

細胞内鉄

—総説—

地球上の生命体の活動や疾患における
鉄の重要性の再認識

名古屋大学 豊國 伸哉

—注目の研究—

細胞内鉄(Ⅱ)イオン選択的検出蛍光プローブ

株式会社同仁化学研究所 立中 佑希

新製品

硫化水素検出用蛍光試薬

P.3

オートファジー検出蛍光試薬

P.7

開発中

鉄検出蛍光試薬

P.5

お役立

細胞毒性測定に関するよくあるお問い合わせ

P.8





表紙撮影：熊本市中央区 熊本城と花火
photo：永島俊介氏

永島俊介氏は、2017年7月に長野県で開催された写真家の全国大会で2年連続最優秀写真家賞を受賞されました。

CONTENTS

Review

地球上の生命体の活動や疾患における鉄の重要性の再認識 ●—— [1]
名古屋大学 豊國 伸哉

Topics on Chemistry

細胞内鉄(Ⅱ)イオン選択的検出蛍光プローブ ●———— [4]
株式会社同仁化学研究所 立中 佑希

Commercial

開発中

鉄検出蛍光試薬 ●———— [5]

新製品

硫化水素検出用蛍光試薬 ●———— [3]

オートファジー検出蛍光試薬 ●———— [7]

細胞内脂溶性過酸化脂質検出蛍光試薬 ●———— [6]

ミトコンドリア膜脂溶性過酸化物検出蛍光試薬 ●———— [6]

マイトファジー検出キット ●———— [7]

細胞毒性測定キット ●—— [9]

老化細胞検出キット ●———— [9]

お知らせ

学会展示・ポスター発表のご案内 ●———— [3]

細胞毒性測定に関するよくあるお問い合わせ ●———— [8]

細胞増殖測定・細胞染色プロトコル 改訂版のお知らせ ●———— [8]

第28回 フォーラム・イン・ドージン開催 ●———— [10]

※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。

硫化水素検出用蛍光試薬

オートファジー検出蛍光試薬

地球上の生命体の活動や疾患における鉄の重要性の再認識

Reappraisal of the importance of iron in the activity and pathology of living organisms on earth



豊國 伸哉

名古屋大学大学院医学系研究科
病理病態学講座
生体反応病理学・分子病理診断学
教授

Abstract

Iron is abundant on earth, and no organisms on earth can live without iron. However, excess iron is a risk for carcinogenesis presumably via catalyzing the Fenton reaction. There are many human diseases associated with excess iron-induced carcinogenesis, and also animal models demonstrating the close association. Recently, several patterns of cellular death by programmed necrosis are recognized, among which ferroptosis is proposed in 2012. Ferroptosis may be initiated by a variety of inhibitors of cysteine/glutamate antiporter (system Xc⁻), which leads to GSH depletion and lipid peroxidation. There is a huge anticipation that recently developed turn-on type fluorescent probes to detect catalytic Fe(II) would unravel novel cellular processes and molecular mechanisms, including ferroptosis and carcinogenesis.

キーワード：触媒性 2 価鉄、発がん、フェロトーシス

1. はじめに

死因として、がんは日本において 1981 年から継続的に第 1 位、世界各国でも上位を占める。がんの原因として、喫煙、放射線、紫外線、ピロリ菌・パピローマウイルス感染など多様なものが知られるが、これらはいわば氷山の一角であり、発がんの根本原因は鉄と酸素の使用にあると私は考えるに至っている¹⁾。太古の海は特に触媒性 2 価鉄が豊富で、その環境で初めての生命が生まれただけでなく、いまだに鉄なしで存続できる生命体は地球上で報告がないことに着目したい²⁾。鉄は周期表で d ブロックの 1 列目に位置し、イオンの価数が変化する遷移金属である。そして、脊椎動物において、酸素を運搬・貯蔵するヘモグロビンやミオグロビンのヘムの一部であり、カタラーゼやチトクロームなどの補因子としても必須なものである。鉄欠乏は貧血や発育障害を起こし、発展途上国では大きな問題となっている。しかし最近、鉄過剰は発がんリスクであるとする報告が相次ぐようになった³⁾。2008 年に公表された 1 年 2 回の定期的瀉血が内臓がん発生を 35% 減少させるという論文は衝撃的でさえある⁴⁾。

2. 鉄のダイナミクス

鉄は、私たちの体で最も多い重金属であり、成人で約 4 g を有する。このうち 60% は、酸素を運搬するヘモグロビンのヘムとして存在する。中性では 3 価鉄イオン [Fe(III)] の溶解性は極めて低いので (10⁻¹⁷ M)、鉄イオンは生体内では他の分子とキレートしたかたちあるいは 2 価 [Fe(II)] で存在すると考えられる。キレート分子としては種々のリン酸化合物、クエン酸などの低分子化合物などのほか、最近では PCBP2 といったタンパク質がシャペロンとして働くことが提案されている⁵⁾。食餌鉄は胃の酸性環境下で可溶化し、十二指腸で吸収される。その絨毛上皮の形質膜において、消化管という外界から体内に 2 価鉄をとりこむトランスポーター (DMT1; SLC11A2) が初めてクローニングされたのは 1997 年である⁶⁾。体内においてはトランスフェリンが全身に Fe(III) を輸送し、余剰鉄は細胞内においては鉄貯蔵タンパク質であるフェリチンとして貯蔵される。フェリである Fe(III) は安全

だが、フェロである Fe(II) は膜の通過に使用されるにもかかわらず、以下のようにリスクを常にはらむ。

Fe(II) はフェントン反応の起点である。これは Fe(II) を触媒として過酸化水素からヒドロキシラジカル (•OH) を発生する化学反応であり、酵素は関与しない。•OH は生物系では最も反応性の高い化学種とされ、近傍の生命分子の切断・修飾・重合を起こす。



酸素は究極的には体内において電子の流れをつくっていると考えられる (図 1)。その過程で破壊性の高いヒドロキシラジカルが発生するが、生体はこれを避ける機構を有する。カタラーゼ、ペ

