

エピジェネティクス

—総説—

ヒストン修飾と特異的モノクローナル抗体

東京工業大学 木村 宏

—注目の研究—

ヒストンコード解明のための発蛍光プラットフォームの開発

株式会社同仁化学研究所 下村 隆

新製品

核小体染色試薬 (Nucleolus Bright Green/Red) P.7

細胞内代謝 [NAD (P) /NAD (P) H] 定量キット P.9

脂肪滴染色蛍光試薬 (Lipi-Blue/Green/Red) P.10

結合型メディエーター P.13

開発中

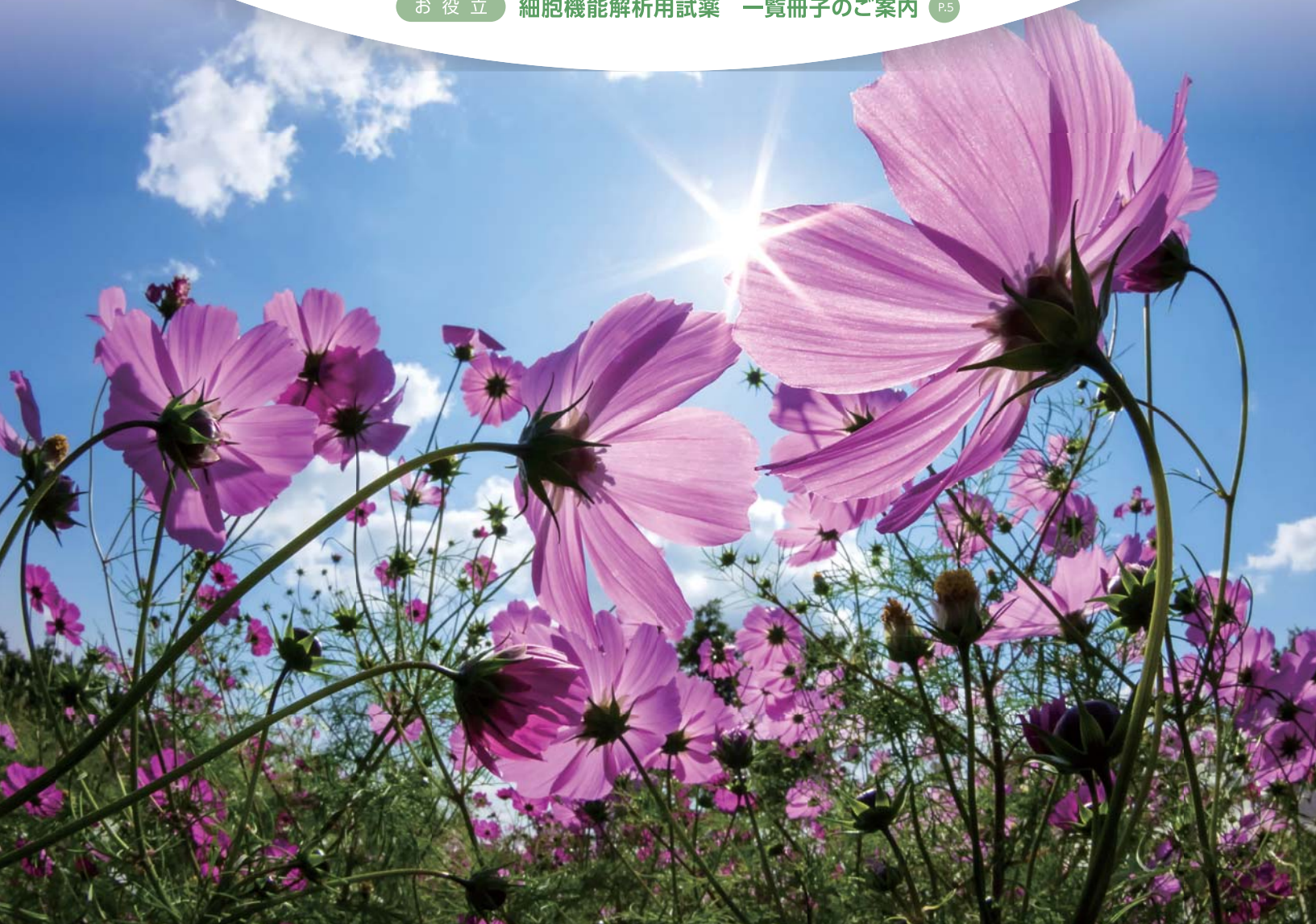
ヒストン修飾解析用抗体 P.5

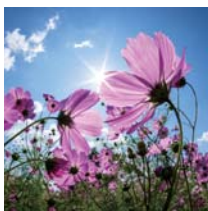
γ -H2AX 蛍光検出キット P.5

グルコース定量キット P.9

お役立

細胞機能解析用試薬 一覧冊子のご案内 P.5





表紙撮影：熊本県阿蘇郡産山村田尻 ヒゴタイ公園
photo：永島俊介氏

CONTENTS

Review

ヒストン修飾と特異的モノクローナル抗体 ●———— [1]

東京工業大学 木村 宏

Topics on Chemistry

ヒストンコード解明のための発蛍光プラットフォームの開発 ●—— [6]

株式会社同仁化学研究所 下村 隆

Commercial

老化細胞検出キット ●———— [7]

細胞内代謝の測定 ●—— [8]

乳酸定量キット ●———— [9]

オートファジー検出試薬 ●———— [11]

開発中

ヒストン修飾解析用抗体 ●———— [5]

γ -H2AX 蛍光検出キット ●—— [5]

グルコース定量キット ●———— [9]

新製品

核小体染色試薬 (Nucleolus Bright Green/Red) ●—— [7]

細胞内代謝 [NAD(P)/NAD(P)H] 定量キット ●———— [9]

脂肪滴染色蛍光試薬 (Lipi-Blue/Green/Red) ●—— [10]

結合型メディエーター ●———— [13]

9月25日発売予定

核染色ノーマライゼーションキット ●———— [12]

ミトコンドリア膜電位測定キット ●—— [12]

Ab-10 Rapid Labeling Kit 1 sample 包装 ●———— [13]

お知らせ

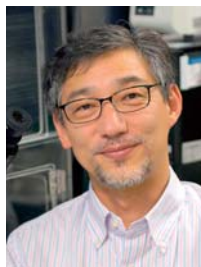
細胞機能解析用試薬 一覧冊子のご案内 ●———— [5]

近日出展予定の学会 ●—— [13]

第29回フォーラム・イン・ドージン開催 ●———— [14]

ヒストン修飾と特異的モノクローナル抗体

Histone modifications and their analysis by using specific monoclonal antibodies



木村 宏

東京工業大学
科学技術創成研究院
細胞制御工学研究センター

Abstract

Eukaryotic nuclear DNA wraps around core histones to form nucleosomes, which are the basic units of chromatin. As core histones tightly bind to DNA, their posttranslational modifications can regulate genome function, including transcription, chromosome replication, repair, and segregation. For epigenetic gene regulation, methylation on lysine residues particularly plays an important role, and the local and global histone modification states can be a good indication of chromatin state for gene expression. Specific modifications fluctuate in response to the cell cycle progression and DNA damages. Among the various methods to detect histone modifications, specific monoclonal antibodies are useful for analyzing the genomic and spatial localizations by chromatin immunoprecipitation and immunofluorescence microscopy. Recent development of live cell imaging techniques has enabled to track the modification dynamics in living cells.

1. はじめに

真核生物の細胞核に存在するゲノム DNA は、クロマチンと呼ばれる高次構造体として存在している。クロマチンの基本単位は、DNA とコアヒストンから構成されるヌクレオソームである(図 1)。ヌクレオソームの構造や性質は、DNA を鋳型または基質とするすべての反応に大きく影響することから、ヌクレオソームを構成するヒストンの種類や翻訳後修飾は、転写、複製、組換え、修復などの制御機構に重要な役割を果たす。そのため、細胞内でゲノム上のどの領域がどのようなクロマチン構造・ヒストン修飾状態で存在するのかわかることは、遺伝子発現制御をはじめとしたゲノム機能制御の理解に極めて重要である。本総説では、ヒストン修飾に関する現在の知見を概説するとともに、その検出法について紹介する。

2. ヒストンとヌクレオソーム

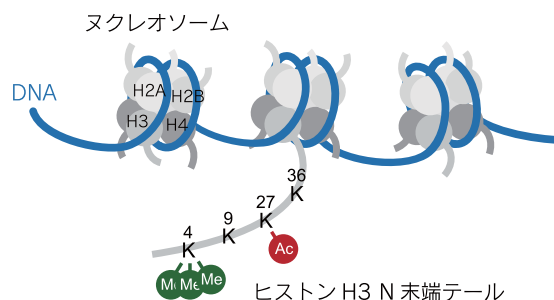
ヌクレオソームを構成するタンパク質として、4 種類のコアヒストン (H2A、H2B、H3、H4) が知られている(ヒストンには、ヌクレオソームとヌクレオソームをつなぐリンカー DNA に結合するリンカーヒストン H1 も存在する)。これらのコアヒストンは、ヌクレオソームの形成に関与するヒストンフォールドと呼ばれる中央のドメインとヌクレオソームから飛び出した N 末端あるいは C 末端の柔軟なドメインを持つ¹⁾。4 種類のコアヒストンそれぞれが 2 分子ずつのオクタマー (8 量体) を形成し、145 ~ 147 塩基対の DNA と共に、ひとつのヌクレオソームが形成される。このヌクレオソームが 50 塩基対程度 (10 ~ 80 塩基対) のリンカー DNA を挟んで連なり、さらに多くのタンパク質や RNA が結合したものがクロマチンである。

4 種類のコアヒストンは等価ではなく、2 つの H3-H4 複合体と DNA によりヌクレオソーム様構造 (テトラソーム) が形成されるのに対して、H2A-H2B と DNA のみではヌクレオソーム様構造はできない。実際、新規にヌクレオソームが形成される際には、H3-H4 と DNA により形成されたテトラソームに、2 つの H2A-H2B 複合体が結合することで、ヌクレオソームが完成する²⁾。完成したヌクレオソームは、試験管内では非常に安定に存在するが、

