ、消光反応の起こりやすさの尺度となる量である。従って、あらかじめ、脱酸素下でのりん光寿命 τ_p^0 と k_q 値を求めておけば、りん光寿命 τ_p を測定することにより、励起分子周囲の酸素濃度あるいは酸素分圧を求めることができる¹⁰⁾。

3. 低酸素マーカーとの違い

低酸素状態にある生体組織を簡便に検出する方法として、ピモニダゾール (1-(2-Nitro-1H-imidazol-1-yl)-3-(piperidin-1-yl)-2-propanol) に代表される 2-ニトロイミダゾール誘導体を使った低酸素マーカーが古くから用いられている。ピモニダゾールは、酸素分圧が約 10 mmHg 以下の低酸素組織に取り込まれると、タンパク質のチオール基に結合し固定化されるため、ピモニダゾールが結合した組織を抗ピモニダゾール抗体を用いて免疫染色するこ

とで、組織中の酸素濃度勾配を検出することができる。この方法は、対象となる細胞や組織のある時点での酸素濃度勾配を、比較的簡便な測定で画像化できるという利点を有するが、生体内の酸素濃度を定量し、その変化をリアルタイムで追跡することはできない。

一方、りん光プローブを用いた酸素計測法では、細胞や組織に取り込まれたプローブの濃度が変わらなければ、発光強度の増減は酸素濃度の相対的な変化をリアルタイムで与えることになる。しかし、発光の強さは、プローブの濃度や励起光強度に依存するため、観測された発光強度が高いから低酸素状態にある、と判断することは難しいので注意が必要である。酸素濃度の高低を定量的に議論するには、上で述べたりん光寿命の測定が必要になる。

4. 代表的なりん光性酸素プローブ

“はじめに” で述べたように、通常の有機分子が与える発光は蛍光に分類され、室温で強いりん光を与える有機分子はほとんど見られない。しかし、分子中に金属イオンを含んだいわゆる金属錯体の中には、脱酸素溶液中で強いりん光を与える化合物がある。その中で、早くから生体内酸素プローブとして注目されてきた錯体として、図3A, B に示すルテニウム(II) 錯体¹¹⁾ とパラジウム(II) または白金(II) イオンを中心にもつ金属ポルフィリン¹²⁾ がある。これらの錯体は、分子構造に多くの改良が重ねられ、培養細胞内あるいは生体組織の血流中の酸素プローブとして用いられている⁸⁾。

一方、我々は有機 EL (Organic electroluminescence) の発光材料として用いられているイリジウム錯体が、溶液中においても強いりん光を与えることに着目し、まず、赤色発光を与える BTP (図3C) について酸素プローブとしての有用性を検討した¹³⁾。その結果、BTP は担癌マウスの尾静脈に投与すると、数十分以内に血中から癌細胞内に取り込まれ、低酸素状態にある腫瘍を発光イメージングできることが分かった。その後、BTP 誘導体を中心に、イリジウム錯体に基づく様々な生体酸素プローブの開発を行ってきた^{7), 8)}。

5. イリジウム錯体の特徴

イリジウム錯体の特徴として、配位子の構造を合成化学的に修飾しやすいこと、配位子の構造によって、吸収・発光波長、発光寿命等の発光特性を変えることができること、さらに、細胞内取り込み能、細胞内局在等の細胞特性も制御できることが挙げられ

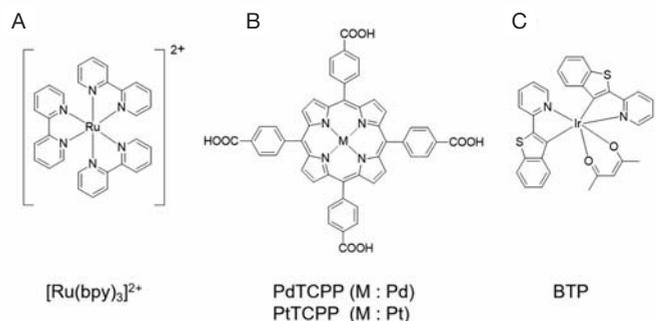


図3 りん光性酸素プローブとして最初に用いられた代表的な Ru (II) 錯体 (A)、金属ポルフィリン (B)、Ir(III) 錯体 (C)

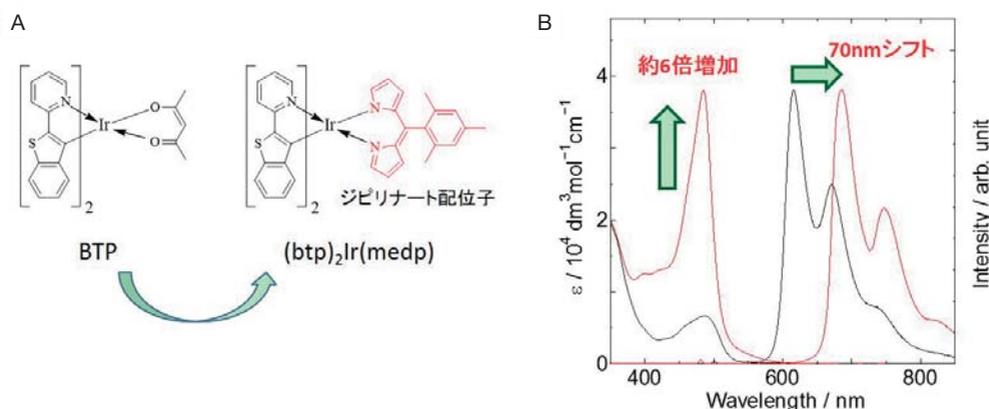


図4 (btp)₂Ir(acac) (BTP)と (btp)₂Ir(medp)の構造式(A)と THF 中における吸収・りん光スペクトル(B)

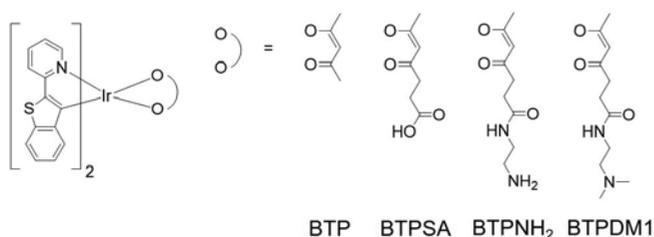


図5 BTP と BTP の acac 配位子に置換基を導入した誘導体の構造と略号

る。例えば、図4に示すように、BTPのアセチルアセトナート(acac)配位子をジピリナート配位子に変えると、モル吸光係数が約6倍に増加し、発光波長を組織への透過性の高い近赤外領域まで延長させることができる。また、BTPのacac配位子にアニオン性またはカチオン性置換基を導入した錯体(図5)では、吸収・発光特性は保持させながら、細胞特性を変化させることができる。細胞内への取り込み量をICP-MS(誘導結合プラズマ質量分析法)を使って分析したところ、BTPに比べてカチオン性置換基を有するBTPDM1では、約20倍取り込み効率が増加した¹⁴⁾。また、BTPとBTPSAの細胞内局在が主に小胞体であるのに対し、BTPNH₂、BTPDM1はライソソームに集積する性質を有することが明らかにされている¹⁴⁾。さらに、図6に示すBTP-Mitoでは、ミトコンドリアへの集積を促進するといわれているトリフェニルホスホニウムカチオン(TPP)をacac配位子に導入したところ、実際にミトコンドリアに対する集積性を示し、培養器の酸素分圧を21%から2.5%に減じると、発光輝度が上昇するとともに発光の減衰速度が遅くなった。すなわち、りん光寿命が長くなることが確かめられた¹⁵⁾。

6. イリジウム錯体を使った細胞内酸素濃度計測

りん光性酸素プローブを使って、細胞内の酸素濃度を定量することはできるのだろうか。その答えを得るには、まず、プローブ分子が細胞内で置かれた環境について考慮する必要がある。図5に示したようなイリジウム錯体は疎水性が高いため、細胞内に取

