

老化・オートファジー

—総説—

活性イオウによる心筋早期老化制御

自然科学研究機構生理学研究所 西村 明幸、西田 基宏

分解標識タンパク質が駆動する ミトコンドリア特異的オートファジー

大阪大学 岡本 浩二

—注目の研究—

オートファジー小胞と不良ミトコンドリアを 可視化する蛍光試薬

株式会社同仁化学研究所 岩下 秀文

新製品

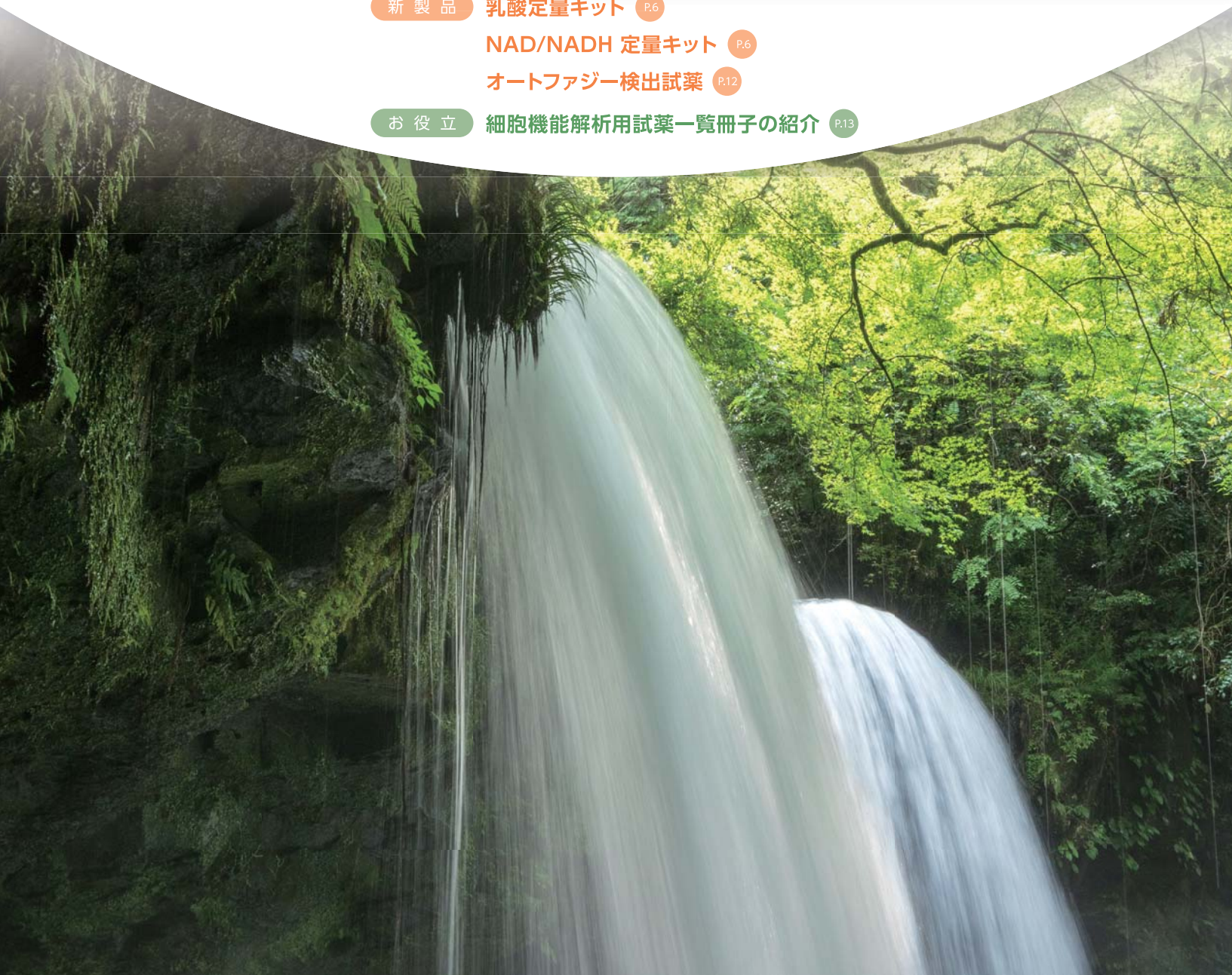
乳酸定量キット P.6

NAD/NADH 定量キット P.6

オートファジー検出試薬 P.12

お役立

細胞機能解析用試薬一覧冊子の紹介 P.13





表紙撮影：熊本県阿蘇郡小国町 鍋ヶ滝
photo：永島俊介氏

CONTENTS

Review

活性イオウによる心筋早期老化制御 ●———— [1]

自然科学研究機構生理学研究所

西村 明幸、西田 基宏

分解標識タンパク質が駆動する ●———— [7]

ミトコンドリア特異的オートファジー

大阪大学 岡本 浩二

Topics on Chemistry

オートファジー小胞と不良ミトコンドリアを
可視化する蛍光試薬 ●———— [10]

株式会社同仁化学研究所 岩下 秀文

Commercial

老化細胞検出キット ●———— [5]

—関連研究の紹介— ●———— [6]

ミトコンドリア機能不全による老化の誘導

マイトファジー検出キット ●———— [11]

新製品

乳酸定量キット ●———— [6]

NAD/NADH 定量キット ●———— [6]

オートファジー検出試薬 ●———— [12]

お知らせ

細胞機能解析用試薬（オートファジー・細胞老化・ミトコンドリア・細胞増殖／細胞
毒性）一覧冊子のお知らせ ●———— [13]

活性イオウによる心筋早期老化制御

Regulation of Cardiac Early Senescence by Reactive Sulfide Species



西村 明幸

自然科学研究機構生理学研究所
(生命創成探究センター)
心循環シグナル研究部門
特任助教



西田 基宏

自然科学研究機構生理学研究所
(生命創成探究センター)
心循環シグナル研究部門
教授

Abstract

Aging is the immortal risk factors for most human diseases, and characterized by a progressive loss of the ability of the organism to cope with stressors and to repair tissue damage. Transfiguration of a reduction/oxidation (redox) balance regulated by enzymes for production, elimination and metabolism of electrophilic substances (electrophiles) is believed as one of key mechanisms underlying cardiovascular early senescence. Electrophilic signaling is mainly regulated by endogenous electrophiles that are generated from reactive oxygen species, nitric oxide, and the derivative reactive species of nitric oxide during stress responses, as well as by exogenous electrophiles including compounds in foods and environmental pollutants. We found that an endogenous electrophile, 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate (8-nitro-cGMP), induces H-Ras-mediated cardiac early senescence through covalent modification (S-guanylation) of H-Ras. Reactive sulfide species (RSS) such as cysteine persulfides and polysulfides that are endogenously produced in cells are likely to be involved in 8-nitro-cGMP metabolism, while accumulation of RSS is also revealed to induce cardiomyocyte injury through mitochondrial hyperfission. In this review, we introduce recent understanding on the mechanism of cell senescence caused by redox imbalance in rodent heart, including suggestions for a new therapeutic strategy for cardiovascular disease.

1. はじめに

超高齢化が進む現代社会において、老化はあらゆる疾患の主要なリスク因子であり、細胞・組織の老化をいち早く診断し、進行を遅らせる革新的な医療技術を開発することが健康長寿社会の実現に必要なと考えられている。心臓においても、心筋梗塞後における心筋細胞の早期老化が心機能の低下（心不全）や不整脈の発生、ひいては突然死の原因になることが示唆されている。一般的に、①がん遺伝子産物の恒常的活性化、②核酸損傷、③酸化ストレスの3つが全ての細胞老化に共通する仲介要因と考えられている。我々は活性酸素によるヌクレオチド損傷の結果として細胞内で形成される親電子物質 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate (8-nitro-cGMP) が慢性心不全モデルマウスの心臓で多く蓄積することに注目し、8-nitro-cGMP によるがん遺伝子産物 H-Ras の親電子修飾（S-グアニル化）を介した H-Ras の恒常的活性化が心筋細胞の早期老化を誘導することを最初に報告した¹⁾。一方、8-nitro-cGMP の代謝系として注目したのが硫化水素アニオン ($\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$) である。 $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$ は親電子物質の標的となるシステイン (Cys) の SH (S^-) 基と化学構造的に類似しており、NaHS 処置により 8-nitro-cGMP を介した心筋細胞老化が抑制されたことから、 $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$ が親電子物質の代謝・解毒に関わる内因性求核物質だと予想された。しかし、試験管レベルで 8-nitro-cGMP は NaHS や Cys-SH 基と直接反応しなかったことから、NaHS がより求核性の高い内因性物質を生成する基質として働く可能性が示された。その後、Cys-SH 基にイオウが複数付加した Cys パースルフィド (CysSSH) や Cys ポリスルフィド (CysSS_nH) が親電子物質と直接反応し、その代謝・解毒に働く求核分子

実体（活性イオウ）であることが明らかにされた²⁾。こうした知見の積み重ねから、心臓での活性イオウ蓄積が心不全治療の新たな戦略になると期待した。ところが、心筋梗塞後の早期老化心筋細胞では活性イオウが多く蓄積していることが明らかとなり、親電子物質のみならず、活性イオウの蓄積もまた心筋老化誘導に関わる可能性が見えてきた。本稿では、親電子/求核バランスの破綻により生じる心筋細胞老化の分子機構とその病態生理的意義について、イオウ代謝制御の視点から概説する。

2. 心筋早期老化のレドックス制御

培養細胞には「ヘイフリック限界³⁾」と呼ばれる分裂回数の制限があり、細胞老化とは、狭義には細胞分裂（増殖）できなくなった状態が不可逆的に起こっている状態を指す。この原因として、染色体の末端保護に働くと考えられているテロメアの短縮やそれに伴う DNA 損傷、ミトコンドリア局在型スーパーオキシドジスムターゼ (SOD2) の発現低下による酸化ストレス増加、がん遺伝子産物の活性化などが指摘されている。がん細胞ではテロメア合成酵素（テロメラーゼ）が活性化状態にあるためテロメアが安定化し、老化が起こりにくいとされている。個体の老化と細胞老化との関連については議論が続くものの、加齢に伴って増える老化細胞が体内に比較的長く存在し続けること、老化細胞から炎症性サイトカインなどが分泌されることから、加齢により蓄積される老化細胞が組織や個体の機能低下を引き起こす誘因となると考えられている。