細胞内ではダイナミックに変化しうる。ヌクレオソームを鋳型として転写や複製が起こる際には、H2A-H2B が解離するのに対して、多くの H3-H4 は DNA から解離せずに維持される³⁾。また、比較的ゆっくりとした速度 (半減期約 2 時間) ではあるが、H2A-H2B の交換が起こる⁴⁾。そのため、H2A や H2B の修飾よりも H3 や H4 の修飾が、より長期にわたるゲノム機能制御に働くと考えられる。

3. ヒストン修飾

すべてのコアヒストンは、翻訳後修飾を受けることが知られている。特に、ヒストン H3 のリジン残基の ε - アミノ基のアセチル化 (ac)、メチル化 (me)、ユビキチン化 (ub) は、遺伝子発現の制御において主要な役割を果たしている。単一のアミノ基に対して、アセチル基とユビキチンはひとつしか付加されないが、メ



活性化	転写開始領域	H3K4me3, H3K27ac
	エンハンサー	H3K4me1, H3K27ac
抑制化	構成的ヘテロクロマチン	H3K9me3
	条件的ヘテロクロマチン	H3K27me3

図 1. ヌクレオソームとヒストン修飾

チル基は3つの水素と置換しうるため、メチル化は3つの状態(モノメチル化, me1; ジメチル化, me2; トリメチル化, me3)をとる。また、それぞれのヒストンには多数のリジン残基が存在するが、同じ修飾であっても、どのリジン残基上に起こるのかによって、意義が異なる(図1)。修飾されたヒストンは、その種類、アミノ酸番号、修飾の略称で表記されることが多く、例えばヒストンH3の9番目のリジン残基のトリメチル化は、H3K9me3と表記される。ヒストンH3のリジン残基のメチル化(H3K9me3やH3K27me3)は、DNAメチル化と共に細胞分裂や世代を経ても維持され、遺伝子の発現状態の世代を超えた制御に関与する。このDNA塩基配列の変化を伴わずに起こる遺伝子発現抑制などの継承はエピジェネティクス(後発的遺伝学あるいは後生学的遺伝学)と呼ばれている。また、細胞内のDNAメチル化状態やヒストンの修飾状態はエピゲノムと呼ばれる。

4. ヒストン修飾と遺伝子発現制御

一般に、発現している遺伝子では、その転写開始点付近にH3K4me3とH3K27acが、エンハンサー領域にH3K4me1とH3K27acが濃縮されている⁵⁾(図1)。また、遺伝子領域の特にエキソン上ではH3K36me3が見られる。それに対して、転写が抑制されたゲノム領域では、H3K9me3やH3K27me3が構成的ヘテロクロマチンや条件的ヘテロクロマチンに局在する。構成的ヘテロクロマチンは、トランスポゾンやレトロウイルスに由来する繰返し配列など発生や分化を通してほとんどの細胞で抑制されているクロマチンであり、セントロメア近傍の繰返し配列(ヒトではαサテライト、マウスではメジャーサテライト)などに代表される。条件的ヘテロクロマチンは、特定の細胞種で抑制されたクロマチンであり、未分化細胞では見られず細胞分化に伴って形成される不活性X染色体などに代表される。現在、ヒトの正常組織の標準エピゲノム情報を取得するための国際組織IHEC(ヒトエピゲノムコンソーシアム; international human epigenome consortium)により、上記6つのヒストン修飾(H3K4me1、H3K4me3、H3K9me3、H3K27ac、H3K27me3、H3K36me3)とDNAメチル化の解析が進められている⁶⁾。これらの標準エピゲノムは、組織や細胞の遺伝子発現制御機構の理解に加え、疾患エピゲノムとの比較に有用であると考えられる。

5. ヒストン修飾と細胞周期

新規に合成されたヒストンH3とH4は、ヒストンシャペロン複合体と結合し、ヌクレオソーム形成に働くが、ヒストンシャペロン複合体中には、ヒストンアセチル化酵素(HAT1; histone acetyltransferase 1)が含まれており、ヒストンH4のK5とK12がアセチル化される²⁾。そのため、新規に形成されたヌクレオソームは、H4K5acK12ac(ジアセチル化)状態にある⁷⁾。一方、ヌクレオソームに取り込まれた直後のH4K20はメチル化されていないが、G2期からM期にかけて、H4K20モノメチル化酵素(PR-Set7)によりH4K20me1レベルが大きく上昇する^{8,9)}。PR-Set7のノックダウンにより細胞分裂の進行が異常になることなどから、H4K20me1は正常な染色体凝縮や分配に必要であることが示唆されている⁸⁾。また、細胞周期のM期では、大部分のH3のS10やS28がリン酸化される^{10,11)}。さらに、細胞死(アポトーシス)の過程では、H2BのS14のリン酸化が起こる¹²⁾。したがって、これらの修飾を検出することで、細胞周期やアポトーシスの解析が可能になる。

6. ヒストン修飾とDNA損傷修復

DNA損傷修復過程においても、ヒストン修飾のダイナミックな変化が起こる。特に、電離放射線(γ線)によるDNAの二重鎖切断に対する応答として、H2AのバリエーションであるH2A.XのS139がリン酸化されることが見出され、このリン酸化H2A.XはγH2A.Xと呼ばれている¹³⁾。1箇所の二重鎖切断に対しその周辺Mb単位に渡ってリン酸化が起こるため、H2A.Xは、DNA修復因子の損傷部位への効率的な集積に働くと考えられているほか、高感度な二重鎖切断のマーカーとしても用いられている¹⁴⁾。H2A.Xは、リン酸化と独立した経路によって、アセチル化やユビキチン化も受けることが知られており、これらの修飾とDNA損傷修復のメカニズムの解明が進められている¹⁵⁾。また、紫外線によるDNA損傷修復過程においては、H3K27acのレベルが損傷部位で低下することも示されている¹⁶⁾。

7. エピゲノム修飾と疾患

最近、加齢や様々な疾患とエピゲノム変化との関係が注目されているが、その中でも、特にがんエピジェネティクスの関係についての解析が特に進んでいる¹⁷⁾。多くのがん細胞では、がん抑制遺伝子の発現が抑制されており、それら遺伝子の転写制御領域ではDNAメチル化や転写抑制に働くヒストンH3メチル修飾が多く見られる。また、多くのがん細胞において、エピゲノム修飾を介した遺伝子発現制御に働くタンパク質の変異や転座、発現レベルの異常が高頻度で見つかっている¹⁸⁾。これらの異常により、特定領域のエピゲノム修飾の変化のみならず、ヒストン修飾のグローバルなレベルの変動も見出されている。例えば、H4K16acとH4K20me3のレベルががん細胞で低下していることや、H3K18acとH3K4me2のレベルが低いほど前立腺がんの再発や、肺がんや腎臓がん患者の生存率と関係することが示されている¹⁹⁾。また、神経膠腫ではヒストン遺伝子そのものの変異も比較的高頻度で検出されており、H3.3のK27のMetへの変異により、K27のメチル化レベルが全体的に低下することも知られている²⁰⁾。これらの変異や修飾状態の変化とがん化のメカニズムとの関係は不明な点が多いが、ヒストン修飾の検出が診断や創薬に応用できることは重要である。

8. ヒストン修飾の検出法

ヒストン修飾は、様々な方法により検出されている。その化学的特性を検出する方法として、古典的にはAcid-Urea-Triton(AUT)ゲル電気泳動が用いられてきた。AUTゲル電気泳動では、ヒストンの電荷に影響を与えるリジン残基のアセチル化やセリン・スレオニン残基のリン酸化などを移動度から判別できる。実際、γH2AXやアポトーシスに伴うH2BS14phはAUTゲル電気泳動により発見された^{12,13)}。AUTゲル電気泳動により、ヒストンバリエーション(例えば、H3.1、H3.2、H3.3)の分離も可能である。近年、質量分析による解析手法が発展し、高感度で定量的に多様な修飾の検出が可能になっている²¹⁾。また、安定同位体を用いたパルス-チェイス法により、ヒストン修飾のターンオーバー速度の検出も可能になり、修飾のダイナミクスの理解が進んでいる²²⁾。質量分析を用いたヒストン修飾の解析法は極めて有用であるが、個々の細胞レベルや特定のゲノム領域での解析には向いていない。それに対して、抗体を用いた方法では、多数の修飾の同時検出という点でのスループットは低いが、単一細胞の解析や特定のゲノム領域の解析が可能である⁵⁾。

9. ヒストン修飾特異的モノクローナル抗体

様々なヒストン修飾に対する抗体は、ウェスタンブロッティング、クロマチン免疫沈降 (ChIP; chromatin immunoprecipitation)、免疫染色など様々な解析に用いることができる (図 2)。現在、ウサギやマウス由来の修飾ヒストン特異的抗体が多く市販されているが、その使用に際しては目的の修飾に対する特異性が検証されている必要がある。リジンのメチル化はその部位とレベルに応じて遺伝子発現調節における役割が異なるため、それらを明確に区別できる特異性が求められる。例えば、H3K9me3 に対する特異的抗体であるならば、H3K9me1 や H3K9me2 に加えて H3K27me3 に対する交差性が少ないことが必須である。また、近傍のアミノ酸の修飾の有無が抗体の反応性に与えることもあるため、修飾の組み合わせに対する反応性が調べられていることが望ましい^{10, 23)}。ポリクローナル抗体の場合、同一の修飾ペプチドを抗原とした場合でも別の動物個体において得られた抗体の特性は異なるため、ロット毎のチェックが必要である。我々は、将来にわたって再現性の良い解析を可能にするために、野崎直仁博士 (株式会社モノクローナル抗体研究所) と共同で特異性の高いモノクローナル抗体を開発してきた^{7, 10, 11, 23-32)}。モノクローナル抗体の場合は、樹立された抗体産生ハイブリドーマ細胞から調製するため基本的にロット間での抗体の特性に差が無く、実験の再現性が保障される。現在までに、ヒストン H3 と H4 の多くのリジン残基のアセチル化とメチル化、セリン残基とスレオニン残基のリン酸化に特異的な抗体が得られている^{7, 10, 11, 23-30)} (表 1)。また、転写を担う酵素である RNA ポリメラーゼ II のリン酸化とメチル化に特異的な抗体も開発した^{31, 32)} (表 2)。これらのモノクローナル抗体は、ウェスタンブロッティング、ChIP、免疫染色など、多くの用途に使用可能である。また、免疫染色の場合、異なる蛍光色素で直接標識することで、複数の修飾の局在とレベルを同時に評価することができる。

