

がんと代謝

総説

がんと代謝 ~多細胞連関からオルガネラレベルの解像度での解析を目指して~

Cancer Metabolism ~understanding cell-cell to organelle-organelle metabolic interactions~

東京大学 大澤 毅

生命科学の最前線 ~熊本大学若手研究者の現場から~

動的構造解析による酵素反応機構の解明

Structural dynamics in enzymatic reaction

熊本大学 中村 照也

注目の研究

低酸素下におけるミトコンドリア-リソソーム間相互作用

株式会社同仁化学研究所 小松 恭佳

連載

抗酸化キットを使う前のサンプル前処理法〈第3回〉

P.14



CONTENTS

Review

がんと代謝 ~多細胞連関からオルガネラレベルの解像度での解析を目指して~

Cancer Metabolism ~understanding cell-cell to organelle-organelle metabolic interactions~

東京大学 大澤 毅

1

Topics on Chemistry

低酸素下におけるミトコンドリア-リソソーム間相互作用

株式会社同仁化学研究所 小松 恭佳

9

Review

動的構造解析による酵素反応機構の解明

Structural dynamics in enzymatic reaction

熊本大学 中村 照也

11

連載

抗酸化キットを使う前のサンプル前処理法 〈第3回〉

株式会社同仁グローバル 山口 勝則

14

Commercial

細胞内代謝関連製品	6
酸素消費プレートアッセイキット	8
細胞数ノーマライゼーションキット	8
リソソーム染色試薬	10
リソソームpH検出試薬	10
リソソームpH検出キット	10
抗酸化能測定キット	15
脂質過酸化関連製品	16
バイオフィルム関連製品	17

お役立ち

「食品機能評価 微生物検出」冊子リニューアル 11

抗酸化能セミナー アーカイブのご案内 16



表紙:小国町 鍋ヶ滝

冬場にマイナス5度以下が約1週間続くと滝にツララが現れる。その季節を待って撮影に出かけた。滝の裏側に廻って岩の中からツララを撮影した。

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。

がん代謝 ~多細胞連関からオルガネラレベルの解像度での解析を目指して~
Cancer Metabolism ~understanding cell-cell to organelle-organelle metabolic interactions~



大澤 毅

東京大学
先端科学技術研究センター
准教授

Abstract

Recently, integrative multi-omics analyses that link organs, cells and even organelles has been extensively studied and are attracting attention. In solid tumors, because of microenvironments such as hypoxia, malnutrition, and acidic pH caused by impaired vascular structures, cancer cells promote metastasis and invasiveness contributing resistance to chemotherapy and poor prognosis. Not only changes in the omics of cancer cells themselves, but also interactions between cells and organelles play an important role in cancer malignancy, attention as a target. Therefore, in this review, I would like to provide an overview from the perspective of multi-omics analysis that links cells, multicellular spaces, and organelles, which can be the essential cause of diseases such as cancer.

1. はじめに

近年、疾患生物学研究において、臓器間や細胞間を連関するオミクス統合解析が盛んに行われている。また最近では、疾患オミクス解析がオルガネラレベルの解像度で明らかになってきており注目を浴びている。固形がんでは、不完全な血管構築や血流不全により生じる低酸素、低栄養、低 pH などのがん微小環境が存在し、エピゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームなど様々な階層のオミクス変動を介して、転移・浸潤能などを促進し、治療抵抗性や再発・転移などにより、予後不良のがん悪性化に寄与することが知られてきた。この粗悪ながん微小環境では、がん細胞自身のオミクス変動のみならず、細胞間の相互作用やオルガネラ間の相互作用もがん悪性化に重要な役割を果たすため、オルガネラ制御が新しい癌治療標的として注目を集めている。そこで本項では、がんなど疾患の本質的な原因となり得る細胞—多細胞間—オルガネラ間を連関するマルチオミクス解析の視点から概説したい。

2. がん代謝研究におけるマルチオミクス研究の必要性

がんや生活習慣病などの克服には、多階層オミクスを統合した疾患の病態解明から治療戦略の確立が重要と考えられる。がん組織内には、酸素や栄養状況が時空間的に変化するがん微小環境に起因する細胞不均一性（ヘテロジェナイティー）が存在する。固形がんでは、不完全な血管構築や血流不全により生じる低酸素、低栄養、低 pH などのがん微小環境が、細胞間の相互作用やオルガネラ間の相互作用を介して、エピゲノム、遺伝子発現、タンパク質の相互作用、エネルギー代謝変動など、各階層における膨大な多次元要素が有機的に繋がって、がん細胞の転移や浸潤能の促進を引き起こし、がんの悪性化に寄与することが知られている。また、このような粗悪ながん微小環境に適応したがん細胞は、しばしば細胞死耐性を獲得し、免疫寛容や薬剤耐性を示すことで再発や患者の予後不良に関与することが報告されている。このことから、酸素や栄養の供給が不足したがん微小環境で生存するがん細胞に対する創薬標的を探索することが重要であると考えられる。本総説では、近年一般的になってきた、エピゲノム、トランスクリプトーム、メタボロームのマルチオミクス解析から新たに見えてきた、粗悪ながん微小環境で中心的な役割を果たす細胞—多細胞—オルガネラレベルのマルチオミクス解析の視点から最近の知見を紹介したい。

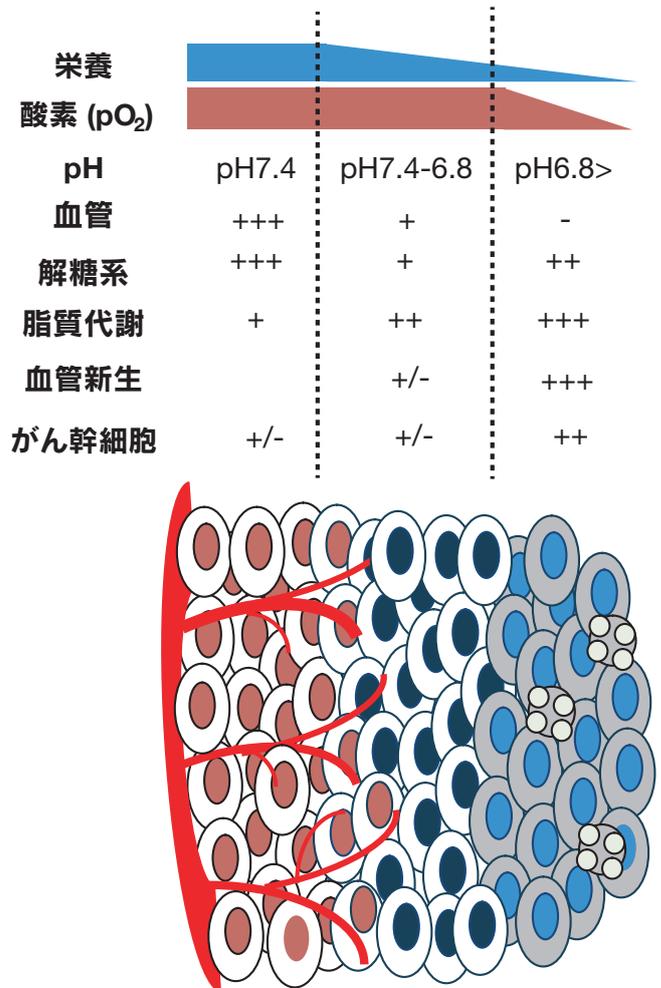


図1 不完全な血管網の構築により腫瘍微小環境が確立される

栄養素と酸素は、血管から遠く離れた細胞に利用できない。ワールブルグ効果としても知られる解糖系の亢進は、乳酸を排出により微小環境の pH を酸性にします。脂質代謝は、低栄養で亢進される可能性がある。極端な微小環境におけるがん細胞特異的な代謝変化は、がんの幹細胞性の維持、血管新生の誘導、および転移にも関与する。

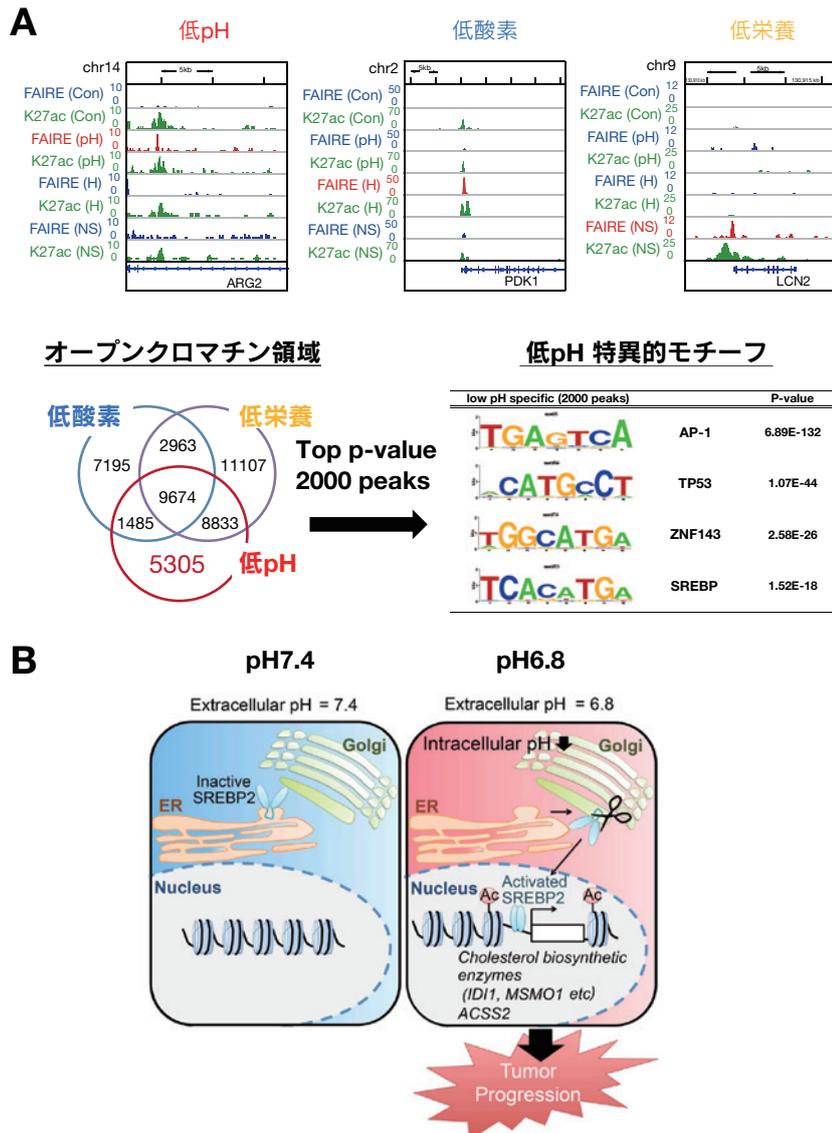


図2 がん微小環境に対するエピゲノム・代謝調節機構

(A) がん微小環境における、低 pH (pH)・低酸素 (H)・低栄養 (NS) では、異なったエピゲノム状態 (ヒストン修飾 (活性化遺伝子 H3K27Ac) 及び、ヌクレオソームフリーな (FAIRE)) の遺伝子が存在する。(B) 通常状態 (左、細胞外 pH 7.4) では、SREBP2 は ER (小胞体) に局在し不活性型である。低 pH 環境にがん細胞が陥ると (右、細胞外 pH 6.8)、細胞内の pH が低下し、SREBP2 がゴルジ体を經由して核内に移行し活性化する。その結果、コレステロール合成や酢酸代謝に関連する酵素群の発現を誘導することで、がんの生存や進展に寄与する。