細胞老化を検出する最も簡便な評価法として、老化関連 β ガラクトシダーゼ (SA- β -gal) 染色が知られている。SA- β -gal 染色

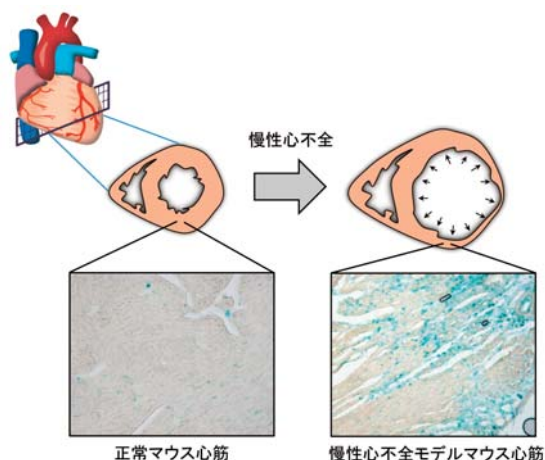


図1 心筋組織の老化

正常マウスと慢性心不全モデルマウス由来の心臓組織切片を SA-β-gal で染色した。慢性心不全モデルマウスの心臓で SA-β-gal 陽性心筋細胞数の増加が認められた。

は様々なストレスによりリソソームベータガラクトシダーゼの発現が数倍程度増加することで陽性反応を示すため、必ずしも細胞老化に特異的というわけではないものの、形態変化（細胞の平坦化やヘテロクロマチン構造（SAHF）や p53、Rb タンパク質などの発現増加といった詳細な解析を行う前段階評価として広く受け入れられている。我々はストレス誘発性の慢性心不全モデルマウスの心臓組織において、SA-β-gal 陽性の正常心筋細胞数が有意に増加していることを見出した（図1）。この老化心筋組織では活性酸素（reactive oxygen species: ROS）や活性窒素種（reactive nitrogen species: RNS）と細胞内グアニンヌクレオチドとの反応により生成する 8-nitro-cGMP が多く生成されており、我々は 8-nitro-cGMP によるがん遺伝子産物 H-Ras の酸化的機能修飾が心筋早期老化を誘導する原因となることを明らかにした。この知見は、ストレス曝露された組織における親電子物質の蓄積が細胞早期老化を誘導する一要因となることを強く示唆している。

3. 活性イオウの生成・代謝とレドックスシグナル制御

含硫アミノ酸であるシステイン（Cys）は、タンパク質を構成するアミノ酸の中でも特に求核性が高く、環境中や生体内で生成される親電子物質の良い標的となる。ヒトゲノムには約 214,000 個もの Cys がコードされており、そのうち 10-20% 程度がレドックス活性の高い Cys（生理的 pH の状態でプロトンが解離したチオール基）をもつと考えられている⁴⁾。環境中に存在する多くの化学物質は、ROS や RNS および ROS/RNS 由来の内因性親電子物質と同様、分子内に存在するレドックスアクティブな Cys をもつタンパク質（センサータンパク質）を標的とし、これと化学的に共有結合することで、センサータンパク質の構造や機能（例えば酵素活性など）を変化させ、下流のシグナル伝達経路に影響を与える^{5, 6)}。ROS や RNS によるタンパク質の翻訳後修飾が可逆的なものに対し、親電子物質はタンパク質と安定した共有（C-S）結合を形成することで、不可逆的な翻訳後修飾を起こす。タンパク質修飾の可逆性が下流へのシグナル伝達の持続性を制御することを考えると、こうした環境内外の親電子物質の複合曝露により誘発

されるタンパク質の不可逆的な機能修飾が、疾患発症リスクを高める原因となることが想定される。

親電子物質の代謝・消去を担う内因性求核物質として注目されてきたのが RSS である。猛毒ガスとして知られる硫化水素（H₂S）は求核性の高いイオウ原子を含んでおり、血管拡張作用や心拍数低下（人工冬眠誘導）、海馬の記憶増強など多彩な薬理作用を示す⁷⁾。最近では、H₂S が食事制限によるストレス抵抗性獲得や延命効果⁸⁾、虚血後の血管内皮細胞増殖因子産生を介した末梢血管新生⁹⁾、およびサーチュイン脱アシル化酵素（SIRT1）を介した末梢血管の流動性やずり応力抵抗性の維持にも関わっており、内皮細胞における H₂S の産生低下が血管老化の原因となることが報告されている¹⁰⁾。このような経緯から、H₂S が一酸化窒素や一酸化炭素に続く第三のガス状シグナル仲介分子だとする荒っぽい考え方も出てきた。しかし、H₂S が老化を制御する分子メカニズムは正直よくわかっていない。H₂S の酸解離定数（pK_a）は 6.76 と低く、生理的 pH（7.4 付近）の溶液中では H₂S の 80% が硫化水素アニオン（HS⁻）の状態が存在する。ところが、HS⁻ は試験管内で 8-nitro-cGMP などの弱い親電子物質とは直接反応せず、遷移金属を触媒として共存させた場合のみ HS⁻ の求核置換代謝物（8-SH-cGMP）を生成する。細胞内 8-nitro-cGMP の消去にも 24 時間前から NaHS を処置する必要があることから、H₂S/HS⁻ は細胞内でより求核性の高い RSS 実体を作るための「基質」として働く可能性が考えられる。加えて、H₂S/HS⁻ 生成酵素だと信じられてきたシスタチオニンβシンターゼ（CBS）やシスタチオニンγリアーゼ（CSE）がシスチンを基質に Cys パースルフィド（Cys-SSH）を生成することが明らかにされ、CysSSH を含むタンパク質ポリスルフィドが親電子物質の直接的な代謝・消去を担う RSS であることが示された²⁾。実際、RSS と選択的に反応する monobromobimane を用いたアダクトーム解析から、マウス心臓に CysSSH やグルタチオンパースルフィド（GSSH）が数 μM レベル存在することも明らかになってきた。ところが、げっ歯類の心臓には CBS や CSE タンパク質がほとんど発現していないことがわかり、別の RSS 生成経路（酵素）が存在する可能性が見えてきた。我々は赤池・熊谷グループらと連携し、哺乳類の細胞内ミトコンドリアに局在する cysteinyl-tRNA synthetase（CARS2）が RSS の主たる生成酵素であることを見出した¹¹⁾。CARS2 は心臓だけでなく組織普遍的に発現しており、CysSH を基質として CysSSH を生成する主要酵素であることがわかってきた（図2）。

4. 活性イオウによるミトコンドリア品質管理制御

細胞老化のもう一つの原因として、ミトコンドリア品質管理異常が指摘されている¹²⁾。CARS2 欠損 HEK293T 細胞株を用いて形態機能を解析した結果、野生型細胞株と比べて CARS2 欠損細胞ではミトコンドリア面積および数の減少と、それに伴う膜電位や酸素消費速度の低下が観察された¹¹⁾。ミトコンドリアの品質管理は分裂と融合のサイクルによって制御されており、分裂・融合ともにレドックス感受性をもつ GTP 結合タンパク質（G タンパク質）により厳密に活性調節されている。ミトコンドリア分裂はダイナミン様 G タンパク質 dynamin-related protein 1（Drp1）によつて的確に制御されており、ヒトおよびマウスの Drp1 タンパク質は NO により C 末端の Cys-644 残基を介して 2 量体化することで活性化されることが報告されている¹³⁾。我々はラット Drp1 タンパク質を用いて、ヒト・マウス Drp1 の Cys-644 に相当する Cys-

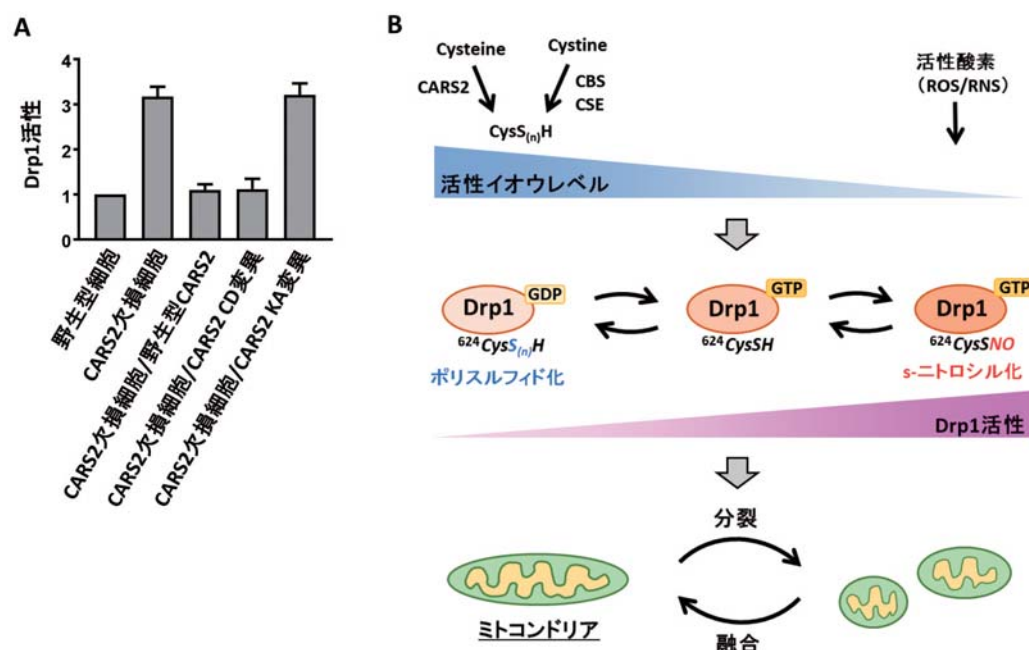


図 2 活性イオンによる Drp1 の活性制御

A: CARS2 欠損 293T 細胞では Drp1 の活性が上昇していた。この欠損細胞に野生型 CARS2 もしくは Zn^{2+} 結合欠損 (CD) 変異体をレスキューすると Drp1 活性は野生型細胞レベルまで低下するのに対して、PI-P 結合欠損 (KA) 変異体のレスキューは Drp1 活性を低下させなかった。

