

DOJIN NEWS

ドージンニュース

2021 No.179

ISSN 0385-1516

オルガネラゾーン

—総説—

ミトコンドリアにおけるリン脂質代謝機構

山形大学 田村 康

—注目の研究—

エクソソーム研究を支える精製技術の発展

株式会社同仁化学研究所 住吉 泰介

新製品

アミノ酸取り込み検出キット P.8

シスチン取り込み検出キット P.9

ADP/ATP 測定キット P.10

解糖系 / 酸化的リン酸化測定キット P.10

リソソーム染色試薬 P.12

開発中

エクソソーム精製キット・キット用フィルター P.6





表紙撮影：熊本県 阿蘇市 西湯浦
牧場に立つ名もない木と雪
樹は珍しく樹氷がついている

photo：永島俊介氏

CONTENTS

Review

ミトコンドリアにおけるリン脂質代謝機構 ●————— [1]

山形大学 田村 康

Topics on Chemistry

エクソソーム研究を支える精製技術の発展 ●————— [4]

株式会社同仁化学研究所 住吉 泰介

Commercial

関連製品

エクソソーム染色キット ●————— [5]

グルコース取り込み検出キット ●————— [9]

細胞内代謝関連製品 ●————— [11]

新製品

アミノ酸取り込み検出キット ●————— [8]

シスチン取り込み検出キット ●————— [9]

ADP/ATP 測定キット ●————— [10]

解糖系/酸化的リン酸化測定キット ●————— [10]

リソソーム染色試薬 ●————— [12]

開発中

エクソソーム精製キット・キット用フィルター ●————— [6]

技術紹介

抗原の新規高感度蛍光検出法 (CLAMP 法) ●————— [7]

ミトコンドリア関連試薬

ミトコンドリア研究用試薬製品群 ●————— [13]

お役立ち

知ろう！学ぼう！これからはじめる老化研究 ●————— [6]

知ろう！学ぼう！これからはじめる ELISA・免疫染色 ●————— [8]

お知らせ

次号 (180 号) から書誌サイズを A4 サイズへ変更致します ●————— [14]

※希望納入価格には消費税等は含まれておりません。

ツイッター



フォロー
お願いします

@dojindoinfo

ミトコンドリアにおけるリン脂質代謝機構 Phospholipid metabolism via mitochondria



田村 康
山形大学
理学部理学科

Abstract

For proper organelle formation, the logistics of lipids and proteins comprising of the organelle is critical. While the protein transport mechanism has been studied for a long time, and well characterized, how hydrophobic lipids are transported across water-soluble compartments such as the cytosol to different organelle membranes remains enigmatic. In particular, the mechanism of lipid trafficking through mitochondria, which are independent of the vesicular trafficking pathway, remains largely unknown. In this article, we review the mechanisms of phospholipid transport via mitochondria and discuss issues in intracellular lipid transport that should be clarified in future studies.

1. はじめに

真核細胞内に発達した膜構造（オルガネラ）が適切に形成されるためには、そのオルガネラを構成する脂質やタンパク質が、その最終目的地まで適切に輸送される必要がある。オルガネラタンパク質の輸送機構に関しては古くから研究が進み、多くの知見が蓄積しているが、水に溶けづらい脂質が、サイトゾルなどの水溶性の区画を越えて異なるオルガネラ膜へと移動するメカニズムには不明な点が多い。特に小胞輸送経路から独立したオルガネラであるミトコンドリアを介した脂質輸送機構には謎が多く、10年ほど前まではほとんど手付かずの状態であった。本稿では出芽酵母を用いた最近の研究によってようやくその一端が明らかになってきたミトコンドリアを介したリン脂質輸送機構について概説する。

2. ER- ミトコンドリア間リン脂質輸送因子ERMES 複合体

リン脂質を合成するためには、小胞体(ER)-ミトコンドリア間におけるリン脂質輸送反応が必須となる。これは一部のリン脂質の原料となる前駆体リン脂質が、自身の合成の場とは異なるオルガネラ膜で合成されるためである(図1)。例えば、ミトコンドリア内膜に局在するPE合成酵素Psd1はPSの脱炭酸酵素であるため、ミトコンドリアでPEを合成するためには、ER膜で合成されたPSが、ミトコンドリアまで輸送されなければならない。しかしER-ミトコンドリア間におけるリン脂質輸送を仲介

する因子は、2009年にER-ミトコンドリア間を直接結合するタンパク質複合体として、ERMES複合体が同定されるまで長らく不明であった。

ERMESはER-Mitochondria Encounter Structureの略であり、もともとミトコンドリアの形態の維持因子、MMM(maintenance of mitochondrial morphology)、MDM(mitochondrial distribution and morphology)として同定されていた4つの因子(Mmm1, Mdm10, Mdm12, Mdm34)をコアサブユニットとして持つタンパク質複合体である(図1)。これらの4つの因子の内一つでも欠損すると、ミトコンドリア形態がチューブ状から球状へと変化する他、強い細胞の増殖阻害、ミトコンドリアDNAの消失、ミトコンドリア外膜タンパク質の輸送異常を引き起こすことが報告された。これらの発見当初、ERMES複合体はミトコンドリア外膜に局在すると考えられていたが、2009年にKornmannらによってMmm1が糖鎖付加を受けることが発見されたことで、Mmm1がER膜に局在するタンパク質であることが示された。すなわち、ER膜タンパク質であるMmm1とミトコンドリア外膜タンパク質であるMdm34とMdm10、サイトゾルの可溶性タンパク質であるMdm12が、オルガネラを隔ててタンパク質複合体を形成することで、ミトコンドリア外膜とER膜を物理的に結合することが明らかになった(図1)¹⁾。

Kornmannらはさらに、ER-ミトコンドリア間のリン脂質輸送を評価できる¹⁴C-serineを用いたパルスチェイス実験によりERMESがリン脂質輸送に関与する可能性を示した。しかしその

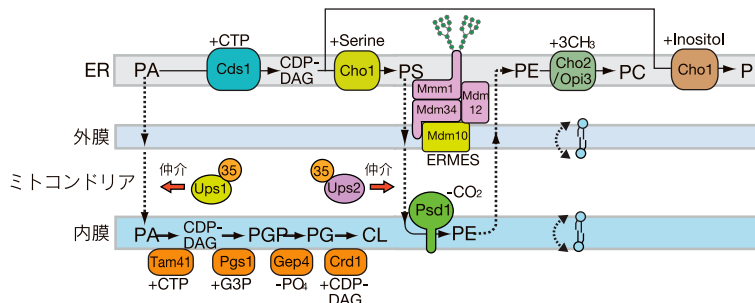


図1 出芽酵母におけるER-ミトコンドリア間におけるリン脂質代謝

一方で、ERMES の欠損がこれらのオルガネラ間のリン脂質輸送には全く影響しないと言う報告もなされ、ERMES のリン脂質輸送への関与は論争となっていた²⁾。このような矛盾が生じる原因として、ERMES が欠損した細胞では、ERMES 欠損の影響を相補してしまうような復帰突然変異（後述）が生じてしまうことが考えられた。そこで筆者らは、ミトコンドリアと ER を含む単離膜画分を用いることで、細胞のアダプテーションによる影響を排除した実験系を構築し、ERMES が欠損すると ER からミトコンドリアへのリン脂質輸送が遅くなることを示した³⁾。ただし、この実験では ERMES の欠損が間接的にリン脂質輸送に影響する可能性を排除することはできない。そこで精製 ERMES タンパク質が直接リン脂質輸送を仲介するかを検討した。その結果、大腸菌から精製した Mmm1-Mdm12 複合体が、人工リポソーム間でリン脂質を輸送する活性を有することがわかった⁴⁾。また、Mdm12 の X 線結晶構造解析から、Mdm12 が脂質分子を脂肪酸側から取り込む疎水的な穴を持つこともわかった⁴⁾。これらの解析により、ERMES が単純な ER-ミトコンドリア間結合因子ではなく、ER-ミトコンドリア間のリン脂質輸送であることが証明された。