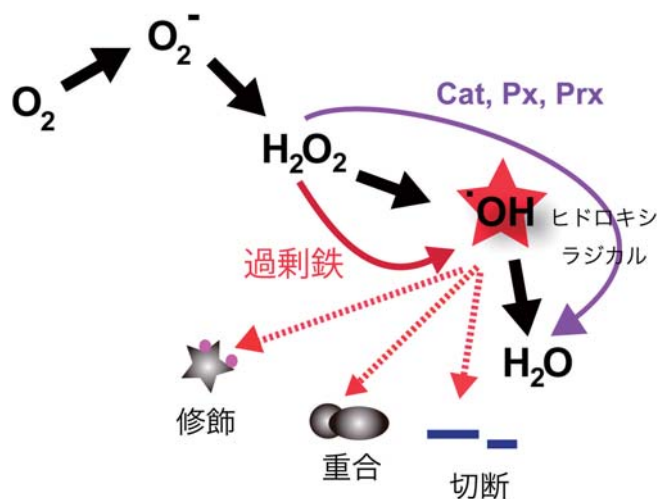


図 1 鉄を触媒として発生するフリーラジカルの起こす基本的な反応
Cat, catalase; Px, peroxidase; Prx, peroxiredoxin

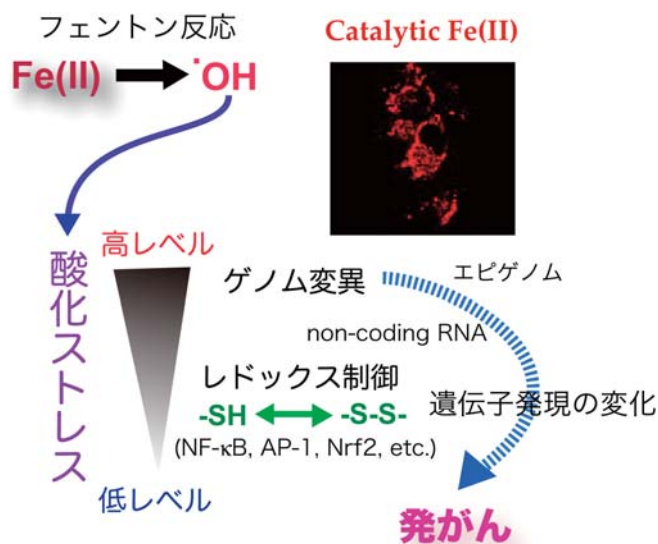


図2 発がんにおける鉄を介した酸化ストレスの意義

ルオキシダーゼ、ペルオキシレドキシン⁷⁾などの酵素がその役割を果たしている。ところが、過剰鉄はフェントン反応を促進する。ラジカルは反応の相手分子を選ばないが、発がんの観点からはゲノムDNAが重要な標的である。酸化ストレスとは、1985年にHelmut Siesにより提唱された細胞や個体に関するコンセプト⁸⁾であり、「活性酸素・フリーラジカルの負荷から、抗酸化分子・抗酸化酵素・修復酵素などによる防御・消去・修復作用を差し引いたもの」と定義される。酸化ストレスの生物学的意義に関しては、90年代まで上記の傷害性が強調されてきたが、「軽度の酸化ストレスは細胞傷害を起こすのではなく、むしろ細胞増殖を促進する」という新たなコンセプトが確立されるに至った。これは、培養細胞に薬剤で酸化ストレスを負荷していくと、その程度が強くなるに従い順に、細胞増殖・アポトーシス・壊死という異なる現象が観察されることに基づいている。その発がんとの関係を図に要約する(図2)。

3. 過剰鉄と発がん

鉄と発がんの関連について既知のデータは基本的に3種類に分類されよう。まず、ヒトがんに関する疫学データがあり、該当する主な疾患を表に示す。次は、全身の鉄貯蔵状態と発がんに関するヒトの疫学データである⁹⁾。最後は、動物に鉄化合物を投与した際の発がん性に関するデータである。私たちはこれまで、主として鉄化合物による腎癌とアスベストによる悪性中皮腫に関して、wild-typeのラットを解析してその発がんの詳細な分子機構を明

表 過剰鉄病態が発がんに関与していると考えられているヒト疾患

B型・C型ウイルス性肝炎による肝癌
アスベスト曝露による中皮腫・肺癌(白石綿・青石綿・茶石綿)
卵巣の子宮内膜症と卵巣癌(特に、明細胞癌)
遺伝性ヘモクロマトーシス(北欧に多い)における肝癌

らかにしてきた。アスベスト繊維あるいは特定のカーボンナノチューブ(直径が50 nm程度のもの)は異物であるが、ヘモグロビンなどの鉄含有タンパク質やヒストンとの親和性が高いこと、細くて長い繊維をマクロファージが処理できないこと、そして体腔を被う中皮細胞が貪食性を有すること、これらが総合的に作用して中皮腫発がんが発症することが判明した。いずれについても、詳細は他の総説を参照されたい^{1, 2)}。

4. フェロトーシス (Ferroptosis)

細胞死は、壊死(ネクローシス・受動死)とアポトーシス(能動死)に大きく分けられ研究が進んできたが、今世紀になってからプログラムされた壊死も存在することが明らかになってきた。その中で現在、フェロトーシスが注目を集めている¹⁰⁾。これはフェロが使用されていることからわかるようにFe(II)依存性の細胞死であり、erastinなどの低分子投与を起点として誘導される。その後、こうした分子はCystine glutamate antiporter (System Xc⁻)を阻害していることがわかり、それに伴う細胞内還元型グルタチオン(GSH)の低下、脂質過酸化へと話が広がった。鉄の触媒性を抑えるdesferalのような鉄キレート剤あるいは膜脂質特異的なGSH peroxidase 4で抑制されるのも特徴である。このような状況下に岐阜薬科大学の平山祐らはFe(II)特異的な種々のturn-on蛍光プローブを初めて開発した¹¹⁾。細胞内でFe(II)は主としてライソゾーム内に存在することがわかっているが、それは細胞の分化・がん化・傷害など諸状況で変化することが判明してきており¹²⁾、このプローブにより様々な新発見が得られつつある。

5. おわりに

隕石の成分分析より宇宙には鉄が豊富にあると考えられており、鉄代謝は生命にとっておそらく根源的なものと考えられるが、その過剰はがんのみならず動脈硬化をはじめとする他の疾患にも関わっている可能性が高い。有効に利用されない過剰鉄が慢性的に存在する状況は生体にとって好ましくなく、日本人の健康寿命をさらに延ばすためには、年齢・性別に応じた体内鉄の適切な制御が必要であろうと考える。私は機会あるたびに65才までの年2回の献血を薦めている。

[参考文献]

