

生体イオウ

—総説—

Dojindo Products in Mechanistic Studies of Reactive Sulfur Species

Department of Molecular Immunology and Toxicology,
National Institute of Oncology
Virág Bogdándi, Péter Nagy

—注目の研究—

レシオメトリックに観察できる 過酸化水素の蛍光検出化合物

株式会社同仁化学研究所 高橋 政孝

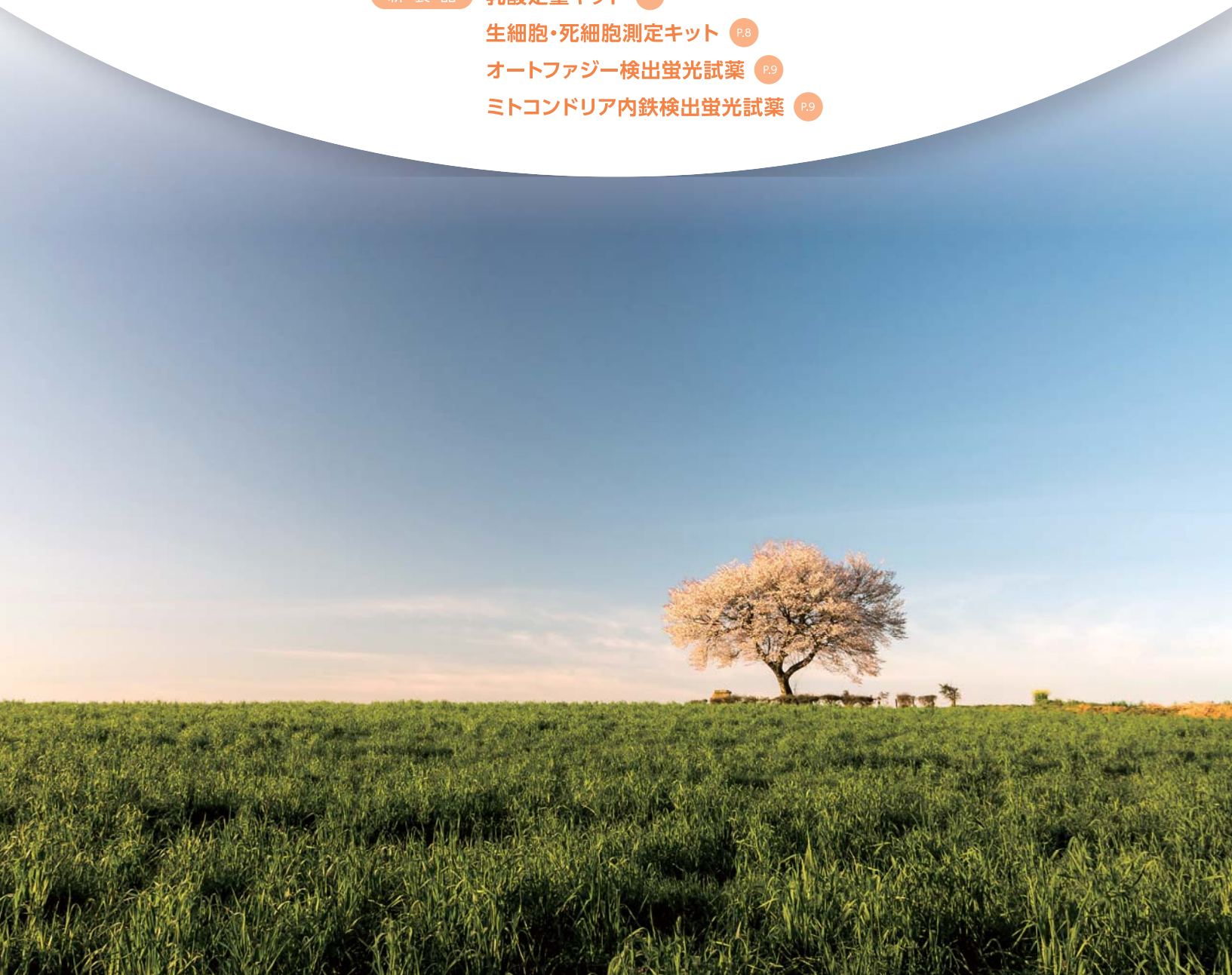
新製品

乳酸定量キット P.8

生細胞・死細胞測定キット P.8

オートファジー検出蛍光試薬 P.9

ミトコンドリア内鉄検出蛍光試薬 P.9





表紙撮影：熊本県阿蘇郡小国町下城 前原の一本桜
photo：永島俊介氏

CONTENTS

Review

Dojindo Products in Mechanistic Studies of Reactive Sulfur Species ●———— [1]

Department of Molecular Immunology and Toxicology,
National Institute of Oncology
Virág Bogdándi, Péter Nagy

Topics on Chemistry

レシオメトリックに観察できる 過酸化水素の蛍光検出化合物 ●———— [6] 株式会社同仁化学研究所 高橋 政孝

Commercial

新製品

- 乳酸定量キット ●———— [8]
- 生細胞・死細胞測定キット ●———— [8]
- オートファジー検出蛍光試薬 ●———— [9]
- ミトコンドリア内鉄検出蛍光試薬 ●———— [9]
- 生体イオウ関連研究用試薬 ●———— [5]
- 老化細胞検出キット ●———— [7]

お知らせ

- 第31版総合カタログ（2018/2019）発行 ●———— [4]
- 第1回若手ミトコンドリア国際会議 ●———— [8]

Dojindo Products in Mechanistic Studies of Reactive Sulfur Species



Virág Bogdándi

Department of Molecular Immunology and Toxicology, National Institute of Oncology,
Ráth György utca 7-9, Budapest 1122, Hungary



Péter Nagy

Department of Molecular Immunology and Toxicology, National Institute of Oncology,
Ráth György utca 7-9, Budapest 1122, Hungary

The common phrase 'Reactive Oxygen Species' is used to describe a number of reactive molecules and free radicals derived from molecular oxygen, mostly generated as by-products during mitochondrial electron transport. They have long been known to lead to oxidative stress causing cellular damage, however recent evidence have shown that these species may play a key role in redox regulation of cellular signaling¹⁾. They are also primary components of the antimicrobial stratagem of phagocytic cells in their host defense mechanisms. These important mediatory and protective functions of reactive oxygen species serve as foundations for recent developments in redox based medicine²⁾.

