

ドージンニュース

2020 No.175

ISSN 0385-1516

オルガネラゾーン

一総 説-

小胞体ストレス応答とゴルジ体ストレス応答 兵庫県立大学 吉田 秀郎・佐々木 柱奈江

一注目の研究一

ER-ThT を用いた小胞体ストレス下における タンパク質凝集体の検出

株式会社同仁化学研究所 末永 元輝





表紙撮影:熊本県阿蘇市

草千里から烏帽子岳を見る 冬の阿蘇草千里は樹氷がつくほど冷え

込む。 k島俊介氏

CONTENTS

Review

小胞体ストレス応答とゴルジ体ストレス応答 ● [1]

兵庫県立大学 吉田 秀郎・佐々木 桂奈江

Topics on Chemistry

ER-ThT を用いた小胞体ストレス下における タンパク質凝集体の検出 ● [4] 株式会社同仁化学研究所 末永 元輝

Commercial

ミトコンドリア膜電位検出キット (JC-1) ● [8]
ミトコンドリア染色試薬 ● [10]
酸化ストレス検出試薬 ● [13]
新製品

 細胞膜染色試薬 ● [5]
 エンドサイトーシス検出試薬 ● [6]
 エクソソーム染色キット ● [7]
 MT-1 ミトコンドリア膜電位検出キット ● [9]
 α - ケトグルタル酸測定キット ● [11]
 ATP 測定キット ● [11]
 ROS 検出キット ● [12]

開発中



グルコース細胞内取り込みアッセイキット ●──

小胞体ストレス応答とゴルジ体ストレス応答 ER stress response and Golgi stress response



吉田 秀郎 兵庫県立大学 大学院生命理学研究科 教授



佐々木 桂奈江 兵庫県立大学 大学院生命理学研究科 助教

Abstract

The endoplasmic reticulum (ER) and the Golgi apparatus are organelles where secretory and membrane proteins are correctly folded and post-translationally modified, respectively. When cells increase synthesis of secretory and membrane proteins, the capacity of the ER and the Golgi becomes insufficient (ER stress and Golgi stress), resulting in stress-induced cell death. To cope with these stresses, eukaryotic cells activate the homeostatic mechanisms called the ER stress response as well as the Golgi stress response, and increase the capacity of these organelles. In this review article, we described basics of the ER stress response and the Golgi stress response.

1. はじめに

細胞の中には小胞体やゴルジ体など様々な細胞小器官が存在するが、同じ細胞種であればどの細胞でもそれぞれの細胞小器官の存在量はほぼ一定である。細胞が分裂して細胞小器官の量が半分に減っても、やがて細胞小器官の量も2倍に増えて、量が一定になるように調節されているように見える。細胞分裂によって細胞から小胞体がなくなってしまったり、細胞がゴルジ体だらけになってしまうことはない。細胞に眼がついているわけでもないの

に、どうやって調節しているのか、とても不思議である。一方、 抗体産生細胞などのようにタンパク質の分泌が盛んな細胞では、 分泌タンパク質の合成と加工を行う小胞体やゴルジ体が著しく発 達している。細胞小器官の量は、細胞の需要に応じて厳密に調節 されているように見える。そう考えれば、細胞が分裂しても細胞 小器官の量が一定に保たれることも説明が付く。このような細胞 小器官の量的調節機構は細胞が自律的に機能するために必須の機 能であり、細胞生物学の根本的な命題の一つであるが、長い間核

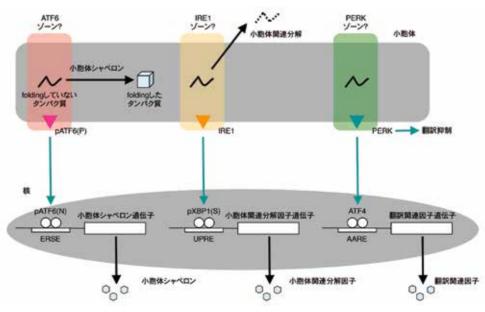


図1 哺乳類の小胞体ストレス応答機構

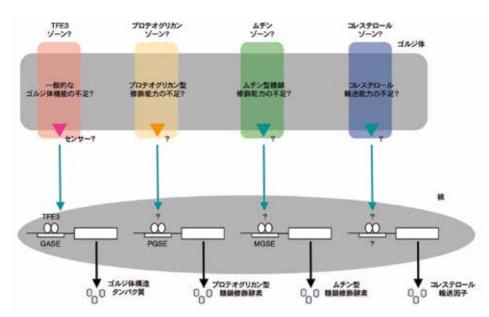


図2 哺乳類のゴルジ体ストレス応答機構

の量的調節機構(細胞周期)の研究以外は、ほとんど顧みられることがなかった¹⁾。本総説では、小胞体及びゴルジ体の量的調節機構である小胞体ストレス応答、ゴルジ体ストレス応答について概説する。

