

相分離生物学

総説

相分離生物学の先へ

Beyond Phase-Separation Biology

筑波大学 白木 賢太郎

生命科学の最前線 ～熊本大学若手研究者の現場から～

次世代プロテオミクス技術の開発と展開

Development and application of next-generation proteomics technologies

慶應義塾大学 増田 豪、熊本大学 大槻 純男

注目の研究

神経変性疾患と LLPS の関わり

株式会社同仁化学研究所 末永 元輝

連載

抗酸化キットを使う前のサンプル前処理法〈第2回〉 P.12

新製品

死細胞標識試薬 P.7



CONTENTS

Review

相分離生物学の先へ

Beyond Phase-Separation Biology

筑波大学 白木 賢太郎

1

Topics on Chemistry

神経変性疾患と LLPS の関わり

株式会社同仁化学研究所 末永 元輝

5

Review

生命科学の最前線 ～熊本大学若手研究者の現場から～ 次世代プロテオミクス技術の開発と展開

Development and application of next-generation proteomics technologies

慶應義塾大学 増田 豪、熊本大学 大槻 純男

8

連載

抗酸化キットを使う前のサンプル前処理法 〈第2回〉

株式会社同仁グローバル 山口 勝則

12

Commercial

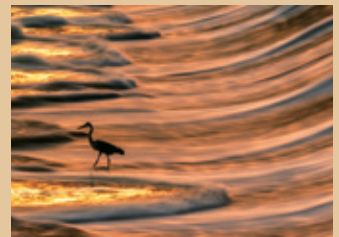
エクソソーム膜・タンパク質 蛍光染色キット	4
脂肪滴染色蛍光試薬	6
脂肪滴測定キット	6
DPPH抗酸化能測定キット	13
バイオフィーム形成量・形成阻害測定キット	14
試験片用バイオフィーム形成能測定キット	14
バイオフィーム薬剤効果測定キット	15
微生物増殖アッセイキット	15
細菌二重染色キット	16

新製品

死細胞標識試薬	7
---------------	---

お役立ち

学会展示のご案内	11
細胞機能解析冊子リニューアル	11
製品取扱説明書 変更のお知らせ	11
ーアプリケーション紹介ー	17



表紙:玉名郡和水町 白石堰の鷺

夏の時期、夕陽が正面から川へ
射し込む時間帯は川が黄金色に
染まる。その美しい流れを表現
する為、ND フィルターを装着
してシャッタースピードを 1.6
に設定。鳥が動くか動かないか
の絶妙なシャッタースピードで
流れを表現して撮影した。

photo:永島 俊介氏



X (旧ツイッター)

小社製品の最新情報や使
用文献などを投稿してい
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。

相分離生物学の先へ

Beyond Phase-Separation Biology



白木 賢太郎

筑波大学数理物質系
教授

Abstract

Liquid-liquid phase separation (LLPS) is currently a hot topic in cell biology. In this manuscript, I first present the finding on several topics that led to the emergence of Phase-Separation Biology. The relevance of LLPS to amyloid and anticancer drugs is an important issue for this area. Finally, Protein-Solution Science will be introduced as a comprehensive view of the application of a protein science for industry.

1. はじめに

タンパク質の液-液相分離に関して、はじめて講演したのは2018年夏のことだった。翌年にこの分野の概要を整理した『相分離生物学』を出版したが、この頃はたくさんの講演の機会をいただいた。当時は、いったいどういう仕組みでタンパク質が相分離するのか、凝集とは何が違うのか、界面はどのようなになっているのか、細胞内で実測するにはどのような方法があるのかなど、初歩的な質問も多かった。それから5年が過ぎているが、この分野に興味を持つ研究者も増えてきている¹⁾。タンパク質の機能を理解するためには、タンパク質の立体構造だけではなく、タンパク質の溶液状態を理解する必要がある、というコンセプトは今では共通認識になってきている。本稿では、相分離生物学の成り立ちと、これから期待される応用の可能性について整理してみたい。

2. 相分離生物学の原郷

相分離生物学の分野の歴史を辿ってみると、細胞の中の構造の研究に行き着くだろう。卵細胞の中にある核小体の研究であれば、すでに19世紀初頭には行われていたような古くからあるテーマである。一方、液-液相分離という現象は、水と油のような身近な例としても知られており、高分子の液-液相分離も1940年代には統計力学で厳密に議論できるようになっていた。だが、この両者が結び付けられたのは21世紀に入ってからのことであった。相分離生物学の原典となる成果に、マックス・プランク研究所のAnthony A. Hymanらが報告した2009年の論文がある²⁾。線虫の受精卵にはP顆粒があり、受精後に卵割が進むにつれて片側に集まることが知られていた。このような非対称性が生まれるのはなぜかという、P顆粒が液体の性質を持つからだというのがこの論文での発見であった。すなわち、この非膜性構造体をドロプレットとみなし、細胞内に物理学の世界を改めて持ち込んだのがこの論文であった。この論文の第一著者であるClifford P. Brangwynneは、その後、プリンストン大学に研究室を持ち、この見方をさらに発展させている。

3. ATP はドロプレットを溶かす

Hymanらの研究グループは、この成果以外にも、相分離に関連する魅力的な仮説をいくつも提唱している。そのひとつに、『ATPは生物学的ハイドロトロプである』という2017年の論文がある³⁾。ハイドロトロプとは疎水性分子を溶かす物質という意味である。細胞内には数mMのATPがあるとされるが、ATPを「エネルギー通貨」として利用している酵素はATPと親

和性が高いので、これだけ高濃度のATPは不要である。ではなぜ、細胞内には過剰量のATPがあるのだろうか？

この論文ではATPがFUSタンパク質のドロプレットを溶かすことが示されている。ATPの濃度が薄いときにはFUSはドロプレットを形成するが、10 mMのATPが含まれているとドロプレットを形成しないのである。つまり、ATPが細胞内にこれだけ高濃度あるのは、FUSのように液-液相分離しやすいタンパク質を分散した状態に保つために働いているのだというのが、この論文の主張である。

この結果から筋萎縮性側索硬化症の発症について次のように考察できるだろう⁴⁾。FUSタンパク質はアミロイドを形成し、筋萎縮性側索硬化症を発症するとされるタンパク質である。細胞内にATPが少ない場合、FUSはドロプレットを形成して濃縮された状態になり、アミロイドを形成しやすい。他方、細胞内にATPがたくさん含まれているとFUSはドロプレットを形成しないので、アミロイドにもなりにくいだろう。すなわち、FUSのドロプレットの形成を抑制することで、この疾患の発症を抑制できる可能性がある。

ATPの化学構造をあらためて見てみると、確かに疎水性の高い領域を構成する核酸塩基と、親水性の高い領域を構成するリン酸基とが糖を介してつながっていることがわかる。ミセルを形成するほど大きな疎水性領域は持っていないが、疎水性物質と相互作用して溶解度を上げる働きがあってもおかしくはない。こうして「タンパク質は液-液相分離する」ということを仮定して考えると、ATPのような著名な分子が細胞内の溶液環境でどのような影響をおよぼしているのかについて、新たな見え方をするのは興味深い。この論文を初めて読んだときのそのような印象を今もよく覚えており、その後、こういう見方を「相分離メガネをかける」などと称している¹⁾。

4. 薬の効果を見直す

創薬は相分離生物学の時代によって見方が変わる分野である。研究が盛んに行われているテーマのひとつに、アミロイドと神経変性疾患の関係がある¹⁾。アミロイドとはタンパク質が主鎖の分子間にできる水素結合によって安定化された線維状の凝集体で、アルツハイマー病やパーキンソン病、プリオン病などに関わるとされてきた。先述のFUSや、パーキンソン病の原因になるとされる α -シヌクレインなど⁵⁾、アミロイドの形成の途中にドロプレットを形成することが発見されてきていた。すなわち、アミロイドの途中にあるドロプレットが、創薬の新しいターゲットにな

るのである。

低分子の薬の効果も相分離の見方によって変わるだろう。もしレセプターがドロレットを形成するならば、そのドロレットへの薬の溶けやすさによって薬効が異なるからである。すなわち、ドロレットによく溶けるなら少量の薬でも効果を発揮するが、溶けないのならいくらその薬を導入しても効果はない。このような見方による最初の報告として、リチャード・ヤングらの研究チームによる抗がん剤の研究がある⁶⁾。これまでに報告されている抗がん剤は、その種類によって、核内に何種類が存在しているドロレットへの溶けやすさが異なるのである。すなわち、標的となるドロレットによく溶けることが薬の効果を高めることにもなり、副作用を減らすことにもなるだろう。

5. タンパク質の液 - 液相分離を再現する

タンパク質の液 - 液相分離は、試験管で簡単に再現できる。ありふれたタンパク質を用いてデモンストレーションをしてみたい。卵白の主成分であるオボアルブミンと、リゾチームをおよそ 1 mg/ml 程度の溶液を準備し、薄い緩衝液の中で混ぜると白濁した状態になる (図 1)。これが現在、広く言われている「タンパク質の液 - 液相分離」の一種であり、白く濁ったものが「ドロレット」と呼ばれるものである。ドロレットは凝集体とは異なり溶媒を含み流動性があるので、この例のようにタンパク質分子が静電相互作用によって集まっているのであれば、塩水を加えるだけで透明な状態に戻る。水に溶けたイオンによる静電遮蔽効果によって、溶質が分散するからである。一方、ここで作らせたドロレットは時間と共に少しずつ成熟する性質があり、白濁した状態で 30 分も置いておけば、同じ濃度の塩水を入れても溶けなくなる。つまり時間とともに疎水性相互作用が強まっていき、イオンでは溶けなくなるのである。要するに、分散したタンパク質を混ぜると液滴になり、時間とともに凝集体へと成熟するのである。

このような試験管内で簡単に再現できるような現象が、なぜ細胞内にあるタンパク質の働きと関連づけて理解されてこなかったのは不思議である。その理由のひとつとして、タンパク質は固有の構造を形成して働き、構造形成に役立たない天然変性領域には注意が向けられてこなかったことが考えられる。事実、ヒトのタンパク質の場合、30 残基以上の天然変性領域を持つものは半数以上であると試算されており⁷⁾、この領域は液 - 液相分離を制御していると考えられるが、どのようなアミノ酸配列を持つと相分離しやすいのかについては、ホットなテーマとなっている。現在では、アミノ酸配列と天然変性領域のほか、アミノ酸配列と相分離性を理解するためのデータベースの整理も進んできている。

6. タンパク質は多様な状態を取る

タンパク質は固有の立体構造を形成して働くが、他方で多様な立体構造を形成し、多様な溶液状態を作り出す (図 2)。先ほどの図 1 で示した結果のように、時間とともにタンパク質の立体構造が変化することもあるので、タンパク質の溶液状態は多様である。例えば、タンパク質の溶液を加熱すると凝集体ができる。しかし凝集といっても多様であり、濃縮すれば均質に全体が濁ったオバレッセンスと呼ばれる状態になるし、高濃度のタンパク質溶液を加熱すると分子間のネットワークができることでゲルになるし、低濃度のタンパク質溶液を加熱すると粒の揃った白濁した凝集体になる。他にも、油を含ませた溶液を混ぜるとタンパク質は構造変化して両親媒性の構造になって乳化剤にもなるし、空気を含めてふり混ぜると泡立つこともある。このような性質は食品加工の分野では積極的に使われることもあるし、バイオ医薬品の開発やタンパク質科学の基礎研究からは嫌がられる特徴にもなっている。

このようにタンパク質が多様な状態をとりうるのは、タンパク質の分子が構造変化し、水やイオン、他のタンパク質や溶質との相互作用が多様になるからである。つまり、タンパク質の一次