3. 巨大リン脂質輸送因子 Vps13

ERMES の欠損によるリン脂質輸送不全は、強い増殖阻害、ミトコンドリア形態異常、ミトコンドリア DNA の消失、ミトコンドリアタンパク質の輸送異常と言った強い表現型を引き起こす。しかしこの ERMES 欠損変異株を培養し続けると、これらの表現型が回復してしまう復帰突然変異株が得られることが以前から知られていた。この復帰突然変異株の原因遺伝子を次世代シーケンシングによって解析したところ、VPS13 という遺伝子に変異が導入されていることが明らかとなった⁵⁾。VPS13 がコードする Vps13 は、3,000 アミノ酸以上からなる巨大なタンパク質であり、その点変異が ERMES の機能不全をほぼ完全に相補できることから、Vps13 が ERMES と同様に脂質輸送タンパク質であることが示唆された⁵⁾。Vps13 は PxP モチーフを持つミトコンドリア外膜タンパク質 Mcp1、液胞やエンドソーム局在する Ypt35、前駆胞子膜に結合する Spo71 と直接結合することで、様々な膜へと脂質を輸送すると考えられる（図 2）⁶⁾。MCP1 遺伝子は筆者らの研究により、ERMES 欠損株の増殖阻害を抑制するマルチコピーサプレッサーとして同定されていた因子であり、過剰発現することにより Vps13 をミトコンドリア側に引き寄せると考えられる⁷⁾。

出芽酵母の研究に続き、ヒトの Vps13 タンパク質（Vps13A と Vps13C）の機能解析が行われた。その結果、ヒトの Vps13 の N 末端領域（N 末端側 1350 アミノ酸領域）が、その結晶構造解析からリン脂質結合に適したリン脂質結合ポケットを持ち、実際にリン脂質を輸送する活性を持つことが示された⁸⁾。Vps13A と Vps13C は、それぞれ ER-ミトコンドリア間や ER-エンドソーム、ER-脂肪滴間コンタクトサイトに局在し、これらの膜間で脂質輸送を仲介するらしい⁹⁾。さらに最近、Vps13D がミトコンドリアとペルオキシソーム上に局在する Miro と相互作用することで、ER 膜からこれらのオルガネラへ脂質を輸送すると報告された⁹⁾¹⁰⁾。また Vps13 の N 末端領域のアミノ酸配列や二次構造がオートファジー関連タンパク質の Atg2 とよく似ていることから、Atg2 が脂質輸送タンパク質であることも予想され、後に証明された（Atg2 は ER からオートファゴソーム膜へ脂質を供給する）¹¹⁾¹²⁾。

4. ミトコンドリア膜間部でリン脂質代謝に関与する Ups1-Mdm35、Ups2-Mdm35 の発見

ミトコンドリアの外側に存在するリン脂質輸送因子である ERMES 複合体や Vps13 に加えて、ミトコンドリア膜間部で機能するリン脂質輸送因子として Ups1-Mdm35、Ups2-Mdm35 複合体が同定されている（図 1）。Ups1 はもともと、その欠損によってミトコンドリア内膜の融合因子 Mgm1 のプロセッシング異常を引き起こす因子（ミトコンドリアの形態制御因子）として同定された¹³⁾。しかし筆者らがさらに研究を進めると、Ups1 が Mgm1 に特異的に作用すると言うよりは、ミトコンドリア内膜やマトリクス内のタンパク質の輸送全般に重要であることがわかり、最終的には CL 量の維持に重要な因子であることを見出した¹⁴⁾。さらに Ups1 のホモログである Ups2 を欠損した場合は PE が顕著に減少することもわかり、Ups1 と Ups2 がミトコンドリアのリン脂質組成に影響を及ぼす因子であることがわかった¹⁴⁾。さらに筆者らは単離ミトコンドリアを化学架橋剤で処理した際に、Ups1、Ups2 が共に分子量約 10 kDa 程度のタンパク質と架橋されることに気が付き、その架橋相手として Mdm35 を同定した（Mdm35 もその名前（MDM, mitochondrial distribution and morphology）が示す通り、もともとミトコンドリアの形態制御因子として見つかったタンパク質である）¹⁵⁾。

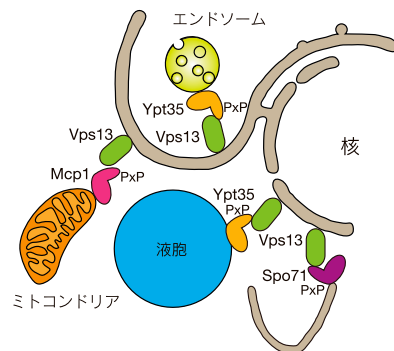


図 2 様々なオルガネラ膜間で働く脂質輸送タンパク質 Vps13

5. Ups1-Mdm35、Ups2-Mdm35 は PA と PS をミトコンドリア外膜から内膜へと輸送する

Ups1 と Ups2 の欠損によって CL、PE が減少する原因として、Ups1-Mdm35、Ups2-Mdm35 がそれぞれ CL、PE の合成に関与する可能性と、CL、PE の前駆体リン脂質である PA、PS の輸送に関与する可能性の 2 つが想定された（PA、PS は ER で合成されるため、CL、PE 合成のためにはミトコンドリア内膜まで輸送されなければならない）（図 1）。これを証明するためには Ups1-Mdm35 の精製タンパク質を調製し、リン脂質輸送活性を持つかを調べれば良い。筆者らは Ups1-Mdm35 を大腸菌から精製しようとしていたが、可溶性タンパク質として発現せず研究は難航していた。そのような状況の中、ドイツの Thomas Langer のグループが大腸菌から精製した Ups1-Mdm35 が、リポソーム間で PA を輸送する活性を持つことを見事に証明した¹⁶⁾。Langer らは Ups1 と Mdm35 を pETDuet という 2 種類の遺伝子を同時にクローニングできるベクターを用いて Ups1 と Mdm35 を大腸菌内で共発現させることで、可溶性タンパク質として、安定に発現精

製することに成功していた¹⁶⁾。余談であるが、同時期に筆者らも全く同じベクターを用いて発現を試みていたが、Ups1とMdm35の遺伝子をLangerのグループとは逆の順番でクローニングしてしまったせいで、うまく発現しなかった。結局この研究成果はScience誌に掲載され、当時は大変落ち込んだ(pETDuetを使用される場合は、必ず2通りの順番でクローニングを行ったほうが良いです)。

その後、筆者らもUps1-Mdm35を大腸菌から精製し、そのX線結晶構造を明らかにすることができた(図3)¹⁷⁾。Ups1-Mdm35は正電荷に富んだポケットを有しており、PAのリン酸基を特異的に認識し、疎水的な脂肪酸領域をカバーすることで膜間におけるPA輸送を実現していることがわかった。同様にUps2-Mdm35に関しても精製タンパク質を用いてPS輸送タンパク質であることを証明した(九州大学の久下理先生のグループとの共同研究)¹⁸⁾。これらの因子の発見により、これまで全く不明であったミトコンドリア外膜-内膜間のリン脂質輸送の一端が明らかになった。ただし、PA、PS以外のリン脂質を輸送因子は不明であり、ミトコンドリア内膜から外膜へ脂質を輸送する因子や、ミトコンドリア膜においてリン脂質をフリップ・フロップする因子も不明である。今後の研究により、まだまだ未解明なミトコンドリアを介したリン脂質輸送機構の謎が解明していきたい。

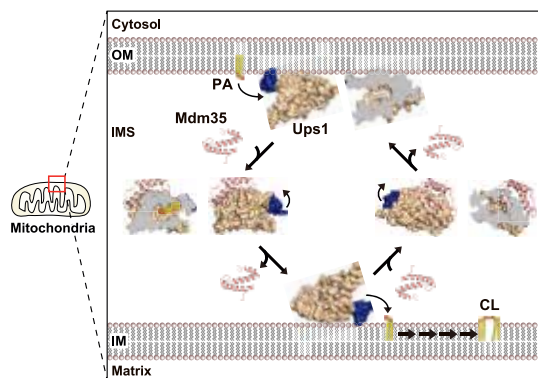


図3 Ups1-Mdm35がミトコンドリア外膜から内膜へPAを輸送するメカニズム

6. おわりに

本稿ではミトコンドリアを介したリン脂質輸送機構に関して、リン脂質輸送因子の発見の経緯から概説した。ここまで読んでいただければ分かる通り、ERMESやUps1, 2-Mdm35はもともとミトコンドリアの形態維持やミトコンドリアタンパク質輸送に関与する因子として同定された経緯を持つ。その後の研究により、これらの因子がリン脂質輸送因子であることが明確に証明されたが、逆に考えると、オルガネラ膜の適切なリン脂質組成の維持が、オルガネラが正しく機能するために極めて重要なファクターであることがわかる。また哺乳類に存在するVPS13ファミリー(VPS13A-D)は全て、パーキンソン病を含むヒトの神経変性疾患の原因遺伝子として報告されており、細胞内リン脂質輸送機構の研究はヒトの疾患克服の面からも重要な意味を持つ。細胞内に存在する多様な脂質輸送タンパク質が、どの脂質を、どの膜へ、いつどれだけ輸送するのか? 未だ謎の多い細胞内脂質輸送機構を解明していくことで、オルガネラの機能発現メカニズムにとどまらず、オルガネラの合成や分解の仕組みもさらに解明されていくと期待される。

[参考文献]