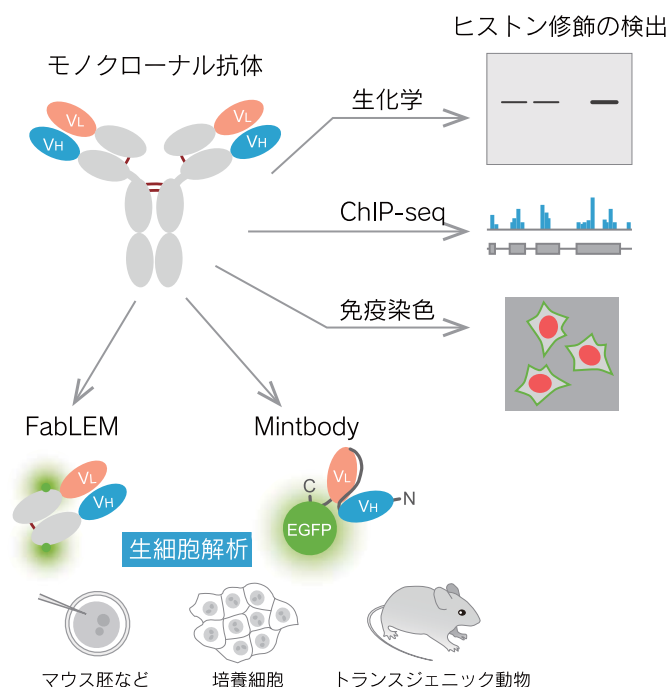


図 2. 修飾特異的抗体とその用途

表 1. ヒストン修飾特異的モノクローナル抗体

ヒストン残基	修飾	クローン (開発名)	サブクラス	抗体の結合を許容する (しない) 近傍の修飾	文献
H3K4	無	CMA301 (13C12)	IgG2b-κ	許容: K9me1, K9me2, K9me3, S10ph, K14ac 非許容: T3ph	23
	me1	CMA302 (19A5)	IgG2b-κ	許容: K9ac	23
	me2	CMA303 (27A6)	IgG1-κ	許容: T3ph, K9me1, K9me2, K9me3	23
	me3	CMA304 (16H10)	IgG1-κ	許容: K9ac	23
H3T3	ph	(16B2)	IgG1-κ	許容: K4me2	25
H3K9	無	(1C6)	IgG1-κ	-	-
	me1	CMA316 (2B8)	IgG3-κ	許容: S10ph	27
	me2	CMA317 (6D11)	IgG1-κ	非許容: S10ph	27
	me3	CMA318 (2F3)	IgG1-κ	反応性低下: S10ph	28
	ac	CMA310 (19E5)	IgG2a-κ	許容: K4me1, K4me2, K4me3, S10ph, K14ac, S28ph	27
H3S10	ph	CMA311 (7G1G7)	IgG1-κ	許容: K9me1, K9me2 反応性低下: K9ac 非許容: K9me3	10
	ph	CMA312 (10H12)	IgG1-κ	許容: K9me1 非許容: K9me2, K9me3, K9ac	-
	ph	CMA313 (3-5F5)	IgG1-κ	許容: K9me2, K9me3 反応性低下: K9me1 非許容: K9 非修飾, K9ac	10
	ph	CMA314 (3-7C4)	IgG2b-κ	許容: K9me2, K9me3, K9ac 反応性低下: K9 非修飾, K9me1	30
H3K14	ac	(7G8)	IgG2b-κ	-	-
H3K23	ac	(49D7)	IgG1-κ	-	-
H3K18	ac	(20D2)	IgG2a-κ	-	-
H3K27	無	(37B7)	IgG2b-κ	-	-
	me1	CMA321 (1B3)	IgG2a-κ	非許容: S28ph	-
	me2	CMA322 (5A12)	IgG2a-κ	非許容: S28ph	-
	me3	CMA323 (1E7)	IgG1-κ	非許容: S28ph	27
	ac	CMA309 (9E2H10)	IgG1-κ	非許容: S28ph	23
H3S28	ph	CMA315 (10-20F11)	IgG2b-κ	許容: K27me1, K27me2, K27me3, K27ac	11
H3K36	me2	CMA332 (2C3)	IgG1-κ	許容: T32ph, K37me2	26
	me3	CMA333 (13C9)	IgG1-κ	-	26
H4 aa21-29	pan	CMA400 (9C5)	IgG2b-κ	許容: K16ac, K20me1, K20me2, K20me3, K20ac	7
H4K5	ac	CMA405 (4A7)	IgG1-κ	非許容: K8ac	7
H4K8	ac	CMA408 (72A9)	IgG1-κ	許容: K5ac, K12ac	7
H4K12	ac	CMA412 (50B3)	IgG1-κ	許容: K8ac, K16ac	7
H4K16	ac	CMA416 (1B2)	IgG1-κ	許容: K12ac, K20me1, K20me2, K20me3, K20ac	7
H4K20	ac	CMA424 (6D6)	IgG2a-κ	-	7
	me1	CMA421 (15F11)	IgG1-κ	許容: K16ac	7
	me2	CMA422 (2E2)	IgG1-κ	非許容: K16ac	7
	me3	CMA423 (27F10)	IgG1-κ	許容: K16ac	7
H2AX S139	ph	(20A8)	IgG1-κ	許容: T136ph	-
H2B S14	ph	(6C9)	IgG2b-κ	-	24

- 未発表

表 2. RNA ポリメラーゼ II 修飾特異的モノクローナル抗体

C 末端ドメインの アミノ酸残基	修飾	クローン (開発名)	サブクラス	文献
YSPTSPS	無	CMA601 (C13B9)	IgG1-κ	31
	S2ph	CMA602 (Pc26B5)	IgG1-λ	31
	S5ph	CMA605 (Pa57B7)	IgG2b-κ	31
YSPTSPK	K7me1	CMA611 (3D3)	IgG2b-κ	32
	K7me2	CMA612 (19B4)	IgG1-κ	32

10. 抗体由来の生細胞プローブ

最近、ヒストン修飾特異的モノクローナル抗体由来のプローブを用いることで、生きた細胞内でヒストン修飾を可視化・計測することが可能になってきた³³⁾。この目的には、蛍光標識した抗原結合断片 (Fab; antigen binding fragment) や蛍光タンパク質と融合した一本鎖可変領域抗体 (scFv; single-chain variable fragment) が用いられる (図 2)。これらの抗体由来の蛍光プローブは、細胞内でも標的のヒストン修飾に特異的に結合するため、ヒストン修飾の局在や相対的な修飾レベルを検出することができる。細胞内でのプローブとヒストン修飾との結合時間は 1 秒以下から数秒程度であり、内在性のタンパク質の結合にあまり影響せず、プローブが存在しても細胞の増殖や胚の発生は正常に進行する²⁷⁾。それは、抗原との結合部位が 1 箇所である Fab や scFv では、IgG に比べて抗原との結合の親和性が 100 ~ 1000 倍程度低下するのに加え、細胞内ではタンパク質濃度が数百 mg/ml と非常に高く分子の衝突頻度も高くなるためであると考えられる。Fab を用いた方法 (FabLEM; Fab-based live endogenous modification) により、マウス受精卵のヒストンアセチル化動態²⁷⁾ や動物培養細胞でのホルモン刺激による転写活性化におけるヒストンアセチル化の機能³¹⁾ が解明された。また、Mintbody (modification-specific intracellular antibody) と名づけた遺伝子コード型のプローブ (蛍光タンパク質と融合した修飾特異的 scFv) は、細胞や生体内で安定に発現させることができるため、長時間にわたるイメージングや動植物個体の生体イメージングが可能になっている^{9, 34)}。

11. おわりに

ヒストン修飾と遺伝子発現制御との関係は近年大きく理解が進み、特定のヒストン修飾の転写開始点やエンハンサーへの集積が遺伝子発現の指標となることが確立されてきた。しかし、これらの修飾が実際にどのように転写を活性化するのか、あるいは転写が起きた結果として付加されるのか、等についてのダイナミクスに関する理解はあまり進んでいない。実際、H3K4me3 が転写開始領域にあるからといって、その遺伝子は常に転写されているとは限らない。今後、生細胞解析などを通して、ヒストン修飾をはじめとした細胞核・クロマチン構造による転写制御機構の実体が解明できると期待される。一方、モノクローナル抗体を用いた簡便な解析系は、ヒストン修飾を指標とした病態の評価や創薬に関する研究開発にとって、今後も益々有用になってくると考えられる。

[参考文献]

- 1) K. Luger, A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent and T. J. Richmond, *Nature*, **1997**, 389, 251-260.
- 2) Y. -J. Park and K. Luger, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2008**, 18, 282-289.
- 3) H. Kimura, *DNA Repair (Amst)*, **2005**, 4, 939-950.
- 4) H. Kimura and P. R. Cook, *J. Cell Biol.*, **2001**, 153, 1341-1353.