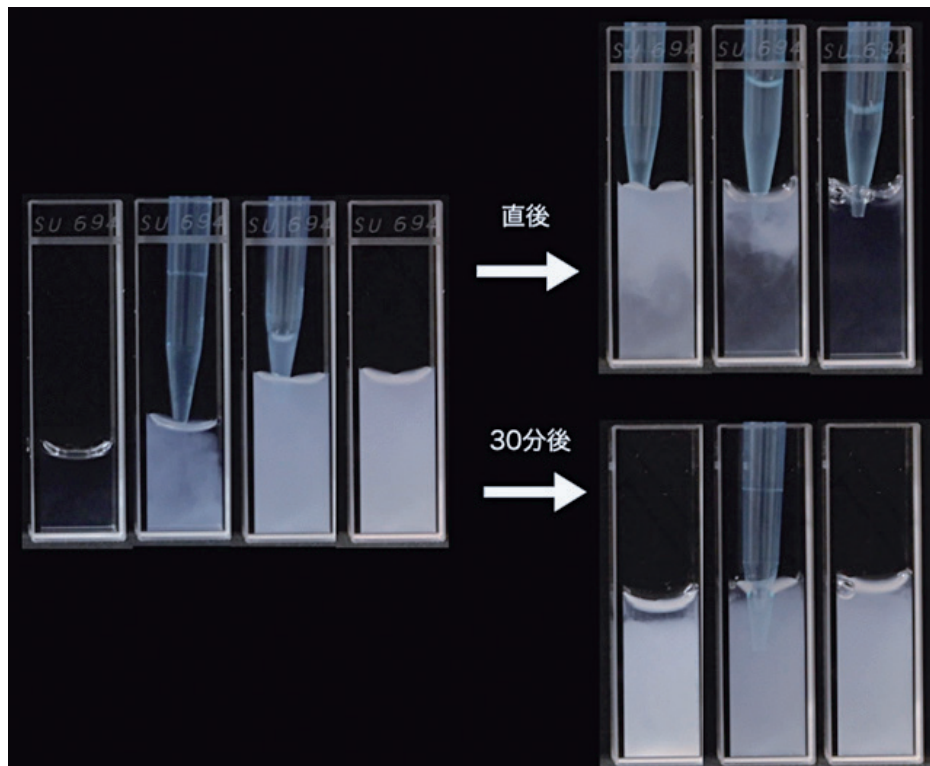


図 1. オボアルブミンとリゾチームを混合した溶液。オボアルブミン溶液にリゾチーム溶液を加えると白濁する。その直後に塩化ナトリウムを加えると透明な溶液になるが、30 分後に塩化ナトリウムを加えても白濁した状態は変化しない。

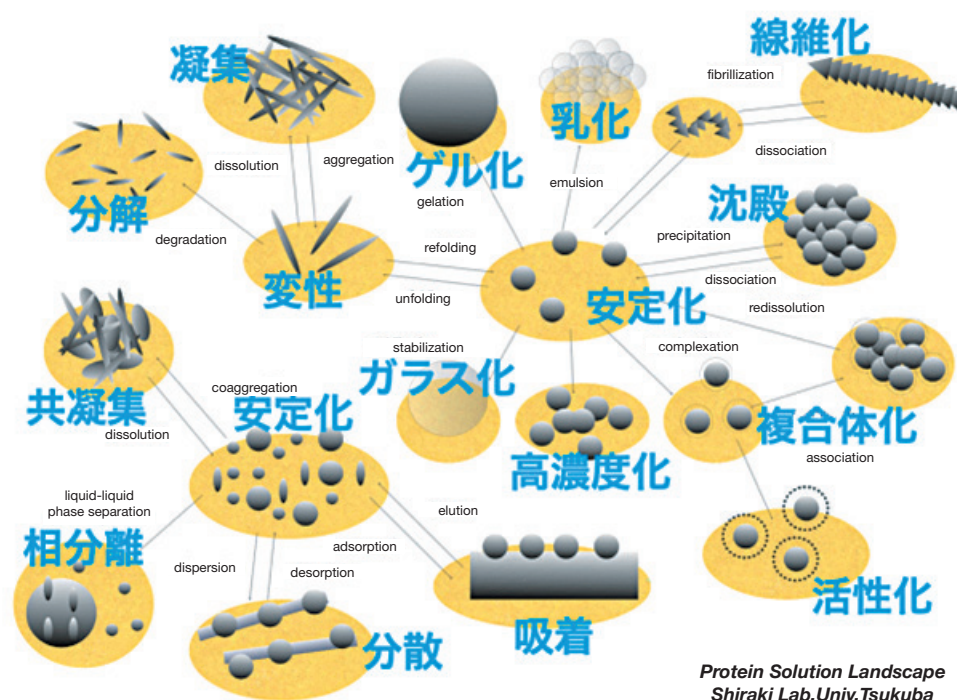


図2. タンパク質がとりうる多様な溶液状態のイメージ図。

配列を明らかにし、水溶液中で形成するネイティブ構造を明らかにしても、タンパク質の可能性の世界からはごく一部しか見ていないことになる。タンパク質を、分子そのものではなく、水分子を含めた「溶液系」としてとらえなおすとき、液-液相分離した状態もそのひとつとして研究者が意識するようになり、その見方によって相分離生物学という新しい分野が出てきたのである。

7. 蛋白質溶液学へ

タンパク質の分子の研究は20世紀半ば以降、広く興味の持たれた分野である。現在では、分子生物学や生化学、酵素学、構造生物学などの分野として各国に学会があり、教科書が書かれている。一方、タンパク質溶液を研究対象とする分野は、不思議なことに確立してはいない。相分離生物学は、細胞内にあるタンパク質溶液を対象とした分野であり、ようやく2010年代後半になって意識されてくるようになったものである。ここでさらに一般的に見方を広げ、タンパク質の溶液状態の全体を扱う分野を、仮に蛋白質溶液学と名づけてみたい。タンパク質を原子レベルの分解能で観察し、物理量に還元して理解するのではなく、タンパク質集合物を現象論的に扱う分野である。

例えば、アルギニン天然アミノ酸の一種であり、いわばありふれた分子である。しかし、アルギニンをタンパク質溶液に入れると、タンパク質の凝集が抑制できることが知られている⁸⁾。今ではアルギニン溶液は、タンパク質の精製や難溶性分子の分散剤など、さまざまな使い方がされてきている。これらの仕組みは全て同じように理解でき、少し専門的になるが、タンパク質などの分子間の π - π 相互作用をアルギニンが弱めることで、凝集をふせいだり、よく溶かしたりするということである。アルギニンの他に、静電相互作用や疎水性相互作用、水素結合などに影響をおよぼす多様な添加剤が開発され、凝集や相分離の制御に応用されてきている⁹⁾。

タンパク質の凝集や相分離は、産業に目を向けると広いテーマに関連している。例えば、私たちが関係している研究例だけでも、卵白の加熱凝集の抑制や¹⁰⁾、大豆タンパク質の乳化剤としての応

用¹¹⁾、食肉の溶解度の改良¹²⁾、高濃度の抗体溶液に見られる相分離の抑制¹³⁾、インスリン¹⁴⁾やポリグルタミン¹⁵⁾などのアミロイドの形成の制御、髪の毛のようなタンパク質の凝集抑制などの多様な課題がある¹⁶⁾。これらの課題を持つ業界は食品や医薬品、美容品などに及ぶが、全てタンパク質溶液という見方では共通している。ここでは、どのようにしてタンパク質の溶液状態が保たれているのかという理解と、どのようにすれば制御できるのかという技術の開発が期待されている。

このような多様なタンパク質の溶液状態のひとつが液-液相分離であり、細胞内にあるタンパク質の溶液状態の統一的理解のために相分離生物学が誕生した。これを含めたタンパク質一般の見方が蛋白質溶液学になる。広くタンパク質の溶液状態を扱うためには解像度は低い方がよく、できるだけ多様な状態をつなげるような見方をすると価値がある。卵白を加熱したときのゲル化をふせぐ分子を、髪の毛の安定化に応用したり、その知見をアミロイドの形成の抑制につなげたりするなど、タンパク質溶液でつながる世界は広い。

これまで産学連携の共同研究をしてきた皆様と、研究室と一緒に研究してきた学生の皆様に感謝したい。

[参考文献]

- 1) 白木賢太郎 (編)『相分離生物学の全貌』東京化学同人、2021年
- 2) C. P. Brangwynne, et al., *Science*, **2009**, 324, 1729 - 1732.
- 3) A. Patel et al., *Science*, **2017**, 356, 753-756.
- 4) A. Patel et al., *Cell*, **2015**, 162, 1066-1077.
- 5) S. Ray et al., *Nat. Chem.*, **2020**, 12, 705-716.
- 6) A. Klein et al., *Science*, **2020**, 368, 1386-1392.
- 7) R. Lee et al., *Chem. Rev.*, **2014**, 114, 6589-6621
- 8) H. Hamada et al., *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **2009**, 10, 400-407.
- 9) K. Shiraki et al., *Biophys Rev.*, **2020**, 12, 587-592
- 10) T. Hong et al., *Food Res. Int.*, **2017**, 97, 272-279.
- 11) H. Kano et al., *Food Chem. X*, **2023**, 17, 100567.

- 12) E. Takai *et al.*, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2013**, 62, 647-651.
 13) Y. Nakauchi *et al.*, *Mol. Pharm.*, **2022**, 19, 1160-1167.
 14) W. Mori *et al.*, *Sci. Rep.*, **2022**, 12, 8556.
 15) E. Minakawa *et al.*, *Brain*, **2020**, 143, 1811-1825.
 16) K. Shiraki *et al.*, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **2016**, 17, 116-125.

〔著者プロフィール〕

氏名：白木 賢太郎 (Kentarō Shiraki)
 所属：筑波大学数理物質系
 〒 305-8573 茨城県つくば市天王台 1-1-1
 Tel：029-853-5306
 E-mail：shiraki.kentarō.gb@u.tsukuba.ac.jp
 出身学校：大阪大学
 学 位：博士（理学）
 専門分野：蛋白質溶液学、相分離生物学
 現在の研究テーマ：タンパク質の凝集や分散の理解

出版物のご案内



相分離生物学

白木 賢太郎 著

東京化学同人

2019年8月2日発行 A5判 176ページ

ISBN 978-4-8079-0965-0

本総説の白木賢太郎先生の著書、「相分離生物学」は細胞内の液-液相分離の成果を整理し、細胞生物学と分子生物学の間に生まれつつある新しい分野を紹介する書籍です。これからこの分野での研究を始める方ばかりでなく、生命科学分野の幅広い読者におすすめです。

エクソソーム膜・タンパク質 蛍光染色キット

ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Green/ Red/ Deep Red ExoSparkler Exosome Protein Labeling Kit-Green/ Red/ Deep Red

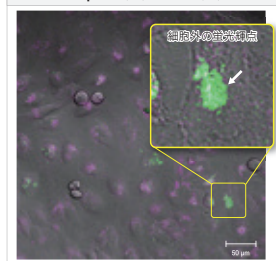
<特長>

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

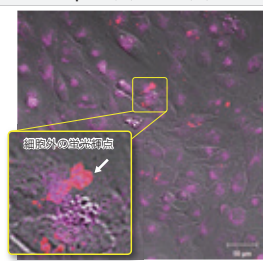
ExoSparkler シリーズは、精製済みのエクソソーム膜またはタンパク質を染色し、細胞に取り込まれるエクソソームをイメージングすることができます。既存の試薬に比べて①細胞外で凝集せず、②標識体はエクソソームの性質にほとんど影響しません。また、キットに同梱のフィルトレーションチューブで染色後の精製が可能です。

