DOJIN NEWS
ドージンニュース
2023 No.185
ISSN 0385-1516

GTPエネルギー代謝機構

総　説

細胞内GTPセンサー･PI5P4Kβの発見とガンや代謝疾患への新たな治療戦略

GTP Energy Metabolism
Discovery of GTP sensor PI5P4Kβ: A Gateway to Innovative Cancer and Metabolic Disease Therapies

シンシナティ大学　佐々木 敦朗、東京大学　竹内 恒、
高エネルギー加速器研究機構（KEK）千田 俊哉

注目の研究

包括的な解析が明らかにする新たな細胞代謝の世界

Dojindo Molecular Technologies,Inc.　清野　涼

連　載　抗酸化キットを使う前のサンプル前処理法 P.11

新製品　リソソーム pH 検出キット Green / Deep Red P.12
オートファジー経路測定キット P.14
解糖系 / ミトコンドリア膜電位測定キット P.16

DOJIN NEWS
2023 No.185 ドージンニュース

CONTENTS

Review

GTPエネルギー代謝機構
細胞内GTPセンサー・PI5P4Kβの発見とガンや代謝疾患への新たな治療戦略
GTP Energy Metabolism
Discovery of GTP sensor PI5P4Kβ: A Gateway to Innovative Cancer and Metabolic Disease Therapies 1

Commercial

細胞内代謝関連製品…… 8
解糖系 / 酸化的リン酸測定キット…… 9
リソソームpH検出キット Green/Deep Red …… 12
リソソーム染色試薬…… 13
リソソームpH検出用試薬 …… 13
リソソームpH検出キット Red/Green …… 13
オートファジー経路測定キット…… 14
オートファジー検出試薬…… 15
解糖系/ミトコンドリア膜電位測定キット …… 16
ミトコンドリア関連試薬…… 17

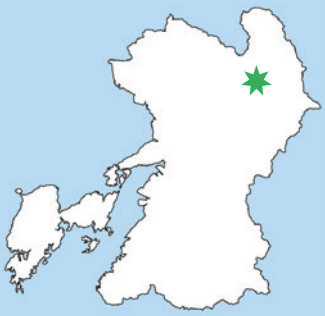
Topics on Chemistry
包括的な解析が明らかにする新たな細胞代謝の世界
Dojindo Molecular Technologies, Inc.　清野 涼 10

連載
抗酸化キットを使う前のサンプル前処理法　〈第1回〉
株式会社同仁グローカル　　山口 勝則 11

表紙:阿蘇　外輪山

阿蘇外輪山を走っていると、秋に向けた準備を始めた牧場に遭遇。大きなトラクターが草を刈りロール状にコロンコロンとお尻から出る様子を撮影した。

photo:永島 俊介氏



ツイッター

小社製品の最新情報や使用文献などをツイートしています。

フォローお願いします

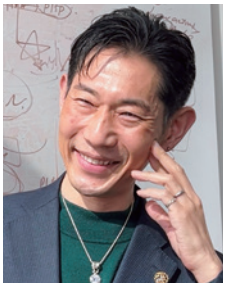
@dojindoinfo

※希望納入価格には消費税は含まれておりません。
※記載価格は本誌発行時における希望納入価格です。
　予告なしに変更する場合がございますのでご注意ください。
※掲載製品は試験・研究用のみに使用するものです。医療用その他の目的には使用できません。

GTP エネルギー代謝機構
細胞内 GTP センサー・PI5P4Kβの発見とガンや代謝疾患への新たな治療戦略

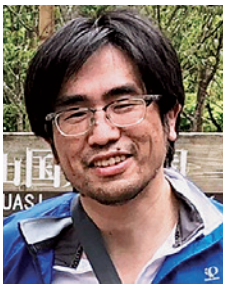
GTP Energy Metabolism
Discovery of GTP sensor PI5P4Kβ: A Gateway to Innovative Cancer and Metabolic Disease Therapies

The GTP-GEEKS 代表



佐々木 敦朗

シンシナティ大学
医学部
教授



竹内 恒

東京大学
大学院薬学系研究科
教授

千田 俊哉

高エネルギー加速器研究機構（KEK）
物質構造科学研究所
教授

Abstract

Guanosine-5'-triphosphate (GTP), a building block of nucleic acids, also provides energy that drives protein synthesis and the cytoskeletal system. Cellular GTP concentrations relative to ATP vary substantially among tissues and increase significantly in multiple cancer cells. Our previous and ongoing studies have shown that life evolved the GTP energy utilization for new cellular functions, and its dysregulation leads to various pathological conditions, such as cancer and metabolic diseases. Here, we GTP-GEEKS will introduce new biological functions from the perspectives of GTP - its involvement in cancer, metabolic diseases, and stress regulation. Our emphasis is also on the efforts to promote an interdisciplinary research on GTP energy metabolism beyond the boundaries of nations and specialties.

1. はじめに

“What if life restarts again?”

生命の定義の一つたるエネルギー代謝に、ATP を代表としたリボヌクレオチドは深く関わっている。例えば、脂質合成は CTP、糖鎖合成は UTP によりなされ、ATP はそれらを支える基盤として働く。我々が取り組んでいる GTP は、細胞の主要成分のひとつ「タンパク質」の合成を駆動するエネルギー分子である。しかしながら、なぜ生命の発生そして進化の過程で GTP が「タンパク質」の合成を駆動するようになったのだろうか？生命は GTP を ATP などと使い分けることで、どのように機能を拡張し、その進化を可能にしてきたのだろうか？ ダイナミックに変動する GTP エネルギー代謝を支える仕組みとその変動が持つ意味はなんだろうか？

我々 GTP-GEEKS は、GTP にまつわるこれらの謎に取り組むことで、生命システムの根源的な理解を目指して研究に取り組んできた。その最初の大きな成果は、細胞内の GTP 量を感知する“GTP センサー”が哺乳細胞に備わっていることを見出したことである [1-4]。GTP センサーの正体は、脂質キナーゼであった。驚くべきことにこの脂質キナーゼは、GTP を基質としてリン酸転移反応を行う特異な性質を持っており、キナーゼは基質のリン酸化に ATP を用いるという既成概念を打ち破った。さらに、がん細胞においては GTP 代謝リプログラムが起こり、高い GTP 濃度が維持されることで、細胞の同化反応が促進されること、またそれゆえ、GTP 代謝システム自体が、がん治療の標的になりうることも見出してきた [5-10]。これらはいずれもオリジナルな研究成果であり、解決すべき新たな謎が次々にでてきている。本稿では GTP センサーの発見からみえてくる新たな GTP にまつわる生命機能—癌や代謝疾患、ストレス制御への関与—について、国や専門の壁を超えて学際的な研究を推し進める我々の取り組みとともに紹介する。

2. GTP の役割

GTP は ATP と同じプリン塩基を持つリボ核酸であり、エネルギー分子として様々な細胞機能を駆動するのも同じである。しかしながら、両者がエネルギー分子として働く局面には、明確な違いがある。ATP は細胞内のほぼ全ての代謝反応に関与しており、GTP の合成にも必要である。細胞の ATP 濃度は常に高く、哺乳細胞では 1-5 mM に保たれる。一方で GTP はタンパク質の合成や制御、細胞骨格の形成、膜輸送、シグナル伝達を駆動する役割を持っており、細胞の GTP 濃度は、0.1-1 mM の濃度域で変動する。

2.1. GTP 代謝異常と疾患

GTP 合成に関わる幾つかの酵素には遺伝性疾患が報告されており、その表現型から GTP 代謝調節は生体において脳機能や視覚、免疫システムにおいて重要な役割を担っていることが知られている。また、GTP 代謝異常は痛風などの疾患とも関連する。例えば、サルベージ経路において GTP 合成を担う HPRT1（Hypoxanthin-Phosphorybosyl transferase-1）に機能欠失型変異があると、部分欠失では高尿酸血症となり、重症の痛風や急性腎不全を引き起こす（Kelley-Seegmiller 症候群）。HPRT1 活性がほぼ完全に欠失すると自ら手指や口唇を噛む、頭を壁などに打ち付けるなどの自傷行為や、運動障害、認知機能障害を起こす（Lesch-Nyhan 症候群）[11-13]。新規（*de novo*）GTP 合成の律速酵素 IMPDH（Inosine monophosphate dehydrogenase）のアイソザイム 1 型（IMPDH1）の機能低下型変異は、網膜色素変性症を引き起こす（Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa および Leber congenital amaurosis）[14, 15]。これは、目の網膜が GTP 濃度がとくに高い器官であることと関係している。網膜の視細胞は光刺激により GTP を cGMP へ変換し、視神経への入力信号を惹起する。IMPDH1 は視細胞における GTP 維持に重要な役割を果たしており、その機能低下は網膜変性を引き起こし、視覚の老化を加速する結果、失明に至る[16]。また、IMPDH 阻害剤は、免疫抑制効果があり、臓器移植における拒絶反応の抑制や全身性エリテマトーデス（systemic lupus erythematosus: SLE）など自己免疫疾患の治療に用いられている[17, 18]。これは免疫システムの作動に、GTP が重要な役割を担うことを示している。このように GTP 代謝の破綻は、様々な生体機能の異常と病態をもたらす。

3. GTP 代謝の謎

3.1. 知識のギャップ① GTP 濃度変化とその制御

歴史も深く、生命科学に携わる研究者なら誰でも知っている分子である GTP、その構成因子であるグアニンは最初に発見された核酸塩基である（1844 年発見）。グアニンは農作物の収穫増産に重要な堆肥の成分でもあり、人類との関わりは紀元前 500 年、インカ帝国まで遡る[9]。核酸の生合成経路は 1940 年代から 1950 年代にかけて同定され（図 1）、今に至るまでそのマップは基本的に変わっていない。一方、生体維持に重要な役割を持つ GTP 量は、組織や細胞種ごとに制御を受けており、GTP の ATP に対する量比は大きく異なる（図 2）[19]。一般に、増殖する細胞においては、GTP 濃度が顕著に増加する。これはバクテリアからヒトまで広く報告がある。この時、GTP の増加率は、ATP のそれを大きく上回る。しかし、生化学の教科書に記載のある ATP・GTP 合成のフィードバック制御では、生体が GTP 濃度を独立に制御している事実を説明することが難しい。フィードバック制御では、ATP と GTP が互いの合成経路を促進させるため、GTP/ATP 比の大きな変化を原理的に生み出すことはできないためである。

GTP や ATP の量の制御を考えるときには、それらがどのように消費されるのかも考える必要がある。GTP や ATP は加水分解で GDP と ADP などになるが、これらはリン酸化によりワンステップで GTP と ATP に再生できる。一方、再生されにくい消費としては、RNA や DNA への組み込みがある。また GTP から BH_4（テトラヒドラビオプテリン）への変換や、ATP から CoA（コエンザイム A），NAD^+/NADH, $NADP^+$/NADPH, SAM などへ変換も再生されにくい消費反応といえる。こうした消費反応の他にも、各種代謝酵素の発現量の変動や翻訳後修飾による活性制御などの要素が存在するため、細胞内における GTP・ATP 濃度の制御には未だ不明な点が多い。消費と合成の総和として決まる GTP・ATP 濃度であるが、その制御機構は実はブラックボックスのままなのである。さらに複雑なことに、GTP 代謝は、エピジェネティックな変化や翻訳後修飾など非遺伝的な仕組みにより、制御を受けていることも考えられ、その破綻が先述の疾患に付随する病態とも関係していると考えられている。いずれにせよ、激しく増殖を行い GTP 消費量の多い細胞で、GTP 量が高く保たれている事実は、消費と合成がともに積極的な制御を受けていることを示している。

3.2. 知識のギャップ② GTP 濃度の変動と機能

GTP 濃度の変動が、細胞や生体の機能に変換される仕組みにも謎は多い。にもかかわらず、G タンパク質シグナルが広く知られているため、GTP 濃度変化の意義についても、多くのことが分かっているような気になりがちである。実際に、科学論文においてさえ、GTP 濃度低下では G タンパク質の「活性低下」が起こる結果、「○△□のような現象が惹起される」との考察が散見される。筆者のひとり佐々木も、そのように思い、GTP 濃度の低下で、癌原遺伝子として知られる G タンパク質 RAS の活性が低下するだろうと思い実験を行った。しかし、この予想は見事に外れ、RAS の活性は GTP 濃度を下げても変化しなかった（関連データは文献[8]）。これは大きな驚きであった。実は、多くの G タンパク質は GTP や GDP に対し高い親和性を持ち、生理的な GTP 濃度の変動は機能に影響を与えない[20]。とすれば、実際には何が GTP 濃度を、細胞機能に変換しているのであろうか？このような疑問に答えるべく、GTP-GEEKS の挑戦がはじまった。