The new kid on the block in redox biology is the small signaling molecule hydrogen sulfide (H₂S). Although sulfide related research remained for a long time limited to toxicology, H₂S is now considered as an essential signaling molecule with crucial roles in health³⁾ and disease⁴⁾. These important functions have recently been underpinned by novel posttranslational modifications that were shown to be induced by hydrogen sulfide or related sulfur species (now commonly called Reactive Sulfur Species, RSS)⁵⁾⁻¹⁰⁾. Extensive research has already identified a number of pathways for the underlying molecular actions of RSS, which are summarized below:

1. The most widely suggested pathway with respect to sulfide-mediated biological functions is persulfide formation on protein cysteine residues¹¹⁾. This posttranslational modification has been proposed to have a protecting function on Cys residues against oxidative damage⁹⁾, as well as modulating distinct enzyme activities⁹⁾. A recent study from the Akaike laboratory in collaboration with us reported a pathway of translation-coupled protein persulfide biosynthesis, introducing a new direction on the pivotal roles of these modifications in cellular homeostasis¹²⁾.

2. Due to its strong nucleophilic character and reducing capacity, sulfide readily coordinates to metal centers of enzymes, and can potentially reduce these metal centers, representing another pathway of regulating enzymatic functions.⁸⁾ For example favorable interactions were reported with cytochrome C oxidase (which is also coupled to sulfide toxicity at high endogenous concentrations of H₂S), hemoglobins

or myoglobins^{13), 14)} as well as heme peroxidases like myeloperoxidase (MPO)^{15), 16)}, lactoperoxidase¹⁷⁾, catalase^{18), 19)} or superoxide dismutase²⁰⁾.

3. Another exciting new direction in sulfide biology focuses on the chemical interactions of sulfide with NO and the cross-talk of NO mediated and H₂S mediated signaling²¹⁾. Accumulating evidence suggest that biochemical and pharmacological interactions between these two signaling molecules occur in numerous different ways, where they reciprocally regulate the expression and function of distinct proteins. Recent research from the Feelisch laboratory in collaboration with us led to the discovery and identification of novel hybrid S/N molecules, which were proposed to be key bioactive reaction products of these small signaling molecules²²⁾.

In order to gain deeper insights into the molecular mechanisms of RSS biology, rigorous mechanistic studies require reliable chemicals, which are commercially available and can be used relatively easily. Dojindo Molecular Technologies offers a number of different reagents, which are extensively used by us and gaining increasing interest in numerous research laboratories all over the world. Here we introduce a few of them that are routinely used in our laboratory:

SSP4 (Sulfane Sulfur Probe 4) is a novel fluorescent probe, which can selectively detect sulfane sulfurs. The thiosalicyl analogue itself is not fluorescent, but fluorescein is released during the chemical interaction with sulfane sulfurs, emitting a strong green fluorescent signal. Thus, high sensitivity of fluorescence detection and convenient imaging of sulfane sulfur species can be performed with this product.

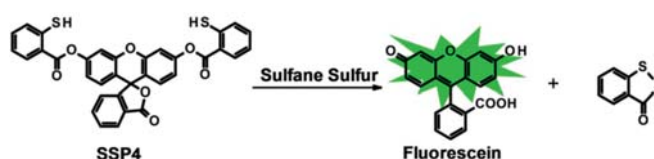


Figure 1 Reaction of SSP4 with sulfane sulfurs
(figure was adopted from Dojindo homepage)

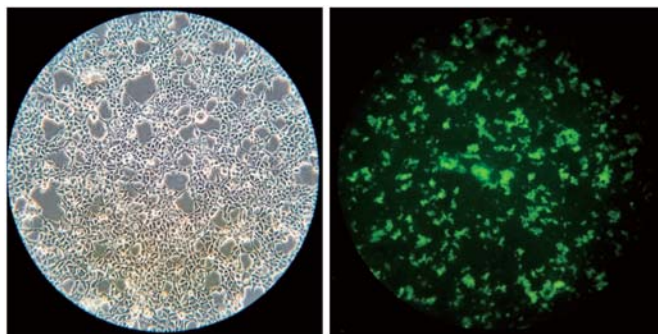


Figure 2 HEK293 cells stained with 50 μ M SSP4, after treatment with sulfide

SSP4 has for example been used in our research laboratory for the detection of cellular persulfide production in HEK293 cells (Figure 2), as well as to follow sulfane sulfur generation during the MPO catalyzed oxidation of sulfide by hydrogen-peroxide^{15), 23)}.

Water-soluble tetrazolium salts (WSTs) are now widely used to study cellular redox events in a quick and convenient way. They can, for example, aid activity measurements of mitochondrial dehydrogenases. Dojindo offers several newly developed phenylazotype tetrazolium salts, which are easily reduced by NADH or other cellular reducing agents to give colorful formazan dyes. An important step in the wider utilization of tetrazolium salts was the increase of their solubility in water by incorporating hydroxide groups and positive or negative charges to the phenyl ring. Dojindo's WSTs have additional sulfonate groups introduced directly or indirectly to the phenyl ring to reach even higher water-solubility. Due to the achieved high water solubility, concentrated (up to 100 mM) solutions can be prepared and used for NADH, NADPH or superoxide detection by simply measuring the absorbance of the dye solutions at the indicated absorption maxima. Besides its high sensitivity, another advantage of this method is that it can be performed in a microplate, making it a simple and time-saving protocol. We routinely use Dojindo's WST compounds for example to measure the enzymatic activity of SOD¹⁵⁾, as well as the superoxide producing activity of NOX2 upon stimulation of human neutrophils²³⁾.

Sodium-sulfide (Na_2S) and different polysulfide salts (Na_2S_2 , Na_2S_3 , Na_2S_4) allow to conveniently study sulfide or polysulfide induced processes. Sodium polysulfides are sulfane sulfur species, which have simple structures, and exist as different chain length hydropolysulfides in an aqueous solution, depending on the concentration conditions⁹⁾. Preparation of inorganic polysulfide solutions has for a long time been based on their in situ generation by reacting hypochlorite²⁴⁾ or glycine monochloramine²⁵⁾ reagents with excess of sulfide. Dojindo's sodium polysulfide salts, which dissolve in ultrapure water, provide a new and more convenient way to produce polysulfide solutions. These commercially available polysulfide salts were tested in our laboratory during the preparation of persulfidating solutions, which were used to develop the ProPerDP method^{5), 26)}. This highly selective semiquantitative protocol allows the detection of protein per- and polysulfide species on isolated proteins, in intact cells as well as in blood plasma or tissue samples.

PEG-PCMal is a reagent to visualize the redox states of proteins by quantitative analysis of their free thiol groups using gel-electrophoresis based techniques. Modification of thiol residues is one of the most important redox post-translational modifications occurring on proteins inside cells. It has recently been revealed that such modifications control numerous cellular functions such as transcription, expression or cell death. Hence, determining protein redox states is a useful mechanistic tool in redox biology.