① 細胞外で凝集しない

本製品 Deep Red (紫) と製品 P (緑) の共染色



本製品 Deep Red (紫) と製品 P (赤) の共染色



観察条件

本製品 Deep Red (紫)：

Ex = 640 nm / Em = 640-760 nm

S 社 製品 P (緑)：

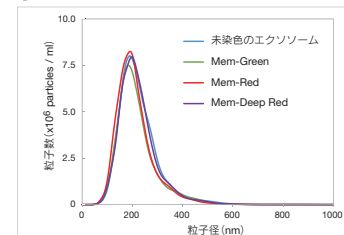
Ex = 561 nm / Em = 560-620 nm

S 社 製品 P (赤)：

Ex = 640 nm / Em = 650-700 nm

HeLa 細胞へ本キット (Membrane, Deep Red) または他社製品 P (緑または赤) で染色したエクソソームを添加し、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ました。その結果、製品 P で染色したエクソソームは、色素の凝集が疑われる細胞外の蛍光輝点を確認されました。

② 標識体は性質にほとんど影響しない



本製品によるエクソソーム染色前後での粒子径比較

染色前後で、NTA とゼータ電位を測定した結果、ほとんど影響を及ぼさない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
ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Green	5 samples	26,800	EX01
ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Red	5 samples	26,800	EX02
ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Deep Red	5 samples	26,800	EX03
ExoSparkler Exosome Protein Labeling Kit-Green	5 samples	21,400	EX04
ExoSparkler Exosome Protein Labeling Kit-Red	5 samples	21,400	EX05
ExoSparkler Exosome Protein Labeling Kit-Deep Red	5 samples	21,400	EX06

Topics on Chemistry

神経変性疾患と LLPS の関わり

株式会社同仁化学研究所 末永 元輝

LLPS 研究分野と神経変性疾患

近年、生命現象を解き明かす新たな研究として、細胞内で生じる液-液相分離 (liquid-liquid phase separation: LLPS) が注目を浴びている。LLPS は細胞内で RNA やタンパク質などの高分子が局所的に集まり、水と油のように細胞質から分離して液滴を形成する現象である。それは核小体に代表されるような、生体膜を持っていない (膜で区切られていない) 固有の動きをもつ集合体 (droplet) であり、オルガネラのように様々な生理現象を担う場となっている。ほぼすべての細胞内現象で LLPS が関与しているとも言われており、神経変性疾患に関わる研究も盛んに行われている。例えば、細胞内でのタンパク質凝集が病因となる疾患 (ミスフォールディング病) のうち、パーキンソン病や前頭側頭葉変性症、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症においては、それらの原因タンパク質である α -シヌクレイン、FUS、タウ、TDP-43 が droplet を形成することにより、凝集体形成が促進される¹⁾。LLPS は生体現象を解明するための新たな糸口であり、神経変性疾患と LLPS の関与を明らかにすることで病態の理解、新規治療法の開発に繋がることが期待されている。

Droplet が凝集体か

ミスフォールディング病の病態を明らかにしていく上で、タンパク質凝集過程における droplet と凝集体の境目を見分けることは重要である。LLPS を評価する実験において、試験管内や細胞内に形成された droplet と凝集体をどうやって見分けているのだろうか。タンパク質凝集が原因とされる疾患では、*in vitro* 環境下でタンパク質を凝集させる実験が古くから行われてきたが²⁾、蛍光プローブや蛍光タンパク質を利用して観察しただけでは蛍光の集合が何を示すのか判断できない。そこで、droplet を判断する手法の一つとして、分子動態を観察できる FRAP (光褪色後蛍光回復法) が使用されている³⁾。レーザーにより褪色させた領域の蛍光回復の程度をもとに、「蛍光の集合に流動性があるか」を確認することで、droplet かどうかを判断できる (図 1)。Droplet を細胞内で観察するためには標的タンパク質に GFP を発現させて FRAP によって評価するが、最近では羽澤らによりピレン化合物を応用した LLPS に応答する低分子プローブも報告されており⁴⁾、LLPS の検出手法についても盛んに研究が進められている。

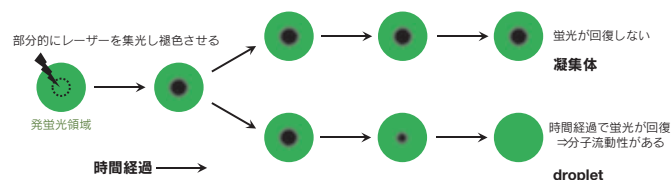


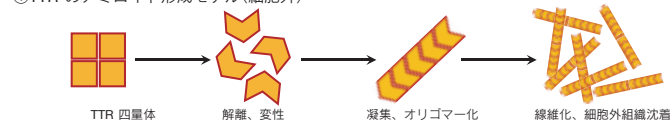
図 1. FRAP (光褪色後蛍光回復) 法の原理

LLPS はアミロイドーシスにも関与しているのか

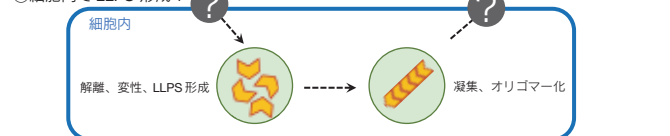
次に、同じくミスフォールディング病に分類されるアミロイドーシスと LLPS との関連についても焦点を当ててみる。前述の通り、細胞内にタンパク質凝集が生じる疾患と LLPS の関与が示唆されているが、一方でアミロイドーシスと LLPS との関連を証明するには気を付けなければならない点もある。例えば、アルツハイマー病の原因タンパク質であるアミロイド β 、家族性アミロイドポリニューロパチーの原因タンパク質であるトランスサイレチ

ン (TTR) に関して、凝集過程における LLPS の関与が報告されている^{5) 6)}。しかし、アミロイドーシスの原因タンパク質は細胞外タンパク質であり、生じるアミロイド線維も細胞外に沈着するため、そこに細胞内の現象である LLPS がどのように関与するかは不明である (図 2)。また、細胞外 (細胞外のマトリックス、または血中など) において線維形成を促進するような LLPS が生じるかも確認されていない。したがって、原因タンパク質がどのように細胞内外を移行するのか、細胞外において LLPS 形成が起きているのか、患者病態において実際に LLPS が観察されるのか、などまだまだ解明すべき点は多い。

①TTR のアミロイド形成モデル (細胞外)



②細胞内で LLPS 形成?



③細胞外で LLPS 形成?



図 2. TTR のアミロイド形成モデルと LLPS 関与の仮説

今後の LLPS 研究

LLPS 研究の広がりの観点から、神経変性疾患に関する最近の知見を紹介したが、これらの研究は人工的な LLPS 形成や細胞株を使った *in vitro* 実験系での検証が多い。今後どのように実際の患者病態に近づけるか、あるいは有用な細胞モデル、*in vivo* モデルをどう作製していくかが課題である。さらに、真に病態との関連を示すためには、患者生体内や生体サンプルでの観察手段が不可欠になってくる。今後、LLPS 研究分野が発展し、多くの疾患の原因究明に貢献していくことを期待する。

[参考文献]

- 1) A. Zbinden *et al.*, "Phase Separation and Neurodegenerative Diseases: A Disturbance in the Force", *Dev Cell*, **2020**, 55, 45-68.
- 2) W. Colon and J. W. Kelly, "Partial denaturation of transthyretin is sufficient for amyloid fibril formation *in vitro*", *Biochemistry*, **1992**, 31, 8654-60.
- 3) N. O. Taylor *et al.*, "Quantifying Dynamics in Phase-Separated Condensates Using Fluorescence Recovery after Photobleaching", *Biophys. J.*, **2019**, 117, 1285-1300.
- 4) M. Hazawa *et al.*, "A light-switching pyrene probe to detect phase-separated biomolecules", *iScience*, **2021**, 24, 102865.
- 5) X. Gui *et al.*, "Liquid-liquid phase separation of amyloid- β oligomers modulates amyloid fibrils formation", *J. Biol. Chem.*, **2023**, 299, 102926.
- 6) G. Duan *et al.*, "The Regulatory Mechanism of Transthyretin Irreversible Aggregation through Liquid-to-Solid Phase Transition", *Int. J. Mol. Sci.*, **2023**, 24, 3729.

脂肪滴染色蛍光試薬

Lipi-Blue / Green / Red / Deep Red

<特長>

- ・脂肪滴への高い選択性*
- ・4色のラインナップでフィルターの選択性が高い
- ・細胞内滞留性が高い

滞留性のデータや参考文献はこちら

脂肪滴 同仁

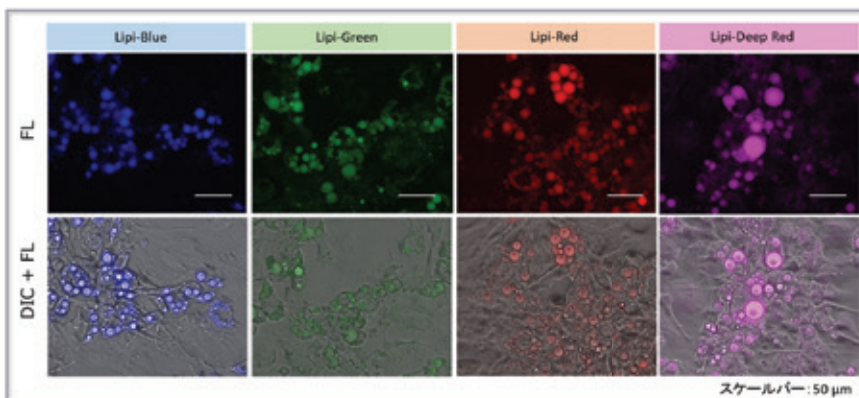
検索

*既存の Nile Red との比較

Lipi シリーズは、脂肪親和性の高い低分子蛍光試薬で疎水性環境下で蛍光が増強します。

<実験例：脂肪細胞の脂肪滴イメージング>

脂肪前駆細胞 3T3-L1 細胞由来の脂肪細胞を本製品群で染色したところ、脂肪細胞中の脂肪滴が明瞭に検出されました。



3T3-L1 細胞 (1.5×10^4 cells/well) に各色素の Working solution を添加後 37 °C で 24 時間インキュベートし、蛍光顕微鏡にて観察した。
*色素濃度：各 2.5 $\mu\text{mol/l}$

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Lipi-Blue	10 nmol	19,900	LD01
Lipi-Green	10 nmol	19,900	LD02
Lipi-Red	100 nmol	19,900	LD03
Lipi-Deep Red	10 nmol	19,300	LD04

脂肪滴測定キット

Lipid Droplet Assay Kit Blue / Deep Red

<特長>

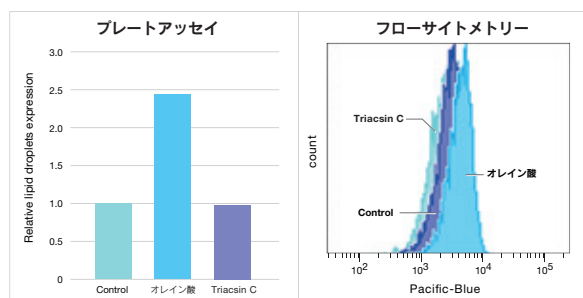
- ・脂肪滴の量的変動を数値化することが可能

Deep Red のデータ、製品の詳細はこちら

脂肪滴キット 同仁

検索

本製品は、試薬を添加するだけで生細胞および固定化細胞中の脂肪滴をイメージングまたは量的変動を数値化することができます。マイクロプレートリーダーやフローサイトメーターの使用が可能です。



<実験例：Lipid Droplet Assay Kit - Blue>

HeLa 細胞（プレートアッセイ）と A549 細胞（フローサイトメトリー）に、オレイン酸または脂肪滴形成阻害剤 Triacsin C を添加して脂肪滴の量的変化を数値化しました。
その結果、コントロールと Triacsin C 添加の場合と比較して、オレイン酸添加の場合に脂肪滴の量が増加していることを確認しました。