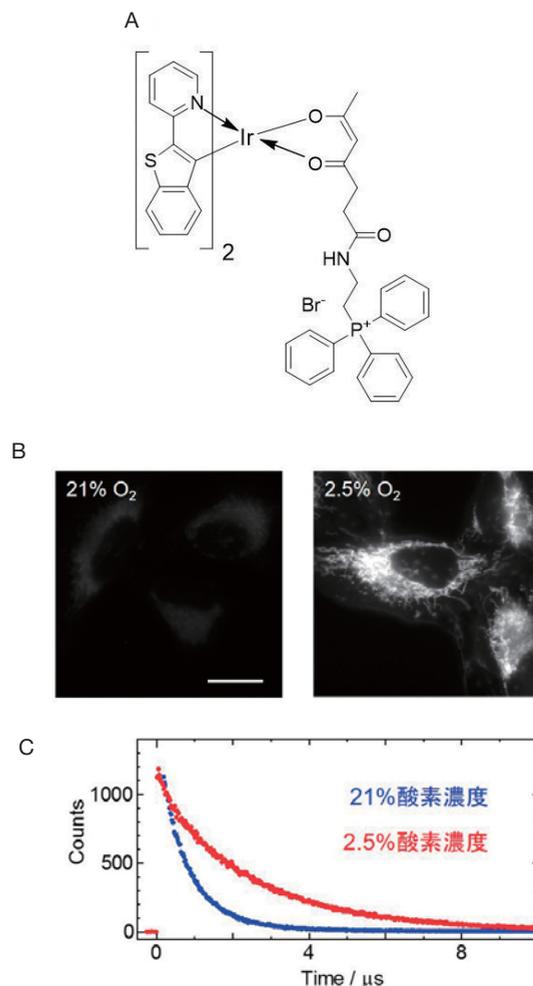


図6 HeLa 細胞中における BTP-Mito のりん光の酸素応答

- A BTP-Mito の構造式
- B HeLa 細胞の培養液に BTP-Mito 溶液を 1 μM になるように添加し、培養器の酸素濃度を 21% または 2.5% にして 8 時間培養後に撮影したりん光顕微鏡画像、スケールバーは 20 μm
- C 培養器の酸素濃度を 21% または 2.5% にして測定した BTP-Mito のりん光減衰曲線

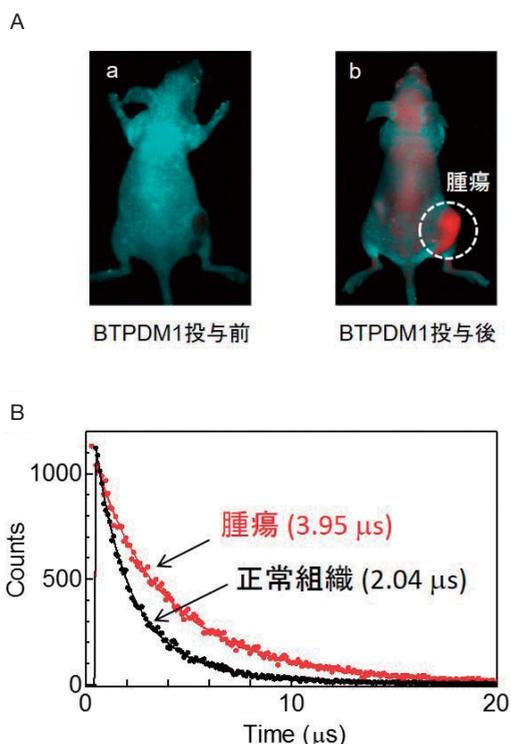


図7 SCC-7細胞を移植した担癌マウスの腫瘍のBTPDM1による発光イメージング
 A BTPDM1投与前と投与後の *in vivo* イメージング画像
 B 腫瘍組織と正常組織のりん光減衰曲線
 Reprinted with permission from T. Yoshihara, et al., *Anal. Chem.*, **2015**, *87*, 2010-2717.
 Copyright 2015 American Chemical Society.

り込まれると特定のオルガネラ膜中に局在すると予想される。オルガネラ膜中には様々な膜タンパク質が存在するため、タンパク質と相互作用して酸素への感受性が変化する可能性がある。実際、細胞内に取り込まれたイリジウム錯体の酸素存在下でのりん光減衰曲線は、単一指数関数的減衰からはずれる傾向が見られる。これは、一部のイリジウム錯体が膜タンパク質と結合して酸素分子との衝突が妨げられていることを示唆している。以上のような考察から、細胞内の酸素濃度を定量する際に、緩衝溶液中で Stern-Volmer 解析を行って得られた k_q 値を使うことはできない。そこで我々は、図6の例が示すように、培養細胞内に取り込まれたプローブのりん光寿命が、培養器の酸素分圧に依存して変化することに着目し、培養器の酸素分圧に対してりん光寿命をプロットして calibration を行う方法を提案している¹⁴⁾。

7. イリジウム錯体を使った *in vivo* 酸素計測

イリジウム錯体のりん光は、低酸素状態でより強く光る性質をもつため、低酸素状態に陥っているがん腫瘍をより強く光らせて正常組織と識別することができる¹⁴⁾。図7Aは、SCC-7 (マウス扁平上皮がん由来) 細胞を移植した担癌マウスの尾静脈に BTPDM1 (DMSO/Saline (1:9) 溶液) を 25 nmol 投与し、2時間後に *in vivo* イメージング装置 (Maestro 2) を使って測定した発光イメージング画像である。プローブ投与前の画像では自家蛍

光しか見られないが、BTPDM1 投与後に測定した発光画像では、腫瘍部分でプローブがより強く発光していることがわかる。ICP-MS を使って BTPDM1 を投与してから2時間後の体内分布を調べたところ、BTPDM1 は全身に分布し、腫瘍への集積は特に認められなかった。従って、腫瘍部でのより強い発光は、正常組織と腫瘍内の酸素濃度の差に起因すると考えられる。実際、腫瘍部とその対側の正常組織をレーザーダイオード (波長: 488 nm, パルス幅: 20 ns, 繰り返し: 40 kHz) を使って励起し、BTPDM1 のりん光寿命を測定したところ、腫瘍組織と正常組織の平均りん光寿命は、それぞれ 3.95 μ s、2.04 μ s となり、確かに腫瘍の方が酸素濃度が低いことが分かった。

さらに、SCC-7 の培養細胞を用いて前節で述べた方法で寿命の calibration を行ったところ、腫瘍組織と正常組織の酸素分圧は、それぞれ 6.1 mmHg, 50 mmHg と見積もられ、腫瘍が低酸素状態になっていることが実験的に示された。

イリジウム錯体は細胞内移行性が非常に高いという特徴をもつ。そのため、マウスの血中に投与したイリジウム錯体は、血中から組織の細胞内へ速やかに移行するため、特定の臓器の酸素化状態を個体が生きた状態で検出することが可能である。例えば、麻酔下でイリジウム錯体を投与したマウスを開腹し、腎臓表面にレーザー光を照射してりん光寿命を測定することにより、腎臓の酸素レベルを低侵襲的に調べることができる¹⁶⁾。

8. おわりに

りん光性酸素プローブを使った生体酸素計測技術は、従来の酸素電極を組織に挿入して電気化学的に酸素を検出する方法に比べると、生体に対する侵襲性が低く、また、寿命測定を行えば酸素濃度を定量することも可能である。特に蛍光寿命イメージング法 (FLIM; Fluorescence lifetime imaging microscopy) をりん光に拡張したりん光寿命イメージング法 (PLIM; Phosphorescence lifetime imaging microscopy) を用いると、組織中の酸素濃度勾配を細胞レベルの高空間分解能で検出できるため、それぞれの目的に適合した発光プローブの開発が望まれている。

血中の酸素濃度を定量するための発光プローブについては、Pt (II) -あるいは Pd (II) - ポルフィリンを水溶性テンドリマー化したプローブがすでに実用化されている。一方、細胞内の酸素濃度を定量するプローブについては、プローブの置かれた環境が複雑であることから、酸素濃度定量の精度をいかに向上させるかなど、まだ、いくつかの課題が残されているが、今後、さらに重要性が増していくと予想される。

[参考文献]

- 1) J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, THIRD EDITION, Springer, New York, **2006**.
- 2) B. Valuer, M. N. Berberan-Santos, *Molecular Fluorescence*, 2nd Ed., Wiley-VCH: Weinheim, **2012**.
- 3) K. K. W. Lo, *Adv. Inorg. Chem.*, **2016**, *68*, 97-140.
- 4) D. B. Papkovsky and R. I. Dmitriev, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 8700-8732.
- 5) X. Wang and O. S. Wolfbeis, *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, *43*, 3666-3761.
- 6) E. Roussakis, Z. Li, A. J. Nichols and C. L. Evans, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*, 8340-8362.
- 7) S. Tobita and T. Yoshihara, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2016**, *33*, 39-45.
- 8) T. Yoshihara, Y. Hirakawa, M. Hosaka, M. Nangaku and S. Tobita, *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.*, **2017**, *30*, 71-95.
- 9) N. Hasebe, Y. Deguchi, S. Murayama, T. Yoshihara, H. Horiuchi, T. Okutsu and S. Tobita, *J. Photochem. Photobiol. A. Chem.*, **2016**, *324*, 134-144.