- 5) H. Kimura, *J. Hum. Genet.*, **2013**, 58, 439-445.
- 6) H. G. Stunnenberg, International Human Epigenome Consortium and M. Hirst, *Cell*, **2016**, 167, 1145-1149.
- 7) Y. Hayashi-Takanaka, K. Maehara, A. Harada, T. Umehara, S. Yokoyama, C. Obuse, Y. Ohkawa, N. Nozaki and H. Kimura, *Chromosome Res.*, **2015**, 23, 753-766.
- 8) D. B. Beck, H. Oda, S. S. Shen and D. Reinberg, *Genes Dev.*, **2012**, 26, 325-337.
- 9) Y. Sato, T. Kujirai, R. Arai, H. Asakawa, C. Ohtsuki, N. Horikoshi, K. Yamagata, J. Ueda, T. Nagase, T. Haraguchi, Y. Hiraoka, A. Kimura, H. Kurumizaka and H. Kimura, *J. Mol. Biol.*, **2016**, 428, 3885-3902.
- 10) Y. Hayashi-Takanaka, K. Yamagata, N. Nozaki and H. Kimura, *J. Cell Biol.*, **2009**, 187, 781-790.
- 11) Y. Hayashi-Takanaka, T. J. Stasevich, H. Kurumizaka, N. Nozaki and H. Kimura, *PLoS One*, **2014**, 9, e106271.
- 12) K. Ajiro, *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275, 439-443.
- 13) E. P. Rogakou, D. R. Pilch, A. H. Orr, V. S. Ivanova and W. M. Bonner, *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 5858-5868.
- 14) M. Mishima, *Front Biosci (Schol Ed)*, **2017**, 9, 1-16.
- 15) M. Ikura, K. Furuya, S. Matsuda, R. Matsuda, H. Shima, J. Adachi, T. Matsuda, T. Shiraki and T. Ikura, *Mol. Cell Biol.*, **2015**, 35, 4147-4157.
- 16) E. Kakumu, S. Nakanishi, H. M. Shiratori, A. Kato, W. Kobayashi, S. Machida, T. Yasuda, N. Adachi, N. Saito, T. Ikura, H. Kurumizaka, H. Kimura, M. Yokoi, W. Sakai and K. Sugawara, *Genes Cells*, **2017**, 22, 310-327.
- 17) M. A. Dawson, *Science*, **2017**, 355, 1147-1152.
- 18) C. Kandoth, M. D. McLellan, F. Vandin, K. Ye, B. Niu, C. Lu, M. Xie, Q. Zhang, J. F. McMichael, M. A. Wyczalkowski, M. D. M. Leiserson, C. A. Miller, J. S. Welch, M. J. Walter, M. C. Wendl, T. J. Ley, R. K. Wilson, B. J. Raphael and L. Ding, *Nature*, **2013**, 502, 333-339.
- 19) D. B. Seligson, S. Horvath, M. A. McBrien, V. Mah, H. Yu, S. Tze, Q. Wang, D. Chia, L. Goodglick and S. K. Kurdiani, *Am. J. Pathol.*, **2009**, 174, 1619-1928.
- 20) 武笠晃文, *Nuero-Oncology の進歩*, **2017**, 24, 1-17.
- 21) Z. F. Yuan, A. M. Arnaudo and B. A. Garcia, *Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto Calif)*, **2014**, 7, 113-128.
- 22) S. Sidoli, C. Lu, M. Coradin, X. Wang, K. R. Karch, C. Ruminowicz and B. A. Garcia, *Epigenetics Chromatin*, **2017**, 10, 34.
- 23) H. Kimura, Y. Hayashi-Takanaka, Y. Goto, N. Takizawa and N. Nozaki, *Cell Struct. Funct.*, **2008**, 33, 61-73.
- 24) H. Kimura, N. Takizawa, E. Allemand, T. Hori, F. J. Iborra, N. Nozaki, M. Muraki, M. Hagiwara, A. R. Krainer, T. Fukagawa and K. Okawa, *J. Cell Biol.*, **2006**, 175, 389-400.
- 25) A. E. Kelly, C. Gheno, J. Z. Xue, C. Zierhut, H. Kimura and H. Funabiki, *Science*, **2010**, 330, 235-239.
- 26) A. Rechtsteiner, S. Ercan, T. Takasaki, T. M. Phippen, T. A. Egelhofer, W. Wang, H. Kimura, J. D. Lieb and S. Strome, *PLoS Genet.*, **2010**, 6, e1001091.
- 27) Y. Hayashi-Takanaka, K. Yamagata, T. Wakayama, T. J. Stasevich, T. Kainuma, T. Tsurimoto, M. Tachibana, Y. Shinkai, H. Kurumizaka, N. Nozaki and H. Kimura, *Nucleic Acids Res.*, **2011**, 39, 6475-6488.
- 28) T. Chandra, K. Kirschner, J. Y. Thuret, B. D. Pope, T. Ryba, S. Newman, K. Ahmed, S. A. Samarajiwa, R. Salama, T. Carroll, R. Stark, R. Janky, M. Narita, L. Xue, A. Chicas, S. Nunez, R. Janknecht, Y. Hayashi-Takanaka, M. D. Wilson, A. Marshall, D. T. Odom, N. M. Babu, D. P. Bazett-Jones, S. Tavaré, P. A. Edwards, S. W. Lowe, H. Kimura, D. M. Gilbert and M. Narita, *Mol. Cell*, **2012**, 47, 203-214.
- 29) J. Y. Kaimori, K. Maehara, Y. Hayashi-Takanaka, A. Harada, M. Fukuda, S. Yamamoto, N. Ichimaru, T. Umehara, S. Yokoyama, R. Matsuda, T. Ikura, K. Nagao, C. Obuse, N. Nozaki, S. Takahara, T. Takao, Y. Ohkawa, H. Kimura and Y. Isaka, *Sci. Rep.*, **2016**, 6, 24318.
- 30) C. Jenness, S. Giunta, N. M. Müller, H. Kimura, T. W. Muir and H. Funabiki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2018**, 115, E876-E885.

- 31) T. J. Stasevich, Y. Hayashi-Takanaka, Y. Sato, K. Maehara, Y. Ohkawa, K. Sakata-Sogawa, M. Tokunaga, T. Nagase, N. Nozaki, J. G. McNally and H. Kimura, *Nature*, **2014**, 516, 272-275.
- 32) J. D. Dias, T. Rito, E. Torlai Triglia, A. Kukalev, C. Ferrai, M. Chotalia, E. Brookes, H. Kimura and A. Pombo, *eLife*, **2015**, 4. pii: e11215.
- 33) H. Kimura, Y. Hayashi-Takanaka, T. J. Stasevich and Y. Sato, *Histochem. Cell Biol.*, **2015**, 144, 101-109.
- 34) Y. Sato, M. Mukai, J. Ueda, M. Muraki, T. J. Stasevich, N. Horikoshi, T. Kujirai, H. Kita, T. Kimura, S. Hira, Y. Okada, Y. Hayashi-Takanaka, C. Obuse, H. Kurumizaka, A. Kawahara, K. Yamagata, N. Nozaki and H. Kimura, *Sci. Rep.*, **2013**, 3, 2436.

[著者プロフィール]

氏名：木村 宏 (Hiroshi Kimura)

所属：東京工業大学 科学技術創成研究院

細胞制御工学研究センター

連絡先：〒226-8503 横浜市緑区長津田町 4259

TEL：045-924-5742

E-mail：hkimura@bio.titech.ac.jp

出身学校：北海道大学大学院理学研究科

学位：博士（理学）

専門分野：細胞生物学、エピジェネティクス

開発中

ヒストン修飾解析用抗体

近年、多くの生命現象にエピジェネティックな制御が関与していることが明らかとなっており、ヒストン修飾は最も重要なエピジェネティクスの一つとして認知されています。小社ではヒストン修飾を一細胞レベルで同時に解析するためのツールとして蛍光標識 - 修飾ヒストン抗体を開発しております。

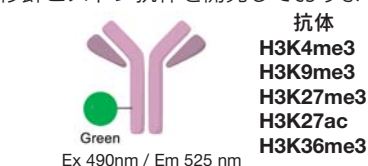
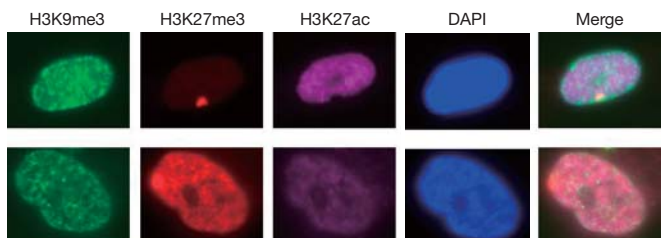


図 開発中の蛍光標識 - 修飾ヒストン抗体

<測定例>



上段：若い細胞（P4）、下段：老化細胞（P20）

図 WI-38 細胞の細胞老化に伴うヒストン修飾変化の同時解析

※ Green-H3K9me3 抗体、Red-H3K27me3 抗体、DeepRed-H3K27ac 抗体を使用

詳細についてご興味ございましたら、お問い合わせください。

E-mail: info@dojindo.co.jp FreeDial: 0120-489548

開発中

γ-H2AX 蛍光検出キット

ヒストン H2AX がリン酸化された γ-H2AX は抗がん剤、放射線、紫外線、化学物質等の外部ストレスによる DNA 損傷のマーカーとして幅広く用いられており、近年では細胞老化を評価する手段としての報告も増加傾向にあります。