プレートアッセイ：

Ex = 376-386 nm, Em = 435-455 nm

フローサイトメトリー：

Ex = 405 nm, Em = 425-475 nm

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Lipid Droplet Assay Kit - Blue	1 set	26,800	LD05
Lipid Droplet Assay Kit - Deep Red	1 set	26,800	LD06

新製品

死細胞染色色素

Dead Cell Makeup Blue – Higher Retention than PI

Dead Cell Makeup Deep Red – Higher Retention than PI

<特長>

- ・細胞の固定化・膜透過処理後に色素が漏れ出ない
- ・フローサイトメトリーで死細胞を明確に識別できる
- ・ストック溶液の長期保存が可能*

*詳細はこちら

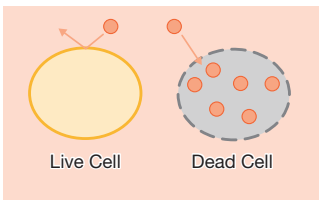
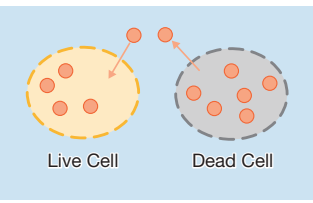
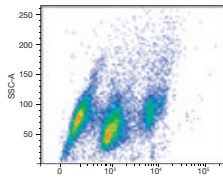
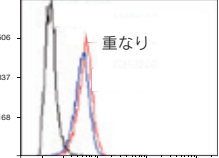
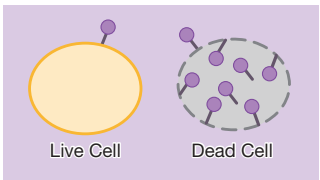
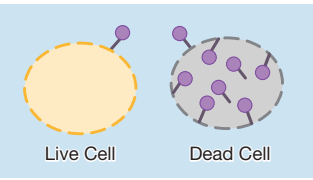
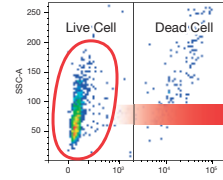
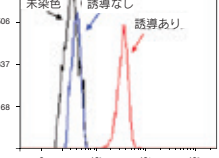
C555 または C556 同仁

検索

死細胞染色色素として Propidium Iodide (PI) が広く使用されていますが、細胞の固定化・膜透過処理により細胞からの漏れ出しが起きることが知られています。漏れ出た PI は生細胞も染色してしまうため、偽陽性の結果をもたらす可能性があります。本製品は、細胞膜非透過性のため生細胞には入り込まず、死細胞の損傷した膜を通して入り込み、細胞内のタンパク質と安定な共有結合を形成します。そのため、細胞の固定化・膜透過処理後に細胞から色素が漏れ出しません。

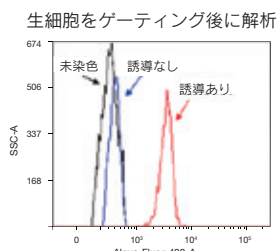
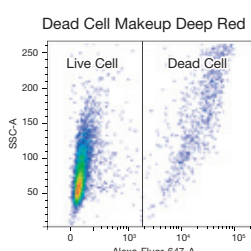
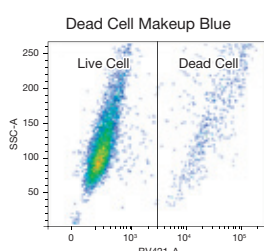
<PI の課題を解決>

本製品はタンパク質と安定な共有結合を形成するため、細胞の固定化・膜透過処理を行った後も色素が漏れ出さず、死細胞を明確に識別でき、データから除外することができます。

	死細胞を染色	固定化・膜透過処理	生・死細胞の確認	FCM 解析
PI	 ● PI 死細胞の核と相互作用	 漏れ出た PI が生細胞に入り込む	 細胞集団が複数に分かれる	死細胞を除かずに解析すると ...  重なり 解析が困難
本製品	 ● Dead Cell Makeup 死細胞内・膜表面のタンパク質に結合	 色素が死細胞から漏出しにくい	 生・死細胞を明確に区別	生細胞のみ解析  未染色 誘導なし 誘導あり 対象を正確に検出

<実験例>

Ionomycin (500 ng/ml) と PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate, 50 ng/ml) を含む RPMI 培地で 48 時間刺激を行った MOLT-4 細胞を、本製品を用いて死細胞を染色し、PD-1 の発現を免疫染色法にて検出しました。その結果、死細胞と生細胞を明確に区別でき、生細胞のみゲーティングを行った解析結果では、刺激を行った細胞群で優位に PD-1 発現量の上昇が認められました。



一次抗体：抗 PD-1 マウス抗体
二次抗体：抗マウス抗体 -Alexa 488

Blue: Ex = 405 nm, Em = 450/50 nm
(Pacific Blue, Brilliant Violet 421, Alexa Fluor 405)
Deep Red: Ex = 640 nm, Em = 670/30 nm
(APC, Alexa Fluor 647, Cy5)

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Dead Cell Makeup Blue – Higher Retention than PI	100 tests	39,000	C555
Dead Cell Makeup Deep Red – Higher Retention than PI	100 tests	39,000	C556

連載

生命科学の最前線 ～熊本大学若手研究者の現場から～

本号より小社が立地する熊本県の生命科学研究最前線を、熊本大学の若手研究者が連載（8回）でお届けします。

次世代プロテオミクス技術の開発と展開

Development and application of next-generation proteomics technologies



増田 豪

慶應義塾大学大学院
政策・メディア研究科
先端生命科学研究所
特任講師



大槻 純男

熊本大学大学院
生命科学研究部
教授

Abstract

Proteomics is a method for comprehensively quantifying proteins present in a sample. In the past, proteomics technologies had low protein coverage and sensitivity. In recent years, the development of related technologies has been tremendous, and it is now possible to quantify 10,000 different proteins in a single shot of liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) by using the developed MS method and data analysis software. In addition, it is possible to obtain proteomic information even from a single cell by developed sample preparation methods. Recent developments enable to observe not only protein-protein interactions but also protein-small molecule interactions. Protein observation is indispensable for life science research. In this article, we hope researchers will find that proteomics a useful technology and apply the proteomic techniques into their own research to help clarify their questions.

1. はじめに

タンパク質は生命活動にとって重要な分子群である。タンパク質は単独で機能することは少なく、タンパク質や代謝物、DNA など他の生命分子と相互作用することで特有な機能を発動する。また、細胞内外で発生したシグナルを伝達するためにタンパク質群が複雑なネットワークを形成している。プロテオミクスは試料中に存在するタンパク質を網羅的に観察する方法であり、タンパク質の役割を明らかにするために生命科学分野で多く用いられている。

プロテオミクスは前処理、質量分析およびデータ解析の3工程に大きく分かれている（図1）。前処理工程では、試料からタンパク質を抽出し消化酵素でペプチドにする。質量分析工程では、前処理工程で得られたペプチドを液体クロマトグラフィータンデム質量分析（LC-MS/MS）に導入し、ペプチドの配列を質量情報として取得していく。データ解析工程では、分析工程で得られた質量情報からソフトウェアを用いてペプチドおよびタンパク質の

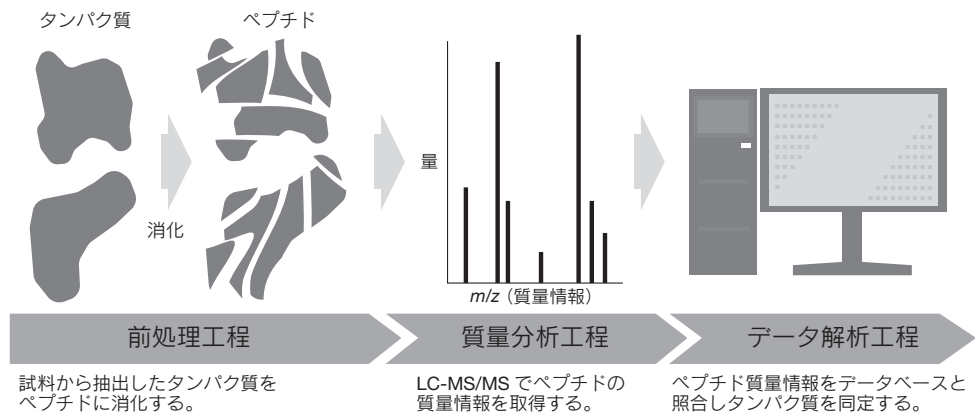
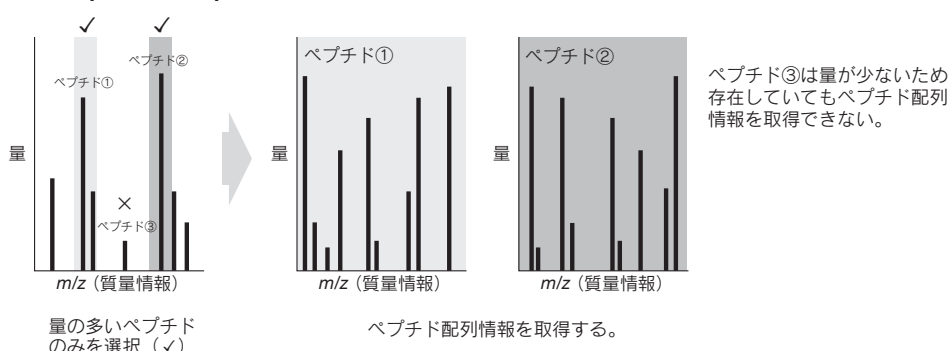


図 1

Data dependent acquisition (DDA)



Data independent acquisition (DIA)

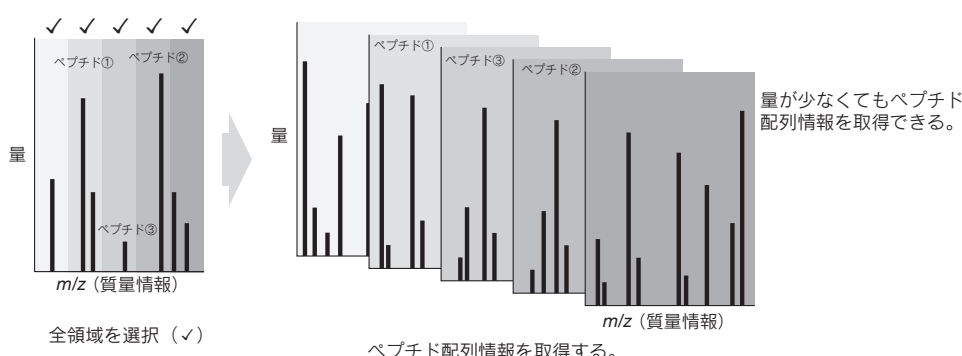


図 2

定性および定量を行う。これら各工程に用いられる手法は年々改良・開発され、20 年前に比べてプロテオミクスの用途は大きく広がった。特に網羅性や高感度性能は飛躍的に向上している。本稿では近年のプロテオミクスの発展に寄与したこれら 2 つの技術について主に紹介する。

2. 網羅性の改善

ヒトの遺伝子は約 20000 種類あるとされ、そのうち約 1 万数千種類がタンパク質として発現していると考えられている¹⁾。プロテオミクスはかつて、同定できるタンパク質の網羅性の低さが課題だった。以前は質量分析計でペプチドを測定する場合、data dependent acquisition (DDA) でペプチドの配列情報を取得することが一般的だった。DDA は、検出量が多い順にペプチドを選択し、それらについてペプチド配列情報を取得する方法である (図 2 上段)。LC-MS/MS では一度に複数のペプチドが同時に検出されるため、質量分析計の処理スピードが追いつかない場合は配列情報を取得できないペプチドが出てくるため同定結果の再現性が低かった。そこでこれまで、タンパク質やペプチドをその生化学的特性にしたがって分画^{2) 3)}したり LC の分離能を上げる⁴⁾ことで問題を解決しようとしてきた。これらの方法を用いることで大幅に同定数は増加したものの、それでもプロテオミクス結果の低い再現性は解決できなかった。