- 10) 吉原利忠, 飛田成史, *ファルマシア*, **2017**, *53*, 220-224.
- 11) H. C. Gerritsen, R. Sanders, A. Draaijer, C. Ince and Y. K. Levine, *J. Fluorescence*, **1997**, *7*, 11-15.
- 12) D. F. Wilson and G. J. Cerniglia, *Cancer Res.*, **1992**, *52*, 3988-3993.
- 13) S. Zhang, M. Hosaka, T. Yoshihara, K. Negishi, Y. Iida, S. Tobita and T. Takeuchi, *Cancer Res.* **2010**, *70*, 4490-4498.
- 14) T. Yoshihara, M. Hosaka, M. Terata, K. Ichikawa, S. Murayama, A. Tanaka, M. Mori, H. Itabashi, T. Takeuchi and S. Tobita, *Anal. Chem.*, **2015**, *87*, 2710-2717.
- 15) T. Murase, T. Yoshihara and S. Tobita, *Chem. Lett.*, **2012**, *41*, 262-263.
- 16) Y. Hirakawa, T. Yoshihara, M. Kamiya, I. Mimura, D. Fujikura, T. Masuda, R. Kikuchi, I. Takahashi, Y. Urano, S. Tobita and M. Nangaku, *Sci. Rep.*, **2015**, *5*, 17838.

[著者プロフィール]

氏名：吉原 利忠 (Toshitada Yoshihara)
 所属：群馬大学大学院理工学府 分子科学部門 准教授
 連絡先：〒 371-0801 桐生市天神町 1-5-1
 TEL：0277-30-1211 FAX：0277-30-1213
 E-mail：yoshihara@gunma-u.ac.jp

出身学校：群馬大学大学院工学研究科
 学位：博士 (工学)
 専門分野：光化学、光生命科学

氏名：飛田 成史 (Seiji Tobita)
 所属：群馬大学大学院理工学府 分子科学部門 教授
 連絡先：〒 371-0801 桐生市天神町 1-5-1
 TEL：0277-30-1210 FAX：0277-30-1213
 E-mail：tobita@gunma-u.ac.jp
 出身学校：東京工業大学大学院理工学研究科
 学位：博士 (理学)
 専門分野：光化学、光生命科学

試薬比較ページのご案内

細胞増殖/細胞毒性測定用試薬の選択ガイド

MTT 法や WST 法は、生細胞中の脱水素酵素活性を利用した吸光度測定法として、測定の手軽さ、安全性および再現性の高さなどの点から、細胞増殖試験や細胞毒性試験など幅広く利用されています。また、細胞毒性を測定する際には、WST 法などの脱水素酵素活性を細胞毒性の指標とした測定と合わせて、細胞膜損傷を指標とした遊離 LDH 活性測定も行われています。これら細胞の増殖や毒性を検出する際の方法として一般的に用いられている検出法の測定原理と各測定法のメリット・デメリットを一覧表にまとめていますので、目的に応じた試薬をご選択いただけます。

試薬名	測定原理	検出範囲	検出感度	検出時間	検出装置	検出単位
MTT	脱水素酵素活性	0.001-100	0.001	15分	分光光度計	吸光度
WST-1	脱水素酵素活性	0.001-100	0.001	15分	分光光度計	吸光度
LDH	細胞膜損傷	0.001-100	0.001	15分	分光光度計	吸光度
ATP	ATP濃度	0.001-100	0.001	15分	ルミノメーター	発光強度
ROS	活性酸素濃度	0.001-100	0.001	15分	ルミノメーター	発光強度
NO	NO濃度	0.001-100	0.001	15分	ルミノメーター	発光強度
NO2	NO2濃度	0.001-100	0.001	15分	ルミノメーター	発光強度
NO3	NO3濃度	0.001-100	0.001	15分	ルミノメーター	発光強度
グルコース	グルコース濃度	0.001-100	0.001	15分	分光光度計	吸光度
グルタミン酸	グルタミン酸濃度	0.001-100	0.001	15分	分光光度計	吸光度
グルタミン	グルタミン濃度	0.001-100	0.001	15分	分光光度計	吸光度
グルタミン酸脱炭酸酵素	グルタミン酸脱炭酸酵素活性	0.001-100	0.001	15分	分光光度計	吸光度
グルタミン酸脱炭酸酵素阻害剤	グルタミン酸脱炭酸酵素阻害剤活性	0.001-100	0.001	15分	分光光度計	吸光度
グルタミン酸脱炭酸酵素阻害剤阻害剤	グルタミン酸脱炭酸酵素阻害剤阻害剤活性	0.001-100	0.001	15分	分光光度計	吸光度

下記キーワードで検索し小社 HP へお越しください。

細胞毒性 比較 同仁

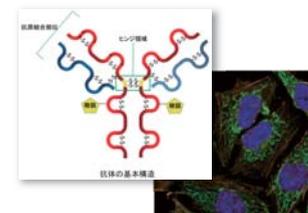
はじめてシリーズのご案内

小社ではお寄せいただいたお問い合わせを基にプロトコル「はじめてシリーズ」を作成しております。

今回、はじめての抗体標識プロトコルについて、第2版として刷新しましたのでご案内いたします。

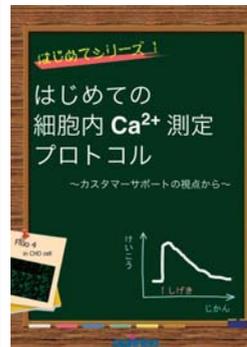


本プロトコルでは、抗体へ蛍光色素やビオチン、酵素を直接標識する方法についての利点や実施例をまとめています。

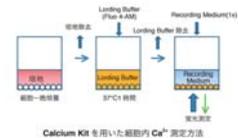


その他にも下記のプロトコルをご準備しておりますので、ぜひ活用ください。

「はじめての細胞内 Ca²⁺測定プロトコル」



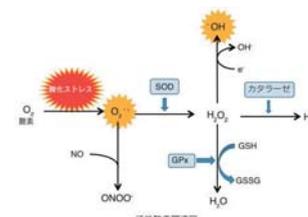
Ca²⁺検出の原理、Ca²⁺プローブの特徴・測定方法、トラブルシューティングなどを掲載しており、これから Ca²⁺測定をはじめられる方はもちろん、すでにご研究されている方にも参考になる情報を掲載しています。



「はじめての酸化ストレスマーカー測定プロトコル」



各種酸化ストレスマーカーの説明や試料の前処理方法をはじめ、小社製品を使用した測定方法などをまとめたプロトコルです。



各資料は小社 HP よりダウンロードいただけます。下記キーワードで検索し小社 HP へお越しください。

はじめてプロトコル 同仁

細胞老化と個体の老化・老年病

Cellular Senescence, Ageing and Age-Related Disorders



城村 由和

東京大学医科学研究所
癌防御シグナル分野
助教



中西 真

東京大学医科学研究所
癌防御シグナル分野
教授

Abstract

Cellular senescence is a state of durable cell cycle arrest with metabolic activities distinct from those of the proliferative state. Since senescence was originally reported to be induced by various genotoxic stressors, such as telomere erosion and oncogenic signaling, it has been proposed to play a pivotal role in aging-related changes and as an anti-tumorigenic barrier *in vivo*. We and others have recently uncovered the mechanisms underlying the induction and maintenance of cellular senescence. In this review, we summarize recent observations in these mechanisms and their implications in age and age-related disorders as well as carcinogenesis *in vivo*.

1. はじめに

今から 50 年以上前に、ウイスター研究所のレオナルド・ヘイフリック博士は、ヒトの正常細胞を試験管の中で培養するとある一定回数の分裂の後に増殖を停止することを見出し、この現象を細胞老化と名付けた¹⁾。老化した細胞は、試験管内で長期に生存することが可能であるが、如何なる刺激に対しても二度と増殖を再開することはない。この一定の分裂回数は、細胞種により規定されるのではなく、細胞が得られた動物種により規定され、またその回数は動物の寿命と強い正の相関を示すため、細胞老化が個体の加齢性変化や寿命を規定する因子として重要な役割を果たしていることが示唆されていたが、直接あるいは間接的にこの仮説を証明する実験的証拠はほとんどなかった。最近になり、個体内における老化細胞の蓄積が、動脈硬化や 2 型糖尿病などの老年病や^{2) 3) 4)}、寿命そのものを制御する実験結果が示された⁵⁾。また細胞老化誘導は個体における発がん防御機構の 1 つであることも提唱され、世界中の注目を集めている^{6) 7)}。本総説では、ごく最近の細胞老化誘導・維持機構についての知見から、個体における役割について紹介する。

2. 細胞老化誘導機構

細胞老化の誘導機構については、がん抑制遺伝子の産物である p53 および pRb ファミリーが重要な役割をはたすことが明らかにされ、細胞老化の誘導機構がいくつか提唱されていた。しかしながら、これらのモデルでは p53 や pRb の活性化が直接細胞老化を誘導しているが、正常培養細胞に活性型 p53 や pRb を発現させても細胞老化は誘導できないことから、未同定の新たな老化誘導経路の存在が示唆されていた。これらを明らかにする目的で、細胞老化過程を生細胞の細胞周期解析法 (FUCCI 法)⁸⁾ を用いた解析を行った。その結果、がん遺伝子活性化ストレスを含めたすべての細胞老化刺激において、多くの細胞が G2 期における一時的な細胞周期の停止ののち、通常は起こるべき細胞分裂をするこ