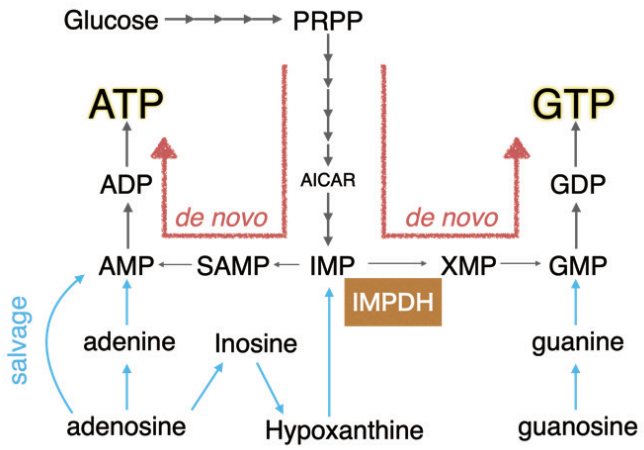


図 1. プリン核酸合成経路 . PRPP (phosphoribosylpyrophosphase), AICAR (5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide), IMP (inosine monophosphate), XMP (xanthine monophosphate), GMP (guanosine monophosphate), GDP (guanosine diphosphate), GTP (guanosine triphosphate), SAMP (succinyl-adenosine monophosphate)

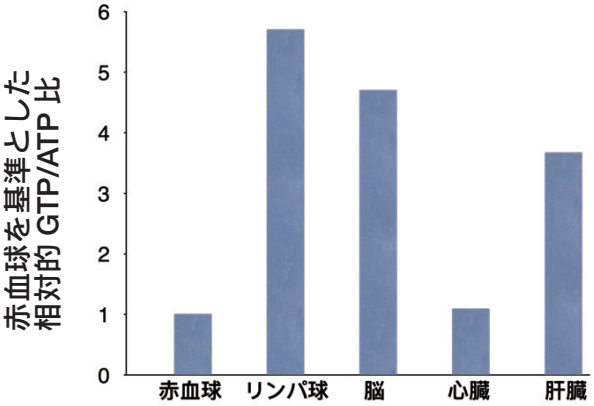


図 2. 細胞や組織ごとの相対的 GTP 量。GTP 量を ATP 量で割ったもの。赤血球における値を 1 として作図。データの出典は Traut 博士の文献（19）による。

4. 細胞内 GTP センサーの発見

4.1. 細胞内のセンサーシステム

エンジンなどの内燃機関には、須く燃料ゲージが付いている。どのくらいのエネルギーが残っているのかが分からないと、エンジンが突然停止して路頭に迷う車が続出し、社会機能は麻痺するだろう。スマートフォンの電池残量がわからないと、多くの人は不安を覚え、社会活動にも制限がかかるに違いない。センサーは、システムを安定的に効率よく動かすために必須といえる。複雑なシステムである細胞にも様々なセンサーが存在する。細胞内の酸素濃度を感知する PDH-HIF システムは、低酸素時に転写リプログラムを誘導しミトコンドリアの酸化的リン酸化システムをダウンレギュレーションし、細胞の酸素消費を抑制することで、解糖系による ATP 再生や血管新生による酸素供給増加を促す。mTOR システムはアミノ酸や脂質など様々な栄養状態を感知して、細胞の同化作用や分解作用のバランスを制御する。AMPK は細胞の ATP エネルギーの状態を感知して、mTOR と協働的に細胞機能を制御する。これらの代謝システムとセンサー分子の発見は、生命への理解を大きく深めただけでなく、センサー分子自体が、がんや代謝疾患などの治療開発標的として、世界中で熾烈な研究開発競争の対象になっている。その発見において、日本勢は黎明期に大いに健闘していたが、ある時期から後塵を拝している状況にある。

4.2. 細胞内 GTP 濃度感知におけるミッシング・リンク

GTP グループリーダーの一人佐々木敦朗は、留学先のハーバード大で G タンパク質の RAS を研究するなかで、GTP 変動の挙動が ATP と違うことに強いギモンを覚えた。なぜ GTP 濃度には大きな幅があるのか？教科書にその答えはなく、論文も見つけられず、当時ポスドクとして在籍していたハーバード大の著名な研究者に聞くも回答は得られなかった。どうも、見落とされてきた大事なものがある。GTP 濃度を感知する仕組み（GTP センサー）や、未知の GTP エネルギー代謝システムがあるのではないだろうか？ GTP 濃度変動が生み出す代謝シグナルは、生命のエネルギー利用に新たな自由度を与え、そのロバストネスの獲得につながったのではないだろうか？ であるならば、その機能獲得は進化的にどのようになされてきたのだろうか？　佐々木は新たな GTP 研究への道へ進むことを決意した。GTP センサーがあるとすれば、

1）GTP に結合する性質
2）生理的な GTP 濃度への応答性
3）さらに GTP 濃度変化をシグナルに変換する機能

この 3 つの条件を持つはずである。であれば、GTP に結合する分子をまずは同定してみよう（図 3）。これが今の GTP 研究につながる第一歩となった。

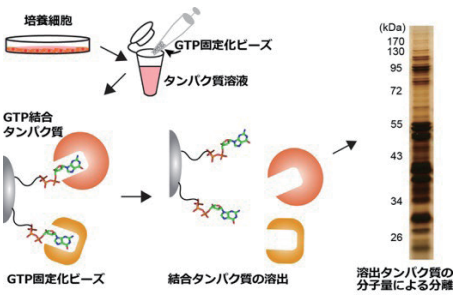


図 3.　GTP 結合タンパク質のプロテオミクスによる探索。GTP を固相化したビーズと細胞抽出液を混ぜプルダウン。様々な条件で溶出したタンパク質を質量解析により同定したところ、GTP への選択性が高い候補分子として PI5P4Kβ が感知された。

4.3. GTP に結合するキナーゼがあった！

佐々木が釣り上げた GTP 結合性分子の中に、イノシトール脂質キナーゼ PI5P4Kβがあった。PI5P4Kβは代謝やがんに重要との報告がある興味深い分子である 。PI5P4Kβのノックアウトマウスは、高脂肪食負荷による肥満抵抗性を示す一方でインシュリン感受性が増大する（例えるなら、毎日ハンバーガーやケーキをバクバク食べても太りにくく糖尿病にもなりにくい表現型）[21]。PI5P4Kβと p53 のダブルノックアウトマウスは胎生致死となる[22]。細胞レベルでは、p53 変異のある乳がん細胞の増殖や腫瘍化に重要といった知見がある。メカニズムは不明な点が多いながら、こうした synthetic lethality（合成致死）はあたかも PI5P4Kβが p53 が担う機能を相補しているようにも見える。しかし、ATP を好むはずのキナーゼがなぜ GTP に結合するのだろうか ?PI5P4Kβが GTP を使う生理的な意義は？疾患とのつながりは？大事な問いだが、これに答える術をもっておらず佐々木は壁にぶつかった。

4.4. GTP バイオロジー推進に必要な専門性

未踏の GTP バイオロジーを進めるためには、表現型の解析に加えて、それらを検証して理解することが必要である。分子レベルはもちろんのこと、原子レベルでのメカニズム解明が欠かせない。GTP センサーに関していえば、原子レベル、すなわち GTP 認識の構造生物学的な理解が最低限必要である。立体構造情報に基づいて PI5P4Kβの GTP に対する親和性を変化させた変異体や阻害剤などを開発することで、初めて細胞や個体での GTP の役割、そして GTP センサーの進化についての解析が可能になるだろう。ここに運命的ともいえる、NMR と創薬科学のエキスパート竹内恒 博士（現・東大院・薬系 教授）、X 線・クライオ電顕などを用いた構造解析をリードする千田俊哉 博士（現・KEK 教授・SBRC センター長）との出会いがあり、佐々木・竹内・千田をコアとした GTP 研究のオタクたちの集うチーム、GTP-GEEKS が生まれた。

4.5. GTP センサー PI5P4Kβの同定

PI5P4Kβはイノシトールリン脂質キナーゼ（PI キナーゼ）のファミリーメンバーであり、脂質セカンドメッセンジャーを制御する分子である。興味深いことに多くのキナーゼが ATP をリン酸基供与体として使うのに対して、PI5P4Kβは ATP よりも GTP を好んで使うキナーゼであり、かつ細胞内の GTP 濃度変化に応じて活性を変化させるのに適した K_m 値（88 μM）を持っていた（図 4）[1]。PI5P4Kβは高い濃度の ATP が共存する条件（1~2 mM）においても、GTP を好んで使い、生理的濃度域での GTP の増加によりキナーゼ活性が上昇する。これは GTP センサーに必須の性質である。この GTP への高い選択性を生み出すメカニズムを理解するため、PI5P4Kβの立体構造を X 線結晶解析により決定した。核酸が結合した PI5P4Kβの結晶構造を得るのは容易でなく、これを打破するため新しい手法の開発も行った[23]。

こうして得られた結晶構造から、PI5P4Kβはそのキナーゼ触媒ポケットにおいて、ATP と GTP を異なるモードで結合することが明らかとなった。その中で、GTP 結合に重要な 2 つのアミノ酸残基 Thr-201 および Phe-205 が同定された（図 5）。うち Phe-205 を Leu に置換変異（F205L 変異）を導入すると GTP 依存的なキナーゼ活性が減弱し ATP 依存的なキナーゼ活性と同程度になった。一方で、ATP 依存的なキナーゼ活性は維持されていた。つまり F205L 変異は GTP 選択性のみを特異的に失わせる変異体といえる。F205L 変異体を用いることで、細胞や生体における PI5P4Kβによる GTP 濃度感知機能がどのような役割を担っているのか解析していくことが可能となった[2]。

PI5P4Kβはキナーゼ活性とは別にスキャフォールディング機能を有し、PI3K シグナルを負に制御していることが最近明らかとなっている[24]。このため、分子レベルでの過剰発現、ノックアウトやノックダウン（KD）といった標的分子の発現量を大きく

変化させる方法では、得られた表現型の原因に関して GTP 濃度感知機能の生理作用とスキャフォールディング機能との間で明確に切り分けることができない。このように立体構造に基づいて、必要十分な変異導入により特定の機能にターゲットして変化を加える構造逆遺伝学的手法を、機能特異的 KD アプローチと呼びたい[2]。F205L 変異体は、GTP 濃度感知機能の解明につながっただけでなく、GTP センサーへの機能的進化のメカニズムの解明にも大きな貢献をした[4, 25]。

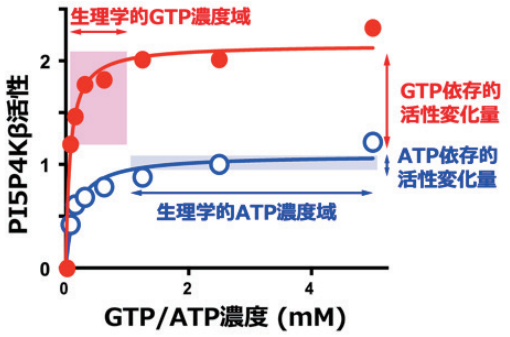


図 4.　PI5P4Kβは ATP だけでなく GTP もリン酸供与体として使う稀有なキナーゼ。生理的な ATP 濃度では活性の増減は軽微であるが、生理的 GTP 濃度域では ATP より高いキナーゼ活性をダイナミックに変動させる。