現在は data independent acquisition (DIA) で測定することでこの問題を解決できている。DIA はペプチドの検出量情報に依存せず、質量分析計に導入された全てのイオンについて配列情報を取得する方法である (図 2 下段)。そのため、DIA は DDA モードに比べてデータ間で同定されるタンパク質の再現性が高くなる。

一方で、DIA では正しくペプチドを同定するために DDA データと照らし合わせる必要があったため、同定できるタンパク質の数は DDA データに依存していた。近年、ニューラルネットワークなどを用いて過去の質量分析データを学習させることで、アミノ酸配列からペプチド配列情報を高精度に予測できるようになった⁵⁾。このことから、DDA データが不要となり FASTA ファイルで DIA データの正確な解析が可能となった。LC-MS の高度化も合わせ、DIA で測定することで 1 回の分析で 10000 種類を超えるタンパク質を定量できることが報告されている⁶⁾。

DIA は現在、プロテオミクスの一般的な質量分析方法となった。一方で翻訳後修飾解析やマルチプレックス解析など DDA が得意とする部分もあり、使い分けることで目的に即したデータを取得することが求められる。

3. 高感度化

一般的なプロテオミクスでは 200 ~ 1000 ng の消化したペプチドを LC-MS/MS に導入する。これだけの量のペプチドを調製するには初期試料として 1 万個程度の細胞が必要である。一方で、疾患組織片やセルソートした希少細胞集団など、1 万個の細胞に満たない微量試料についてもプロテオミクスを行いたいといった需要も多い。微量試料を高感度に分析するために、これまで LC 部分を中心に改良されてきた⁷⁾。近年では、1 細胞プロテオミクスへの展開が期待され、さらなる高感度分析が必要とされてきた。質量分析計自体は 1 細胞に含まれるほとんどのタンパク質を検出できるほど十分に高感度であることが知られている⁸⁾。一般的な前処理方法で 1 細胞のプロテオミクスを行うとタンパク質はほぼ同定できないことから、現在は前処理方法の高感度化が行われて

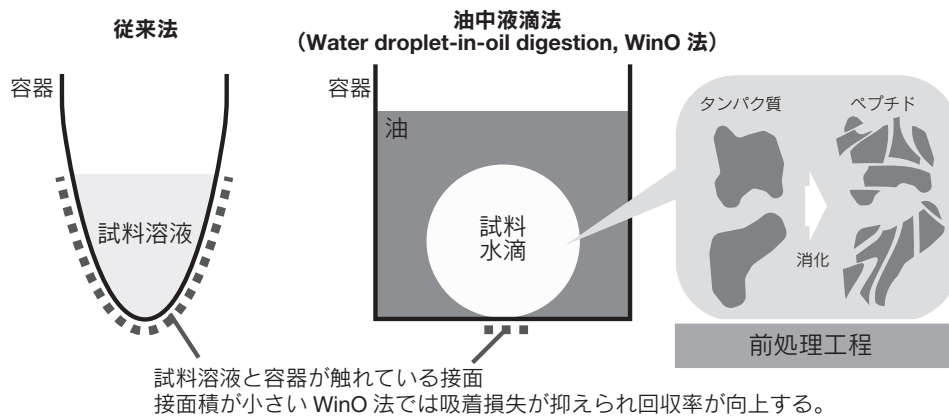


図3

いる。1細胞プロテオミクスにおける一般的な前処理方法の問題点は、1細胞から抽出した極微量のタンパク質が吸着損失してしまうことである（図3）。タンパク質は遺伝子のようにそれを鋳型に増幅することができないため、いかに損失することなくLC-MS/MSに導入するかが重要となる。1細胞プロテオミクスを可能とするために前処理方法がこれまでいくつか報告されている^{9) 10)}。1細胞プロテオミクスの前処理技術には高回収率でありマルチウェルプレートを用いて1度に複数の1細胞を同時に処理できることが求められる。さらに1細胞プロテオミクス研究領域の間口を広げるためには誰もが使用できるような簡便な手法が必要であり、開発した研究チームしか持っていないような特殊な装置を使わない技術が望ましいと筆者は考えている。筆者らはこれら要件を満たす前処理技術として油中液滴法（Water droplet-in-oil digestion, WinO）を開発した（図3）¹¹⁾。WinO法は油の中に形成した微小な水滴でプロテオミクスの前処理を行う方法である。WinO法では、試料溶液の形状が球体に近づきチューブとの接触面積が大幅に縮小し回収率が従来の消化方法に比べて10倍向上した。セルソーターで細胞をマルチウェルプレート中の油中液的に直接導入でき、液体ハンドリングロボットで前処理を行える。また、質量分析計で検出されたペプチドイオンの由来細胞を見分けられるタグとなる安定同位体標識試薬を用いることで最大16個の1細胞を混合して1回のLC-MS/MSでデータを取得できる。1個の細胞から約800種類のタンパク質を定量できるWinO法は1細胞プロテオミクスに有用な簡便な方法である。

4. その他のプロテオミクス技術とその利用

上述した技術以外にも、プロテオミクスはいろいろな前処理方法と組み合わせることで様々な用途に利用されてきている。例えば、抗体などを用いたアフィニティークラムにより標的を濃縮して、翻訳後修飾情報や相互作用情報を取得することができる。相互作用解析においては近年、近接依存的標識できる酵素を用いた方法が利用されている。標的タンパク質にTurboID¹²⁾やAPEX2¹³⁾などの近接依存的標識酵素をフュージョンさせて発現させることで、弱いもしくは短時間の相互作用タンパク質でも同定できるようになった。また、この方法は細胞内の標的タンパク質が局在している部位で標識が完了するため、標識後の試料調製時に相互作用してしまう偽陽性タンパク質を減らすことができることが大きな利点である。タンパク質-タンパク質相互作用以外にも、サーマルシフトアッセイと組み合わせることで、低分子化合物と相互作用するタンパク質候補を網羅的に同定することができる¹⁴⁾。サーマルシフトプロテオームプロファイリングは、低分子と相互作用するタンパク質の熱安定性が上昇することを利用して、熱変性温度が上昇したタンパク質を網羅的に探索する手法である。この

方法は培養細胞、血清や組織など幅広く応用可能されており、またサーマルシフトアッセイ方法を改良することで膜タンパク質と低分子化合物の相互作用解析にも用いられている^{15) 16)}。

5. 今後の展開

プロテオミクスの今後期待される展開として網羅的なプロテオフォーム解析手法の確立がある。同じ遺伝子から発現したとしても異なるプロセッシングを受けた多様なプロテオフォームが細胞内には存在する。プロテオフォームはタンパク質の機能を理解するうえで重要であるものの、プロテオミクスではペプチドまで断片化するためプロテオフォーム情報は失われてしまう。プロテオフォームを網羅的に解析するために、長いペプチドやタンパク質を測定できる前処理方法、質量分析方法やデータ解析手法の開発が重要になってくるだろう。また、大規模なプロテオームデータから生命現象を説明するために必要な解析手法の開発も今後期待される課題の一つである。遺伝子のノックアウトや薬剤投与など細胞に摂動を与えると多くのタンパク質の発現量が変動する。大規模なプロテオミクスデータから得られる数多くの変動タンパク質からどれを選ぶべきなのか迷ってしまうことは多々ある。プロテオミクスを行えば発生している生命現象を簡単に捉えられるわけではない。研究課題に沿ったタンパク質を候補群の中から絞り込む解析手段を充実させることでプロテオミクスデータの有用性がさらに向上すると期待している。

6. おわりに

20年前から考えると今のプロテオミクスは夢のようである。プロテオミクスのアプローチが多く、網羅性が高い方法もあれば1個の細胞からでもプロテオミクス情報を取得できる高感度な方法もある。このことを考えると、今のプロテオミクスにできないことでも数年後にはできるようになっている可能性は高く、プロテオミクスは生命科学研究にますます貢献できる分析技術となるだろう。本稿が生命科学研究者にとってプロテオミクスを積極的に利用していただくきっかけになることを期待している。

[参考文献]

- 1) M. Wilhelm, J. Schlegel, H. Hahne, A. M. Gholami, M. Lieberenz, M. M. Savitski, E. Ziegler, L. Butzmann, S. Gessulat, H. Marx, T. Mathieson, S. Lemeer, K. Schnatbaum, U. Reimer, H. Wenschuh, M. Mollenhauer, J. Slotta-Huspenina, J. H. Boese, M. Bantschke, A. Gerstmaier, F. Faerber, B. Kuster, *Nature*, **2014**, 509, 582-587.
- 2) K. Rezaul, L. Wu, V. Mayya, S. I. Hwang, D. Han, *Mol. Cell. Proteomics*, **2005**, 4, 169-181.
- 3) T. S. Batth, C. Francavilla, J. V. Olsen, *J. Proteome. Res.*, **2014**, 13, 6176-

6186.

- 4) M. Iwasaki, S. Miwa, T. Ikegami, M. Tomita, N. Tanaka, Y. Ishihama, *Anal. Chem.*, **2010**, 82, 2616-2620.
- 5) V. Demichev, C. B. Messner, S. I. Vernardis, K. S. Lilley, M. Ralser, *Nat. Methods*, **2020**, 17, 41-44.
- 6) Y. Kawashima, H. Nagai, R. Konno, M. Ishikawa, D. Nakajima, H. Sato, R. Nakamura, T. Furuyashiki, O. Ohara, *J. Proteome. Res.*, **2022**, 21, 1418-1427.
- 7) T. Masuda, N. Sugiyama, M. Tomita, Y. Ishihama, *Anal. Chem.*, **2011**, 83, 7698-7703.
- 8) R. D. Smith, Y. Shen, K. Tang, *Acc. Chem. Res.*, **2004**, 37, 269-278.
- 9) Y. Zhu, P. D. Piehowski, R. Zhao, J. Chen, Y. Shen, R. J. Moore, A. K. Shukla, V. A. Petyuk, M. Campbell-Thompson, C. E. Mathews, R. D. Smith, W. J. Qian, R. T. Kelly, *Nat. Commun.*, **2018**, 9, 882.
- 10) H. Specht, E. Emmott, A. A. Petelski, R. G. Huffman, D. H. Perlman, M. Serra, P. Kharchenko, A. Koller, N. Slavov, *Genome Biol.*, **2021**, 22, 50.
- 11) T. Masuda, Y. Inamori, A. Furukawa, M. Yamahiro, K. Momosaki, C. H. Chang, D. Kobayashi, H. Ohguchi, Y. Kawano, S. Ito, N. Araki, S. E. Ong, S. Ohtsuki, *Anal. Chem.*, **2022**, 94, 10329-10336.
- 12) K. F. Cho, T. C. Branon, N. D. Udeshi, S. A. Myers, S. A. Carr, A. Y. Ting, *Nat. Protoc.*, **2020**, 15, 3971-3999.
- 13) V. Hung, N. D. Udeshi, S. S. Lam, K. H. Loh, K. J. Cox, K. Pedram, S. A. Carr, A. Y. Ting, *Nat. Protoc.*, **2016**, 11, 456-475.
- 14) M. M. Savitski, F. B. Reinhard, H. Franken, T. Werner, M. F. Savitski, D. Eberhard, D. Martinez Molina, R. Jafari, R. B. Dovega, S. Klaeger, B. Kuster, P. Nordlund, M. Bantscheff, G. Drewes, *Science*, **2014**, 346, 1255784.
- 15) F. B. Reinhard, D. Eberhard, T. Werner, H. Franken, D. Childs, C. Doce, M. F. Savitski, W. Huber, M. Bantscheff, M. M. Savitski, G. Drewes, *Nat. Methods*, **2015**, 12, 1129-1131.
- 16) J. Perrin, T. Werner, N. Kurzawa, A. Rutkowska, D. D. Childs, M. Kalxdorf, D. Poedel, E. Stonehouse, K. Strohmmer, B. Heller, D. W. Thomson, J. Krause, I. Becher, H. C. Eberl, J. Vappiani, D. C. Sevin, C. E. Rau, H. Franken, W. Huber, M. Faelth-Savitski, M. M. Savitski, M. Bantscheff, G. Bergamini, *Nat. Biotechnol.*, **2020**, 38, 303-308.