PEG-Maleimide is a conventional reagent, which is used to visualize the redox states of proteins by a gel shift assay (Figure 3). It has a maleimide group, which binds covalently to protein thiols. This interaction results in a mobility shift upon electrophoretic separation (Figure 4). Hence, the number of free thiol groups on a protein can be assessed after PEG-Maleimide labeling followed by SDS-PAGE. A technological challenge is that PEG labeled protein chains transfer with lower efficiency and often present diminished antibody recognition during western blot analyses. Dojindo's PEG-PCMal has a UV photocleavable moiety in the molecule, which allows the cleavage of the PEG chains off the protein in the gel when exposed to UV irradiation after electrophoresis. Therefore, alkylated proteins that were treated with UV irradiation can be transferred from the gel to PVDF membrane and detected by antibodies with much higher efficacy and sensitivity.

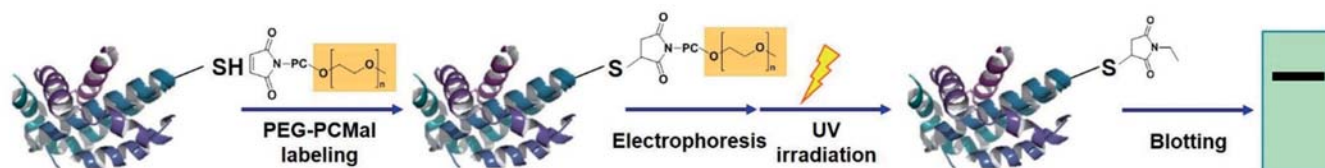


Figure 3 Schematic protocol for the determination of protein redox states by PEG-PCMal labeling, gel shift assay and western blotting (figure was adopted from Dojindo homepage)

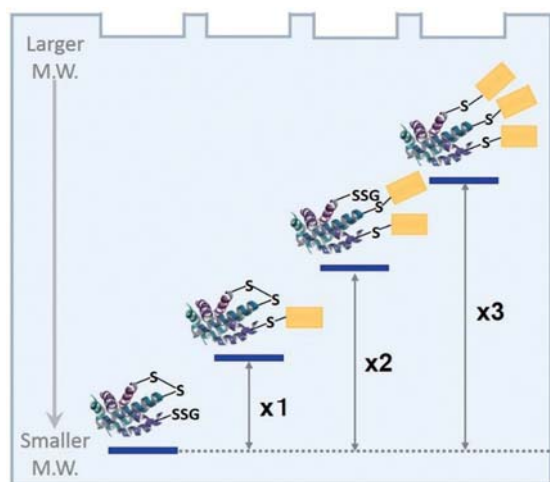


Figure 4 Mobility shift assay mechanism by PEG-PCMal depending on the redox state of the protein (figure was adopted from Dojindo homepage)

PEG-PCMal can also be utilized in a recently developed methodology to detect protein polysulfides, called polyethylene glycol-conjugated maleimide-labeling gel shift assay (PMSA, Figure 5), which is based on the unique redox property of polysulfides¹². This technology is similar to the method mentioned above, but allows to quantify the protein polysulfide levels according to differences in band mobility upon SDS-PAGE. Initially, all sulfhydryl groups are blocked by iodoacetamide. In the second reaction, polysulfidated Cys residues are labeled by the conventional reagent, biotin-PEG-maleimide which can cleave alkylated polysulfide chains¹². Thus, the degree of protein polysulfidation is determined as a change in band mobility upon PEG-maleimide labeling. Low sensitivity drawbacks are also resolved by using Dojindo's PEG-PCMal (see Figure 3 and 4). Recently we have extensively validated this methodology and found that it is indeed appropriate for the detection of protein per/polysulfidation levels.

[References]

- 1) S. G. Rhee, *Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling*. Science (2006) 312, 1882-1883.
- 2) M. M. Cortese-Krott, A. Koning, G. G. C. Kuhnle, P. Nagy, C. L. Bianco, A. Pasch, D. A. Wink, J. M. Fukuto, A. A. Jackson, H. van Goor, K. R. Olson, M. Feelisch, *The Reactive Species Interactome: Evolutionary Emergence, Biological Significance, and Opportunities for Redox Metabolomics and Personalized Medicine*. Antioxid Redox Signal (2017) 27, 684-712.
- 3) C. Szabo, *Hydrogen sulphide and its therapeutic potential*. Nat Rev Drug Discov (2007) 6, 917-935.
- 4) J. L. Wallace, R. Wang, *Hydrogen sulfide-based therapeutics: exploiting a unique but ubiquitous gasotransmitter*. Nat Rev Drug Discov (2015) 14, 329-345.
- 5) E. Doka, I. Pader, A. Biro, K. Johansson, Q. Cheng, K. Ballago, J. R. Prigge, D. Pastor-Flores, T. P. Dick, E. E. Schmidt, E. S. Arner, P. Nagy, *A novel persulfide detection method reveals protein persulfide- and polysulfide-reducing functions of thioredoxin and glutathione systems*. Sci Adv (2016) 2, e1500968.
- 6) T. Ida, T. Sawa, H. Ihara, Y. Tsuchiya, Y. Watanabe, Y. Kumagai, M. Suematsu, H. Motohashi, S. Fujii, T. Matsunaga, M. Yamamoto, K. Ono, N. O. Devarie-Baez, M. Xian, J. M. Fukuto, T. Akaike, *Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, (2014) 111, 7606-7611.
- 7) H. Kimura, *Hydrogen sulfide: its production, release and functions*. Amino Acids (2011) 41, 113-121.
- 8) P. Nagy, *Mechanistic chemical perspective of hydrogen sulfide signaling*. Methods Enzymol, (2015) 554, 3-29.
- 9) K. Ono, T. Akaike, T. Sawa, Y. Kumagai, D. A. Wink, D. J. Tantillo, A. J. Hobbs, P. Nagy, M. Xian, J. Lin, J. M. Fukuto, *Redox chemistry and chemical biology of H₂S, hydropersulfides, and derived species: implications of their possible biological activity and utility*. Free Radic Biol Med (2014) 77, 82-94.
- 10) R. Wang, *Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed*. Physiol Rev (2012) 92, 791-896.
- 11) A. K. Mustafa, M. M. Gadalla, N. Sen, S. Kim, W. Mu, S. K. Gazi, R. K. Barrow, G. Yang, R. Wang, S. H. Snyder, *H₂S signals through protein S-sulfhydration*. Sci Signal (2009) 2, ra72.
- 12) T. Akaike, T. Ida, F. Y. Wei, M. Nishida, Y. Kumagai, M. M. Alam, H. Ihara, T. Sawa, T. Matsunaga, S. Kasamatsu, A. Nishimura, M. Morita, K. Tomizawa, A. Nishimura, S. Watanabe, K. Inaba, H. Shima, N. Tanuma, M. Jung, S. Fujii, Y. Watanabe, M. Ohmuraya, P. Nagy, M. Feelisch, J. M. Fukuto, H. Motohashi, *CysteinyI-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics*. Nat Commun (2017) 8, 1177.
- 13) R. Pietri, E. Roman-Morales, J. Lopez-Garriga, *Hydrogen sulfide and hemeproteins: knowledge and mysteries*. Antioxid Redox Signal (2011) 15, 393-404.
- 14) B. B. Rios-Gonzalez, E. M. Roman-Morales, R. Pietri, J. Lopez-Garriga, *Hydrogen sulfide activation in hemeproteins: the sulfheme scenario*. J Inorg Biochem (2014) 133, 78-86.