- 1) B. Kornmann *et al.*, "An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen", *Science*, **2009**, 325, 477-481.
- 2) T. T. Nguyen *et al.*, "Gem1 and ERMES Do Not Directly Affect Phosphatidylserine Transport from ER to Mitochondria or Mitochondrial Inheritance", *Traffic*, **2012**, 13, 880-890.
- 3) R. Kojima, T. Endo and Y. Tamura, "A phospholipid transfer function of ER-mitochondria encounter structure revealed in vitro", *Sci. Rep.*, **2016**, 6, 30777.
- 4) S. Kawano *et al.*, "Structure-function insights into direct lipid transfer between membranes by Mmm1-Mdm12 of ERMES", *J. Cell Biol.*, **2018**, 217, 959-974.
- 5) A. B. Lang, A. T. J. Peter, P. Walter and B. Kornmann, "ER-mitochondrial junctions can be bypassed by dominant mutations in the endosomal protein Vps13", *J. Cell Biol.*, **2015**, 210, 883-890.
- 6) B. D. M. Bean *et al.*, "Competitive organelle-specific adaptors recruit Vps13 to membrane contact sites", *J. Cell Biol.*, **2018**, 217, 3593-3607.
- 7) R. Kojima, S. Kajiura, H. Sesaki, T. Endo and Y. Tamura, "Identification of multi-copy suppressors for endoplasmic reticulum-mitochondria tethering proteins in *Saccharomyces cerevisiae*", *FEBS Lett.*, **2016**, 590, 3061-3070.
- 8) N. Kumar *et al.*, "VPS13A and VPS13C are lipid transport proteins differentially localized at ER contact sites", *J. Cell Biol.*, **2018**, 217, 3625-3639.
- 9) H. A. Baldwin *et al.*, "VPS13D promotes peroxisome biogenesis", *J. Cell Biol.*, **2021**, 220.
- 10) A. Guillén-Samander *et al.*, "VPS13D bridges the ER to mitochondria and peroxisomes via Miro", *J. Cell Biol.*, **2021**, 220.
- 11) D. P. Valverde *et al.*, "ATG2 transports lipids to promote autophagosome biogenesis", *J. Cell Biol.*, **2019**, 218, 1787-1798.
- 12) T. Osawa, *et al.*, "Atg2 mediates direct lipid transfer between membranes for autophagosome formation", *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2019**, 26, 281-288.
- 13) H. Sesaki *et al.*, "Ups1p, a conserved intermembrane space protein, regulates mitochondrial shape and alternative topogenesis of Mgm1p", *J. Cell Biol.*, **2006**, 173, 651-658.
- 14) Y. Tamura, T. Endo, M. Iijima and H. Sesaki, "Ups1p and Ups2p antagonistically regulate cardiolipin metabolism in mitochondria", *J. Cell Biol.*, **2009**, 185, 1029-1045.
- 15) Y. Tamura, M. Iijima and H. Sesaki, "Mdm35p imports Ups proteins into the mitochondrial intermembrane space by functional complex formation", *EMBO J.*, **2010**, 29, 2875-2887.
- 16) M. Connerth *et al.*, "Intramitochondrial Transport of Phosphatidic Acid in Yeast by a Lipid Transfer Protein", *Science (80-.)*, **2012**, 338, 815-818.
- 17) Y. Watanabe, Y. Tamura, S. Kawano and T. Endo, "Structural and mechanistic insights into phospholipid transfer by Ups1-Mdm35 in mitochondria", *Nat. Commun.*, **2015**, 6, 7922.
- 18) N. Miyata, Y. Watanabe, Y. Tamura, T. Endo and O. Kuge, "Phosphatidylserine transport by Ups2-Mdm35 in respiration-active mitochondria", *J. Cell Biol.*, **2016**, 214, 77-88.

[著者プロフィール]

氏名: 田村 康 (TAMURA Yasushi)

所属: 山形大学理学部理学科

〒990-8560 山形県山形市小川町 1-4-12

Tel : 023-628-4561

Fax : 023-628-4561

E-mail : tamura@sci.kj.yamagata-u.ac.jp

出身: 名古屋大学大学院理学研究科物質理学専攻

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: オルガネラコンタクトサイトの形成機構と生理的意義解明

Topics on Chemistry

エクソソーム研究を支える精製技術の発展

株式会社同仁化学研究所 住吉 泰介

エクソソームはエンドソーム由来の直径 30-150 nm の細胞外小胞体的一种である。発見当初は細胞からの排泄物という見方がされる傾向にあったが、2000 年以降の研究で細胞間コミュニケーション^{1,2)} や薬物輸送のベクター³⁾ としての役割が見えてきている。また、エクソソーム内には、タンパク質、DNA、RNA 類、脂質、代謝物が含まれており、近年では、がん⁴⁾ や慢性閉塞性肺疾患⁵⁾、リンパ性機能障害⁶⁾ などのバイオマーカーとしても注目されている。しかしながらエクソソームの生理学的な機能は十分に解明されておらず、今後、研究が進むことで病理との関係性が明らかになることが期待される。

エクソソームの実験を行うにあたっては、血漿や血清、組織、馴化培地などのサンプルからエクソソームを精製し回収するところから始まる。精製方法には、超遠心法、Poly-Ethylene Glycol (PEG) ベースの沈殿法、限外ろ過法、免疫親和性で捕獲する方法、マイクロ流体法、サイズ排除クロマトグラフィー法 (SEC 法) がある。それぞれの精製方法には固有の長所短所があるため、精製の精度や回収率に違いが生じる。Singh らが行った超遠心法と複数の市販キットを用いた比較では、エクソソーム量やサイズ分布、細胞毒性の違いが確認されており、精製方法により得られる結果に差異が生じる要因になっている⁷⁾。

現在、最も一般的に用いられる方法は超遠心法であるが⁸⁾、高い精製技術が求められる上に、高価な超遠心機が必要である。そこで簡便で特別な装置を必要としない精製方法も望まれており、これまでそれぞれの手法で課題とされてきた点を改良する報告も出てきている。ここでは PEG ベースの沈殿法と SEC 法にスポットをあて紹介する (表 1)。

表 1. 精製方法の比較表⁹⁾

精製方法	特長	課題
超遠心法	現在のスタンダードになっている方法	高度な技術と高額な装置が必要
PEG ベースの沈殿法	簡便かつ安価な方法	精製の精度が低い
SEC 法	簡便かつ安価な方法	近いサイズの不純物除去が困難

PEG ベースの沈殿法は、PEG 溶液によってエクソソームが包み込まれ凝集を促進させることで、汎用の遠心機で PEG とエクソソームの共沈殿物を回収する方法である。図 1 に示すように PEG は非特異的にエクソソーム以外のタンパク質も一緒に取り込み沈殿するため、エクソソームへの選択性が劣る¹⁰⁾。また、PEG とエクソソームは一つの凝集体として沈殿するため、PEG が下流実験に影響を及ぼす可能性もあった。そこを打開する方法として Fe₃O₄ をベースにしたマグネティックナノパーティクル (MNP) に PEG をコーティングした化合物を用いたエクソソームの精製技術が報告されている¹¹⁾。MNP の単体の構造は Fe₃O₄ 表面に多くの PEG が固定されており、大きさは約 20 nm である。さらに MNP 同士で凝集する性質を持ち、その凝集体の直径は約 400 nm ほどになる。凝集作用によって表面には無数の PEG が網目状に群がりたくさんの穴がもたらされ、タンパク質や微細な不純物がトラップされるメカニズムである (図 2a)。最終的に不純物をトラップした MNP-PEG 凝集体は磁石によって固定され、上澄みに残ったエクソソームを回収する仕組みである (図 2b)。また、PEG と Fe₃O₄ (MNP) は化学結合していること

を確認しており¹²⁾、PEG 自体が不純物として精製エクソソームに混入する可能性が低く、精度の高いエクソソームを得ることが可能になっている。実際、ウシ胎児血清や人の血清サンプルから簡便にタンパク質を除去でき 30-200 nm のエクソソームを得ることに成功しており、エクソソームに対する分離能が向上している。

