

神経変性疾患

—総説—

精神神経疾患と脂質代謝～スフィンゴ脂質をターゲットとした新たな治療戦略の可能性～

崇城大学 江崎 加代子

—連載—

生命科学の最前線 ～熊本大学若手研究者の現場から～ ⑤

RNA 高次構造と遺伝子発現制御との関連性について

熊本大学 五木 結愛、勝田 陽介

—注目の研究—

低分子化合物を用いた α -シヌクレインのアミロイド線維化の検出

株式会社同仁化学研究所 村井 雅樹

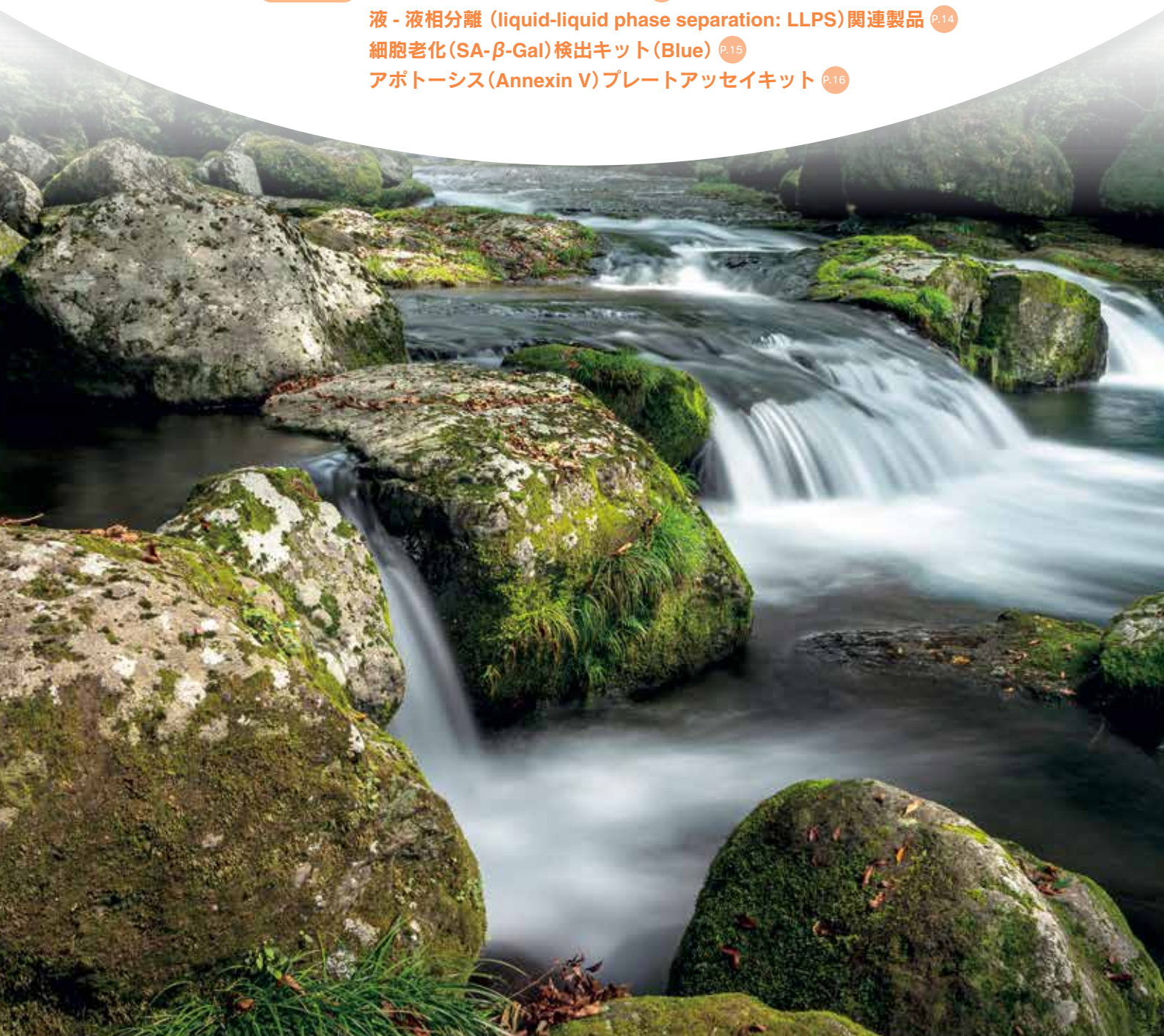
新製品

オートファジー経路測定キット P.7

液-液相分離 (liquid-liquid phase separation: LLPS) 関連製品 P.14

細胞老化 (SA- β -Gal) 検出キット (Blue) P.15

アポトーシス (Annexin V) プレートアッセイキット P.16



CONTENTS

Review

精神神経疾患と脂質代謝～スフィンゴ脂質をターゲットとした新たな治療戦略の可能性～

Neuropsychiatric Disorders and Lipid Metabolism: Potential for New Therapeutic Strategies Targeting Sphingolipids

崇城大学 江崎 加代子

1

Topics on Chemistry

低分子化合物を用いた α -シヌクレインのアミロイド線維化の検出

株式会社同仁化学研究所 村井 雅樹

4

連載

生命科学の最前線～熊本大学若手研究者の現場から～ ⑤

RNA 高次構造と遺伝子発現制御との関連性について

Causative Links between RNA Higher-Order Structures and Controlling Gene Expression

熊本大学大学院 五木 結愛、勝田 陽介

10

Commercial

新製品

オートファジー経路測定キット	7
液-液相分離 (liquid-liquid phase separation: LLPS) 関連製品	14
細胞老化 (SA- β -Gal) 検出キット (Blue)	15
アポトーシス (Annexin V) プレートアッセイキット	16

関連製品

脂肪滴染色蛍光試薬	5
脂肪滴測定キット	5
オートファジー検出試薬	6
ミトコンドリア関連製品	8
フェロトーシス関連製品	9

お役立ち

第二研究所 新棟完成のご案内	13
研究助成金募集のご案内	13
学会展示のご案内	13
酵素活性、阻害活性分析のご案内ー同仁グローバルー	17
フォーラム開催告知	18

※希望納入価格には消費税等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。

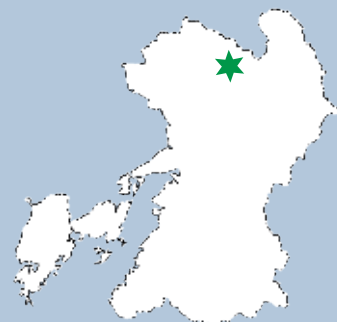
※掲載製品は試験・研究用のみに使用するものです。医療用その他の目的には使用できません。



表紙：菊池市 菊池渓谷

夏から秋への季節が変わる頃、
木々の色の変化を撮影した。

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

精神神経疾患と脂質代謝～スフィンゴ脂質をターゲットとした新たな治療戦略の可能性～ Neuropsychiatric Disorders and Lipid Metabolism: Potential for New Therapeutic Strategies Targeting Sphingolipids



江崎 加代子

崇城大学生物生命学部
生物生命学科
准教授

Abstract

Sphingolipids are components of cell membranes and play important roles in brain development and neurological function. In recent years, several studies have reported changes in sphingolipid metabolism in neurodegenerative diseases, such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and hereditary sensory and autonomic neuropathy (HSAN), and psychiatric disorders, such as schizophrenia, suggesting the involvement of sphingolipid metabolism in the pathogenesis of these diseases. Since patients with neurodegenerative diseases may also suffer from psychiatric disorders, sphingolipids are suspected to be involved in one of the molecular mechanisms linking these diseases. In this article, I introduce the metabolic abnormalities of sphingolipids in neurodegenerative disease- and psychiatric disorder-related studies based on recent findings from our group.

1. はじめに

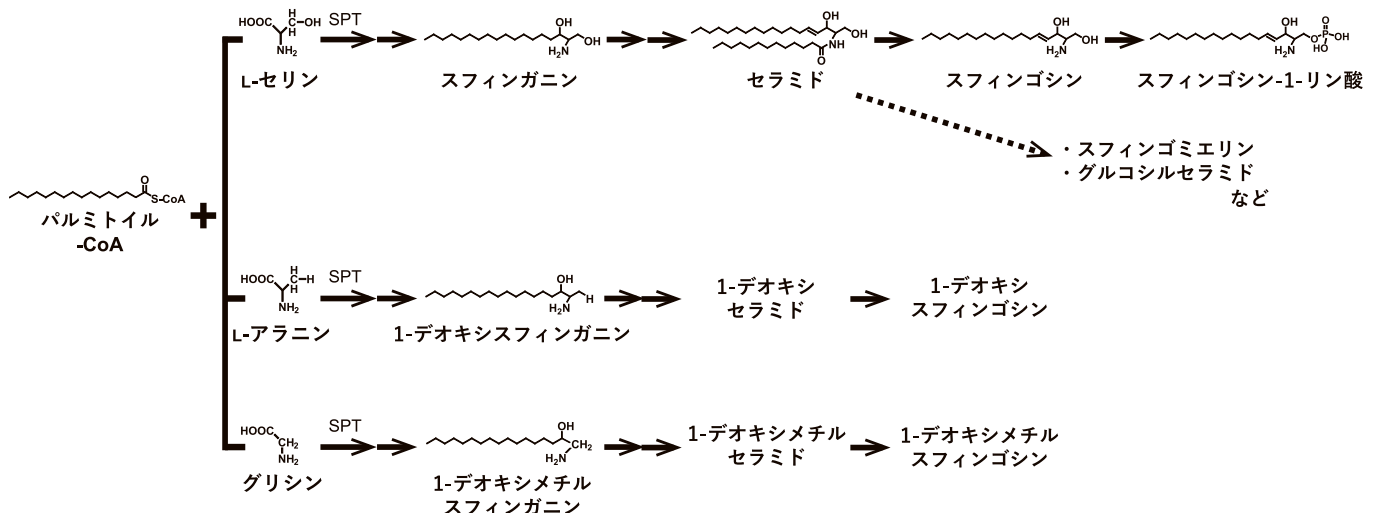
スフィンゴ脂質は、細胞膜の構成要素であり、脳の発達や神経機能などで重要な役割を果たすことが知られている。近年、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) や遺伝性感覚性自律神経性ニューロパチー (HSAN) などの神経変性疾患や、統合失調症などの精神疾患におけるスフィンゴ脂質代謝酵素遺伝子の変異やスフィンゴ脂質代謝の変化が複数報告されており、これら疾患の病態発症メカニズムへのスフィンゴ脂質代謝の関与が示唆されている。神経変性疾患患者においては、精神疾患を併発する場合もあることから、神経を軸とした二つの疾患をつなぐ分子機構の一つとしてスフィンゴ脂質の関与が疑われる。本稿では、我々のグループの最近の研究成果も踏まえて筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患および精神疾患関連の研究におけるスフィンゴ脂質の代謝異常について紹介する。

2. スフィンゴ脂質の代謝

スフィンゴ脂質は、スフィンゴイド塩基を骨格として持つ脂質の総称である。スフィンゴ脂質には、グリセロ脂質の骨格には存

在しない窒素原子を含んでいるという構造的特徴があり、その窒素原子はアミノ酸のL-セリンに由来する。スフィンゴ脂質は受容体を介した機能がよく知られており、ミエリン形成や免疫などの様々な細胞機能に関与するシグナル伝達カスケードの重要なメディエーターである。また、細胞膜の構成成分としても知られており、特にミエリンなど中枢神経系では特に豊富に含まれる。