となく G1 期に進行した。すなわち、分裂期の回避を生じて 4 倍体の G1 期細胞となり、不可逆的に細胞周期を停止することを見出した (図 1)⁹⁾。老化の過程における細胞分裂制御タンパク質の発現の変化を解析したところ、分裂制御タンパク質発現が G2 期においてほぼ完全に消失することが細胞分裂期の回避の原因となっていることが分かった。

これまで細胞老化誘導に必須と考えられている p53 や pRb の細胞分裂期回避における役割を解析したところ、G2 期における p53 の活性化が分裂期の回避および細胞老化の誘導に必要な十分であることが明らかになった。

この結果から、G2 期で活性化された p53 は、APC/C^{dh1} および pRb ファミリーを協調的に活性化することにより分裂期の回避および細胞老化を誘導する可能性が考えられた。この可能性を検討するため、Cdh1 および pRb の構成的な活性化変異体それぞれ単

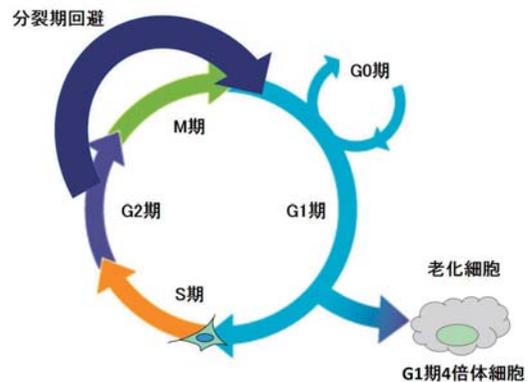


図 1 老化細胞は G2 期において p53 が活性化することで分裂期回避が起こり、その結果生じた G1 期 4 倍体細胞である。

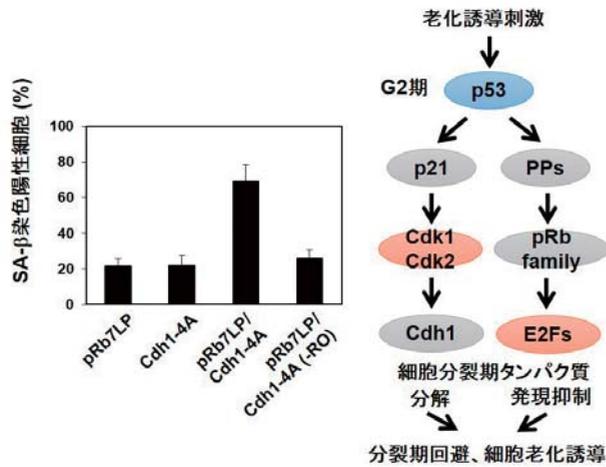


図2 G2期においてp53が活性化した結果、Cdh1およびpRbの早期活性化が起こり、分裂期を制御するタンパク質の分解が促進し、またこれら遺伝子の転写が抑制することで、分裂期制御タンパク質が完全に消失することで分裂期回避が生じる。

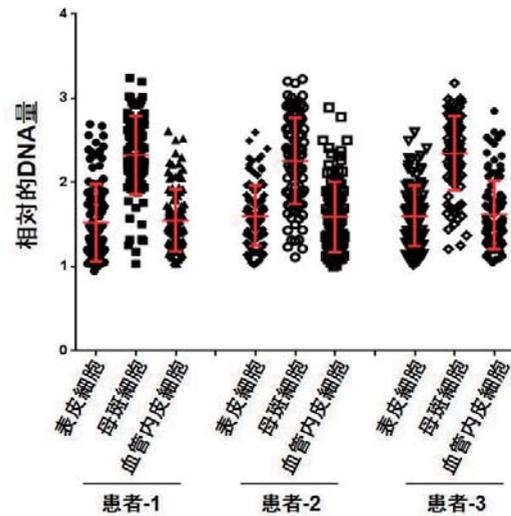


図3 母斑細胞性母斑は表皮細胞および血管内皮細胞と比較して約2倍のDNA含量を示す。

独の発現、およびその両方の発現を一過性にかつ可逆的に誘導できる細胞株を樹立して解析した。その結果、p53を過剰に発現した細胞と同様に、Cdh1およびpRbの発現をG2期において一過的に誘導した場合のみ、分裂期の回避および細胞老化の誘導が認められた(図2)⁹⁾。

次に、細胞分裂期回避がヒトの生体においても細胞老化の誘導において重要な役割をはたしているかどうかを検討した。ヒトの母斑細胞(ほくろ)はRas遺伝子の下流ではたらくリン酸化酵素BRAFの変異により生じる老化細胞であることが報告されている¹⁰⁾。母斑の組織切片における母斑細胞のDNA含量を測定するためDAPI染色を行った。その結果、正常な上皮細胞あるいは血管内皮細胞と比較して、母斑細胞は約2倍のDNA含量を示すことが分かった。さらに、G2期/M期のマーカーであるサイクリンB1や細胞増殖のマーカーであるKi67による組織免疫染色を行ったところ、母斑細胞においてはどちらも認められなかった。これらの結果から、生体に存在する老化細胞も4倍体のG1期細胞であり、試験管内同様にG2期でのp53活性化の結果生じた分裂期回避が重要な役割を果たしていると考えられた(図3)⁹⁾。

3. 細胞老化維持機構

老化細胞は不可逆的かつ恒久的増殖停止を示すのみならず、様々な特徴的性質を持っている。例えば、老化細胞は特異的に様々な炎症性サイトカインや、増殖因子を分泌している¹¹⁾。これをSenescence-Associated Secretory Phenotype (SASP)と呼んでいる。また老化細胞ではオートファジー経路が亢進している¹²⁾。これらの老化細胞特異的性質が、個体における加齢性変化や寿命にどのような役割を果たしているのか不明な点も多いが、SASPが老化細胞周囲の微小環境に影響を与えて慢性炎症場を形成し、高齢個体における発がんや加齢性変化を促進していると考えられている。それでは、老化細胞特異的なこれらの性質はどのように制御されているのであろうか?これまで、細胞老化過程で細胞分裂期回避のため活性化されたp53が不活性化されることがSASP誘導やオートファジー亢進と連動していると報告されてい

た¹³⁾。我々は、老化細胞特異的に発現する因子が、老化細胞維持においてp53を負に制御していると考え、この因子の同定を試みた。その結果、Fbxo22というF-boxタンパク質遺伝子が老化細胞特異的に発現誘導されていることが分かった。Fbxo22はSCFタンパク質分解複合体と結合し、p53をユビキチン化・分解誘導することが示された¹⁴⁾。興味深いことに、Fbxo22はp53と同時にKDM4Aリジン脱メチル化酵素とも結合し、SCFと合わせて大きな複合体を形成していることが分かった。Fbxo22の発現を抑制すると、メチル化p53が特異的に増加することも示された。面白いことに、Fbxo22ノックアウトマウスは、様々な臓器・組織においてメチル化p53の蓄積が起こり、細胞の増殖が抑制されるため、正常ヘテロマウスと比較して約半分の大きさであった。重要なことに、Fbxo22ノックアウト細胞では、老化細胞においてSASPが顕著に抑制されていた。以上のことから、SASP誘導には老化刺激によるFbxo22の発現誘導と、SCF^{Fbxo22}によるp53の分解が重要であると考えられる(図4)。

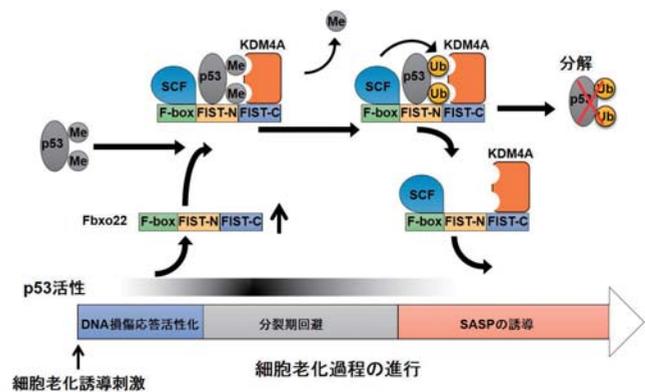


図4 老化誘導過程で起こるp53の強い活性化は分裂期回避に必要であるが、その後SCF^{Fbxo22}-KDM4A複合体により分解されることが、老化細胞特有の性質であるSASPに必要である。