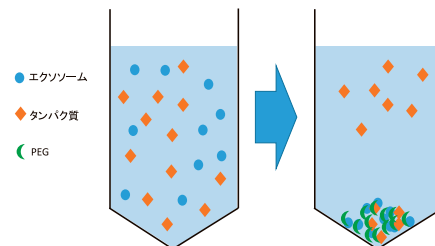


図 1 PEG ベースの沈殿法

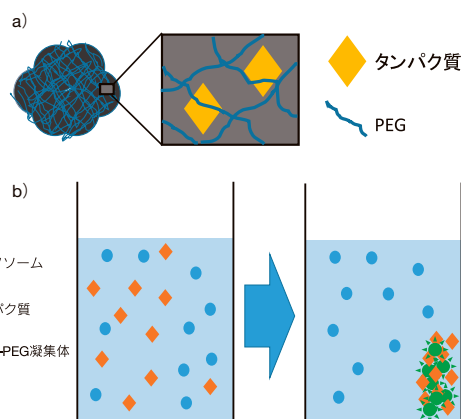


図 2 MNP-PEG を用いたエクソソーム精製メカニズム⁸⁾

SEC 法はコスト、簡便性、精製の質を総合して高く評価されている。このことは International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) が行った調査結果において、2015 年から 2019 年にかけて SEC 法を使う研究者の割合が 2 倍に増えているところにも表れている¹³⁾。しかしながら、SEC 法は大きさで分離するため、エクソソームと同じサイズの細胞由来の微小小胞体やリポタンパク質粒子の分離は不得意とされている (表 1)。精製の最適化を行うために SEC 法を超遠心法や PEG 沈殿法と組み合わせる選択肢はあるが、簡便性が失われてしまう。そこで Lee らは、低コストと簡便性を担保しつつ精製効率を上げるために、SEC と陽イオン交換膜を組み合わせたカラムを開発し、血漿に含まれるリポタンパク質粒子を SEC 法に比べて 60 倍の効率で除くことに成功している¹⁴⁾。SEC と陽イオン交換膜を物理的に組み合わせたカラムで、操作としては SEC 法と変わらない (図 3)。カラム上段の SEC で 30 ~ 40 nm 以下のタンパク質などを分離し、下段にある陽イオン交換膜で小胞体と混在しているリポタンパク質を捕捉する。このように SEC 法と変わらない簡便な操作でリポタンパク質を除去できる精製方法になっている。

簡便かつ低コストでできる新たな精製方法として、Fe₃O₄ をベースにした MNP に PEG をコーティングした沈殿法と SEC 法に陽イオン交換膜を組み合わせた方法を紹介した。目的物の機能

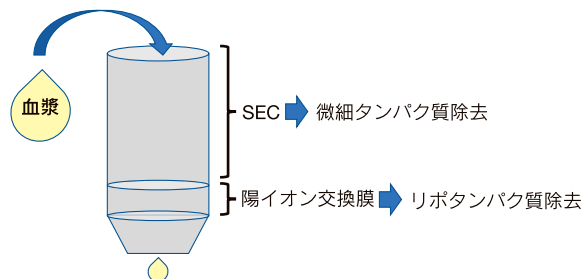


図3 SECと陽イオン交換膜からなるカラムを用いた精製

解析を行う上で「精製」は非常に重要である。今後このような方法が精製技術としてさらなる発展をしていくことでスタンダードとなり、エクソソーム研究躍進の名脇役になることを期待する。

[参考文献]

- 1) C. Thery *et al.*, “Exosomes: Composition, biogenesis and function”, *Nat. Rev. Immunol.*, **2002**, 2, 569.
- 2) H. Valadi *et al.*, “Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells”, *Nat. Cell Biol.*, **2007**, 9(6), 654.
- 3) E. Van Der Pol *et al.*, “Classification, Functions, and Clinical Relevance of Extracellular Vesicles”, *Pharmacol. Rev.*, **2012**, 64, 676.
- 4) H. Julich *et al.*, “Extracellular Vesicle Profiling and Their Use as Potential Disease Specific Biomarker”, *Front. Immunol.*, **2014**, 5, 413.
- 5) J. Salimian *et al.*, “Chronic obstructive pulmonary disease: MicroRNAs and exosomes as new diagnostic and therapeutic biomarkers”, *J. Res. Med. Sci.*, **2018**, 23, 27.
- 6) A. Milasan, *et al.*, “Extracellular Vesicles as Potential Prognostic Markers of Lymphatic Dysfunction”, *Front. Physiol.*, **2020**, 11, 476.
- 7) G. K. Patel *et al.*, “Comparative analysis of exosome isolation methods using culture supernatant for optimum yield, purity, and downstream applications”, *Scientific Rep.*, **2019**, 9, 5335.
- 8) P. Li *et al.*, “Progress in Exosome Isolation Techniques”, *Thermostics.*, **2017**, 7, 789.
- 9) K. Sidhom *et al.*, “A Review of Exosomal Isolation Methods: Is Size Exclusion Chromatography the Best Option?”, *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, 21, 6466.
- 10) R. Linares *et al.*, “High-speed centrifugation induces aggregation of extracellular vesicles”, *J. Extracell. Vesicles*, **2015**, 4, 29509.
- 11) M. Chang *et al.*, “Exosome purification based on PEG-coated Fe₃O₄ nanoparticles”, *PLoS ONE.*, **2018**, 13(6), e0199438.
- 12) M. Anbarasu *et al.*, “Synthesis and characterization of polyethylene glycol (PEG) coated Fe₃O₄ nanoparticles by chemical co precipitation method for biomedical applications”, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.*, **2015**, 135, 536.
- 13) F. Royo *et al.*, “Methods for Separation and Standardization of Extracellular Vesicles: Results of a Worldwide Survey Performed by the ISEV Rigor and Standardization Subcommittee”, *Cells*, **2020**, 9, 1955.
- 14) J. Van Deun *et al.*, “Integrated Dual-Mode Chromatography to Enrich Extracellular Vesicles from Plasma”, *adv. Biosyst.*, **2020**, 1900310.

関連製品

エクソソーム染色キット

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。

細胞外で凝集しない

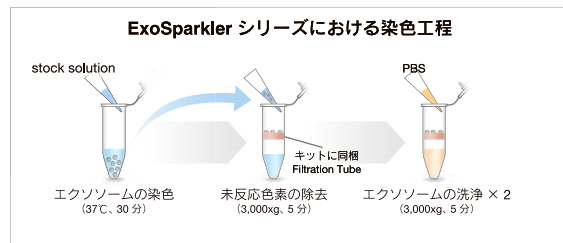


ExoSparkler (紫) と他社製品 P (緑) で細胞への取り込みを共染色で観察したところ、製品 P では色素の凝集が疑われる蛍光輝点が観察された。

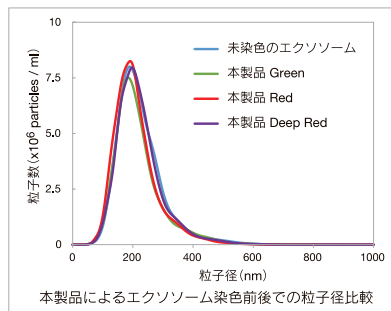
〈観察条件〉
本キット : Ex = 640 nm, Em = 640-760 nm
製品 P : Ex = 488 nm, Em = 490-540 nm

蛍光標識から精製までこのキットでできる

エクソソームの標識に最適化したプロトコルに加え、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 (同梱) で、簡単に蛍光標識エクソソームを調製できます。



エクソソームの性質にほとんど影響しない



ExoSparkler で染色前後のエクソソームを 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、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た。

エクソソーム 同仁 検索

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

開発中

エクソソーム精製キット・キット用フィルター

Exolsolator Exosome Isolation Kit

<特長>

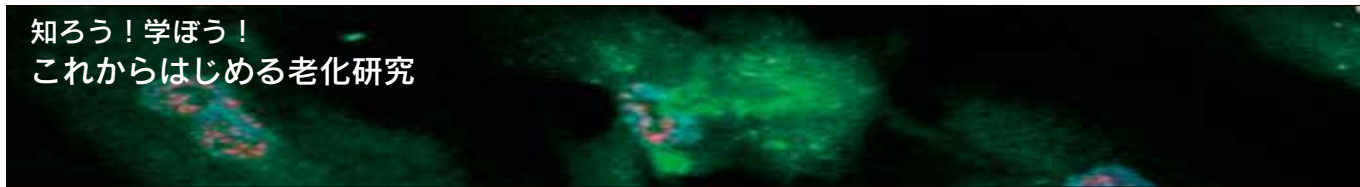
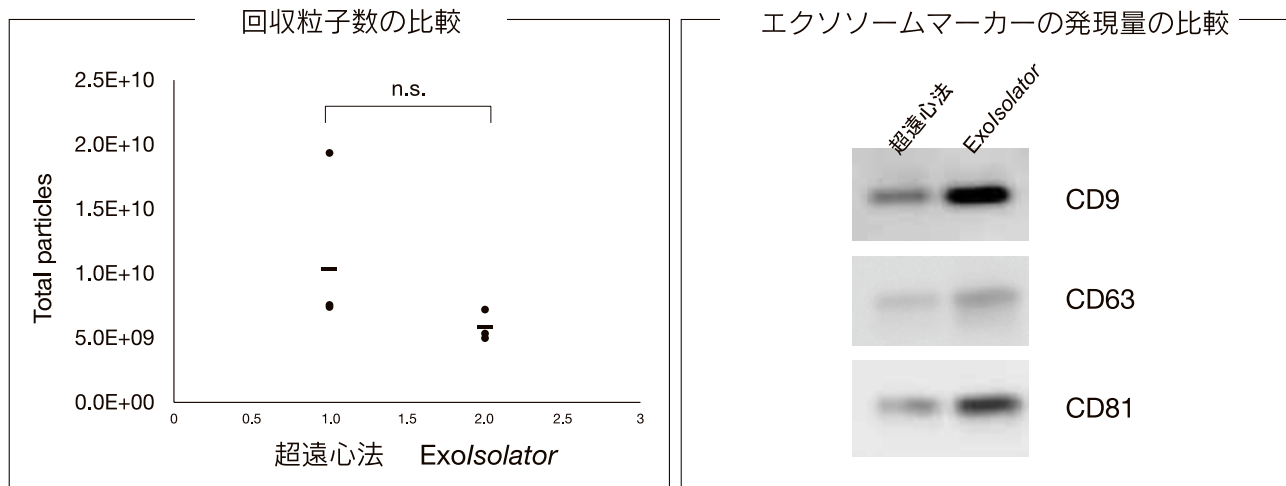
- ・細胞培養上清のフィルトレーションだけでエクソソームを精製可能
- ・エクソソームの回収率は超遠心法と同等
- ・超遠心機等の高額な機器は不要