2. 小胞体ストレス応答

森和俊博士(京都大学)は、小胞体の量的調節機構である小胞 体ストレス応答の研究に果敢に挑戦し、その分子機構を明らかに した^{2,3)}。哺乳類の小胞体ストレス応答には ATF6 経路と IRE1 経路、PERK 経路という3つの応答経路が存在し、それぞれ異な る小胞体の機能を制御している(図1)。それぞれの応答経路は、 ①小胞体の機能が不足していること(小胞体ストレス)を感知す るセンサー、②センサーによって活性化される転写因子、③転写 因子が結合するエンハンサー配列、④転写が誘導される標的遺伝 子の4つからなっている。ATF6 経路は、小胞体でのタンパク質 フォールディング能力を増強する経路である。センサー分子の pATF6(P)は、通常は小胞体膜上に存在している。フォールディ ング能力が不足してフォールディングが完了していない異常タン パク質が小胞体に蓄積すると(小胞体ストレス状態)、pATF6(P) は小胞輸送によってゴルジ体へ輸送され、ゴルジ体に存在する 2 つのプロテアーゼ(S1P と S2P)によって切断されて生じる転 写因子 pATF6(N) がエンハンサー配列 ERSE に結合することで、 小胞体シャペロン遺伝子の転写を誘導する。IRE1 経路は、小胞 体に蓄積した異常タンパク質を分解する機構(小胞体関連分解 (ERAD)) を増強する経路である。小胞体膜上に存在するセン サー分子 IRE1 は平常時には単量体であるが、異常タンパク質を 感知すると多量体化して活性化し、XBP1 の前駆体 mRNA を細 胞質でスプライシングすることによって成熟型 mRNA へと変換 する。この成熟型 mRNA から翻訳された転写因子 pXBP1(S)が エンハンサー配列 UPRE に結合することによって ERAD 因子遺 伝子の転写を誘導する。PERK 経路は、一時的な翻訳抑制を行う とともに、翻訳関連因子や細胞死の誘導を行う経路である。セン サーである PERK は小胞体膜上に存在し、IRE1 とよく似た機構 によって活性化する。活性化した PERK は翻訳開始因子である elF2 のαサブユニットをリン酸化することで翻訳を一時的に抑制し、それ以上小胞体ストレスが悪化しないようにしている。その間に ATF6 経路や IRE1 経路によって小胞体内の異常タンパク質が処理されればよいが、依然として異常タンパク質が蓄積しているときには PERK 経路によって転写因子 ATF4 の翻訳が誘導され、ATF4 がエンハンサー配列 AARE に結合することで細胞死を誘導する転写因子 CHOP の発現が誘導される。

3. ゴルジ体ストレス応答

吉田秀郎博士(兵庫県立大学)は、森和俊博士の研究室から独 立する際に、世界に先駆けてゴルジ体の量的調節機構であるゴル ジ体ストレス応答の研究を開始し、現在は佐々木桂奈江博士(兵 庫県立大学)とともに解析を進めている。ゴルジ体ストレス応答 にも複数の応答経路が存在し、ゴルジ体の異なる機能を増強して いる 4) (図 2)。TFE3 経路はゴルジ体の一般的な機能を増強する 経路であり、その標的遺伝子にはゴルジ体の構造タンパク質であ る GCP60 や小胞輸送に関与する GM130、Giantin などが含まれ る。これらの標的遺伝子の転写を制御するエンハンサー配列は GASE (Golgi stress response element) と呼ばれ、そのコンセ ンサス配列は ACGTGGC である 5)。TFE3 経路を制御する転写因 子には bHLH-ZIP 型転写因子である TFE3 ⁶⁾ と MLX ⁷⁾ がある。 平常時には TFE3 はリン酸化されて細胞質に留められているが、 ゴルジ体ストレス時(ゴルジ体の一般的な機能が不足した時)に は脱リン酸化されて核へ移行し、GASE に結合することで標的遺 伝子の転写を誘導する。MLX は GASE に競合的に結合すること で、TFE3 の機能を抑制する転写抑制因子だと考えられている。

プロテオグリカン経路は、プロテオグリカン型の糖鎖修飾能力を増強する応答経路である。プロテオグリカンは軟骨の潤滑を担う分子であるが、その機能にはプロテオグリカン型の糖鎖修飾がきわめて重要である。標的遺伝子にはプロテオグリカンの糖鎖修飾酵素や硫酸化酵素などの遺伝子が多く含まれている。これらの標的遺伝子のプロモーター上に存在するエンハンサー配列 PGSE

(proteoglycan-type Golgi stress response element) が転写誘導を制御していることがわかっているが®、センサー分子や転写因子はまだ未知である。軟骨細胞などプロテオグリカンを産生する細胞では、プロテオグリカン経路が活性化されることで、プロテオグリカン型糖鎖修飾能力を増強していると考えられる。

ムチン経路は、ムチン型の糖鎖修飾能力を増強する応答経路である。ムチンは多量のムチン型糖鎖修飾を受けており、これらの糖鎖が粘膜を形成することに重要である。標的遺伝子はムチン型糖鎖修飾酵素群の遺伝子であり、エンハンサー配列 MGSE (mucin-type Golgi stress response element) が同定されている⁹⁾。センサーと転写因子は未同定である。

コレステロール経路は、小胞体からゴルジ体へのコレステロールの輸送能力を増強する応答経路である 100。標的遺伝子として OSBP2 は同定されているが、その他の制御因子は同定されていない。

上記の応答経路以外にも、他の研究者からいくつかの応答経路が報告されている。Jan Reiling 博士(MIT)は、CREB3 経路を同定した。膜貫通型センサーである CREB3 が活性化されると CREB3 が切断され、膜から遊離した CREB3 が転写因子として働いて ARF4 遺伝子の転写を誘導し、結果としてアポトーシスを誘導する 11)。宮田信吾博士(近畿大学)が同定した HSP47 経路は、逆にゴルジ体ストレスによるアポトーシスを抑制する経路である 12)。

4. おわりに

以上、小胞体ストレス応答とゴルジ体ストレス応答について概説した。今後小胞体ストレス応答については、その分子機構の詳細な解析が進むとともに、個体における小胞体ストレス応答の生理的役割の解析が進んでいくものと考えられる。ゴルジ体ストレス応答に関しては、未同定の制御因子群を網羅的に同定するとともに、これらの応答経路のノックアウトマウスの表現型を解析することによって、ゴルジ体ストレス応答の全体像を明らかにしていくことが肝要と考えている。