B: 活性イオウによるDrp1活性制御の概略図。Drp1活性はCys-624のポリスルフィド化によって低く保たれている。親電子物質がCys-624を脱イオウ化することでDrp1活性を上昇させる。脱イオウ化されたCys-624はNOが付加することで二量体形成し、さらにDrp1活性を上昇させる。

624のSH基がポリイオウ化されていることを明らかにした。CARS2欠損細胞ではDrp1のポリイオウ化レベルが著しく低下していた。CARS2欠損細胞に野生型CARS2を発現させるとミトコンドリア分裂とDrp1活性化が顕著に抑制され、これに伴って膜電位や酸素消費速度の低下も回復した。CARS2のtRNA合成酵素活性だけを阻害した変異体(CD)を発現させても同様の回復効果が認められたのに対し、CARS2のパースルフィド生成活性に必要なpyridoxal phosphate (PLP) 結合部位のリジンを置換した変異体(KA)を発現させてもミトコンドリア分裂抑制効果は認められなかった。以上の結果より、ミトコンドリア品質管理を制御するDrp1が活性イオウにより活性調節されていることが明らかとなった(図2)。これまでGタンパク質の活性は、GTP/GDP exchange factor (GEF)とGTPase activating protein (GAP)のバランスでのみ厳密に制御されるものと信じられてきた。本知見は、Gタンパク質Drp1の活性がCysのポリイオウ化レベルによって調節されるという全く新しい概念を提唱するものである。一方、ミトコンドリア融合促進Gタンパク質であるMfn1, Mfn2, Opa1では顕著なポリイオウ化シグナルが観察されず、CARS2欠損細胞との違いも認められなかった。タンパク質によって定常状態のポリイオウ化レベルが異なることを考えると、Mfn1, Mfn2, Opa1などのタンパク質Cysポリイオウ鎖は、翻訳後速やかに脱イオウ化されている可能性が考えられる。

5. 還元ストレスと心筋老化

好気性生物は様々な ROS/RNS 消去酵素システムや低分子の抗酸化物質を備えている。例えば、親電子物質により Keap1/Nrf2 システムが活性化されると、ヘムオキシナーゼ-1 (HO-1) やグル

タチオン S- トランスフェラーゼ (GST)、チオレドキシン (Trx) /Trx 還元酵素 (TR)、グルタチオン (GSH) や GSH 還元酵素 (GR) といった還元物質の発現が誘導される。しかし、慢性的な親電子物質曝露によって還元物質の発現誘導が続くと、今度は逆に還元型 GSH や NADPH 量が増加し、還元ストレスが誘発される。Rajasekaran らは、ヒト α B クリスタリン変異発現マウスが酸化的還元ストレスを誘発し、タンパク質凝集型の心筋症を呈することを実証することで、還元ストレスという概念を提唱した¹⁴⁾。Keap1/Nrf2 システムは環境ストレスに対する生体防御システムとして非常に重要な役割を果たしており、Nrf2 欠損マウスが酸化ストレスに対して脆弱性を示すことが報告されている¹⁵⁾。しかしその一方で、Nrf2 の持続的活性化が還元ストレスを誘発し、結果的に ROS 生成も増加し、心筋症を呈することも報告されている¹⁶⁾。Nrf2 の活性化は HO-1 の発現を増加するが、HO-1 は酸素を使ってヘムの分解を促進する酵素であり、結果としてビリベルジン、一酸化炭素、遊離 Fe^{2+} を生成する。 Fe^{2+} 供給は鉄欠乏の慢性心不全患者に対して有効と考えられていたが、最近では逆にミトコンドリアの遊離 Fe^{2+} 量を減らすことが心臓の治療に有効であることも臨床研究から明らかにされており¹⁷⁾、HO-1 による遊離 Fe^{2+} 量の増加がミトコンドリア鉄過負荷を介して還元ストレス誘発性心機能障害を誘発している可能性も考えられる。

我々は最近、心筋梗塞後のマウス心臓において、特に梗塞周辺領域において活性イオウ(sulfane sulfur)が蓄積しており、これに伴って心筋早期老化が誘導されていることを見出している。SA-β-gal 陽性心筋細胞ではミトコンドリアが過剰に分裂しているものの、Drp1 の GTP 結合活性は増加しておらず、むしろ Drp1 タンパク質が多量体化(凝集体)を形成していることがわかってきた。

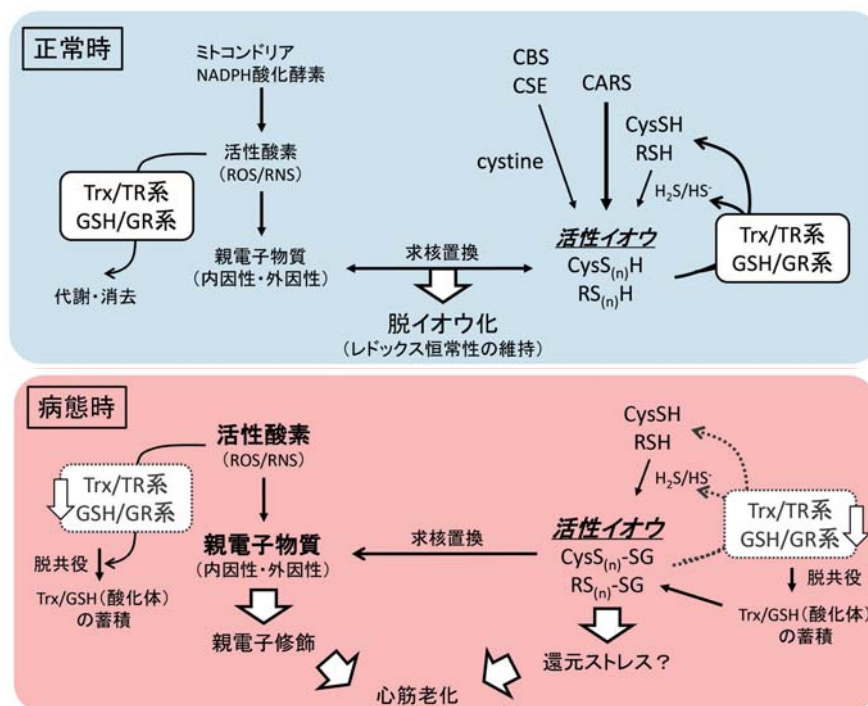


図3 活性イオウによる還元ストレスの概略図

正常時、活性酸素や活性イオウはTrx-TR系やGSH-GR系の働きによって代謝されることで一定レベルに保たれている。病態時にはTrx-TRやGSH-GRの共役が低下し、親電子物質の産生が亢進する。親電子物質はH-Rasタンパク質の機能修飾を介した心筋老化を誘導する。Trx-TR・GSH-GR共役系は活性イオウの還元（脱イオウ化）にも関与することから、その機能低下は活性イオウの蓄積も引き起こす。脱共役により代償的に増加したTrxやGSHは、ROSにより酸化されることで蓄積した活性イオウと反応（ポリスルフィド化修飾）する。これら安定なポリスルフィド化合物の蓄積が還元ストレスとなって心筋老化を誘導すると考えられる。

Drp1 多量体化は還元剤処置により消失することから、Cys ジスルフィド（またはポリスルフィド）重合を介した反応であると考えられる。心筋細胞のDrp1 多量体化を模倣するためには、低酸素ストレスだけでなく、RSS 蓄積も必要であることがわかってきた。RSS の還元反応（脱イオウ化）はTrx やGSH系を介して起こることが報告されている¹⁸⁾。これらの知見をまとめると、還元ストレスとは（低酸素ストレスなどの曝露により）Trx/TR系やGSH/GR系で代謝還元できなくなったRSSが蓄積した状態を意味するのかもしれない（図3）。

6. 終わりに

超高齢化社会が始まりつつある現代において、環境リスクの定量技術開発や健康長寿のための医療技術開発は必要不可欠であり、活性イオウ研究がこの問題を解決する新しい学問分野となることは間違いない。RSSあるいは環境親電子物質とRSSとの反応代謝物が、ヒトの細胞・組織老化や加齢性疾患リスクを予測する新たな指標となる可能性が示されてきた。また、タンパク質中に含まれるRSSが、タンパク質自身の品質も管理することで、その酵素活性や下流エフェクター分子との相互作用を制御しうることもわかってきた。RSSとその生成・代謝系の発見は東北大学・赤池孝章教授をはじめとした日本人研究者の貢献が大きく、今後わが国を中心に益々発展していく研究分野になるだろう。