細胞が分泌する細胞外小胞 (Extracelluart vesicle: EV) の一種であるエクソソームは、様々なタンパク質や核酸などを内包しており、エクソソームを介して内包物質が伝達されることで、受け手側の細胞に様々な影響を与えることが明らかとなっております。近年、特にがん研究分野では悪性化や転移に促進的に寄与することから注目を集めています。

Exolsolator Exosome Isolation Kit は、培養上清中に分泌されたエクソソームをフィルトレーションの操作だけで簡単に、短時間で回収することができるキットです。

<既存法との比較>

Exolsolator Exosome Isolation Kit または超遠心法により、HEK293S 細胞の培養上清からエクソソームを回収しました。回収したそれぞれのエクソソームをナノ粒子トラッキング解析 (NTA 法) で解析し比較した結果、どちらの方法でも回収できるエクソソーム量は同等であるという結果が得られました。また、ウエスタンブロットティングにて CD9、CD63、CD81 のマーカー発現量を確認したところ、Exolsolator Exosome Isolation Kit で回収したエクソソームの方がマーカーの発現量が多いことが確認されました。これらの結果から、Exolsolator Exosome Isolation Kit は超遠心法とエクソソーム回収率が同等であり、超遠心法よりも夾雑タンパク質が少ないエクソソームが回収できることがわかりました。



知ろう！学ぼう！
これからはじめる老化研究

老化研究の意義から試薬の選択まで、はじめて実験を始める方のためのお役立ち情報をまとめました。

- ・細胞老化とは
- ・細胞老化の評価
- ・細胞老化に関する学術記事
- ・細胞老化に関連する指標
- ・老化細胞検出用試薬の選択ガイド など



詳細な情報は
Webにて公開中

技術紹介

抗原の新規高感度蛍光検出法 (CLAMP 法)

近年、細胞表面抗原を標的としたがん治療や診断が注目され、がんの早期発見や治療等のためにがん細胞や免疫細胞などの細胞表面抗原の研究が活発化しています。しかしながら、細胞表面タンパク質には発現量が少ないものも多く、従来技術では検出及び解析が困難なものが多いです。細胞表面タンパク質の特異的な検出方法として、蛍光標識抗体を用いた蛍光検出法が広く知られています(蛍光免疫染色法)。しかし、感度が低く、適用対象が限られるという問題が存在します。

そこで、今回我々はこれらの課題を解決するために、新たに CLAMP 法 (quinone methide-based catalyzed signal amplification) を開発しました。本手法では、一次抗体、 β -Galactosidase 標識二次抗体と新たに開発した蛍光色素 (MUGF) を使い、特定の細胞表面タンパク質を発現する細胞を選択的かつ高感度に蛍光染色することが可能です。具体的には、細胞膜非透過性の MUGF は、 β -Galactosidase と反応し細胞膜透過性のキノンメチドに変換されます。細胞膜を透過したキノンメチドは、細胞内に存在するアミノ基やチオール基と結合し、細胞内に固定され青色蛍光を発生します。このように色素が抗原の量に依存して、細胞内に蓄積するため、高感度に抗原を検出することが可能となります(図1)。

CLAMP 法には、以下の特長があります。

- ・ 蛍光免疫染色法に比べて 10-100 倍高感度である
- ・ 生細胞、PFA 固定細胞、FFPE 組織切片などのサンプルに適用が可能
- ・ 抗原を有する細胞を選択的に染色が可能である

CLAMP 法での実験例を 3 つ紹介します。

1 つ目は、A549 細胞表面に存在する CD44 抗原の検出を蛍光免疫染色法と比較した例です。図 2 に示す通り、蛍光標識抗体法ではほとんど蛍光を確認することができませんが、CLAMP 法を用いた場合は明瞭に蛍光を確認することができました。蛍光画像から強度を定量したところ、CLAMP 法は蛍光標識法に比べて約 10 倍程度高く、高感度であることを確認しました。

2 つ目は、インターフェロン γ (INF γ) 処理により細胞表面に発現する PD-L1 を検出した例です。事前に CFSE で緑色蛍光ラベル化した INF γ 未処理の HepG2 細胞と INF γ 処理 HepG2 細胞を混合培養し、CLAMP 法により PD-L1 発現細胞の検出を行いました。その結果、青色と緑色の蛍光は重ならず、PD-L1 発現細胞のみを特異的に検出できることを確認しました(図3)。

3 つ目は、がん免疫の分野でよく測定される低発現の PD-1 抗原を CLAMP 法または蛍光免疫染色法で染色し、フローサイトメトリーで測定した例です。この実験では、フローサイトメーターの 405 nm 励起に最適化した β -Galactosidase の蛍光基質である MUGF3 を用いました。その結果、蛍光免疫染色法に比べ、CLAMP 法で高い蛍光シグナルが得られることを確認しました(図4)。

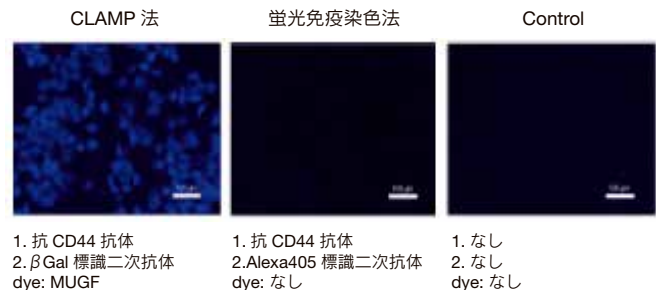


図2 蛍光イメージングでの測定結果 (A549 細胞、抗原: CD44)

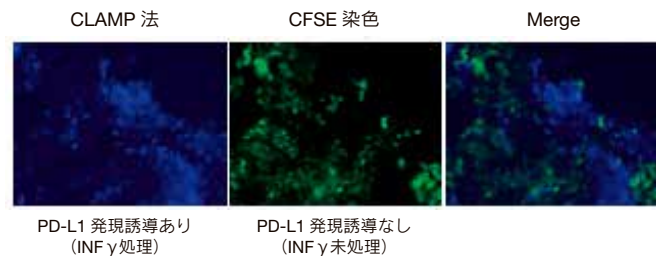


図3 細胞の特異的染色 (HepG2 細胞、抗原: PD-L1)