4. 老化細胞の蓄積と老化・老年病発症

様々な老年病発症に老化細胞蓄積が重要であることが示されている。例えば、加齢に伴う動脈硬化巣や脂肪組織の中に、SA-β-gal 染色で陽性となる老化細胞の蓄積が認められる²⁾³⁾。さらに最近、BubR1 早老症マウスに p16 プロモーターを用いた老化細胞除去カセット遺伝子を導入するシステムを用いた解析から、p16 陽性細胞の除去が筋肉量低下や、脂肪萎縮、白内障などの老年病の発症を遅らせることが示された⁴⁾。さらに、p16 陽性細胞の除去は、正常マウスにおいても様々な老年病の発症を遅らせ、さらに寿命そのものも延長させることが示された⁵⁾。興味深いことに、p16 陽性細胞の除去は、発がんそのものも強く抑制することが分かり、老化細胞の蓄積が加齢個体において発がんを促進することが、実験的に証明された。さらに、LDH ノックアウトマウスに見られる動脈硬化亢進に、脂肪を蓄積したマクロファージの細胞老化が重要な役割を果たしていることも示された¹⁵⁾。これらの成果は加齢個体から老化細胞を除去することで、寿命を延長するのみならず様々な老化・老年病の発症を予防することができることを示している。

5. 終わりに

近年、個体の加齢性変化や老化・老年病発症、さらには寿命制御にも細胞老化が重要な役割を果たしていることが実験的に示され始めた。今後、老化細胞除去のための様々な技術が開発されることで、人類の健康寿命の延長が可能になるかもしれない。しかしながら、なぜ加齢個体において老化細胞が蓄積するのか？若い個体においてどのような分子機序で老化細胞が除去されるのか？まだ不明な命題も数多く残されている。これらの点を含めて、細胞老化分野におけるさらなる基礎研究の進展が期待される。

[参考文献]

- 1) L. Hayflick and P. S. Moorhead, *Exp. Cell Res.*, **1961**, 25, 585-621.
- 2) T. Minamino, H. Miyauchi, T. Yoshida, Y. Ishida, H. Yoshida and I. Komuro, *Circulation* **2002**, 105, 1541-1544.
- 3) T. Minamino, M. Orimo, I. Shimizu, T. Kunieda, M. Yokoyama, T. Ito, A. Nojima, A. Nabetani, Y. Oike, H. Matsubara, F. Ishikawa and I. Komuro, *Nat. Med.*, **2009**, 15, 1082-1087.
- 4) D. J. Baker, T. Wijshage, T. Tchkonja, N. K. LeBrasseur, B. G. Childs, B. van de Sluis, J. L. Kirkland and J. M. van Deursen, *Nature*, **2011**, 479, 232-236.
- 5) D. J. Baker, B. G. Childs, M. Durik, M. E. Wijers, C. J. Sieben, J. Zhong, R. A. Saltness, K. B. Jeganathan, G. Casaclang Verzosa, A. Pezeshki, K. Khazaie, J. D. Miller and J. M. Van Deursen, *Nature*, **2016**, 530, 184-189.
- 6) T. D. Halazonetis, V. G. Gorgoulis and J. Bartek, *Science*, **2008**, 319, 1352-1355.
- 7) T. Kuilman, C. Michaloglou, W. J. Mooi and D. S. Peeper, *Genes Dev.*, **2010**, 24, 2463-2479.
- 8) A. Sakaue-Sawano, H. Kurokawa, T. Morimura, A. Hanyu, H. Hama, H. Osawa, S. Kashiwagi, K. Fukami, T. Miyata, H. Miyoshi, T. Imamura, M. Ogawa, H. Masai and A. Miyawaki, *Cell*, **2008**, 132, 487-498.
- 9) Y. Johmura, M. Shimada, T. Misaki, A. Naiki-Ito, H. Miyoshi, N. Motoyama, N. Ohtani, E. Hara, M. Nakamura, A. Morita, S. Takahashi and M. Nakanishi, *Mol. Cell*, **2014**, 55, 73-84.
- 10) C. Michaloglou, L. C. W. Vredeveld, M. S. Soengas, C. Denoyelle, T. Kuilman, C. M. a M. van der Horst, D. M. Majoor, J. W. Shay, W. J. Mooi and D. S. Peeper, *Nature*, **2005**, 436, 720-724.
- 11) J. Campisi and F. d'Adda di Fagnagna, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2007**, 8, 729-740.
- 12) A. R. Young, M. Narita, M. Ferreira, K. Kirschner, M. Sadaie, J. F. Darot, S.

Travare, S. Arakawa, S. Shimizu, F. M. Watt and M. Narita, *Genes Dev.* **2009**, 23, 798-803.

13) A. Freund, C. K. Patil and J. Campisi, *EMBO J.*, **2011**, 30, 1536-1548.

14) Y. Johmura, J. Sun, K. Kitagawa, K. Nakanishi, T. Kuno, A. Naiki-Ito, Y. Sawada, T. Miyamoto, A. Okabe, H. Aburatani, S. Li, I. Miyoshi, S. Takahashi, M. Kitagawa and M. Nakanishi, *Nat. Commun.*, **2016**, 7, 10574.

15) B. G. Childs, D. J. Baker, T. Wijshage, C. A. Conover, J. Campisi and J. M. van Deursen, *Science*, **2016**, 354, 472-477.

[著者プロフィール]

氏名：城村 由和 (Yoshikazu Johmura)
 所属：東京大学医学研究所 癌防御シグナル分野 助教
 連絡先：〒108-8639 東京都港区白金台 4-6-1
 TEL：03-5449-5341 FAX：03-5449-5342
 E-mail：Johmuray@ims.u-tokyo.ac.jp
 出身学校：名古屋市立大学薬学部
 学位：博士（薬学）
 専門分野：分子細胞生物学 細胞老化

氏名：中西 真 (Makoto Nakanishi)
 所属：東京大学医学研究所 癌防御シグナル分野 教授
 連絡先：〒108-8639 東京都港区白金台 4-6-1
 TEL：03-5449-5341 FAX：03-5449-5342
 E-mail：mkt-naka@ims.u-tokyo.ac.jp
 出身学校：名古屋市立大学医学部
 学位：博士（医学）
 専門分野：分子細胞生物学 細胞老化、癌防御

試薬比較ページのご案内

β-ガラクトシダーゼ検出用試薬の特徴と違いを一覧表で紹介

レポータージーンアッセイ等において幅広く利用されているβ-ガラクトシダーゼ基質のX-Galをはじめ、最新の蛍光基質の特徴と原理について紹介しています。基質ごとに適応可能な装置やサンプルを一覧表に示しているので、目的に応じて試薬を選択いただけます。

製品名	SPD-X-β Gal	FDG	ClFDG	X-Gal	OMPG	
検出方法	蛍光	蛍光	蛍光	発色	発色	
基質特性	酵素反応後に蛍光を発する。かつ、塩橋のタンパク質に結合する。	酵素反応によりフルオレセインを生成する。	FDGよりも細胞膜への透過性を向上させている。	酵素反応後に発色すると同時に不溶性の沈降物を生成する。	酵素反応により黄色のp-ニトロロフェニールを生成する。	
発色・蛍光特性 (ex./em)	493.325/560	490/514	497/516	615 nm	420 nm	
主な検出方法	蛍光顕微鏡	蛍光顕微鏡	蛍光顕微鏡	顕微鏡	プレートリーダー	
生細胞・組織への適用	○	×	△	×	×	
固定化試料への適用	○	△	△	○	△	
細胞内滞留性	◎	×	△	○	×	
検出感度	1 μmol/l	100 ~ 2 mmol/l	33 μmol/l	2.5 mmol/l	2.3 mmol/l (ELISA用として)	
培養時間	15 min.	20-25 min.	20-60 min.	Overnight	N/A	
酵素反応部位の数	1	2	2	1	1	
特徴	生細胞検出感度がよく、固定後の検出も利用されている。蛍光基質が細胞から流れ出さない。試薬のコスト、他にもOMPG、DOAGなどの蛍光基質がある。FDGは細胞膜透過性が弱いため生細胞には適用できない。	生細胞検出感度を高める。高濃度の試薬でも利用可能。生細胞への透過性が高い。	FDGよりも細胞膜への透過性を向上させている。生細胞での検出感度を高める。高濃度の試薬でも利用可能。生細胞への透過性が高い。	高濃度の試薬でも利用可能。生細胞への透過性が高い。	高濃度の試薬でも利用可能。生細胞への透過性が高い。	高濃度の試薬でも利用可能。生細胞への透過性が高い。