- 1) S. Toyokuni, "Oxidative stress as an iceberg in carcinogenesis and cancer biology", *Arch. Biochem. Biophys.*, **2016**, 595, 46-49.
- 2) S. Toyokuni, F. Ito, K. Yamashita, *et al.*, "Iron and thiol redox signaling in cancer: An exquisite balance to escape ferroptosis", *Free Radic. Biol. Med.*, **2017**, 108, 610-626.
- 3) S. Toyokuni, "Role of iron in carcinogenesis: Cancer as a ferrotoxic disease", *Cancer Sci.*, **2009**, 100, 9-16.
- 4) L. Zacharski, B. Chow, P. Howes, *et al.*, "Decreased cancer risk after iron reduction in patients with peripheral arterial disease: Results from a randomized trial", *J. Natl. Cancer Inst.*, **2008**, 100, 996-1002.
- 5) I. Yanatori, D. R. Richardson, K. Imada, *et al.*, "Iron export through the transporter Ferroportin 1 is modulated by the iron chaperone PCBP2", *J. Biol. Chem.*, **2016**, 291, 17303-17318.
- 6) H. Gunshin, B. Mackenzie, U. Berger, *et al.*, "Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter", *Nature*, **1997**, 388, 482-488.
- 7) H. A. Woo, H. Z. Chae, S. C. Hwang, *et al.*, "Reversing the inactivation of peroxidoreductases caused by cysteine sulfinic acid formation", *Science*, **2003**, 300, 653-656.
- 8) H. Sies, "German-Japanese relationships in biochemistry: a personal perspective", *Nagoya J. Med. Sci.*, **2016**, 78, 335-347.

- 9) S. Toyokuni, "Iron-induced carcinogenesis: the role of redox regulation", *Free Radic. Biol. Med.*, **1996**, 20, 553-566.
- 10) M. Conrad, J. P. Angeli, P. Vandenabeele, *et al.*, "Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities", *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2016**, 15, 348-366.
- 11) T. Hirayama and H. Nagasawa, "Chemical tools for detecting Fe ions", *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **2017**, 60, 39-48.
- 12) F. Ito, T. Nishiyama, L. Shi, *et al.* "Contrasting intra- and extracellular distribution of catalytic ferrous iron in ovalbumin-induced peritonitis" *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2016**, 476, 600-606.

[著者プロフィール]

氏名：豊國 伸哉 (Shinya Toyokuni)

所属：名古屋大学 大学院医学系研究科 病理病態学講座
生体反応病理学・分子病理診断学 教授

連絡先：〒466-8550 名古屋市昭和区鶴舞町 65

TEL：052-744-2086 FAX：052-744-2091

E-mail：toyokuni@med.nagoya-u.ac.jp

出身大学：京都大学医学部

学位：医学博士

専門分野：病理学

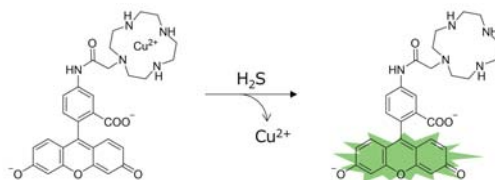
現在の研究テーマ：発がん機構の解明、がん予防、鉄代謝、
フェロトシス

新製品 *DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.*

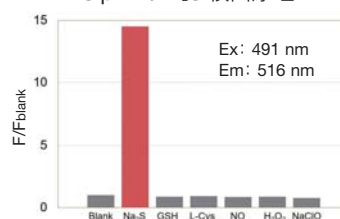
硫化水素検出用蛍光試薬

-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。

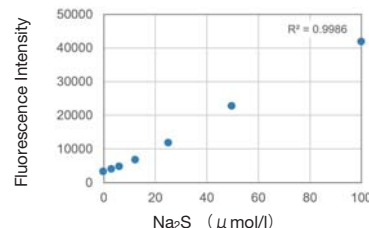


HSip-1 の H₂S 検出原理



試薬の反応特異性比較

HSip-1 1 μ mol/l (30 mmol/l HEPES, pH 7.4) 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



HSip-1 による検量線

各濃度の H₂S ドナー (Na₂S：製品コード SB01) 水溶液に 100 μ mol/l HSip-1 を加え、30 分室温にて反応後に蛍光強度を測定。

学会展示・ポスター発表のご案内

2017 年度 生命科学系学会合同年次大会
第 40 回日本分子生物学会年会
第 90 回日本生化学会大会

期日：2017 年 12 月 6 日 (水) ~ 9 日 (土)

会場：神戸ポートアイランド

ポスター発表内容

- ・低分子蛍光プローブによるオートファジーの可視化；マイトファジーとオートリソソームのライブセルイメージング
- ・新規脂肪滴検出蛍光色素の開発とその応用
- ・新規蛍光プローブ SPiDER- β Gal による細胞老化マーカー SA- β -gal の迅速検出

展示ブースにてお待ちしております。

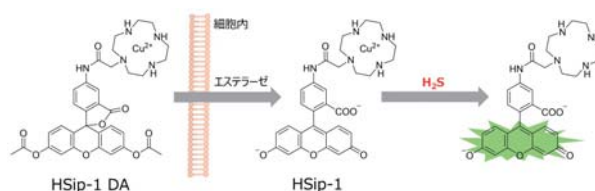
ぜひ、お立ち寄り下さい。

ポスター番号は後日小社 HP にてご案内いたします。

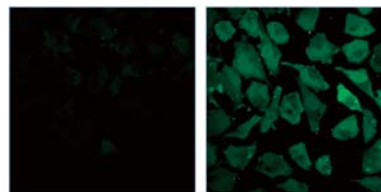
同仁化学

検索

-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：H₂S ドナー*を添加した HeLa 細胞

* H₂S ドナー：Na₂S
(製品コード SB01)

HSip-1 DA を用いた細胞内 H₂S 蛍光イメージング

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
-SulfoBiotics- HSip-1	1 mg	20,000	SB21
-SulfoBiotics- HSip-1 DA	50 μ g	18,000	SB22