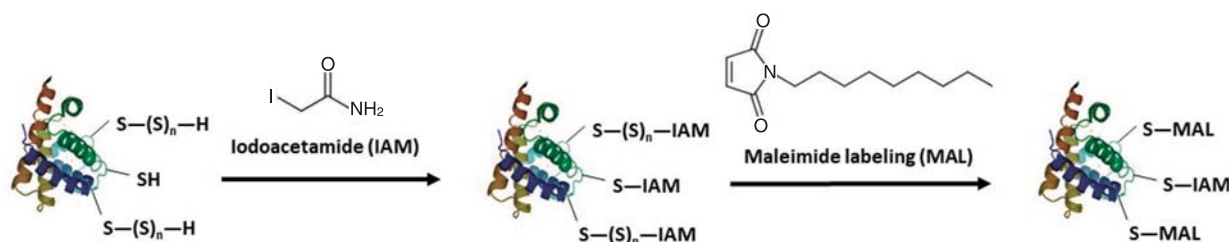


Figure 5 The principle of polyethylene glycol-conjugated maleimide-labeling gel shift assay (PMSA)

- 15) D. Garai, B. B. Rios-Gonzalez, P. G. Furtmuller, J. M. Fukuto, M. Xian, J. Lopez-Garriga, C. Obinger, P. Nagy, *Mechanisms of myeloperoxidase catalyzed oxidation of H₂S by H₂O₂ or O₂ to produce potent protein Cys-polysulfide-inducing species*. Free Radic Biol Med (2017) 113, 551-563.
- 16) Z. Palinkas, P. G. Furtmuller, A. Nagy, C. Jakopitsch, K. F. Pirker, M. Magierowski, K. Jasnos, J. L. Wallace, C. Obinger, P. Nagy, *Interactions of hydrogen sulfide with myeloperoxidase*. Br J Pharmacol (2015) 172, 1516-1532
- 17) S. Nakamura, M. Nakamura, I. Yamazaki, M. Morrison, *Reactions of ferryl lactoperoxidase (compound II) with sulfide and sulfhydryl compounds*. J Biol Chem (1984) 259, 7080-7085.
- 18) K. R. Olson, Y. Gao, E. R. DeLeon, M. Arif, F. Arif, N. Arora, K. D. Straub, *Catalase as a sulfide-sulfur oxido-reductase: An ancient (and modern?) regulator of reactive sulfur species (RSS)*. Redox Biol (2017) 12, 325-339.
- 19) D. Padovani, A. Hessani, F. T. Castillo, G. Liot, M. Andriamihaja, A. Lan, C. Pilati, F. Blachier, S. Sen, E. Galardon, I. Artaud, *Sulfheme formation during homocysteine S-oxygenation by catalase in cancers and neurodegenerative diseases*. Nat Commun (2016) 7, 13386.
- 20) D. G. Searcy, J. P. Whitehead, M. J. Maroney, *Interaction of Cu, Zn superoxide dismutase with hydrogen sulfide*. Arch Biochem Biophys (1995) 318, 251-263.
- 21) C. Kevil, M. M. Cortese-Krott, P. Nagy, A. Papapetropoulos, M. Feelisch, C. Szabo, in *Nitric Oxide (Third Edition)*, B. A. Freeman, Ed. (Academic Press, 2017), 57-83.
- 22) M. M. Cortese-Krott, G. G. Kuhnle, A. Dyson, B. O. Fernandez, M. Grman, J. F. DuMond, M. P. Barrow, G. McLeod, H. Nakagawa, K. Ondrias, P. Nagy, S. B. King, J. E. Saavedra, L. K. Keefer, M. Singer, M. Kelm, A. R. Butler, M. Feelisch, *Key bioactive reaction products of the NO/H₂S interaction are S/N-hybrid species, polysulfides, and nitroxyl*. Proc Natl Acad Sci U S A (2015) 112, E4651-4660.
- 23) D. Garai, Zoltán Pálkás, József Balla, Anthony J. Kettle, P. Nagy, *Measurements for sulfide-mediated inhibition of myeloperoxidase activity* in press (2018).
- 24) P. Nagy, C. C. Winterbourn, *Rapid reaction of hydrogen sulfide with the neutrophil oxidant hypochlorous acid to generate polysulfides*. Chem Res Toxicol (2010) 23, 1541-1543.
- 25) A. Vasas, *Kinetics and mechanisms of some biologically important redox reactions mediated by hydrogen sulfide* Ph.D. Thesis (2015).
- 26) E. Doka, E. S. J. Arner, E. E. Schmidt, P. Nagy, in *Methods Mol Biol*, J. Beltowski, Ed. (Springer, in press, 2017), vol. Special Issue.

Author

Virág Bogdándi (PhD student)

Contact

Department of Molecular Immunology and Toxicology,
National Institute of Oncology,
Ráth György utca 7-9, Budapest 1122, Hungary

Recent major awards:

- | | |
|-----------|--|
| 2017-2018 | National Excellence Scholarship awarded by the Ministry of Human Capacities |
| 2015 | Medal of the Faculty of Science and Technology of the University of Debrecen |
| 2015 | Pro Scientia Gold Medal |
| 2015 | First place at the XXXII. National Science Competition for Undergraduate Students, Hungary |
| 2014-2015 | Scholarship of the Republic of Hungary |

Author

Péter Nagy

Contact

Department of Molecular Immunology and Toxicology,
National Institute of Oncology,
Ráth György utca 7-9, Budapest 1122, Hungary
Phone: +36-1-224-8600/3644
Fax: +36-1-224-8620
E-mail: peter.nagy[at]oncol.hu

Positions Held

- | | |
|-------|---|
| 2017- | Scientific Director at the National Institute of Oncology, Hungary |
| 2016- | Accreditation and Designation Board member of the Organisation of European Cancer Institutes (OECI) |
| 2015- | Cancer Center Accreditation Auditor for OECI |
| 2013- | Director of International Relations at the National Institute of Oncology, Hungary |
| 2011- | Head of Department - Department of Molecular Immunology and Toxicology at the National Institute of Oncology, Hungary |

Recent major awards

- | | |
|-----------|---|
| 2017 | Doctor of Science of the Hungarian Academy of Sciences |
| 2015 | János Bolyai Research Scholar of the Hungarian Academy of Sciences |
| 2015- | Honorary Associate Professor at Debrecen University, Hungary |
| 2015- | Honorary Senior Research Fellow at the University of Otago, Christchurch, Department of Pathology, Free Radical Research Group, New Zealand |
| 2011-2015 | Marie Curie International Reintegration Grant Fellow |