[参考文献]

- K. Sasaki and H. Yoshida, Organelle autoregulation-stress responses in the ER, Golgi, mitochondria and lysosome, *J. Biochem.*, 2015, 157, 185-195.
- K. Mori, The unfolded protein response: the dawn of a new field, Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci., 2015, 91, 469-480.
- 3. H. Yoshida, ER stress and diseases, FEBS J., 2007, 274, 630-658.
- M. Taniguchi and H. Yoshida, TFE3, HSP47, and CREB3 Pathways of the Mammalian Golgi Stress Response, Cell Struct. Funct., 2017, 42, 27-36.
- M. Oku, S. Tanakura, A. Uemura, M. Sohda, Y. Misumi, M. Taniguchi, S. Wakabayashi and H. Yoshida, Novel cis-acting element GASE regulates transcriptional induction by the Golgi stress response, *Cell Struct. Funct.*, 2011, 36, 1-12.
- M. Taniguchi, S. Nadanaka, S. Tanakura, S. Sawaguchi, S. Midori, Y. Kawai, S. Yamaguchi, Y. Shimada, Y. Nakamura, Y. Matsumura, N. Fujita, N. Araki, M. Yamamoto, M. Oku, S. Wakabayashi, H. Kitagawa and H. Yoshida, TFE3 is a bHLH-ZIP-type transcription factor that regulates the mammalian Golgi stress response, Cell Struct. Funct., 2015, 40, 13-30.
- M. Taniguchi, K. Sasaki-Osugi, M. Oku, S. Sawaguchi, S. Tanakura, Y. Kawai, S. Wakabayashi and H. Yoshida, MLX Is a Transcriptional Repressor of the Mammalian Golgi Stress Response, *Cell Struct. Funct.*, 2016, 41, 93-104.
- 8. K. Sasaki, R. Komori, M. Taniguchi, A. Shimaoka, S. Midori, M. Yamamoto, C. Okuda, R. Tanaka, M. Sakamoto, S. Wakabayashi and H.

- Yoshida, PGSE Is a Novel Enhancer Regulating the Proteoglycan Pathway of the Mammalian Golgi Stress Response, *Cell Struct. Funct.*, **2019**, *44*, 1-19
- M. I. Jamaludin, S. Wakabayashi, M. Taniguchi, K. Sasaki, R. Komori, H. Kawamura, H. Takase, M. Sakamoto and H. Yoshida, MGSE Regulates Crosstalk from the Mucin Pathway to the TFE3 Pathway of the Golgi Stress Response, Cell Struct. Funct., 2019, 44, 137-151.
- M. Kimura, K. Sasaki, Y. Fukutani, H. Yoshida, I. Ohsawa, M. Yohda and K. Sakurai, Anticancer saponin OSW-1 is a novel class of selective Golgi stress inducer. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2019, 29, 1732-17369.
- J. H. Reiling, A. J. Olive, S. Sanyal, J. E. Carette, T. R. Brummelkamp, H. L. Ploegh, M. N. Starnbach and D. M. Sabatini, A CREB3-ARF4 signalling pathway mediates the response to Golgi stress and susceptibility to pathogens, *Nat. Cell Biol.*, 2013, 15, 1473-1485.
- S. Miyata, T. Mizuno, Y. Koyama, T. Katayama and M. Tohyama, The endoplasmic reticulum-resident chaperone heat shock protein 47 protects the Golgi apparatus from the effects of O-glycosylation inhibition, *PLoS One*, 2013, 8, e69732.

[著者プロフィール]

氏名:佐々木 桂奈江(SASAKI Kanae) 所属:兵庫県立大学大学院生命理学研究科 〒 678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町 3-2-1

E-mail:sasaki@sci.u-hyogo.ac.jp 出身学校:名古屋大学大学院生命農学研究科

学位:博士(農学)

専門分野:細胞生物学、細胞小器官、ストレス応答

現在の研究テーマ:ゴルジ体ストレス応答

氏名:吉田 秀郎 (YOSHIDA Hiderou) 所属:兵庫県立大学大学院生命理学研究科 〒678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町 3-2-1

E-mail:hide@sci.u-hyogo.ac.jp 出身学校:京都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、細胞小器官、ストレス応答

現在の研究テーマ:ゴルジ体ストレス応答



Topics on Chemistry

ER-ThT を用いた小胞体ストレス下におけるタンパク質凝集体の検出

株式会社同仁化学研究所 末永 元輝

小胞体(endoplasmic reticulum, ER)は、タンパク質が正しく機能するようにフォールディングや翻訳後修飾を行う重要なオルガネラである。小胞体の機能に障害が起きると、タンパク質が正常にフォールディングせず、不良タンパク質が凝集体として蓄積していき、小胞体ストレスが誘導される。これに対し細胞は小胞体ストレス応答を起こすことで細胞へのダメージを防いでいるが、過度なストレスによって防御機構が破綻すると細胞がアポトーシスを起こし、細胞の脱落や組織の機能不全が起きるなど、様々な障害が起きる。小胞体ストレスは糖尿病、神経変性疾患、代謝性疾患、がんなどの多くの疾患との関連が報告 1)-4) されており、その要因となるタンパク質凝集体の解析は疾患との関連を明らかにするうえで重要である。本稿では、Verwilst らが開発した、小胞体内のタンパク質凝集体を観察できる蛍光プローブ、ERthioflavin T (ER-ThT) について紹介する 5)。