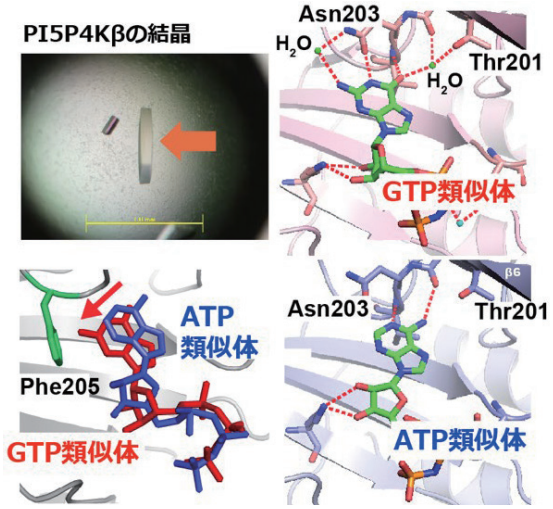


図 5.　PI5P4Kβと GTP および ATP 類似体との X 線結晶構造解析。新技術開発により核酸などリガンドと結合した PI5P4Kβのクオリティの高い結晶が得られるようになった（左上）。結晶構造の決定により、GTP の認識には Thr-201 と Phe-205 が重要な役割を持ち、GTP 特異的な結合モードを形成することが明らかとなった。

5. GTP センサー PI5P4Kβの癌における役割：

上記のような機能選択的な F205L 変異体を得たのち、我々は PI5P4Kβを欠失させたマウス線維芽細胞に F205L 変異体と野生型の PI5P4Kβを入れ戻したアイソジェニックな細胞株を樹立した。長い時間と数々の工夫と苦労を積み重ねて（そして佐々木のキャリアをかけて）得た F205L 変異とそれを発現する細胞を使えば、きっと何かすごいことが起きるに違いないという期待を持っていた。ところが、予想とは裏腹に、通常のシャーレ上での培養において、F205L 細胞はコントロールの細胞と細胞増殖、増殖因子への応答性など見事なまでに同じ挙動を示した。

一見ネガティブにみえる結果も、極めて重要な意味を持っていることが往々にあるものである。そうした信念をもって GTP-GEEKS は研究を進めた。すると、足場非依存性のコロニー形成など、通常のシャーレ上での培養とは異なるストレスがかかる状況において、F205L 細胞の増殖能が低下することが分かってきた。とくにマウスへの異所性移植実験において、コントロール細胞は腫瘍を形成するのに対し、F205L 細胞では腫瘍形成が認められなかった（図 6）[1]。異所性移植実験では、移植された細胞が生着するには、足場非依存性な増殖や栄養飢餓、酸化ストレスなど様々な難関を乗り越える必要がある。こうしたストレスを切り抜けた場合にのみ腫瘍形成が成立する。この時点では分子メカニズムは分かっていなかったが、GTP 濃度感知機能がストレス下におけるがん細胞の増殖や腫瘍形成に重要な役割を果たすこと示した大事な結果であった。この発見を記した論文は、2016 年に Molecular Cell 誌に受理された[1]。

一流誌における査読では、辛辣な批評の嵐に晒されることもままある。しかしながら、この論文はレビュワーから称賛の嵐を受け、ほぼ一発通しともいえるものであった。学会などで発表した際には、この発見で何故 Nature や Science でないのか？といった嬉しいコメントも頂いた。実はそうしたジャーナルにはトライはしたのだが、門前払いとなっていた。これはデータというよりも、結果の意義への洞察が不足していたためである。GTP を使うキナーゼの発見に、驕りもあったとも思う。今ならば、結果は違ったかもと思うが、こればかりは仕方がない。この学びを次へ活かしていくのみである。

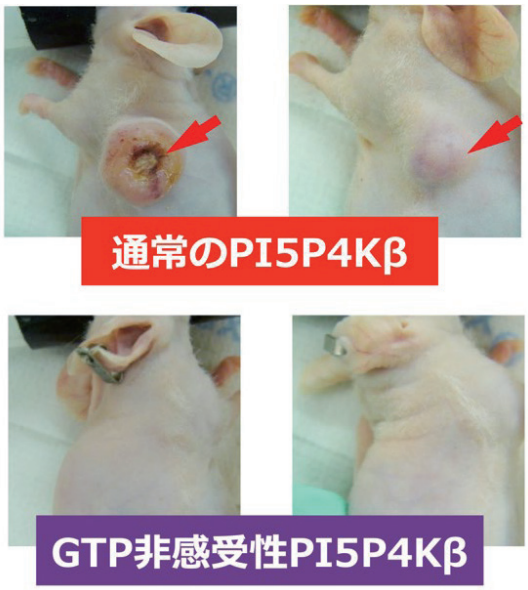


図 6.　PI5P4Kβ の GTP 感知機能は腫瘍形成過程に重要な役割を持つ。野生型 PI5P4Kβ を発現する細胞はマウス皮下移植後に腫瘍を形成した。一方 GTP 非感受（F205L）PI5P4Kβ 発現細胞では腫瘍形成が抑制された。

6. PI5P4Kβの阻害剤開発

6.1. 阻害剤開発の難点

上記の結果は、ガン細胞が細胞に本来備わる GTP 濃度制御機構と GTP センサーを悪用していることを示唆している。ゆえに GTP センサーの機能を阻害することは、新たながん治療戦略になりうる。PI5P4Kβノックアウトの表現型から考えると、PI5P4Kβの阻害薬は肥満や糖尿病を改善する効果や、p53 変異ガンを抑制する効果も期待できる。事実、メガファーマのファイザー、バイエル、サノフィはすでに PI5P4K 阻害剤の開発に乗り出してお

り、アカデミアからも、NIH, ハーバード大 , シンガポール大などが阻害剤開発競争に参入している。しかしながら、多くの研究は、阻害剤スクリーニングに活性の強い PI5P4K αを用いており、PI5P4Kβ特異的な阻害剤の報告はいまだみられない。

報告されてきた PI5P4K 阻害剤は、10-50 μM 程度の低濃度 ATP 存在下でスクリーニングされており、結果の解釈には注意を要する。PI5P4Kβは ATP への親和性が低いため、ATP と拮抗する阻害剤は、低濃度 ATP で効きやすく、みかけ上は高い阻害活性を示しても、ATP 濃度が 100 倍程度の高い細胞内環境では活性が大幅に低下する [26]。またキナーゼ阻害剤のスクリーニングは、ルシフェラーゼまたはその類似体により消費された ATP 量を測定することが多い。しかし、この方法では GTP を基質とする酵素の活性は測定できない。無理に行おうとする場合、nucleoside diphosphate kinase（NDPK）など、GTP の消費により生ずる GDP を ATP に変換する酵素がさらに必要になり [27]、擬陽性のリスクが生ずることになる。よって、GTP センサーである PI5P4Kβに有効な阻害剤の開発は他のキナーゼよりも技術的に難しいと言わざるを得ない。

6.2. NMR を用いた PI5P4Kβアッセイ系の確立と独自の阻害剤開発

我々 GTP-GEEKS も過去に ATP 消費を指標とする常法や GDP から ATP への変換を用いて PI5P4Kβ阻害剤のスクリーニングを行ったことがある。しかし、PI5P4Kβの ATP 依存的なキナーゼ活性は低く、また GDP/ATP 変換法は偽陽性率が高かったため、芳しい結果は得られなかった。そこで我々は核磁気共鳴（NMR）法により、PI5P4Kβが GTP を GDP へ加水分解する活性を直接感知する技術を開発し、十分なスループットを持つアッセイ系を構築した（図 7）。これにより、他の酵素の介在をなくし、偽陽性が原理的に存在しないスクリーニングが可能となった（特許：WO/2019/11792）。この手法を用いた阻害剤スクリーニングと阻害活性の検証、さらには阻害剤の結合した PI5P4Kβの結晶構造に基づく阻害剤構造の最適化を行うことで、高いアイソザイム選択性と阻害活性を両立した化合物を複数見出している。

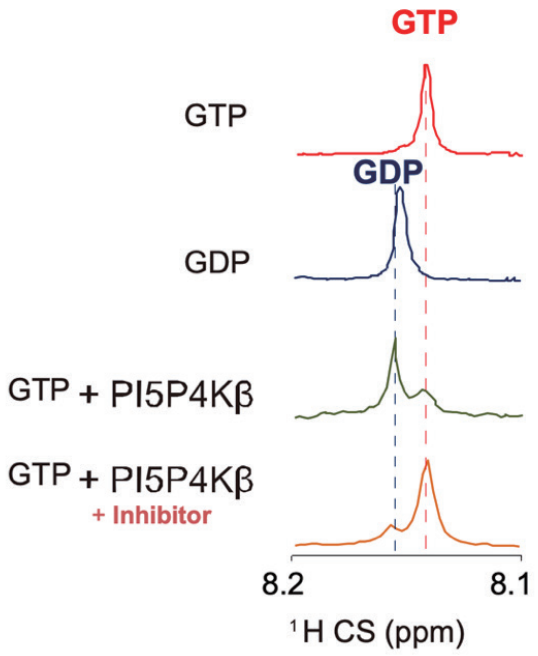


図 7.　NMR 法による PI5P4Kβの GTP 加水分解活性感知方法。NMR による GTP と GDP のスペクトラム感知（上）。PI5P4KβによるGTPのGDPへの変換は、阻害剤添加による抑制される（下）。

阻害剤開発は限られた資金で細々と続けてきたが、幸いにも大型の阻害剤開発支援を AMED から頂けることになった（代表：佐々木敦朗）。PI5P4Kβ阻害剤の開発により、脳腫瘍、中でも最も悪性度の高い膠芽腫（グリオブラストーマ）への新たな治療戦略を打ち立てるべく、慶應（佐々木敦朗）・東大（竹内恒）・KEK（千田俊哉）・新潟大（棗田学）・横浜市大（立石健祐）がチームを結成し、課題に取り組んでいる。PI5P4Kβに対する特異的阻害剤は、その細胞機能を明らかにしていくツールとしても、大きな威力を発揮しつつある。また GTP 合成の鍵酵素である IMPDH に対する新たな阻害剤開発にも取り組んでおり、ウイルス感染への新たな対抗戦略として、JST-CREST の支援を受け（代表：千田俊哉）、ウイルス感染測定（筑波大・川口敦史）、阻害剤開発（東大・竹内恒；東京薬科大・林良雄）、ウイルス進化（東海大・中川草）、GTP バイオロジー（慶應・佐々木敦朗）のチームにより取り組んでいる。我々は、分野横断的アプローチにより、GTP を標的とした新たなコンセプトによるがん、代謝疾患、老化、感染などの疾患治療開発を目指している。

7. おわりに

ここで初めに提示した疑問に戻ろう、“What if Life restarts again?”
もし、生命史が繰り返されるとすれば、今の生命のように ATP は主エネルギーとして君臨し、キナーゼは ATP を使うのだろうか ?GTP は同化作用に用いられ、G タンパクが生まれるのであろうか ?12 年前には漠然としていたこの問いに対する答えを、我々は見出しつつある。我々の GTP 研究は、GTP と ATP はその物理化学的性質の違いから、半ば必然的に今のような使われ方をするようになったことを示している。また GTP センサー PI5P4Kβの GTP 濃度感知機能のみを欠失させた変異マウスを作成し解析を進める中、GTP センサーが思わぬ形で老化や発生を制御している可能性も示された。GTP センサーは生体において重要な役割を果たしている。さらに、GTP センサー PI5P4Kβの進化的配列解析から、GTP 濃度感知機能が無脊椎動物から脊椎動物への進化の過程で獲得されたものであることが示されつつある。GTP センサーのさらなる研究から、生命進化について新たなコンセプトが次々に生まれてくることだろう。

2019 年に Nat Cell Biol へ報告した癌細胞での GTP 代謝スイッチとその細胞の同化作用促進メカニズムの発見により [8]、細胞や臓器の GTP エネルギー収支を制御するシステムの一端が見えてきた。細胞内 GTP エネルギー代謝の時空間的制御も姿を現しつつある [7, 28]。我々は金沢大・新井敏教授、千葉大・村田武士教授そしてフィンランドの Turku 大学の Harri Harma 教授らのグループと GTP の可視化プローブの作成に取り組んでいる。さらに GTP 代謝のナノスケールでの局所的操作に、名古屋大・髙橋康史教授そしてケンブリッジ大学の Laura Machesky 教授らのグループと取り組んでいる（HFSP 国際共同研究グラントを獲得）。生化学および構造生物学的アプローチから、どのように細胞が GTP 濃度を制御しているのか、新たなメカニズムが浮び上がりつつある。がんの病理メカニズムについての理解が進めば、異なるコンセプトの治療戦略も生まれてくるだろう。

このように我々 GTP-GEEKS は分野や専門の垣根を超えたサイエンスを合言葉に、生理学的、多層的オミックス、合成生物学、計算科学、進化生物学、ナノ定量生物学、など様々なエキスパートが仲間になって活発に議論をしながら研究を推進してきた。国内外で毎年のように GTP ワークショップを開催し、様々な分野のエキスパートが和と輪の精神で繋がり、一つの集合体として成長しつづけている（図 8）。本稿を読んで、新たに芽吹き、その黎明期にある GTP 研究に興味を持っていただけたとすれば、嬉しいかぎりである。熱き仲間を求めているので、我々の GTP 研

図 8.　第 6 回となる分子生物学会での GTP ワークショップ（千葉・幕張）のあと、場所を山形県は鶴岡の秘湯の温泉宿にて 2 泊 3 日で朝から夜まで GTP ハッカソンを行った。新たな GTP 研究へ沢山のアイデアと共同研究が生まれる熱くも楽しいイベントとなった。

究に新たな可能性を感じたのであれば気軽に連絡頂ければ有り難い。本稿を最後までご一読頂き、GTP-GEEKS を代表して心より感謝申し上げる。

[参考文献]

1）Sumita, K., Lo, Y., Takeuchi, K., Senda, M., Kofuji, S., Ikeda, Y., Terakawa, J., Sasaki, M., Yoshino, H., Majd, N., Zheng, Y., Kahoud, E.R., Yokota, T., Emerling, B.M., Asara, J.M., Ishida, T., Locasale, J.W., Daikoku, T., Anastasiou, D., Senda, T., and Sasaki, A.T. “The Lipid Kinase PI5P4Kβ Is an Intracellular GTP Sensor for Metabolism and Tumorigenesis”, *Mol. Cell.*, 2016, *61*(2), 187-198.