3.1 オミクス統合解析からみたがん細胞の悪性化機構

正常細胞と比べてがん細胞では解糖系に依存した代謝に変化することが古くから知られている。オット・ワーブルグ博士 (1883-1970) により 1920 年代に提唱された有名な事象であるが¹⁾、酸素の有無に関わらずがん細胞は、エネルギー産生としては非効率な経路 (酸化的リン酸化が 1 分子のグルコースから 38ATP 産生するのに対し、解糖系からは 2ATP しか産生しない) である解糖系を中心的に利用するというものである。また、増殖期や低酸素のがん細胞において解糖系は、主要なエネルギー産生系であり、さらに、解糖系から核酸合成、アミノ酸合成、タンパク合成、細胞膜合成など細胞増殖のために必要な分子が制御される。また、グルタミン (グルタミノリシス) やロイシン、イソロイシン、リジンなどの分岐鎖アミノ酸 (BCAA) を利用した経路が、がん幹細胞維持に重要であるということが注目されている^{2) 3)}。また、増殖期の細胞における解糖系の亢進は、低酸素で活性化する HIF1a を介した一連の解糖系酵素群の発現誘導 (転写制御) や、

低酸素応答性ヒストンメチル化・脱メチル化酵素群 (エピゲノム制御) が関与していることが報告されている。さらに、最近では、タンパク質のリン酸化や複合体形成のみならず、RNA 修飾や RNA-タンパク質の結合を介したエピトランスクリプトーム制御が⁴⁾、増殖期のがん細胞における多階層オミクスが解糖系を制御することが報告されている。

これまで単なる低酸素や解糖系の結果として考えられてきた低 pH がん微小環境においても、酢酸代謝の中心代謝酵素である ACSS2 が発現誘導されることを明らかにした^{5) 6)}。我々の研究グループは、がんにおける酸性状態を模した培養系を用い、がん細胞に対しトランスクリプトーム、エピゲノムなどのオミクス統合解析を行なった。その結果、コレステロール代謝におけるマスターレギュレーターとして知られる SREBP2 を、低 pH で機能する転写因子として見出した⁷⁾ (図 2)。マルチオミクス解析が一般化されつつある現在、これまで知られていない多次元を連関するフィードバック制御機構が次々と発見されることが期待できる。

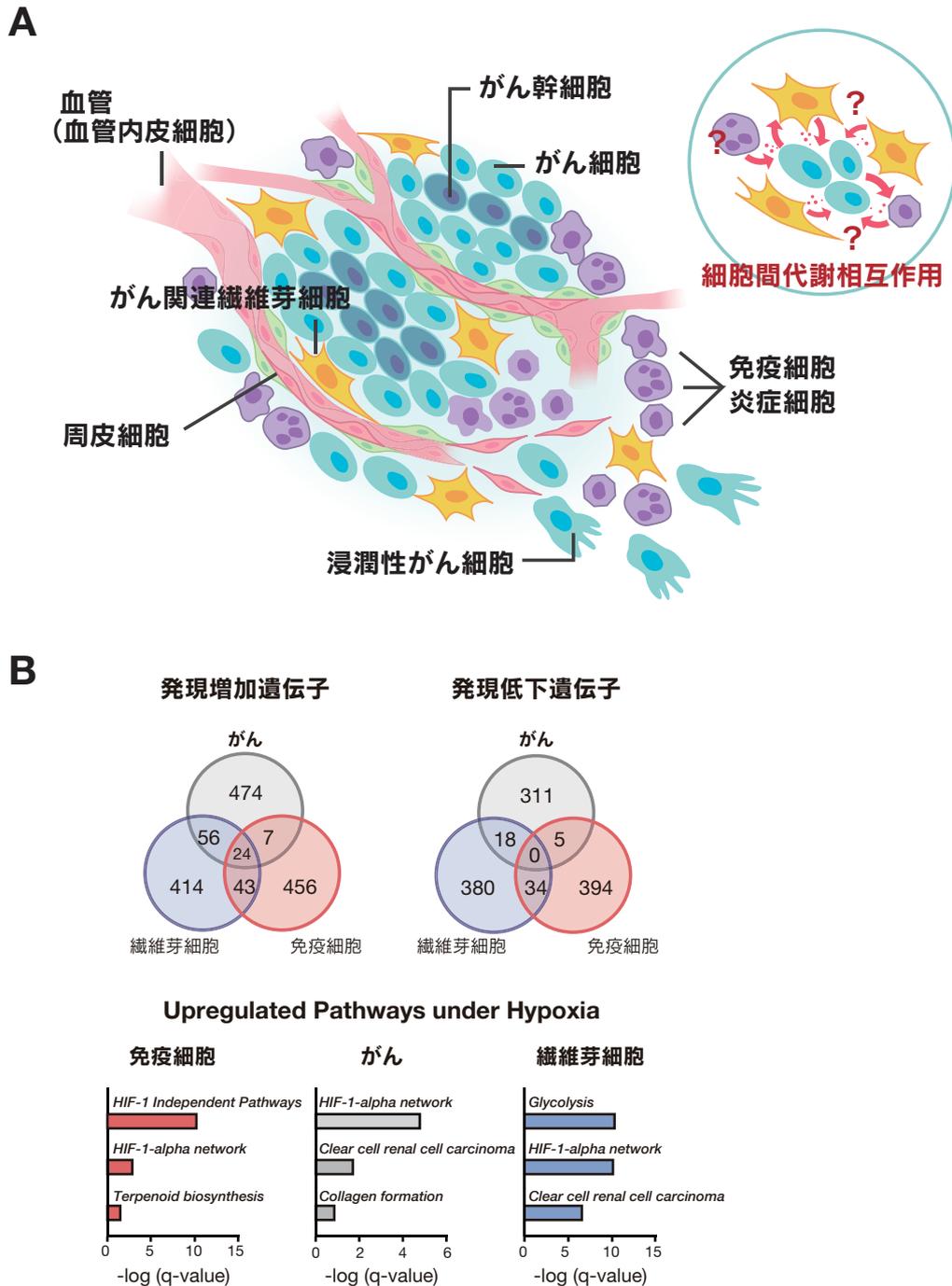


図3 腫瘍組織は、がん細胞、がん関連繊維芽細胞 (CAF)、免疫細胞、血管内皮細胞など様々な細胞で構成される

(A) がん細胞は、隣接する間質細胞または免疫細胞の代謝リプログラムし、がん細胞の増殖に利用できるアミノ酸などの栄養素を提供し、また、免疫寛容するシグナル伝達物質を分泌する。(B) 低酸素腫瘍微小環境は、がん細胞、線維芽細胞、および単球/マクロファージにおいて異なる遺伝子発現系を誘導する。低酸素下では HIF1 α を介した解糖系は様々な細胞で共通して亢進されるが、単球/マクロファージでは HIF1 α に非依存的経路も亢進することが明らかとなってきた。

3.2 がん微小環境における細胞間代謝相互作用

がん組織内の腫瘍微小環境は、栄養素や酸素、pHのみならず、さまざまな種類の細胞間の相互作用によって形成される⁹⁾。例えば、がん細胞は、腫瘍微小環境で最も豊富な細胞の一つであるがん関連線維芽細胞 (CAF) からのアラニンやグルタミンといった代謝物質を利用して増殖する。また、免疫細胞もがんの進行に関与しており、がん細胞から分泌される乳酸やキヌレニンなどの代謝物質が免疫細胞の免疫抑制機能を増強することが知られて

いる⁹⁾。さらに、T細胞の代謝異常は、がん細胞に対する免疫応答を抑制することが報告されている¹⁰⁾。当研究室においても、がん細胞単独、あるいは多細胞連関モデルを用いた腫瘍形成実験を行ったところ、がん細胞-CAF-免疫細胞の代謝相互作用が腫瘍形成に大きく寄与することを見出している。

これらの代謝相互作用を介した細胞間連関は、がん細胞の遺伝子やエピジェネティックな変化を誘導することが知られており、がんの進行や治療耐性に影響を与える可能性がある。例えば、

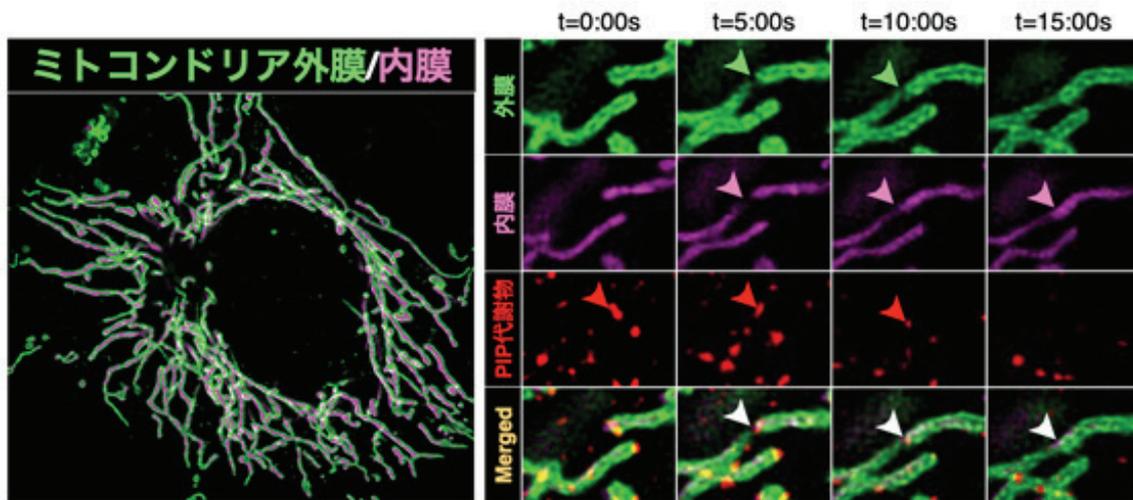
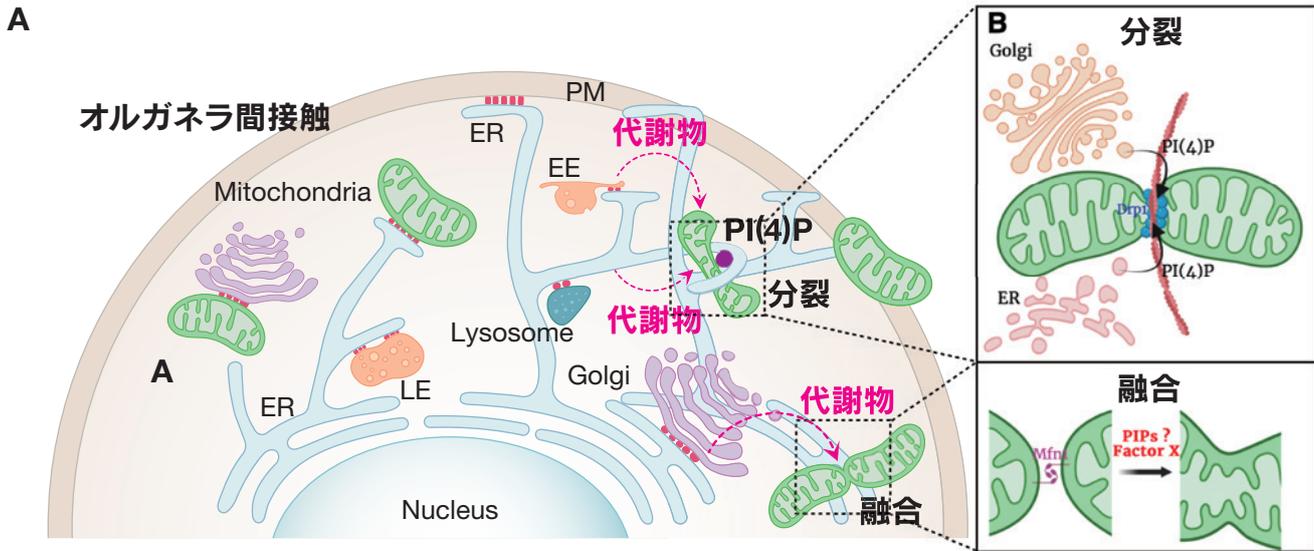