[著者プロフィール]

氏名：増田 豪 (Takeshi Masuda)

所属：慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科 / 先端生命科学研究所

〒997-0017 山形県鶴岡市大宝寺日本国 403-1

TEL : 0235-29-0572

FAX : 0235-29-0536

E-mail : t-masuda.z3@keio.jp

出身大学：東京農業大学

学 位：博士 (生物産業学)

専門分野：プロテオミクス、分析化学

現在の研究テーマ：1 細胞プロテオミクス技術の開発とその利用、多発性骨髄腫の薬剤耐性機構解明

氏名：大槻 純男 (Sumio Ohtsuki)

所属：熊本大学大学院生命科学研究部

〒862-0973 熊本県熊本市中央区大江本町 5-1

TEL: 096-371-4323

FAX: 096-371-4329

E-mail : sohtsuki@kumamoto-u.ac.jp

出身大学：東京大学

学 位：博士 (薬学)

専門分野：プロテオミクス、生物薬剤学

現在の研究テーマ：DIA プロテオミクス開発と血液脳関門の機能解明

編集部注

増田豪先生は執筆当時 (2023 年 3 月)、熊本大学大学院生命科学研究部・薬学系に在籍されていました。

学会展示のご案内

●第 22 回 ミトコンドリア学会

会期：2023 年 11 月 14 日 (火) ~ 15 日 (水)

会場：つくば国際会議場

●第 46 回 日本分子生物学会年会

会期：2023 年 12 月 6 日 (水) ~ 8 日 (金)

会場：神戸ポートアイランド

展示ブースにて小社担当者がお待ちしております。ぜひお立ち寄りください。

細胞機能解析冊子リニューアル



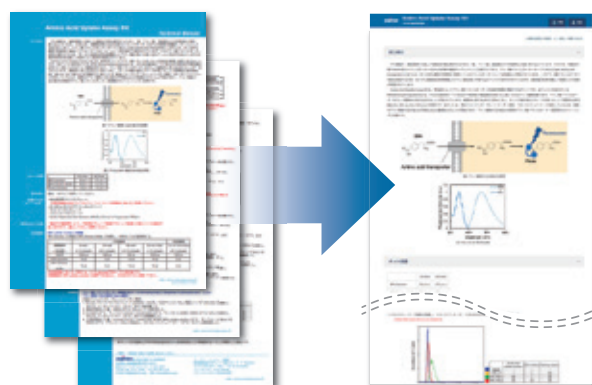
オルガネラや細胞内代謝など、細胞機能解析の製品 (100 製品以上) を集めた冊子「細胞機能解析」は大変ご好評をいただき、第 5 版を発行いたしました。Web からご覧いただけます。紙媒体でご希望の方は販売店様、お問い合わせよりご請求ください。



細胞機能解析 同仁 検索

製品取扱説明書 変更のお知らせ

取扱説明書が PDF 版ダウンロードから Web 版へリニューアルします。*



PDF ダウンロード版

Web 版

- ・全てのデバイスからダウンロード不要で閲覧いただけます。
- ・操作手順など必要な部分だけを選んで印刷ができます。
- ・製品ページの「よくあるご質問」や「論文情報」へアクセスしやすくなります。(印刷時は、製品ページへの QR コードが記載されます)

* 内容に変更はございません。

* 取扱説明書のある全製品へ順次変更いたします。

連載

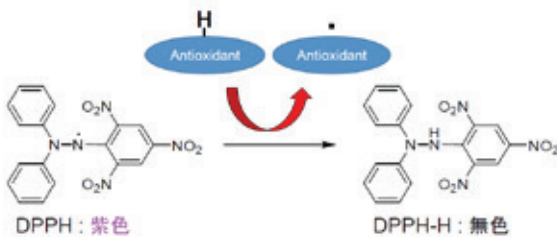
抗酸化キットを使う前のサンプル前処理法 〈第2回〉

株式会社同仁グローバル 山口 勝則

今号では、DPPH 測定キットの前処理について進めていきます。

3. DPPH 法について

DPPH 法は、抗酸化能測定法の中で最も簡便な手法と言えます。DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) は、化合物自体が紫色 ($\lambda_{\max} = 517 \text{ nm}$) のラジカル物質でありながら比較的安定であるため、固体の DPPH をエタノール等の溶剤で溶解するだけで使用できます。DPPH 法に類似した測定方法は ABTS 法などがありますが、ラジカル物質が DPPH 程安定ではないため、酸化剤を用いてラジカル物質を用時調製する必要があります。



DPPH 法は、試薬調製が簡便であるため、操作によるバラツキや誤操作のリスクが小さいと考えることができます。しかしながら、実際の試料で測定を行った場合、データの再現性が良くなかったり、文献等とデータが整合しなかったりする事例が多いようです。その理由を考えると、試料の前処理（目的成分の抽出）方法による要因が大きいと考えられます。

試料の前処理の基本的な流れは、①試料の選定、②抽出溶媒、緩衝剤の選定、③試料の破碎、④試料の抽出、⑤除タンパク、不溶物の除去、になり、プロセス毎に測定値の差異が生じる要因を挙げていきます。

①試料の選定

同じ試料であっても、品種、産地、熟成の程度等により、構成成分に差があり、当然、個体差もあるので、できるだけ標準的なものを選定することが望ましいです。

②抽出溶媒、緩衝剤の選定

溶媒の種類については、エタノールやメタノールのアルコール類が通常使用されますが、アルコール類以外の溶剤では抗酸化能は低下する傾向にあります。また、緩衝剤では、PBS 等のリン酸塩よりも Tris-HCl 系の方が高い活性を示し、さらに Tris 濃度にも依存する傾向がみられます。これらの点は、抗酸化物質のフェノール性水酸基 (-OH) の電子移動に溶媒のアルコールや緩衝剤の Tris の複数の隣接した水酸基が関与していると考えられています¹⁾。そのため、再現性が必要な場合、溶媒や緩衝液組成を厳密に合わせる必要があります。

溶媒にケトン類（アセトン）やエステル類、エーテル類等の疎水性溶剤を用いる場合、疎水性の抗酸化成分の抽出に有効ですが、測定に使用する透明のウェル（通常、ポリスチレン製）が白濁して測定に支障が出る場合があるので、アルコール系以外の溶媒を用いる場合は、事前に確認しておくことが良いです。

③試料の破碎

生体試料の場合、細胞が破壊されると、分解酵素や酸化酵素、等が放出され、自己分解が進み劣化します。野菜や果物の切り口の褐変、魚の切り身の溶解がその一例です。

試料の破碎時、破碎後の自己分解を抑えるためには、より低温で操作するのが望ましいです。冷却方法としては、氷冷しながら

ホモジナイズというのが一般的ですが、場合によっては液体窒素で凍結させて破碎するというのも有効です。

また、一見乱暴に見えますが、分解酵素の影響を考えると、熱処理を行うのも酵素の影響を考えれば有効な手段の1つです。ただし、加熱すれば、ビタミン C がかなり失われるので、肉類のようにビタミン C をあまり含有しない試料やビタミン C の関与を想定しない場合は有効です。

また、酸化防止の目的で、2-ME や DTT の還元剤を使用する場合がありますが、DPPH 法では影響するので使用は避けるべきです。塩濃度やキレート剤によって酵素活性を抑えられるものもありますが、DPPH 法は高濃度のエタノール溶媒中で行うため、不溶物の析出が懸念されるので避けるべきです。

④試料の抽出

破碎後に所定の溶媒条件で抽出を行います。アルコール等の溶剤を必要量加えてドライアイスや液体窒素で冷却しながらホモジナイズすることで、分解酵素の活性を低下させ、凍結せず氷点下で処理でき、試料の劣化を抑えられる方法もあります。DPPH は水分を 50% 以下で維持しないと不溶化するので高濃度のアルコール溶液として抽出しますが、抽出時のアルコール濃度により親水性物質と疎水性物質の回収率のバランスが変化するので、条件は厳密に合わせる必要があります。

⑤除タンパク、不溶物の除去

DPPH 法の場合、酵素による抗酸化能は関与しないので、DPPH が吸着する等して測定に支障をきたす恐れのあるタンパク質や濁りの原因になる不溶成分は、極力除去しておきたいところです。

遠心分離後にメンブランフィルター等で濾過して不溶物を除去するのは吸光度を正確に測定するため有効ですが、試料の粘性や溶媒の種類によっては濾過が困難な場合があるので、遠心分離後の上澄みの濁りが許容範囲なら濾過操作は省略できます。

【DPPH の反応性について】

DPPH が疎水性であるため、親水性のビタミン C 等より、ビタミン E 等の疎水性成分との相性が良いと考えられます。

そのため、試料を前処理する際は疎水性成分が主体になりがちですが、抗酸化能の評価試験の場合、定量分析的な物質に比例する化学反応ではなく、反応して酸化した抗酸化物質が他の抗酸化物質や還元剤によって再生される仕組み²⁾があることで、より複雑な様相となってしまいます。

生体試料の場合、抗酸化物質の他に多数の生体由来成分があり、それ自体が DPPH と直接反応しなくても、酸化されたビタミン E 等を還元して元の状態に戻す反応を媒介する成分が含まれることで、ビタミン E の含有量以上の抗酸化能を示すことができます。α-リポ酸等の両親媒性の抗酸化物質、界面活性剤やシクロデキストリン等の安定化剤によって抽出効率や反応性に差が生じます。

【まとめ】

DPPH 法は、測定操作が簡便な一方で、疎水性の抗酸化成分が主な対象となるため、使用する溶剤、緩衝剤、抽出条件等で影響を及ぼす因子が多くなり、高い再現性を求める場合は、これらの条件を厳密に合わせる必要があります。

【参考文献】

- 山内良子, " 酸化防止剤力価評価を目的とした DPPH ラジカル消去におよぼす反応溶媒の影響 ", 日本食品保蔵科学会誌, 2016, 42 (5).
- 平原文子, " ビタミン E と抗酸化性 ", 栄養学雑誌, 1994, 52 (4), 205-206.