2）Takeuchi, K., Senda, M., Lo, Y., Kofuji, S., Ikeda, Y., Sasaki, A.T., and Senda, T. “Structural reverse genetics study of the PI5P4Kβ -nucleotide complexes reveals the presence of the GTP bioenergetic system in mammalian cells”, *FEBS J.*, **2016**, *283*(*19*), 3556-3562.

3）Takeuchi, K., Ikeda, Y., Senda, M., Harada, A., Okuwaki, K., Fukuzawa, K., Nakagawa, S., Yu, H.Y., Nagase, L., Imai, M., Sasaki, M., Lo, Y., Ito, D., Osaka, N., Fujii, Y., Sasaki, A.T., and Senda, T. “The GTP responsiveness of PI5P4Kbeta evolved from a compromised trade-off between activity and specificity”, *Structure*, **2022**, *30,* 886-899.e4.

4）Takeuchi, K., Senda, M., Ikeda, Y., Okuwaki, K., Fukuzawa, K., Nakagawa, S., Sasaki, M., Sasaki, A.T., and Senda, T. “Functional molecular evolution of a GTP sensing kinase: PI5P4Kβ”, *FEBS J.*, **2023**, doi: 10.1111/febs.16763

5）Majd, N., Sumita, K., Yoshino, H., Chen, D., Terakawa, J., Daikoku, T., Kofuji, S., Curry, R., Wise-Draper, T., Warnick, R.E., Guarnaschelli, J., and Sasaki, A.T. “A Review of the Potential Utility of Mycophenolate Mofetil as a Cancer Therapeutic”, *Journal of Cancer Research*, **2014**, 1-12.

6）Naffouje, R., Grover, P., Yu, H., Sendilnathan, A., Wolfe, K., Majd, N., Smith, E.P., Takeuchi, K., Senda, T., Kofuji, S., and Sasaki, A.T. “Anti-Tumor Potential of IMP Dehydrogenase Inhibitors: A Century-Long Story”, *Cancers*, **2019**, *11*, 1346-30.

7）Wolfe, K., Kofuji, S., Yoshino, H., Sasaki, M., Okumura, K., and Sasaki, A.T. “Dynamic compartmentalization of purine nucleotide metabolic enzymes at leading edge in highly motile renal cell carcinoma”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2019**, *516*, 50-56.

8）Kofuji, S., Hirayama, A., Eberhardt, A.O., Kawaguchi, R., Sugiura, Y., Sampetrean, O., Ikeda, Y., Warren, M., Sakamoto, N., Kitahara, S., Yoshino, H., Yamashita, D., Sumita, K., Wolfe, K., Lange, L., Ikeda, S., Shimada, H., Minami, N., Malhotra, A., Morioka, S., Ban, Y., Asano, M., Flanary, V.L., Ramkissoon, A., Chow, L.M.L., Kiyokawa, J., Mashimo, T., Lucey, G., Mareninov, S., Ozawa, T., Onishi, N., Okumura, K., Terakawa, J., Daikoku, T., Wise-Draper, T., Majd, N., Kofuji, K., Sasaki, M., Mori, M., Kanemura, Y., Smith, E.P., Anastasiou, D., Wakimoto, H., Holland, E.C., Yong, W.H., Horbinski, C., Nakano, I., Deberardinis, R.J., Bachoo, R.M., Mischel, P.S., Yasui, W., Suematsu, M., Saya, H., Soga, T., Grummt, I., Bierhoff, H., and Sasaki, A.T. “IMP dehydrogenase-2 drives aberrant nucleolar activity and promotes tumorigenesis in glioblastoma”, *Nat. Cell Biol.*, **2019**, *21*, 1-18.

9）Kofuji, S., and Sasaki, A.T. “GTP Metabolic Reprogramming by IMPDH2: Unlocking Cancer Cells' Fueling Mechanism”, *J. Biochem.*, **2020**, *168*(*4*), 319-328.

10）Ikeda, Y., Hirayama, A., Kofuji, S., Hirota, Y., Kamata, R., Osaka, N., Fujii, Y., Sasaki, M., Ikeda, S., Smith, E.P., Bachoo, R., Soga, T., and Sasaki, A.T. “SI-MOIRAI: A new method to identify and quantify the metabolic fate of nucleotides”, *J. Biochem.*, **2021**, *170*(*6*), 699-711.

11）Harris, J.C.（2018）“Lesch-Nyhan syndrome and its variants: examining the behavioral and neurocognitive phenotype”, *Current opinion in psychiatry*, **2018**, *31*, 96-102.

12）Nyhan, W.L. “Behavior in the Lesch-Nyhan syndrome”, *J. Autism Child. Schizophr.*, **1976**, *6*, 235-252.

13）Lesch, M. and Nyhan W.I.,” A Familial Disorder of Uric Acid Metabolism and Central Nervous System Function”, *Am. J. Med.*, **1964**, 36, 561-570.

14）Bowne, S.J., Sullivan, L.S., Mortimer, S.E., Hedstrom, L., Zhu, J., Spellicy, C.J., Gire, A.I., Hughbanks-Wheaton, D., Birch, D.G., Lewis, R.A., Heckenlively, J.R., and Daiger, S.P. “Spectrum and frequency of mutations in IMPDH1 associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa and leber congenital amaurosis”, *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.*, **2006**, *47*, 34-42.

15）Bowne, S.J., Liu, Q., Sullivan, L.S., Zhu, J., Spellicy, C.J., Rickman, C.B., Pierce, E.A., and Daiger, S.P. “Why do mutations in the ubiquitously expressed housekeeping gene IMPDH1 cause retina-specific photoreceptor degeneration?”, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2006**, *47*, 3754.

16）Plana-Bonamaisó, A., López-Begines, S., Fernández-Justel, D., Junza, A., Soler-Tapia, A., Andilla, J., Loza-Alvarez, P., Rosa, J.L., Miralles, E.,

Casals, I., Yanes, O., de la Villa, P., Buey, R.M., and Méndez, A. "Post-translational regulation of retinal IMPDH1 in vivo to adjust GTP synthesis to illumination conditions", *eLife.*, **2020**, *9*, 641.
17) Ginzler, E.M., and Aranow, C. "Mycophenolate mofetil in lupus nephritis", *Lupus*, **2005**, *14*, 59-64.
18) Allison, A.C., and Eugui, E.M. "Mechanisms of action of mycophenolate mofetil in preventing acute and chronic allograft rejection", *Transplantation*, **2005**, *80*, 181.
19) Traut, T.W. "Physiological concentrations of purines and pyrimidines", *Mol. Cell. Biochem.*, **1994**, *140*, 1-22.
20) Osaka, N., Hirota, Y., Ito, D., Ikeda, Y., Kamata, R., Fujii, Y., Chirasani, V.R., Campbell, S.L., Takeuchi, K., Senda, T., and Sasaki, A.T. "Divergent Mechanisms Activating RAS and Small GTPases Through Post-translational Modification", *Frontiers in molecular biosciences*, **2021**, *8*, 707439.
21) Lamia, K.A., Peroni, O.D., Kim, Y., Rameh, L.E., Kahn, B.B., and Cantley, L.C. "Increased insulin sensitivity and reduced adiposity in phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase β-/- mice", *Mol. Cell. Biol.*, **2004**, *24*, 5080-5087.
22) Emerling, B.M., Hurov, J.B., Poulogiannis, G., Tsukazawa, K.S., Choo-Wing, R., Wulf, G.M., Bell, E.L., Shim, H., Lamia, K.A., Rameh, L.E., Bellinger, G., Sasaki, A.T., Asara, J.M., Yuan, X., Bullock, A., Denicola, G.M., Song, J., Brown, V., Signoretti, S., and Cantley, L.C. "Depletion of a Putatively Druggable Class of Phosphatidylinositol Kinases Inhibits Growth of p53-Null Tumors", *Cell*, **2013**, *155*, 844-857.
23) Senda, M., Hayashi, T., Hatakeyama, M., Takeuchi, K., Sasaki, A.T., and Senda, T. "Use of Multiple Cryoprotectants to Improve Diffraction Quality from Protein Crystals", *Crystal Growth & Design*, **2016**, *16*, 1565-1571.
24) Wang, D.G., Paddock, M.N., Lundquist, M.R., Sun, J.Y., Mashadova, O., Amadiume, S., Bumpus, T.W., Hodakoski, C., Hopkins, B.D., Fine, M., Hill, A., Yang, T.J., Baskin, J.M., Dow, L.E., and Cantley, L.C. (2019) "PIP4Ks Suppress Insulin Signaling through a Catalytic-Independent Mechanism", *Cell Reports*, **2019**, *27*, 1991-2001.e5.
25) Takeuchi, K., Ikeda, Y., Senda, M., Harada, A., Okuwaki, K., Fukuzawa, K., Nakagawa, S., Yu, H.Y., Nagase, L., Imai, M., Sasaki, M., Lo, Y., Ito, D., Osaka, N., Fujii, Y., Sasaki, A.T., and Senda, T. "The GTP responsiveness of PI5P4Kβ evolved from a compromised trade-off between activity and specificity", *Structure*, **2022**, *30*(6), 886-899.e4.
26) Knight, Z.A., and Shokat, K.M. "Features of selective kinase inhibitors", *Chem. Biol.*, **2005**, *12*, 621-637.
27) Kumagai, K., Kojima, H., Okabe, T., and Nagano, T. "Development of a highly sensitive, high-throughput assay for glycosyltransferases using enzyme-coupled fluorescence detection", *Anal. Biochem.*, **2014**, *447*, 146-155.
28) Wolfe, K., Kamata, R., Coutinho, K., Inoue, T., and Sasaki, A.T. "Metabolic Compartmentalization at the Leading Edge of Metastatic Cancer Cells", *Frontiers in Oncology*, **2020**, *10*, 1.

Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6
Reprinted from *Molecular Cell*, 61(2) Kazutaka Sumita, *et al*., "The Lipid Kinase PI5P4Kβ Is an Intracellular GTP Sensorfor Metabolism and Tumorigenesis", Copyright (2023), with permission from Elsevier.