図4 細胞間および細胞内の代謝相互作用でオルガネラが中心的な役割を果たす

(A) オルガネラ間代謝相互作用は、互いの機能を協調的に制御することで生体恒常性に重要な役割を果たしている。オルガネラ間代謝相互作用の理解は、がんを含む疾患の病態生理学の解明し、生体における代謝ロバストネス制御に繋がる新しい疾患治療戦略となることが期待される。(B) オルガネラ代謝相互作用によるミトコンドリア融合メカニズムは未だに解明されていない。(C) PIP代謝物がミトコンドリア外膜に作用することでミトコンドリア融合が開始される。

CAFはがん細胞の増殖を促進するサイトカインを分泌することで、がん細胞の遺伝子発現プロファイルを変化させることが報告されている。また、腫瘍微小環境に存在する酸素の欠乏は、がん細胞の遺伝子発現や代謝プロセスを変化させ、治療抵抗性を引き起こすことが報告されている。したがって、腫瘍微小環境における細胞間相互作用の理解は、新しい治療法の開発に重要な役割を果たすことが期待される。

3.3 オルガネラ - オルガネラ代謝相互作用を介した疾患制御

近年、疾患オミクス解析が臓器間や細胞間、さらにはオルガネラレベルの解像度で明らかになってきており、組織や細胞間相互作用だけでなく、オルガネラレベルでの代謝相互作用が注目されている。オルガネラは、時々刻々とその形態や局在を変化させ、局所的な生体物質の調節やシグナル伝達の場として機能し、多様な生理学的プロセスを調節することで、積極的に細胞機能を制御

している。近年、超解像度顕微鏡をはじめとしたイメージング技術の飛躍的な向上により、個々のオルガネラが直接的な接着を介して互いに連関し、オルガネラ相互作用（ネットワーク）を形成していることが明らかになってきた。あるオルガネラの機能や形態変化が他のオルガネラにも影響するように、このネットワークは物理的な繋がりに留まらず、代謝物やシグナル伝達、オルガネラ形態制御など互いの機能を協調的に制御することで生体恒常性に重要な役割を果たしている¹¹⁾。我々は、腫瘍微小環境下におけるゴルジ体と小胞体（ER）の融合が起因となり転写因子が活性化し、コレステロール生合成を促進することを発見し、オルガネラの形態変化を介したがんや生活習慣病の新たな転写調節メカニズムとして注目している。また、ミトコンドリアの分裂が小胞体やゴルジ体との相互作用によって調節されていることが報告されているが^{12), 13)}、我々も他のオルガネラを介したPIPsの代謝変換により制御される、新たなミトコンドリア外膜融合機構を見出している（図4）。さらに、PIPs代謝酵素KOマウスはミトコンド

リア形態の異常を示し、循環機能不全を呈することから、オルガネラの独自構造が生体恒常性の維持は密接に関連しており、細胞内の正常な機能とバランスを維持するために重要な要素であることが示唆される。

がんでは、オルガネラが腫瘍微小環境への適応を調節する上で重要な役割を果たし、細胞内でのミトコンドリア、ゴルジ体、小胞体、オルガネラの機能の変化は、がんの増殖、浸潤、そして転移や生活習慣病に関与すること報告されている¹⁴⁾。最近では、ミトコンドリアがSTING活性化に関与していることが示唆されており、ミトコンドリア由来小胞からのDNAの放出やミトコンドリアのストレス応答がSTINGを刺激し、免疫応答を誘導することが報告されている¹⁵⁾。さらに、従来ミトコンドリアは細胞内で生成・維持されるものと考えられてきたが、細胞間でミトコンドリア輸送を行う細胞間ミトコンドリア転送も観察され、オルガネラを介した細胞間連関という、新たな階層の細胞間オルガネラ相互作用の存在も示唆されている¹⁶⁾。細胞間ミトコンドリア転送は、細胞の生存や代謝に重要な役割を果たす可能性があり、疾患の理解に新たな展望を提供する研究領域となり得る。細胞は、環境の変化やストレスに応じてオルガネラの形態を調節し、適切な機能を維持する仕組みを有しており、腫瘍微小環境下に晒されたがん細胞では、劇的なオルガネラ構造変化が起こり、オルガネラ相互作用が変動すると考えられる。これら病態の克服には、細胞内代謝適応の要となるミトコンドリアをはじめとしたオルガネラ間の代謝物を介した相互作用の理解が必須であり、がんや生活習慣病の新たな治療法の開発に繋がることが期待される。

4. おわりに

生命は核酸、糖質、脂質、タンパク質などの複雑な有機化合物から構成されている。近年、次世代シーケンサー、質量分析器やクライオ電子顕微鏡などの普及により、ゲノム配列、転写、翻訳、代謝、タンパク質複合体、などの生命現象が網羅的に解析されてきており、従来の多細胞間相互作用、あるいは1細胞解析では捉えきれない、オルガネラレベルの代謝相互作用の解析へと展開され、がんの病態の研究はさまざまなスケールでの組織微小環境における代謝相互作用の評価が可能となってきている。本項では、(1) がん細胞自身は、がん代謝を変化させることにより、低酸素、栄養飢餓、酸性pHなどの腫瘍微小環境に適応する。これは、治療に抵抗性を持つがん細胞が存在する理由の一つであり、適応がんが創薬の新たな標的になる可能性がある。(2) がん細胞と異なる細胞間の代謝相互作用は、がんの進行と生存に不可欠な栄養素を供給する。CAFは、腫瘍微小環境内で最も豊富な細胞であり、腫瘍の形成に必要な栄養素の供給源である。したがって、CAFを標的とした治療法の開発が期待される。(3) オルガネラ間相互作用は、がんや生活習慣病における細胞増殖・老化、生存、転移、環境適応など本質的な特徴に関与している可能性がある。オルガネラを標的としたがんの治療は、細胞内での特定の代謝経路やオルガネラを制御のみならず生体における代謝口バスターネス制御に繋がる新しいがん治療戦略となることが期待される。

[参考文献]

- 1) Warburg O, *Science*, **1956**, 123, 309-314.
- 2) McKeehan WL, *Cell Biol. Int. Rep.*, **1982**, 6, 635-650.
- 3) Hattori et al., *Nature*, **2017**, 545 (7655), 500-504.
- 4) Esteller and Pandolfi, *Cancer Discov.*, **2017**, 7(4), 359-368.
- 5) DeNicola GM & Cantley LC, *Mol Cell*, **2015**, 60(4), 514-523.
- 6) Shug ZT et al., *Cancer Cell*, **2015**, 27(1), 57-71.
- 7) Kondo et al., *Cell Rep*, **2017**, 18(9), 2228-2242.
- 8) Dey P et al., *Cancer Discov.*, **2021**, 11(5), 1067-1081.
- 9) CM Sousa et al., *Nature*, **2016**, 536, 479-83.
- 10) Madden MZ et al., *Cancer Discov.*, **2021**, 11(7), 1636-1643.
- 11) Jain A et al., *Mol Metab.*, **2022**, 60, 101481.
- 12) JR Friedman et al., *Science*, **2011**, 334, 358-362.
- 13) Nagashima et al., *Science*, **2020**, 367, 1366-1371.
- 14) A Saminathan et al., *Nat. Rev. Mater.*, **2022**, 7(5), 355-371.
- 15) Zecchini V et al., *Nature*, **2023**, 615, 499-506.
- 16) Liu D et al., *Signal Transduct Target Ther.*, **2021**, 6(1), 65.

[著者プロフィール]

氏名：大澤 毅 (Tsuyoshi Osawa)

所属：東京大学 先端科学技術研究センター
ニュートリオミクス・腫瘍学分野

〒153-8904 東京都目黒区駒場 4-6-1

東京大学先端科学技術研究センター

Tel : 03-5452-5025

E-mail : osawa@lsbm.org

出身学校：英国ロンドン大学 (UCL) 大学院 腫瘍学専攻
学位：(博士 (腫瘍学))

専門分野：がん代謝学、ニュートリオミクス

現在の研究テーマ：オミクスデータを統合し、がん微小環境におけるがん悪性化機構の研究に取り組んでいる。

出版物のご案内



本総説の大澤毅先生の編集による新刊「マルチオミクス データ駆動時代の疾患研究」(羊土社)は、オミクス解析の概説から疾患研究の例までまとめられています。これからこの分野の研究を始める方はもちろん、新たなヒントを得たい方におすすめです。

実験医学 増刊

マルチオミクス データ駆動時代の疾患研究

大澤 毅 編

発行：羊土社

2023年9月5日発行 B5判 222ページ

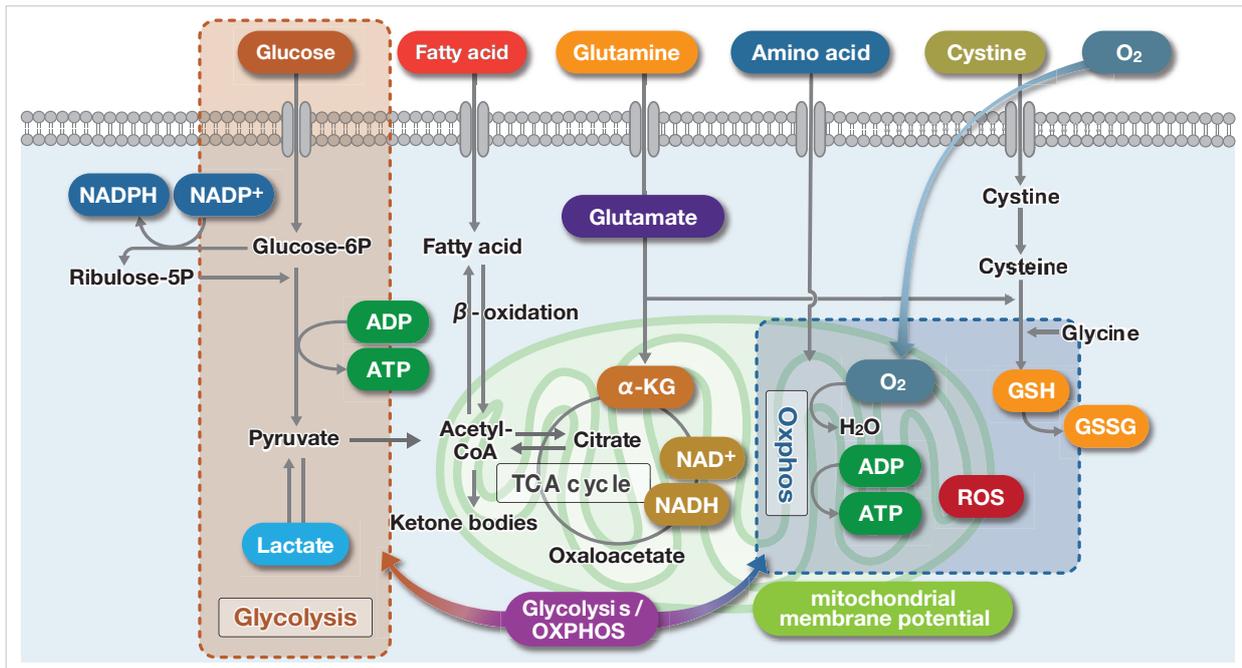
ISBN 978-4-7581-0413-5

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。

<細胞内代謝マップ>

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



より詳しい情報はこちら

これから 代謝 同仁

検索

品名	検出系	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
● Glucose Assay Kit-WST	比色 : 450 nm	50 tests 200 tests	19,900 41,900	G264
● Lactate Assay Kit-WST	比色 : 450 nm	50 tests 200 tests	33,000 77,200	L256
● NAD/NADH Assay Kit-WST	比色 : 450 nm	100 tests	61,400	N509
● NADP/NADPH Assay Kit-WST	比色 : 450 nm	100 tests	59,700	N510
● Glutamine Assay Kit-WST	比色 : 450 nm	100 tests	58,900	G268
● Glutamate Assay Kit-WST	比色 : 450 nm	100 tests	53,500	G269
● α-Ketoglutarate Assay Kit-Fluorometric	蛍光 Ex. 530-560 nm Em. 580-600 nm	100 tests	68,500	K261
● ATP Assay Kit-Luminescence	発光	50 tests 200 tests	26,800 48,200	A550
● Glycolysis/OXPHOS Assay Kit	比色 : 450 nm 発光	50 tests	51,400	G270
● ADP/ATP Ratio Assay Kit-Luminescence	発光	100 tests	53,500	A552
● Glycolysis/JC-1 MitoMP Assay Kit	比色 : 450 nm 蛍光 : Green : Ex. 480-490 nm Em. 525-545 nm Red : Ex. 530-540 nm Em. 585-605 nm	50 tests	48,000	G272