主要なスフィンゴ脂質の *de novo* 合成は、セリンパルミトイル転移酵素 (SPT) による、アミノ酸 L-セリンとパルミトイル CoA の縮合で始まり、スフィンゴイド塩基のアミノ基に脂肪酸が結合してセラミドが生成される。セラミドに糖やホスホコリンなどが結合することで、グルコシルセラミドやスフィンゴミエリンなどが合成される。さらに、セラミドが分解されてスフィンゴシンやスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) なども生成される¹⁾。また、変異型 SPT などでは、L-セリンの代わりにL-アラニンまたはグリシンとパルミトイル CoA の縮合でスフィンゴ脂質の合成が開始され、C1 水酸基を欠くデオキシスフィンゴ脂質が生成される (図1)。デオキシスフィンゴ脂質は、ミトコンドリア障害を引き起こし、特に神経細胞に強い毒性を示すことが報告さ



れている²⁾。

3. セリンパルミトイル転移酵素 (SPT)

スフィンゴ脂質合成の初発段階を担う酵素はセリンパルミトイル転移酵素 (serine palmitoyltransferase; SPT) であり、セリンとパルミトイル CoA とを縮合してケトジヒドロスフィンゴシンを生成する。SPT は、3 種類のサブユニット SPTLC1、SPTLC2、SPTLC3 が構成成分として知られており、SPTLC1/SPTLC2 または SPTLC1/SPTLC3 のヘテロ二量体を形成する。スフィンゴ脂質の *de novo* 合成で主に生成されるスフィンゴイド塩基は C18 スフィンゴシンであるが、SPTLC3 が SPT の構成成分として含まれる場合には、基質として用いる脂肪酸の幅が広がり C16 から C22 スフィンゴシンが生成される。また、SPTSSA (serine palmitoyltransferase small subunit A) または SPTSSB が前述のヘテロ二量体と結合して機能し、SPT の脂肪酸への基質特異性に関与する。SPTSSA が結合した場合にはパルミトイル CoA への親和性が高くなるため C18 スフィンゴシン、SPTSSB ではステアロイル CoA への親和性が高くなるため C20 スフィンゴシンが生成される。さらに、SPT の活性制御として、SPTSSA および SPTSSB は活性を正に制御し、一方で ORM/ORMDL ファミリータンパク質は負に制御することも知られている³⁾。

4. 筋萎縮性側索硬化症におけるスフィンゴ脂質過剰産生

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、上位運動ニューロンと下位運動ニューロンの進行性変性を特徴とする神経変性疾患である。ALS が進行すると、上肢や下肢の筋力低下、口輪筋や呼吸筋の筋力低下を呈する。ALS の発症率は 10 万人あたり約 2 人で、50-70 歳で発症することが多いが、40 歳未満で発症する若年発症の ALS も知られている。発症からの平均生存期間は 2 ~ 4 年であり、患者の約 50% は運動障害に加えて認知症などの症状がある程度認められる。また、症例の約 10% は家族性で、C9orf72、SOD1、FUS、TDP43 など 30 以上の遺伝子が ALS の原因遺伝子または関連遺伝子として同定されている⁴⁾。

近年、若年性 ALS の家系において SPTLC1 遺伝子における変異が同定された。この変異は、SPT 活性を負に制御する ORMDL と相互作用する膜貫通ドメインに位置することから、SPT 活性の制御異常によるスフィンゴ脂質過剰産生が疑われた。そこで、ALS 型変異を有する SPTLC1 遺伝子を発現させた HEK293 細胞を用い、安定同位体標識した L-セリンを添加して *de novo* スフィンゴ脂質合成能の変化が検討された。その結果、ALS 型変異 SPTLC1 発現細胞において顕著なスフィンゴ脂質合成能の上昇が観察された⁵⁾。また、筆者らは ALS 患者で新たに同定した、ORMDL3 に隣接する部位の SPTLC2 変異を有する ALS 発症者と、同一家系の変異を有しない非発症者の血漿について、LC-ESI-MS/MS を用いてスフィンゴ脂質分析を行った (図 2)。その結果、ALS 発症者群の血漿において、デオキシスフィンゴ脂質を含むスフィンゴ脂質の有意な増加が観察された。これらのことから、過剰なスフィンゴ脂質合成が ALS の病態発症メカニズムに関与することが明らかになった⁶⁾。

5. 遺伝性感覚性自律神経性ニューロパチーにおけるデオキシスフィンゴ脂質合成

遺伝性感覚性自律神経性ニューロパチー (HSAN) は、主に感覚神経に影響を及ぼす遺伝性の神経疾患である。痛覚障害による外傷に起因する感染により、壊疽・潰瘍や骨髄炎をおこし、足趾などの切断にいたる場合も少なくない。また、無汗症などの自律神経症状もみられる。HSAN 患者においては、SPTLC1 遺伝子ま

たは SPTLC2 遺伝子のミスセンス変異が同定されており、これらの変異によって SPT の基質特異性に影響を与えてアラニンやグリシンへの親和性が高くなり、デオキシスフィンゴ脂質産生が亢進することが報告されている^{2, 7)}。デオキシスフィンゴ脂質は、ミトコンドリアの断片化と機能障害を引き起こすため、特にエネルギー要求量が非常に高い末梢神経においてエネルギー不足を生じさせ、神経障害をもたらすと考えられている⁸⁾。さらに、HSAN1 患者および SPT に変異を有しないⅡ型糖尿病患者において、HSAN1 の末梢神経障害と糖尿病性神経障害の臨床症状は非常によく似ており、血中デオキシスフィンゴ脂質の上昇という代謝的な表現型も一致する。これらのことから、両疾患の病態にデオキシスフィンゴ脂質が関与していることが示唆されている⁹⁾。

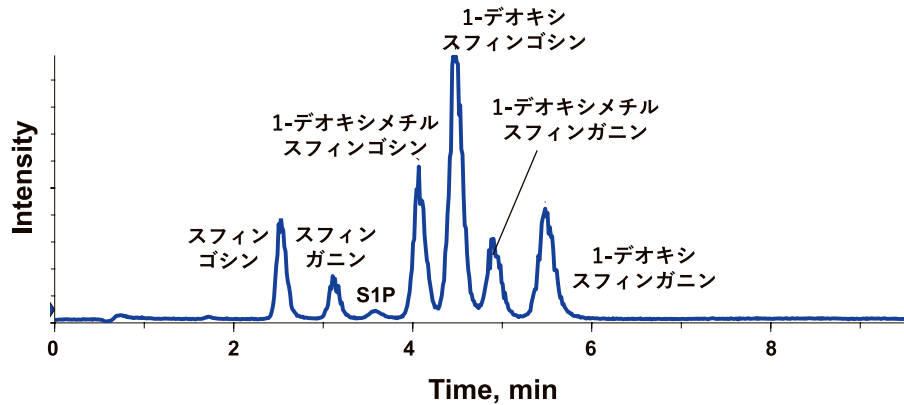
また、デオキシスフィンゴ脂質の合成は、変異型 SPT によって顕著に誘導されるが、SPT に変異がない場合でもアミノ酸のアラニン/セリン比が上昇することで合成量が増加することが筆者らのこれまでの研究において明らかになっている¹⁰⁾。抗がん剤のパクリタキセルは、セリンレベルの低下および血中デオキシスフィンゴ脂質の上昇を引き起こす。パクリタキセルは副作用として末梢神経障害を生じるが、神経障害の発症率および重症度とデオキシスフィンゴ脂質レベルとの間に相関があることが報告されている¹¹⁾。糖尿病においても血中アラニンの上昇を伴う報告が複数あることから、アラニン/セリン比の上昇を伴う神経障害においてデオキシスフィンゴ脂質が疾患の分子メカニズムに関与する可能性は少なくないと考えられる。

6. 精神疾患におけるスフィンゴ脂質代謝異常

統合失調症は生涯リスクが約 1% の重度の精神疾患である。幻覚、妄想などの陽性症状、情動の平板化や自閉などの陰性症状、および認知機能障害を特徴とし、思春期から青年期の 10 代後半から 30 代に発症することが多い。統合失調症患者において脳梁を含む脳白質の容積の減少は数多く報告されており、患者の陰性症状と相関することが示されている¹²⁾。加えて、統合失調症患者において、セリンなどのアミノ酸濃度や代謝酵素発現の変化、そしてスフィンゴ脂質の代謝変化が明らかになっている^{13, 14)}。そこで筆者らは、スフィンゴ脂質代謝と統合失調症病態の関連の解明を目指し、統合失調症患者群と対象群の死後脳のスフィンゴ脂質分析を行った。その結果、統合失調症患者の脳白質において S1P が約 30% 有意に減少していることが明らかになった。さらに、S1P の代謝酵素および受容体の遺伝子解析を行ったところ、統合失調症患者の脳白質において、S1P 分解の亢進による S1P 含量低下、およびその代償反応としての S1P 受容体遺伝子発現レベル上昇が引き起こされている可能性が示唆された¹⁵⁾。

スフィンゴ脂質の一つで重要なシグナル伝達分子である S1P は、S1P 受容体を介して神経細胞の突起伸長やミエリン形成、造血細胞輸送、免疫細胞の運命決定を含む様々な機能の制御に関与している¹⁶⁾。最近の研究では、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病などの神経変性疾患患者やそれらのモデルマウスにおいて、S1P 含有量や S1P 代謝に関連する遺伝子やタンパク質の発現レベルが低下することが報告されている¹⁷⁻²⁰⁾。したがって、我々の知見は、統合失調症患者の神経炎症、白質の減少、血液脳関門統合性やオートファジーの調節不全等の病理形成メカニズムに S1P 含量低下が関与する可能性を示した。また、(SO+Cer)/S1P 比の上昇は、アポトーシス、細胞周期の停止、細胞生存および細胞増殖の抑制を誘導する。我々は、この比率が統合失調症患者群において対照群よりも高い傾向を示すことを発見した。さらに、認知症を伴うことの多い ALS においても (SO+Cer)/S1P 比の上昇が観察されており⁶⁾、神経変性疾患における精神障害にスフィンゴ脂質バランスの崩壊が関与する可能性が考えられる。

塩基型分子の解析



脂肪酸付加型分子の解析

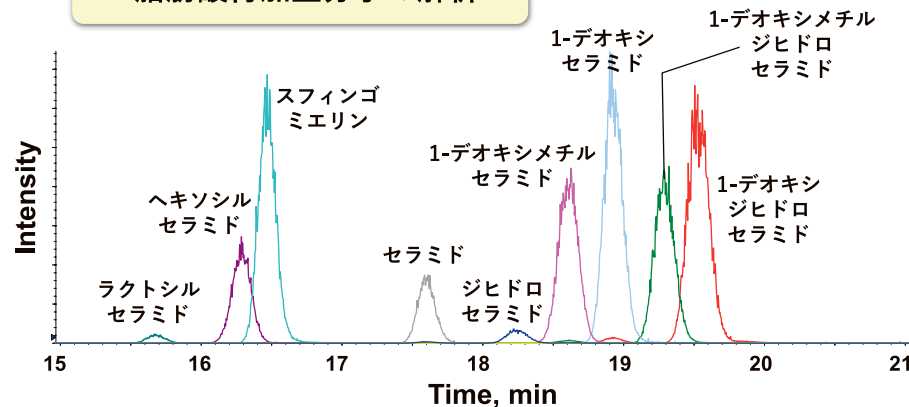


図2 LC-ESI-MS/MS を用いたスフィンゴ脂質解析

7. おわりに

近年、新たに発見された非定型デオキシスフィンゴ脂質は機能や代謝について未だ不明な点が多い。軸索が長いことからエネルギー要求量が非常に大きい末梢神経は、エネルギー不足に対して脆弱である。デオキシスフィンゴ脂質はミトコンドリア障害を引き起こすため、デオキシスフィンゴ脂質の合成が誘導される末梢神経障害の分子機構において重要な役割を果たしていると考えられている。また、ALS や精神疾患においてスフィンゴ脂質の過剰産生や含量低下などの代謝異常が報告されている。これらは、非定型デオキシスフィンゴ脂質の毒性だけでなく、スフィンゴ脂質合成/バランスの崩壊が病理形成メカニズムに関与する可能性を示しており、末梢神経だけでなく中枢神経におけるスフィンゴ脂質の機能や代謝経路を明らかにすることが今後の重要な研究課題であると考えられる。これらを解明することがスフィンゴ脂質の代謝制御をターゲットとした治療法の開発に繋がり、神経変性疾患および精神疾患における新たな治療戦略となることが期待される。

【参考文献】

- 1) N. Bartke and Y. A. Hannun, *J. Lipid Res.*, **2009**, 50 Suppl, S91-96.
- 2) A. Penno *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2010**, 285, 11178-11187.
- 3) S. Li *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2021**, 28, 249-257.
- 4) R. J. Mead *et al.*, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2023**, 22, 185-212.
- 5) P. Mohassel *et al.*, *Nat. Med.*, **2021**, 27, 1197-1204.
- 6) H. Naruse *et al.*, *Ann. Clin. Transl. Neurol.*, **2024**, 11, 946-957.
- 7) H. Bode *et al.*, *Hum. Mol. Genet.*, **2016**, 25, 853-865.