第 31 版総合カタログ(2018/2019)発行

第 31 版総合カタログを発行いたしました。
カタログ発行と併せて、別冊で添付しているプロトコルの内容も更新しております。

カタログのご請求は小社カスタマーリレーション部までご依頼ください。

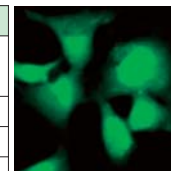
URL: www.dojindo.co.jp E-mail: info@dojindo.co.jp

生体イオウ関連研究用試薬

硫化水素

【検出】 従来の Methylene blue 法では硫化水素に加え結合型硫黄も検出されていましたが、中性で反応可能な HSip-1 は硫化水素を選択的に検出できます。また蛍光イメージングや HPLC など用途に応じ試薬を選択頂けます。

試薬	HSip-1	HSip-1 DA	Sulfide-dibimane (標準物質)
検出原理	硫化水素と反応し蛍光が増大 (定量)	細胞膜透過後、硫化水素と反応し蛍光が増大 (イメージング)	モノプロモビマンと硫化水素が反応し生じた蛍光物質 (スルフィドジビマン) を高感度に検出
検出法	蛍光光度計、蛍光プレートリーダー	蛍光顕微鏡	HPLC、LC/MS (同位体)
容量	1 mg	50 µg	10 nmol × 5
希望納入価格 (¥)	20,000	18,000	Request
メーカーコード	SB21	SB22	SB15、SB16 (同位体)



HSip-1 DA による検出例

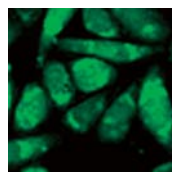
【ドナー】 Na_2S は水に溶解するだけで硫化水素を放出します。その他、加水分解反応やグルタチオン/システインとの反応で硫化水素の放出を制御できるドナーがあります。

試薬	Na_2S	GGY4137	H_2S donor 5a	H_2S donor 8l	H_2S donor 8o
放出機構	—	加水分解反応	グルタチオンやシステインとの反応		
H_2S 発生場所	細胞外		細胞内		
放出パターン	即座	ゆっくり	グルタチオンやシステインの濃度に依存		
放出時間	—	数時間~数日間	20 分	15 分	40 分
容量	100 mg × 5	10 mg	10 mg	10 mg	10 mg
希望納入価格 (¥)	9,000	7,000	15,000	18,000	18,000
メーカーコード	SB01	SB06	SB07	SB08	SB09

サルフェン硫黄

【検出】 従来の検出で使う Cyanolysis は有毒で操作も煩雑です。一方、蛍光プローブの SSP4 は簡便に定量でき、更には細胞のイメージングも可能です。

試薬	SSP4
検出原理	サルフェン硫黄と特異的に反応し蛍光が増大
検出法	蛍光顕微鏡、プレートリーダー
容量	1 mg
希望納入価格 (¥)	29,000
メーカーコード	SB10



SSP4 による検出例

【ドナー】 パースルフィドやポリスルフィド等のサルフェン硫黄は、システインやグルタチオンよりも還元能が高く生体内における抗酸化物質としての作用も示唆されています。

試薬	Sodium disulfide (Na_2S_2)	Sodium trisulfide (Na_2S_3)	Sodium tetrasulfide (Na_2S_4)
$\text{pK}_{a1} / \text{pK}_{a2}$	5 / 9.7	4.2 / 7.5	3.8 / 6.3
容量	100 mg × 5	100 mg × 5	100 mg × 5
希望納入価格 (¥)	12,000	12,000	12,000
メーカーコード	SB02	SB03	SB04

タンパク質解析

代表的な翻訳後修飾の一つであるタンパク質のチオール修飾や S-ニトロシル化は、生体内のレドックス変化に応答して生じます。ゲルシフトアッセイによるタンパク質解析では、目的タンパク質中のチオール又は S-ニトロシル基に特定分子量の化合物を付与した後、電気泳動にてバンドのシフト幅を解析しチオール数や S-ニトロシル基の数を確認することができます。

試薬	Protein Redox Monitoring Kit Plus	PEG-PCMal	Protein S-Nitrosylation Monitoring Kit	Biotin-HPDP (WS) solution
検出原理	ゲルシフトアッセイ (チオール検出)		ゲルシフトアッセイ (S-ニトロシル基検出)	Biotin-switch 法
バンドのシフト幅	15 kDa	5 kDa	15 kDa	—
形態	キット	粉末	キット	水溶液
容量	5 samples / 20 samples	1 mg / 1 mg × 10	20 samples	500 µl
希望納入価格 (¥)	23,000 / 50,000	8,000 / 50,000	59,000	20,000
メーカーコード	SB12	SB20	SB14	SB17

Topics on Chemistry

レシオメトリックに観察できる過酸化水素の蛍光検出化合物

株式会社同仁化学研究所 高橋 政孝

生体内の酸化ストレスを議論する上で、ミトコンドリアは重要なオルガネラの一つである。ミトコンドリアは、酸素を利用しATPを合成することで生体内のエネルギーを生産しており、その際、酸化力の強い活性酸素種（ROS）が発生する。通常、発生したROSはSODやカタラーゼにより生体内で無毒化されるが、ROSが残存した場合、その強い酸化力にて様々なタンパク質を酸化し、多様な生理機能に異常をきたす。また、ミトコンドリアはシグナル伝達、細胞分裂、細胞死などにも深く関与していることが示唆されており¹⁾、ミトコンドリアを研究するための新しい技術の開発は、酸化ストレスと生理現象の関わりを解明する上で非常に重要である。

比色アッセイなど従来の分析技術と比較して、蛍光プローブを用いたリアルタイムイメージング技術は高い感度と選択性、空間分解能の高さ、操作の簡便さ、非破壊検出、という利点があり、最も有効な検出ツールとして認知されている²⁾。

現在、ミトコンドリア内ROSの検出用蛍光プローブの開発は化学、生物学、医学などの研究分野において重要性が増しており、近年でも多くの論文が報告されている。今回のトピックではROSの中でもATP産生時に副次的に発生する過酸化水素への応答を絞り、報告された論文の中で特に興味深い蛍光プローブを二例で紹介したい。

一例目は、2012年にChoらが報告した、ミトコンドリアに局在し、過酸化水素をレシオメトリックに検出するSHP-Mitoである³⁾。メカニズムとしては、構造内のトリフェニルホスフィン基のカチオン性によりミトコンドリアに集積し、過酸化水素への応答によって、蛍光発色団の電価移動相互作用が増加し蛍光波長が青色から黄色にシフトする（図1）。