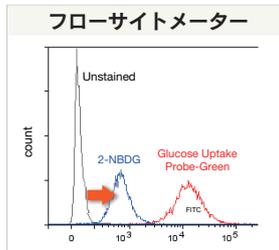
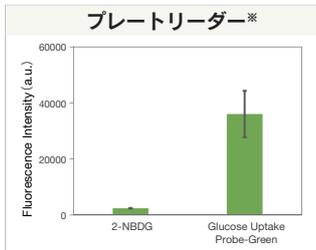
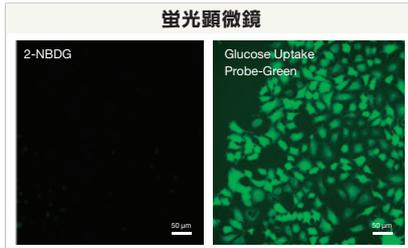
細胞内代謝関連製品

グルコース取り込み検出キット

Glucose Uptake Assay Kit-Blue, Green, Red

蛍光標識グルコース誘導体 Glucose Uptake Probe は、高感度に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。

さらに、本キットに含まれる Washing and Imaging (WI) Solution を用いることで細胞からのプローブの漏出を抑制し、再現性の高いデータを取得することが可能です。



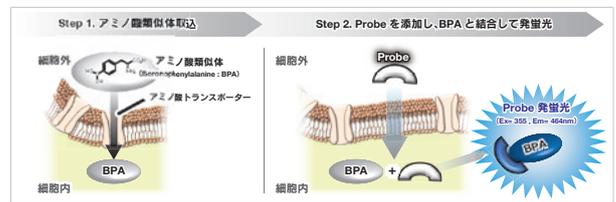
※ プレートリーダーでの検出は、Green, Redのみ対応しています。

アミノ酸取り込み検出キット

Amino Acid Uptake Assay Kit

増殖が活発ながん細胞において、アミノ酸はタンパク質や核酸の合成に必須な栄養素です。また、がん細胞では解糖系からのアセチル CoA の供給が低下するため、TCA サイクルの栄養源としてアミノ酸を積極的に利用しています。そのため、がん細胞ではアミノ酸トランスポーター LAT1 (L-type amino acid transporter 1) の発現量を増やして、多くのアミノ酸を取り込んでいることが明らかとなっています。

本キットは、蛍光イメージング、プレートリーダー測定、フローサイトメトリーに対応しているため、細胞のアミノ酸取り込み能力を可視化、数値化することが可能であり、アミノ酸取り込み能力の評価やアミノ酸トランスポーター阻害剤のスクリーニングに有用です。



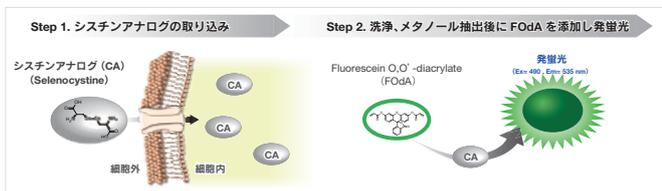
※ 本キットは大阪府立大学の切畑光統先生から技術指導および情報提供をいただき開発した製品です。

シスチン取り込み検出キット

Cystine Uptake Assay Kit

キットに含まれる Cystine Analog (CA) は、シスチンと同様に xCT を経由して細胞に取り込まれます。細胞内に取り込まれた CA を抽出した後、還元剤存在下で検出用プローブ FODa と反応させることによって、CA 量に応じた蛍光シグナルを得ることができます。

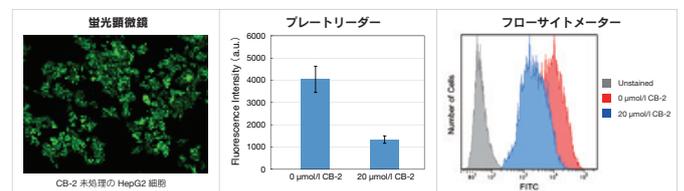
[特許出願中]



脂肪酸取り込み検出キット

Fatty Acid Uptake Assay Kit

本キットには、脂肪酸トランスポーターを介して細胞に取り込まれる Fatty acid analog を同梱しており、脂肪酸の取り込みを蛍光法にて検出できます。Quenching Buffer により洗浄操作の手間と時間を省いた検出が可能です。



品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Glucose Uptake Assay Kit-Blue	1 set	42,800	UP01
Glucose Uptake Assay Kit-Green	1 set	40,700	UP02
Glucose Uptake Assay Kit-Red	1 set	42,800	UP03
Amino Acid Uptake Assay Kit	20 tests 100 tests	17,100 48,200	UP04
Cystine Uptake Assay Kit	20 tests 100 tests	19,300 53,500	UP05
Fatty Acid Uptake Assay Kit	100 tests	32,000	UP07

酸素消費プレートアッセイキット

Extracellular OCR Plate Assay Kit

OCR 測定が初めての方にも最適！

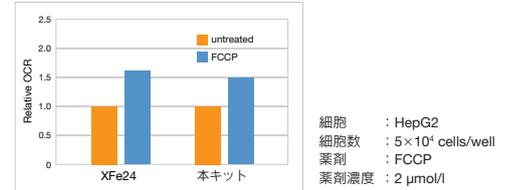
<特徴>

- ・細胞の酸素消費速度をプレートアッセイで測定可能
- ・プレートリーダーの蛍光モードでの測定が可能*
- ・専用のプレートや培地の必要がない*

<フラックスアナライザーとの比較>

フラックスアナライザー (XFe24) と本キットを、同条件 (細胞種・細胞数・FCCP 濃度) にて、同日測定しました。その結果、XFe24 と本キットで相関する酸素消費速度変化のデータが得られました。

* 本製品は、群馬大学 吉原 利忠 先生のご指導の下、製品化しました。



<本キットで OCR の算出まで>

本キットには、培地中の酸素濃度が高いほどりん光が弱くなる特性を持つ Oxygen Probe と、Well 内に空気中の酸素流入を遮断するための Mineral Oil を同梱しています。細胞外の酸素濃度に応じたりん光強度を蛍光マイクロプレートリーダーで測定後、Stern-Volmer の関係式より細胞の OCR を算出 (自動計算シート) します。



品名	容量	希望納入価格 (¥)	メーカーコード
Extracellular OCR Plate Assay Kit	100 tests	48,000	E297

関連製品

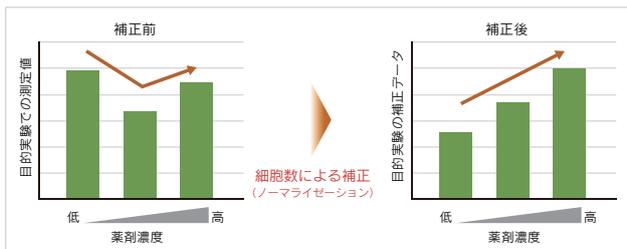
細胞数ノーマライゼーションキット

Cell Count Normalization Kit

<特長>

- ・試薬を添加するだけの簡単操作
- ・蛍光強度から細胞数を簡便に評価することができる

マイクロプレートを用いた細胞の解析では、得られる結果がウェル中の細胞数によって変化する場合があります。その際には、細胞数のカウントやトータルタンパク質量の確認により、得られた測定値の補正 (ノーマライゼーション) が必要となります。本キットでは、試薬を細胞培養液に添加するだけで、細胞内の核が染色され、得られる蛍光強度から細胞数を簡便に評価することができます。



試薬をウェルに加えるだけ



品名	容量	希望納入価格 (¥)	メーカーコード
Cell Count Normalization Kit	200 tests	9,000	C544
	1000 tests	22,000	

Topics on Chemistry

低酸素下におけるミトコンドリア - リソソーム間相互作用

株式会社同仁化学研究所 小松 恭佳

細胞内に存在するオルガネラは、それぞれの役割を担いながら他のオルガネラと相互作用して細胞内の様々な機能を維持している。中でもミトコンドリアとリソソームは密接に関係しており、ミトコンドリアは物理的および機能的にリソソームと相互作用して細胞の代謝を調節し、細胞の恒常性を維持する。その一例として、正常な細胞にはマイトファジーと呼ばれる不良ミトコンドリア分解機構が備わっている。また、リソソームは鉄の恒常性を調節することでミトコンドリアの代謝をサポートすることが報告されている^{1,2)}。ミトコンドリア-リソソーム間の相互作用は細胞機能の重要な決定要因であるにも関わらず、根本的な機構はほとんど不明のままである。本稿では、最近報告された、低酸素下におけるオートファゴソーム非依存的なミトコンドリア分解 (mitochondrial self-digestion) に関連したミトコンドリア-リソソーム間相互作用について紹介する³⁾。

ミトコンドリアの機能に重要な内膜のクリステ構造をつくる MICOS 複合体の枯渇は、ミトコンドリア分裂の停止とミトコンドリア内膜組織の障害により、巨大な球状ミトコンドリア (megamitochondria) の形成をもたらす^{4,5)}。この巨大ミトコンドリアは特定の病理学的細胞において観察されており、様々な疾患に関連していることが報告されている^{6,7,8)}。巨大ミトコンドリアの生理学的機能についてはほとんど理解されていない。Hao らは、HeLa 細胞を低酸素下に曝すとミトコンドリア融合の割合が増加し、巨大な球状ミトコンドリアが形成されることを示した (図 1)。

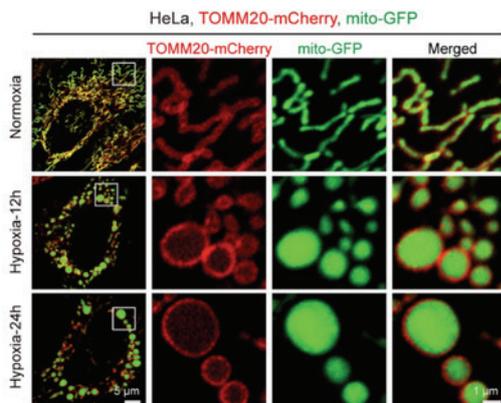


図 1 正常酸素下および低酸素下におけるミトコンドリア形態³⁾

巨大ミトコンドリアの形成が誘導された HeLa 細胞では、ミトコンドリアとリソソームの接触が促進することが確認され、正常酸素下の場合、リソソームと接触したミトコンドリアは分裂するが、巨大ミトコンドリアが形成される低酸素下ではリソソームがミトコンドリアに飲み込まれている様子が観察された (図 2)。

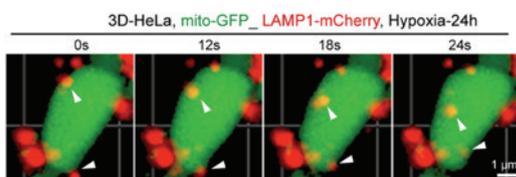


図 2 リソソームがミトコンドリアに飲み込まれる様子³⁾

Hao らはこの現象を megamitochondria engulfing lysosome (MMEL) と名付けており、MMEL にはミトコンドリア融合を介した巨大ミトコンドリアが必要であり、断片化したミトコンドリアや正常なミトコンドリアはリソソームを飲み込むことができないことを確認している。また、リソソームの酸性化を阻害した場合や、リソソーム膜タンパク質をノックダウンした場合には、低酸素下において巨大ミトコンドリアは形成されるが、MMEL が減少することが分かった。これらの結果は、低酸素誘発性 MMEL にはミトコンドリアの融合とリソソームの成熟が必要であることを示唆している。