※本製品は、東京大学大学院薬学系研究科 長野哲雄先生、花岡健二郎先生の指導の下、製品化しました。

Topics on Chemistry

細胞内鉄(Ⅱ)イオン選択的検出蛍光プローブ

株式会社同仁化学研究所 立中 佑希

鉄は生体内で最も多く存在する遷移金属種であり、高い酸化還元活性及び電気化学的性質を有し、酸素輸送、電子伝達、酵素反応といった生理的に重要な役割を果たしている。一方、細胞内において鉄の濃度異常が生じた場合、このレドックス活性は容易に細胞死や細胞損傷を引き起こすことが分かっている。通常、細胞内で鉄はフェリチンをはじめとするタンパク質に貯蔵され、毒性を出さないよう綿密に制御されているが、過剰になると自由鉄と呼ばれる不安定な鉄が増加し毒性を発揮してしまう。近年、このタンパク質非結合型の自由鉄としての存在が注目されており、アルツハイマー病やパーキンソン病といった疾患と関与することが示唆されている^{1), 2)}。自由鉄は生細胞内において、細胞内還元環境、水溶性、トランスポーター等の存在から、鉄(Ⅲ)イオンよりも鉄(Ⅱ)イオンの挙動が重要であると考えられている。特に、鉄(Ⅱ)イオンは細胞内の活性酸素種 ROS (reactive oxygen species) の産生にも深く関わっており、鉄(Ⅱ)イオンの触媒作用で引き起こされるフェントン反応によって生成したヒドロキシラジカルは、その強い酸化力から脂質過酸化や DNA 傷害を引き起こすことが分かっている。生細胞内の自由鉄は、酸化還元状態の異なる鉄(Ⅱ)イオンと鉄(Ⅲ)イオンが混在し検出することが困難であり、その機能解明が待ち望まれている。そこで、本稿では永澤、平山らによって報告された自由鉄の主成分である鉄(Ⅱ)イオンを選択的に検出する蛍光プローブである RhoNox-1 を紹介する³⁾。

RhoNox-1 は、ローダミン B を基本骨格に、2つのうちの1つの第3級アミンが *N*-オキシド化した構造を有している。*N*-オキシド化した状態ではほとんど蛍光を発しないが、*N*-オキシドが鉄(Ⅱ)イオンにより特異的に還元されることで、蛍光体を生成する turn-on 型の蛍光プローブである (図 1)。

RhoNox-1 に鉄(Ⅱ)イオンを添加すると、575 nm をピークに蛍光強度が増大し、約 30 倍の蛍光応答を示した。選択性に関して、鉄(Ⅲ)イオンをはじめとする他の金属種にはほとんど蛍光変化を示さなかった。これまで、鉄(Ⅱ)イオンを検出する蛍光プローブとしては消光型の鉄イオン検出プローブしかツールがなく、感度や選択性に課題があったが、RhoNox-1 は高感度、高選択的

に鉄(Ⅱ)イオンを検出できることが報告されている。

実際に、RhoNox-1 を用いて HepG2 細胞内の鉄(Ⅱ)イオンのライブセルイメージングを試みた結果、RhoNox-1 を添加した無刺激の細胞内では僅かな蛍光しか観察されないが、外部から鉄(Ⅱ)イオンを添加すると細胞内に強い蛍光が観察されることを確認している。また、鉄(Ⅱ)イオンのキレート剤であるビピリジル処理によって明らかに蛍光シグナルが減少することから、生細胞中においてもこのプローブが鉄(Ⅱ)イオンと効率的かつ選択的に反応し、鉄(Ⅱ)イオンの検出をモニタリングできることを示唆するものである。さらに、MCF-7 細胞中の RhoNox-1 によって検出された鉄(Ⅱ)イオンのシグナルが、ゴルジ体に分布していることを確認しており、ゴルジ体内の鉄(Ⅱ)イオンの検出が可能である。現在、小社では FeS クラスターやヘム合成の場として知られるミトコンドリア内の鉄(Ⅱ)イオンと選択的に反応する蛍光プローブ Mito-FerroGreen (次頁) を製品化予定である。

鉄(Ⅱ)イオンの動態制御機構や生理的意義について未解明な部分が多く、生細胞中の鉄(Ⅱ)イオンの検出は極めて重要である。永澤、平山らは、さらなる感度や応答性を向上したプローブを開発しており、生理学及び病理学的プロセスの解明、生命科学の発展が期待される。

【参考文献】

- 1) S. Ayton, N. G. Faux and A. I. Bush, "Ferritin levels in the cerebrospinal fluid predict Alzheimer's disease outcomes and are regulated by APOE", *Nat. Commun.*, **2015**, 6, 6760.
- 2) R. B. Mounsey and P. Teismann, "Chelators in the treatment of iron accumulation in Parkinson's disease", *Int. J. Cell Biol.*, **2012**, 2012, 983245.
- 3) T. Hirayama, K. Okuda and H. Nagasawa, "A highly selective turn-on fluorescent probe for iron (II) to visualize labile iron in living cells", *Chem. Sci.*, **2013**, 4, 1250.

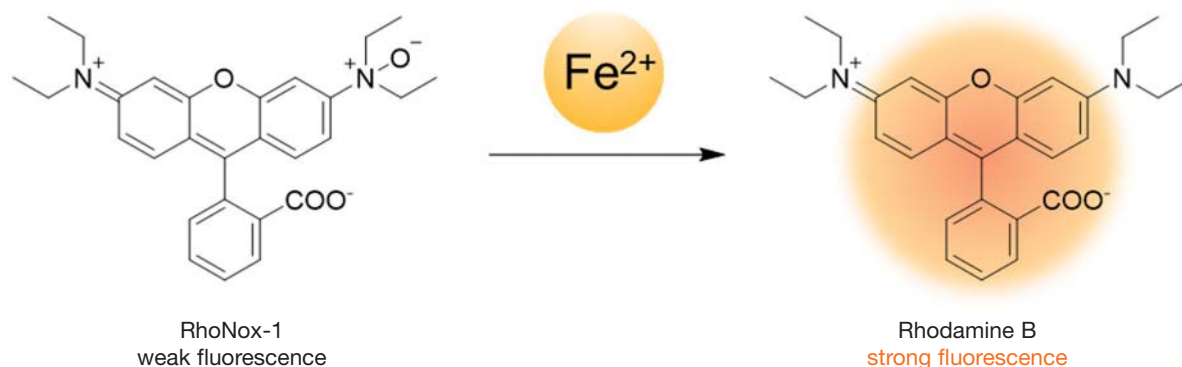


図 1 RhoNox-1 の鉄(Ⅱ)イオン検出原理

開発中

鉄検出蛍光試薬

Mito-FerroGreen

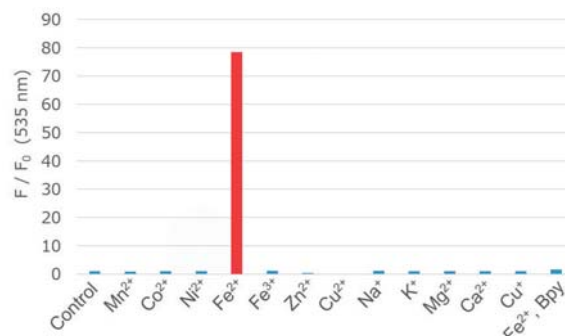
<特長>

- ・ Fe^{2+} への高い選択性
- ・ 生細胞中のミトコンドリアに局在する Fe^{2+} を検出
- ・ 励起波長 505 nm、蛍光波長 535 nm で測定可能