- 8) I. Alecu *et al.*, *J. Lipid Res.*, **2017**, 58, 42-59.
- 9) M. Berteau *et al.*, *Lipids Health Dis.*, **2010**, 9, 84.
- 10) K. Esaki *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2015**, 290, 14595-14609.
- 11) R. Kramer *et al.*, *FASEB J.*, **2015**, 29, 4461-4472.
- 12) E. C. Del Re *et al.*, *Brain Imaging Behav.*, **2016**, 10, 1264-1273.
- 13) I. Bendikov *et al.*, *Schizophr. Res.*, **2007**, 90, 41-51.
- 14) S. Narayan and E. A. Thomas, *Front Biosci. (Landmark Ed.)*, **2011**, 16, 1797-1810.
- 15) K. Esaki *et al.*, *Schizophr. Bull.*, **2020**, 46(5), 1172-1181.
- 16) A. Cartier and T. Hla, *Science*, **2019**, 366, eaar5551.
- 17) J. Ceccom *et al.*, *Acta. Neuropathol. Commun.*, **2014**, 2, 12.
- 18) T. A. Couttas *et al.*, *Acta. Neuropathol. Commun.*, **2014**, 2, 9.
- 19) M. Sivasubramanian *et al.*, *Neuroscience*, **2015**, 290, 636-648.
- 20) A. Di Pardo *et al.*, *Sci. Rep.*, **2017**, 7, 5280.

【著者プロフィール】

氏名：江崎 加代子 (Kayoko Esaki)
 所属：崇城大学 生物生命学部 生物生命学科
 〒 860-0082 熊本県熊本市西区池田 4-22-1
 Tel : 096-326-3693

E-mail : esaki@bio.sojo-u.ac.jp

出身学校：宮崎大学／九州大学大学院

学位：博士（農学）

専門分野：脂質生化学

現在の研究テーマ：スフィンゴ脂質の機能や代謝

Topics on Chemistry

低分子化合物を用いた α -シヌクレインのアミロイド線維化の検出

株式会社同仁化学研究所 村井 雅樹

神経変性疾患とは、神経組織の変性が進行し障害が発生する病気の総称である。発症の原因が分からず、対処療法しかないため難病に指定されている。代表的な神経変性疾患にはアルツハイマー型認知症、パーキンソン病、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症などがあり、この中でも特に、アルツハイマー型認知症とパーキンソン病は患者数が多く全世界での患者数は5000万人以上とも言われている。神経変性疾患の発症から進行とともに、神経細胞に起こる変化として、異常タンパク質の蓄積やミトコンドリア機能不全が起こり、神経細胞の機能が障害される。神経変性疾患の一種である、パーキンソン病ではドーパミンを産生する神経細胞に変性が起こり、異常タンパク質が蓄積することで炎症が発生し、ドーパミン分泌の減少により運動機能が低下する。また、パーキンソン病における異常タンパク質の蓄積は α -シヌクレインの『アミロイド線維化』といわれる凝集体であるとされており、 α -シヌクレインのアミロイド線維化を検出することがパーキンソン病の臨床研究や早期診断に繋がる有用なツールとなると言われている¹⁾。

α -シヌクレインとはパーキンソン病原因遺伝子として最初に発見された14-19 kDaのタンパク質である。パーキンソン病の原因は脳内の黒質でドーパミンを分泌する神経細胞内に生じたレビー小体と言われているが²⁾、このレビー小体の主な成分が α -シヌクレインのアミロイド線維である。また、神経細胞内でユビキチン化された α -シヌクレインは液-液相分離し、アミロイド線維化することが示唆されており、パーキンソン病のバイオマーカーとして注目されている³⁾。

現在、 α -シヌクレインを低分子蛍光色素で検出する手法としてThioflavin T (ThT) が使用されている。ThTはベンゾチアゾール基とジメチルアニリンが回転可能な単結合で繋がった構造をしており、 α -シヌクレインと結合すると回転部分が止まり蛍光を発するメカニズムを有している。しかしながら、ThTは α -シヌクレインの重合体しか検出することができず、 α -シヌクレインのアミロイド線維化は検出することができない⁴⁾。パーキンソン病のバイオマーカーとしては α -シヌクレインのアミロイド線維化を検出することが望ましく、新たな検出色素の開発が望まれていた。そこで、Chrisらは α -シヌクレインの重合化、アミロイド線維化を検出できる低分子蛍光色素TPE-TPPを開発した⁴⁾。TPE-TPPはテトラフェニルエチレン基(TPE基)にトリフェニルホスホニウム基(TPP基)を2個付した構造をしており、Chrisらによると α -シヌクレインとTPP基の π - π スタッキング効果により蛍光色素が凝集し蛍光を発する。Chrisらは、さらにTPP基の付加により、 α -シヌクレインの重合体とアミロイド線維化の選択性を持たせ、原子間力顕微鏡において、 α -シヌクレインのアミロイド線維化のタイムラプス測定に成功している。このように、アルツハイマー病のバイオマーカー検出に有能なTPE-TPPだが、一方で、蛍光骨格がTPE基のため、UV励起でしか検出できず、蛍光顕微鏡での検出には向いていない。パーキンソン病ではミトコンドリアの機能不全が起こるため、『 α -シヌクレインのアミロイド線維化』と『ミトコンドリアの機能不全』を同時に検出することができれば、パーキンソン病の解明や早期発見のための基礎実験において強力なツールになると考えられる。仮に、TPE-TPPの蛍光特性を長波長化できれば、TPE-TPPはTPP基を付していることから、ミトコンドリアに集積する可能性が高い。そのためパーキンソン病と関連するミトコンドリア損傷と α -シヌクレインのアミロイド線維化の同時検出が可能になると考えられる。

一方で、臨床への応用としては、 α -シヌクレインの蓄積に対し陽電子断層撮影法(PET)での検出が望まれている。これに対し、遠藤らは、 α -シヌクレイン蓄積に対して強い結合を示す化合物C05-05を化合物スクリーニングから同定し、PETイメージングに適用させるため、 ^{18}F 放射性同位体を組み込んだ ^{18}F -C05-05を開発した⁵⁾。これまでも ^{18}F 放射性同位体を組み込んだ蛍光プローブは開発されていたが、神経変性疾患の中でもパーキンソン病やレビー小体型認知症では α -シヌクレイン病変量が非常に少ないため、病変を捉えることはできなかった。これに対し、脳内で持続的に高い濃度が維持される ^{18}F -C05-05は、 α -シヌクレイン蓄積を高感度に検出できる。実際に、遠藤らは、 ^{18}F -C05-05を使ってパーキンソン病とレビー小体型認知症のモデル動物と患者の脳内における α -シヌクレインの可視化に成功している。今後、TPP-TPEや ^{18}F -C05-05のようなイメージング試薬により神経変性疾患の病態の解明や治療薬への応用が期待される。

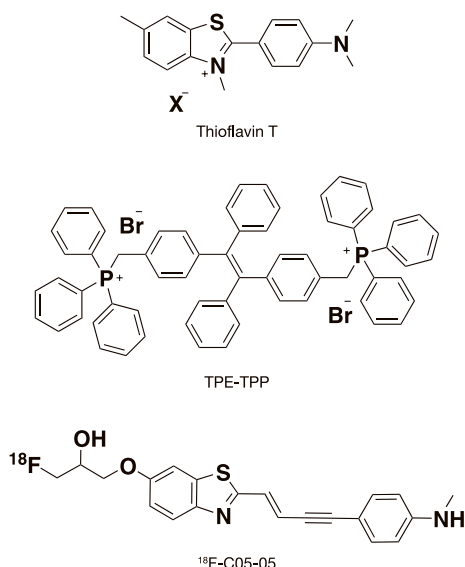


図1 Thioflavin T, TPE-TPP, ^{18}F -C05-05の化学構造式

[参考文献]

- 1) A. Parvez et al., "α-synuclein oligomers and fibrils: a spectrum of species, a spectrum of toxicities", *Journal of Neurochemistry*, **2019**, 150, 522-534.
- 2) C. Paolo et al., "Alpha-synuclein in Parkinson's disease and other synucleinopathies: from overt neurodegeneration back to early synaptic dysfunction", *Cell Death & Disease*, **2023**, 14, 176.
- 3) B. T. Cookson et al., "Modulating α-Synuclein Liquid-Liquid Phase Separation", *Biochemistry*, **2021**, 60, 48, 3676-3696.
- 4) W. T. L. Chris et al., "Detection of Oligomers and Fibrils of α-Synuclein by AIE-gen with Strong Fluorescence", *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 1866.
- 5) H. Endo et al., "Imaging α-synuclein pathologies in animal models and patients with Parkinson's and related diseases", *Neuron*, **2024**, 120, 1-18.

関連製品

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

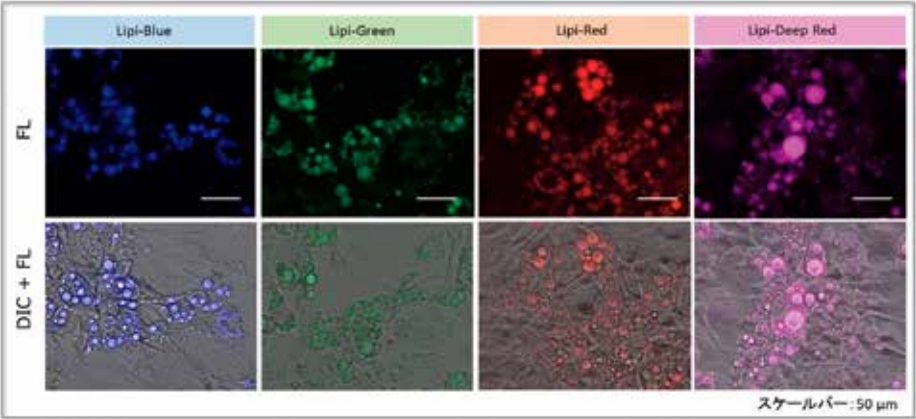
滞留性のデータや参考文献はこちら

脂肪滴 同仁 検索

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。
※ Nile Red との比較

<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 x 10⁴ cells/well) に各色素の Working solution を添加後 37℃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 μmol/l

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Lipi-Blue	10 nmol	21,300	LD01
Lipi-Green	10 nmol	21,300	LD02
Lipi-Red	100 nmol	21,300	LD03
Lipi-Deep Red	10 nmol	20,700	LD04

脂肪滴測定キット

Lipid Droplet Assay Kit Blue / Deep Red

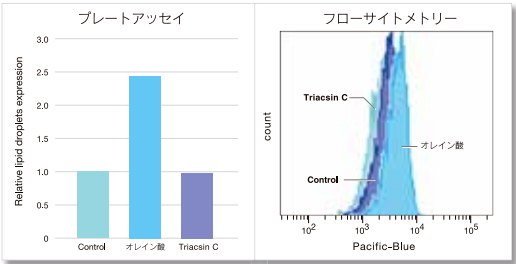
<特長>

- ・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 >

A549 細胞（プレートアッセイ）と HeLa 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	28,700	LD05
Lipid Droplet Assay Kit - Deep Red	1 set	28,700	LD06