低酸素状態は多くのミトコンドリアプロテアーゼを活性化し、ミトコンドリアタンパク質の分解を引き起こす (図 3)。低酸素下では巨大ミトコンドリアが形成され、MMEL を介してミトコンドリアとリソソームは相互作用していることが示された。この現象に対してリソソームがどのような動きをしているのか、リソソームプロテアーゼに焦点を当てて確認したところ、巨大ミトコンドリアに飲み込まれたリソソームはミトコンドリア内でリソソームプロテアーゼ (cathepsin) を活性化することが分かった。低酸素状態においてこのリソソームプロテアーゼを枯渇させた結果、ミトコンドリアタンパク質の分解が著しく阻害されたことから (図 3)、リソソームは低酸素下におけるミトコンドリアタンパク質の分解に寄与していることを明らかにした。この時、オートファゴソームの形成を阻害してもミトコンドリアタンパク質は大幅に減少したことから、MMEL を介したリソソームによるミトコンドリアタンパク質の分解は、オートファゴソーム依存性マイトファジーとは独立して行われ、ミトコンドリアを自己消化していることを示唆した。

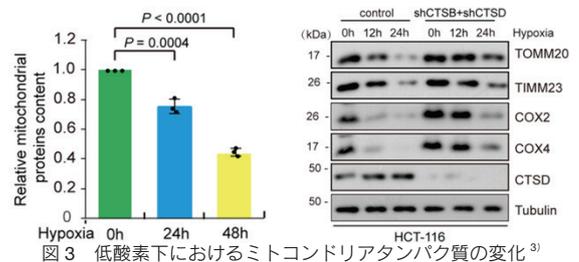


図 3 低酸素下におけるミトコンドリアタンパク質の変化³⁾

今回紹介した報告では、低酸素下におけるミトコンドリア-リソソーム間相互作用の様式が明らかとなっている。老化、がん、神経変性疾患などに関与するミトコンドリアの品質管理という点で、ミトコンドリアの自己消化は 1 つの重要な経路となる可能性がある。今回得られた知見から、ミトコンドリア-リソソーム間相互作用の機構解明がさらに進むことを期待している。

[参考文献]

- 1) C. E. Hughes, et al., *Cell*, **2020**, 180, 296-310.
- 2) R. A. Weber, et al., *Mol. Cell*, **2020**, 77, 645-655.
- 3) T. Hao, et al., *Nat. Commun.*, **2023**, 14, 4105.
- 4) F. Jian, et al., *Cell Rep.*, **2018**, 23, 2989-3005.
- 5) H. Li, et al., *Cell Death Differ.*, **2016**, 23, 380-392.
- 6) A. Wiczorek, et al., *Clin. Exp. Hepatol.*, **2017**, 3, 169-175.
- 7) T. Wakabayashi, *J. Cell Mol. Med.*, **2002**, 6, 497-538.
- 8) T. Yamada, et al., *iScience*, **2022**, 25, 103996.

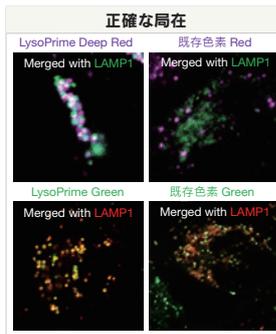
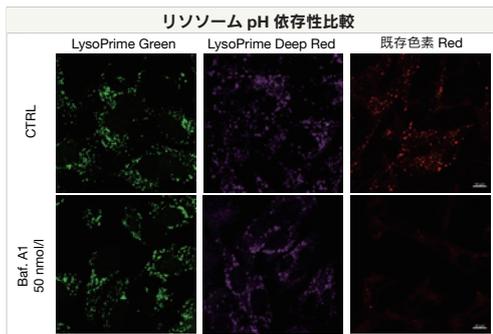
Fig. 1, 2 and 3 were reprinted from Reference 3).
Copyright © 2023, T. Hao et al. / CC BY 4.0.

リソソーム染色試薬

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

<リソソームの pH 変化に強い染色試薬>

既存のリソソーム試薬は、リソソームの正確な局在に課題がありました。本製品は高いリソソーム指向性を持ち、リソソーム pH 変動を受けにくい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。



リソソーム酸性度阻害剤 Bafilomycin A1 (Baf. A1) で処理後も鮮明な蛍光が観測できた (左図)。また、LAMP1-GFP または RFP 発現 HeLa 細胞を本製品で染色したところ既存色素よりも局在性が高いことがわかった (右図)。

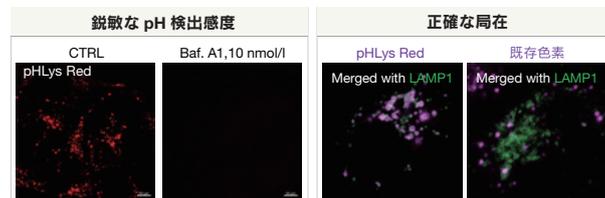
LysoPrime Green:
Ex = 488 nm, Em = 500-600 nm
LysoPrime Deep Red:
Ex = 633 nm, Em = 640-700 nm

リソソーム pH 検出試薬

pHLys Red - Lysosomal Acidic pH Detection

<リソソームの pH を高感度に検出>

既存のリソソーム pH 検出試薬は、リソソームの正確な局在と感度に課題がありました。本製品はリソソーム pH の変動に鋭敏に反応して蛍光強度を変化させます。さらに高いリソソーム指向性から得られる蛍光輝度は正確なリソソーム pH を表すことができます。



低濃度のリソソーム酸性度阻害剤 Bafilomycin A1 (Baf. A1) で処理した HeLa 細胞を用いて本製品にて染色した (左図)。また、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-GFP 発現 HeLa 細胞を用いて既存色素と比較した (右図)

Ex = 561 nm, Em = 560 - 650 nm

リソソーム pH 検出キット

Lysosomal Acidic pH Detection Kit Lysosomal Acidic pH Detection Kit-Green/Deep Red

<正確なリソソーム染色と pH 検出のオールインワンキット>

リソソーム染色色素と pH 検出試薬、リソソームの pH 酸性化阻害剤を組み合わせた、初めての利用におすすめの構成のキットです。色の異なる 2 種類のキットをご用意しております。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
LysoPrime Green	10 µl x 1 ^{*1}	13,900	L261
- High Specificity and pH Resistance	10 µl x 3 ^{*1}	28,900	
LysoPrime Deep Red	1 tube ^{*1}	15,000	L264
- High Specificity and pH Resistance	3 tubes ^{*1}	30,000	
pHLys Red - Lysosomal Acidic pH Detection	1 tube ^{*2}	28,000	L265
	3 tubes ^{*2}	48,000	
Lysosomal Acidic pH Detection Kit	1 set ^{*2}	38,000	L266
Lysosomal Acidic pH Detection Kit-Green/Deep Red	1 set	38,000	L268

(使用回数の目安) *1 10 µl あたり、35 mm dish 10 枚、µ-Slide 8 well 10 枚、*2 1 tube あたり、35 mm dish 10 枚、µ-Slide 8 well 10 枚、96-well Plate 2 枚

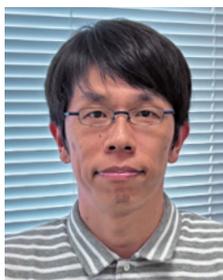
生命科学の最前線

～熊本大学若手研究者の現場から～ ②

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。

動的構造解析による酵素反応機構の解明

Structural dynamics in enzymatic reaction



中村 照也

熊本大学大学院
生命科学研究部（薬学系）
准教授

Abstract

Enzymes are responsible for essential chemical reactions in biological phenomena and catalyze reactions by binding substrates, coenzymes and metal ions to the active site and reducing the activation energy. To understand the mechanisms of enzymatic reactions, it is essential not only to determine the structures of the enzyme-substrate and enzyme-reaction product complexes, but also to capture the intermediate structures and observe the structural changes during the reaction processes. X-ray crystallography is a methodology for determining the three-dimensional structure of proteins in a crystalline state, and in many cases, enzyme activity is retained even in a crystalline state. Here we present the dynamic structure analysis of enzymes using X-ray crystallography and a new enzymatic reaction mechanism of MutT, an enzyme that hydrolyzes a mutagenic oxidized nucleotide.

1. はじめに

酵素は、生命現象における様々な化学反応を担うタンパク質であり、基質、補酵素や金属イオンを自身の活性部位に結合し、活性化エネルギーを低下させることで化学反応を触媒する。このような酵素反応機構を理解するには、酵素反応の速度論解析はもちろん、酵素の構造解析が必要不可欠となる。構造解析においては、反応過程における酵素-基質複合体や酵素-反応生成物複合体の立体構造を決定するだけでなく、反応中間体の立体構造も捉えて、反応開始から終了までの構造変化を明らかにすることが求められる。タンパク質構造解析法の一つであるX線結晶構造解析は、結晶状態となったタンパク質の立体構造、すなわち静的なタンパク質の立体構造を決定する手法である。タンパク質の結晶は、溶媒含有率が高く（～40%以上が溶媒）、結晶状態であっても自身の酵素活性を保持しているケースも少なくない。実際、我々はDNA合成酵素であるDNAポリメラーゼが結晶状態でも酵素活性を保持していることに着目することで、X線結晶構造解析を用いたDNAポリメラーゼの動的構造解析を行った。その結果、DNAポリメラーゼが行うヌクレオチド転移反応において、DNA末端とヌクレオチド(dNTP)の間に共有結合が形成される過程を観察することに成功し、DNAポリメラーゼの新規反応機構を提案した^{1), 2)}。さらに近年、突然変異原の酸化ヌクレオチドを加水分解する酵素MutTの動的構造解析も行い、その新規反応機構を提案した³⁾。本稿では、X線結晶構造解析を用いた酵素の動的構造解析法と、本手法によって最近明らかにしたMutTの酵素反応の新規機構について紹介する。

2. 大腸菌 MutT タンパク質

細胞内で生じる活性酸素種は、遺伝情報物質であるDNAだけでなくその前駆体であるヌクレオチドも酸化する。dGTPの酸化により生じた8-oxo-dGTPがDNAポリメラーゼによってDNA中に取り込まれた際、酸化塩基部位の8-オキソグアニンはシトシンだけでなくアデニンともミス塩基対を形成できるため突然変異の原因となる(図1)。1992年、当時九州大学の真木と関口は、本研究対象の大腸菌MutTが8-oxo-dGTPを分解することで8-oxo-dGTPのDNAへの取り込みを防ぎ、突然変異を抑制することを明らかにした⁴⁾。これは、遺伝情報エラーの回避がDNAレベルだけでなくヌ