鉄は、生体内で最も多く存在する遷移金属元素であり、様々な生理活性を示すことが報告されています。近年、タンパク質非結合型の鉄イオン（自由鉄）としての存在が注目されており、その高い反応性は細胞損傷や細胞死にも関与していることが示唆されています。自由鉄は安定な化学種である鉄(II)イオン及び鉄(III)イオンとして存在しますが、生細胞内において、細胞内還元的環境、水溶性、トランスポーターの存在等を考慮すると鉄(III)イオンよりも鉄(II)イオンの挙動を知ることが重要であると考えられています。

Mito-FerroGreen は、FeS クラスターやヘム合成の場として知られるミトコンドリア内の鉄(II)イオンと選択的に反応し強い蛍光 ($\lambda_{\text{ex}} = 505 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm}$) を発する試薬であり、細胞内鉄(II)イオンのライブセルイメージングに利用することが可能です。

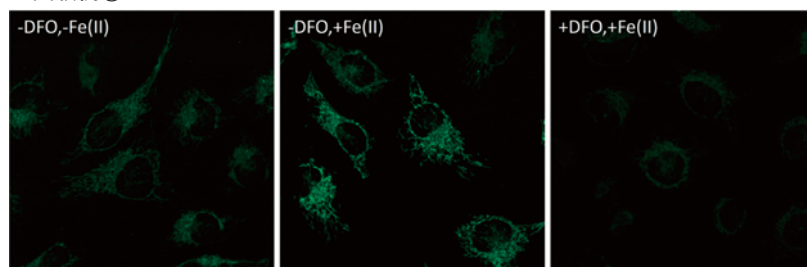
金属種に対する反応選択性



50 mmol/l HEPES Buffer (pH7.4) 1 ml 中に 1 mmol/l Mito-FerroGreen 2 μl 、10 mmol/l 各種金属 2 μl 及び 1 mg/ml Esterase 20 μl を加え室温にて 1 時間反応後の蛍光強度を測定した。

励起波長：500 nm、蛍光波長：535 nm

<実験例①>



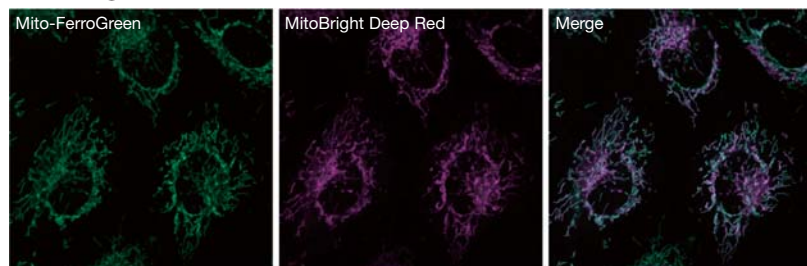
細胞への鉄及び鉄キレート試薬添加によるイメージング評価

血清を含む MEM 増殖培地にて培養した HeLa 細胞 (左図) へ Mito-FerroGreen を添加することで、細胞中に内在する鉄を蛍光にて検出できた。一方、HeLa 細胞へ鉄及び鉄キレート試薬を添加することで、細胞内鉄量の変化が蛍光強度の変化により確認できた。

励起波長：488 nm、蛍光波長：500-565 nm

HeLa 細胞に 5 $\mu\text{mol/l}$ Mito-FerroGreen を添加し更に 37°C で 30 分間インキュベート。その後、鉄キレート試薬である 10 mmol/l Deferoxamine (DFO) 又は 100 $\mu\text{mol/l}$ 硫酸アンモニウム鉄(II)を添加し、37°C で 1 時間インキュベートし、共焦点顕微鏡により観察した。

<実験例②>



ミトコンドリア染色試薬との共染色

Mito-FerroGreen の細胞内局在を確認するため、ミトコンドリア染色試薬 (MitoBright Deep Red) と共染色を行ったところ、両試薬の蛍光は重複しており、Mito-FerroGreen はミトコンドリアを選択的に染色していることを確認した。

Mito-FerroGreen……励起波長：488 nm、蛍光波長：500-565 nm

MitoBright Deep Red……励起波長：640 nm、蛍光波長：656-700 nm

HeLa 細胞に 5 $\mu\text{mol/l}$ Mito-FerroGreen およびミトコンドリア染色試薬 200 nmol/l MitoBright Deep Red (コード：MT08) を添加し 37°C で 30 分間インキュベート。更に 100 $\mu\text{mol/l}$ 硫酸アンモニウム鉄(II)を添加し、37°C で 1 時間インキュベートし、共焦点顕微鏡により観察した。

本製品に関するお問い合わせは、info@dojindo.co.jp まで

細胞内脂溶性過酸化脂質検出蛍光試薬

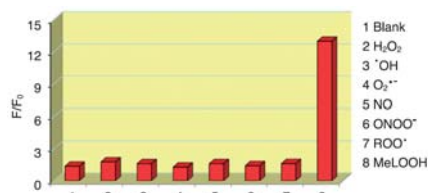
Liperfluo

<特長>

- ・細胞内の過酸化脂質を蛍光イメージング
- ・脂溶性過酸化脂質への反応特異性が高い
- ・汎用の励起フィルター (488 nm) に適応

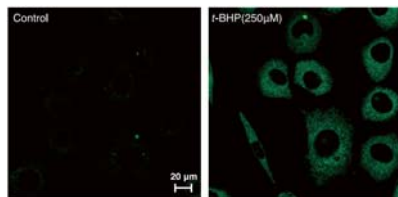
Liperfluo は、過酸化脂質により特異的に酸化されエタノール等の有機溶媒中で強い蛍光を発します。本試薬は、ジイソキノリン環の片方にテトラエチレングリコール基が導入されたもので、小社製品の Spy-LHP よりも水系バッファー中での分散性が向上しています。また Liperfluo 酸化体は水中ではほとんど蛍光を発しませんが、細胞膜等の脂溶性の高い部位では蛍光性となることから、生細胞の過酸化脂質のイメージングやフローサイトメトリーによる細胞の過酸化脂質量の分析に使用することができます。