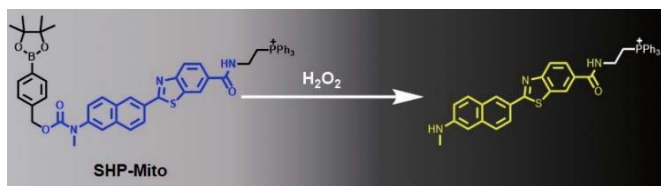


図1 SHP-Mitoの過酸化水素検出システム

SHP-Mitoは既存の過酸化水素検出試薬の様なoff-onの検出方法とは異なり、蛍光波長の変化によって過酸化水素を検出するため、過酸化水素が存在しない条件でも蛍光を捉えることができ、ネガティブデータとの比較が容易である。また、マウスの海馬組織を染色した実績があり³⁾、臓器ごとの過酸化水素レベルのモニタリングに有用であることが期待される。さらに、過酸化水素の検出限界が4.6 $\mu\text{mol/l}$ と報告されており、微量の過酸化水素の定量にも期待できる。

二例目は、2017年にStainsらが報告した、ミトコンドリア内過酸化水素のレシオメトリック蛍光検出用プローブのSiOH2Rである⁴⁾。メカニズムとしては、構造内のジメチルアミノ基のカチオン性によりプローブがミトコンドリアに集積し、過酸化水素への応答により蛍光団骨格が構造変化し励起蛍光波長が紫色から黄色にシフトする（図2）。

この化合物の最大の利点は蛍光特性であり、応答前後の蛍光特性が大きく変化していることである（SiOH2R $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$: 663/681 nm、TMR $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$: 550/570 nm）。この大きな蛍光特

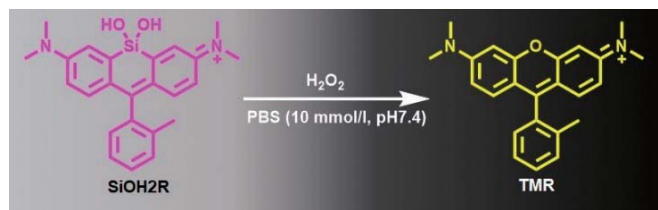


図2 SiOH2Rの過酸化水素検出システム

性の変化により、過酸化水素添加時の蛍光強度比（TMR/SiOH2R）が5000倍と報告され⁴⁾、既存の過酸化水素検出試薬に比べ圧倒的に高感度であり有用である（図3）。

SHP-Mitoと同様、蛍光波長の変化による過酸化水素非存在下時の画像取得の容易さも利点として挙げられる。

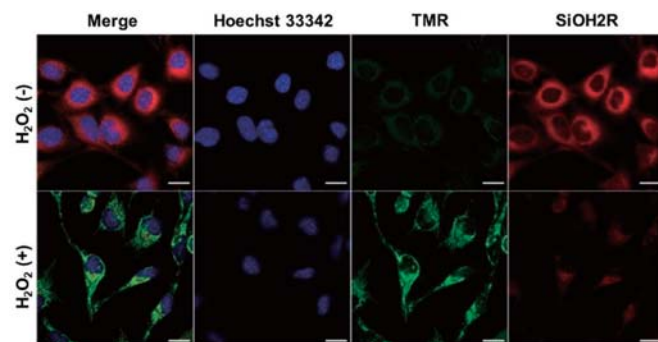


図3 SiOH2Rを用いたHeLa細胞染色画像

酸化ストレス、ミトコンドリア、及び細胞機能は密接な関係があるが、その全容は未だ解明されていない。そのため、より簡便で高感度なミトコンドリア内のROS検出プローブの開発は重要な課題の一つである。蛍光波長変化による検出メカニズムを用いたこれらのROS検出試薬はそれらの条件をクリアする有用なツールであり、化学、生物学、医学などのさまざまな領域での研究をさらに加速させることが期待できる。

【参考文献】

- 1) H. M. McBride *et al.*, "Mitochondria: More Than Just a Powerhouse", *Curr. Biol.*, **2006**, 16, R551.
- 2) L. Xu *et al.*, "Fluorescent probe for the selective detection of chemical species inside mitochondria", *Chem. Commun.*, **2016**, 52, 1094.
- 3) B. R. Cho *et al.*, "A Mitochondria-Localized Two-Photon Fluorescent Probe for Ratiometric Imaging of Hydrogen Peroxide in Live Tissue", *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 3518.
- 4) C. I. Stains *et al.*, "Chemoselective Alteration of Fluorophore Scaffolds as a Strategy for the Development of Ratiometric Chemodosimeters", *Angew. Chem.*, **2017**, 56, 4197.

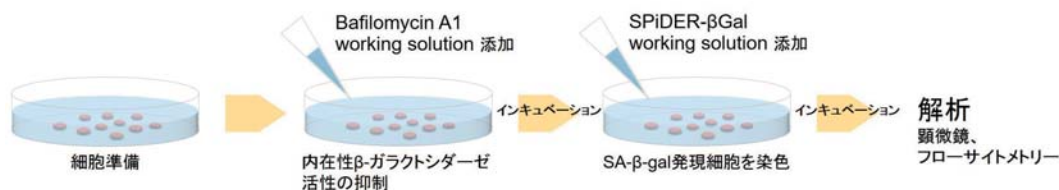
老化細胞検出キット

Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER-β Gal

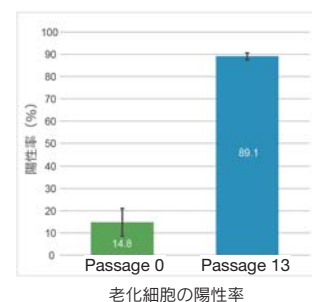
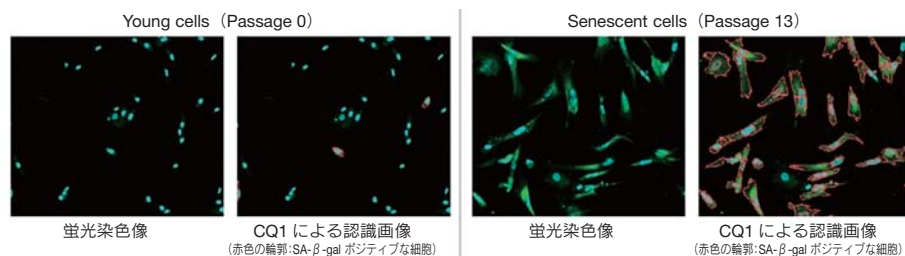
<特長>