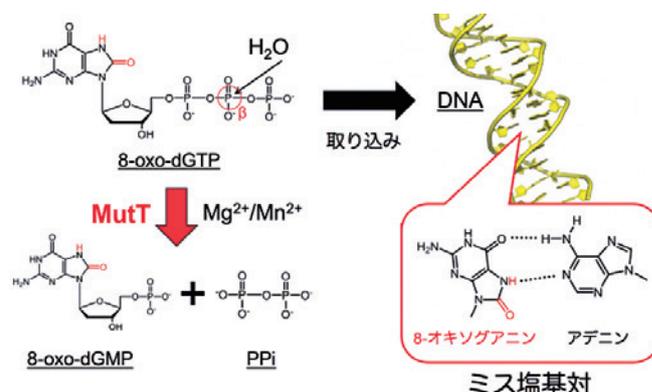


図1 8-oxo-dGTPが関与するDNAミス塩基対とMutTの機能

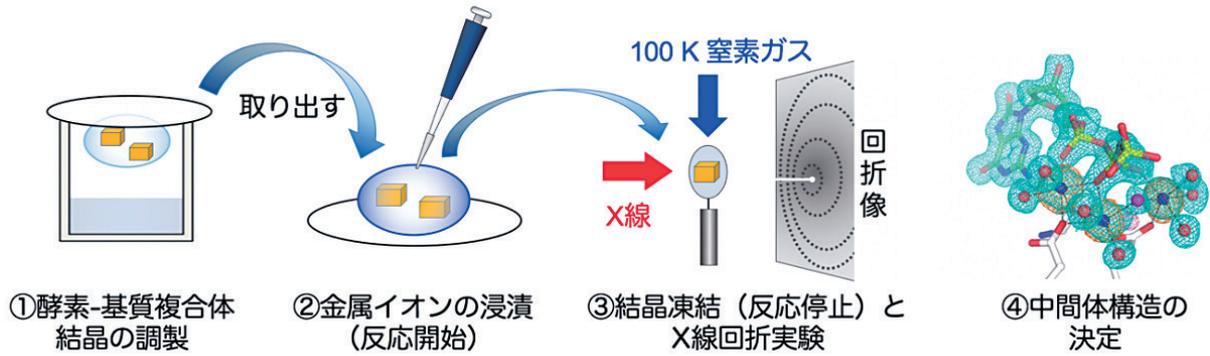


図2 X線結晶構造解析を用いた動的構造解析の実験手順

クレオチドレベルでも行われていることを示した大きな発見であった。

MutTはMg²⁺もしくはMn²⁺存在下、8-oxo-dGTPを加水分解する。その際、8-oxo-dGTPのβ-リン原子への水分子の求核攻撃によって、8-oxo-dGTPは一リン酸型の8-oxo-dGMPとピロリン酸 (PPi) へと加水分解される (図1)。MutTは、大きな加水分解ファミリーであるNudix/MutTファミリー (ヌクレオシドニリン酸を加水分解する酵素群) に属し、ファミリー名からもわかる通り、MutTはこのファミリーにおいて最も古くから研究されてきた酵素である。MutTの酵素反応機構は、核磁気共鳴や反応速度論解析などにより研究されており^{5),6)}、MutTは2つのMg²⁺/Mn²⁺イオンを介して加水分解反応を触媒すること (two-metal-ion mechanism) が提案されていた。一方、これまでに我々が決定したMutTと反応生成物とMn²⁺の複合体のX線結晶構造 (MutT-8-oxo-dGMP-Mn²⁺) では、MutTが3つのMg²⁺/Mn²⁺イオンを介して反応を触媒すること (three-metal-ion mechanism) が示唆されていた⁷⁾。また、他のNudixファミリー酵素においても、加水分解反応の触媒には2つもしくは3つの金属イオンが必要であることが報告されており、統一的な知見は得られていない。これは、Nudixファミリーはわずか23残基という加水分解モチーフのアミノ酸配列で定義されているため、反応機構に多様性がみられると考えることもできる。しかし一方で、酵素反応機構の推定に用いられている結晶構造のほとんどは、基質類縁体や活性を示さない金属イオンなどとの複合体であることや結晶化条件のpHも様々であることにより、酵素反応の活性化状態を反映していない可能性も考えられる。このようなMutTを含めたNudixファミリーの金属イオンを介した酵素反応機構を解明するために、X線結晶構造解析を用いたMutTの動的構造解析を行った。

3. X線結晶構造解析を用いた動的構造解析

酵素は結晶状態であっても活性を保持しているという特徴を利用して、反応中間体を低温 (~100 K) で捕捉する低温トラップ法を用いたX線結晶構造解析により、MutTの動的構造解析を行った。MutTやDNAポリメラーゼなど、金属イオン存在下で反応を触媒する酵素については、以下の①~④の手順で実験を行った (図2)。「①酵素-基質複合体結晶を反応の起こらない状態で調製する。②反応開始となる金属イオンを結晶に浸漬させて結晶内反応を開始させる。③結晶を目的の反応時間インキュベートした後、急速凍結して反応を完全に停止させる。④反応時間毎の中間体構造をX線結晶構造解析により決定する。」という手順である。本動的構造解析を行うにあたっては、1) 反応の起こらない状態で酵素-基質複合体構造 (ES、反応開始前構造) を決定できる、2) 追跡可能なタイムスケールで反応を進行できる、3) 反応中に結晶の状態を維持できる (結晶が崩壊するとX線回折データを収集できないため)、などといった条件を満たす必要があるため、結晶化条件のみならず、金属イオン濃度、pH、反応時間、反応温度といった条件を検討し、反応過程を追跡できる結晶内反応条件を酵素に応じて見出す必要がある。実際、DNAポリメラーゼとMutTについては、それぞれ100以上の結晶内反応条件を検討することで、最終的に反応開始から終了までの全過程を追跡することが可能となった^{1),3)}。DNAポリメラーゼの場合は、pH 7.0で反応時間が40~300秒で酵素反応過程を観察できたが、MutTの場合は、pHを5.8にして反応速度を下げ、反応時間を数十分から数時間とすることで反応過程を観察することができた。

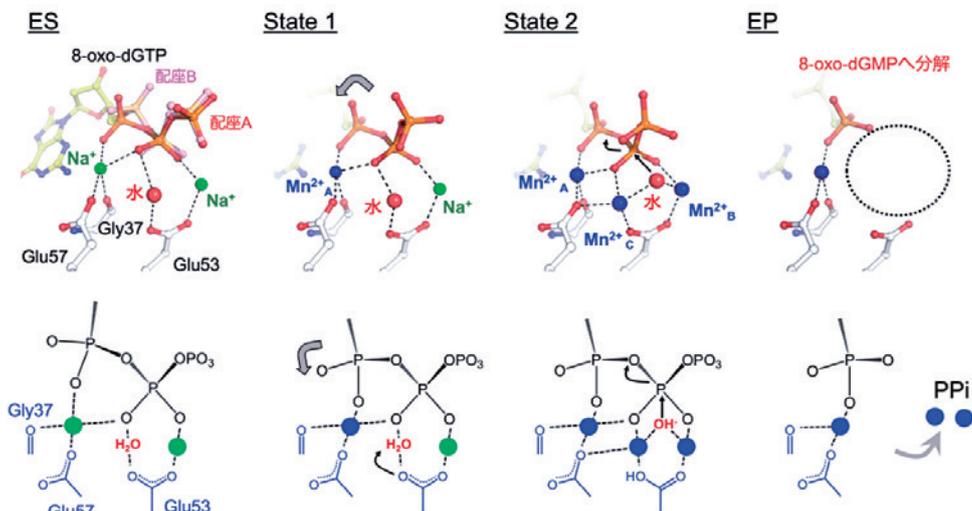


図3 MutTによる8-oxo-dGTP加水分解反応の中間体構造 (上段) と反応機構 (下段)

4. 酵素反応過程の観察と新規反応機構

MutT の動的構造解析により、ES (MutT-8-oxo-dGTP 複合体)、EP (MutT-8-oxo-dGMP 複合体) を含む合計 6 つの中間体構造を決定し、MutT による 8-oxo-dGTP の加水分解反応過程を原子レベルで観察した (図 3)。なお本稿では、これらのうち 4 つの構造を示している。反応開始前の ES では、8-oxo-dGTP の三リン酸部位が MutT 活性部位の Gly37、Glu57、Glu53 に水分子と Na⁺ イオンを介して結合しているが (図 3 の ES)、三リン酸部位では、活性部位に近づいている配座 A と活性部位から遠ざかった配座 B の 2 つの状態がみられた。これは、酵素活性に必須の Mg²⁺/Mn²⁺ イオンのない時は、三リン酸部位が活性部位に引きつけられない、すなわち、活性状態にはないことを示唆している。結晶を Mn²⁺ 溶液に浸漬させることで結晶内反応を開始した。反応の開始と共に、まず 1 つの Mn²⁺ (Mn²⁺_A) が Gly37、Glu57、三リン酸に配位し、この Mn²⁺_A の配位によって三リン酸部位は活性部位に引きつけられる (図 3 の State 1 の矢印)。反応時間が経過すると、さらに 2 つの Mn²⁺ (Mn²⁺_B と Mn²⁺_C) が活性部位に配位する (図 3 の State 2)。これら 3 つの Mn²⁺ が活性部位に配位した後、Mn²⁺_B と Mn²⁺_C に架橋する水分子が現れる。このように、MutT の活性部位に 3 つの Mn²⁺ が配位することで、8-oxo-dGTP の三リン酸部位が活性部位に引きつけられるとともに、水分子が 8-oxo-dGTP の β-リン原子を求核攻撃するために適した位置に配置される。この水分子が β-リン原子を求核攻撃することで、8-oxo-dGTP が 8-oxo-dGMP へと加水分解されることが明らかとなった。反応時間が経過すると、8-oxo-dGTP は 8-oxo-dGMP へと加水分解され、PPi と Mn²⁺_B と Mn²⁺_C は活性部位から遊離する (図 3 の EP)。また、構造解析での電子密度図から、State 2 で現れた水分子は、ES と State 1 において Glu53 と結合していた水分子が、State 2 にて Mn²⁺_B と Mn²⁺_C に架橋するように移動したことが示唆された。過去の反応速度論解析において、この Glu53 が反応における一般塩基となることが報告されていることから⁶⁾、現段階では、図 3 の下段に示したように Glu53 が Mn²⁺ の配位子として、さらには一般塩基として働くという酵素反応機構を提案している。また、Mg²⁺ を用いた酵素反応過程の追跡も行ったが、Mn²⁺ の場合と同様、MutT は 3 つの Mg²⁺ を介して反応を触媒することが明らかとなった。

5. おわりに

酵素の動的構造解析により、反応開始から終了までの酵素反応過程を観察することで、MutT が 3 つの金属イオンを介して 8-oxo-dGTP を加水分解すること (three-metal-ion mechanism) を解明し、新規反応機構を提案することができた。本研究により、Nudix ファミリーの中には three-metal-ion mechanism で加水分解反応を触媒する酵素も存在することが示唆された。図 3 の下段に示した酵素反応機構では、求核攻撃を行う水分子の脱プロトン化も含め、水素原子を含んだ酵素反応機構を議論している。しかしながら、X 線結晶構造解析では水素原子を観察することが極めて難しいため、提案した反応機構における水素原子の位置と動きは、今回の動的構造解析の結果とこれまでの反応速度論解析の結果から推測している。反応におけるプロトン化/脱プロトン化を含めた水素原子の位置および動きを明らかにすることは、タンパク質の機能を原子レベルで議論する上で極めて重要であるが、タンパク質構造解析の現状としては、多くの場合、水素原子の位置は推測するにとどまっている。今後は水素原子を高感度で検出できる中性子構造解析も組み合わせることで、反応機構を水素原子レベルで議論できるような酵素反応の物理化学的研究を展開したいと考えている。

[参考文献]

- 1) T. Nakamura, Y. Zhao, Y. Yamagata, Y. J. Hua, W. Yang, *Nature*, **2012**, 487, 196-201.
- 2) T. Nakamura, Y. Zhao, Y. Yamagata, Y. J. Hua, W. Yang, *Biophysics*, **2013**, 9, 31-36.
- 3) T. Nakamura and Y. Yamagata, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2022**, 119, e2203118119.
- 4) H. Maki and M. Sekiguchi, *Nature*, **1992**, 355, 273-275.
- 5) J. Lin, C. Abeygunawardana, D. N. Frick, M. J. Bessman, A. S. Mildvan, *Biochemistry*, **1997**, 36, 1199-1211.
- 6) T. K. Harris, G. Wu, M. A. Massiah, A. S. Mildvan, *Biochemistry*, **2000**, 39, 1655-1674.
- 7) T. Nakamura, S. Meshitsuka, S. Kitagawa, N. Abe, J. Yamada, T. Ishino, H. Nakano, T. Tsuzuki, T. Doi, Y. Kobayashi, S. Fujii, M. Sekiguchi, Y. Yamagata, *J. Biol. Chem.*, **2010**, 285, 444-452.