小社では γ-H2AX をご希望の色で評価できるよう、波長の異なる 3 種類の検出キットを開発しております。

<測定例>

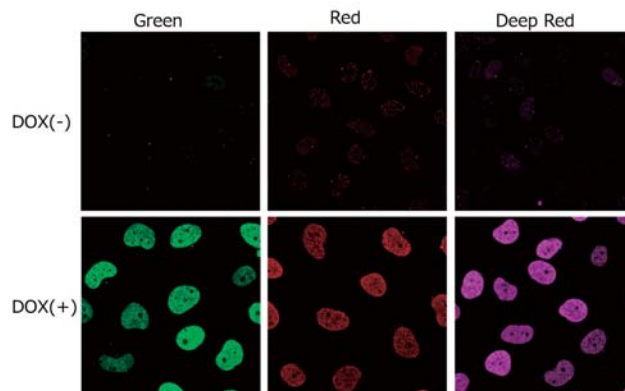


図 Doxorubicin (DOX) 処理した HeLa 細胞中の γ-H2AX の検出

詳細についてご興味ございましたら、お問い合わせください。

E-mail: info@dojindo.co.jp FreeDial: 0120-489548

細胞機能解析用試薬 一覧冊子のご案内

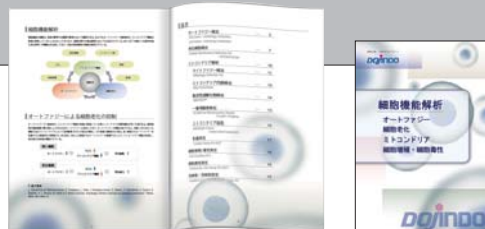
ミトコンドリア解析用試薬を含む、細胞機能解析関連製品を一冊に集約

【掲載製品】

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 同仁

検索



Topics on Chemistry

ヒストンコード解明のための発蛍光プラットフォームの開発

株式会社同仁化学研究所 下村 隆

真核生物の DNA は、核内においてヒストンタンパク質とその複合体であるクロマチンの状態で存在する。塩基性タンパク質であるヒストンはカチオン性であり、アニオン性の DNA と静電的に相互作用している。ヒストンの N 末端側の 50 残基程度のアミノ酸配列をヒストンテールと呼び、メチル化、アセチル化、リン酸化などの様々な化学修飾を受ける。例えば、ヒストンがアセチル化やリン酸化などの化学修飾を受けると、DNA の相互作用が弱まり転写が活性化する。一方で、DNA のメチル化は遺伝子発現を抑制する場合が多い。このような DNA の塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現の変化をエピジェネティクスとよぶ。

ヒストンテール上の様々な修飾（アセチル化、メチル化、リン酸化など）の組み合わせが、細胞の機能に重要な役割を果たすというヒストンコードが提唱されている。例えば、ヒストン 3 の N 末端から 4 番目リジンのメチル化（H3K4me）は遺伝子発現の活性化、H3K9me は遺伝子発現の抑制となる。さらに、H3S10ph（ph はリン酸化）は H3K9me3 の効果を抑制し、H3T11ph は H3K4 のメチル化を促進し、遺伝子活性化を促す。これらのヒストンコードの解明は基礎研究のみならず、臨床的に重要な創薬の標的の創出に結びつく可能性を秘めている。

エピジェネティクスの分野の中で、ヒストンの修飾位置や種類の組み合わせであるヒストンコードと生命現象の関係性は近年活発に研究されてきている。従来からヒストンコードを解析する手段として、質量分析法と抗体を用いたクロマチン免疫沈降法が使用されてきたが、スループット性の低さや、修飾の正確な位置を解析することが困難であることが課題となっていた。続いて、それらの課題を克服したマイクロアレイ技術が開発された。様々な抗ヒストン修飾抗体をガラススライドに固定化し、蛍光標識したヒストンタンパク質を結合させ解析する手法である。この手法では、一つ一つのヒストン修飾に対する抗体を準備することが困難であること、認識部位以外の周辺の修飾内容によつての抗体の結合能力にばらつきがあることが欠点となる。本稿では、ペプチドと小分子を用いたヒストンコードを解明するための最新のアレイ技術を報告する¹⁾。

本技術は、4 種類の蛍光センサー（図 1 の B, D, G, N）と様々な修飾ヒストンテールペプチドを混合して得られる蛍光強度を解析し、ペプチドのどの位置がどのような化学修飾を受けているかを

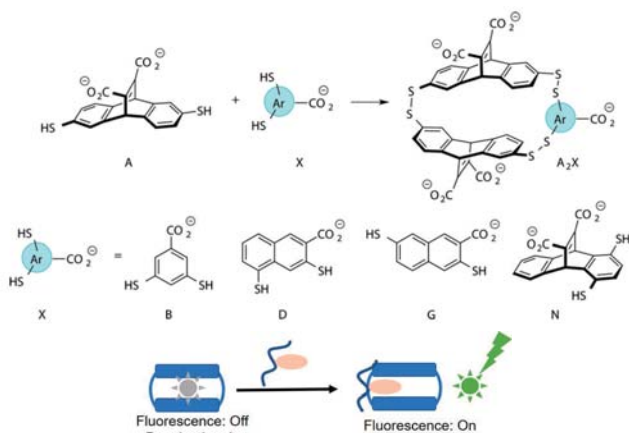


図 1 センサーの構造

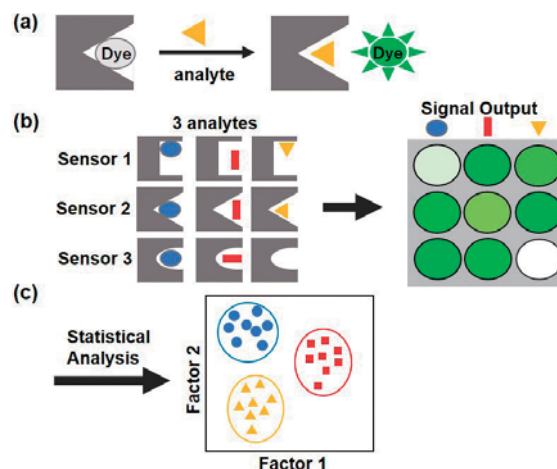


図 2 アレイを用いたヒストンコード解析

判別するものである。具体的な実験内容は図 2 の通りである。(a) 蛍光物質をセンサーに包接し、消光させる。次にペプチド (analyte) を混合し、センサーがペプチドを包接して蛍光物質が脱離すると蛍光を発する。(b) センサーとペプチドは、その組み合わせにより相互作用が異なり、得られる蛍光強度が異なる。(c) 各組み合わせの蛍光強度を基に統計的解析を行い、グラフを作成する。この結果から、サンプルのペプチドの修飾位置や修飾の内容（ヒストンコード）を知ることができる。

センサー（図 1）とヒストン H3 のペプチド配列（表 1）を用いて、本アレイ技術で解析した結果を示す（図 3）。センサーは二つの分子 A と一つの分子 X と架橋した構造（A₂X: X = B, D, G, N）となっている。A₂X は、図 1 の通り、中に空間があり蛍光物質やメチル化したリジンやアルギニンが包接される性質を有する。この性質は、X の構造やペプチド配列中のリン酸化やアセチル化など環境要因によって変化する。次に、センサー 4 種類とペプチド 13 種類をそれぞれの組み合わせで混合し、蛍光強度を測定後、統計的解析を行うと図 3 に示す結果が得られている。各データは一定の領域に集まっており、96% の正確度で判別可能であった。

表 1 ペプチドの配列

Abbreviation	peptide sequence
H3 1-12	Ac-ARTKQTARKSTGY-NH ₂
K9me3	Ac-ARTKQTARKme3STGY-NH ₂
K4ac	Ac-ARTKacQTARKSTGY-NH ₂
R2me2a	Ac-ARme2aTKQTARKSTGY-NH ₂
T11ph	Ac-ARTKQTARKSTphGY-NH ₂
R2me2a K9me2	Ac-ARme2aTKQTARKme2STGY-NH ₂
R2me2a K9me3	Ac-ARme2aTKQTARKme3STphGY-NH ₂
R2me2a K4me2	Ac-ARme2aTKme2QTARKSTphGY-NH ₂
R2me2a K4me3	Ac-ARme2aTKme3QTARKSTphGY-NH ₂
K9me2 T11ph	Ac-ARTKQTARKme2STphGY-NH ₂
K9me3 T11ph	Ac-ARTKQTARKme3STphGY-NH ₂
K3me2 T11ph	Ac-ARTKme2QTARKSTphGY-NH ₂
K4me3 T11ph	Ac-ARTKme3QTARKSTphGY-NH ₂

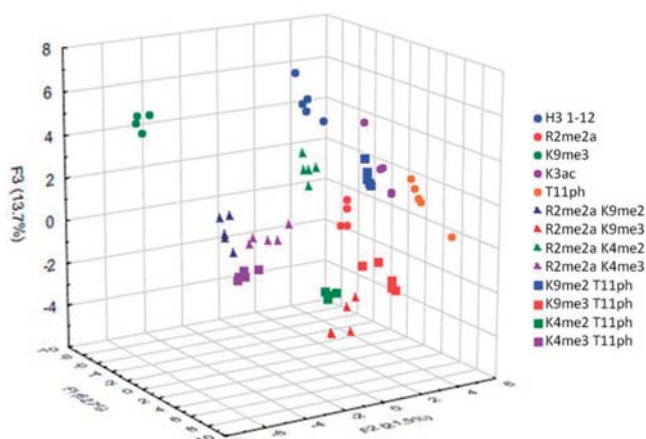


図3 ヒストンH3のヒストンコード解析結果
Reproduced by permission of the Royal Society of Chemistry

この結果より、リジン、アルギニンのメチル化、アセチル化、リン酸化といった様々な修飾を判別し、さらに複数の修飾に関しても適用可能であることが報告されている。

本技術は、リジンメチル化数の判別、酵素反応のモニタリング (data not shown) なども報告しており、*in vitro* でのヒストンコード研究の有用なツールになることが期待される。

[参考文献]

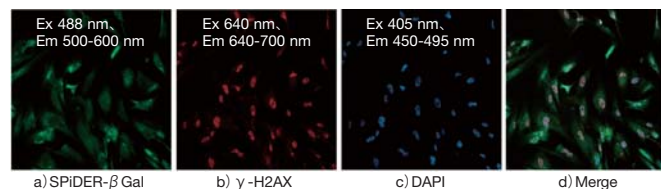
- 1) Peacor, B. C.; Ramsay, C. M.; Waters, M. L., *Chemical Science*, **2017**, 8, 1422-1428.