関連製品

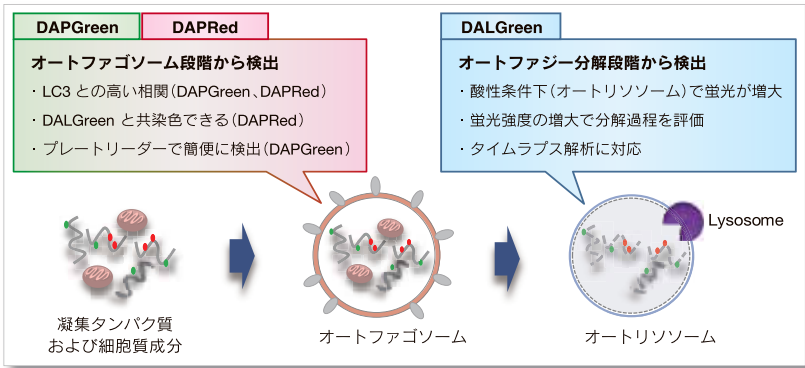
オートファジー検出試薬

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単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。



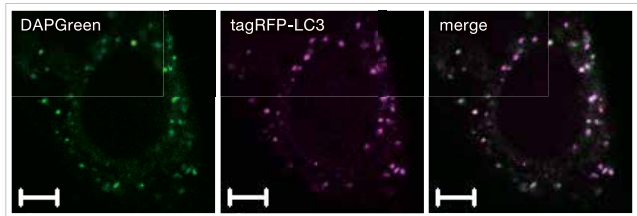
特性比較

	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	○	○	○	$\lambda_{ex} = 425-475 \text{ nm}^*$ $\lambda_{em} = 500-560 \text{ nm}$	35 mm dish: 25 枚分 (0.1 $\mu\text{mol/l}$ で使用時)	LC3-GFP MDC Cyto-ID など
DAPRed	○	×	×	$\lambda_{ex} = 500-560 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 690-750 \text{ nm}$	35 mm dish: 25 枚分 (0.1 $\mu\text{mol/l}$ で使用時)	
DALGreen	○	○	×	$\lambda_{ex} = 350-450 \text{ nm}^*$ $\lambda_{em} = 500-560 \text{ nm}$	35 mm dish: 10 枚分 (1.0 $\mu\text{mol/l}$ で使用時)	LC3-GFP-RFP など

*共焦点顕微鏡では 488 nm にて励起可能

LC3との高い相関 DAPGreen

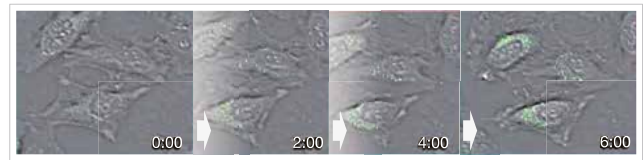
RFP-LC3 発現 HeLa 細胞に DAPGreen を添加後、Rapamycin によりオートファジーを誘導しました。その結果、DAPGreen と、LC3 が共局在する結果が得られました。



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。その結果、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	42,600	D677
DAPGreen - Autophagy Detection	5 nmol	43,800	D676
DALGreen - Autophagy Detection	20 nmol	34,100	D675

新製品

オートファジー経路測定キット

Autophagic Flux Assay Kit

<特長>

- ・オートファジーの誘導もしくはオートリソソームの阻害を解析できる
- ・誘導評価、阻害評価それぞれのプロトコルを準備
- ・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の不要なタンパク質や細胞小器官の再利用による代謝分解過程の現象ですが、パーキンソン病などの神経変性疾患や老化にも関わりがあることが分かってきており盛んに研究されています。近年では、オートファゴソームが増えた要因がオートファジー誘導によるものなのか、それともオートリソソーム阻害によるものなのかを区別することが求められてきており、オートファジー過程の流れ（Flux）を理解することが重視されています。

本キットは、オートファゴソームの形成からオートリソソームの分解までをモニタリングし、オートファジーの活性を正しく評価するために、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、さらにリソソーム酸性化阻害剤 Bafilomycin A1 を同梱しています¹⁾。

<原理>

本キットに同梱される 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。このように 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^{2, 3)}。

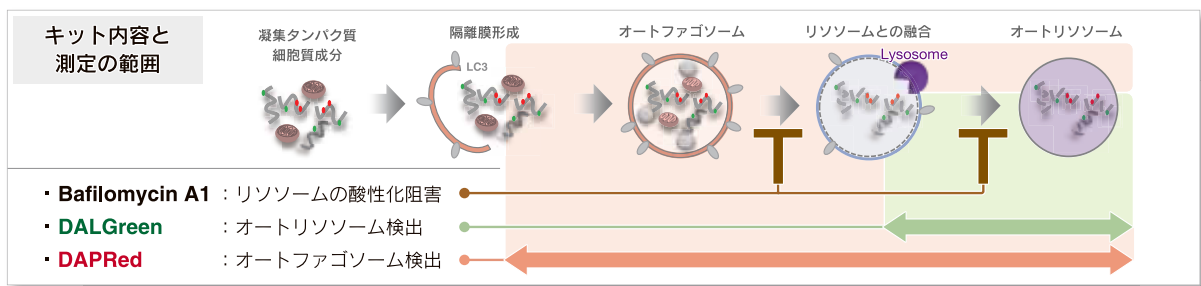
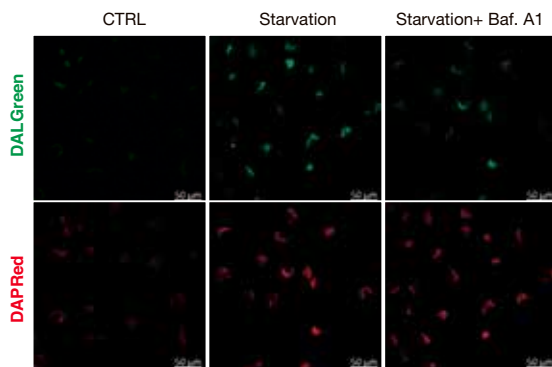


図1 DAPRed と DALGreen の同時測定によるオートファジー経路解析

<オートファジー経路の解析例>

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。コントロール実験として HeLa 細胞をアミノ酸不含培地で培養し、飢餓培養によるオートファジーの誘導が DAPRed と DALGreen の蛍光増加により確認できました。一方で、Baf. A1 を添加した場合には、DAPRed の蛍光は増加しましたが、DALGreen の蛍光は低下することが観察されました。この結果から、オートファジー経路はオートリソソームの形成が阻害されたことでオートファゴソームが増加したということがわかります。



【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 = 565-700 nm

Scale bar: 50 μ m

<キットコンポーネント>

- ・オートファゴソームおよびオートリソソーム検出試薬
DAPRed
- ・オートリソソーム検出試薬
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 A1 (Baf. A1) を用いたオートファジー経路の解析

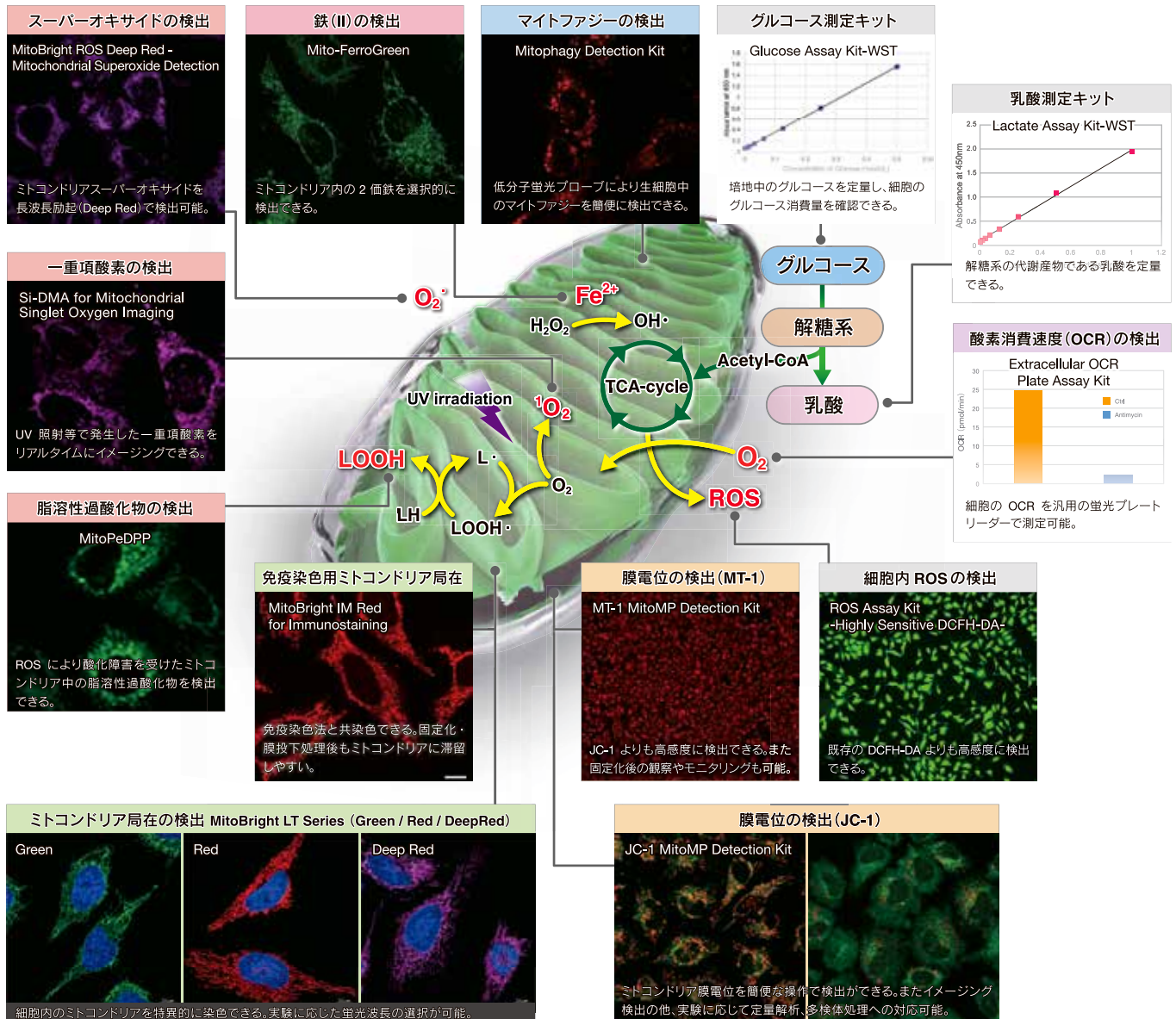
- 1) H. T. Sakurai *et al.*, *iScience*, **2023**, 26, 107218.
- 2) X. Chen *et al.*, *Am. J. Transl. Res.*, **2020**, 12(9), 4902-4922.
- 3) C. Oh *et al.*, *J. Neurosci.*, **2022**, 42(14), 3011-3024.