Thioflavin T(ThT)は、従来よりアルツハイマー病やプリオン 病などに共通してみられるアミロイド線維の検出に用いられてき たプローブであり、アミロイド線維あるいはタンパク質凝集体と 結合することにより非常に強い蛍光を発する。Verwilst らは、 ThT の構造をタンパク質凝集体のセンサーとし、そこに小胞体特 異的な Eeyarestatin I の構造の一部を組み合わせ、ER-ThT を合 成した(図1)。このER-ThTを用い、Dithiothreitol(DTT)添加 により変性させたリゾチームや BSA といったタンパク質に反応 させたところ、時間依存的、濃度依存的に ER-ThT の強い蛍光を 示したことから、ER-ThT がタンパク質凝集体に特異的な蛍光ブ ローブであることが示されている。また、DTT 処理した Hela 細 胞が ER-ThT によって蛍光染色されること、さらに小胞体ストレ ス誘導剤 (Thapsigargin) を処理した Hela 細胞においても ER-ThT により蛍光染色されていることが確認されている。また、小 胞体を染色する ER-Tracker と局在が一致しており、小胞体内の タンパク質凝集体に特異的な ER-ThT による蛍光染色が確認され ている。これらの結果に加えて、Thapsigargin で処理した HeLa 細胞に小胞体ストレス応答を抑制する薬剤 (TUDCA, TMAO, PBA) で処理したところ、ER-ThT による蛍光を示さなかった。 これらの結果から、ER-ThT が小胞体内で蓄積したタンパク質凝 集体に特異的に結合し、可視化できることが示唆された(図2)。

タンパク質の異常構造に起因する疾患は数多くあるが、凝集体を検出すること、及び凝集を抑制する薬剤を見つけることは、これらの疾患の診断、治療において重要である。本稿で紹介したER-ThT は、生細胞の小胞体内で起きているタンパク質凝集体を検出でき、さらには、化学シャペロンなどの小胞体ストレス応答を抑制する薬剤のスクリーニングにも有用なツールである。小胞体をはじめとした細胞小器官の機能解析は未解明な点も多く、これらの研究を発展させる更なる新技術開発が望まれる。

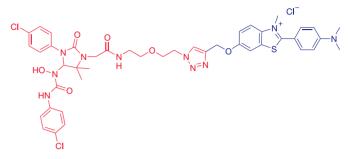


図 1 ER-ThT の構造

(赤色の部分が Eeyarestatin I の構造の一部、青色は Thioflavin T 由来の構造を示す)

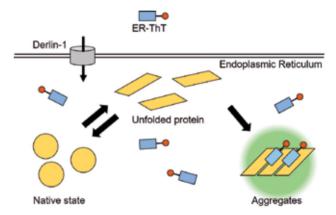


図2 ER-ThT のタンパク質凝集体への結合

[参考文献]

- 1) S. E. Thomas *et al.*, "Diabetes as a disease of endoplasmic reticulum stress", *Metab. Res. Rev.*, **2010**, *26*, 611.
- C. Hetz et al., "ER stress and the unfolded protein response in neurodegeneration", Nat. Rev. Neurol., 2017, 13, 477.
- 3) N. Kawasaki et al., "Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue", Sci. Rep., 2012, 2, 799.
- C. Han et al., "New Insights into the Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Breast Cancer Metastasis", J. Breast Cancer, 2018, 21, 354.
- P. Verwilst et al., "Revealing Protein Aggregates under Thapsigargin-Induced ER Stress Using an ER-Targeted Thioflavin", ACS Sens., 2019, 11, 2858.

細胞膜染色試薬

PlasMem Bright Green PlasMem Bright Red

く特長>

- ・生細胞で使用できる、染色後に固定できる
- ・低毒性で試薬の滞留性が高い
- ・培地に試薬を加えるだけ

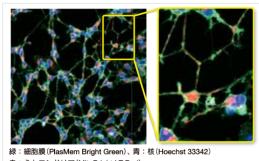


PlasMem Bright シリーズは低毒性で色素の細胞膜滞留性が高く、生細胞や染色後に固定した細胞を用いた様々な 実験でご利用いただくことが可能です。既存の細胞膜染色試薬に対して特に多かった不満を PlasMem Bright シリー ズが解決します。

製品名	細胞毒性※1	滞留性※2	染色後の洗浄	血清入り培地の使用	染色後の固定化
PlasMem Bright (Green, Red)	低	24 時間	不要	可	可(PFA)
S 社 製品 P	_	0.5 時間以下	必要	不可	可
T 社 製品 D	_	0.5 時間以下	必要	可	不可
T 社 製品 C	高	1.5 時間	必要	可	可 (PFA)

- ※1 各染色試薬で染色後、神経細胞の形態変化(凝集)を比較した場合
- ※2 試薬滞留性は細胞腫により異なる場合がございます。(上記は HeLa 細胞および SH-SY5Y 細胞を用いた際の実績)

<細胞膜の鮮明な可視化:神経細胞の形態と軸索内のミトコンドリア局在観察>



〈観察条件〉PlasMem Bright Green: Ex 488 nm / Em 500-600 nm

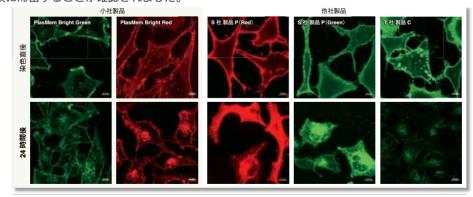
赤:ミトコンドリア(MitoBright LT Red)

赤:細胞膜(PlasMem Bright Red)、 青:核(Hoechst 33342) 緑:ミトコンドリア(MitoBright LT Green)

〈観察条件〉PlasMem Bright Red: Ex 561 nm / Em 560-700 nm

<細胞膜への長期滞留性>

各細胞膜染色試薬で染色した細胞を 24 時間培養したのち、それぞれの蛍光画像を比較しました。既存試薬に比べ、PlasMem Bright シリーズは長時間、膜に滞留することが確認されました。