【参考文献】

- 1) M. Nishida, T. Sawa, N. Kitajima *et al.*, "Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulfhydration", *Nat. Chem. Biol.*, **2012**, 8, 714-724.
- 2) T. Ida, T. Sawa, H. Ihara *et al.*, "Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling", *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **2014**, 111, 7606-7611.
- 3) L. Hayflick, "The serial cultivation of human diploid cell strains", *Exp. Cell Res.*, **1961**, 585-621.
- 4) D. P. Jones, "Redox theory of aging", *Redox Biol.*, **2015**, 5, 71-79.
- 5) M. Nishida, A. Nishimura, T. Matsunaga *et al.*, "Redox regulation of electrophilic signaling by reactive persulfides in cardiac cells", *Free Radic. Biol. Med.*, **2017**, 109, 132-140.
- 6) M. Nishida, T. Toyama and T. Akaïke, "Role of 8-nitro-cGMP and its redox regulation in cardiovascular electrophilic signaling", *J. Mol. Cell Cardiol.*, **2014**, 73, 10-17.
- 7) B. D. Paul and S. H. Snyder, "H₂S signalling through protein sulphydration and beyond", *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2012**, 13, 499-507.
- 8) C. Hine, E. Harputlugil, Y. Zhang *et al.*, "Endogenous hydrogen sulfide production is essential for dietary restriction benefits", *Cell*, **2015**, 160, 132-144.
- 9) A. Longchamp, T. Mirabella, A. Arduini *et al.*, "Amino acid restriction triggers angiogenesis via GCN2/ATF4 regulation of VEGF and H₂S production" *Cell*, **2018**, 173, 117-129.
- 10) A. Das, G. X. Huang and M. S. Bonkowski *et al.*, "Impairment of an endothelial NAD⁺-H₂S signaling network is a reversible cause of vascular aging", *Cell*, **2018**, 173, 74-89.
- 11) T. Akaïke, T. Ida, F. Y. Wei, M. Nishida *et al.*, "CysteinyI-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics", *Nat.*

- Commun., **2017**, 8, 1177.
- 12) D. H. Cho, T. Nakamura, J. Fang *et al.*, "S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury", *Science*, **2009**, 324, 102-105.
- 13) M. Song and G. W. II Dorn, "Mitoconfusion: noncanonical functioning of dynamism factors in static mitochondria of the heart", *Cell Metab.*, **2015**, 21, 195-205.
- 14) N. S. Rajasekaran *et al.*, "Human alpha B-crystallin mutation causes oxido-reductive stress and protein aggregation cardiomyopathy in mice", *Cell*, **2007**, 130, 427-439.
- 15) J. Li *et al.*, "Nrf2 protects against maladaptive cardiac responses to hemodynamic stress", *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **2009**, 29, 1843-1850.
- 16) N. S. Rajasekaran *et al.*, "Sustained activation of nuclear erythroid 2-related factor 2/antioxidant response element signaling promotes reductive stress in the human mutant protein aggregation cardiomyopathy in mice", *Antioxid. Redox Signal.*, **2011**, 14, 957-971.
- 17) H. C. Chang *et al.*, "Getting to the heart of cardiac disease by decreasing mitochondrial iron" *Circ. Res.*, **2016**, 119, 1164-1166.
- 18) É. Dóka, I. Pader, A. Biro *et al.*, "A novel persulfide detection method reveals protein persulfide- and polysulfide-reducing functions of thioredoxin and glutathione systems", *Sci. Adv.*, **2016**, 2: e1500968.

[著者プロフィール]

氏名：西村 明幸 (Akiyuki Nishimura)

所属：自然科学研究機構生理学研究所

(生命創成探究センター)

心循環シグナル研究部門

総合研究大学院大学・生理科学専攻

連絡先：〒444-8787 愛知県岡崎市明大寺町東山 5-1

Tel&Fax：0564-59-5563

E-mail：aki@nips.ac.jp

現在の研究テーマ：G 蛋白質、レドックスシグナル

氏名：西田 基宏 (Motohiro Nishida)

所属：自然科学研究機構生理学研究所

(生命創成探究センター)

心循環シグナル研究部門

九州大学大学院薬学研究院・創薬育薬研究施設統括室

総合研究大学院大学・生理科学専攻

連絡先：〒444-8787 愛知県岡崎市明大寺町東山 5-1

Tel&Fax：0564-59-5560

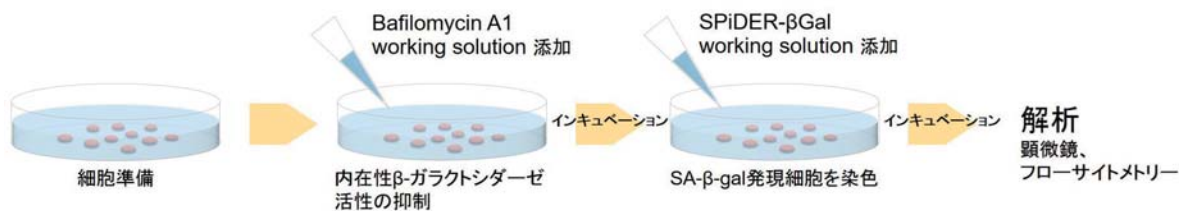
E-mail：nishida@nips.ac.jp

現在の研究テーマ：環境レセプトーム、心循環ダイナミズム

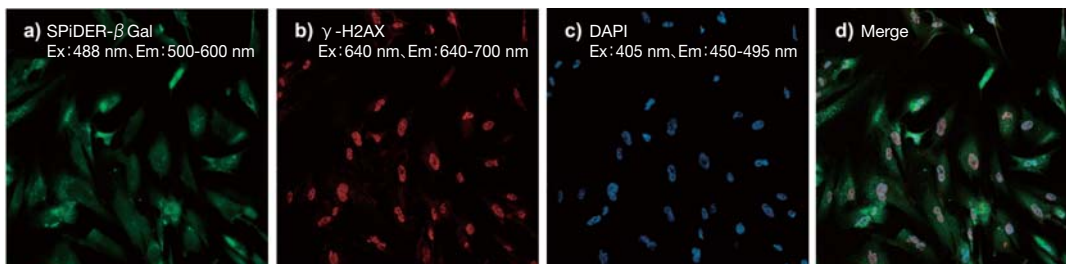
老化細胞検出キット

Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER-β Gal

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。



＜多重染色例－異なる老化マーカーとの共染色＞



上記実験では、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 10) を用い、本キットによる a) SA-β-gal の検出、b) γ-H2AX (DNA 損傷マーカー)、c) 更に全細胞の核染色 (DAPI) を行い、SA-β-gal と γ-H2AX で同様に発現の亢進が見られました。

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

— 関連研究の紹介 —

ミトコンドリア機能不全による老化の誘導



加齢や有糸分裂などによりミトコンドリア機能が低下し、細胞老化を引き起こす MiDAS (Mitochondrial Dysfunction-Associated Senescence) について、2016 年 Wiley らが報告をしている。細胞内代謝を理解する上で重要な補酵素 NAD^+/NADH の比が減少することで MiDAS が誘導される。この NAD^+/NADH 比の減少は AMPK (AMP-activated protein kinase) を介した p53 のリン酸化と細胞周期の停止に密接に関係し、更に MiDAS が IL-1 関連因子を欠損した SASP (Senescence-associated secretory phenotype) を誘導することも明らかにしている。この様に、ミトコンドリア機能と細胞内の代謝は密接に関与しており、細胞内代謝の変化が引き金となり、細胞老化を始め様々な疾患等への関与が明らかにされてきている。

C. Wiley, M. Velarde, P. Lecot, S. Liu, E. Sarnoski, A. Freund, K. Shirakawa, H. Lim, S. Davis, A. Ramanathan, A. Gerencser, E. Verdin and J. Campisi, "Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype", *Cell Metab.*, **2016**, 23 (2), 303.

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
- ・ 試薬の安定性が高いため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

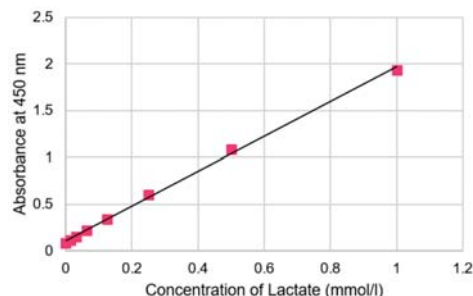
本キットは、サンプルに試薬を添加しインキュベートするだけの簡単操作で乳酸を定量できます。



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分間インキュベート



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	

新製品

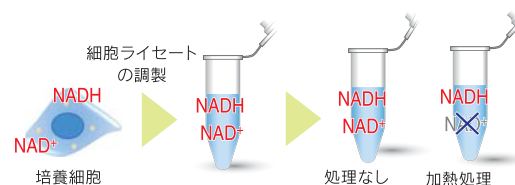
NAD/NADH 定量キット

NAD/NADH Assay Kit-WST

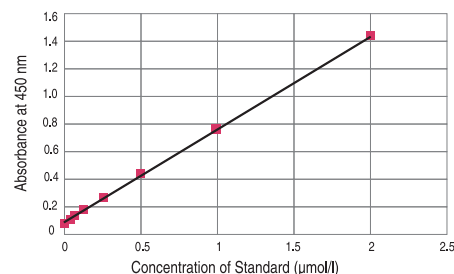
<特長>

- ・ NAD^+ と NADH の量と比が分かる
- ・ 96 ウェルプレートによる吸光度測定
- ・ 同梱の除タンパク質用チューブでサンプル調製が簡単

本キット同梱の抽出バッファーと除タンパク質用チューブで細胞ライセートを調製後、加熱処理の有無で NADH 量と総 NAD^+/NADH 量を測り分けることができます。



NAD^+ と NADH の測り分け操作



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
NAD/NADH Assay Kit-WST	100 tests	54,000	N509

分解標識タンパク質が駆動するミトコンドリア特異的オートファジー

Mitochondria-specific autophagy driven by proteins acting as degradation tags



岡本 浩二

大阪大学
大学院生命機能研究科
准教授

Abstract

Selective clearance of excess or unhealthy mitochondria is a fundamental process conserved from yeast to humans, contributing to mitochondrial quantity and quality control. This catabolic event primarily depends on autophagy, a cellular self-eating pathway that mediates transport of cytoplasmic components to lysosomes for degradation and is thus called mitophagy. Defects in mitophagy are thought to be associated with a myriad of disorders such as mitochondrial malfunction, heart/liver failure, neurodegeneration, aging, and cancer, underscoring the physiological relevance. In the last decade, numerous studies have demonstrated that specific proteins on the surface of mitochondria serve as receptors for Atg8 family members, ubiquitin-like modifier covalently conjugated to the phospholipid phosphatidylethanolamine and localized on the autophagosomal membranes, thereby promoting formation of autophagosomes surrounding mitochondria. During prolonged respiratory growth, the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* undergoes drastic mitophagy via Atg32, a mitochondrial outer membrane acting as a receptor for Atg8. In addition, Atg32 interacts with Atg11, a scaffolding protein that mediates assembly of core Atg proteins essential for autophagosome formation. Through these protein-protein interactions, Atg32 recruits the autophagy machinery to the mitochondrial surface and selectively facilitates sequestration of mitochondria into autophagosomes. Notably, basic principles underlying Atg32-driven mitophagy are shared with mammalian receptors, further highlighting the biological significance.