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

ミトコンドリア関連製品

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の検出 (Mitophagy Detection Kit) をはじめ、ROS (活性酸素種) の検出 (Si-DMA、MitoBright ROS) 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

これから始める
ミトコンドリア検出

★これから始めるミトコンドリア検出★

ミトコンドリア研究を始める方におすすめのガイドをご用意しております。

これから始める ミトコンドリア

検索



関連製品

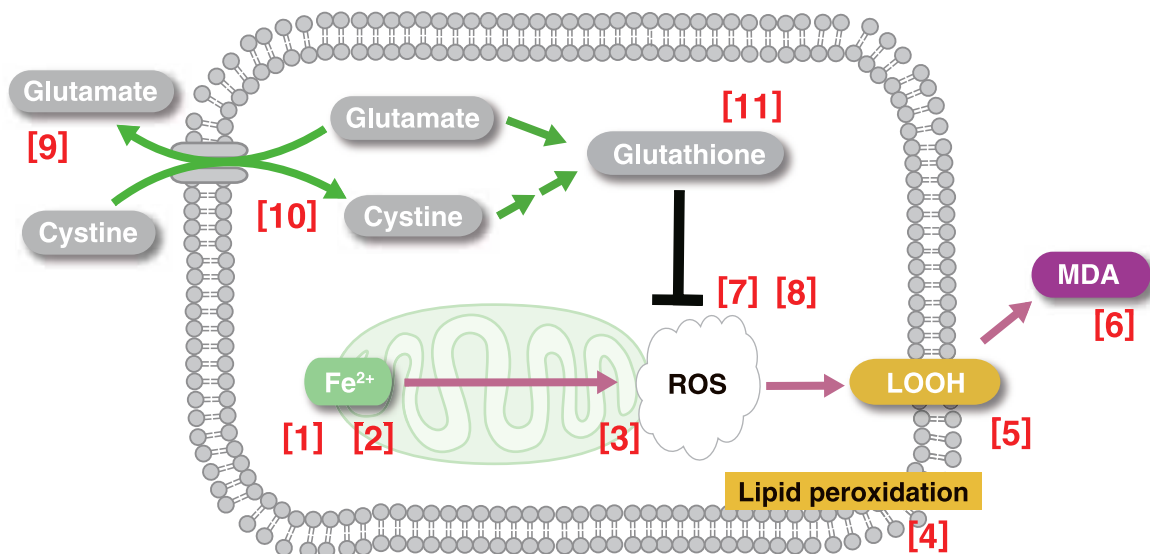
フェロトーシス関連製品

2012年にコロンビア大学の Stockwell らにより、フェロトーシスは新しい細胞死の1つとして提案されました¹⁾。フェロトーシスは、鉄イオン依存性脂質過酸化物の蓄積によって引き起こされる非アポトーシス細胞死として研究されています²⁾。Stockwell らの研究において、小社の Liperfluo が過酸化脂質の検出用の蛍光プローブとして使用されています³⁾。フェロトーシスに関わる指標と関連製品を紹介します。

1) B. R. Stockwell *et al.*, *Cell*, **2012**, 149, 1060-1072.

2) 豊國伸哉, *DOJIN News*, **2017**, 162, 1-3.

3) B. R. Stockwell, *et al.*, *Cell*, **2017**, 171(2), 273-285.



	指標	品名	メーカーコード
[1]	細胞内鉄イオン (Fe^{2+})	FerroOrange	F374
[2]	ミトコンドリア鉄イオン (Fe^{2+})	Mito-FerroGreen	M489
[3]	ミトコンドリア脂質過酸化	MitoPeDPP	M466
[4]	脂質過酸化	Lipid Peroxidation Probe -BDP 581/591 C11-	L267
[5]	過酸化脂質	Liperfluo	L248
[6]	マロンジアルデヒド	MDA Assay Kit	M496
[7]	活性酸素種 (ROS)	ROS Assay Kit -Highly Sensitive DCFH-DA-	R252
[8]	活性酸素種 (ROS)	ROS Assay Kit -Photo-oxidation Resistant DCFH-DA-	R253
[9]	グルタミン酸	Glutamate Assay Kit-WST	G269
[10]	シスチン	Cystine Uptake Assay Kit	UP05
[11]	グルタチオン	GSSG/GSH Quantification Kit	G257

詳しい内容・実験例はこちらから。

メーカーコード 同仁

検索

これから始める

フェロトーシス 検出

★これから始めるフェロトーシス★

初めて学ぶ方、すでに研究中の方におすすめのガイドをご用意しております。

これから始める フェロトーシス

検索



連載

生命科学の最前線

～熊本大学若手研究者の現場から～ ⑤

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。

RNA 高次構造と遺伝子発現制御との関連性について

Causative Links between RNA Higher-Order Structures and Controlling Gene Expression



五木 結愛

熊本大学大学院
先端科学研究部
博士後期課程



勝田 陽介

熊本大学大学院
先端科学研究部
准教授

Abstract

Recent advancements in scientific technology have revealed that RNA, forms complex higher-order structures that play crucial roles within cells. This review focuses on the relationship between RNA's higher-order structures and gene expression, highlighting technological advancements and specific functions.

1. はじめに

我々は高校生物の教科書で「二重螺旋構造の DNA」から転写反応が進行することで「紐状の RNA」が作製され、翻訳反応という過程を踏んで「複雑な構造を持つタンパク質」が出来上がるというプロセスを学習してきた。

複雑な構造を形成しているタンパク質は、熱変性などによって構造が崩れると失活することからもわかる通り、その機能において構造が重要な役割を担っていることが以前から知られていた。ところが近年の科学技術の進歩に伴い、核酸も同様に複雑な高次構造を形成しており、この高次構造が細胞内において重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。

例えばほとんどの領域が相補鎖と二重螺旋構造を形成していると考えられていた DNA に関しては、ゲノム DNA 末端の一本鎖領域でグアニン四重鎖（G4）構造を形成していることが報告されており、神経変性疾患などと密接に関連している可能性が見出されている¹⁾。こうした事実は、相補鎖が存在しない核酸の領域が分子内構造を形成しやすいことを示唆しているとも言える。

つまり、相補鎖が存在しないため一本鎖の状態であると考えられていた RNA は、分子内の塩基対形成などによって DNA と比較してはるかに多様な分子内高次構造を形成していると考えられる。実際に、熱力学的安定性に基づく二次構造予測や構造解析シーケンス技術などによって RNA の高次構造が解き明かされるにしたがって、遺伝子発現など多くの生体内における反応と RNA の構造が密接に関連していることが見出されつつある。

本レビューでは、こうした RNA の複雑な構造と遺伝子発現の

関連性についてまとめる。

2. 「構造」解析技術の発展

RNA の高次構造は、かねてより酵素マッピング法といった生化学的な手法で解析されてきた。この手法は、エンドヌクレアーゼとエキソヌクレアーゼを組み合わせる RNA の一本鎖領域を特定し標的 RNA の全体構造を解明するものである。こうした手法によって塩基配列という一次構造ではなく二次構造が重要な意味を持つハンマーヘッドリボザイムといった「機能的な RNA」の存在が見出され、配列と構造の関連を探る研究の必要性に大きな注目が集まったといえる²⁾。つまり lncRNA のようなタンパク質に翻訳されない RNA は高次構造形成によって生体内で重要な役割を担っており、タンパク質に翻訳される mRNA も単なる遺伝情報の中継ぎではなく高次構造形成によって遺伝子発現を制御している可能性が示唆されるようになり、高次構造解析技術の必要性が認識されるようになったということだ。しかしこうした手法のみで数十万～数百万種存在すると言われていた RNA 全ての高次構造を解き明かすことは非現実的であり、大規模解析を可能とする手法の開発が必要となる。こうした背景から次世代シーケンサー（NGS）といったハイスループットな技術を用いることで網羅的に構造解析を行う研究が進められ、数多くの RNA に対する生化学的な手法での構造解析が可能になってきた³⁻⁵⁾。

また、計算科学に基づく高次構造予測技術も近年著しい発展を遂げている。以前より熱力学的安定性に基づいて RNA の平面構造を予測するツールとして mRNAfold や RNAstructure などが広

く用いられてきた⁶⁾。しかしこれらのツールで予測できるのは局所的な配列情報から算出された構造に限定されている。そこで RNA 全体がとりうる構造を包括的かつ正確に予測するために、AI が活用され始めた。機械学習・深層学習により局所的な配列情報だけでなく RNA 全体の構造を考慮できるようになり、長鎖の RNA に対する計算科学的な手法での構造予測が可能になってきた⁷⁾。

さらに上記の実験や計算に基づいて予測された RNA の高次構造について直接的に観測し、構造を決定する技術も大きく進歩している。以前から、NMR や X 線構造解析技術が RNA の高次構造を解析するために用いられてきた。しかしこれらの技術では RNA の局所的な高次構造やタンパク質との部分的な相互作用を解明するにとどまり、RNA 全体がどのような高次構造をとるかについての情報を取得することは困難であった。こうした背景から cryo EM といった RNA 全体の構造を捉える技術の研究が進められてきた。RNA 全体の構造に対する直接的な情報が得られるようになったことで、長鎖の RNA に対する直接的な構造解明が可能になってきた⁸⁾。

上記のような技術の発展により、RNA の高次構造解析が効率的かつ高精度に行われるようになった。これにより多くの RNA 配列の構造が解明され、その構造が持つ機能が次々と明らかにされている。

3. UTR で形成される高次構造の機能

ヒトを代表とする高度な生命体において、リボソームは mRNA の最上流つまり 5'UTR のキャップ構造にリクルートされ、5'UTR をスキャンし開始コドンからアミノ酸伸長反応を開始する。しかし、ウイルスや細菌といった単純な遺伝子しか持たない生命体（ウイルスを生命と判定するか否かは別として）は、可能な限り多様なタンパク質の発現を可能とするシステムが必要である。この鍵となっている RNA 高次構造が「Internal Ribosome Entry Site: IRES」である。

これは複数のステムループ等から成る複雑な高次構造であり、キャップ構造非依存的にリボソームを mRNA へ直接リクルートする。イメージしやすいように説明するとすれば高速道路のインターチェンジから車が侵入するようなもので、リボソームが 5'UTR の末端であるキャップ構造からではなく、mRNA のいわゆる「端っこではない」領域である IRES からエンタリー下流の遺伝子配列の翻訳が開始される。

IRES はこれまでにウイルスをはじめ様々な生物のゲノムから 100 種類以上が同定されており、高次構造や翻訳開始の作用機序によって 4 つのクラスに分類できることが知られている。Class I に分類される IRES はピコルナウイルス科によく見られ、複数のステムループ構造からなるものの、Class I から Class IV に分類される IRES の中では最もシンプルな構造を形成している⁹⁻¹¹⁾。IRES としての作用機序は eIF4G などの翻訳開始因子と結合することでリボソームのリクルートを促すドメインを有し、一般的な mRNA と同様にリボソームが翻訳を開始する。Class II に分類される IRES は、カルジオウイルス属やアフトウイルス属に多く見られ、Class I と同様にシンプルな高次構造から成る^{12,13)}。この Class に分類される IRES は eIF4G 結合ドメイン直下に開始コドンが存在することから、eIF4G にリクルートされたリボソームは開始コドンを探索する必要なく翻訳を開始することができる特徴がある。つまり Class I と Class II は構造そのものはシンプルであるものの、開始コドンの探索が必要であるか否かで区別化されている。Class III に分類される IRES はフラビウイルス科に多くみられ、ステムループ構造に加えてシュードノット構造などによる複雑な構造を形成している^{14,15)}。eIF3 およびリボソームの小サブユニットは Class III の IRES 上で結合することが

ら、リボソームは IRES 直下の開始コドンからタンパク質翻訳が開始できる。Class IV に分類される IRES はジシストロウイルス科から多数が見つかり、Class III と同様にシュードノット構造を含む複雑な高次構造を形成している¹⁶⁻¹⁸⁾。この Class に分類される IRES は mRNA の翻訳領域上流に存在するのではなく、2 つの翻訳領域の間を繋ぐ IGR (Intergenic Region) に存在し、IRES 下流に位置する遺伝子のタンパク質の翻訳を可能とする。機序としては、Class IV に分類される IRES がリボソームの小サブユニットと大サブユニットの両方をリクルートし、非開始コドンである IRES 直下の GCU (Ala) からの翻訳を促す。