下記キーワードで検索し弊社 HP へお越しください。

ガラクトシダーゼ 同仁

検索

Topics on Chemistry

β-ガラクトシダーゼ検出蛍光プローブによる 一細胞レベルでの lacZ 発現の検出

株式会社同仁化学研究所 野口 克也

目的とする遺伝子の発現状態を可視化する技術としてレポーター遺伝子アッセイが広く用いられている。レポーター遺伝子の中でもβ-ガラクトシダーゼを発現する遺伝子 (*lacZ*) は古くから使用されており、染色試薬である 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside (X-gal) を用いることにより、*lacZ* 発現細胞を青く染色することができる。しかし、細胞を固定化処理する必要があり、生細胞に適用することはできない。また、比色であるために他の色素との重ね合わせが難しく、組織試料において一細胞レベルでの検出は困難である。そこで、本トピックスでは上記の課題を克服した新規蛍光プローブ SPiDER-β Gal-1 について紹介する。

SPiDER-β Gal-1 は浦野らによって開発された新規β-ガラクトシダーゼ検出用蛍光プローブであり、β-ガラクトシダーゼと反応すると細胞内タンパク質と共有結合し、強い蛍光を発する。そのため、反応により生成された蛍光色素が細胞外へ拡散しないという優れた特長を有している¹⁾。この特性により、*lacZ* 発現細胞を一細胞レベルで特異的に蛍光検出することが可能となっている(図1)。

また、この蛍光プローブは、生細胞だけでなく生きた組織にも適用でき、キイロショウジョウバエの幼虫脂肪体組織¹⁾ やマウス膵臓組織における *lacZ* 発現細胞の検出²⁾ にも使用されている(図2)。浦野らの報告によれば、SPiDER-β Gal-1 でラベル化したマウス脳スライスの神経細胞をそのまま電気生理学的実験に用いる

ことも可能である。

SPiDER-β Gal-1 は、生細胞や生きた組織だけでなく固定化処理した細胞や組織にも使用することができるため、蛍光免疫染色との併用も可能であり、幅広い実験系に利用することができる³⁾。

近年、レポーター遺伝子アッセイにおいて GFP 等の蛍光タンパク質を用いることが多いが、通常一つのタンパク質に対して一つの蛍光タンパク質を発現させる。そのため発現量の少ないタンパク質にラベル化した場合、感度不足となる場合がある。一方、β-ガラクトシダーゼは酵素であるため、SPiDER-β Gal-1 と組み合わせれば蛍光シグナルを増幅することができ、高感度化することが可能である。

最近小社では、この蛍光プローブを用いた細胞老化マーカー (senescence-associated β-galactosidase; SA-β-gal) 検出への応用を試み、その有用性を確認している。本プローブを用いれば、一般的な X-gal 染色法に比べ、高感度かつ短時間で SA-β-gal を検出することができ、またフローサイトメーターを用いた老化細胞の定量解析にも有用である。

このように優れた特長を有する新規β-ガラクトシダーゼ検出プローブ SPiDER-β Gal-1 の登場により、今後新たな知見が得られ、生命科学の発展に寄与するものと思われる。

※本文記載の SPiDER-β Gal-1 は、現在小社で SPiDER-β Gal (メーカーコード：SG02) として販売しております。

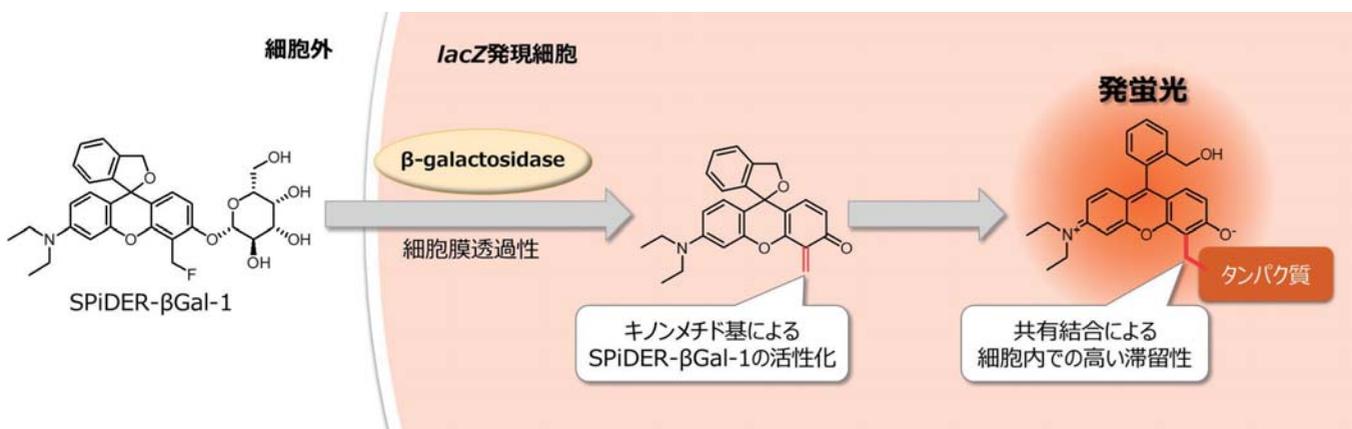


図1 SPiDER-β Gal-1 の *lacZ* 発現細胞検出原理

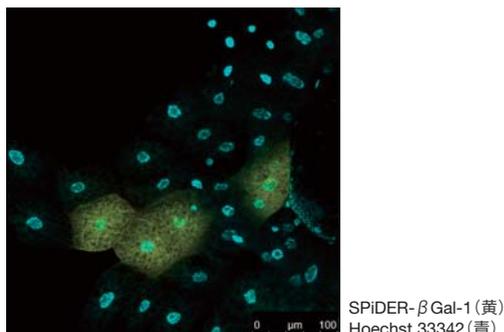


図2 ショウジョウバエ組織のライブイメージング

【参考文献】

- 1) T. Doura, M. Kamiya, F. Obata, Y. Yamaguchi, T. Y. Hiyama, T. Matsuda, A. Fukamizu, M. Noda, M. Miura and Y. Urano, "Detection of LacZ-Positive Cells in Living Tissue with Single-Cell Resolution.", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2016**, 55, 9620.
- 2) H. Omori, S. Ogaki, D. Sakano, M. Sato, K. Umeda, N. Takeda, N. Nakagata and S. Kume, "Changes in expression of C2cd4c in pancreatic endocrine cells during pancreatic development.", *FEBS Lett.*, **2016**, 590, 2584.
- 3) 堂浦智裕, 神谷真子, 浦野泰照, "生体組織中の *lacZ* 発現細胞のライブ蛍光検出", *実験医学*, **2016**, 34 (19), 3197.

新製品

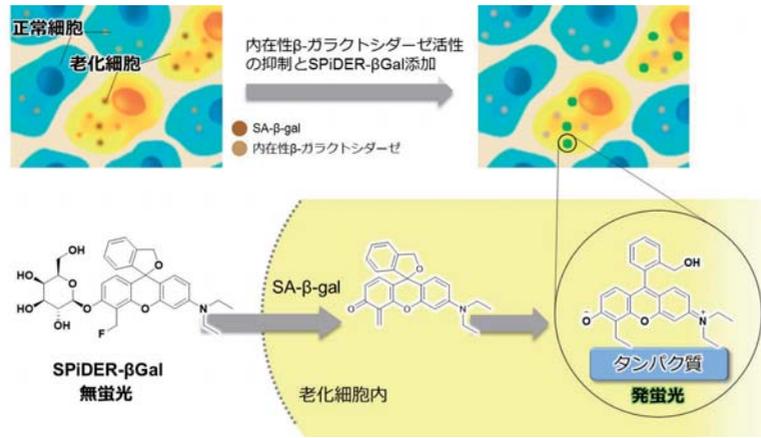
老化細胞検出キット

Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER-βGal

<特長>

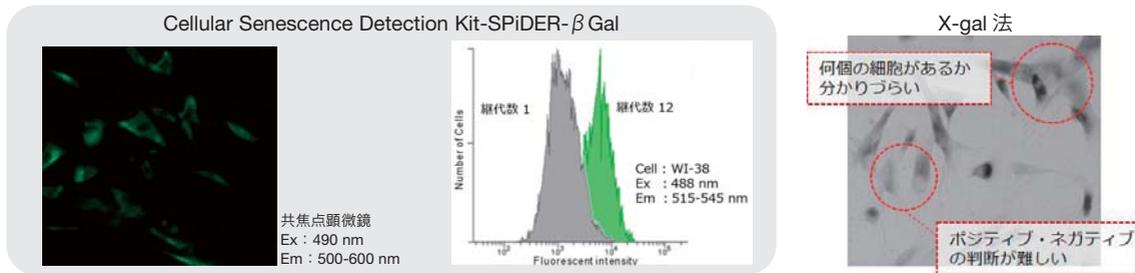
- ・ 固定化せずに簡単に老化細胞を検出
- ・ 定量解析が可能
- ・ 固定化細胞にも適用可能