1. はじめに

ミトコンドリアはATP産生を担う真核細胞の主要な細胞小器官（オルガネラ）であり、細胞のエネルギー需要に応じてその量が適切に調節されている。例えば、活発に増殖している対数増殖期の細胞ではエネルギー需要が高いため、ミトコンドリアの活性が上昇するとともに量も増える。一方、細胞が増殖を停止して静止期に入るとエネルギー需要も低くなるので、ミトコンドリアが余剰となる。また、電子伝達系で生じる副産物としての活性酸素種（ROS）は酸化ストレスとなり、ミトコンドリアに障害を与えて機能不全を引き起こす。そのため細胞には、余剰または損傷ミトコンドリアを丸ごと隔離・除去することで、ミトコンドリアの量や品質を管理する機構が備わっていることが、近年の研究で明らかとなってきた¹⁾。この仕組みは、細胞の自食作用「オートファジー」を利用することから、「マイトファジー」(mitophagy, mitochondria autophagy)と呼ばれ、最近にわかに注目されている。

オートファジーは、細胞内の構成成分を非選択的かつ大規模に分解する経路であり、酵母からヒトまで保存された基本的な仕組みである²⁾。最も典型的な例として、栄養飢餓誘導型オートファジーがよく知られている。細胞が窒素源飢餓などに曝されると、細胞内に隔離膜と呼ばれる2重膜でできた扁平な構造体が出現し、これがタンパク質やオルガネラを取り囲んでゆく。成長した隔離

膜はやがて袋状となり、オートファゴソームが完成する。オートファゴソームはリソソーム（酵母や植物では液胞）と融合し、リソソームから供給されるタンパク質・脂質・核酸などの分解酵素によって速やかに分解される。タンパク質の細胞内分解においては、ユビキチン・プロテアソーム系も大きな役割を果たしているが、オルガネラのような巨大な構造体を丸ごと隔離・除去できるシステムは、オートファジーしか知られていない。重要なことに、オートファジーの仕組みは非選択的なバルク分解だけでなく、特定のタンパク質やオルガネラのみを隔離・除去する役割も果たしていることがわかってきた³⁾。後者は選択的オートファジーと呼ばれ、マイトファジーもその一つである。

筆者らのグループは、単細胞のモデル生物である出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用い、呼吸増殖後の静止期の細胞内でマイトファジーが劇的に誘導されることを見出した⁴⁾。さらに別のグループと同時かつ独立に、マイトファジーに特異的かつ必須なタンパク質 Atg32 を同定し^{4), 5)}、その分子機能を明らかにするとともに、マイトファジーの選択性を規定する仕組みの一端を世界に先駆けて解明するに至った。その後の研究成果により、Atg32と同様の機能をもつ哺乳類マイトファジー駆動因子が次々に報告され、オートファジーに必須なユビキチン様タンパク質 Atg8の受容体が分解標識タンパク質として働くという、生物種を超えて保存された共通原理が明らかになってきた。また、最近の

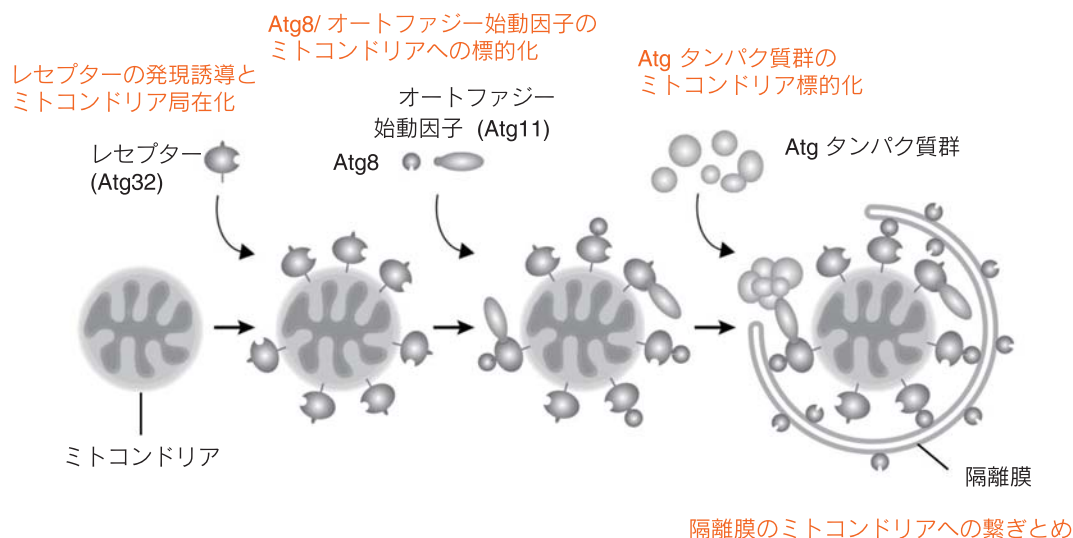


図1 Atg32 が駆動するミトコンドリア隔離の仕組み

研究から、マイトファジーの生理機能と病態発症のリンクが示唆されており、その生物学的意義に大きな関心が集まっている⁶⁾。本稿では、筆者らの研究成果を中心に、これまでに明らかになった分解標識タンパク質駆動型マイトファジーの分子機構について概説する。

2. 酵母マイトファジーを駆動する分解標識タンパク質

出芽酵母のミトコンドリア特異的オートファジーに必須な因子 Atg32 は、細胞が非発酵性の炭素源を含む培地で増殖する際、発現が強く誘導される。この培養条件では、ミトコンドリアでの ATP 合成が酵母の生存に必須であり、活発な呼吸によって ROS レベルが上昇する。同時に、細胞内の還元型グルタチオン量が減少し、これが引き金となって ATG32 遺伝子の転写誘導が起ると考えられる⁷⁾。合成された Atg32 タンパク質はミトコンドリア表面に標的化・膜挿入されるとともに、直接的な結合により Atg8 をミトコンドリアにリクルートする(図1)。Atg8 ファミリータンパク質は生物種を超えて保存されているオートファジーの「実働因子」であり、リン脂質ホスファチジルエタノールアミンに共有結合して隔離膜に局在する⁸⁾。このため、Atg32-Atg8 相互作用は隔離膜形成をミトコンドリア表面へ限局させるのに寄与していると考えられる⁹⁾。なお、Atg32 の N 末端側ドメインには、Atg8 の結合部位として機能するモチーフがあり⁴⁾、AIM (Atg8-family interacting motif) あるいは LIR (LC3-interacting region) と呼ばれる。

重要なことに、Atg8 との結合だけでなく、Atg32 は別のオートファジー関連タンパク質 Atg11 と直接相互作用する(図1)⁴⁾・⁵⁾。Atg11 は選択的オートファジーのための隔離膜形成に必須な Atg タンパク質の分子集合の足場として機能するオートファジーの「始動因子」であり¹⁰⁾、Atg32-Atg11 相互作用はマイトファジーに不可欠と考えられる⁹⁾・¹¹⁾・¹²⁾。このように、Atg32 はミトコンドリアの丸ごと分別・除去のための隔離膜形成の始動因子と実働因子を直接的にミトコンドリアへリクルートすることで、マイト

ファジーの選択性を規定している(図1)。

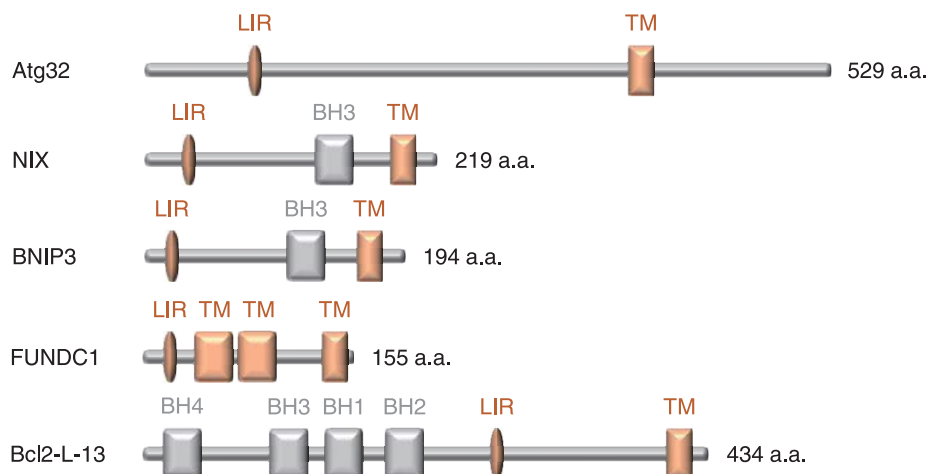
3. 分解標識タンパク質の普遍性と多様性

最近、Atg32 のように LIR モチーフによる LC3 (Atg8 の哺乳類ホモログ) 受容体としての機能を持ち、膜貫通ドメインによってミトコンドリア表面へ膜挿入する因子が複数同定されている(図2)¹³⁾。加えて、Atg32 を含むこれらのマイトファジー駆動因子に共通する重要なポイントが二つある。第一に、リン酸化や脱リン酸化などの翻訳後修飾を受けることで、LC3 やオートファジー始動因子との結合が正または負に制御され、それによってマイトファジー活性が調節されている点である。第二に、特定の生理条件によってタンパク質の発現量が上昇、あるいは前述の翻訳後修飾が促進され、それによってマイトファジー誘導が調節されている点である。一方、マイトファジー誘導の生理条件は、酸化ストレス・低酸素・細胞分化などが知られており、それらに対応する分解標識タンパク質も様々である。