[著者プロフィール]

氏名：中村 照也 (NAKAMURA Teruya)

所属：熊本大学大学院生命科学研究部 (薬学系)

〒 862-0973 熊本市中央区大江本町 5-1

TEL : 096-371-4638

E-mail : tnaka@gpo.kumamoto-u.ac.jp

出身学校：大阪大学大学院薬学研究科博士前期課程

学位：博士 (薬学) (熊本大学)

専門分野：構造生物学

現在の研究テーマ：ゲノム安定性、細胞シグナル伝達に関わる構造生物学

「食品機能評価 微生物検出」 冊子リニューアル



食品の機能評価と微生物検出に役立つ製品を集めた冊子「食品機能評価 微生物検出」は大変ご好評を頂き、このたび第 3 版を発行いたしました。リニューアルにより、旧版には紹介されなかった製品も掲載しております。本冊子は小社 Web からご覧いただけます。紙媒体をご希望の方は、販売店様、お問い合わせよりご請求ください。

食品機能評価 同仁

検索

連載

抗酸化キットを使う前のサンプル前処理法 〈第3回〉

株式会社同仁グローバル 山口 勝則

今号は、SOD Assay Kit-WST についてです。

4. SOD Assay Kit-WST について

SOD 活性の測定には、Nitroblue tetrazolium (NBT) 法が以前は用いられてきましたが、発色成分が疎水性で有機溶剤による抽出が必要なことや、NBT が Xanthine oxidase と反応し、100% 阻害率が求められないなどの難点がありました。SOD Assay Kit-WST は、水溶性の WST-1 を用いて改良した方法です。

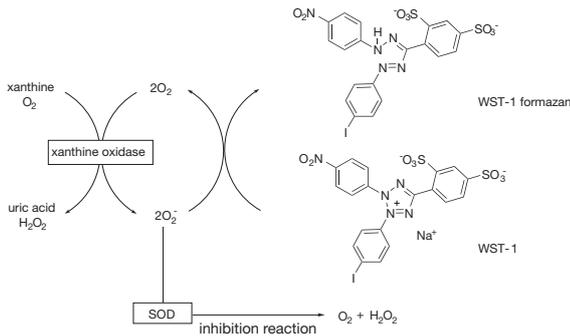


図 4-1 : SOD キットの反応式の図

本題の前処理に入りますが、抽出試料の状態としては、①目的成分が適切に抽出されていること、②サンプルに濁りや着色が生じないこと、③SOD や Xanthine oxidase の酵素反応を妨害しないこと、④目的成分以外で WST-1 と反応しないことなどが必要と考えられます。

① 目的成分が適切に抽出されていること

本法での目的成分 (SOD 酵素、抗酸化成分など) の大部分は水溶性ですが、ビタミン E、ポリフェノール類などの疎水性成分も含むため、SOD 活性全体を評価したい場合、水による抽出と 80% 前後の親水性溶剤による抽出の併用が有効です。

総ポリフェノール類の測定法であるフォーリン - チオカルト法やフォーリン - デニス法¹⁾の抽出操作がよく用いられますが、現状で公定法となるような手法はありません。

実際のところ、抽出を行う場合、試料中の全ての抗酸化能を評価することは不可能で、あくまでも決められた条件での抽出成分のみを評価しているに過ぎません。水抽出物と溶剤抽出物を混合して測定するか、個別の測定値を合計するかも値が一致するとは限りません。文献や各種資料でデータが整合しないのは、実験誤差ももちろんありますが、厳密に同じ方法で抽出されていない要因が大きいと考えるべきです。

実験目的が、「手持ちの試料間の相対的な違いを評価」であれば抽出条件は自由に設定できますが、厳密に同じ条件で抽出操作を行う必要があります。「文献の条件で評価する」ことが目的なら文献での抽出条件を厳密に調べて再現する必要があります。

試料の前処理は、通常、試料の破碎・溶剤などによる抽出操作、不溶物の分離操作を行い、透明な液体の状態にする必要があります。目的成分が疎水性の場合、80% 前後のエタノールなどで抽出を行います。疎水性成分が多いと測定試料が濁る恐れがあり、考慮しておくべきです。また、アセトンはウェル (ポリスチレン) を白濁させる恐れがあるので避けるべきです。

試料の粘性が高かったり、懸濁粒子を含む場合などでは、抽出物が不均一になりやすく、希釈系列を作成する際の再現性を低下させます。充分ホモジナイズして、高回転の遠心分離で除くことが望ましいです。

非加熱の動植物試料の場合、細胞破碎後は各種の分解酵素が放出され、急速に分解が進むため、低温・短時間で破碎・ホモジナイズ・分離処理を行い、速やかに使用するべきです。

試料の個体差や部位の差、抽出条件によって結果に差が出るのは当然ですし、極論を言えば、同じサンプルは再現できないので、失敗の無いよう目的にあった調製を行うことが大切です。

② サンプルに濁りや着色が無いこと

SOD Assay Kit-WST は吸光度法で測定するため、測定試料に濁りや着色があれば、吸光度が高上げられ、ダイナミックレンジが狭くなり、吸光度のパラッキも大きくなるので、どうしても濁りの影響を排除できない場合、IC₅₀ を求めるための希釈系列の希釈倍率を小さくするようにして、50% 阻害率付近のデータがうまく取れるようにすべきでしょう。

ブルーベリーなどの濃い色素を含んだ試料の場合、試料中の色素 (アントシアニンなど) の吸収スペクトルパターンを把握し、測定波長付近に吸収が無いこと、発色系の pH や溶媒環境 (SOD ならほぼ水系) で変色、不溶化しないことなどの確認をしておくべきです。また、着色した試料の場合は、測定波長 (SOD なら 450 nm) に影響が無いことを確認し、影響がある場合は希釈系列ごとに試料ブランク (blank 2) を作成して補正が必要です。

③ SOD や Xanthine oxidase の酵素反応を妨害しないこと

細胞内や血液の SOD は、活性中心に Cu/Zn を含んでおり、ミトコンドリアの SOD は Mn を含んでいるので、強力なキレート試薬や金属をマスクする成分が共存すれば、影響を受けます。SOD Assay Kit-WST では EDTA は 2 mmol/l までは許容できますが、活性部位に EDTA のような大きな分子が侵入できないような高次構造があるためと考えられます。

Cu/Zn-SOD の酵素反応を阻害する成分としては、シアン化カリウムや Diethyldithiocarbamate がありますが、これらはサイズが EDTA のように大きくなく、酵素の活性部位に容易に侵入でき、金属イオンと結合することで阻害すると考えられます。ところが Mn-SOD に対しては阻害しないため、これらを最終濃度で 1 mmol/l になるよう添加することで、Cu/Zn-SOD を失活させ、Mn-SOD の活性を測定できます。

また、Xanthine oxidase が妨害されれば、SOD の基質である superoxide (O₂⁻) の供給量が減少し、測定に影響が出ます。Xanthine oxidase の阻害要因としては、高濃度の溶剤成分、米ぬかやとうもろこし、植物の種子などに含まれるフィチン酸²⁾ があります。事前に予測するのは難しいですが、データの再現性が悪い時の検証の際は要因の 1 つとして考えていいと思います。

④ 目的成分以外で WST-1 と反応しないこと

タンパク質の安定化のため 2-メルカプトエタノール (2-ME) やジチオスレイトール (DTT) などの還元剤はよく使われますが、これらは WST-1 と直接反応し、WST-1 formazan を形成しプラス誤差になるので、SOD Assay Kit-WST では使用できません。逆に酸化剤はマイナス誤差になります。抽出処理後は経時変化しないよう手早い操作が求められます。またアスコルビン酸 (ビタミン C) はそれ自身が抗酸化物質であるため、当然影響するので使用は避けるべきです。

【参考文献】

- 1) 金谷建一郎, "ポリフェノール類", 食品分析法 (II), 光琳, 2006, 68.
- 2) 三浦俊明, 日本薬学会年会要旨集, 2003, 123 (3), 113.

関連製品

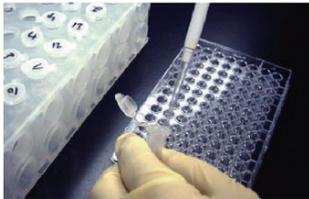
抗酸化能測定キット

SOD Assay Kit-WST

Superoxide dismutase (SOD) は、生体内に存在する抗酸化酵素であり、活性酸素種 (ROS) の一つであるスーパーオキシド (O₂⁻) を消去する働きがあります。本キットは 96 well マイクロプレートを使い SOD 様活性を簡便に測定することができます。

<測定操作>

96 well プレートを用い、サンプル調製から測定まで約 1 時間で完了します。



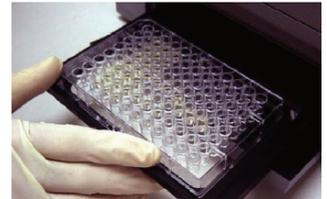
サンプル調製



キット添付の試薬を添加



37°Cで20分間インキュベート



マイクロプレートリーダーで測定 (450 nm)

<測定例>

(1) 生体サンプルの測定例

各サンプルを本製品で測定し、WST 法でユニットを規定した場合の測定例です。前処理方法については同仁化学 HP (下記) をご参照下さい。

SOD 同仁 [検索](#)

赤血球	9720 U/ml of blood
血漿	335 U/ml of blood
ラット心臓	15712 U/g(湿重量)
ラット肝臓	142907 U/g(湿重量)
HeLa 細胞	73 U/1 × 10 ⁷ cells
HL60 細胞	226 U/1 × 10 ⁸ cells

(2) 食品サンプルの測定例

高知大学の島村らは碁石茶 (ゴイシチャ) の製造工程毎に SOD 様活性をキットで測定しています。

製造工程中で微生物が関与する好氣的発酵、および嫌氣的発酵で SOD 様活性が大きく増加し、発酵工程中の茶抽出成分の変化による抗酸化能の変化を報告しています。

島村, “碁石茶製造工程におけるカテキン含量とスーパーオキシドアニオン消去活性の変化”, 日本食品科学工学会誌, 55(12), 640

DPPH 法との比較 ~複数の指標でより詳しく理解する~

DPPH ラジカル消去活性と併用することで、異なる指標で抗酸化能を確認することができます。

測定法	原理	反応溶媒	標準物質	特徴
SOD 様活性	系中で発生させた O ₂ ⁻ と被検物質を反応後、残存する O ₂ ⁻ を WST-1 により比色測定 (450 nm) する。	水	不要	・ 生体内ラジカル (O ₂ ⁻) が指標 ・ 水溶性サンプルに適合 ・ 還元能のあるサンプルは測定が難しい
DPPHラジカル消去活性	紫色に吸収のある DPPH ラジカルを被検物質が還元することで、低下する吸光度 (517 nm) を測定する。	水 / エタノール	Trolox	・ 食品サンプルの測定報告例が多い ・ 水溶性の低いサンプルにも適合 ・ 生体内に存在しないラジカルが指標

※上記内容は、同仁化学研究所の製品概要です。

品名	容量	希望納入価格 (¥)	メーカーコード
SOD Assay Kit - WST	100 tests	10,100	S311
	500 tests	26,000	
DPPH Antioxidant Assay Kit	100 tests	7,100	D678
	500 tests	21,100	

脂質過酸化関連製品

活性酸素種 (ROS) は脂質を酸化して過酸化脂質を生成し、細胞機能を障害します。また、過酸化脂質が分解されると ROS が産生され細胞傷害をさらに進める可能性があります。このように ROS と過酸化脂質は相互に関係しており、老化や疾患の原因となる可能性があります。小社では、これらの脂質の過酸化現象や最終代謝物のマロンジアルデヒド (MDA) を検出する製品をご用意しております。各製品の詳細は、小社 Web からご確認下さい。