関連製品

DPPH 抗酸化能測定キット

DPPH Antioxidant Assay Kit

<特長>

- ・試薬調製の手間を大幅に低減
- ・データの再現性が高い
- ・多検体処理が可能

高知大学の島村らは、測定施設間差の少ない抗酸化活性評価法として DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) を用いた測定法を報告しています¹⁾。本製品はこの測定法に準拠したマイクロプレート法による評価キットです。

本製品は高知大学農林海洋科学部農芸化学科島村智子先生のご指導の下、製品化しました。

1) T. Shimamura et al., *Anal. Sci.*, **2014**, 30, 717-721

① 一定品質の試薬

測定結果に大きく影響する DPPH の純度と含量を一定品質で提供いたします。

② 最適化された測定条件

測定時の pH や溶媒が抗酸化能の測定誤差となります。影響因子を排除した最適化マニュアルを用意しました。

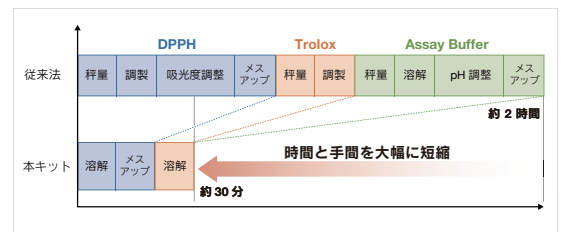
③ 標準物質との比較で算出

日間・施設間差の問題を Trolox を基準とした評価 (TEAC) 法により大幅に改善しました。

① 一定品質の試薬

DPPH および Trolox は溶液状態で不安定なため用時調製が必要ですが、特に測定に影響を与える DPPH は、吸光度による含量確認まで行う必要があり、試薬調製には長い時間を要していました。本キットでは測定に必要な試薬が小分けされており、測定前の簡単な準備で、すぐに実験を開始できます。

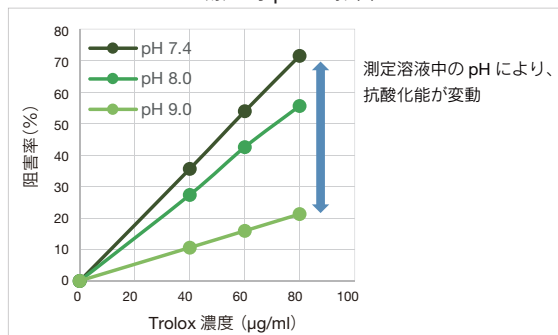
*DPPH の溶解操作には超音波洗浄機が必要です。



② 最適化された測定条件

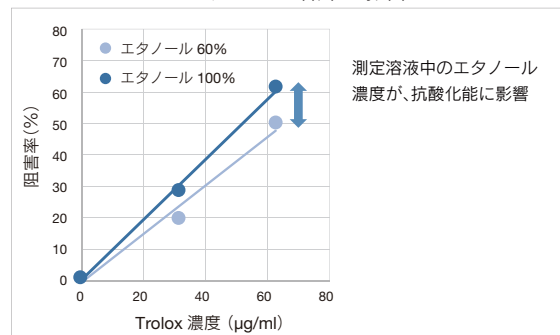
これまで施設間差や日間差によるデータの再現性の低さが問題となっていました。本キットでは、試薬品質、プロトコル、解析法を吟味することで、バラツキの抑えられた再現性の高いデータを得ることができるようになりました。

<測定時 pH の影響>



製品添付の Assay Buffer により、一定の pH で測定が行えます。

<サンプル溶媒の影響>



サンプル量を反応液全体の 1/10 (20 μl) に規定し、サンプルを水やエタノールに溶解しても測定値に差が出ないように最適化しています。

③ 標準物質との比較で算出

サンプルの抗酸化能を IC₅₀ 値のみで解析すると、僅かな測定条件の差でデータがばらつきます。標準物質 (Trolox) をサンプルと同時に測定し、抗酸化能を Trolox 等価活性値 (TEAC) として算出することで、再現性の高い測定値が得られます。

$$\text{TEAC } (\mu\text{g TE}/\mu\text{g}) = \text{Trolox IC}_{50} \text{ } (\mu\text{g/ml}) / \text{Sample IC}_{50} \text{ } (\mu\text{g/ml})$$

<標準物質との比較>

	アスコルビン酸		Trolox
	IC ₅₀ (μg/ml)	TEAC (μg TE/μg)	IC ₅₀ (μg/ml)
測定 1	37.24	1.42	52.98
測定 2	39.75	1.44	57.42
測定 3	48.22	1.47	70.95

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
DPPH Antioxidant Assay Kit	100 tests	7,100	D678
	500 tests	21,000	

バイオフィーム関連製品

バイオフィーム形成量・形成阻害測定キット

Biofilm Formation Assay Kit

バイオフィーム形成量の測定に最適

既存法ではマイクロプレートの底にバイオフィームが形成するため、培地交換や洗浄作業の手間、剥離しやすさによる測定値のバラツキが課題でした。本製品は蓋に固定されたピン上にバイオフィームを形成させるため、手間なくバラツキの少ないデータが得られます。



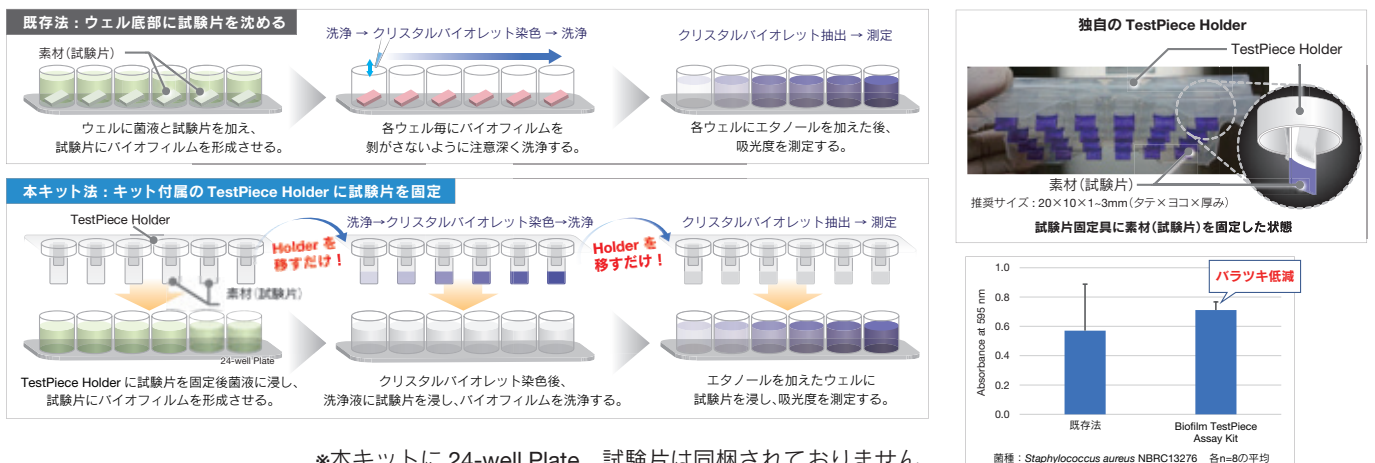
品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Biofilm Formation Assay Kit	96 tests	17,400	B601

試験片用バイオフィーム形成能測定キット

Biofilm TestPiece Assay Kit

材質へのバイオフィーム形成評価に最適

本キットはクリスタルバイオレット染色法により、素材毎のバイオフィーム形成量の違いを測定することができます。任意の素材を固定できる独自開発の蓋 (TestPiece Holder) を使用することで、洗浄・染色操作によりバイオフィームが剥がれることなく、複数サンプルを簡便に測定することが可能です。また、水に浮くような浮力の高い素材に対しても TestPiece Holder で固定することで、他の素材と同様に評価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
Biofilm TestPiece Assay Kit	24 tests	26,800	B606

これから始める
バイオフィーム検出



小社 Web ではバイオフィームの基礎から、キットの選択ガイドまでお役立ち情報を掲載しています。

バイオフィーム検出 同仁 検索

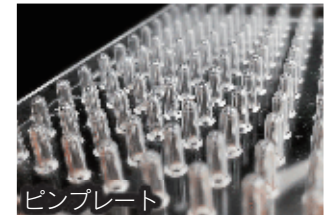
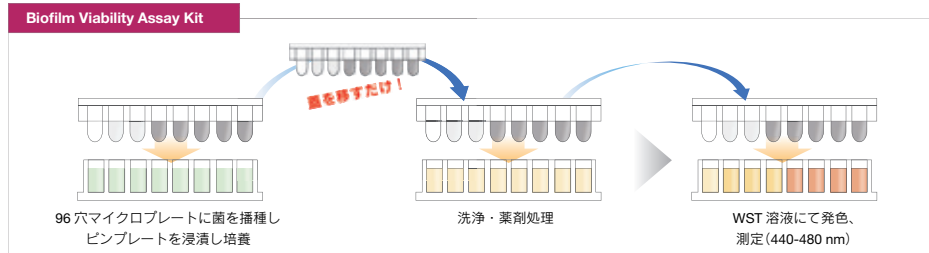
バイオフィーム薬剤効果測定キット

Biofilm Viability Assay Kit

バイオフィーム内の生菌の代謝活性測定に最適

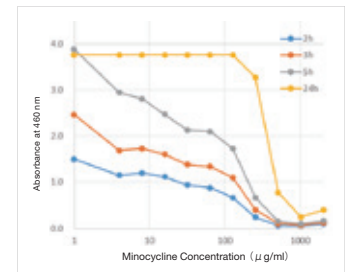
本キットはピンプレートに形成*させたバイオフィーム内の生菌の代謝活性を測定することで、バイオフィーム内微生物に対する薬剤効果を確認するキットです。エネルギー代謝の補酵素の1つであるNAD(P)Hは電子メディエーターを介してWST色素を橙色へと発色させます。この発色の程度により微生物の代謝活性を検出します。ピンは蓋に固定されているため、洗浄・発色操作によりバイオフィームが剥がれることなく、多検体を簡便にバラツキを押さえて測定することが可能です。

*本キットご利用前にピンプレートへのバイオフィーム形成条件をご検討ください。



<測定例>

バイオフィームに対するMBEC (Minimum Biofilm Eradication Concentrations、最小バイオフィーム撲滅濃度) が指標として用いられています。Minocycline の *S. aureus* バイオフィームに対する薬剤効果を本キットにて測定しました。その結果、MBEC が約 1000 $\mu\text{g/ml}$ であることが確認できました (右図)。



品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Biofilm Viability Assay Kit	96 tests	20,000	B603

微生物増殖アッセイキット

Microbial Viability Assay Kit-WST

菌種毎と使用論文を掲載しています。

M439 同仁

検索

<特長>

- ・評価にかかる時間を大幅に短縮
- ・生菌の活性評価を濁度から色の変化へ

本キットに含まれる小社の開発品である還元発色剤 WST-8 は、電子メディエーターを介して微生物内で生成するNAD(P)Hによって還元され発色します。還元されたWST-8ホルマザン量は微生物の代謝活性に比例しており、吸光度を測定することで、微生物の生存率や活性度合いを簡便に測定することができます。

<操作>

96 well プレートに菌懸濁液を準備し、試薬を添加する。



<従来法との比較> *菌種によって最適条件は異なります。

	従来法		本方法
	コロニー形成法	濁度法	WST 法
所要時間	24 時間以上	18-24 時間	約 8 時間 (培養 6 時間 発色 2 時間)
特徴	・標準法 ・操作が煩雑	・マイクロプレートアッセイが可能 ・代謝活性は見えない	・短時間でのマイクロプレートアッセイが可能 ・代謝活性を指標とする

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Microbial Viability Assay Kit-WST	100 tests	6,800	M439
	500 tests	24,200	

* 14、15 ページに掲載の 4 製品は、福岡県工業技術センター生物食品研究所との共同開発品です。

製品紹介

細菌二重染色キット

- Bacstain- Bacterial Viability Detection Kit-DAPI/PI
- Bacstain- Bacterial Viability Detection Kit-CTC/DAPI
- Bacstain- Bacterial Viability Detection Kit-CFDA/PI

<特長>

- ・蛍光二重染色に最適化したプロトコルで試薬を添加するだけ
- ・複数の指標で薬剤効果や菌の状態を評価できる
- ・培地法と比較して評価にかかる時間を大幅に短縮できる

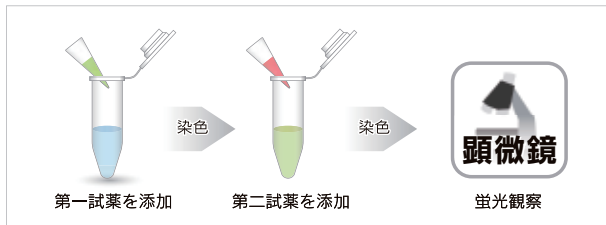
細菌に対する抗菌剤等の効果を評価する場合、培養法によるコロニー形成単位(CFU)の確認や蛍光染色試薬を用いた多重染色法による評価が広く用いられています。近年では特に感染症における薬剤耐性菌の出現や損傷菌が引き起こす食中毒等の問題を受けて、これまで一般的に行われてきた単一指標ではなく、抗菌性評価の信頼性向上を目的として、複数の指標で薬剤等の抗菌性を評価する必要性が高まっています。