<反応特異性>



Liperfluo の活性酸素種に対する反応選択性

<実験例>



(データ提供：北里大学薬学部 今井浩孝先生、熊谷剛先生)

生細胞を用いた過酸化脂質の共焦点顕微鏡イメージング

L929 細胞 (マウス線維芽細胞由来培養細胞株) に Liperfluo を含む培養培地を添加 (終濃度: 1 μmol/l) し、30 分間インキュベート。その後培地を除去し、t-BHP を含む新しい培地を添加 (終濃度: 250 μmol/l) 後、更に 2 時間インキュベート後に観察した。t-BHP により刺激した細胞において、蛍光強度の増大がみられた。

装置: 共焦点レーザー顕微鏡 Zeiss LSM510META

フィルターセット: FITC wide filter, HFT UV/488, NFT490, BP505-550

本試薬を用いた論文の紹介

過酸化脂質とフェロトーシス

細胞死メカニズムの一つとしてフェロトーシス (Ferroptosis) が注目されている。フェロトーシスは、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPX4) の活性が下がることで、細胞内のリン脂質が酸化され過酸化脂質として蓄積され引き起こされることが知られている。Kagan らは、脂肪酸アシルの arachidonoyl と adrenoyl の過酸化がフェロトーシスの引き金になることを発見した。このような細胞内脂質の過酸化が細胞死シグナルとして近年見出されてきている。詳細は下記論文を参照ください。

V. E. Kagan *et al.*, "Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis", *Nature Chemical Biology*, **2017**, 13, 81.

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Liperfluo	50 μg × 5	20,000	L248

ミトコンドリア膜脂溶性過酸化脂質検出蛍光試薬

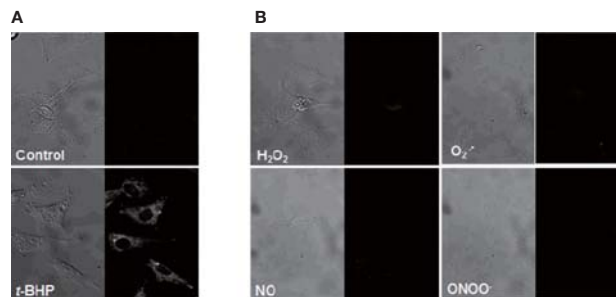
MitoPeDPP

<特長>

- ・細胞小器官であるミトコンドリア特異的に集積
- ・ミトコンドリア膜中の脂溶性過酸化脂質を選択的に検出
- ・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脂質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脂質のイメージングが可能です。

<反応特異性>



MitoPeDPP の反応選択性

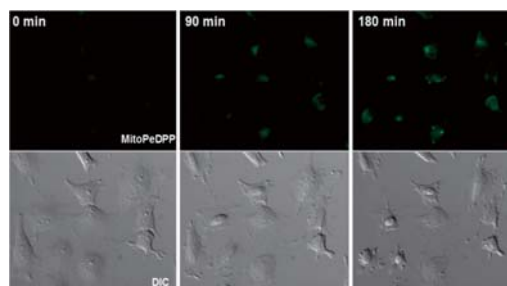
A: HepG2 細胞中で MitoPeDPP を 15 分インキュベート後、100 μmol/l t-BHP を添加、更に 15 分のインキュベート後、顕微鏡画像を取得。B: HepG2 細胞中で MitoPeDPP を 15 分インキュベート後、各種 ROS、RNS 発生剤を添加 (H₂O₂、NO、ONOO⁻ は各発生剤の濃度を 100 μmol/l 使用、O₂·⁻ は PMA (phorbol myristate acetate) により発生させ 10 μmol/l の濃度で使用)

※写真は位相差画像 (左) と蛍光画像 (右) を示す。

※フィルター: 470/40 (Ex)、525/50 (Em)

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

<実験例>



Rotenone を用いた脂溶性過酸化脂質の検出例

HeLa 細胞に MitoPeDPP を添加、更に Rotenone 添加直後 (左)、添加 90 分後 (中)、添加 180 分後 (右) の細胞を観察した。添加 90 分後より MitoPeDPP により脂溶性過酸化脂質を検出した。

※写真は蛍光画像 (上) と位相差画像 (下) を示す。

※フィルター: 470/40 (Ex)、525/50 (Em)

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

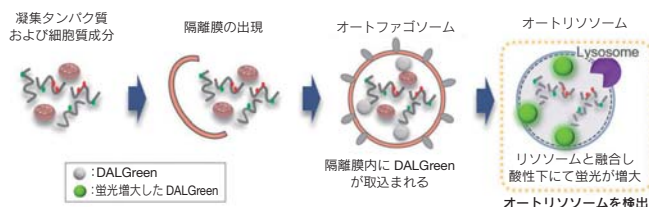
新製品

オートファジー検出蛍光試薬

DALGreen - Autophagy Detection

<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



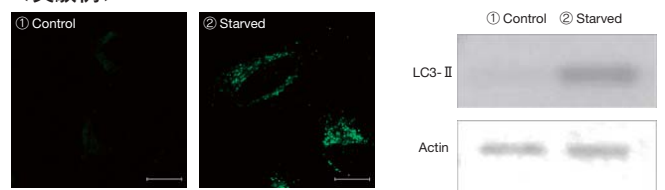
DALGreen は、細胞内の不要なタンパク質・細胞小器官などの再利用や、代謝のための分解過程であるオートファジーを検出できる蛍光色素です。培養細胞に添加した DALGreen は生細胞膜を透過し、オートファジー誘導により形成されたオートファゴソーム内に取り込まれます。その後、リソソームと融合し酸性環境となったオートリソソームにおいて DALGreen の蛍光が増大します。

<操作>

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>



※フィルター：488 nm (Ex), 500/-563 nm (Em)

※共焦点顕微鏡

DALGreen によるイメージング

① Control：増殖培地で 6 時間培養

② Starved：アミノ酸不含培養培地で 6 時間培養

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た。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た。

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

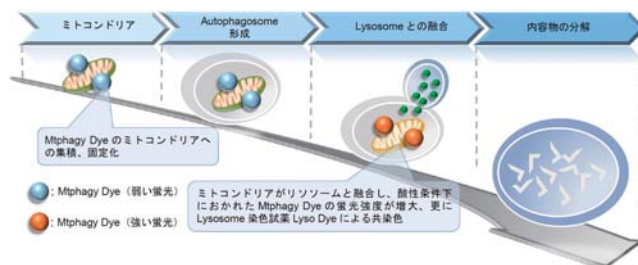
DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