脂質過酸化検出試薬 Lipid Peroxidation Probe -BDP 581/591 C11-

Lipid Peroxidation Probe は脂質周辺の ROS 発生状況を確認する試薬で、脂質過酸化現象を高感度に検出することができます。

品名: Lipid Peroxidation Probe -BDP 581/591 C11-
 容量: 200 tests *1

マロンジアルデヒド測定キット MDA Assay Kit

本キットは、TBARS 法により、発色した MDA とチオバルビツール酸付加体の測定から細胞内もしくは組織中の MDA を検出できます。

品名: MDA Assay Kit
 容量: 100 tests *2

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Lipid Peroxidation Probe -BDP 581/591 C11-	200 tests *1	29,800	L267
MDA Assay Kit	100 tests *2	31,000	M496

*1: 〈使用回数の目安〉 96-well plate 2 枚 *2: 〈使用回数の目安〉 96-well plate 1 枚

お役立ち

抗酸化能セミナー アーカイブのご案内

抗酸化能の測定や予測についてのセミナーを、各分野で専門とされている先生方をお招きして開催しました。今回のセミナー後半では、異なる分野で抗酸化能へアプローチされている先生方のパネルディスカッションを行い、大変好評を頂きました。この度、先生方のご厚意によりアーカイブ配信をいたします。視聴ご希望の方は、小社 Web よりお申し込み下さい。

セミナー 同仁 [検索](#)

【講演】	
1. 『抗酸化評価法の標準化の試み - キット開発までの道のり -』 DPPH 法はその簡便さから食品の抗酸化活性評価に広く利用されてきた方法であるが、変法が多く、共通のプロトコールが存在しない状況にあった。今回は、室間共同試験による DPPH 法の妥当性確認、及びその後のキット化の経緯について紹介する。	 講師： 高知大学 農林海洋科学部 農芸化学科 教授 島村 智子 先生
2. 『食品成分の構造から考える抗酸化能』 抗酸化作用は食品の第 7 の栄養素としても注目されており、この抗酸化作用を試験管内の測定により推定することは食品科学分野で 30 年来行われている。私達の研究室では、フェノール類の包括的な抗酸化能予測モデルの作成を目指している。講演では、研究背景や予測方法の概略について紹介する。	 講師： 横浜国立大学 化学生命系学科 化学 EP 准教授 五東 弘昭 先生
【パネルディスカッション】	
テーマ：食品と化合物の抗酸化測定と機械学習の未来 パネリスト 高知大学 農林海洋科学部 農芸化学科 教授 島村 智子 先生 横浜国立大学 化学生命系学科 化学 EP 准教授 五東 弘昭 先生	 コーディネーター： 立命館大学 薬学部 教授 井之上 浩一 先生

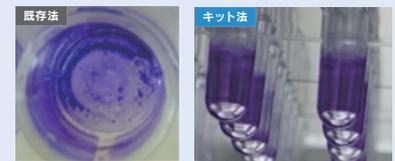
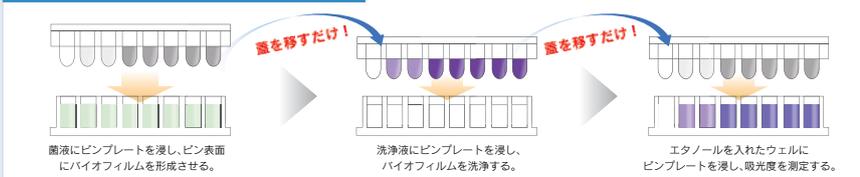
バイオフィーム関連製品

バイオフィーム関連製品群は、バイオフィームの形成量や生存率を測定することで、バイオフィームの形成を抑制する薬剤や素材の開発、殺菌剤の検討に利用することができます。既存法の課題であった均一なバイオフィーム形成をピンプレートや試験片に形成させることで、簡便に培養や形成量の測定、バイオフィーム中の微生物の生存率を、精度よく多検体で測定することができます。

■バイオフィームの形成条件や形成量の測定用キット

Biofilm Formation Assay Kit

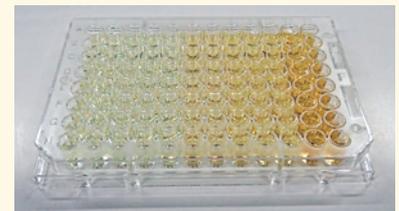
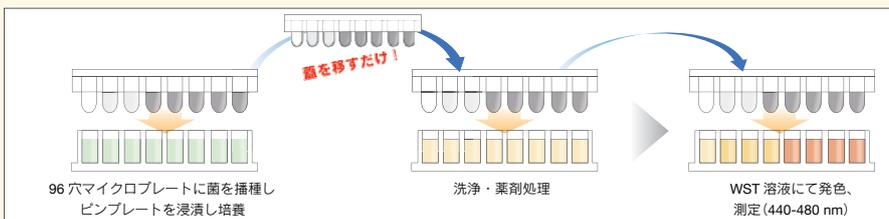
キット法：ピンプレートにバイオフィームを形成



従来のマイクロプレート底面に形成させる方法では難しかった均一なバイオフィームをピンプレートに形成させ測定することで、ばらつきの少ないデータを精度よく測定できます。バイオフィーム形成条件の検討にご利用できます。

■バイオフィーム中の微生物生存率の測定用キット

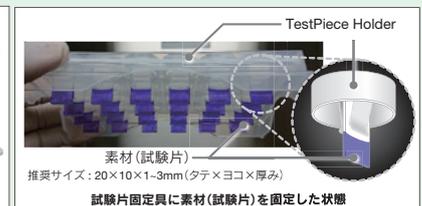
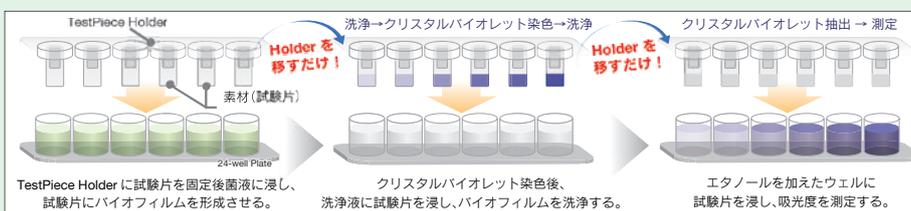
Biofilm Viability Assay Kit



ピンプレートに形成させたバイオフィーム中の微生物生存率をWST法によって測定できます。バイオフィーム内微生物に対する抗菌剤の検討などに利用できます。

■抗菌素材の開発に役立つ試験片用の測定キット

Biofilm TestPiece Assay Kit



試験片素材をホルダーに固定して均一なバイオフィームを形成させ、クリスタルバイオレット法で測定することで、抗菌性素材の開発に利用できます。

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
Biofilm Viability Assay Kit	96 tests	20,000	B603
Biofilm TestPiece Assay Kit	24 tests	26,800	B606

第 33 回フォーラム・イン・ドージン開催後記 「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～」

今年のフォーラムもオンライン開催の形式をとったが、演者の先生方には熊本にお越しいただき、液-液相分離の最新のご研究内容を熊本より発信していただいた。本フォーラム代表世話人の熊本大学富澤一仁先生から、「近年のホットな話題である液-液相分離研究は生物学、診断、治療の分野で大変注目されている。今回は、本フォーラムでご講演いただく白木先生が造語された、“相分離生物学”および“相分離メガネ”をフォーラムの表題に採用させていただいた。相分離研究が世界をリードする研究に発展することを期待して本フォーラムを開催する」と述べられ、午前のセッションがスタートした。

最初の演者である筑波大学白木賢太郎先生は、相分離研究のスタートとなった細胞内の P 顆粒に液体の性質があるという研究紹介から、タンパク質の凝集と相分離および凝集抑制剤についての概要を説明された。リゾチームとアルブミンの水溶液を混ぜると即座に相分離を起こすことで白濁し、塩水を加えると相分離が解消され透明になるという相分離現象の例を示された。アルギニンは分子内のグアニジウム基がタンパク質中のチロシンの芳香族とカチオン- π 相互作用により凝集を防ぐ。RGG と YGG のアミノ酸配列は相分離を起こしやすい構造と説明された。細胞内で見えないことを試験管内で現象を起こさせることで、細胞内で起きている現象を説明できるのではないかと締めくくられた。続いて University of Texas Southwestern Medical Center の加藤昌人先生は、RNA 結合タンパクの hnRNP タンパク質は可逆性の cross β 繊維を形成するが、その low-complexity domain (LCD) に保存されたアスパラギン酸が変異すると不可逆性の cross β 繊維となり凝集する。TDP-43 は LCD 領域にあるメチオニンの変異により、FUS は LCD 領域にあるグリシンの変異によりそれぞれ安定な cross β 構造となり凝集する。以上のことから神経変性疾患を引き起こす LCD 内の gain-of-function (機能獲得) 変異の分子メカニズムの一端が明らかになったと説明された。大阪大学廣瀬哲郎先生は、非膜オルガネラ骨格として働く lncRNA を発見され、architectural RNA (arcRNA) と命名された。そして NEAT1_2 lncRNA は核内非膜オルガネラのパラスペックルの構造骨格として働くことを見出され、パラスペックルはブロック共重合体の高分子ミセルとして振る舞うことを提唱された。さらに arcRNA を骨格に相分離形成される非膜オルガネラの作動として提唱されている、「るつぽ機能」、「スポンジ機能」、「ハブ機能」についての詳細を説明された。

午後のセッションは熊本大学塩田倫史先生のご講演から始まった。塩田先生は、グアニンリッチ配列の伸長によるリピート病において、G4 の異常形成が神経変性疾患に関与することを説明された。脆弱 X 随伴振戦 / 失調症候群 (FXTAS) では FMR1 遺伝子の 5' 非翻訳領域に CGG リピート伸長が見られ、RNA 毒性が観察される。 α -synuclein は G4RNA と結合することでゾルーゲル相御転移経路後凝集体を形成し、tau タンパク質も G4RNA に結

合しゾルーゲル相転移を起こすことを報告された。大阪大学甲斐歳恵先生は、動物の生殖細胞にある非膜オルガネラで RNA- タンパク質複合体であるヌアージュの構築原理とその機能について講演された。トランスポゾン抑制に働く piRNA はヌアージュで合成されるが、そのヌアージュ形成に Tejas (Tej) が重要な役割を果たすことを明らかにされた。また piRNA 産生過程においては Tej が Vas、Spn-E と協働的に働き、piRNA 前駆体のプロセシングに重要な役割を果たしていることを解明された。

コーヒーブレークの後、京都大学吉村成弘先生は、電荷ブロック駆動型液-液相分離とリン酸による制御機構について発表された。リン酸化による「電荷ブロック」の増強・減弱が液-液相分離を亢進・抑制することを突き止められ、1) 特定のアミノ酸残基のリン酸化ではなく、ブロックの電荷変化が重要、2) 正・負両方のブロックが存在すると相分離は促進される、3) ブロックの大きさは数十アミノ酸、とまとめられていた。北海道大学藤岡優子先生は、オートファジーの開始に形成される pre-autophagosomal structure (PAS) が液-液相分離状態であることを明らかにされた。栄養豊富な条件下では、TORC1 により Atg1 複合体中の Atg13 がリン酸化されることで PAS の形成が阻害され、飢餓状態では Atg13 が脱リン酸化され他の Atg タンパク質と液-液相分離を起こし、液滴からオートファゴソームが形成されることを解明された。

世話人である熊本大学三隅将吾先生は、「分子集合物が如何にして働くのか」がかなりのレベルで分かってきた。相分離がきちんと起こらなければ細胞恒常性の機能破綻が起こり、最終的には疾患を発症するという流れが見えてきている。今回参加していただいた方と第 34 回フォーラムでお会いできることを楽しみにしている。」とフォーラムを締めくくられた。

最後にあたり、フォーラムに関するご意見、今後フォーラムに取り上げてもらいたいテーマ等あれば当社マーケティング部までご連絡いただきたい (<https://www.dojindo.co.jp/contact/>)。
(石山宗孝)



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②