[著者プロフィール]
氏名 : 佐々木 敦朗（Atsuo Sasaki）
所属 : シンシナティ大学医学部　教授
3125 Eden Ave. Cincinnati, OH 45267-0508, USA
TEL : +1 513-558-2160
FAX : +1 513-558-6703
E-mail : atsuo.sasaki@uc.edu

所属 : 慶應義塾大学先端生命科学研究所　特任教授
〒 997-0052 山形県鶴岡市覚岸寺字水上 246-2
鶴岡メタボロームキャンパス C 棟 C13
TEL : 0235-29-0581
FAX : 0235-29-0574
E-mail : sasaki29@ttck.keio.ac.jp

所属 : 広島大学病院 ゲノム医療センター・遺伝子診療科 特任教授
〒 734-8551 広島市南区霞 1-2-3
TEL : 082-257-2019
FAX : 082-257-2019
E-mail : sasakiat@hiroshima-u.ac.jp

ラボ HP : http://thesasakilab.org/
GTP-GEEKS HP : https://www.gtp-project.net/

出身学校 : 東京理科大学 / 広島大学 / 久留米大学
学位 : 博士（医学）
専門分野 : 細胞生物学・代謝生物学
現在の研究テーマ : GTP エネルギー代謝

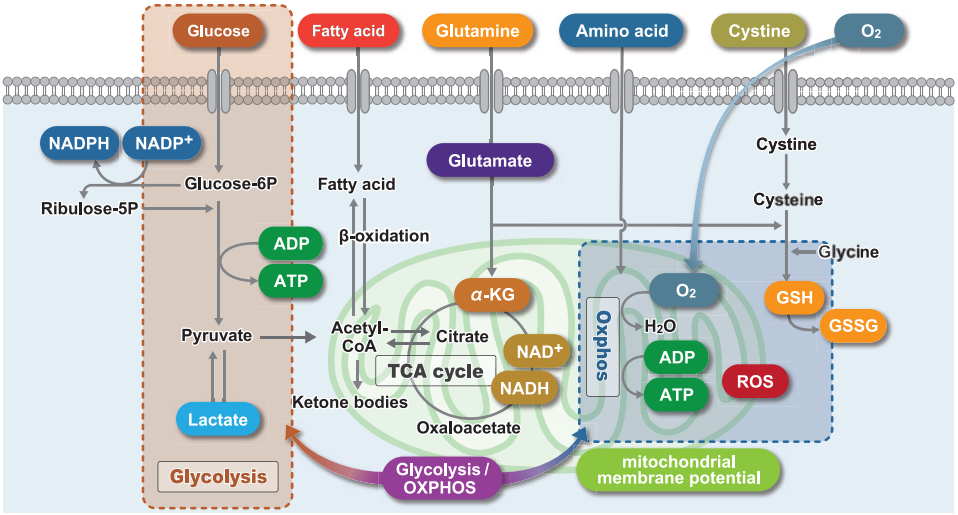
氏名 : 竹内 恒（Koh Takeuchi）
所属 : 東京大学大学院薬学系研究科　生命物理化学教室　教授
〒 113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1
薬学系総合研究棟 2 階
TEL : 03-5841-4810
E-mail : koh-takeuchi@mol.f.u-tokyo.ac.jp
出身学校 : 東京大学
学位 : 博士（薬学）
専門分野 : 創薬化学・構造生物学（NMR）
現在の研究テーマ : GTP 代謝を標的とした創薬、動的構造解析

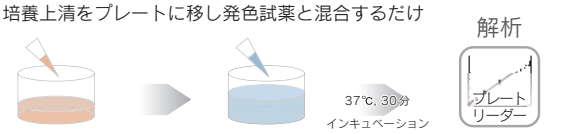
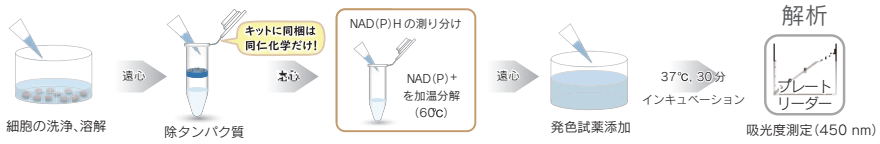
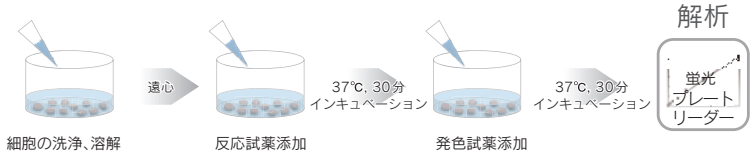
氏名 : 千田 俊哉（Toshiya Senda）
所属 : 高エネルギー加速器研究機構（KEK）
物質構造科学研究所 教授
構造生物学研究センター（SBRC）センター長
〒 305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1
TEL : 029-879-6178
FAX : 029-879-6179
E-mail : toshiya.senda@kek.jp
HP : https://www2.kek.jp/imss/sbrc/
出身学校 : 長岡技術科学大学
学位 : 博士（工学）
専門分野 : 構造生物学
現在の研究テーマ : GTP 代謝の構造生物学

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、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
グルコース 乳酸 グルタミン グルタミン酸 NAD/NADH NADP/NADPH	比色	培養上清をプレートに移し発色試薬と混合するだけ 
		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  ※ グルタミン、グルタミン酸、NAD(P)/NAD(P)H に同梱しています。
ATP ADP/ATP	発光	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
α-ケトグルタル酸	蛍光	既存品の課題であるバラつきを低減した操作 

関連製品

解糖系 / 酸化的リン酸化測定キット

Glycolysis/OXPHOS Assay Kit

＜特長＞
- **プレートリーダーを利用した簡便な測定**
- **必要な試薬が入った All in One のキット形態**
- **実験操作の流れが解る詳細なプロトコル**

実験例やプロトコルはこちらから
G270　同仁　検索

多くのがん細胞は、解糖系に依存したエネルギー代謝により ATP を産生しています。一方で、解糖系が抑制されたがん細胞は、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していることが、近年報告されています。本キットは、解糖能、代謝シフトおよび、細胞が解糖系と酸化的リン酸化のどちらに依存してエネルギー産生を行っているのかをプレートリーダーを用いるため高額な装置購入が不要です。 本キットには、これらの評価に必要な試薬が同梱されています。

＜原理＞
本キットは、細胞内のアデノシン三リン酸（ATP）量をホタル・ルシフェラーゼ発光法で測定し、細胞外へ排出される乳酸量を WST ホルマザンを用いた吸光度測定法にて測定するキットです。解糖系と酸化的リン酸化それぞれに対する阻害剤を使用し得られる結果から、代謝経路を評価することが可能です。また、本キットではマイクロプレートを用いた測定が可能です。

＜本キットでできる 3 つの評価＞
Oligomycin で酸化的リン酸化（OXPHOS）での ATP 合成を阻害、あるいは、2-Deoxy-D-glucose（2-DG）で解糖系（Glycolysis）での ATP 合成を阻害させた時の ATP 量（発光値）や Lactate 量（吸光度）の変化を測定することで、次の①～③の評価を行います。

品名	容量	希望納入価格（¥）	メーカーコード
Glucose Assay Kit-WST	50 tests 200 tests	19,900 41,900	G264
Lactate Assay Kit-WST	50 tests 200 tests	33,000 77,200	L256
Glutamine Assay Kit-WST	100 tests	58,900	G268
Glutamate Assay Kit-WST	100 tests	53,500	G269
NAD/NADH Assay Kit-WST	100 tests	61,400	N509
NADP/NADPH Assay Kit-WST	100 tests	59,700	N510
ATP Assay Kit-Luminescence	50 tests 200 tests	26,800 48,200	A550
ADP/ATP Ratio Assay Kit-Luminescence	100 tests	53,500	A552
α-Ketoglutarate Assay Kit-Fluorometric	100 tests	68,500	K261
Glycolysis/OXPHOS Assay Kit	50 tests	51,400	G270
Extracellular OCR Plate Assay Kit	100 tests	48,000	E297

製品の詳細はこちら
メーカーコード　同仁　検索

Topics on Chemistry

包括的な解析が明らかにする新たな細胞代謝の世界

Dojindo Molecular Technologies, Inc.　清野　涼

代謝を制御することは、細胞内のエネルギーと生体分子の適切なバランスを維持するために重要である。ホルモン、酵素等の関連因子や時には代謝物までもが共役してそれぞれの代謝経路を制御し、細胞内の恒常性を維持している。複雑に絡み合うこれらの代謝関連因子が一度不均衡の状態になると、糖尿病、癌、神経変性疾患などの疾病を引き起こすことが広く知られ、現在では細胞代謝に焦点を当てた治療法の開発も盛んに行われている。さらに、メタボロームや RNA-seq トランスクリプトームといったオミクス解析の普及により次々と新しい知見が報告されており、個体のホメオスタシスを細胞代謝という観点から明らかにしていく流れは昨今加速しているように感じる。本稿では、最近報告された①核内トリカルボン酸（TCA）サイクルの存在、②アルツハイマー病における代謝スイッチングといった代謝に関連するユニークな 2 つの論文を紹介する。（概略図を図 1 に示す。）

①核内 TCA サイクルの存在 [1)]

核酸とヒストンの修飾は、その基質と補因子の多くを TCA サイクルに依存している。これまで TCA サイクルに関連する酵素が核に存在していることは知られていたが、対応する経路はミトコンドリアで機能すると考えられていた。Kafkia らは質量分析を活用したメタボローム解析によりこの TCA サイクルの一部が核内でも機能していることを示した。^{13}C 安定同位体追跡分析を用いて、HeLa 細胞の核において一部の TCA サイクルに関連する変換経路（グルタミン➡フマル酸 or アスパラギン酸、クエン酸➡コハク酸）の活性化を確認した。さらに Biotin を活用した近接標識質量分析により、TCA サイクルに関与する酵素とコア核タンパク質が近接していることが明らかとなっている。この結果は、TCA サイクルの一部が核内で活性化していることを示唆している。加えて TCA サイクルに関与する 2- オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ（OGDH）の核局在化により、核タンパク質のスクシニル化が惹起され、これがマウス胚性幹細胞（ES 細胞）における多能性に関連することも明らかにしている。これらの結果はオルガネラ依存的な代謝に関する新たな見解を提起するだけでなく、代謝とエピジェネティックな分化に関する新たな空間的背景を示唆している。

②アルツハイマー病における代謝スイッチング [2)]

孤発性アルツハイマー病（AD）は遺伝、環境、生活習慣などの複数の因子が発症に関与しており、原因の解明には未だ至っていない。Traxler らは AD 患者由来の線維芽細胞から直接変換された誘導ニューロン（iN）を利用して、AD iN の代謝状態が好気的解糖（ワールブルグ効果）へスイッチしていることを確認した。さらに RNA-seq トランスクリプトームと質量分析を活用したメタボロミクス分析を組み合わせて、解糖酵素ピルビン酸キナーゼ M（PKM）が選択的スプライシングによりがん様 PKM である PKM2 へアイソフォームスイッチングしていること、そしてこのスイッチングが AD iN の代謝および転写の変化をもたらしていることを明らかにした。これらの変化は PKM2 の核移行に起因し、ワールブルグ様の代謝シフトが起きたニューロンではアポトーシス感受性が促進していた。阻害剤を用いて PKM2 の核移行を防ぐことで、AD 特異的遺伝子発現並びに代謝変化を逆転させ、細胞死に対する感受性を回復させることにも成功している。これらの新しい知見は AD の治療戦略に新たに代謝シフトと言う概念を提起している。

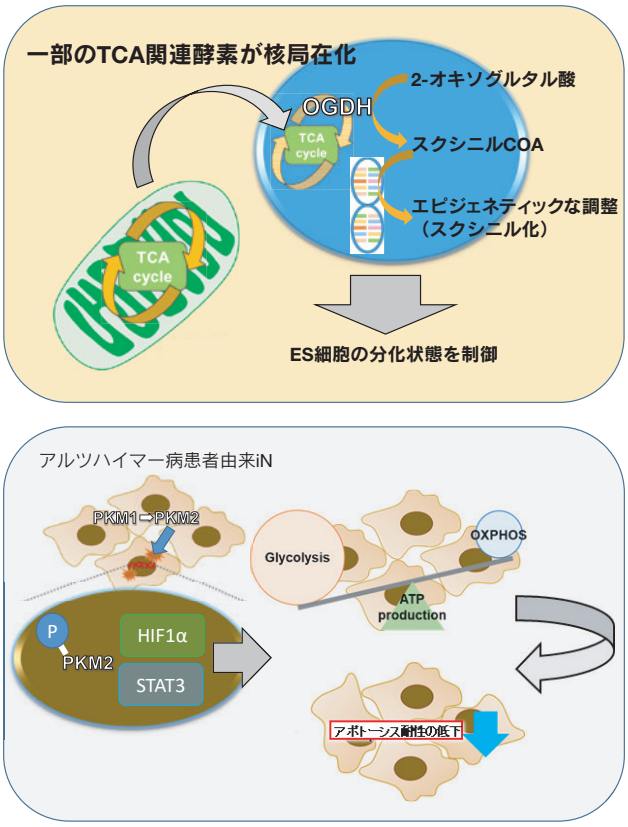


図 1　①核内 TCA サイクルの存在 (上図)、②アルツハイマー病における代謝スイッチング（下図）の概略図

これら報告ではメタボローム解析やトランスクリプトーム解析といった包括的な解析と独自のアイディアを組み合わせることで代謝研究に新たな知見をもたらしている好例である。研究手法の発展は基礎研究分野の発展のみならず、その先にある病態解明や早期治療法の発見にも不可欠なものである。一方で、最先端の研究手法はそのコスト面やハード面から導入ハードルが高いのも事実であり、類似した解析をするために他の方法を提案しハードルを下げることも各種試薬・装置メーカーに期待されることである。小社ではプレートリーダーを活用した簡便かつ多検体処理に向いた代謝関連製品を数多くラインナップしている。またそれらを組み合わせた実験手法（代謝シフト測定法等）や各種薬剤刺激に伴う包括的な代謝変化をアプリケーションデータとして web ページに掲載している。最先端の研究に触れ、思い浮かんだアイディアを実現に移す際に小社の試薬・情報がその一助になることを期待している。

[参考文献]

1) Eleni Kafkia, *et al.*, “Operation of a TCA cycle subnetwork in the mammalian nucleus” , *Sci. Adv.*, **2022**, *8*, eabq52.
2) Larissa Taxler, *et al.*, “Warburg-like metabolic transformation underlies neuronal degeneration in sporadic Alzheimer’ s disease” , *Cell Metab.*, **2022**, *34*, 1248-1263.