- ・ 固定化せず簡単に老化細胞を検出
- ・ 蛍光検出による定量解析が可能
- ・ 固定化細胞を用いた多重染色に適用できる

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。



<老化細胞の陽性率解析>



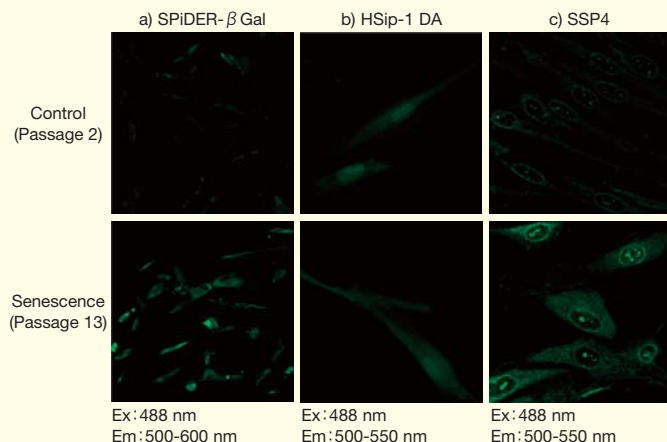
共焦点定量イメージサイトメーターを用いた老化細胞の定量解析
(シアン: Hoechst 33342、緑: SPiDER-β Gal)

継代数の異なる WI-38 細胞を核染色試薬 (Hoechst 33342) で全細胞を染色し、SPiDER-β Gal で SA-β-gal を指標とした老化細胞を染色しました。その後、共焦点定量イメージングサイトメーター (横河電機株式会社 CQ1) を用い、全細胞数に対し、SPiDER-β Gal で染色された老化細胞数の割合を算出し (左図)、陽性率として定量解析を行いました。その結果、継代数の多い WI-38 細胞においては高い陽性率となりました (右図)。

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

老化細胞を用いた硫化水素およびサルフェン硫黄の検出例

本誌のテーマ「生体イオウ」にあわせて、継代数の異なる若い細胞と老化細胞を用いた評価を試してみました。



実験では、老化細胞のモデルとして継代培養を繰り返した WI-38 細胞 (Passage 13) を用い、
a) SPiDER-β Gal による SA-β-gal の検出、
b) HSip-1 DA による硫化水素の検出、
c) SSP4 によるサルフェン硫黄の検出を試みた。

結果、継代培養を繰り返した WI-38 細胞において老化細胞マーカーである SA-β-gal が検出され、さらにサルフェン硫黄の変動が示唆された。一方で、硫化水素の変動は確認できなかった。

サルフェン硫黄をはじめとする活性硫黄種が、細胞老化に対してどのように働いているのか含めて、今後のさらなる研究の進展が期待される。

新製品

乳酸定量キット

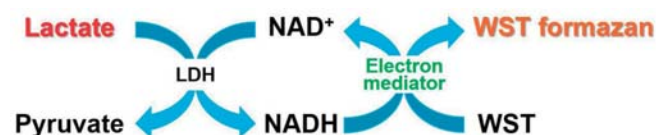
Lactate Assay Kit-WST

<特長>

- ・試薬を加えてインキュベートするだけの簡単操作
- ・試薬が安定だから必要な時にすぐ使える
- ・まずは試したいという要望に応え小容量を用意

本キットは、乳酸量に応じ発色した WST ホルマザンの吸光度を測定することで、細胞培養液や細胞内の乳酸を検出することができます。

<原理>



<操作>

サンプルに試薬を添加しインキュベーションするだけの簡便な操作で乳酸を定量できます。



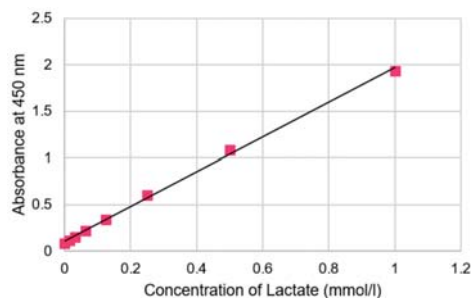
各ウェルに標準液とサンプルを添加

Working solution を各ウェルに添加

37℃で30分インキュベート

< Lactate 検量線の例>

キット添付の標準液で作成した検量線からサンプル中の乳酸濃度を求めることができます。



本キットを用いた検量線の作成例

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Lactate Assay Kit-WST	50 tests	29,000	L256
	200 tests	68,000	

第1回若手ミトコンドリア国際会議

期日：2018年4月20日（金）～22日（日）

会場：ホテルコープイン京都

展示ブースにてお待ちしております。

本学会展示に関する詳細は、後日小社 HP にてご案内致します。

新製品

生細胞・死細胞測定キット

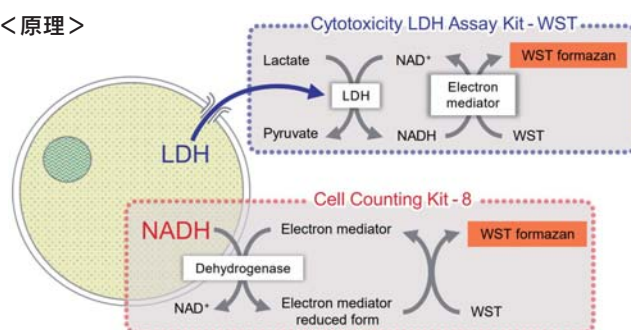
Viability/Cytotoxicity Multiplex Assay Kit

<特長>

- ・生細胞と死細胞をそれぞれ異なる指標で測定
- ・プレートアッセイによる多検体処理に対応
- ・同じ培養細胞を用いて2つの測定ができる

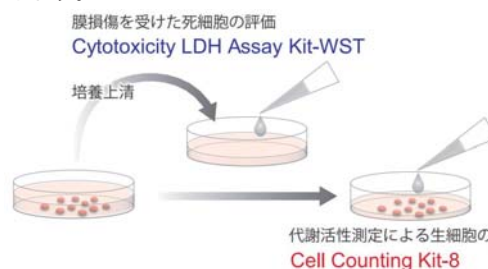
細胞毒性を評価する際、複数の指標を用いて評価することで細胞毒性を総合的に判断するケースが増えてきています。本製品は、生存細胞数を指標とする Cell Counting Kit-8 (CCK-8) と、死細胞数を指標とする Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST (LDH Assay Kit) を組合せたセット品です。

<原理>

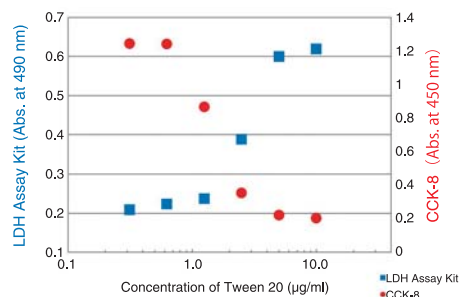


<同じ細胞を用いた評価>

本キット中の CCK-8 と LDH Assay Kit は、何れも同じ測定波長でプレートアッセイができます。また同じ細胞サンプルを使い一度に生細胞と死細胞を評価できるため手間と時間を抑えることができます。