品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
PlasMem Bright Green	100 μ I \times 1	25,000	P504
PlasMem Bright Red	100 μ I × 1	25,000	P505

% 〈使用回数の目安〉100 μ I あたり、35 mm dish 10 枚、 μ -Slide 8 well 10 枚

製品の詳細や他社製品と比較した実験例などは、小社 HP をご覧ください。

膜染色 同仁

検索

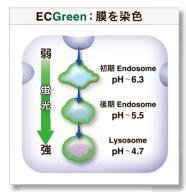
エンドサイトーシス検出試薬

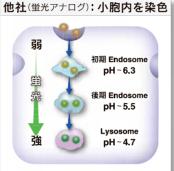
ECGreen-Endocytosis Detection

く特長>

- ・より正確にエンドサイトーシスを可視化できる
- ・生細胞でエンドサイトーシスを追跡できる
- ·pH 変化に対する応答性が高い

ECGreen-Endocytosis Detection は小胞膜に局在し、pH に依存して蛍光を発する試薬で、蛍光アナログよりも直接的にエンドサイトーシスを可視化することができます。また、本品は従来用いられてきた蛍光標識デキストランと比較して、pH 変化に対する応答性に優れています。そのため、初期エンドソームも高感度に検出することが可能です。





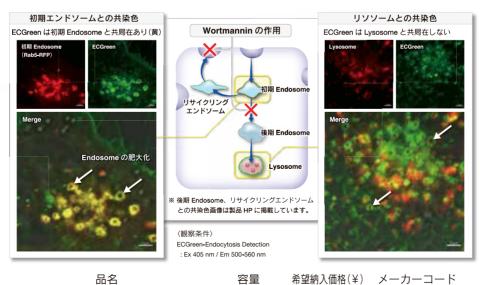
٩n ECGreen 80 ■蛍光標識デキストラン 70 60 50 F 40 初期エンドソーム 30 での感度が高い 20 10 4.0 6.5 7.4 nН

染色原理の模式図

各試薬の pH に対する蛍光強度変化

<実験例:細胞内小胞輸送系を鮮明に可視化>

Wortmannin はエンドソームのリサイクリングやリソソームへの移行を阻害し、エンドソームの肥大化を惹起することが知られています。Wortmannin によるこれらの変化を ECGreen と初期エンドソームマーカータンパク質 Rab5-RFP (蛍光タンパク質) との共染色、および ECGreen とリソソーム染色試薬との共染色で確認しました。その結果、Wortmannin 添加時には ECGreen は肥大化したエンドソーム(Rab5-RFP)と共局在(左図:Merge)し、リソソームとは共局在しない(右図:Merge)ことが確認できました。これらの結果から、ECGreen は細胞内小胞輸送系の変化を可視化できることがわかりました。



ECGreen-Endocytosis Deteciton 40 μl × 1 45,000 E296 ※<使用回数の目安> 40 μl あたり、35 mm dish 20 枚、μ-Slide 8 well 20 枚

製品の詳細や他社製品と比較した実験例などは、小社 HP をご覧ください。

エンドソーム 同仁

検索

エクソソーム染色キット

エクソソーム膜 蛍光染色キット

ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Green, Red, Deep Red エクソソームタンパク質 蛍光染色キット

ExoSparkler Exosome Protein Labeling Kit-Green, Red. Deep Red



く特長>

- ・細胞外で凝集しない
- ・キットだけで蛍光標識から精製まで可能
- ・エクソソームの性質にほとんど影響しない

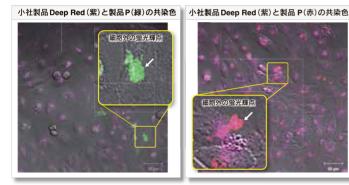
製品の詳細や他社製品と比較した実験例などは、 小社 HP をご覧ください。

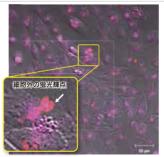
エクソソーム 同仁

検索

ExoSparkler シリーズは、精製されたエクソソームの膜またはタンパク質を染色し、細胞に取り込まれるエクソソームをイメージン グすることができます。

(1) ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Deep Red 及び S 社製品 P(緑または赤)で染色したエクソソームを HeLa 細胞 へ添加し、細胞内へ取り込まれるエクソソームを蛍光顕微鏡で確認した結果、ExoSparkler シリーズでは色素の凝集が見られな かったのに対し製品 P (緑または赤) で染色したエクソソームでは、色素の凝集が疑われる細胞外の蛍光輝点が確認されました。





ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Deep Red (紫): Ex 640 nm / Em 640-760 nm

S 社 製品 P (緑)

Ex 488 nm / Em 490-540 nm

S 社 製品 P (赤):

Ex 561 nm / Em 570-640 nm

(2) ExoSparkler シリーズは、エクソソームの標識に最適化したプロトコルに加え、蛍光標識後の未反応色素を除去できる フィルトレーションチューブを同梱しているため、簡単な操作で蛍光標識エクソソームを調製できます。

ExoSparkler シリーズにおける染色工程

精製手法(未反応色素の除去)と回収率の比較



	回収率※
フィルトレーションチューブ(本キット)	50% 程度
ゲルろ過法	10% 程度

※ 小社での実施例

精製前後のエクソソーム粒子数を NTA(ナノ粒子トラッキング解析)で比較

(3) ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit (Green, Red, Deep Red) で染色する前後のエクソソームについて、 NTA(ナノ粒子トラッキング解析)とゼータ電位を測定した結果、小社製品は、エクソソームの性質にほとんど影響を及ぼさな いことが確認されました。比較データは製品 HP に掲載しています。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Green	5 samples	25,000	EX01
ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Red	5 samples	25,000	EX02
ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Deep Red	5 samples	25,000	EX03
ExoSparkler Exosome Protein Labeling Kit-Green	5 samples	20,000	EX04
ExoSparkler Exosome Protein Labeling Kit-Red	5 samples	20,000	EX05
ExoSparkler Exosome Protein Labeling Kit-Deep Red	5 samples	20,000	EX06