興味深いことに、Atg32 欠損酵母細胞で哺乳類マイトファジーの駆動因子 Bcl2-L-13 を発現させたところ、微弱ながらミトコンドリアの分解が回復することがわかった¹⁴⁾。このマイトファジー活性は Bcl2-L-13 の LIR モチーフに依存しており、かつ全てのオートファジー関連経路に必須な Atg7 を必要とする¹⁴⁾。これらの知見から、Bcl2-L-13 は Atg8 に相互作用し、オートファジーの仕組みを利用して酵母ミトコンドリアの分解を促進していると考えられる。すなわち、Bcl2-L-13 は Atg32 の機能性ホモログであり、同様の仕組みで哺乳類マイトファジーを駆動しているのかもしれない。

4. おわりに

本稿では、マイトファジーを駆動する分解標識タンパク質について焦点を絞り、出芽酵母の駆動因子 Atg32 の分子機能とそれに類似した哺乳類タンパク質の特徴を紹介してきた。これらとは別に、ユビキチンが分解標識として働く仕組みがあり(酵母では見つかっていない)、パーキンソン病関連因子 PINK1/Parkin に依存したマイトファジーとして詳細に解析されている¹⁵⁾。哺乳類細



LIR, LC3-interacting region; TM, transmembrane domain; BH1-4, Bcl-2 Homology 1-4 domain.

レセプター	生物種	誘導条件	AIM/LIR 数	TM数	リン酸化	責任キナーゼ	脱リン酸化	責任フォスファターゼ	オートファジー 始動因子との結合
Atg32	出芽酵母	酸化ストレス	1	1	あり	CK2	?	?	Atg11
NIX	哺乳類	低酸素・赤血球分化	1	1	?	?	?	?	?
BNIP3	哺乳類	低酸素	1	1	あり	?	?	?	?
FUNDC1	哺乳類	低酸素	1	3	あり	Src, CK2, ULK1	あり	PGAM5	ULK1 ?
Bcl2-L-13	哺乳類	?	1	1	あり	?	?	?	?

図2 マイトファジーを駆動する分別標識タンパク質のドメイン構造

胞では、Atg8（LC3）受容体駆動型とユビキチン駆動型の二つのタイプが存在しており、それぞれ相互補完的に働いているか、状況に応じて使い分けられている可能性も考えられる。マイトファジー不全が関連する病態とそれらの治療に向けて、今後のさらなる解析が待たれる。

[参考文献]

- 1) K. Okamoto and N. Kondo-Okamoto, *Biochim. Biophys. Acta.*, **2012**, 1820, 595-600.
- 2) N. Mizushima, T. Yoshimori and Y. Ohsumi, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **2011**, 27, 107-132.
- 3) D. Gatica, V. Lahiri and D. J. Klionsky, *Nat. Cell Biol.*, **2018**, 20, 233-242.
- 4) K. Okamoto, N. Kondo-Okamoto and Y. Ohsumi, *Dev. Cell*, **2009**, 17, 87-97.
- 5) T. Kanki, K. Wang, Y. Cao, M. Baba and D. J. Klionsky, *Dev. Cell*, **2009**, 17, 98-109.
- 6) J. H. Um and J. Yun, *BMB Rep.*, **2017**, 50, 299-307.
- 7) K. Sakakibara, A. Eiyama, S. W. Suzuki, M. Sakoh-Nakatogawa, N. Okumura, M. Tani, A. Hashimoto, S. Nagumo, N. Kondo-Okamoto, C. Kondo-Kakuta, E. Asai, H. Kirisako, H. Nakatogawa, O. Kuge, T. Takao, Y. Ohsumi and K. Okamoto, *EMBO J.*, **2015**, 34, 2703-2719.
- 8) M. R. Slobodkin and Z. Elazar, *Essays Biochem.*, **2013**, 55, 51-64.
- 9) N. Kondo-Okamoto, N. N. Noda, S. W. Suzuki, H. Nakatogawa, I. Takahashi, M. Matsunami, A. Hashimoto, F. Inagaki, Y. Ohsumi and K. Okamoto, *J. Biol. Chem.*, **2012**, 287, 10631-10638.
- 10) H. Nakatogawa, K. Suzuki, Y. Kamada and Y. Ohsumi, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2009**, 10, 458-467.

- 11) Y. Aoki, T. Kanki, Y. Hirota, Y. Kurihara, T. Saigusa, T. Uchiyumi and D. Kang, *Mol. Biol. Cell*, **2011**, 22, 3206-3217.
- 12) T. Kanki, Y. Kurihara, X. Jin, T. Goda, Y. Ono, M. Aihara, Y. Hirota, T. Saigusa, Y. Aoki, T. Uchiyumi and D. Kang, *EMBO Rep.*, **2013**, 14, 788-794.
- 13) H. Wu, H. Wei, S. A. Sehgal, L. Liu and Q. Chen, *Free Radic. Biol. Med.*, **2016**, 100, 199-209.
- 14) T. Murakawa, O. Yamaguchi, A. Hashimoto, S. Hikoso, T. Takeda, T. Oka, H. Yasui, H. Ueda, Y. Akazawa, H. Nakayama, M. Taneike, T. Misaka, S. Omiya, A. M. Shah, A. Yamamoto, K. Nishida, Y. Ohsumi, K. Okamoto, Y. Sakata and K. Otsu, *Nat. Commun.*, **2015**, 6, 7527.
- 15) J. W. Harper, A. Ordureau and J. M. Heo, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2018**, 19, 93-108.

[著者プロフィール]

氏名：岡本 浩二 (Koji Okamoto)

所属：大阪大学大学院生命機能研究科

連絡先：〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-3

TEL：06-6879-7970、FAX：06-6879-7970

E-mail：kokamoto@fbs.osaka-u.ac.jp

出身学校：広島大学大学院理学研究科

学位：博士（理学）

専門分野：分子細胞生物学

現在の研究テーマ：ミトコンドリア質・量管理の分子機構と生理機能

Topics on Chemistry

オートファジー小胞と不良ミトコンドリアを可視化する蛍光試薬

株式会社同仁化学研究所 岩下 秀文

2016年のノーベル賞受賞対象となったオートファジーは、細胞内の自己構成成分を分解する細胞機能として東京工業大学の大隅崇誉教授らのグループにより発見された。オートファジーの中には、①細胞内成分を二重膜構造体で周囲から隔離し、リソソームと融合することで消化されるマクロオートファジー、②リソソームが内側に陥入し、個々に分裂して細胞質成分が消化されるミクロオートファジー、③個別の分子が直接リソソーム内部に透過され消化されるシャペロン依存性オートファジー、④オルガネラなどを選択的にマクロオートファジー経路で消化する選択的オートファジーなどが存在する。単にオートファジーと呼ぶ場合は、マクロオートファジーのことを指す。本稿においてもマクロオートファジーをオートファジーと呼ぶ。オートファジーは細胞内の不要なタンパク質や細胞小器官を二重膜で構成されるオートファゴソームと呼ばれる隔離膜によって隔離され、続いてリソソームと融合しオートリソソームを形成する。内容物はオートリソソーム内でリソソーム性消化酵素により分解される。この細胞機能の破綻は神経変性疾患などに関与することが次第に明らかになってきており、正常に機能しているかどうか簡便に見定める必要がある。筆者らは低分子蛍光色素を用いることでこれら機能を簡便に全ての細胞に適応可能な検出手法の開発を進めてきた。本稿ではオートファジー小胞と不良ミトコンドリアそれぞれを可視化する特徴的な蛍光色素類について紹介したい。

細胞内で不要となったタンパク質や細胞小器官は二重膜で構成されたオートファゴソームによって隔離される。オートファゴソームはリソソームと融合することでオートリソソームを形成し内容物をリソソーム性消化酵素により分解する。この現象を生細胞で検出するため、オートファゴソーム特異的タンパク質である microtubule-associated protein 1 with light chain 3(LC3) に緑色

蛍光タンパク質 (GFP) を共発現させる手法が最も用いられているが、遺伝子導入の必要があるため全ての細胞に適応することは難しい。近年では初代培養細胞や疾患患者由来 induced pluripotent stem cells (iPS 細胞) を用いた応用研究及び創薬が増えており汎用性の高い検出系が必要となっている。筆者らは、全ての細胞種のオートファジー現象を生細胞で可視化する低分子蛍光色素を開発した¹⁾。DAPGreen は、オートファゴソーム及びオートリソソームを可視化することができる (図 1)。一方、DALGreen は酸性環境に応答する仕組みを有するため、リソソームとの融合体であるオートリソソームを検出することができる (図 1)。実際に、HeLa 細胞にこれら色素を導入し、飢餓培養または rapamycin によりオートファジーを誘導した結果、細胞内で多数の蛍光顆粒点が観察されている。これら蛍光顆粒点は tagRFP-LC3 発現細胞を用いた評価から LC3 と共局在することも確認されている (13 ページに共焦点顕微鏡による観察結果を掲載)。

さらに筆者らは細胞内でエネルギー産生を担うミトコンドリアに着目し、ミトコンドリア選択的オートファジー (マイトファジー) を可視化する蛍光色素についても報告している²⁾。マイトファジーはパーキンソン病などの神経変性疾患と関わりがあり、発症する患者の多くはミトコンドリア分解に重要な Parkin と PINK1 の 2 つの遺伝子がうまく機能していないことが分かっている。つまり、マイトファジーは、蓄積した不良ミトコンドリアの品質管理機構の一つとして重要な役割を担っている。筆者らは不良ミトコンドリアを可視化する低分子蛍光色素を開発した。Mtpagy Dye は膜電位依存的にミトコンドリアに集積し、ミトコンドリア膜上またはタンパク質に共有結合で固定化される。この生理条件下において蛍光強度は弱い、酸性環境に変化すると蛍光強度が増大する特徴を有する (図 2)。Parkin 発現細胞と Parkin