マイトファジー検出キット

Mitophagy Detection Kit

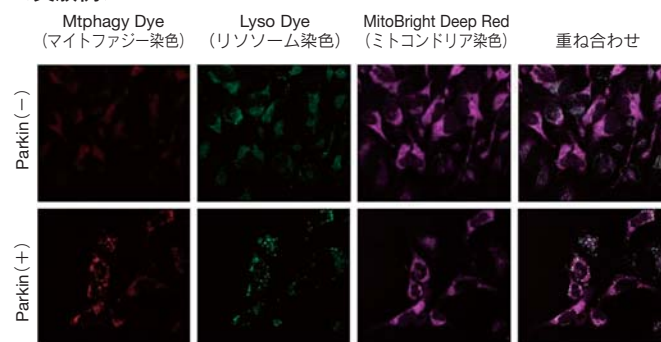
<特長>

- ・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



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。

<実験例>



Parkin 発現細胞でのマイトファジー検出例

Parkin 発現 HeLa 細胞 (下段) および未発現 HeLa 細胞 (上段) に CCCP (carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone) を添加。Parkin 発現した細胞では CCCP 刺激によりマイトファジーを誘導。またミトコンドリア染色色素 (MitoBright Deep Red: MT08) との共染色により、リソソームに取り込まれたミトコンドリア (白色: 重ね合せ) を識別することができた。

Mphagy Dye (赤): 561 nm (Ex), 650 LP nm (Em)

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

MitoBright Deep Red (紫): 640 nm (Ex), 656-700 nm (Em)

本キットを用いた論文の紹介

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、これらはリボフスチンと呼ばれ、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ボ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, *et al.*, "Mitochondrial contribution to lipofuscin formation", *Redox Biology*, **2017**, 11, 673.

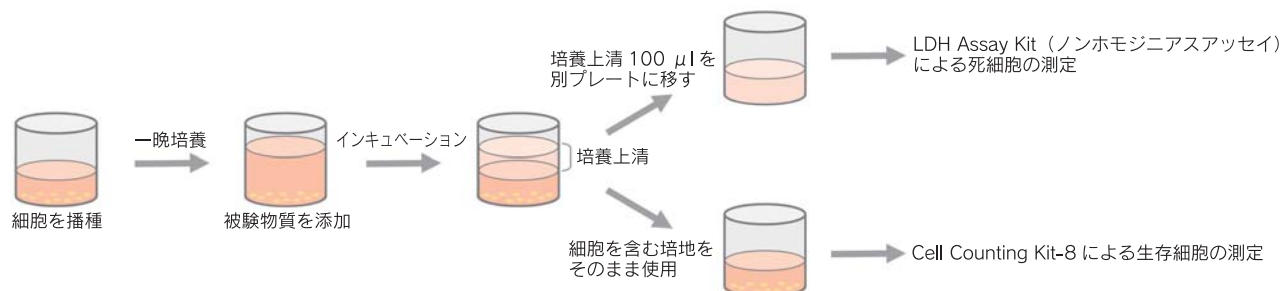
品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Mitophagy Detection Kit	1 set	36,000	MD01

細胞毒性測定に関するよくあるお問い合わせ

対象製品：Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST

Q. 同じ細胞を用いて、LDH アッセイ以外の評価にも使用できますか？

A. 培養上清を用いたノンホモジニアスアッセイで評価すると、残りの細胞培養液を他の評価にご使用頂けます。下記の実験フローは、培養上清を用い LDH アッセイによる死細胞の評価を、また残りの細胞を含む培地は Cell Counting Kit-8 による生細胞の評価を行ったものになります。操作手順および実験例については、下記の細胞増殖測定・細胞染色プロトコルに記載しておりますので参照ください。



Q. LDH アッセイと Cell Counting Kit-8 を用いた生細胞の評価には相関性がありますか？

A. Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST と Cell Counting Kit-8 では、測定原理が異なるため相関性（同じ薬剤濃度で細胞毒性を示す結果）は必ずしも得られません。また双方の結果は被験物質として用いる薬剤の細胞に対する作用機序にも依存します。

< Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST >

細胞膜の損傷により培地中に漏れ出した LDH 活性を測定（細胞膜損傷が指標）

< Cell Counting Kit-8 >

細胞内の代謝活性（デヒドロゲナーゼ）を測定（代謝活性が指標）

Q. 測定に影響を与える化合物はありますか？

A. ①培地中の血清に含まれる LDH はバックグラウンドを上昇させることがあります。

対応：無血清培地または血清量を 5%以下となるように調整した培地をご使用ください。

②被検物質や培地中に強い還元性を持つ物質が含まれていると、発色色素である WST を還元し誤発色させてしまいます。

対応：細胞を含まない培地および被験物質を用いて、試薬ブランクを測定し誤発色の有無を確認してください。

なお、一般的な DMEM、RPMI、F-12 等の培地には、通常、還元物質は含まれていません。

③培地中にビルビン酸が高濃度含まれると LDH 活性の測定を阻害します。

対応：高コントロールの吸光度が低い（低コントロールと同程度）場合は、培地中にビルビン酸が含まれていないかご確認いただき、ビルビン酸を含まない培地で評価をおこなってください。

Q. 490 nm 以外の吸収フィルターで測定できますか？

A. 小社では 490 nm を推奨していますが、数 nm 波長が異なるフィルター（例：492nm）でも問題なくご使用頂けます。490 nm 以外では、450 nm のフィルターは小社でも使用実績があり、使用可能です。但し、吸光度は 490 nm と比較的高くなります。

Q. Working Solution 調製後は直ぐに使い切る必要はありますか？

A. 調製した Working Solution は冷蔵保存して頂ければ半年間は保存可能です。

細胞増殖測定・細胞染色プロトコル 改訂版のお知らせ



新版の第三版では、Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST を新たに追加しました。

測定時のヒントやコツ、トラブルシューティングも掲載しておりますので、是非ご活用ください。

下記キーワードにて検索ください。

試薬ダウンロード 同仁

検索

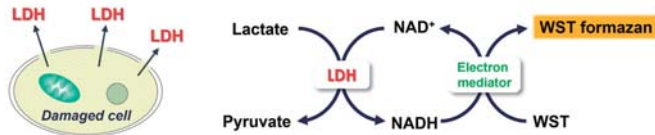
DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