連 載

抗酸化キットを使う前のサンプル前処理法 〈第１回〉

1. はじめに

私どもの所属する株式会社同仁グローカルは、同仁化学研究所のグループ会社で、排水、排ガス等の分析や河川等の環境調査、作業環境測定等の計量証明事業が主な事業ですが、最近では、お客様のトラブル事案に対し、原因究明や対策立案を行う問題解決型調査業務を行うようになりました。また、一方で、グループ会社の同仁化学研究所の試薬、キット等を用いた受託分析を行うようになり、これらの実績からノウハウを蓄積してきました。

そんな中、執筆依頼を頂きましたので、私どもの持っているノウハウが何かしらの役に立つことになれば幸いと思い、筆を執った次第です。とは言え、私どもは大学や公的機関、大手企業の研究者ではなく、自前の研究データを持ち合わせていませんので、実際に手を動かす技術者視点で、ゆる～く、ハードルを低くして、ちょっといい話をしていけたらと思います。正直、経験者の方にとっては「釈迦に説法」ですので、そこは温かい目でご覧いただけますと幸いです。

本連載では、抗酸化能関連のキット類における試料の前処理について話を進めたいと思いますが、まず活性酸素関連の抗酸化能を中心に各測定方法の特性について触れていきたいと思います。

2. 活性酸素のそもそも論

一般的に活性酸素といわれるものは、酸素分子（O_2）が不対電子を１個ずつ捕獲することで生成するスーパーオキシド（$O_2^{\cdot-}$）、過酸化水素（H_2O_2）、ヒドロキシルラジカル（$\cdot OH$）と一重項酸素（$^1O_2$）の４つがあります[1]。

一重項酸素は酸素分子の２個の不対電子が電子対をなし、空の電子軌道によって強い酸化力が生じ、紫外線等によって、主に皮膚上で発生します。

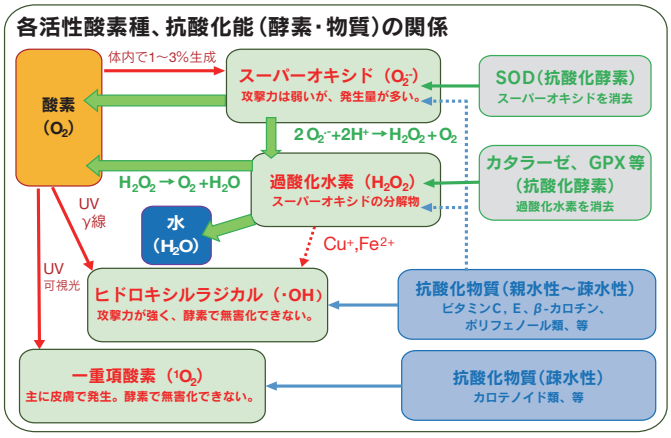
生体内では、呼吸により取り込まれた酸素が主にミトコンドリアで利用され、その1~3% 程[2]がスーパーオキシドになると推測されています。スーパーオキシドは、抗酸化酵素である SOD（superoxide dismutase）による不均化反応（$2\ O_2^{\cdot-} + 2\ H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$）により過酸化水素と水に分解されます。

次に、ここで生じた過酸化水素がカタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼ（GPx）等の抗酸化酵素により、酸素と水に分解されます。（$2\ H_2O_2 \rightarrow O_2 + H_2O$）

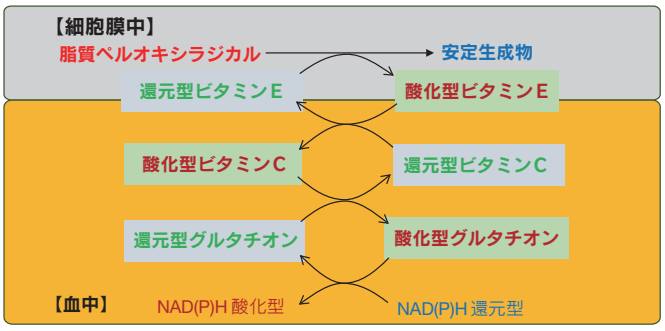
一方、分解されずに残った過酸化水素に銅（Ⅰ）イオンや鉄（Ⅱ）イオンが作用すると最も攻撃力の強いヒドロキシルラジカルが発生します。また、酸素に紫外線やγ線が作用することで、一重項酸素とともにヒドロキシルラジカルが発生します。

ここで、①スーパーオキシド、②過酸化水素、③ヒドロキシルラジカルの関係は、攻撃力で①＜②＜③、発生量や寿命を考慮した存在量は、①＞②＞③であるといわれています。

そして、ヒドロキシルラジカルと一重項酸素に対しては、生体内に SOD やカタラーゼのような無毒化するための酵素が存在しないので、これらに対しては抗酸化物質（ビタミン C、ビタミン E、ポリフェノール類、等）が直接反応して消去するしかありません。また、抗酸化物質は酵素ではないので、活性酸素に対して必要量が消費されていきます。もしも、SOD やカタラーゼ等の抗酸化酵素の働きが低下して、これらの抗酸化物質が多量に消費されると、攻撃性の強いヒドロキシルラジカルや一重項酸素を抑制できず、タンパク質や DNA 等が攻撃を受け、様々な障害や疾病に繋がるリスクが増大するわけです。そういう意味では、これらの抗酸化物質が活性酸素に対する「最後の砦」になるわけで、SOD やカタラーゼ等によって酵素による消去能が有効に働き、抗酸化物質を無駄に消費させないことが重要です。しかも、抗酸化物質のうちビタミン類は、体内では産生できず、食物から摂取する必要があるので、日々の食生活でのビタミン摂取が大切です。



生体内の抗酸化物質は、アスコルビン酸（ビタミン C）、α - トコフェロール（ビタミン E）、グルタチオン、*N*- アセチルシステイン、カロテノイド類、ポリフェノール類、カテキン、ケルセチン、尿酸、ビリルビン、グルコース、フラボノイド、コエンザイム Q10 など[3]多くの成分が知られています。これらは、溶解性や反応性、安定性において多様であり、また活性酸素種により特異性が異なるため、1:1 で反応する普通の化学反応とは異なり、反応条件（pH、溶媒の濃度、塩濃度、金属やキレート剤の影響、酸化成分や還元成分等の影響、等）の違いや、構成成分同士の組み合わせにより示す活性が異なります。酸化されたビタミン E をビタミン C により再生する[4]サイクルがその一例です。



そのため、測定方法や前処理の違い（共存成分の違い）によって同じサンプルでも全く違った測定値となる場合があるので注意が必要です。

前置きが長くなりましたが、次号は本題の前処理について、DPPH 測定キットの事例で進めたいと思います（次号へ続く）。

[参考文献]
1）藤田直, “活性酸素 ,過酸化脂質,フリーラジカルの生成と消去機構並びにそれらの生物学的作用”, 薬学雑誌 , **2002**, *122*(3), 203.
2）松本紋子 , “ミトコンドリア呼吸鎖（電子伝達系）複合体と活性酸素種” , https://www.toho-u.ac.jp/sci/bio/column/0790.html（閲覧日：2023年4月17日）
3）中村成夫 , “活性酸素と抗酸化物質の化学” , 日医大医会誌 , **2013**, *9*(3) .
4）平原文子, “ビタミンEと抗酸化性”, 栄養学雑誌, **1994**, *52*(4), 205.

[著者プロフィール]
氏名：山口 勝則（Masanori Yamaguchi）
所属：株式会社同仁グローカル　営業部
〒 861-2202
熊本県上益城郡益城町田原 2081-25
TEL：096-286-1311
FAX：096-286-1312
E-mail：m-yama@dojindo.co.jp

新製品　　6月30日発売予定

リソソーム pH 検出キット　Green/Deep Red

Lysosomal Acidic pH Detection Kit – Green/Deep Red

＜特長＞
・リソソームの pH 変化を正確に検出する
・初めて使用される方向け オールインワンキット
・フローサイトメーターを用いて測定が可能

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。既存の色素を使用し機能を解析した場合、単一の色素の蛍光輝度のみで議論するため、リソソームの量が変動したのか、機能（pH）が変動したのかを判別するが困難でした。小社の Lysosomal Acidic pH Detection Kit–Green/Deep Red は、リソソーム pH に依存的な蛍光の変動を示す pHLys Green と、抵抗性の LysoPrime Deep Red で構成されています。これらを組み合わせてリソソーム量と pH を同時解析することで、リソソーム機能の詳細な解析が可能です。

＜原理＞
本キットは、リソソーム pH に依存的な pHLys Green と、抵抗性の LysoPrime Deep Red で構成されています。pHLys Green は、リソソーム機能の低下によってリソソームの pH が中性化すると蛍光強度が減少します。一方、LysoPrime Deep Red は、リソソームの pH 変化に抵抗性があるため、蛍光強度が変化しません。リソソームの pH に依存的もしくは抵抗性の集積性を示す 2 種類の色素を組み合わせることで、リソソーム pH とリソソーム量を測定し、正確なリソソーム pH の変化を検出できます。

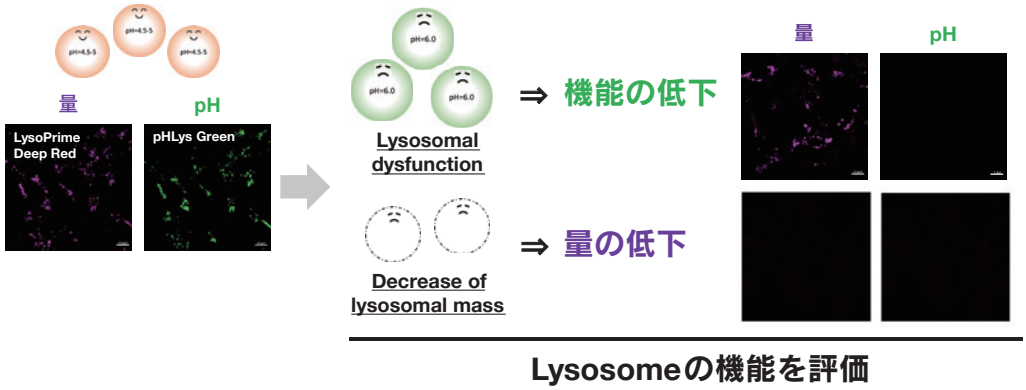
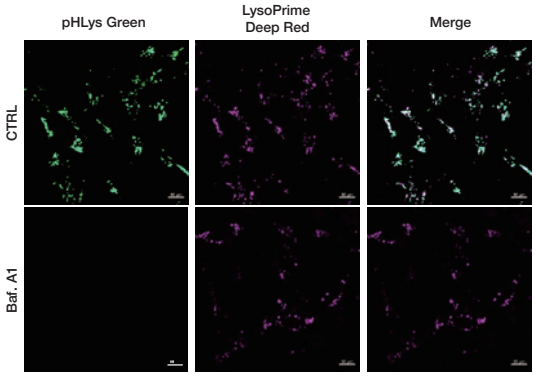