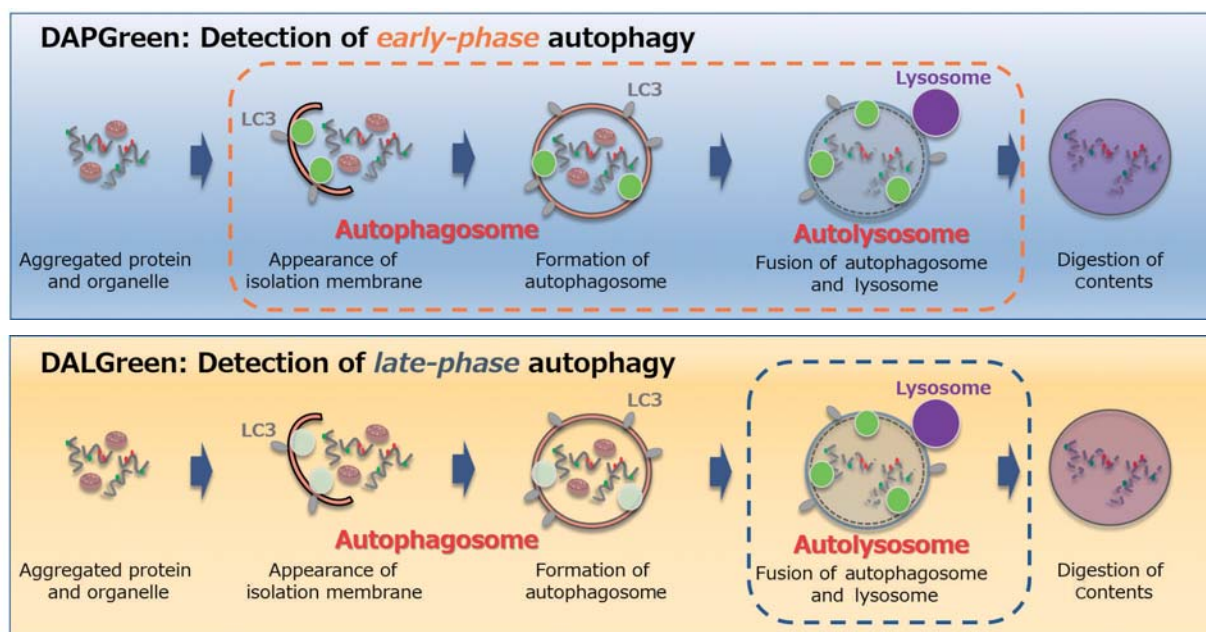


図 1 DAPGreen と DALGreen を用いた検出メカニズム

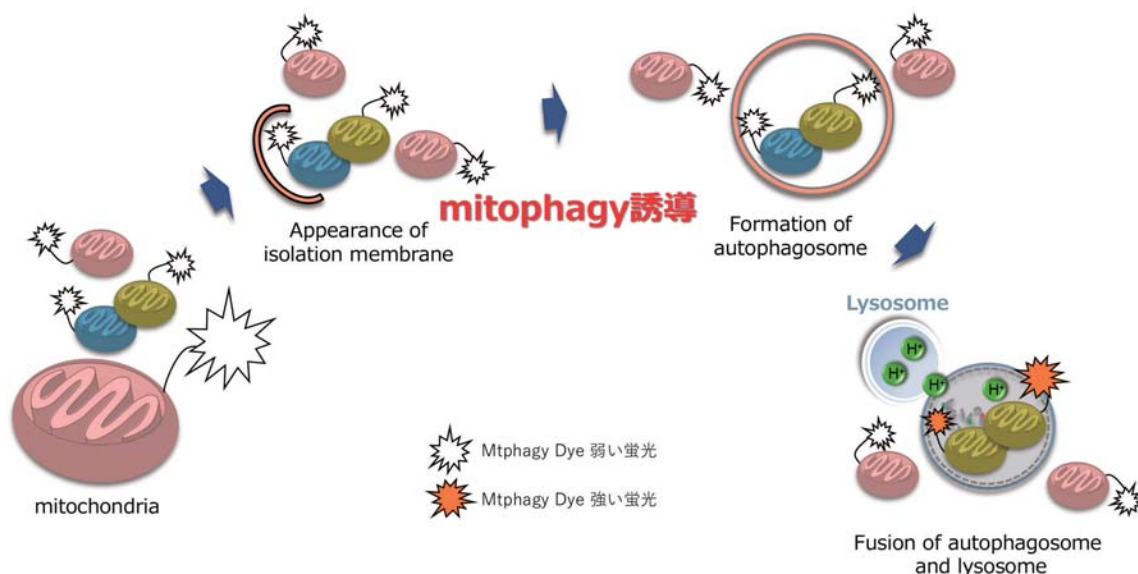


図2 Mtpagy Dye を用いた検出メカニズム

未発現細胞を用い、Mtpagy Dye を導入し carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) によりミトコンドリアの膜電位を低下させマイトファジーを誘導した。その結果、マイトファジー誘導 18 時間後 Parkin 発現細胞において細胞内で Mtpagy Dye 由来の赤い蛍光顆粒点が多数確認されたが、Parkin 未発現細胞では観察されなかった²⁾。これら蛍光顆粒点はミトコンドリア染色色素の MitoTracker やオートファゴソームマーカーの GFP-LC3 とともに共局在することから、不良化ミトコンドリアがオートファゴソームに隔離されオートファジー経路によりリソソームと融合した過程を生細胞で可視化できることを示している。

本稿で紹介した蛍光色素類は生細胞イメージングによる細胞内現象の追跡のみならず多検体サンプルを用いた薬剤スクリーニングにも応用が可能である。多くの研究分野でオートファジー現象を可視化する一つの手法として活躍することを期待している。

【謝辞】

本研究を進めるにあたりご指導いただいた東京医科歯科大学の清水教授、鳥居講師、桜井助教に感謝いたします。

【参考文献】

- 1) H. Iwashita, H. T. Sakurai, N. Nagahora, M. Ishiyama, K. Shioji, K. Sasamoto, K. Okuma, S. Shimizu and Y. Ueno, "Small fluorescent molecules for monitoring autophagic flux", *FEBS Lett.*, **2018**, 592(4), 559.
- 2) H. Iwashita, S. Torii, N. Nagahora, M. Ishiyama, K. Shioji, K. Sasamoto, S. Shimizu and K. Okuma, "Live Cell Imaging of Mitochondrial Autophagy with a Novel Fluorescent Small Molecule", *ACS Chem. Biol.*, **2017**, 12(10), 2546.

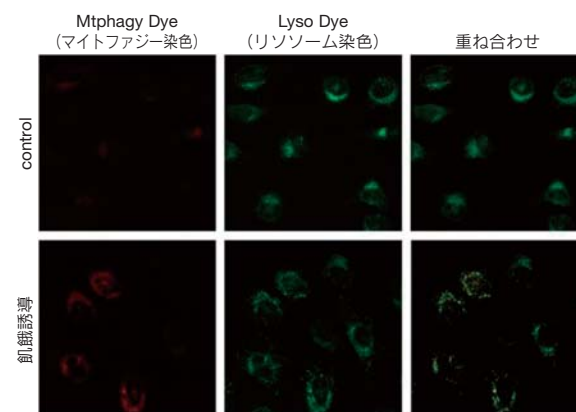
関連製品 DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

マイトファジー検出蛍光試薬

Mitophagy Detection Kit

<特長>

- ・低分子蛍光試薬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
- ・培養細胞に試薬を添加するだけの簡単操作



飢餓培養条件下でのマイトファジー検出例

HeLa 細胞に Mtpagy Dye を添加後、通常培養条件下 (DMEM) および飢餓誘導条件下 (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し、更に Lyso Dye 添加により得られた蛍光像を観察した。飢餓誘導した HeLa 細胞において、Mtpagy Dye の蛍光強度の増大がみられた。

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

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

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

新製品

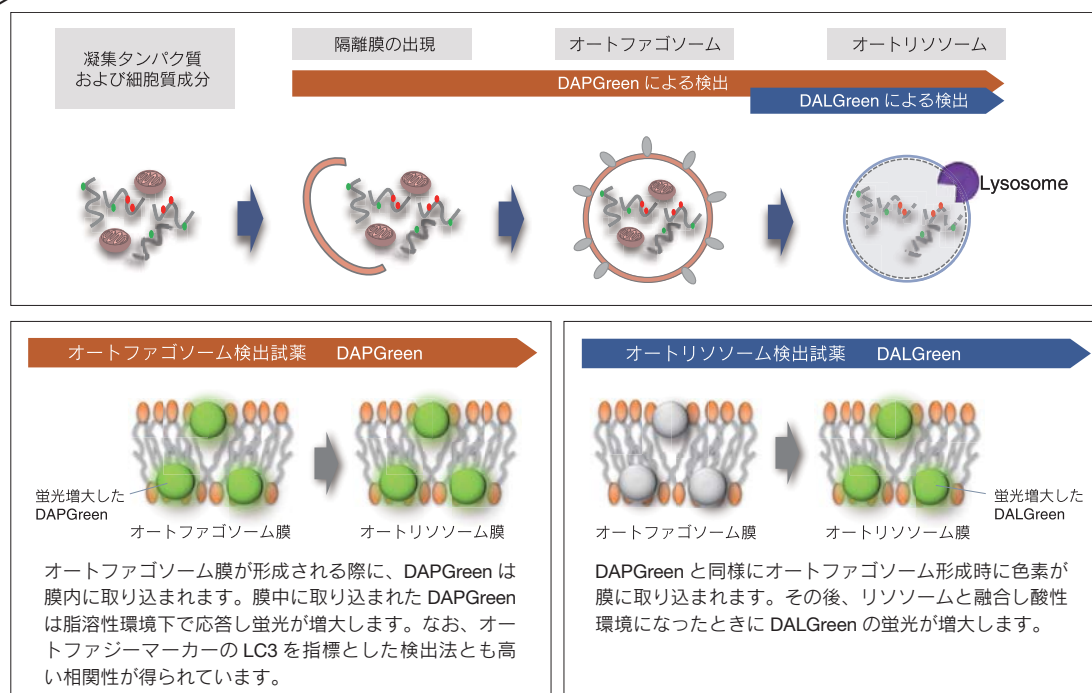
オートファジー検出試薬

オートファゴソーム検出試薬 DAPGreen - Autophagy Detection

オートリソソーム検出試薬 DALGreen - Autophagy Detection

DALGreen, DAPGreen 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。DAPGreen はオートファゴソーム膜に取り込まれることで蛍光を発します。一方、DALGreen は凝集タンパク質等が分解されるオートリソソーム段階で蛍光を発します。この様に DAPGreen と DALGreen は、“オートファゴソーム形成およびリソソームとの融合・内容物の分解” の過程を試薬の添加だけでモニターリングすることができます。