先述のような IRES のケースを除外するとすれば、一般的にリボソームは mRNA の最上流つまり 5'UTR のキャップ構造から侵入し、開始コドンから翻訳を開始する。つまり、このプロセスに影響を与える「何か」はもちろんタンパク質の翻訳反応に影響を与えるだろう。例えば、オルニチン脱炭素酵素 ODC の 5'UTR は GC 含有率が高いため安定した、いわゆる硬いステムループ構造を形成しており、これらがリボソームのスキャンを阻害することでタンパク質翻訳を抑制する¹⁹⁾。また鉄輸送関連遺伝子フェリチンの 5'UTR に存在する鉄応答エレメント (IRE) と呼ばれる構造は、IRP というタンパク質と結合しリボソームが翻訳開始複合体へ結合するのを立体障害によって阻害するため、タンパク質翻訳は抑制される²⁰⁾。

上記した「何か」次第では、タンパク質発現量が減るのみではなく増えるという現象につながることもある。例えばインスリン様成長因子 IGF-1 の 5'UTR のステムループは Poly A Binding Protein (PABP) というタンパク質と結合し、mRNA 上流における翻訳開始複合体の形成を促すことでタンパク質翻訳を促進するケースなどが知られている^{21,22)}。

一方で、mRNA にはリボソームによるタンパク質翻訳反応が終結した後の領域、つまり 3'UTR が存在しており mRNA の安定性と関係していると言われている。もちろんこの領域においても、遺伝子発現に影響を与える「何か」の例は数多く報告されている。例えば、一時的に発現することが重要であることがわかっている免疫関連遺伝子インターロイキン 6 の 3'UTR に存在するステムループ構造が RNA 分解酵素 Rignase-1 と結合し、mRNA そのものの分解速度を上げることでタンパク質翻訳を抑制する²³⁾。また同じく免疫関連遺伝子 TNF α の 3'UTR には A や U に富んだ領域が存在し (AU リッチエレメント: ARE)、この領域で形成される RNA 高次構造が mRNA 分解酵素 Tristetraprolin (TTP) と結合することでタンパク質翻訳を抑制する²⁴⁻²⁶⁾。

またこの 3'UTR においても「何か」次第ではタンパク質発現量が増える。例えば、試験管レベルおよび細胞レベルでの検討ではあるものの、標的 RNA の 3'UTR に GC リッチな安定高次構造などが存在するとエキソヌクレアーゼの進行が阻害され、結果として RNA の安定性が向上することでタンパク質翻訳量は増加する報告が挙げられている²⁷⁾。この事実から察するに、内在性の遺伝子においても、同様の機序で mRNA を安定化し遺伝子発現量を増やす高次構造が存在する可能性は大きいであろう。

このようにステムループ等から構成される「機能的な RNA」の高次構造は、遺伝子配列の数だけ無数に存在しており、形成位置や配列によって非常に多様な効果を示す。そのため、前項の構造解析技術や構造予測技術を駆使して、配列ごとに異なる RNA の高次構造や RNA 結合タンパク質との相互作用を解析することが重要になる。

4. RNA G4 と遺伝子発現の関連

RNA G4 構造は 4 つのグアニン塩基がフーグスティーン型塩基対によって平面構造 (G-quartet) を形成し、これらが π スタッキングにより積み重なり強固な高次構造を形成する (図 1)。ス

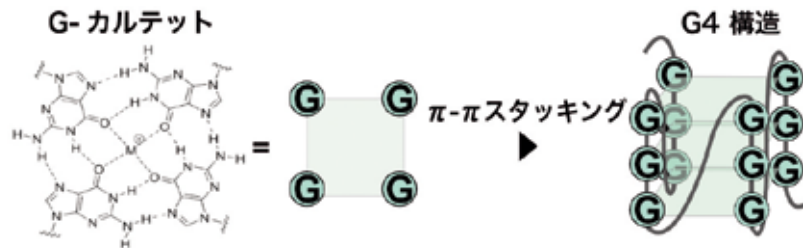


図1 RNA G4の構造。4つのグアニン塩基が一価の陽イオンを中心として形成するG-カルテットがスタッキングし、安定化することで形成する。

テムループ構造は配列の数だけ多様な種類が存在するのに対し、RNA G4はグアニンの連続配列という単純な要素で形成される構造であるにもかかわらず、その存在する「場所」によって遺伝子発現を増減させる機能の多様性に注目が集まっている。

前項で記載した通り、リボソームのスキャンニングに強い影響を与える5'UTRに高次構造が存在するとタンパク質の発現が抑制される。つまりRNA G4のような強固な高次構造が5'UTRに存在すれば、タンパク質発現を強く抑制することは容易に想像できるだろう。例えばがん関連遺伝子NRASやZic-1などがその例として知られる^{28, 29)}。

また5'UTRに存在するRNA G4も遺伝子によっては、タンパク質発現量が増えることもある。例えばアポトーシス阻害遺伝子cIAP1の5'UTRに存在するRNA G4は、詳細な機構については明らかになっていないもののタンパク質翻訳量を増やす効果があることが報告されている³⁰⁾。

一方で3'UTRに存在するRNA G4に関しても遺伝子発現に影響を与える例が数多く報告されている。例えば、アミロイド前駆体タンパク質APPやリン酸化酵素PIM1の3'UTRに存在するRNA G4は多くのRNA結合タンパク質と相互作用しタンパク質翻訳を抑制することが報告されている^{31, 32)}。しかしそれ以上の詳細なメカニズムに関しては未だ明らかになっていない。

また、3'UTRに存在するRNA G4も遺伝子によってはタンパク質翻訳量を増やすことがある。脂肪酸不飽和化酵素遺伝子desaturaseの3'UTRに存在するRNA G4は、mRNAそのものの分解を誘導するmiRNA (micro-RNA) の一種であるmir331-3pの結合領域上に存在しており、標的mRNAへのmir331-3pの結合を阻害することでmRNAの分解耐性を向上させ、結果としてタンパク質翻訳量を増加させる効果がある³³⁾。

そのほかの遺伝子についても網羅的に解析を行った結果miRNAの結合領域と重複するRNA G4形成配列が44,000箇所同定されており、RNA G4が標的mRNAへのmiRNAの結合を阻害することでmRNAの分解を抑制している可能性が示唆される。さらに、低密度リボタンパク質受容体関連タンパク質LRP5の3'UTRに存在するRNA G4は代替ポリアデニル化を促進し、miRNAの結合領域を含まない短い3'UTRを生成することで、mRNAの分解を抑制しタンパク質発現量を増加させることも報告されている³⁴⁾。

上記においてはmRNA、つまり遺伝子の情報を「持つ」RNAについて言及してきた。これに加え、近年、遺伝子の情報を「持たない」RNAも、RNA G4などの高次構造を介して遺伝子発現に影響を与えることがわかってきた。また、その存在比に関してはRNA全体のうち遺伝子の情報を「持つ」RNAはわずか2%で、遺伝子の情報を「持たない」RNAは98%存在することになる。この98%と生体内の“ほぼ”全てを占める遺伝子の情報を持たないRNAはncRNA (non-coding RNA) と呼ばれている。かつてncRNAは「ジャンクRNA」だと考えられていたが、その多くが高次構造の形成によって多くの機能を有する「機能的な

RNA」であることが明らかとなっている。

様々な種類が存在するncRNAは長さによって大きく2つに分けられる。500 nt以上に及ぶ長鎖のncRNAはlncRNA (long non-coding RNA) と呼ばれ、MALAT1やNEAT1など核内において高いレベルで発現していることが知られている。例えば、MALAT1に存在するRNA G4はNONOというタンパク質と結合し、核内におけるMALAT1の局在化を誘導することでがん関連のタンパク質翻訳は抑制される³⁵⁾。

また長さが20 nt程度の非常に短いncRNAのうち、遺伝子サイレンシング機能を有するmiRNAにもRNA G4は数多く存在している。miRNAは通常AGOタンパク質とRISC複合体を形成し、相補的な配列を持つmRNAに結合することで標的mRNAを分解し遺伝子発現を抑制する。つまり、このmiRNA中に存在するRNA G4構造は、miRNAとAGOタンパク質の複合体形成を妨げ、miRNAと標的mRNAの結合を阻害し遺伝子発現抑制機能を失わせる。

すでに、RNA G4の構造基盤となるG-quartetの存在が明らかになってから半世紀以上が経過している。しかし近年の計算化学や構造解析技術の進歩に伴い、RNA G4の形成位置や機能についての知見が増えているものの、未だその全貌は解き明かされていない。したがってRNA G4の機能を明らかにするために、日々進化する分析技術を駆使してRNA G4の位置やタンパク質との相互作用を正確に把握していくことが求められる。

5. おわりに

本総説では、RNA G4をはじめとするRNA上の高次構造が遺伝子発現を減らす・増やす例について述べた。このように近年ではRNAが単なる遺伝情報の媒体物質ではなく、高次構造によって様々な機能を有する「機能的なRNA」であり、ストレス応答、シグナル伝達など、多岐にわたる生理機能に関与していることが多くの研究によって示されている。今後の研究は、これらの知見を基にRNAの機能をより深く理解し、応用するための新しい方法を模索することが求められるであろう。具体的には、計算化学や構造解析技術の更なる進化などが挙げられる。

最後に、「機能的なRNA」の高次構造やその機能を明らかにすることは、基礎研究のみならず医療やバイオテクノロジーなどの分野においても大きく貢献できる可能性を秘めている。今後の「機能的なRNA」に関する研究が、多くの分野においてこれまでにない新しい発見と応用をもたらすであろう。

[参考文献]

- 1) E. Renton et al., *Neuron*, **2011**, 72(2), 257-268.
- 2) C. Anthony et al., *Cell*, **1987**, 49, 211-220.
- 3) C. Cao et al., *Nat. Commun.*, **2021**, 12(1), 3917.
- 4) S. Rouskin et al., *Nature*, **2014**, 505, 701-705.
- 5) Q. Luo et al., *Nat. Commun.*, **2021**, 12, 3397.
- 6) J. S. Reuter et al., *BMC Bioinformatics*, **2010**, 11, 129.
- 7) K. Sato et al., *Nat. Commun.*, **2021**, 12, 941.

- 8) S. Imai et al., *Nat. Commun.*, **2023**, 14, 4977.
- 9) E. Anderson et al., *J. Gen. Virol.*, **2007**, 88, 3043-3052.
- 10) J. M. Bailey et al., *J. Virol.*, **2007**, 81, 650-668.
- 11) J. Lin et al., *Nucleic. Acids Res.*, **2009**, 37, 47-59.
- 12) G. Lozano et al., *Curr. Opin. Virol.*, **2015**, 12, 113-120.
- 13) Y. Gao et al., *Virol. J.*, **2016**, 13, 107.
- 14) M. Asnani et al., *Virology*, **2015**, 478, 61-74.
- 15) G. Belsham, *Virus Res.*, **2009**, 139, 183-192.
- 16) C. H. Kerr et al., *J. Virol.*, **2016**, 90, 5538-5540.
- 17) E. Jan et al., *J. Mol. Biol.*, **2002**, 324, 889-902.
- 18) T. V. Pestova et al., *Genes Dev.*, **2007**, 17, 181-186.
- 19) J. Manzella et al., *J. Biol. Chem.*, **1990**, 265, 20.
- 20) M. Martina et al., *Molecular Cell*, **1998**, 2, 383-388.
- 21) O. P. De Melo Neto et al., *Nucleic. Acids Res.*, **1995**, 23, 2198-2205.
- 22) S. D. Kulkarni et al., *J. Biol. Chem.*, **2011**, 286, 14146-14156.
- 23) H. Iwasaki et al., *Nat. Immunol.*, **2011**, 12, 1167-1175.
- 24) P. Anderson, *Ann. Rheum.*, **2000**, 59, i3-i5.
- 25) A. B. Shyu et al., *Cell*, **2000**, 102, 135-138.
- 26) C. J. Wilusz et al., *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **2001**, 2, 237-246.
- 27) V. Solodushko et al., *Gene Ther.*, **2023**, 30, 620-627.
- 28) S. Kumari et al., *Nat. Chem. Biol.*, **2007**, 3, 218-221.
- 29) A. Arora et al., *RNA*, **2008**, 14(7), 1290-1296.
- 30) A. Singha Roy et al., *Biochemistry*, **2024**, 63(4), 475-486.
- 31) E. Crenshaw et al., *PLoS ONE*, **2015**, 10(11), e0143160.
- 32) A. Arora et al., *RNA Biology*, **2011**, 8(5), 802-805.
- 33) S. Rouleau et al., *RNA*, **2007**, 23, 1172-1179.
- 34) J. D. Beaudoin et al., *Nucleic. acids Res.*, **2013**, 41, 5898-5911.
- 35) X. Mou et al., *Nucleic. Acids Res.*, **2022**, 50(1), 397-410.