老化細胞検出キット

Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER-βGal

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。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 で相関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
Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER-βGal	10 assays	38,000	SG03

新製品

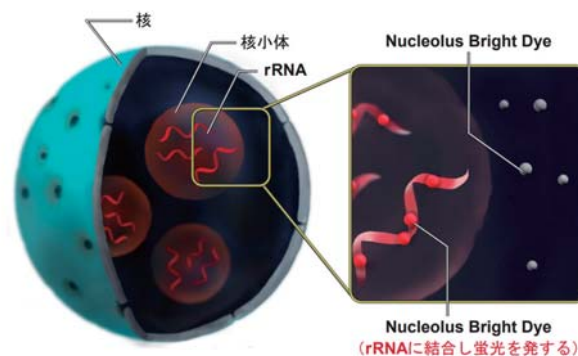
核小体染色試薬

Nucleolus Bright Green Nucleolus Bright Red

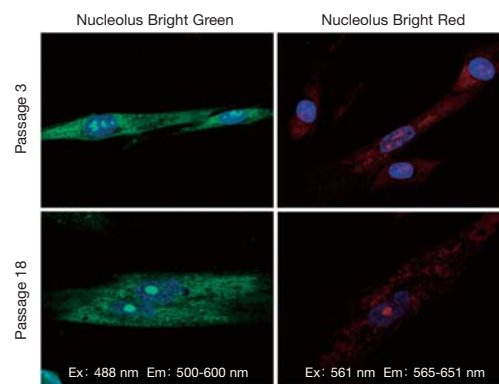
<特長>

- ・ RNA と結合し、核小体で強い蛍光を発する
- ・ 固定化細胞へ試薬を添加するだけ
- ・ 老化マーカーとしての評価実績がある

核小体の変化は多くの細胞内イベントに関わっていると言われています。近年ではがんの病理診断の指標だけでなく、DNA 損傷、オートファジー、細胞老化への関連性が報告され、注目を集めています。



<老化細胞の検出例>



継代数の異なる WI-38 細胞を、4%PFA 固定および 1%TritonX-100 による膜透過処理を行った後、Nucleolus Bright Green/Red および DAPI 染色し、蛍光観察しました。その結果、継代数が少ない細胞に比べ、継代数の多い細胞では核小体が肥大化あるいは一つに凝集しているものが多く観察されました。

老化と核小体に関する論文情報は小社 HP からご覧いただけます。

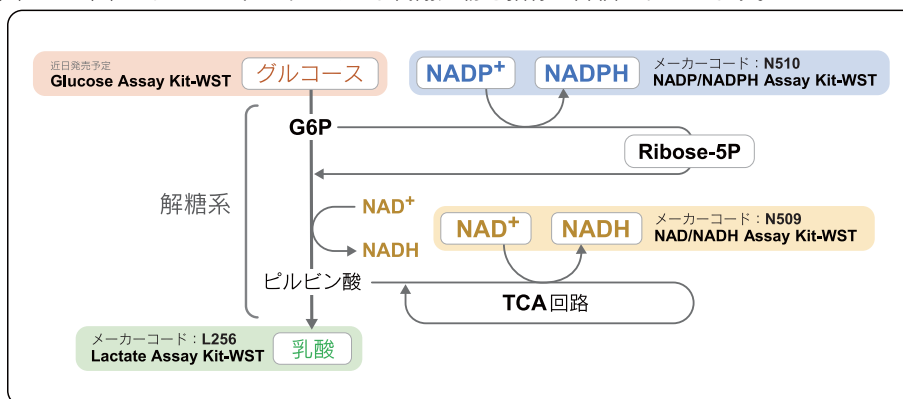
核小体 同仁 検索

本製品は、熊本大学発生医学研究所 細胞医学分野中尾光喜先生のご指導の下、製品化しました。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Nucleolus Bright Green	60 nmol	28,000	N511
Nucleolus Bright Red	60 nmol	28,000	N512

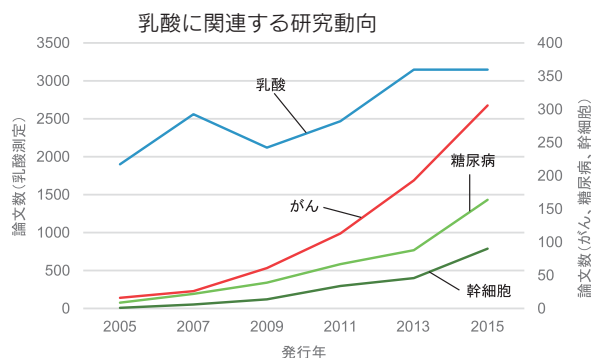
細胞内代謝の測定

細胞内の代謝システムである、解糖系や TCA 回路、ペントース-リン酸経路の解析は、細胞状態を理解する上で重要であり、グルコースや乳酸、NAD(P)/NAD(P)H などのエネルギーおよび代謝産物を指標に評価されています。



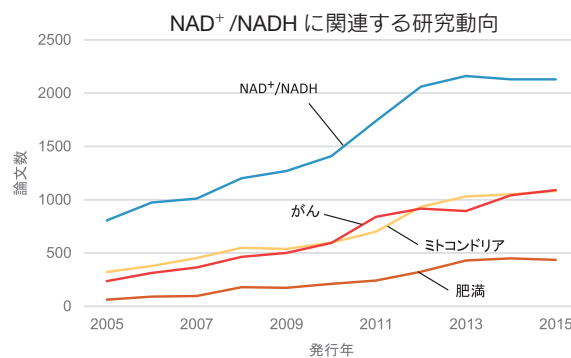
<乳酸と NAD⁺/NADH に関連した研究動向>

がん研究においては Warburg 効果の発見により乳酸を指標とした細胞内代謝に関する研究報告が増加していますが、近年では糖尿病や幹細胞の研究でも測定が行われるようになってきています。また細胞内 NAD⁺/NADH は、ミトコンドリア機能を理解する際の重要な代謝マーカーとして注目されていますが、最近では長寿に関わるサーチュインが NAD⁺量と深く関与していることが明らかとなっています。



データ参照元: Google Scholar

<検索ワード> 乳酸アッセイ: "lactate assay", がん: "lactate assay" cancer, 糖尿病: "lactate assay" diabetes, 幹細胞: "lactate assay" "stem cell"



データ参照元: Google Scholar

<検索ワード> NAD/NADH: "NAD/NADH", がん: "NAD/NADH" cancer, ミトコンドリア: "NAD/NADH" mitochondria, 肥満: "NAD/NADH" obesity

<代謝と疾患の関連性を示した報告例>

がんや糖尿病などの疾患の解明や治療薬の開発において、ミトコンドリア機能や細胞内代謝状態に注目した研究が増えてきております。下記表では、乳酸と NAD⁺/NADH を指標に評価されている事例を紹介します。

代謝への影響因子	乳酸量	NAD ⁺ /NADH 比	サンプル
解糖系阻害による変化	↓	↑	HeLa 細胞 (解糖系阻害剤処理)
ミトコンドリア機能低下	n/a	↓	哺乳動物細胞 (mtDNA 突然変異モデル)
	↑	n/a	個体老化マウスの脳
	↑	(↓ NAD ⁺ 量)	がん細胞
高インスリン血症	↑	n/a	早期ヒト糖尿病患者の血漿
NAMPT* (NAD ⁺ 合成酵素) 量低下 * Nicotinamide phosphoribosyltransferase	n/a	(↓ NAD ⁺ 量)	個体老化マウス (肝臓、白色脂肪組織、骨格筋)

上記報告に関する論文情報および関連する代謝マップを、小社 HP で案内しています。

細胞内代謝 同仁

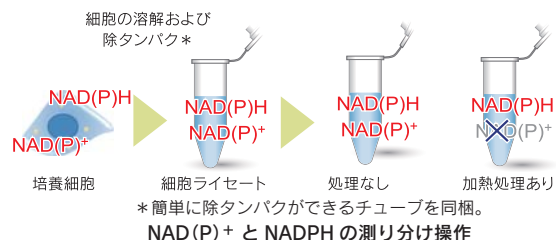
検索

新製品

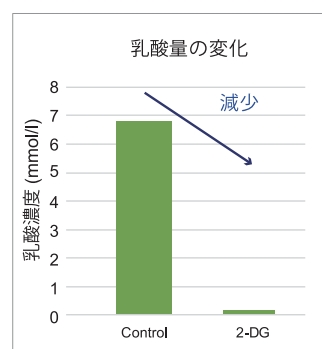
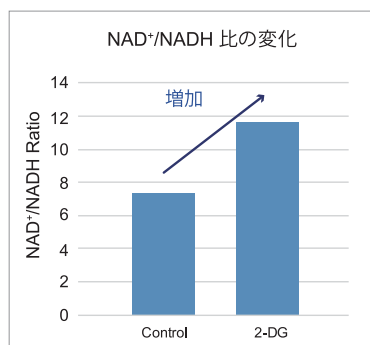
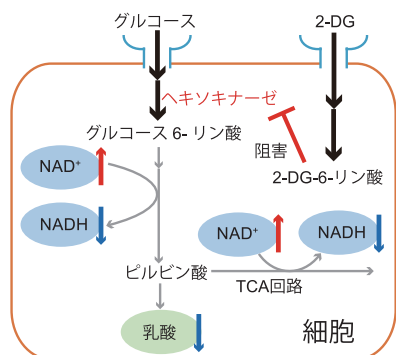
細胞内代謝 [NAD(P)/NAD(P)H] 定量キット

NAD/NADH Assay Kit-WST NADP/NADPH Assay Kit-WST

細胞内の NAD(P)^+ と NAD(P)H 量は細胞内のエネルギー代謝やレドックスバランスを制御する重要な電子伝達物質であり、細胞内の状態を評価する上で重要な指標となります。本キットではキット付属の抽出バッファーと除タンパク質用チューブを用いて培養細胞から簡便に測定サンプルを調製でき、プレートアッセイにて NAD^+ と NADH 及び NADP^+ と NADPH の量と比を測定することができます。