< 染色原理 >



オートファジーの検出原理や様々な実験データを掲載した論文が公開
H. Iwashita et al., *FEBS Letters*, **2018**, 592 (4), 559-567 小社 HP からご覧いただけます。

< 検出試薬の概要 >

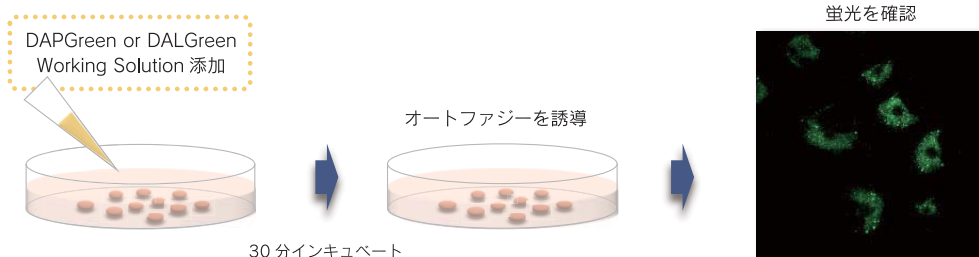
蛍光顕微鏡だけでなくフローサイトメーターでも検出頂けます。また DAPGreen では、プレートリーダーによる検出も実現しました。ご使用の装置で検出可能な蛍光特性をご確認の上、ご使用ください。

	対応装置			蛍光特性	容量 / 使用回数の目安	既存検出法
	蛍光顕微鏡	フローサイトメーター	プレートリーダー			
DAPGreen	○	○	○	Ex. 425-475 Em. 500-560 ※ 共焦点顕微鏡では 488 nm にて励起可能	5 nmol x 1 / 35 mm dish: 25 枚分 (最大濃度で使用时)	LC3-GFP MDC Cyto-ID など
DALGreen	○	○	×	Ex. 350-450 Em. 500-560 ※ 共焦点顕微鏡では 488 nm にて励起可能	20 nmol x 1 / 35 mm dish: 10 枚分 (最大濃度で使用时)	LC3-GFP-RFP など

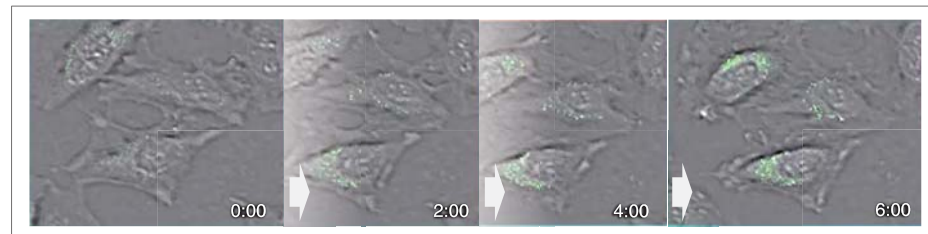
※ 励起・蛍光スペクトル図は小社 HP にてご覧いただけます。
※ DAPGreen と DALGreen の共染色イメージングはできません。

<操作>

遺伝子導入は不要です。準備した細胞に試薬を添加するだけの簡単操作で蛍光イメージングを実現します。



<タイムラプスで検出 (DALGreen の使用例)>

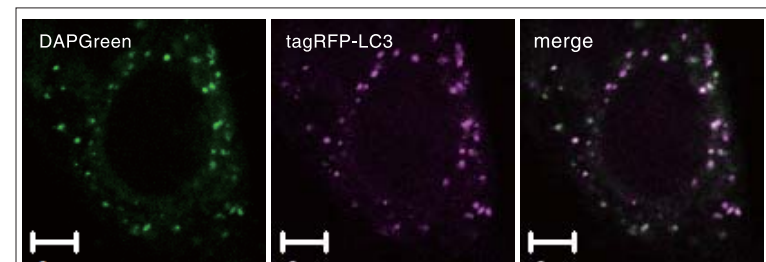


イメージング条件

培養条件 : アミノ酸不含培養培地
装置 : 共焦点イメージングサイトメーター
(横河電機株式会社 : CQ1)
蛍光フィルター : Ex. 405 / Em. 525/50
倍率 : 20 倍

HeLa 細胞を DALGreen で染色後、飢餓培養にて 6 時間までの細胞の状態を観察しました。オートファジーを誘導した細胞において、DALGreen の蛍光の増大が確認されました。本タイムラプスの動画は、小社 HP にてご覧いただけます。

< LC3 との高い相関 (DAPGreen の使用例)>



イメージング条件

DAPGreen : Ex. 488 nm / Em. 500-563 nm
スケールバー : 10 μ m
オートファジー誘導条件
RFP-LC3 発現 HeLa 細胞に DAPGreen 添加後、Rapamycin によりオートファジーを誘導

オートファジーマーカーである LC3 を指標とした検出法と共染色を行い局在の比較を行いました。オートファジーの誘導から 4 時間後に、DAPGreen 及び RFP の蛍光像を共焦点顕微鏡にて確認し、DAPGreen と LC3 が共局在する結果が得られました。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
DAPGreen - Autophagy Detection	5 nmol	36,000	D676
DALGreen - Autophagy Detection	20 nmol	28,000	D675

製品一覧冊子のご案内

ミトコンドリア解析試薬を含む、細胞機能解析関連の製品を一冊に集約。

【掲載製品群】

オートファジー、細胞老化、ミトコンドリア、細胞増殖・細胞毒性

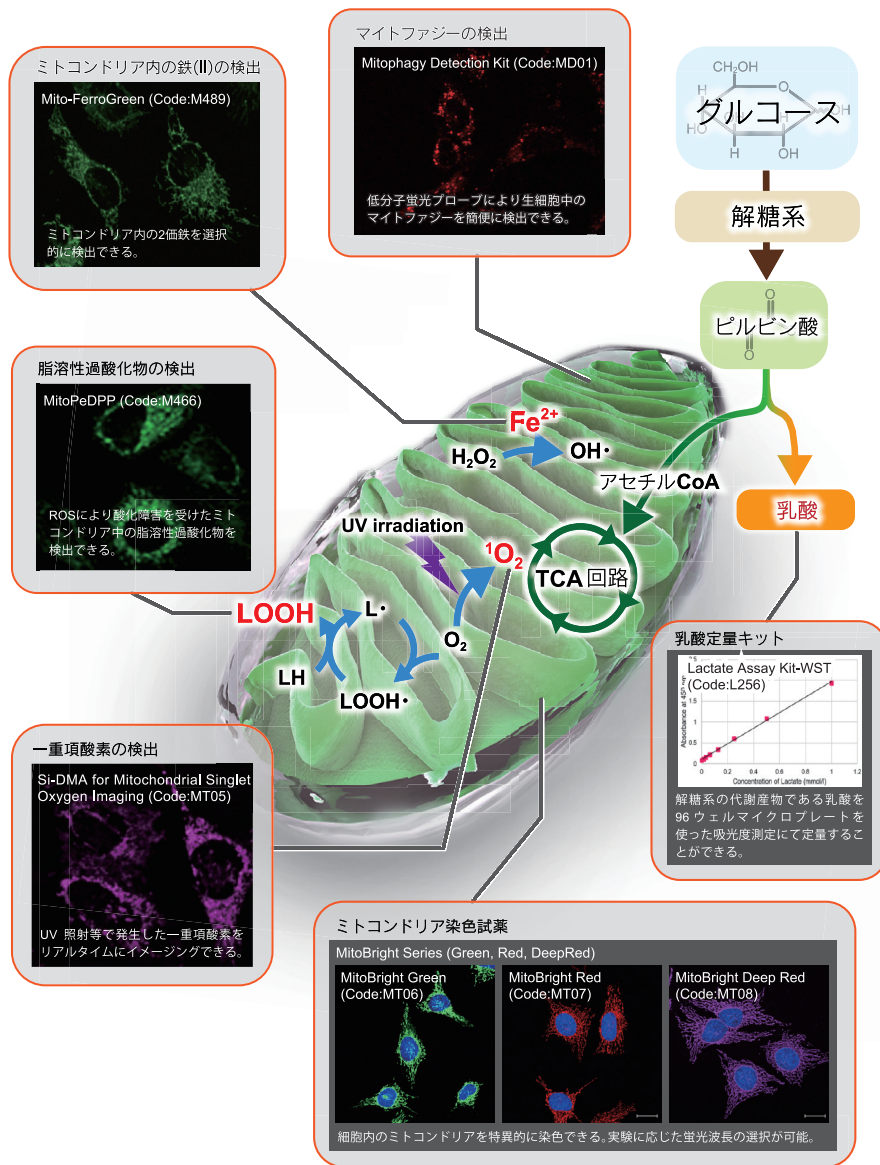
試薬パンフレットダウンロード 同仁化学

検索



ミトコンドリア解析用試薬

ミトコンドリア解析のための製品ラインアップ



ホームページで一覧公開中！

ミトコンドリア解析 同化学

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
フリーダイヤル

0120-021557
0120-489548