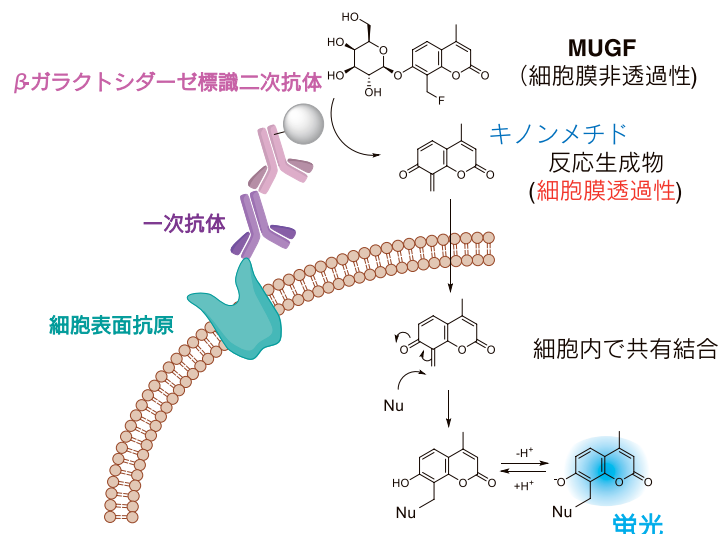


図1 CLAMP 法の原理¹⁾

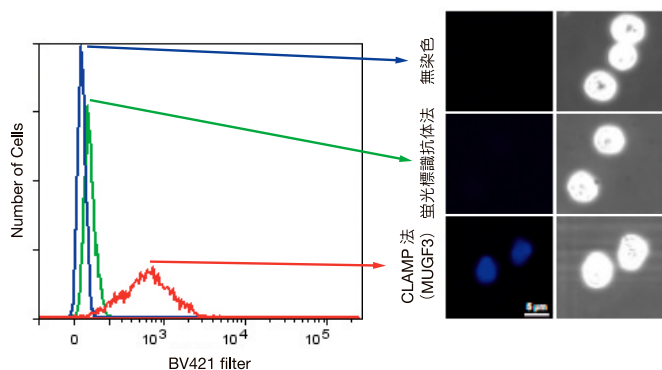


図4 フローサイトメトリーでの測定結果 (MOLT4 細胞、抗原: PD-1)

以上のように、CLAMP法は既存法に比べて高感度かつ選択的に蛍光染色できることが分かりました。新規な抗原の探索や有用な微量抗原を利用した診断法の確立などに利用されることが今後の発展とともに期待されます。

[参考文献]

- 1) K. Noguchi *et al.*, “ β -Galactosidase-Catalyzed Fluorescent Reporter Labeling of Living Cells for Sensitive Detection of Cell Surface Antigens”, *Bioconjugate Chem.*, **2020**, 31(7), 1740-1744.

本技術にご興味ございましたら、小社 HP よりお問い合わせください。

お問い合わせ先はこちら

<https://www.dojindo.co.jp/contact/>



抗体を用いた代表的な免疫実験法であるELISAと免疫染色についての原理や特徴を、はじめて実験を始める方のためのお役立ち情報をまとめました。

- ・ ELISA 原理と比較
- ・ 免疫染色 検出法と基質
- ・ お役立ち情報 など

詳細な情報は Web にて公開中



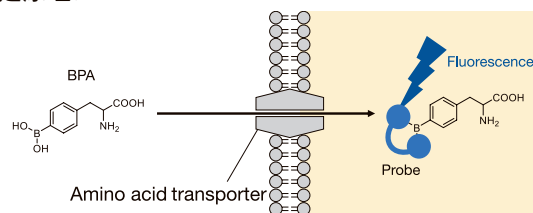
新製品

アミノ酸取り込み検出キット

Amino Acid Uptake Assay Kit

必須アミノ酸を取り込む大型中性アミノ酸トランスポーター (LAT) は、がん細胞や活性化した免疫細胞において発現が亢進していることが知られています。特に、LAT-1 はがん研究において、新規バイオマーカー及び治療ターゲットのひとつとして期待されています。小社では大型中性アミノ酸類似体であるホウ素アミノ酸 (boronophenylalanine : BPA) を用いた新規のアミノ酸取り込み能力測定法を開発しました。BPA は、大型中性アミノ酸と同様に LAT を経由して細胞内に取り込まれ、BPA と特異的に反応する蛍光プローブを用いることで検出することが可能です。本キットは蛍光イメージング、プレートリーダー測定、フローサイトメーター測定に使用できます。

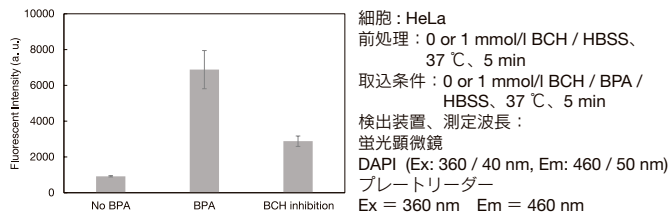
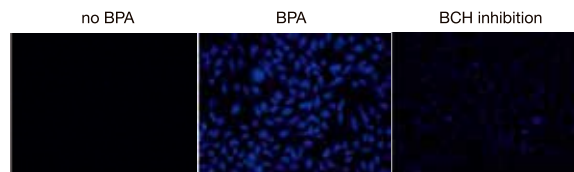
<測定原理>



< LAT 阻害剤 BCH を用いたアミノ酸取り込み阻害実験 >

Amino Acid Uptake Assay Kit を用いて LAT 阻害剤 BCH によるアミノ酸取り込み阻害を確認した。

BCH : 2-aminobicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxylic acid



※本キットは大阪府立大学 切畑光統先生から技術指導、情報提供をいただき開発した製品です。

[参考文献]

- 1) Y. Hattori *et al.*, “Visualization of Boronic Acid Containing Pharmaceuticals in Live Tumor Cells Using a Fluorescent Boronic Acid Sensor”, *ACS Sens.*, **2016**, 1(12), 1394-1397.
- 2) Y. Hattori *et al.*, “Development and Elucidation of a Novel Fluorescent Boron-Sensor for the Analysis of Boronic Acid-Containing Compounds”, *Sensors*, **2017**, 17(10), 2436.

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Amino Acid Uptake Assay Kit	20 tests	16,000	UP04
	100 tests	45,000	

新製品

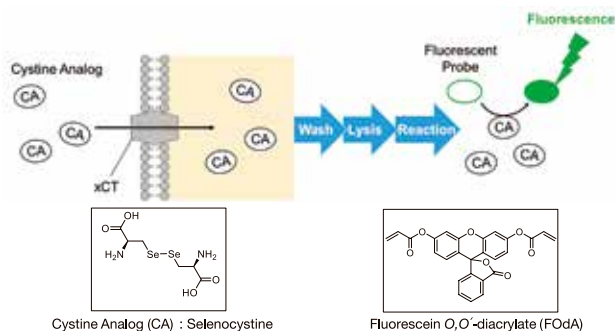
シスチン取り込み検出キット

Cystine Uptake Assay Kit

シスチン・グルタミン酸トランスポーター (xCT) は、主に細胞外液のシスチンと細胞内のグルタミン酸を 1 対 1 で交換輸送するアミノ酸トランスポーターです。xCT を介して取り込まれたシスチンは、抗酸化物質であるグルタチオンの原料として利用され、細胞内の酸化ストレス応答に重要な働きをしています。近年 xCT は、がん、神経変性疾患、免疫との関連で注目されています。特にがん幹細胞において xCT が高発現していることが分かり、xCT 阻害剤は新たながん治療薬として期待されています。

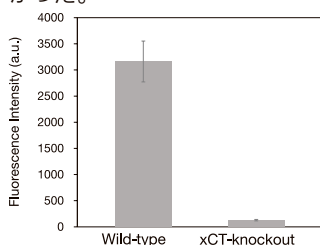
小社では Cystine Analog (CA) として Selenocystine を用いた新規の xCT 活性測定法を開発しました。この CA は、シスチンと同様に xCT を経由して細胞内に取り込まれ、CA と特異的に反応する蛍光色素 FODa を用いることで検出することが可能です。本キットは細胞のシスチン取り込み能力の測定だけでなくマイクロプレートを用いた多検体処理が可能のため、薬剤スクリーニング等にも有用です。

<測定原理>



<野生型細胞と xCT KO 細胞のシスチン取り込み能の比較>

xCT KO 細胞では、ほとんどシスチンの取り込みは観察されなかつた。



細胞 : U251 (wild-type or xCT-knockout)
 前処理 : DMEM (cystine-free, serum-free), 37°C, 5 min
 取込条件 : Cystine Analog / DMEM (cystine-free, serum-free), 37°C, 30 min
 検出装置 : プレートリーダー
 測定波長 : Ex = 490 nm, Em = 535 nm

※ U251 wild-type 及び xCT knockout 細胞は京都大学 加藤裕教先生にご提供いただきました。

[参考文献]

- 1) T. Shimomura *et al.*, "Simple Fluorescence Assay for Cystine Uptake via the xCT in Cells Using Selenocystine and a Fluorescent Probe", *ACS Sens.*, **2021**, 6(6), 2125-2128.