図 1　リソソーム量と pH の同時測定による、リソソーム機能の詳細な解析

＜リソソームの pH 変化を正確に検出する ＞
本キットを用いて、リソソーム pH 酸性化阻害剤 Bafilomycin A1（Baf. A1）を用いたリソソームの量と pH 変化の検出を行いました。LysoPrime Deep Red の蛍光は、Baf. A1 添加にかかわらず殆ど変化しませんが、pHLys Green は Baf. A1 添加に伴うリソソーム中性化により蛍光の低下が観察されました。リソソーム pH に依存的な pHLys Green と、抵抗性の LysoPrime Deep Red を組み合わせて正確なリソソーム pH 変化を確認しました。また、フローサイトメトリー（FCM）での解析も可能でした。

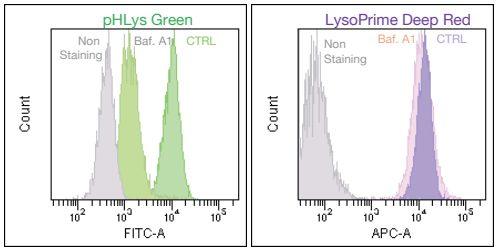


【実験条件】
細胞：HeLa

【検出条件】
pHLys Green（緑）：
Ex = 488 nm
Em = 490 – 550 nm

LysoPrime Deep Red（紫）：
Ex = 633 nm
Em = 640 – 700 nm

図 2　Bafilomycin A1 を用いたリソソーム pH 変化のイメージング



【実験条件】
pHLys Green: FITC Filter (Ex = 488 nm, Em = 515 – 545 nm)
LysoPrime Deep Red: APC Filter (Ex=640 nm, Em = 650 – 670 nm)

図 3　Bafilomycin A1 を用いたリソソーム pH 変化の FCM 解析

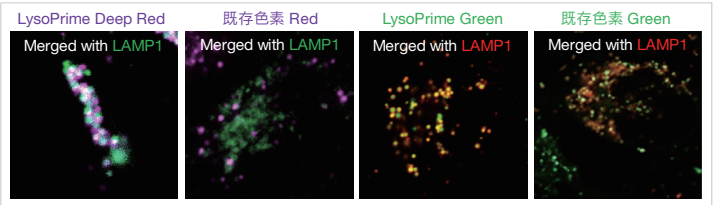
品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Lysosomal Acidic pH Detection Kit – Green/Deep Red	1 set	38,000	L268

関連製品

リソソーム染色試薬

LysoPrime Green - High Specificity and pH Resistance
LysoPrime Deep Red - High Specificity and pH Resistance

既存のリソソーム試薬は、リソソームへの正確な局在を観察する際に課題がありました。LysoPrime Green/Deep Red は高いリソソーム指向性を持ち、リソソーム pH 変動に影響せず蛍光強度を維持するため、正確なリソソームの位置や量を観察することができます。



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 10 µl x 3	13,900 28,900	L261
LysoPrime Deep Red - High Specificity and pH Resistance	1 tube 3 tubes	15,000 30,000	L264

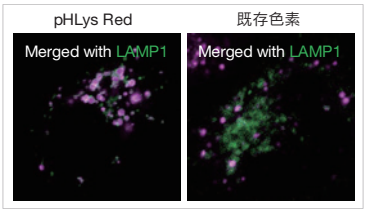
関連製品

リソソーム pH 検出用試薬

pHLys Red – Lysosomal Acidic pH Detection

既存のリソソーム pH 検出試薬は、特異性や pH 変化による染色能の低下が課題としてありましたが、本製品はリソソーム特異性が高く pH 変化に鋭敏に応答を示す低分子蛍光色素です。既存の蛍光色素よりもより正確なリソソーム pH の生細胞解析が可能であり、滞留性が高いため長期間※のイメージングが必要な実験系にも適応可能です。

※細胞種や実験条件により異なる場合があります。



【実験条件】
細胞 : HeLa

【検出条件】
pHLys Red（紫）:
Ex = 561 nm
Em = 560 – 620 nm

図 2　リソソームマーカータンパク質 LAMP1 発現細胞での局在確認実験

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
pHLys Red - Lysosomal Acidic pH Detection	1 tube 3 tubes	28,000 48,000	L265

関連製品

リソソーム pH 検出キット　Red/Green

Lysosomal Acidic pH Detection Kit

2 種類の色素とリソソーム pH 酸性化阻害剤を 1 コンポーネントにしたオールインワンのキットです。

〈キットに含まれる検出色素と阻害剤〉
・リソソーム量検出色素　：LysoPrime Green
・リソソーム pH 検出色素　：pHLys Red
・リソソーム pH 酸性化阻害剤　：Bafilomycin A1

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Lysosomal Acidic pH Detection Kit	1 set	38,000	L266

新製品　　6月30日発売予定

オートファジー経路測定キット

Autophagic Flux Assay Kit

＜特長＞
・オートファジーの亢進もしくはオートリソソームの抑制を解析できる
・リソソーム酸性化阻害剤同梱のオールインワンキット

オートファジーは、細胞内で不要なタンパク質や細胞小器官などの不要物を覆ったオートファゴソームを形成し、さらにオートファゴソームとリソソームが融合したオートリソソーム内で分解を受けますが、この過程の流れはオートファジーフラックスと言われており、オートファジー分解活性の指標とされています[1)2)]。近年、オートファゴソームの増加がオートファジー誘導によるものなのか、それともオートファジーの最終段階でオートリソソームが阻害されて増加したのかを測定し、解析する必要が出てきました。本キットはオートファゴソームとオートリソソームを同時測定することで、オートファジー経路解析を行なうことができます。

1）X. Chen, *et al., Am J Transl Res.*, **2020**, *12*(9), 4902-4922.
2）C. Oh, *et al., J Neurosci.*, **2022**, *42*(14), 3011–3024.

＜原理＞
本キットは、オートファゴソームおよびオートリソソームを検出する DAPRed と、オートリソソームを検出する DALGreen で構成されています。DAPRed はオートファゴソーム膜に取り込まれ蛍光を発します。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 DAPRed 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リングすることができます。

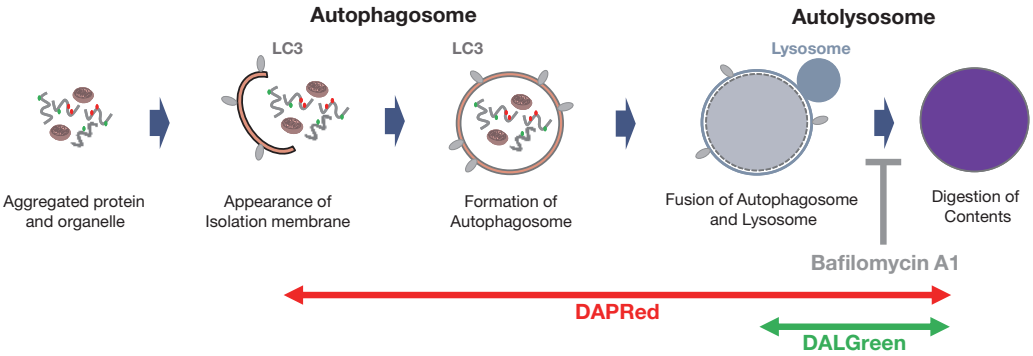
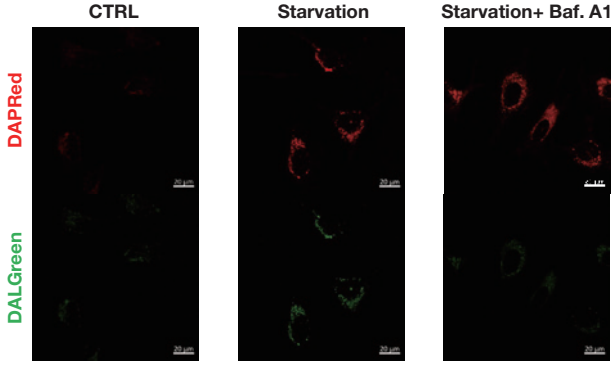


図 1　DAPRed と DALGreen の同時測定によるオートファジー経路解析

＜オートファジー経路を解析する＞
本キットを用いて、リソソーム酸性化阻害剤 Bafilomycin A1（Baf. A1）を用いたオートファジー経路の解析を行いました。HBSS で培養した HeLa 細胞において、DAPRed と DALGreen の蛍光が増大し飢餓培養によるオートファジーの誘導を確認しました。また、Baf. A1 添加に伴うオートリソソーム形成阻害によりオートファゴソームが蓄積し、DAPRed の蛍光は増加しましたが、DALGreen は蛍光の低下が観察されました。オートファゴソームを検出する DAPRed と、オートリソソームおよびオートリソソームを検出する DALGreen を組み合わせてオートファジー経路として測定できました。



【実験条件】
細胞 : HeLa

【検出条件】
DALGreen（緑）:
Ex = 488 nm
Em = 490 – 550 nm

DAPRed（赤）:
Ex = 561 nm
Em = 600 – 700 nm

＜初めて使用される方向け オールインワンキット ＞

キットコンポーネント
・オートファゴソーム検出色素
DAPRed

・オートリソソーム検出色素
DALGreen

・リソソーム酸性化阻害剤
Bafilomycin A1

図 2　リソソーム酸性化阻害剤（Baf. A1）を用いたオートファジー経路の解析

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Autophagic Flux Assay Kit	1 set	39,000	A562

関連製品

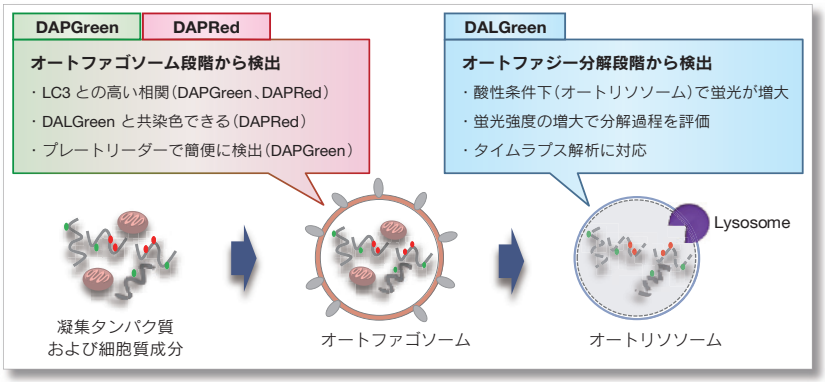
オートファジー検出試薬

DAPRed - Autophagy Detection
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・細胞内小器官等の再利用や代謝のための分解機構としての様々な疾患への関与が示唆されています。 DAPRed, DAPGreen, DALGreen は培養細胞に添加するだけで簡便にオートファジーを検出できる蛍光試薬です。

＜原理＞

DAPRed, DAPGreen はオートファゴソーム膜に取り込まれ蛍光を発します。一方、DALGreen も同様にオートファゴソーム形成時に取り込まれますが、凝集タンパク質等が分解されるオートリソソーム内で蛍光を発します。DAPRed, DAPGreen, DALGreen は試薬を添加するだけで、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モニタリングすることができます。



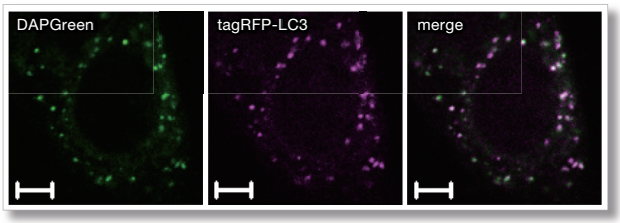
特性比較

	対応装置			蛍光特性	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	○	○	○	λex=425-475 nm※ λem=500-560 nm	35 mm dish: 25 枚分 (0.1 μmol/l で使用時)	LC3-GFP MDC Cyto-ID など
DAPRed	○	×	×	λex=500-560 nm λem=690-750 nm	35 mm dish: 25 枚分 (0.1 μmol/l で使用時)	
DALGreen	○	○	×	λex=350-450 nm※ λem=500-560 nm	35 mm dish: 10 枚分 (1.0 μmol/l で使用時)	LC3-GFP-RFP など