[著者プロフィール]

氏名：五木 結愛 (Yua Itsuki)

所属：熊本大学大学院先端科学研究部 博士後期課程

〒860-8555 熊本県熊本市中央区黒髪2丁目39番1号

TEL：080-9666-6740

E-mail：249d9402@st.kumamoto-u.ac.jp

出身学校：熊本大学

学位：現在 博士後期課程 1年

専門分野：核酸化学、生物化学

現在の研究テーマ：遺伝子発現を増やす核酸医薬の開発

氏名：勝田 陽介 (Yousuke Katsuda)

所属：熊本大学大学院先端科学研究部

〒860-8555 熊本県熊本市中央区黒髪2丁目39番1号

TEL：080-9666-6740

E-mail：katsuda2243@kumamoto-u.ac.jp

出身学校：京都大学大学院理学研究科

学位：博士 (理学)

専門分野：核酸化学、生物化学

現在の研究テーマ：核酸医薬

第二研究所 新棟完成のご案内

この度、小社は現在の熊本本社近くに建設しておりました第二研究所の第1期工事により、試薬製造の新棟が本年7月に完成いたしました事をご案内申し上げます。

この新棟は大型設備による量産施設であり、工程の省力化により生産能力を一層強化しております。

今後も安定品質・安定供給にお応えできるよう生産体制のさらなる強化に努めてまいります。



新棟全景



新棟内エントランス

研究助成金募集のご案内

一般財団法人同仁化学学術振興財団では、科学分野において活躍する研究者への研究開発の助成を行うことにより、科学技術の振興を図り、社会経済の発展に寄与することを目的として、2025年度の研究助成の募集を行います。

・応募期間

2024年8月1日より2024年10月31日まで (期限厳守)

応募要件や選考方法等の内容、応募方法については、財団ホームページに掲載の募集要項を参照下さい。

2025年度募集要項 <https://dojindo-f.or.jp/subsidy/>

学会展示のご案内

●第97回 日本生化学会大会

会期：2024年11月6日(水)～8日(金)

会場：パシフィコ横浜 ノース

●第23回 日本ミトコンドリア学会年会

会期：2024年11月21日(木)～23日(土)

会場：順天堂大学 本郷キャンパス

●第47回 日本分子生物学会年会

会期：2024年11月27日(水)～29日(金)

会場：福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

展示ブースにて小社担当者がお待ちしております。
ぜひお立ち寄り下さい。

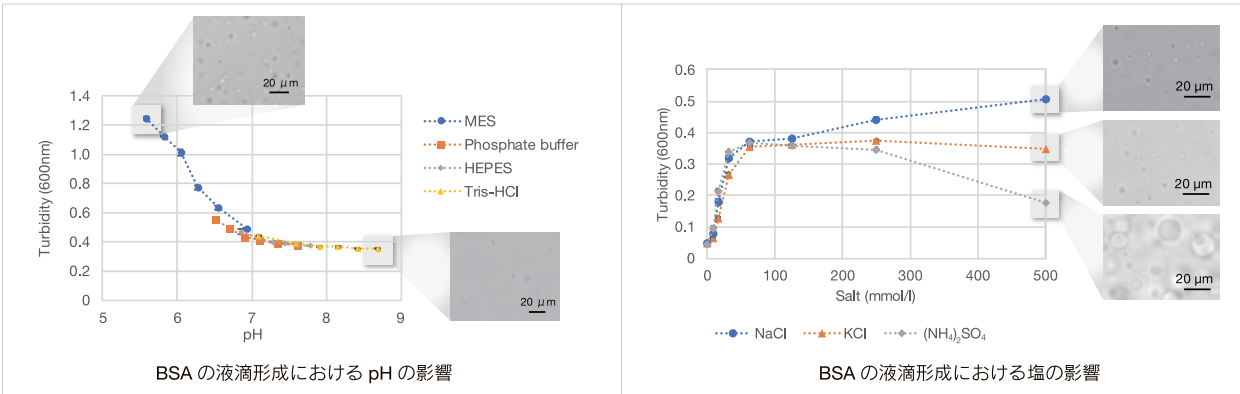
新製品

液 - 液相分離（liquid-liquid phase separation: LLPS）関連製品

LLPS は細胞内で特定の分子が局所的に集まり、液体のような性質を持つ生体分子の凝集体（液滴）を形成する現象です。LLPS 研究を始めるには、まず細胞を用いない系で標的タンパク質が液滴を形成するかを確認することが一般的です。タンパク質により至適条件が異なるため、pH や塩の種類、クラウディング剤※などを揃える手間や、組み合わせについての検討や注意すべき点が多くあり、そのため検討に労力がかかります。小社では LLPS 研究をこれからはめる方向けに最適な 2 種類のキットをご用意しました。

※クラウディング剤（分子夾雑物再現剤）：細胞内の混みあった環境を再現するために添加される、PEG や Ficoll などの高分子。

< BSA の液滴形成における pH と塩の影響の例 >



液滴作成法・観察方法の確認

LLPS Starter Kit

- ・マイクロピペットと顕微鏡だけで液滴の観察が可能
- ・計算例や操作詳細を記載した取扱説明書付き
- ・液滴形成のポジティブコントロールに最適

PEG なし BSA なし BSA+PEG

キット内容

1. タンパク質	BSA	10 mg × 1
2. 緩衝液	BSA Dissolving Buffer (20 mmol/l HEPES, 150 mmol/l NaCl)	420 µl × 1
	Assay Buffer (60 mmol/l HEPES, 450 mmol/l NaCl)	100 µl × 1
3. クラウディング剤	30% PEG8000 Solution	100 µl × 1
4. 観察容器	Slide Glass with Double-Sided Tape	× 2
	Cover Glass	× 4
5. 調製容器	1.5 ml Micro Tube	× 4
	0.5 ml Micro Tube	× 4



品名

標的タンパク質液滴の最適条件の確認

LLPS Forming Condition Screening Kit

- ・液滴作製条件の検討に必要な試薬のセット
- ・本キットでクラウディング剤、pH、塩の検討が可能
- ・pH の異なる緩衝液を混合し各種 pH の緩衝液調製が可能
- ・緩衝液の pH 調整方法を記載した取扱説明書付き

PEG8000 w/w (%)

BSA (µmol/l)

● 2phases ◇ 1phase

キット内容

1. クラウディング剤	PEG400 (液体)	15 g
	PEG4000 (粉末)	15 g
	PEG8000 (粉末)	15 g
2. 緩衝液	500 mmol/l MES Buffer Solution pH5.5 / pH7.0	各 10 ml
	500 mmol/l Phosphate Buffer Solution pH6.0 / pH7.5	各 10 ml
	500 mmol/l HEPES Buffer Solution pH7.0 / pH8.0	各 10 ml
	500 mmol/l Tris-HCl Buffer Solution pH7.0 / pH9.0	各 10 ml
3. 塩類	2 mol/l Sodium Chloride Solution	20 ml
	2 mol/l Potassium Chloride Solution	20 ml
	2 mol/l Ammonium Sulfate Solution	20 ml



容量

希望納入価格(¥) メーカーコード

LLPS Starter Kit	1 set	19,800	LL01
LLPS Forming Condition Screening Kit	300 tests	39,800	LL02

新製品

細胞老化(SA-β-Gal)検出キット(Blue)

Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER Blue

<特長>

- ・固定化細胞の SA-β-gal を簡便かつ迅速に検出することが可能
- ・プレートリーダーやフローサイトメーターでも測定が可能
- ・緑色や赤色の蛍光色素と共染色が可能

正常細胞は、分裂を繰り返すことや、酸化ストレス等により DNA に損傷を生じます。損傷 DNA が修復されない場合には、不可逆的に細胞分裂を停止することにより細胞の癌化を抑制します。不可逆的な細胞分裂の停止は細胞老化と呼ばれており、老化細胞には SA-β-gal (senescence-associated β-galactosidase) が過剰発現しています。このため、SA-β-gal は、老化マーカーのひとつとしてその判別に汎用されています。

<原理>

本製品は、SA-β-gal を簡便かつ高感度検出するためのキットです。固定化細胞中の SA-β-gal と反応することで青色蛍光を発するため、緑や赤色の蛍光特性を持つ色素や蛍光標識抗体による免疫染色との共染色が可能です。

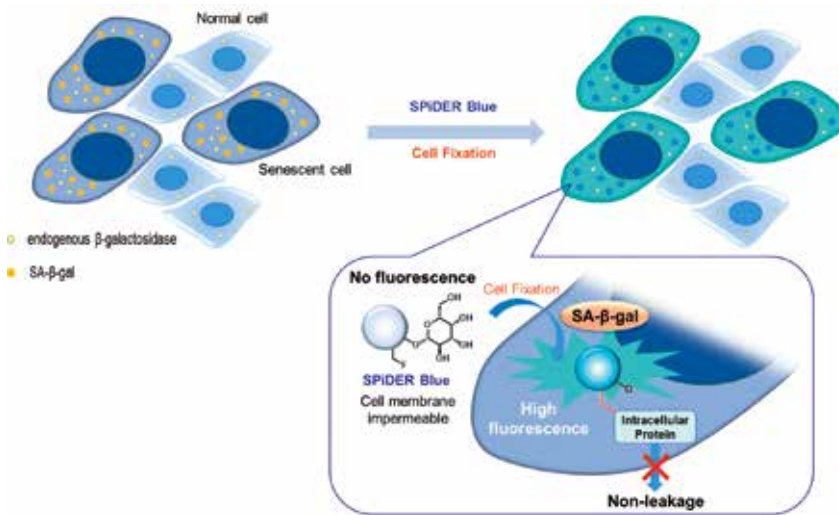


図1 SPiDER Blue による老化細胞の検出原理

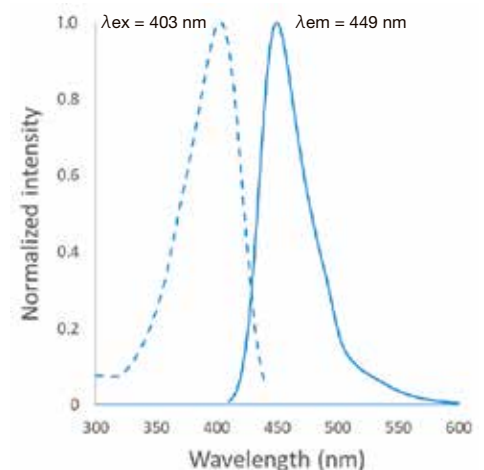


図2 反応後の励起蛍光スペクトル

< Doxorubicin 処理で老化誘導した A549 細胞中の SA-β-gal の解析 >

細胞周期の G2/M 期に作用し細胞増殖を停止させ、細胞老化を誘導することが知られる Doxorubicin (DOX) を A549 細胞へ添加後、細胞を固定化し、本製品によるイメージング (図3) およびプレートアッセイ (図4) を行いました。その結果、DOX 処理した細胞では、SA-β-gal の発現が亢進していることが双方の解析結果で確認されました。