<実験例>



Tween 20 を用いた細胞毒性試験

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Viability/Cytotoxicity Multiplex Assay Kit	500 tests	29,800	CK17

新製品

オートファジー検出蛍光試薬

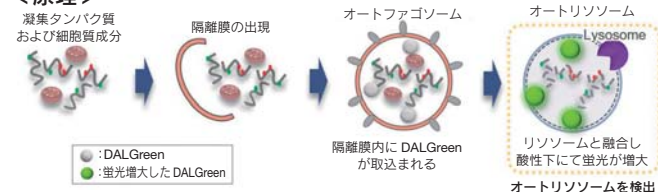
DALGreen - Autophagy Detection

<特長>

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

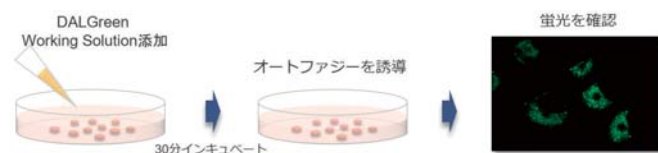
オートファジーは、細胞内の不要なタンパク質・細胞小器官などの再利用や代謝のための分解機構として様々な疾患への関与が示唆されています。DALGreen は試薬を培養細胞に添加するだけで簡単にオートファジーを検出できる蛍光色素です。

<原理>

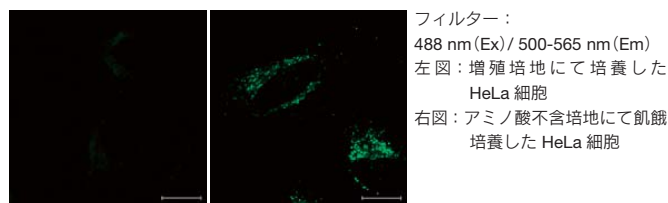


<操作>

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>



DALGreen によるイメージング

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。

最新情報を続々掲載

オートファジーの検出原理を説明した論文が公開

オートファジーの検出原理や LC3 との共染色データ、更には現在開発中のオートファゴソーム染色試薬 DAPGreen に関する情報が掲載されています。詳細は下記論文または小社 HP にてご参照下さい。

H. Iwashita et al., *FEBS Letters*, **2018**, 592 (4), 559-567.

オートファジーのタイムラプス動画を公開

小社 HP または YouTube にてご覧頂けます。

DALGreen

検索

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

新製品

ミトコンドリア内鉄検出蛍光試薬

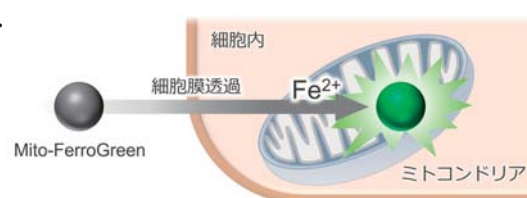
Mito-FerroGreen

<特長>

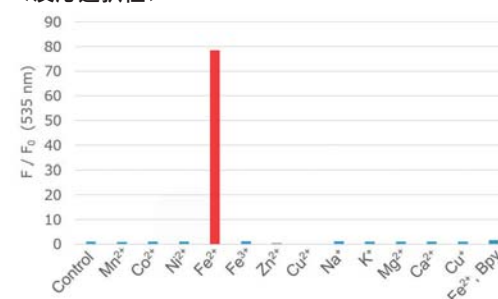
- ・ Fe^{2+} への高い選択性
- ・生細胞中のミトコンドリアに局在する Fe^{2+} を検出
- ・励起波長 505 nm、蛍光波長 535 nm で測定可能

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。

<原理>



<反応選択性>

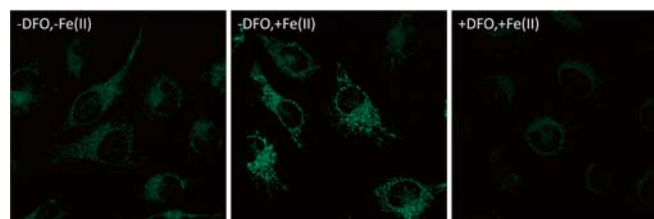


金属種に対する反応選択性

フィルター: 500 nm (Ex) / 535 nm (Em)

50 mmol/l HEPES Buffer (pH 7.4) 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。

<実験例>



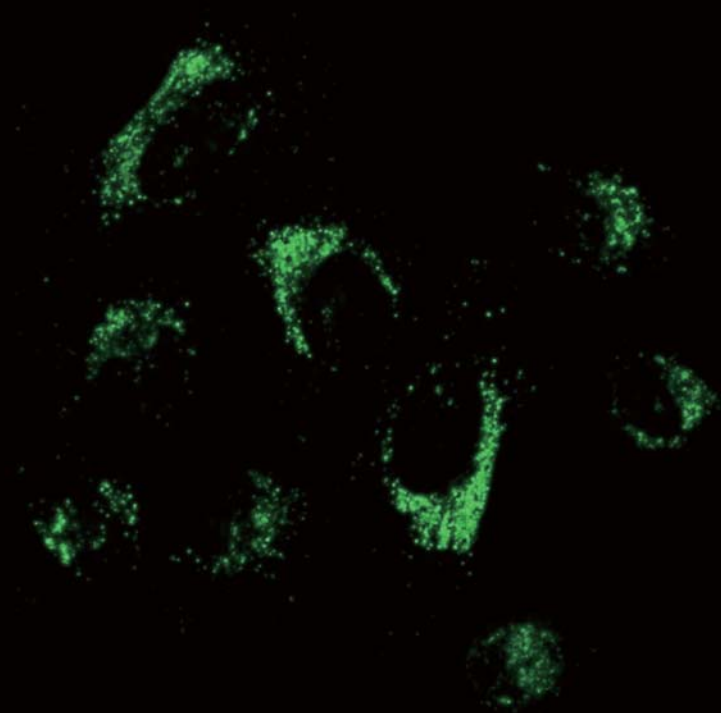
ミトコンドリア内鉄のライブイメージング

フィルター: 488 nm (Ex) / 500-565 nm (Em)

HeLa 細胞に Mito-FerroGreen を添加し、ミトコンドリアに内在する鉄を蛍光にて検出した (左図)。一方、鉄を添加した HeLa 細胞では、Mito-FerroGreen の強い蛍光がみられ (中央図)、鉄キレート試薬 Deferoxamine (DFO) と鉄を添加した細胞では、Mito-FerroGreen の蛍光はほとんど見られなかった (右図)。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Mito-FerroGreen	50 $\mu\text{g} \times 2$	25,000	M489

本製品は、岐阜薬科大学薬化学研究室 永澤秀子先生、平山祐先生のご指導の下、製品化しました。



オートファジーが光る

DALGreen

検索

光るオートファジーを動画で公開中!!



オートファジー検出蛍光試薬

DALGreen - Autophagy Detection

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