<細胞を用いた測定例>



HeLa 細胞 に 2-Deoxy-D-glucose (2-DG) を添加し、乳酸量および NAD^+ / NADH 比を確認しました。乳酸量は、培養上清を用いて Lactate Assay Kit-WST (製品コード: L256) にて測定し、培養上清除去後の細胞を用いて NAD^+ / NADH 比を NAD/NADH Assay Kit-WST を用いて測定しました。その結果、2-DG 添加により細胞内の解糖系が阻害されたことで乳酸量は減少し、 NAD^+ / NADH 比は増加することがわかりました。

これから代謝を測定される方へ、W キャンペーンを実施中です！
(30%OFF + 万が一実験サポート) 期間限定：2018 年 10 月 31 日 詳細は小社 HP をご覧ください。

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
NADP/NADPH Assay Kit-WST	100 tests	54,000	N510

NAD 同仁 または NADP 同仁

検索

開発中

乳酸定量キット

Lactate Assay Kit-WST

培養上清または組織・細胞の破碎液を用い、試薬を添加するだけの簡便な操作で乳酸量を定量できます。まずは試したいという要望に応え小容量を用意しております。



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

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	

グルコース定量キット

グルコースは生体のエネルギー源として最も重要な物質であり、細胞の主要なエネルギー代謝の指標の1つです。糖尿病や肥満といった研究分野だけでなく、がん細胞ではグルコースの取り込みが亢進していることを利用し、がん研究においても糖代謝の指標としてよく使用されています。

小社では、細胞培養上清中のグルコース量を簡便に定量できるキットを開発中です。

詳細についてご興味ございましたら、お問い合わせください。

E-mail: info@dojindo.co.jp FreeDial: 0120-489548

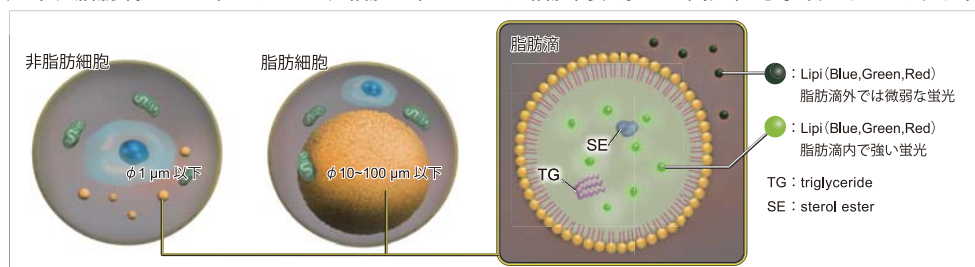
新製品

脂肪滴染色蛍光試薬

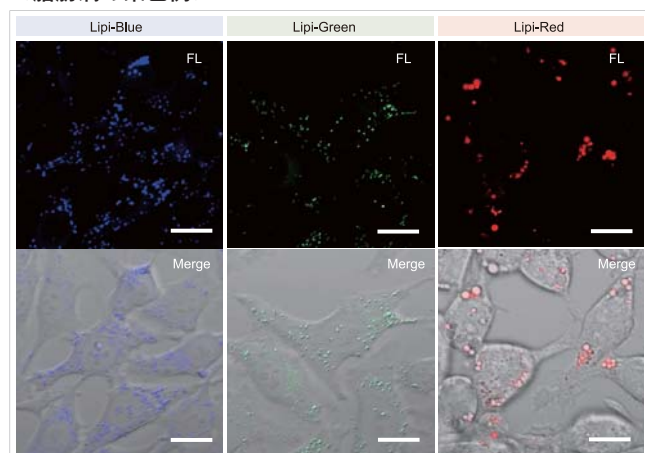
Lipi シリーズ (Blue, Green, Red)

Lipi シリーズは、脂肪親和性の高い低分子蛍光試薬であり、疎水性環境下で蛍光が増強します。また、試薬を添加するだけで生細胞および固定化細胞中の脂肪滴を明瞭に観察することができます。

脂肪滴は、トリアシルグリセロールやコレステロールエステルなどの中性脂肪が単分層のリン脂質一重膜によって取り囲まれた構造体です。脂肪滴はその表面に種々のタンパク質が結合し、体内の脂質代謝制御において重要な役割を担っていることが明らかになってきており、近年、脂肪滴とオートファジー、細胞老化といった細胞内現象との関連性も示唆されております。



< 脂肪滴の染色例 >



< 検出条件 >

- ・ Lipi-Blue Ex 405 nm / Em 450-500 nm
- ・ Lipi-Green Ex 488 nm / Em 500-550 nm
- ・ Lipi-Red Ex 561 nm / Em 565-650 nm

上段 蛍光画像

下段 位相差像とのマージ画像

スケールバー : 20 μm

HeLa 細胞の培養液中に 200 μmol/l オレイン酸を添加、一晩培養後に細胞を PBS で洗浄し Lipi シリーズの各色素 1 μmol/l にて 15 分間染色し観察しました。

< 市販試薬との性能比較 >

Lipi シリーズでは、既存の脂肪滴染色試薬の課題（選択性、フィルター適応性、滞留性）を大幅に改善しました。また色素ラインナップの充実により、多重染色時の色素選択が容易に行えるようになりました。

	同仁化学製品			市販品 (T 社)		
	Lipi-Blue	Lipi-Green	Lipi-Red	Oil Red O (比色)	Nile Red	試薬 B
生細胞の染色	○	○	○	×	○	○
固定化細胞の染色	○	○	○	○	○	○
脂肪滴への選択性 (低バックグラウンド)	○	○	○	×	×	△
汎用フィルターへの適応	○	○	○	n.d.	×	○
生細胞内での滞留性	○	○	×	n.d.	×	×

*GFP フィルターに漏れ込む

品名	容量	希望納入価格 (¥)	メーカーコード
Lipi-Blue	10 nmol	18,000	LD01
Lipi-Green	10 nmol	18,000	LD02
Lipi-Red	100 nmol	18,000	LD03

* 35 nm dish : 10 ~ 50 枚分

アプリケーションデータは小社 HP よりご覧いただけます。

脂肪滴 同仁

検索

オートファジー検出試薬

DAPGreen - Autophagy Detection DALGreen - Autophagy Detection

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。DAPGreen, 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。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。

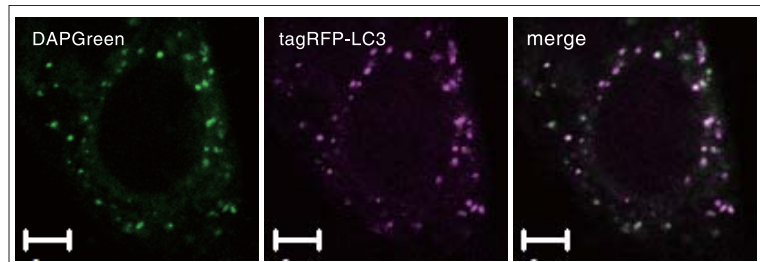
< 検出試薬の概要 >

	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 nm Em 500-560 nm ※ 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 (0.1 μmol/l で使用時)	LC3-GFP MDC Cyto-ID など
DALGreen	○	○	×	Ex 350-450 nm Em 500-560 nm ※ 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 (1.0 μmol/l で使用時)	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。

< 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 μm

オートファジー誘導条件

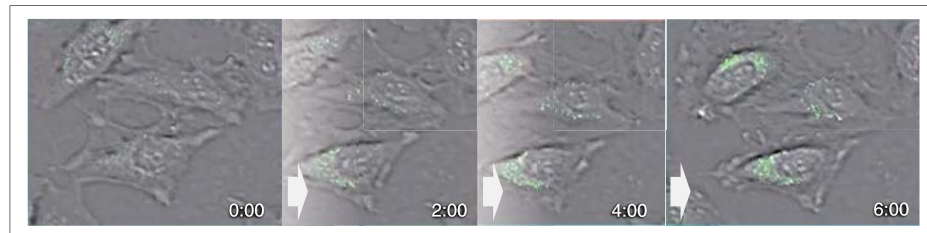
RFP-LC3 発現 HeLa 細胞に DAPGreen 添加後、Rapamycin によりオートファジーを誘導

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。

< タイムラプスで検出 (DALGreen の使用例) >

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。その結果、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。



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 nm / Em 525/50 nm
倍率 : 20 倍

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

本製品を使用した論文がオープンアクセスになりました。
詳細は、小社 HP よりご覧いただけます。

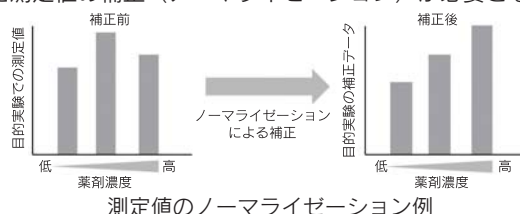
オートファジー 同仁 検索

9月25日発売予定

核染色ノーマライゼーションキット

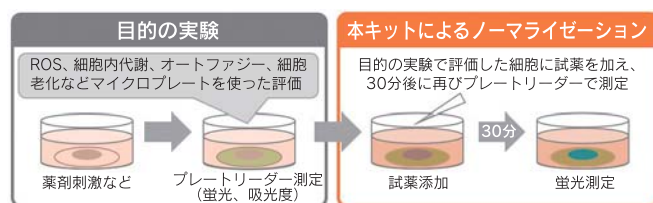
Cell Count Normalization Kit

マイクロプレートを用いた細胞の解析では、得られる結果がウェル中の細胞数によって変化する場合があります。その際には、細胞数のカウントやトータルタンパク質量の確認により、得られた測定値の補正（ノーマライゼーション）が必要となります。



<評価の流れ>

本キットでは、試薬を細胞培養液に添加するだけで、細胞内の核を染色し得られる蛍光強度から、細胞数を簡単に評価することができます。



<実験に応じて2種の操作から選択できる>

操作法A：試薬添加だけの簡便操作

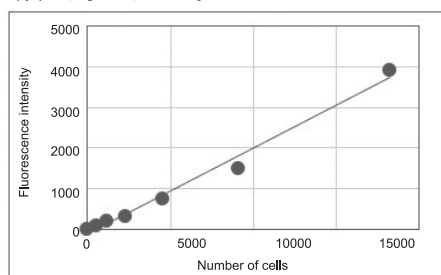
独自の消光バッファの採用により、血清やフェノールレッドの影響を受けず試薬を添加するだけで評価できます。