※精製済エクソソーム (超遠心法) として、タンパク質: 1-10 μg/sample、粒子数: 10-100 × 108 個 /sample

関連製品

ミトコンドリア膜電位検出キット(JC-1)

JC-1 MitoMP Detection Kit

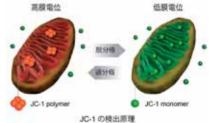
ミトコンドリアは、ATP 等のエネルギー産生の場であり、その活性の変化や機能障害ががんや老化、神経変性疾患などと密接に関連しています。そのため、ミトコンドリアの状態を把握することは重要であり、その指標としてエネルギー産生に伴い生じる膜電位差が評価されています。

<測定原理>

ミトコンドリアが正常で膜電位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比により、ミトコンドリア膜電位の変化を評価することができます。

キットを使った蛍光顕微鏡やフローサイトメーター、プレートリーダーの解析 例や最新論文は小社 HP よりご覧頂けます。

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



キットを使用した最新論文は小社 HP よりご覧いただけます。

JC-1 同仁

検索

ミトコンドリア染色試薬

MitoBright LT Green, Red, Deep Red

く特長>

- ・ミトコンドリアを長期間観察可能
- ・血清入り培地中で染色可能
- ・コラーゲンコートプレート上で培養した細胞のミトコンドリアを低バックグラウンドで検出可能



ミトコンドリアを長期間観察

HeLa 細胞を各 MitoBright LT または既存試薬で染色し、4 日間培養後ミトコンドリアを観察しました。その結果、既存試薬の蛍光強度は大きく低下したのに対し、MitoBright LT は蛍光強度が維持され、ミトコンドリアを明瞭に観察できました。

温度1071と「日下		
	MitoBright LT	
Green	Red	Deep Red
染色後 4 日間培養 染色直後	O O	

既存試薬(T 社)					
Green	Red	Deep Red			
0		od A			

<検出条件> MitoBright LT Green、 既存試薬(T 社)Green: Ex 488 nm / Em 500-560 nm

MitoBright LT Red、 既存試薬(T 社)Red: Ex 561 nm / Em 560-620 nm

MitoBright LT Deep Red、 既存試薬(T 社)Deep Red: Ex 640 nm / Em 650-700 nm

スケールバー: $20\,\mu m$

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
	20 μ I \times 1	6,000	
MitoBright LT Green	$400 \mu I \times 1$	12,000	MT10
	400 μ I \times 3	30,000	
	$20 \mu I \times 1$	6,000	
MitoBright LT Red	400 μ I \times 1	12,000	MT11
	400 μ I \times 3	30,000	
	$20 \mu I \times 1$	6,000	
MitoBright LT Deep Red	400 μ I \times 1	12,000	MT12
	400 μ I \times 3	30,000	

さらに詳細な情報は小社 HPで!

MitoBright LT 同仁

検索

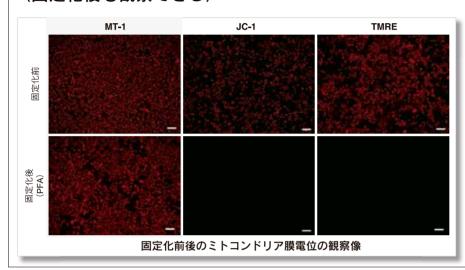
MT-1 ミトコンドリア膜電位検出キット

MT-1 MitoMP Detection Kit

く特長>

- ・生細胞で使用できる、染色後に固定化できる
- ・ミトコンドリア膜電位のモニタリングができる
- ・ミトコンドリア膜電位の変化を高感度に検出できる

〈固定化後も観察できる〉



僅かな細胞状態の変化によりミトコンドリア膜電位は変動するため、データの再現性取得には細心の注意が必要でした。汎用のミトコンドリア膜電位検出試薬(JC-1、TMRE)は、細胞を固定化処理すると蛍光が失われるため、生細胞を用いた迅速な測定が必要でした。

MT-1 は、染色後の PFA 固定化操作を行っても蛍光が保持されるため、再現性の高い実験を行う事が可能です。

〈検出条件〉

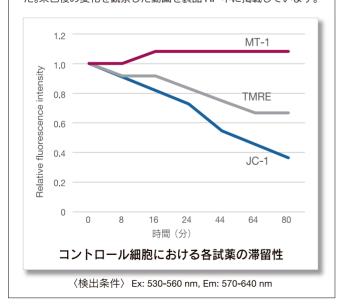
Ex: 530-560 nm, Em: 570-640 nm

スケールバー: 100 μm

細胞: HeLa 細胞

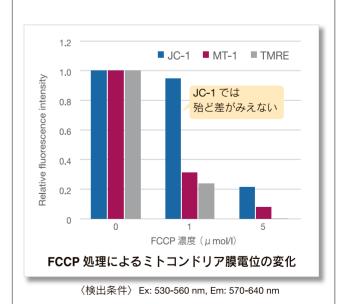
〈モニタリングできる〉

薬剤刺激を行っていないコントロール細胞を各試薬で染色し、蛍 光強度の変化を確認しました。結果、JC-1 や TMRE は染色から約 10 分程で蛍光強度が低下し、MT-1 は一定に蛍光強度を保ちました。染色後の変化を観察した動画を製品 HP 中に掲載しています。