また、日本国内では食品を扱う全事業者に対して HACCP(危害分析重要管理点)に沿った衛生管理が制度化されたことから、特に飲食料品の製造分野では菌検査の簡素化ならびに迅速化の需要が高まっています。

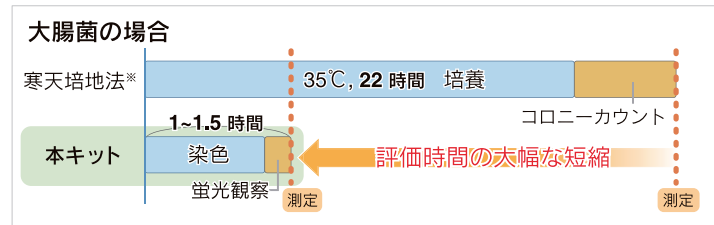
このような方におススメします！

- ☑これから蛍光染色法による実験を始めたい！
- ☑培養法で判定している検査を迅速化したい！
- ☑損傷菌や VNC 菌を検出したい！
- ☑菌に対する薬剤効果を正確かつ簡便に評価したい！

試薬を添加するだけの簡単操作



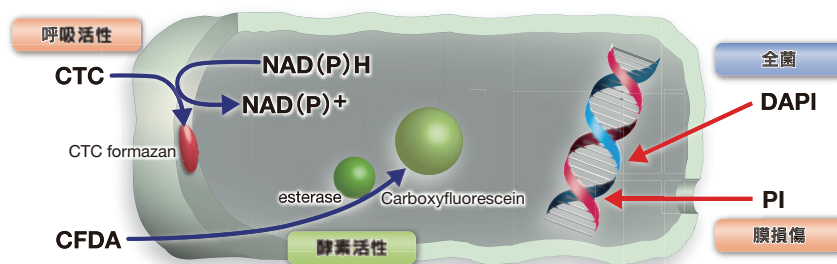
評価にかかる時間を大幅に短縮



※微生物の増殖能力によって時間は異なります。

蛍光染色法による細菌の生死判定などによく用いられる膜損傷の有無を指標とした蛍光染色に加え、-Bacstain- Bacterial Viability Detection Kit シリーズでは複数の指標を選んで染め分けすることができるため、細菌の状態を様々な視点から評価できます。

検出対象	全菌	膜損傷	呼吸活性	酵素活性
-Bacstain- Bacterial Viability Detection Kit-DAPI/PI	✓	✓		
-Bacstain- Bacterial Viability Detection Kit-CTC/DAPI	✓		✓	
-Bacstain- Bacterial Viability Detection Kit-CFDA/PI		✓		✓



品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
-Bacstain- Bacterial Viability Detection Kit-DAPI/PI	1 set	21,400	BS08
-Bacstain- Bacterial Viability Detection Kit-CTC/DAPI	1 set	38,500	BS09
-Bacstain- Bacterial Viability Detection Kit-CFDA/PI	1 set	38,500	BS10

※<使用回数の目安>1 setあたり、約 100 検体分

知ろう! 学ぼう!
これからはじめる微生物実験



小社 Web では微生物の基礎から、
キットの選択ガイドまでお役立ち情報を掲載しています。

微生物実験 同仁

検索

ーアプリケーション紹介ー

活性化マクロファージにおける ROS 産生のライブセルハイコンテンツイメージング

免疫細胞は、炎症反応により異物を分解して体を正常に保つ役割を果たしています。一方で、過剰な炎症は様々な疾病を引き起こす要因となることから、ミトコンドリアで生産される ROS (Reactive Oxygen Species) を指標にして抗炎症薬のスクリーニングが行われています。ここでは、小社製品を使った ROS 産生のライブセルハイコンテンツイメージングのアプリケーションをご紹介します。

<実験>

Lipopolysaccharide (LPS) 刺激によって誘発される ROS 産生を評価しました。ROS の検出には、ROS Assay Kit -Photo-oxidation Resistant DCFH-DA- (メーカーコード：R253) を用い、ニコン倒立顕微鏡 (Ti2-E) にて細胞の形態と ROS の産生、細胞あたりの ROS の変化を経時的に測定しました。

<結果>

・細胞形態の観察と細胞数の測定

LPS 刺激により細胞あたりの細胞面積が増加しました (図 1A)。また、コントロール細胞よりも細胞数の増加が抑制される結果が得られました (図 1B)。

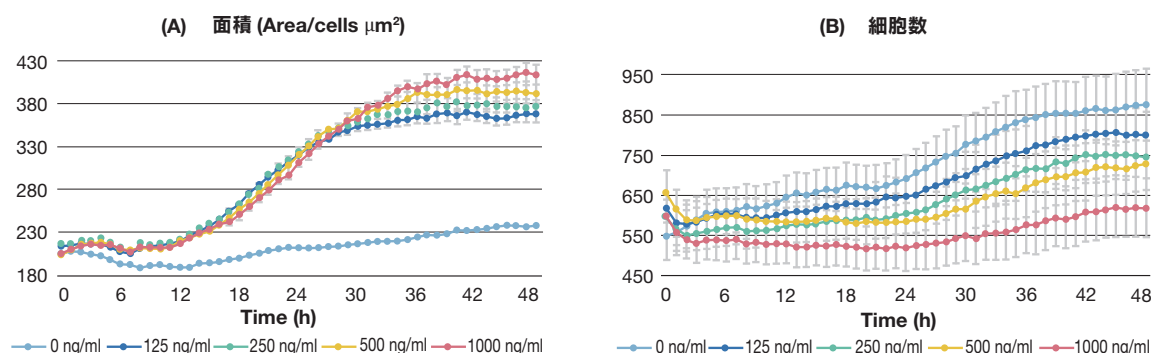


図 1. LPS 添加後の細胞数と細胞あたりの細胞面積の変化

・ROS の検出

視野全体の細胞数を測定し細胞あたりの蛍光強度を算出すると、21 時間後では LPS 濃度が高いほど細胞あたりの ROS 産生量が増加しました*。さらにタイムラプス画像による解析では、細胞分裂による細胞数の増加、マクロファージの貪食による細胞数の減少や ROS の増加を確認しました (図 2)。

既存の試薬では励起光による色素の自動酸化や再現性に課題がありましたが、小社キットではこれらの課題を解決することで、長時間 (48時間) にわたる ROS の経時的な検出が可能となり、低いバックグラウンドで細胞内に色素が結合するため精度の高く再現性の高い解析が可能になりました。

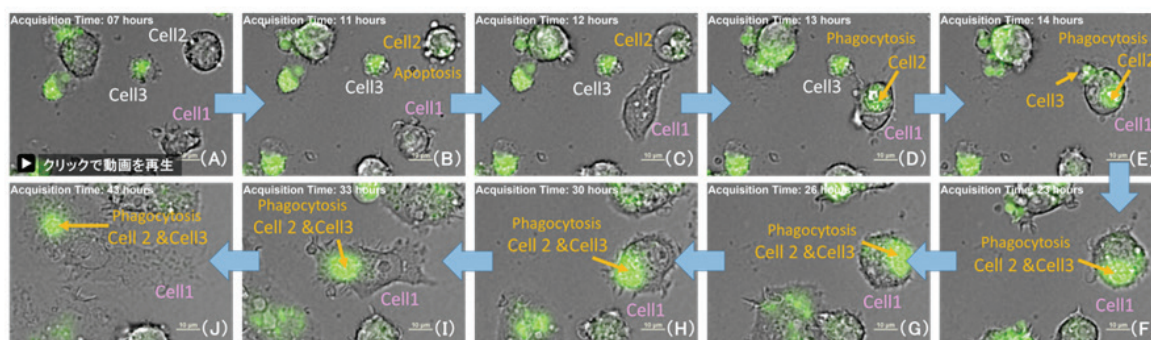


図 2. 活性化マクロファージによる死細胞のファゴサイトーシス

LPS 500 ng/ml を添加したウェルのタイムラプス画像。緑:ROS, Scale bar: 10 μm 。Cell2 はアポトーシスを起こし (B)、1 時間後に死細胞の形態を示した (C)。Cell1 は死滅した Cell2 と Cell3 を貪食し、ROS を増加させた (C-F)

<使用装置>

ハイコンテンツアナリシス (HCA) 顕微鏡システム (株式会社ニコン)

*染色操作と解析法の詳細は、株式会社ニコン「APPLICATION NOTE: 活性化マクロファージにおける ROS 生産のライブセルハイコンテンツイメージング」よりご覧いただけます。

マクロファージの貪食過程の ROS をモニタリング

*詳しいデータやライブ動画は、小社 HP の製品ページよりご覧いただけます。

R253 同仁

検索

品名	容量	希望納入価格 (¥)	メーカーコード
ROS Assay Kit -Photo-oxidation Resistant DCFH-DA-	100 tests	36,000	R253



33rd Forum in DOJIN

相分離メガネで見る 非膜オルガネラの ダイナミクス

～ザ・相分離生物学ビッグバン～

Program

9:30～9:35 主催者挨拶 上野 右一郎 (株同仁化学研究所)
9:35～9:45 世話人挨拶 富澤 一仁 (熊本大学大学院 生命科学研究部 分子生理学講座・教授)

Session 1 座長 富澤 一仁 (熊本大学大学院 生命科学研究部 分子生理学講座・教授)

9:45～10:45 「Overview タンパク質の凝集と相分離:
産業的な課題の解決へ」
白木 賢太郎 (筑波大学 数理物質系・教授)
10:45～11:30 「神経変性疾患変異による low-complexity
ドメインの相転移・相分離異常の分子メカニズム」
加藤 昌人 (University of Texas Southwestern Medical Center・Professor)
11:30～12:15 「RNA が誘発する細胞内相分離の分子機構と機能」
廣瀬 哲郎 (大阪大学大学院 生命機能研究科・教授)
12:15～13:30 ランチブレイク 12:45～13:15 ランチョンセミナー (株同仁化学研究所 平川 哲央)

Session 2 座長 三隅 将吾 (熊本大学大学院 生命科学研究部附属グローバル天然物科学研究センター 環境分子保健学研究室・教授)

13:30～14:15 「神経生物学における RNA グアニン四重鎖の相分離」
塩田 倫史 (熊本大学 発生医学研究所・教授)
14:15～15:00 「生殖細胞特異的な非膜オルガネラ・ヌアージュの構造と機能」
甲斐 歳恵 (大阪大学大学院 生命機能研究科・教授)
15:00～15:15 コーヒーブレイク
15:15～16:00 「電荷ブロック駆動型液-液相分離とリン酸化による制御機構の解明」
吉村 成弘 (京都大学大学院 生命科学研究科・准教授)
16:00～16:45 「液-液相分離によるオートファジー制御」
藤岡 優子 (北海道大学 遺伝子病制御研究所・准教授)
16:45～17:00 閉会の挨拶 三隅 将吾 (熊本大学大学院 生命科学研究部附属グローバル天然物科学研究センター 環境分子保健学研究室・教授)

※講演の順番・時間に関しては変更となる場合がございます。

日時

2023.10.27 [金]
9:30 ~ 17:00

[オンライン開催:参加無料]



主催 (株)同仁化学研究所 後援 (株)ケミカル同仁

お問い合わせ 〒861-2202 熊本県上益城郡益城町田原2025-5 株同仁化学研究所内「フォーラム・イン・ドージン事務局」(担当:高橋)
Tel:0120-489548 Fax:0120-021557



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
がんと代謝