細胞毒性測定キット

Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST

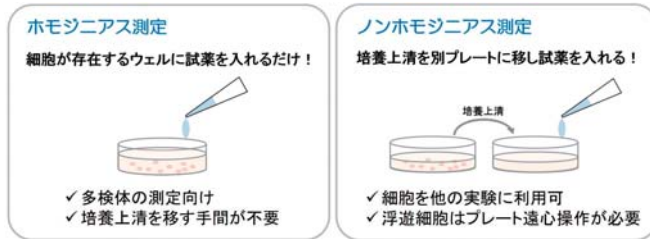
<特長>

- ・細胞を含む培地または培養上清をサンプルとして選択可能
- ・試薬の安定性が高い
- ・マイクロプレートアッセイによる多検体測定が可能

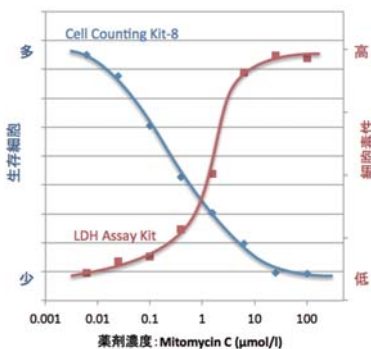


本キット中の試薬は生細胞と反応せず、また細胞にダメージを与えないため、生細胞と死細胞が混在する細胞培養液中に直接試薬を加えても細胞傷害を測定することが可能です（ホモジニアスアッセイ）。また細胞培養液の上清を取り出して LDH 活性を測定することも可能です（ノンホモジニアスアッセイ）。また、安定性の高い試薬を用いているため、調製した溶液は長期間保存でき、用時調製する必要がありません。

選べる 2 種の測定方法



<実験例>



Mitomycin C 添加による細胞毒性評価

HeLa 細胞に Mitomycin C を各濃度で添加した際の細胞毒性を Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST (赤) と Cell Counting Kit-8 (青) を併用して測定した。2つの異なる指標で評価することで薬剤添加による生細胞の減少と死細胞の増加が確認できた。

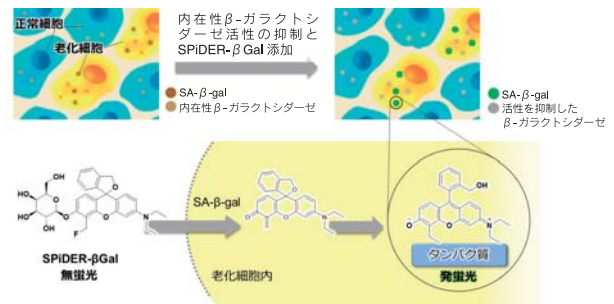
品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST	100 tests	9,600	CK12
	500 tests	25,400	
	2000 tests	38,000	

老化細胞検出キット

Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER-β Gal

<特長>

- ・ライブセルで簡便に老化細胞を検出
- ・蛍光による定量解析が可能
- ・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-β Gal) は、優れた細胞膜透過性を有するため、生細胞内の SA-β-gal を検出することができます。また蛍光による検出のためフローサイトメトリーを用いた定量解析も可能です。

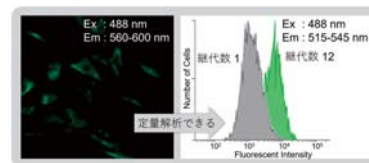
<操作>



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測定に利用します。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。詳細は小社 HP に掲載の取扱説明書をご覧ください。

<従来法(X-gal 法)の課題を解決>

Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER-β Gal



X-gal 法



本キットは蛍光法であることから、X-gal 法では不可能であったフローサイトメトリーに利用でき、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すが、本キットでは生細胞に利用でき、簡便な操作で染色が可能です。

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



28th Forum in DOJIN

D-アミノ酸生物学

—右と左からみた生命の世界—

日時 2017.11.17 金 10:00~17:00 (開場9:30)

場所 熊本ホテルキャッスル2F 熊本市中央区城東町4-2

主催 株同仁化学研究所

後援 株ケミカル同仁

参加費
無料
定員
140名

Program

10:00~10:05 主催者挨拶 上野 右一郎 (株同仁化学研究所)

10:05~10:15 世話人挨拶 富澤 一仁 (熊本大学大学院 生命科学研究部 分子生理学分野)

Session 1

10:15~11:15 吉村 徹 (名古屋大学大学院 生命農学研究科 応用分子生命科学専攻 応用生命化学講座 生体高分子学研究室)

「新規バイオファクターとしてのD-アミノ酸:その発見と研究の展開」

11:15~12:00 本間 浩 (北里大学 薬学部 生体分子解析学教室)

「酸性D-アミノ酸の代謝と生理機能」

12:00~13:30 昼食 (株同仁化学研究所「製品紹介」12:30~13:15)

Session 2

13:30~14:15 藤井 紀子 (京都大学原子炉実験所)

「老化蛋白質および血液のペプチド中のD-アミノ酸」

14:15~15:00 笹部 潤平 (慶應義塾大学 医学部 解剖学教室)

「腸内環境におけるD-アミノ酸を介した微生物と宿主の相互作用」

15:00~15:15 コーヒーブレイク

Session 3

15:15~16:00 西川 徹 (東京医科歯科大学大学院 精神行動医学分野)

「D-セリンと精神疾患」

16:00~16:45 福井 清 (徳島大学 先端酵素学研究所 次世代酵素学研究領域 病態システム酵素学分野)

「D-アミノ酸代謝制御システムをターゲットとした疾患酵素学研究」

16:45~17:00 閉会の挨拶 三浦 列 (熊本大学名誉教授)

17:00~18:30 ミキサー

問い合わせ
参加申込先

〒861-2202 熊本県上益城郡益城町田原2025-5 株同仁化学研究所内「フォーラム・イン・ドージン事務局」(担当:江口)

Tel:0120-489548 Fax:0120-021557 E-mail:info@dojindo.co.jp



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

フォーラム・イン・ドージン 申込書

下記要項にご記入の上、FaxまたはE-mailにて申し込みください。

年 月 日

該当の申込内容にチェックをお入れ下さい。

☐ フォーラム参加 ☐ 要旨集のみ送付希望

ご芳名：

ご所属：

ご住所：〒

Tel：

E-mail：

申込書の送付先

フリーファックス：0120-021557
E-mail：info@dojindo.co.jp

フォーラム・イン・ドージン事務局
熊本県上益城郡益城町田原2025-5
株式会社 同仁化学研究所
フリーダイヤル：0120-489548