〈高感度検出できる〉

わずかなミトコンドリア膜電位の変化は、JC-1 では検出困難なケースがあり、その際に TMRE が用いられてきました。MT-1 はTMRE と同等の検出感度を実現しています。

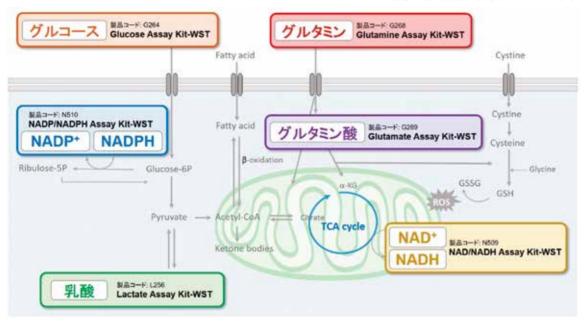


品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
MT-1 MitoMP Detection Kit	1 set	28,000	MT13

※<使用回数の目安> 35 mm dish 30 枚分

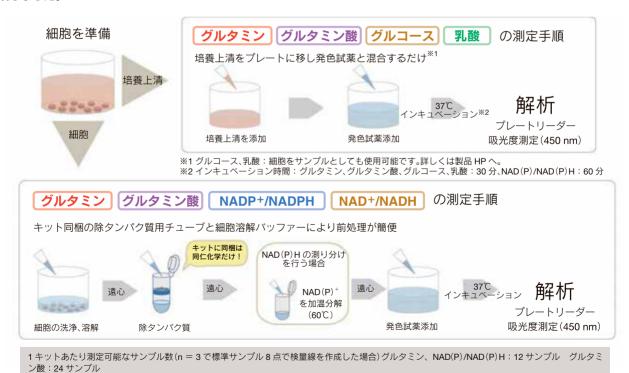
細胞内代謝関連製品

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、グルタミン、グルタミン酸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。



くはじめてでも分かりやすい簡単な操作>

はじめて細胞内代謝を評価される方々のご要望にお応えし、測定に必要な試薬やコンポーネントを同梱して、より使い易い操作性を実現しました。



10

α-ケトグルタル酸測定キット

α-Ketoglutarate Assay Kit-Fluorometric

〈特長〉

- ・ シンプルなサンプル前処理操作を採用
- ・試薬を加えてインキュベートするだけの簡単操作
- ・マイクロプレートアッセイ(蛍光法)により多検体に対応

 α - ケトグルタル酸(α -KG)は、TCA サイクルの中間代謝物として重要な基質です。グルコース代謝物の TCA 回路への取り込み亢進や、グルタミンを基質に α - ケトグルタル酸を供給する経路である「グルタミノリシス」亢進の指標に用いられています。また、 α - ケトグルタル酸は、神経伝達物質や γ - アミノ酪酸(GABA)の生成において重要な役割を果たすほか、最近のがん研究では腫瘍抑制に効果的に働くことが報告されています 1 。

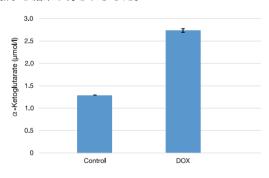
1) John, P. M. IV, et al., Nature, 2019, 573, 595-599.

<測定原理>



く薬剤刺激による細胞内 α-KG の濃度の変化>

Doxorubicin(DOX)添加による A549 細胞の α -KG の濃度変化を測定しました。その結果、DOX 添加によって細胞内 α -KG は増加する結果が得られました。



容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
100 tests	64,000	K261
50 tests	25,000	A550
200 tests	45,000	A330
	100 tests 50 tests	100 tests 64,000 50 tests 25,000

新製品

ATP 測定キット

ATP Assay Kit-Luminescence

〈特長〉

- ・試薬添加 10 分後に測定可能
- ・安定した発光シグナル(発光半減期:3時間以上)
- ・高感度であるため、少ない細胞数から測定可能
- · ATP 定量のためのスタンダード同梱

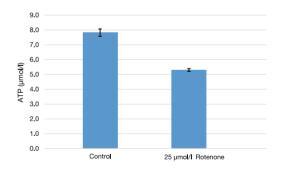
ATP は、解糖系およびミトコンドリアにおける TCA 回路、電子伝達系でつくられ、細胞が生きていくためのエネルギー源として重要です。ミトコンドリア機能の異常は、がんや老化、アルツハイマー病などの神経変性疾患、ミトコンドリア病などを引き起こすことが知られており、ミトコンドリア活性の指標の1つとして ATP が用いられています。

<測定原理>



く薬剤刺激による ATP 濃度の変化>

Rotenone 刺激により Jurkat 細胞のミトコンドリア電子伝達系を阻害したところ、細胞内 ATP 量の減少が見られました。



学術情報から学べる 細胞内代謝測定

細胞内代謝マップ 同仁

検索

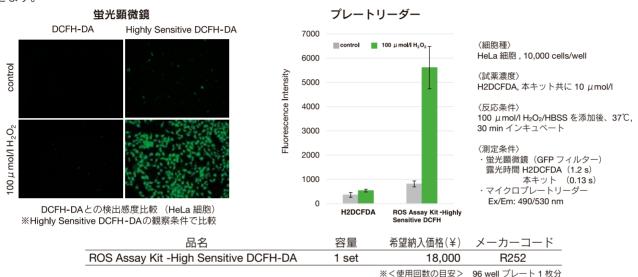
細胞内代謝の基礎から学べる動画コンテンツ ご好評につきニュース読者様へご案内します。 ご希望の場合は小社カスタマーサポートまでご要望ください。