本製品は老化マーカーの1つとして広く用いられている SA-β-gal (senescence-associated β-galactosidase) を特異的に検出することができるキットです。キットに含まれる蛍光基質 (SPiDER-βGal) は優れた細胞膜透過性を有し、内在性β-ガラクトシダーゼ活性を抑制する試薬と併用することで生細胞にも利用でき、フローサイトメトリーを用いた定量解析が可能です。

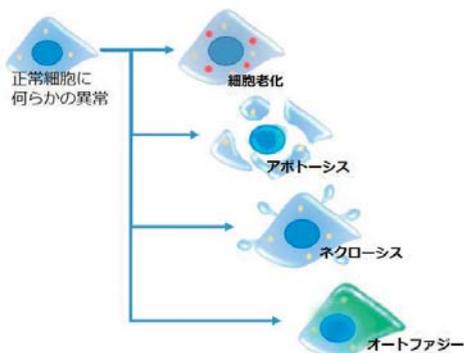


従来法 (X-gal 法) の課題を解決

蛍光検出が可能なおことから、X-gal 法では適用できなかったフローサイトメトリーも利用することができ、定量性のあるデータを取得できます。また、X-gal 法では細胞を固定化する必要がありましたが、本キットでは生細胞に利用でき、簡便な操作で老化細胞を染色することが可能となりました。染色操作の詳細は、p.11 をご参照下さい。



なぜ細胞老化が注目されているのか？



細胞老化は、アポトーシスやネクローシス、オートファジーと並び、細胞の生存および死を制御する重要な細胞応答の一つです。近年、細胞老化が個体の老化やがん等の疾病、ステムセルエイジング (幹細胞老化) にも関与していることが示され、注目されています。

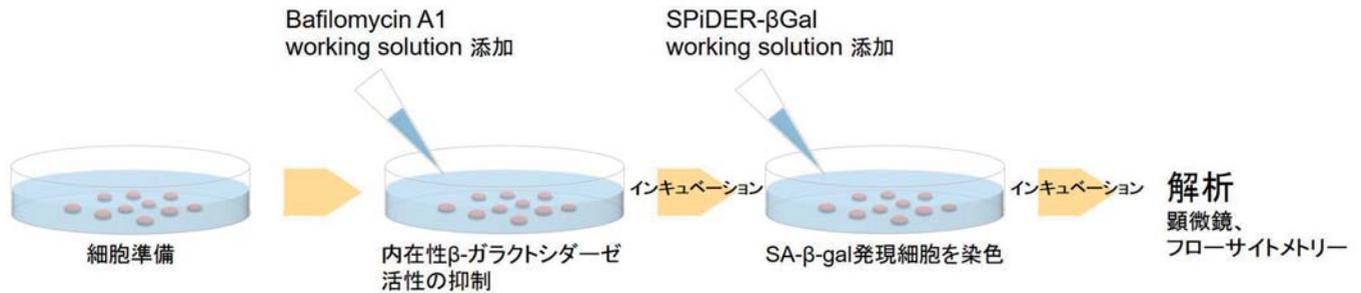
品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER-βGal	10 assays	38,000	SG03

老化細胞検出キット

よくあるお問合せ

Q：キットの使用方法を教えてください。

A：細胞に Bafilomycin A1 を加え内在性 β - ガラクトシダーゼを抑制後、SPiDER- β Gal を加え蛍光顕微鏡観察やフローサイトメトリーに利用します。固定化細胞を用いる場合は、バッファー置換により内在性 β - ガラクトシダーゼの抑制を行います。詳細は取扱説明書をご覧ください。

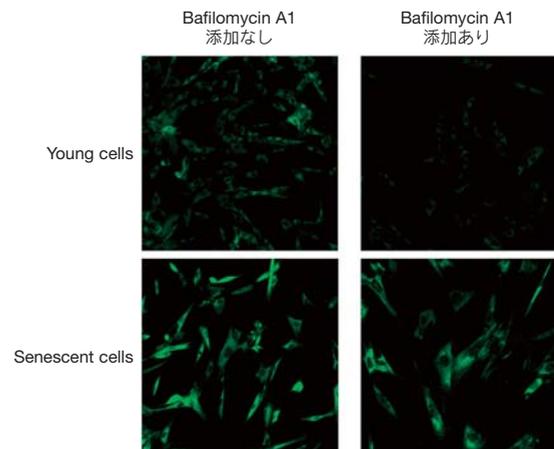


Q：生細胞を染色時に Bafilomycin A1 を添加する理由を教えてください。

A：SPiDER- β Gal は、内在性の β - ガラクトシダーゼとも反応するため、老化が認められていない細胞でも、蛍光が観察され SA- β -gal の検出に支障をきたします。

Bafilomycin A1 は、リソソーム中の ATPase 活性を阻害し、リソソーム中の pH を酸性から中性付近に変化させます。この作用により内在性 β - ガラクトシダーゼの活性を低下させ SA- β -gal を特異的に検出します。

右図では Bafilomycin A1 の添加有無による SA- β -gal 検出の違いを示しています。



Q：細胞を固定化した後に、SA- β -gal を染色できますか？

A：可能です。固定化した場合、Bafilomycin A1 を用いた細胞の前処理は必要ありませんが、McIlvaine buffer (pH 6.0) を別途準備して頂く必要があります。詳細は取扱説明書をご覧ください。

Q：SA- β -gal 発現細胞を染色後、細胞を固定化できますか？

A：可能です。4%パラホルムアルデヒドを用いて固定化してください。

Q：1 キット (10 assays) 当たりの使用回数を教えてください。

A：使用する容器の種類に応じて使用回数は異なります。下記の表を目安にしてください。

容器の種類	使用回数の目安	1 アッセイ当たりの試薬量	
		Bafilomycin A1 working solution	SPiDER- β Gal working solution
35 mm ディッシュ	10 枚分	1 ml/dish	1 ml/dish
カバーガラスチャンバー (8 well の場合)	100 well 分	200 μ l/well	100 μ l/well

Q：培地中の血清やフェノールレッドは検出に影響しますか？

A：培地中の血清やフェノールレッドは SA- β -gal 検出には影響しません。

小社 HP より取扱説明書をダウンロードできます。

<http://www.dojindo.co.jp/manual/sg03.pdf>

新製品

DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

オートファジー検出蛍光試薬

マイトファジー検出蛍光試薬

DALGreen - Autophagy Detection

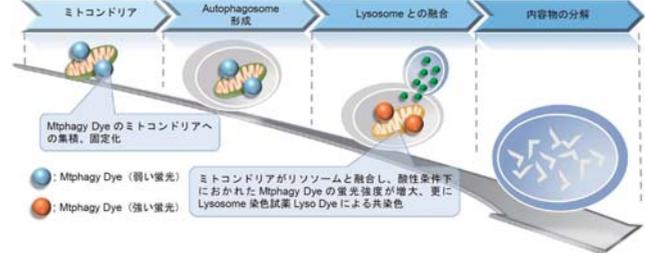
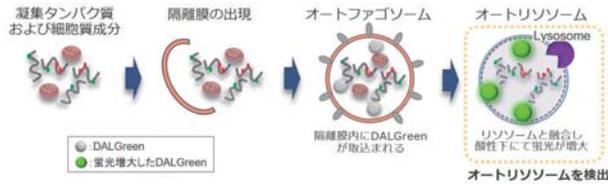
Mitophagy Detection Kit

<特長>

<特長>

- ・オートファジーを蛍光でイメージング
- ・オートリソソームを特異的に染色
- ・培養細胞に試薬を添加するだけの簡単操作

- ・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
- ・生細胞を用いたライブイメージングが可能
- ・共有結合によるミトコンドリアへの高い滞留性



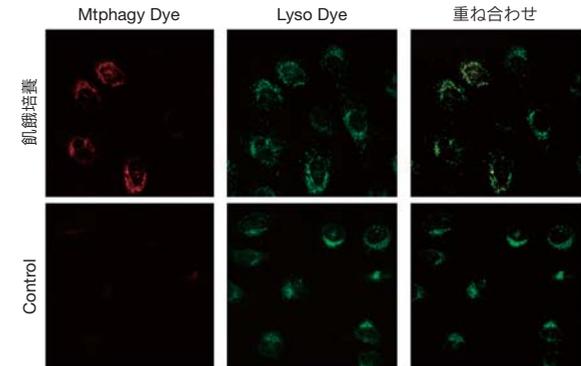
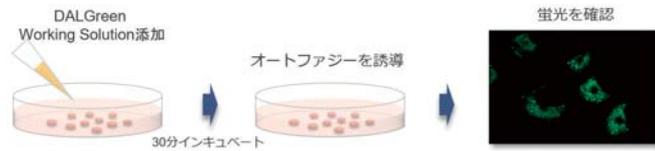
DALGreen は、細胞内の不要なタンパク質・細胞小器官などの再利用や代謝のための分解過程であるオートファジーを検出できる蛍光色素です。培養細胞に添加した DALGreen は生細胞膜を透過し、オートファジー誘導により形成されたオートファゴソーム内に取り込まれます。その後、リソソームと融合し酸性環境となったオートリソソームにおいて DALGreen の蛍光が増大します。