※共焦点顕微鏡では488nmにて励起可能

LC3 との高い相関 DAPGreen

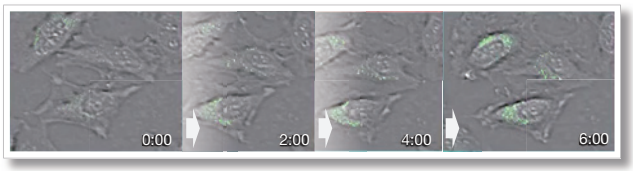
RFP-LC3 発現 HeLa 細胞に DAPGreen を添加後、Rapamycin によりオートファジーを誘導しました。結果、DAPGreen と、LC3 が共局在する結果が得られました。



検出条件
Ex=488 nm , Em=500-563 nm
スケールバー：10 μm

タイムラプスで検出 DALGreen

DALGreen で染色後の HeLa 細胞をアミノ酸不含培地にて培養を開始し、6 時間までの細胞および蛍光像の変化を観察しました。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。



タイムラプス動画を小社 HP で公開中！

検出条件
Ex=405 nm, Em=500-550 nm
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）

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
DAPRed - Autophagy Detection	5 nmol	39,800	D677
DAPGreen - Autophagy Detection	5 nmol	40,900	D676
DALGreen - Autophagy Detection	20 nmol	31,900	D675

新製品

解糖系 / ミトコンドリア膜電位測定キット

Glycolysis/JC-1 MitoMP Assay Kit

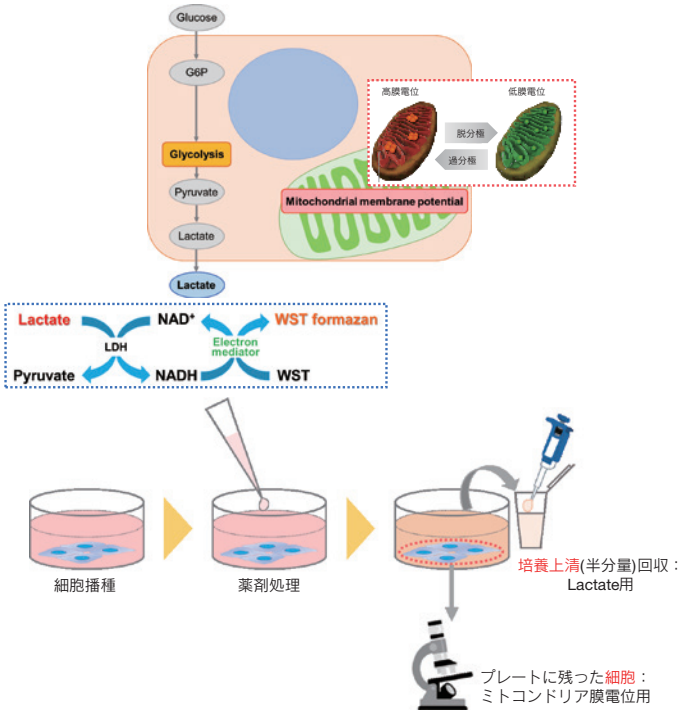
＜特長＞
・誰でも簡単に実験ができるプロトコルを同梱
・実験に必要な試薬が全て同梱されたオールインワンのキット
・キット 1 つで 2 つの指標 (乳酸産生量とミトコンドリア膜電位) を評価可能

解糖系は細胞の主要な代謝経路の 1 つであり、その代謝産物である乳酸は解糖系の機能をモニタリングするための指標として利用されています。また、ミトコンドリアは細胞が生きていくためのエネルギーを産生する重要なオルガネラであり、ミトコンドリア膜電位はミトコンドリア機能の指標の 1 つとしてよく用いられています。ミトコンドリア機能が低下した老化細胞では解糖系を亢進させることや、解糖系に強く依存するがん細胞においては、解糖系が抑制されてもミトコンドリア機能を活性化することで生存を維持することが報告されています。このように、解糖系とミトコンドリアの機能を併せて見ることは、老化やがんなどの様々な疾患における治療戦略の開発に繋がることが期待されています。

Glycolysis/JC-1 MitoMP Assay Kit は、乳酸産生量の測定 (Lactate Assay) とミトコンドリア膜電位の測定 (JC-1 Assay) ができるキットです。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。

＜原理＞

本製品では、細胞外へ排出された乳酸量を WST ホルマザンを用いた吸光度法で測定し、ミトコンドリア膜電位を低分子蛍光色素 JC-1 を用いて蛍光法で測定します。



① ディッシュまたはマイクロプレートに細胞を準備する
② 必要に応じて薬剤刺激を行う
③ 細胞培養上清を半分量回収する
④ ③のサンプルを用いて Lactate Assay を行う
⑤ ディッシュまたはマイクロプレートに残った細胞を用いて JC-1 Assay を行う

＜キット内容＞

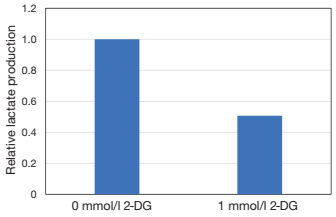
Dye Mixture	Lactate Assay 用
Lactate Standard (10 mmol/l)	
LDH Solution	
Lactate Assay Buffer	
Reconstitution Buffer	
JC-1 Dye	JC-1 Assay 用
Imaging Buffer (10 ×)	

＜実験例＞

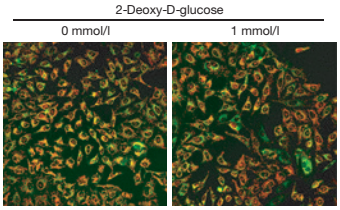
2-Deoxy-D-glucose 処理した細胞を用いた評価

2-Deoxy-D-glucose(2-DG)で処理した HeLa 細胞の乳酸産生量およびミトコンドリア膜電位を測定しました。
結果、2-DG 処理により HeLa 細胞の乳酸産生量は減少し解糖系が阻害された一方で、ミトコンドリア膜電位の上昇が確認されました。

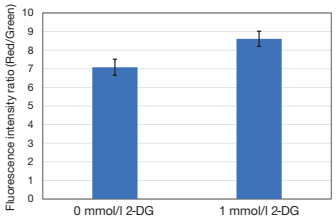
乳酸産生量の変化測定：
プレートリーダー 450 nm



ミトコンドリア膜電位の変化：



共焦点レーザー蛍光顕微鏡
(緑)
Ex = 488 nm, Em = 500-550 nm
(赤)
Ex = 561 nm, Em = 560-600 nm



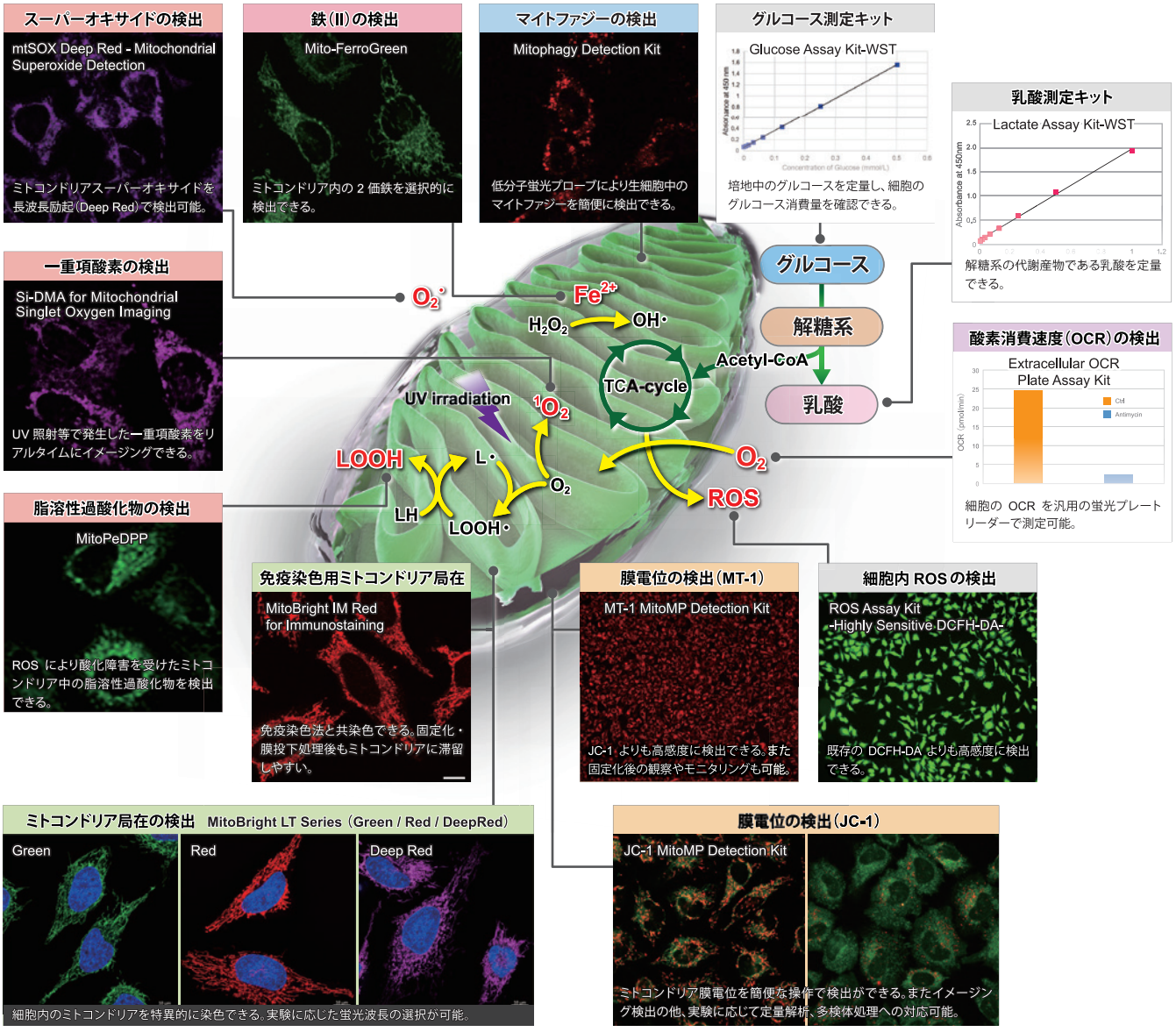
プレートリーダー
(緑)
Ex = 485 nm, Em = 535 nm
(赤)
Ex = 535 nm, Em = 595 nm

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Glycolysis/JC-1 MitoMP Assay Kit	50 tests	48,000	G272

関連製品

ミトコンドリア関連試薬マップ

ミトコンドリア研究用試薬として、損傷ミトコンドリアの品質管理システムであるマイトファジー検出（Mitophagy Detection Kit）をはじめ、ROS: 活性酸素種の検出（Si-DMA、mtSOX）および ROS により酸化を受け生じた過酸化脂質などの脂溶性過酸化物の検出（MitoPeDPP）、更にはミトコンドリア染色用および膜電位依存的な各種蛍光プローブ（MitoBright LT シリーズ Green / Red / DeepRed）、MitoBright IM、JC-1、MT-1）をラインナップしています。



各製品の詳細は下記から

ミトコンドリア　同仁　検索

細胞機能解析

5th Edition

Analysis for Cellular Function

- 細胞増殖/細胞毒性
- 細胞内代謝
- ミトコンドリア
- 酸化ストレス
- 生体硫黄
- 細胞老化
- 脂肪滴
- 膜動態/膜形態
- オートファジー
- エクソソーム
- 抗体標識
- 注目の試薬を掲載 100製品以上!!

ダウンロード

細胞機能研究への注目の製品を多数掲載!!
研究へのお役立てください

お問い合わせ

技術的なお困りごとや、ご相談・ご要望など
お気軽にご相談ください。

小社へのお問い合わせ等は下記 HP よりお願いします
URL:https://www.dojindo.co.jp/

次号テーマ
相分離生物学

DOJIN NEWS No.185

ドージンニュース No.185　令和 5 年 6 月 12 日発行
株式会社同仁化学研究所　DOJINDO LABORATORIES
熊本県上益城郡益城町田原 2025-5 〒 861-2202
発行責任者 松野寛明　編集責任者　岩永竜弥　年 4 回発行
許可なくコピーを禁ず