ROS 検出キット

ROS Assay Kit -Highly Sensitive DCFH-DA-

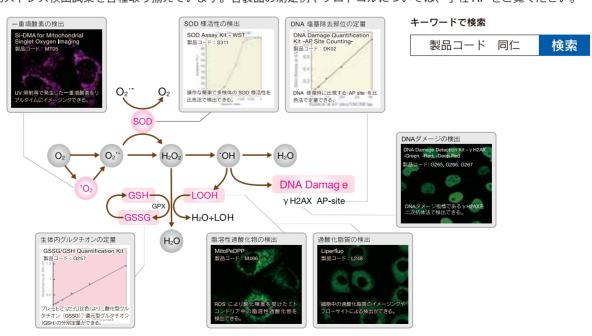
本製品は ROS(Reactive Oxygen Species)を蛍光プレートリーダー、蛍光顕微鏡、もしくはフローサイトメーターを使って蛍光法により検出するキットです。一般的に ROS を検出するキットの蛍光基質は ROS により酸化されることで発蛍光する DCFH-DA が使用されていますが、本キットは細胞膜透過性を向上させた構造を有しており、DCFH-DA と比較して高感度に ROS を検出することができます。また、DCFH-DA と同等の蛍光波長を有することから DCFH-DA での検出と同じ検出器やフィルターを使用することができます。



関連製品

酸化ストレス検出試薬

小社では、酸化ストレス検出試薬を各種取り揃えています。各製品の測定例やプロトコルについては、小社 HP をご覧ください。



開発中

グルコース細胞内取り込みアッセイキット

Glucose Uptake Assay Kit - Blue, - Green, - Red

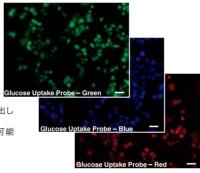
細胞の重要なエネルギー源であるグルコースの細胞内取り込み能力は、細胞の代謝活性の指標の一つとして利用されています。一般的にグルコースの細胞内取り込みをイメージングする試薬として 2-deoxy-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl) amino]-D-glucose (2-NBDG) が、広く用いられていますが、蛍光が弱く、感度が低いという課題がありました。そこで小社では Green の他、これまでにない Red 及び Blue を含めた 3 種類の新規高感度グルコース細胞内取り込みアッセイ用蛍光プローブ Glucose Uptake Probe を開発しました。グルコースの細胞内取り込みを明瞭にイメージングすることができ、フローサイトメーターを用いた測定も可能です。また Green、Red は蛍光強度が高いためプレートリーダーでの測定も可能です。さらに小社が開発した Washing and Imaging(WI) solution を用いることで細胞からのプローブの漏出を抑制することができ、安定したデータを取得することが可能となりました。

くグルコースの細胞内取り込みの可視化>



※ 1…本測定に最適化した WI Solution を用いることで細胞からの色素の漏れ出しを抑制できます。

※ 2…Glucose Uptake Probe - Green、 - Red はプレートリーダー測定が可能です。



細胞:A549 〈使用培地〉DMEM

(0 mmol/L Glucose)

〈染色条件〉x500 Glucose Uptake Probe 37℃. 15 min

37 C, 15 IIIII 〈検出装置〉蛍光顕微鏡

(BZ-X700, Keyence 社)

〈検出条件〉

Blue: Ex: 360/40 nm, Em: 460/50 nm Green: Ex: 470/40 nm, Em: 525/50 nm Bed: Ex: 545/25 nm, Em: 605/70 nm

<高濃度グルコースによるグルコース取り込み能力の阻害実験>

Glucose Uptake Probe - Green とグルコース との競合阻害実験を行った。高濃度(25 mmol/l) グルコース下では、Glucose Uptake Probe -Green の細胞内取り込みは阻害された。

細胞 : A549

染色培地:DMEM(0 or 25 mmol/l Glucose)

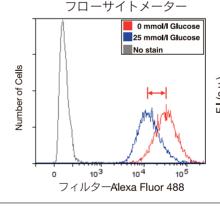
染色条件: x500 Glucose Uptake Probe - Green, 37℃, 15 min

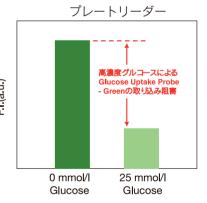
検出装置:

フローサイトメーター(LSRFortessa X-20, BD 社 検出:Alexa Fluor 488 フィルク

プレートリーダー

検出:Alexa Fluor 488 フィルター) (Infinite 200 PRO, TECAN 社 検出:Ex / Em = 488 / 520 nm)





くインスリンによる脂肪細胞のグルコース取り込み促進>

インスリンによる脂肪細胞のグルコース取り込み能の 促進を Glucose Uptake Probe – Green を用いて蛍光観 察した。

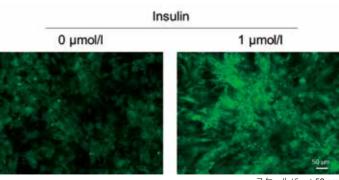
細胞: mouse adipocyte

染色培地:DMEM(5.5 mmol/l Glucose)

刺激条件:1 μmol/l Insulin / DMEM(5.5 mmol/l Glucose), 37℃, 15 min

染色条件:x500 Glucose Uptake Probe – Green, 37℃, 15 min

検出装置:蛍光顕微鏡(BZ-X700, Keyence 社) 検出条件:Ex: 470/40 nm, Em: 525/50 nm



スケールバー: 50 nm

ご興味がございましたら、小社カスタマーサポート (info@dojindo.co.jp Free Dial: 0120-489548) までお問い合せください。



ホームページアドレス

URL: https://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

(受付時間:平日9:00~17:00) 土・日・祝日は除く