操作法B：培地交換後の評価で様々な評価系に適用

汎用性の高い無色透明バッファを使った染色なので、浮遊細胞や上方励起のプレートリーダーにも適用できます。

細胞数との相関

本キットで測定した蛍光強度を細胞数毎にプロットしたところ、高い直線性を示しました。



細胞数による蛍光強度の変化

HeLa細胞を培地にて段階希釈し96ウェルマイクロプレートに播種。一晚培養後、本キットにて測定した蛍光値を細胞数毎にプロットしました。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Cell Count Normalization Kit	200 tests	8,000	C544
	1000 tests	20,000	

9月25日発売予定

ミトコンドリア膜電位測定キット

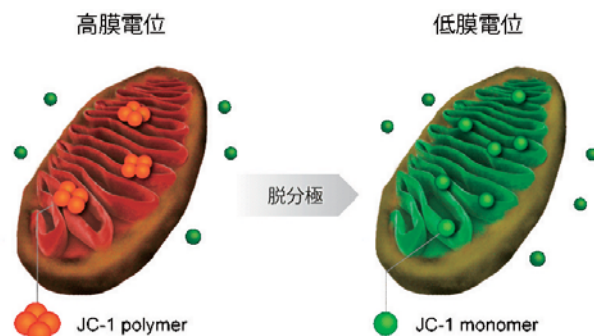
JC-1 MitoMP Detection Kit

ミトコンドリアは、ATP等のエネルギー産生場であり、その活性の変化や機能障害ががんや老化、神経変性疾患などと密接に関連しています。そのためミトコンドリアの状態を理解することは重要であり、その指標としてエネルギー産生に伴い生じる膜電位差が評価されています。

本キットは、汎用のJC-1を用いており、はじめての方でも使いやすいよう、難溶性色素の溶解プロトコルをはじめ様々なアプリケーションをご用意しております。

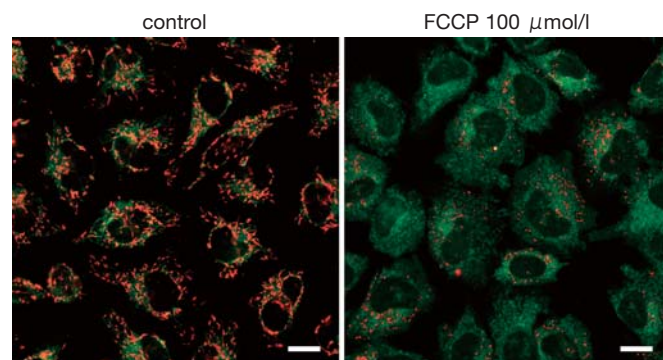
測定原理

ミトコンドリアが正常で膜電位差が保たれた状態ではJC-1が凝集し赤色の蛍光を発し、膜電位が低下するとJC-1が単量体として存在し緑色の蛍光を発します。この赤色と緑色の蛍光強度の変化を、ミトコンドリア膜電位の状態として評価することができます。



細胞での測定例

HeLa細胞を脱分極剤であるcarbonylcyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP)で処理し本キットにて染色しました。



Green: Ex 488 nm / Em 500-550 nm
Red: Ex 561 nm / Em 560-610 nm

スケールバー：20μm

FCCPで処理したHeLa細胞は、未処理のHeLa細胞で観察された赤色の蛍光が減少し、膜電位が低下していることを確認しました。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
JC-1 MitoMP Detection Kit	1 set	23,000	MT09

新製品

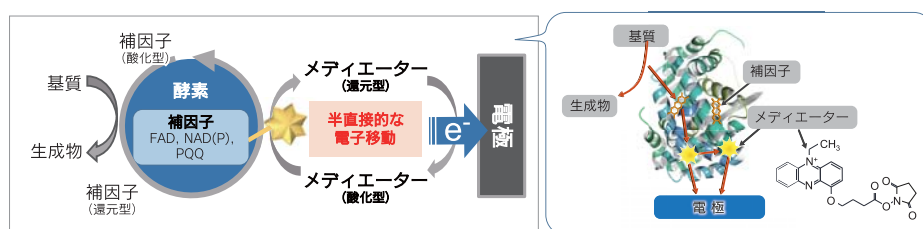
結合型メディエーター

Amine-reactive PES

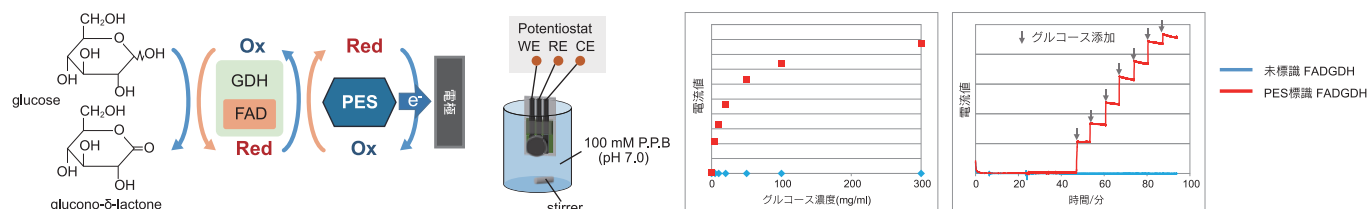
<特長>

- ・混ぜるだけでアミノ基に結合できる
- ・様々な酸化還元酵素での使用実績あり

酸化還元反応を仲介する電子メディエーターを、混ぜるだけで目的物のアミノ基に結合できるこれまでにない試薬です。バイオセンサーや燃料電池分野では、メディエーター漏出の問題が解決でき、電子伝達効率の向上や有害金属が不要になる等、数多くの興味をいただいております。



<測定例：グルコース測定>



電子メディエーター修飾酵素 (GDH) を用いることで未修飾 GDH では不可能なグルコース濃度の定量及びモニタリングが可能です。

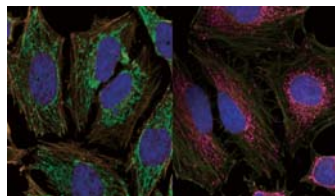
品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Amine-reactive PES	10 mg	52,500	A543

9月25日発売予定

DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

Ab-10 Rapid Labeling Kit 1 sample 包装

Ab-10 Rapid Labeling Kit シリーズは 10 µg の抗体に 30 分以内に標識するためのキットです。自分の抗体で試したいというご要望から、手軽に試せる 1 sample 包装をご用意いたしました。



細胞：HeLa 細胞
アクチン (黄)：
HiLyte Fluor™ 555 標識抗体
ミトコンドリア (緑)：
Fluorescein 標識抗体
ミトコンドリア (赤)：
HiLyte Fluor™ 647 標識抗体

詳細についてご興味ございましたら、お問い合わせください。

E-mail: info@dojindo.co.jp FreeDial: 0120-489548

抗体標識 同仁 検索

近日出展予定の学会

第 91 回日本生化学会大会

期日：2018 年 9 月 24 日 (月) ~ 26 日 (水)
会場：国立京都国際会館

第 77 回日本癌学会学術総会

期日：2018 年 9 月 27 日 (木) ~ 29 日 (土)
会場：大阪国際会議場 リーガロイヤルホテル

第 41 回日本分子生物学会年会

期日：2018 年 11 月 28 日 (水) ~ 30 日 (金)
会場：パシフィコ横浜

日本ミトコンドリア学会 第 18 回年会

期日：2018 年 12 月 7 日 (金) ~ 9 日 (日)
会場：久留米大学 筑水会館 イベントホール

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 にてご案内いたします。



29th Forum in DOJIN

細胞と個体の老化生物学

— 科学は不老長寿に迫れるか —

2018.11.22 [木] 熊本ホテルキャッスル地下1階

9:30~17:00 (開場9:00) 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

参加申込み 受付け中

フォーラム 同仁 検索



参加費
無料

定員
140名

Program

9:30~9:35 主催者挨拶 上野 右一郎 (株同仁化学研究所) 9:35~9:45 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	Session 2	Session 3
座長 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) 9:45~10:45 鍋島 陽一 (公益財団法人先端医療産業都市推進機構 先端医療研究センター-研究所) 「クロトー研究の最近の進展」 10:45~11:30 中西 真 (東京大学医科学研究所 癌・細胞増殖部門 癌防衛シグナル分野) 「老化細胞特有の代謝特性と形質維持」 11:30~12:15 中尾 光善 (熊本大学医学部 細胞医学分野) 「エビゲノム因子による細胞老化と病態の分子基盤」 12:15~13:30 昼食 (株同仁化学研究所 「製品紹介」 12:30~13:15)	座長 三隅 将吾 (熊本大学大学院 生命科学研究部 環境分子保健学分野) 13:30~14:15 田原 栄俊 (広島大学大学院 医歯薬保健学研究科 薬学講座) 「テロメア・マイクロRNAによる細胞と個体の老化制御と健康長寿への挑戦」 14:15~15:00 大谷 直子 (大阪市立大学大学院 医学研究科 分子生体医学講座 病理生理学) 「細胞老化とSASP: その誘導機構と生体における役割」 15:00~15:15 コーヒーブレイク	座長 三浦 潤 (熊本大学名誉教授) 15:15~16:00 下川 功 (長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 医科学専攻 病理学分野) 「カロリー制限による老化制御機構」 16:00~16:45 三浦 恭子 (熊本大学大学院 生命科学研究部 老化・健康長寿学分野/大学院先端機構) 「最長寿命歯類ハダカデバネズミにおける老化耐性・がん化耐性機構の探求」 16:45~17:00 閉会の挨拶 山本 哲郎 (元熊本大学大学院 生命科学研究部 分子病理学分野) 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
(受付時間: 平日 9:00 ~ 17:00)
(土・日・祝日は除く)