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。

<操作>

<実験例>

準備した細胞に試薬を添加し、オートファジーを誘導するだけで蛍光イメージングできます。



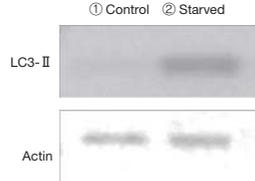
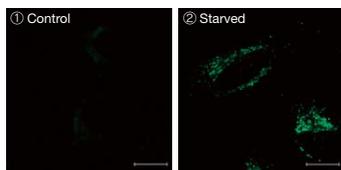
<実験例>

増殖培地にて培養した HeLa 細胞と飢餓培養にてオートファジーを誘導した HeLa 細胞を用いて、オートファジーマーカーである LC3-II の発現量と DALGreen によるイメージング像を比較しました。

飢餓培養条件下でのマイトファジー検出例

DALGreen によるイメージング

LC3-II のウェスタンブロット解析



検出波長: Ex. 488 nm / Em. 500-563 nm

HeLa 細胞に Mphagy Dye を添加後、通常培養条件下 (DMEM) および飢餓培養条件下 (DMEM: 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。飢餓培養した HeLa 細胞において、Mphagy Dye の蛍光強度の増大がみられた。

Mphagy Dye (赤): 561 nm (Ex), 650 LP nm (Em)
Lyso Dye (緑): 488 nm (Ex), 502-554 nm (Em) LP: ロングパスフィルター

- ①コントロール: 増殖培地で 6 時間培養
- ②飢餓培養: アミノ酸不含培養培地で 6 時間培養

<本キットを用いた論文の紹介>

飢餓培養によりオートファジーを誘導した HeLa 細胞において DALGreen の蛍光増大がみられました。またオートファジーのマーカーである LC3-II 発現量も同様に増加がみられており、双方の解析において相関する結果が得られました。

リソソームで分解しきれなかった酸化損傷タンパク質やミトコンドリアは不溶性物質として細胞内に蓄積されるが、これらはリポフスチンと呼ばれ、神経変性疾患への関与について盛んに研究されている。筆者らは、老化細胞において、マイトファジーの低下、ミトコンドリアの増大、ROS 発生量の増加を確認し、ミトコンドリアの分解や分裂能の低下がリポフスチン形成へ関与することを報告している。

詳細は下記論文を参照ください。

J. Koniga, C. Otta, M. Hugoa, T. Junga, A. L. Bulteaub, T. Grunea and A. Hohna, "Mitochondrial contribution to lipofuscin formation", *Redox Biology*, 2017, 11, 673.

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
DALGreen - Autophagy Detection	20 nmol	28,000	D675

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

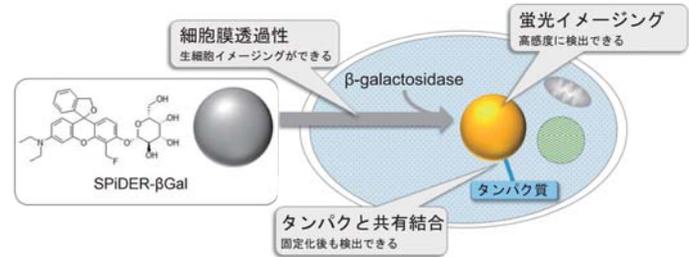
β-ガラクトシダーゼ検出プローブ

SPiDER-βGal

<特長>

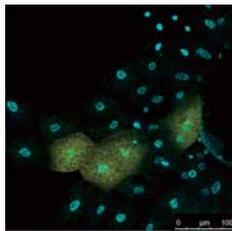
- ・細胞・組織をライブで蛍光イメージング
- ・固定化前後での蛍光染色が可能
- ・細胞内滞留型プローブによる一細胞レベルでの解析が可能

SPiDER-βGal は、レポーター遺伝子アッセイマーカーとして幅広く用いられているβ-ガラクトシダーゼの検出方法として、既存の基質 (X-gal 等) で課題だった細胞膜透過性と細胞内滞留性を克服した蛍光基質です。本試薬は、β-ガラクトシダーゼとの酵素反応により形成される、キノンメチドと呼ばれる中間体を介して、近傍のタンパク質と安定な共有結合を形成し、蛍光性になります。このように、反応した試薬が細胞内タンパク質に固定化されることで優れた細胞内滞留性を有し、その結果、β-ガラクトシダーゼ発現細胞を一細胞レベルで明確に検出することが可能となりました。



<実験例①>

ショウジョウバエ組織のライブイメージング

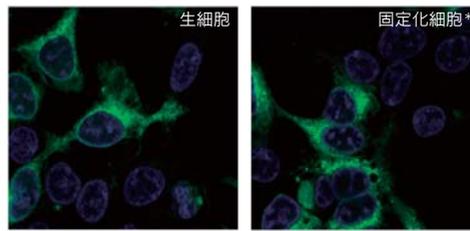


SPiDER-βGal (黄)
Hoechst 33342 (青)

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した。

<実験例②>

固定化前後の細胞イメージング



* 固定化：4%パラホルムアルデヒド
SPiDER-βGal (緑)：
488 nm (Ex)、500-600 nm (Em)
Hoechst 33342 (青)：
405 nm (Ex)、410-450 nm (Em)

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 となるように混合培養し、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した。SPiDER-βGal の膜透過性と細胞内滞留性により固定化前後ともに蛍光イメージングができることが確認された。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
SPiDER-βGal	20 μg×3	42,000	SG02

学会展示・ポスター発表のご案内

第 44 回日本毒性学会学術年会

期日：2017 年 7 月 10 日 (月)～12 日 (水)
会場：パシフィコ横浜 会議センター

ポスター発表内容

- ・低分子蛍光色素を用いたオートファジーの検出
日時：2017 年 7 月 10 日(月)9:30～10:45
ポスター番号：5232
- ・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
日時：2017 年 7 月 12 日(水)13:15～14:00
ポスター番号：5291

展示出展を致します。
ぜひブース (#98-99) へお立ち寄り下さい。

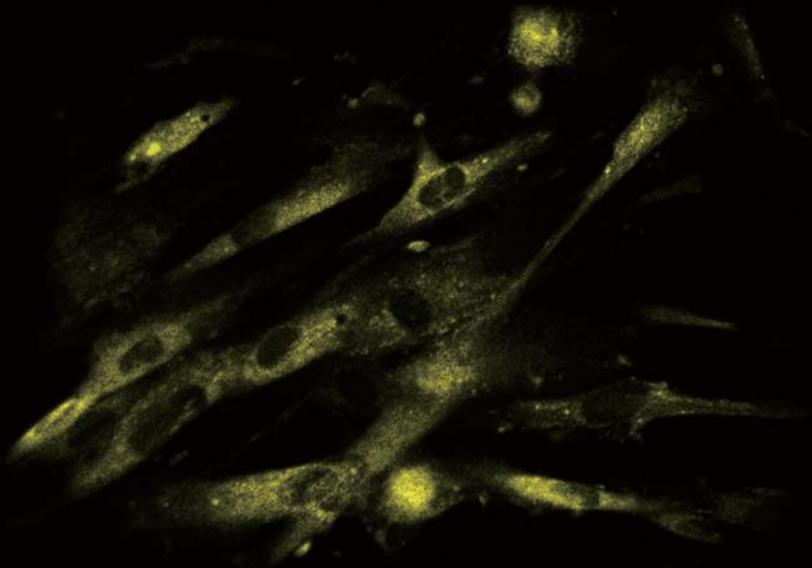
イノベティブ リサーチ センター開設のご案内

細胞機能解析等に用いる研究用試薬の開発拠点として、2017 年 5 月に神奈川県川崎市 (ライフイノベーションセンター内) にイノベティブ リサーチ センターを開設いたしました。

神奈川県が整備したライフイノベーションセンター (LIC) は、再生・細胞医療の集積拠点として国が指定した国家戦略総合特区にあり、この分野の産業化を推進するための施設 (延床面積 16,000m²、地上 4 階建て) です。すでに再生医療分野へ進出している多数の企業が入居を決めています。また LIC が立地する殿町地区には、実験動物中央研究所や富士フィルム RI ファーマなどの施設があり、またこの夏には国立医薬品食品衛生研究所も移転の予定です。このように再生医療分野における神戸のメディカルクラスターと並ぶ本格的なクラスターとしての充実が期待されています。



ライフイノベーションセンターの外観



老化細胞が光る

老化細胞検出キット

Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER-β Gal

Senescence 同仁 検索

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