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Cystine Uptake Assay Kit	20 tests	18,000	UP05
	100 tests	50,000	

関連製品

グルコース取り込み検出キット

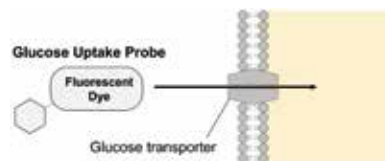
Glucose Uptake Assay Kit-Blue, -Green, -Red

<特長>

- ・既存法 (2-NBDG) よりも高感度
- ・簡便な操作と短時間での染色が可能
- ・染色後の色素の漏れ出しを軽減

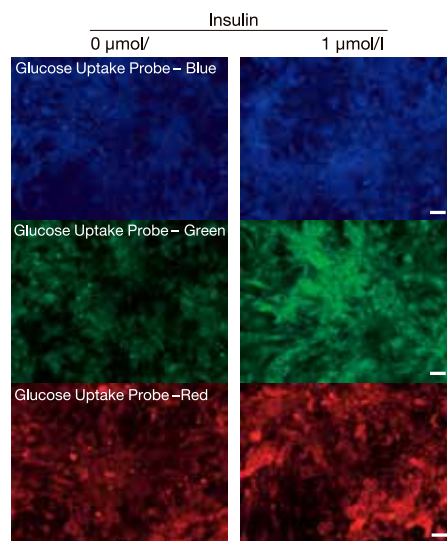
本キットに含まれる Glucose Uptake Probes は、既存品 2-NBDG と同様の蛍光標識グルコースです。グルコース類似体であるこれらの試薬はグルコーストランスポーターを介して細胞内に取り込まれるため、蛍光顕微鏡などの蛍光測定法によって細胞のグルコース取り込み能力を測定することができます。

<測定原理>



<インスリンによるグルコース取り込み促進>

Glucose Uptake Assay Kit を用いてインスリンによる脂肪細胞のグルコース取り込み促進を観察した。



細胞 : mouce adiocyte 使用培地 : DMEM (5.5 mmol/l Glucose)
 前処理 : 1 μmol/l Insulin / DMEM (5.5 mmol/l Glucose), 37°C, 15 min
 染色条件 : x500 Glucose Uptake Probe / DMEM (0 mmol/l Glucose), 37°C, 15 min
 検出装置 : 蛍光顕微鏡
 検出条件 : DAPI (Ex: 360 / 40 nm, Em: 460 / 50 nm)
 GFP (Ex: 470 / 40 nm, Em: 525 / 50 nm)
 TRITC (Ex: 545 / 25 nm, Em: 605 / 70 nm)
 スケールバー : 50 μm

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Glucose Uptake Assay Kit-Blue	1 set	40,000	UP01
Glucose Uptake Assay Kit-Green	1 set	38,000	UP02
Glucose Uptake Assay Kit-Red	1 set	40,000	UP03

新製品

ADP/ATP 測定キット

ADP/ATP Ratio Assay Kit-Luminescence

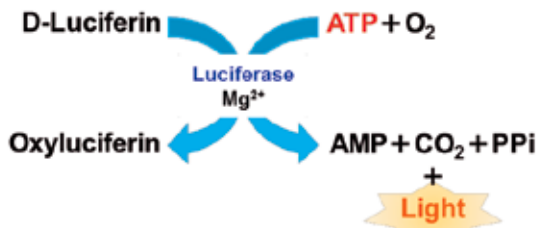
<特長>

- ・ ADP/ATP Ratio を再現性よく測定
- ・ 調製溶液の保存が可能
- ・ 洗浄操作は不要
- ・ マイクロプレート法のため多検体測定が可能

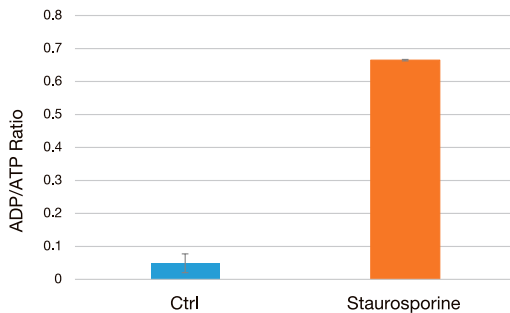
ATP は解糖系およびミトコンドリアにおける TCA 回路や電子伝達系でつくられ、細胞が生きていくためのエネルギー源として重要です。通常、細胞の ATP 産出が低下すると、分解物である ADP から再合成され、細胞内の ATP 濃度が保たれています。しかし、ATP 産出の代謝が破綻すると、ADP から ATP を再合成できなくなりますが、細胞内の ATP は ADP へと変換が進むため、ADP/ATP Ratio が上昇します。ADP/ATP Ratio の変化は、細胞活性の有用な指標の一つです。

<測定原理>

はじめに細胞中の ATP 量をホタル・ルシフェラーゼ発光法で測定します。次に、ADP を酵素を用いて ATP に変換し、同様にして総 ATP 量を測定します。総 ATP 量から最初に測定した ATP 量を差し引くことで、細胞内の ADP 量を算出し、ADP/ATP Ratio を決定します。



<実験例：薬剤刺激による ADP/ATP 比の変化>



刺激剤：Staurosporine, 5 μmol/l, 5 h
細胞：Jurkat

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
ADP/ATP Ratio Assay Kit-Luminescence	100 tests	50,000	A552

新製品

解糖系 / 酸化的リン酸化測定キット

Glycolysis/OXPHOS Assay Kit

<特長>

- ・ マイクロプレートリーダーで評価可能
- ・ 実験に必要な試薬が全て同梱されたオールインワンのキット
- ・ 試薬を加えてインキュベートする簡便な操作

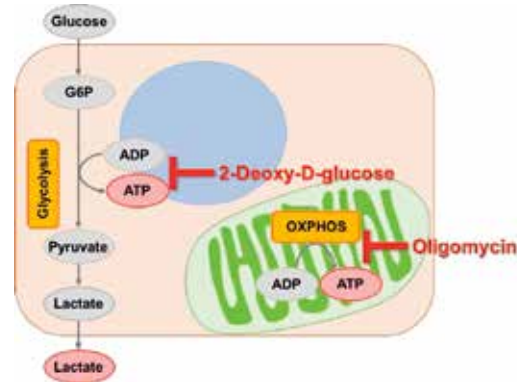
解糖系およびミトコンドリアの酸化的リン酸化で産生される ATP は、細胞が生きていくためのエネルギー源として重要です。最近の研究によりがん細胞は、解糖系が抑制されても、ミトコンドリア機能を亢進させることでエネルギー代謝を酸化的リン酸化にシフトさせ、生存に必要な ATP を産生するようになることが報告されています^{1,2)}。

Glycolysis/OXPHOS Assay Kit は、阻害剤 (Oligomycin や 2-DG) を使用し、細胞の解糖能、代謝シフトなどを Lactate や ATP を指標に評価するキットです。本キットには、これらの評価に必要な試薬が全て同梱されています。

1) R. Shiratori, et al., *Sci. Rep.*, **2019**, 573, 595-599.
2) J. Kim, et al., *Cancer Cell*, **2019**, 35, 191-203.

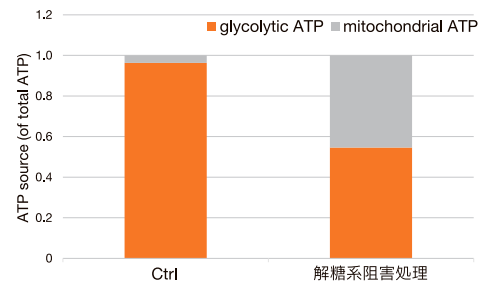
<測定原理>

Oligomycin で酸化的リン酸化での ATP 合成を阻害、あるいは、2-DG で解糖系での ATP 合成を阻害させた時の ATP (発光量) や Lactate (吸光度) の変化を測定します。



<解糖系阻害による細胞の代謝シフト評価>

解糖系を阻害する薬剤で処理することによって、HeLa 細胞はミトコンドリアでの ATP 産生を増加させ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
Glycolysis/OXPHOS Assay Kit	50 tests	48,000	G270

関連製品

細胞内代謝関連製品

細胞内の代謝システム（解糖系や TCA 回路、ペントース - リン酸経路等）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。

既存の市販製品よりも高い操作性を実現した小社製品は、はじめて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も同梱しています。

測定指標	検出	操作
<ul style="list-style-type: none"> グルコース 乳酸 グルタミン グルタミン酸 NAD/NADH NADP/NADPH 	比色	<p>培養上清をプレートに移し発色試薬と混合するだけ</p> <p>培養上清を添加 → 発色試薬添加 → 37°C, 30分 インキュベーション → 吸光度測定 (450 nm)</p> <p>解析: プレートリーダー</p> <p>キット同梱の除タンパク質チューブ[※]と細胞溶解バッファーにより前処理が簡便</p> <p>細胞の洗浄、溶解 → 遠心 → 除タンパク質 → キットに同梱は同じ化学だけ! → NAD(P)Hの溜り分け → NAD(P)⁺を加温分解 (60°C) → 遠心 → 発色試薬添加 → 37°C, 30分 インキュベーション → 吸光度測定 (450 nm)</p> <p>解析: プレートリーダー</p> <p>※ グルタミン、グルタミン酸、NAD(P)/NAD(P)H に同梱しています。</p>
<ul style="list-style-type: none"> ATP ADP/ATP 	発光	<p>キット同梱の ATP 標準試薬と小容量のラインナップにより、手軽に試せる</p> <p>サンプル溶液添加 → 試薬添加 → 2分震とう → 10分 インキュベーション → 発光測定</p> <p>解析: 発光プレートリーダー</p> <p>サンプル前処理 → 試薬添加 → 2分震とう → 10分 インキュベーション → 発光測定 → 試薬添加 → 10分 インキュベーション → 発光測定 → 試薬添加 → 2分震とう → 8分 インキュベーション → 発光測定</p> <p>解析: 発光プレートリーダー</p>
<ul style="list-style-type: none"> α-ケトグルタル酸 	蛍光	<p>既存品の課題であるバラつきを低減した操作</p> <p>細胞の洗浄、溶解 → 遠心 → 反応試薬添加 → 37°C, 30分 インキュベーション → 発色試薬添加 → 37°C, 30分 インキュベーション → 蛍光測定</p> <p>解析: 蛍光プレートリーダー</p>

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Glucose Assay Kit-WST	50 tests	18,000	G264
	200 tests	38,000	
Lactate Assay Kit-WST	50 tests	29,000	L256
	200 tests	68,000	
Glutamine Assay Kit-WST	100 tests	55,000	G268
Glutamate Assay Kit-WST	100 tests	50,000	G269
NAD/NADH Assay Kit-WST	100 tests	54,000	N509
NADP/NADPH Assay Kit-WST	100 tests	54,000	N510
ATP Assay Kit-Luminescence	50 tests	25,000	A550
	200 tests	45,000	
α-Ketoglutarate Assay Kit-Fluorometric	100 tests	64,000	K261

新製品

リソソーム染色試薬

LysoPrime Green - High Specificity and pH Resistance

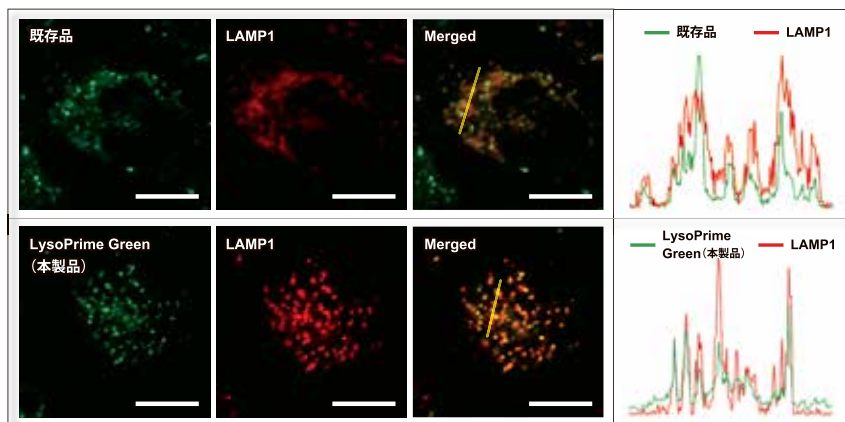
<特長>

- ・リソソームへの特異性が高い
- ・リソソームの pH 変化の影響を受けにくい

リソソームは不要な物質を分解することで生体内恒常性の維持に寄与しています。リソソームの機能不全は神経変性疾患等の発症・進展に深く関与していることから、リソソームを詳細に解析することが病態の解明や治療薬の開発に有用であると考えられています。リソソームの生細胞解析では低分子蛍光色素を用いたライブイメージングが汎用されてきましたが、特異性や pH 変化による染色能の低下が課題として挙げられてきました。本製品はこれらの課題を解決した製品です。

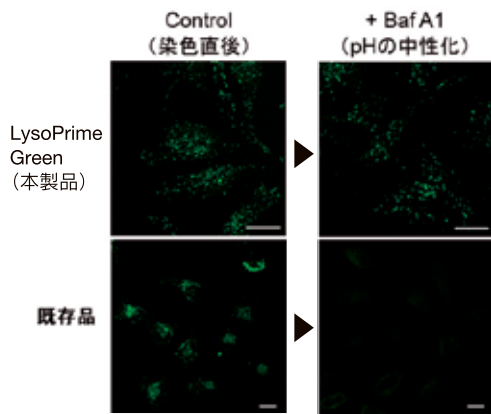
<実験例：リソソームへの特異性が高い>

既存色素と LysoPrime Green（本製品）のリソソーム局在性をリソソームマーカータンパク LAMP1-RFP 発現 HeLa 細胞を用いて比較しました。既存色素による染色ではリソソーム以外にも分散してバックグラウンドが高くなったのに対し、LysoPrime Green ではバックグラウンドが抑えられる結果が得られました（蛍光画像 Merged）。また、蛍光画像の範囲において蛍光強度を測定した結果、LysoPrime Green は既存色素と比較してリソソームへの局在性が高いことが判りました（右図）。



<実験例：pH 非依存な色素であることの確認実験>

本製品および既存色素は酸性状態にあるリソソームに集積する性質を有しますが、リソソーム酸性阻害剤である Bafilomycin A1 (Baf A1) で処理すると、既存色素はリソソームから離れることで蛍光シグナルが著しく低下します。その一方で、本製品はリソソームに保持されやすい構造を有するため蛍光シグナルの低下が抑えられました。



細胞 : HeLa
 染色条件 :
 LysoPrime Green working solution (2000 倍希釈)、37℃、30 分
 Bafilomycin A1 100 nmol/l、37℃、30 分

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
LysoPrime Green - High Specificity and pH Resistance	10 μl	13,000	L261
	10 μl × 3	27,000	

ミトコンドリア関連試薬

ミトコンドリア研究用試薬製品群

スーパーオキシドの検出
mtSOX Deep Red - Mitochondrial Superoxide Detection
 ミトコンドリアスーパーオキシドを長波長励起 (Deep Red) で検出可能

鉄 (II) の検出
Mito-FerroGreen
 ミトコンドリア内の 2 価鉄を選択的に検出できる

マイトファジーの検出
Mitophagy Detection Kit
 低分子蛍光プローブにより生細胞中のマイトファジーを簡便に検出できる

グルコース測定キット
Glucose Assay Kit-WST
 培地中のグルコースを定量し、細胞のグルコース消費量を確認できる

一重項酸素の検出
Si-DMA for Mitochondrial Singlet Oxygen Imaging
 UV 照射等で発生した一重項酸素をリアルタイムにイメージングできる

脂溶性過酸化物の検出
MitoPeDPP
 ROS により酸化障害を受けたミトコンドリア中の脂溶性過酸化物を検出できる

免疫染色用ミトコンドリア局在の検出
MitoBright IM Red for Immunostaining
 免疫染色法と共染色できる。固定化・膜透過処理後もミトコンドリアに滞留しやすい

膜電位の検出 (MT-1)
MT-1 MitoMP Detection Kit
 JC-1 よりも高感度に検出できる。また固定化後の観察やモニタリングも可能

乳酸測定キット
Lactate Assay Kit-WST
 解糖系の代謝産物である乳酸を定量することができる (1 of Lactate (mmol/l))

細胞内 ROS の検出
ROS Assay Kit - Highly Sensitive DCFH-DA-
 既存の DCFH-DA よりも高感度に検出することが可能

ミトコンドリア局在の検出 MitoBright LT Series (Green / Red / DeepRed)
 Green Red Deep Red
 細胞内のミトコンドリアを特異的に染色できる。実験に応じた蛍光波長の選択が可能

膜電位の検出 (JC-1)
JC-1 MitoMP Detection Kit
 ミトコンドリア膜電位を簡便な操作で検出ができる。またイメージング検出の他、実験に応じて定量解析、多検体処理への対応可能

ミトコンドリア研究用試薬の比較の詳細はこちら

<https://dojindo.co.jp/products/contents/mitochondria-mitophagy-autophagy-ros-detection-imaging.html>

リソソームを正確に見る

▶ **リソソーム染色色素** 
 LysoPrime Green – High Specificity and pH Resistance

随時情報更新中!



アミノ酸取り込み能力を 簡便に見る

▶ **アミノ酸取り込み測定キット**
 Amino Acid Uptake Assay Kit   

随時情報更新中!



▶ **30秒でわかる グルコース取り込み測定キット** Webで公開中




【ご案内】次号（180号）から書誌サイズをA4サイズへ変更致します。

URL : <https://www.dojindo.co.jp/>
 Free Dial : 0120-489-548 (受付時間：平日 9:00～17:00
 土・日・祝日は除く)

次号テーマ案内
パイロトーシス