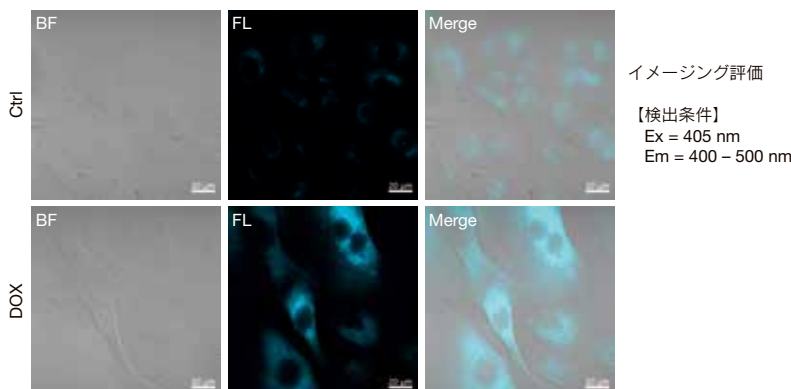


図3 DOX 処理による SA-β-gal の蛍光イメージング画像

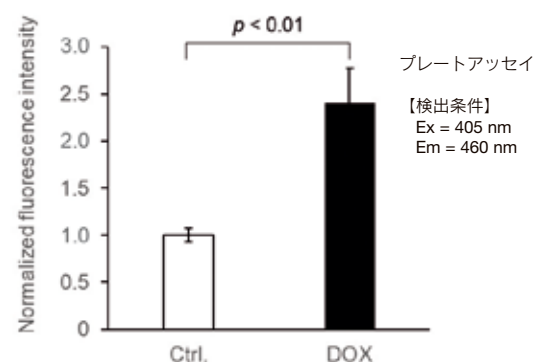


図4 DOX 処理による SA-β-gal のプレートアッセイ

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER Blue	1 plate	39,000	SG07

新製品

アポトーシス (Annexin V) プレートアッセイキット

Annexin V Apoptosis Plate Assay Kit

<特長>

- ・ Annexin V アッセイがプレートリーダーでできる
- ・ Quenching Buffer (同梱) で洗浄不要
- ・ スループット性が高く多検体処理が可能

アポトーシスは、細胞のプログラムされた死の一つであり、植物や動物のホメオスタシスや発生過程の維持に重要な役割を果たしています。その一つの例として、細胞生成過程で発生した異常な細胞はアポトーシスによって除去されます。アポトーシスの初期段階において、細胞膜の内側に存在するホスファチジルセリン(PS)が細胞膜の外側に移行することが知られています。この特異な変化により、アポトーシス細胞を識別することが可能です。Annexin V は、カルシウムイオンの存在下でホスファチジルセリンに特異的に結合するタンパク質です。この特性を利用し、蛍光標識された Annexin V を用いることで、アポトーシス細胞を蛍光検出することが可能となります。一般的に、フローサイトメトリーや蛍光顕微鏡を用いてアポトーシス細胞の検出が行われておりますが、多検体処理に時間を要します。

本キットには、蛍光標識 Annexin V や PS に結合していない蛍光標識 Annexin V の蛍光を消去する試薬 (Quencher Buffer) が同梱されており、洗浄不要でプレートリーダーで迅速に多検体処理が可能です。

<原理>

Annexin V は、アポトーシスの初期段階で細胞膜の内側から外側に移行する PS に高い親和性を持つタンパク質です。通常、健全な細胞では PS は細胞膜の内側に存在しますが、アポトーシスが始まると PS は細胞膜の外側に露出します。Annexin V は蛍光色素を標識しているため、プレートリーダーでの蛍光検出が可能となります。

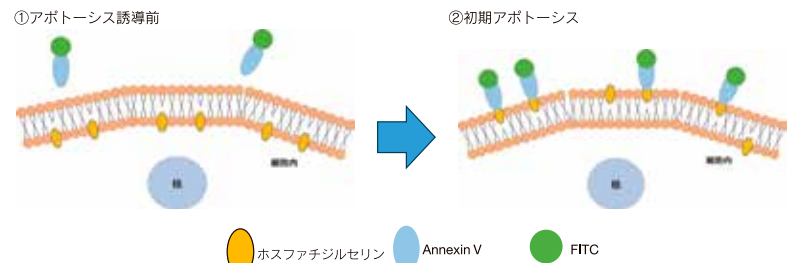
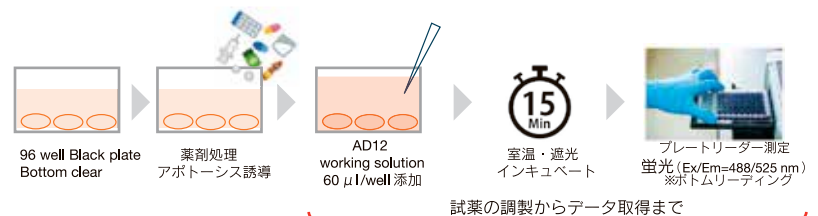


図 Annexin V の原理

<実験方法>

1. 96-well Black Plate (Bottom clear) に細胞を播種し一晩インキュベート
2. 薬剤処理等を行う
3. 2 種類の試薬を混合し working solution を調製
4. 全ての well に working solution を直接添加
5. 室温遮光下で 15 分静置
6. プレートリーダーで蛍光測定



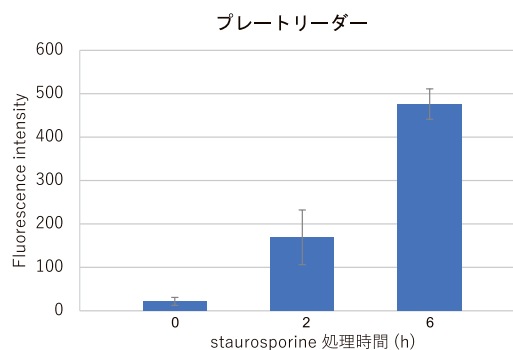
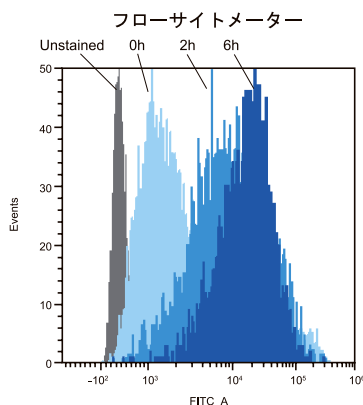
試薬の調製からデータ取得まで

わずか30分

<フローサイトメトリー法との比較>

HeLa 細胞を Staurosporine で処理し、アポトーシスを誘導しました。

一方は市販の FITC 標識 Annexin V で染色後にフローサイトメーターで検出し、もう一方は本キットを用いてプレートリーダーで蛍光検出しました。その結果、フローサイトメーターとプレートリーダー両方でアポトーシスの進行に伴い蛍光強度の増加を確認しました。



【サンプル】
HeLa 細胞
【薬剤】
Staurosporine 5 µmol/l
0 ~ 24 hr

【検出条件】
プレートリーダー
(TECAN 社製 Infinite M200 PRO
ボトムリーディング)
Ex = 488 nm, Em = 525 nm
フローサイトメーター
(SONY 社製 SA3800)

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Annexin V Apoptosis Plate Assay Kit	100 tests	29,800	AD12

酵素活性、阻害活性分析のご案内ー同仁グローバル

**多様なサンプルの酵素活性の分析や阻害活性分析を行っております。
目的に沿った分析をご提案します。**

<酵素活性、阻害活性の委託分析をご検討の皆様へ>

製品の確認、製品間の比較、原料チェックなど様々な研究開発・製品評価の試験を受託しております。

酵素活性が製品異常の原因となる場合もございます。

酵素活性分析ではサンプルの前処理工程が重要です。弊社では様々なサンプルの酵素活性分析に関する豊富な実績がありますので、是非ご相談ください。

- ・ サンプル（抽出物、培養液、加工品、食品、機能性食品等）の酵素活性を測定したい
- ・ 特定の酵素に対する阻害活性を測定したい
- ・ 酵素を使ってサンプルを処理するにあたり、処理条件を最適化したい
- ・ サンプルにどのような酵素活性があるか調べたい

<酵素活性分析の一例*と方法>

項目	分析方法	ユニット規定
アミラーゼ活性	デンプン基質法	40℃において 30 分間に 1%デンプン溶液 1 ml をヨウ素呈色度が 670 nm で 66%の透過率を与えるまで分解する酵素活性を 1 ユニットとする
スクラーゼ活性	スクロース基質法	10 分間に 1 mg のグルコースを生成する酵素量を 1 ユニットとする
セルラーゼ活性	セルロース基質法	30 分間に 1 mg のグルコースを生成する酵素量を 1 ユニットとする
リパーゼ活性	オリブ油基質法	乳化基質から 1 分間に遊離した 1 μ mol の脂肪酸量を 1 ユニットとする
マルターゼ活性	PNGP 法	1 分間に 1 μ mol の 4- ニトロフェノールを生成する酵素量を 1 ユニットとする
ラクターゼ活性	ONGP 法	1 分間に 1 μ mol の 2- ニトロフェノールを生成する酵素量を 1 ユニットとする
プロテアーゼ活性	カゼイン基質	カゼインから 40℃において 1 分間に 1 μ g のチロシン相当量を切り出す酵素活性を 1 ユニットとする

*その他の酵素活性、阻害活性分析も実施しておりますので、お問い合わせください

<分析事例>

糖分解酵素の一つであるスクラーゼの阻害活性について分析を行いました。阻害活性は酵素反応の 50% を阻害する濃度（IC₅₀）からユニットを規定します。

【分析方法】

スクロース基質

サンプル溶液（阻害剤；アカルボース）

スクラーゼ溶液

↓

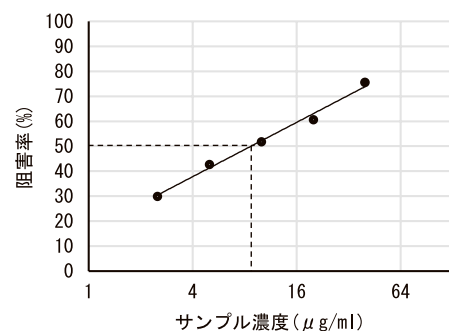
インキュベート

↓

反 応 停 止

↓

グルコース量測定（Glucose Assay Kit-WST）



株式会社同仁グローバル

<お問合せ>

Tel 096-286-1311

Fax 096-286-1312

glocal@dojindo.co.jp



同仁グローバル

検索

www.dojin-glocal.com



酵素分析





34th Forum in DOJIN

脳の未来への挑戦

新薬革命と神経変性疾患を克服する新時代

夢か現実か、議論の舞台裏

日時 **2024.11.15** [金]

9:30~17:00 [オンライン開催:参加無料]

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)
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)	
9:45~10:30	「アルツハイマー病病態形成とグリアネットワーク」 齊藤 貴志 (名古屋市立大学大学院 医学研究科 脳神経科学研究所・認知症科学分野)
10:30~11:15	「TDP-43をターゲットとするALS治療戦略」 須貝 章弘 (新潟大学脳研究所 脳神経内科)
11:15~12:00	「α-シヌクレインシードの検出と α-シヌクレインパチー病態解明への期待」 奥住 文美 (順天堂大学大学院 医学研究科 神経学)
12:00~13:15	ランチブレイク 12:30~13:00 ランチョンセミナー (株)同仁化学研究所
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)	
13:15~14:00	「トランスサイレチンアミロイドシスの病態解明と治療法の進歩」 三隅 洋平 (熊本大学大学院 生命科学研究部 脳神経内科学講座)
14:00~14:45	「パーキンソン病に対する疾患修飾療法 -オートファジーに着目して-」 斉木 臣二 (筑波大学 医学医療系 神経内科学分野)
14:45~15:00	コーヒーブレイク
15:00~15:45	「リピート伸長変異による神経変性疾患: 明らかになる遺伝学と新規分子病態」 藤野 雄三 (近畿大学 医学部 脳神経内科)
15:45~16:45	「アルツハイマー病治療薬開発の現状と展望」 岩坪 威 (東京大学大学院 医学研究科 神経病理学分野)
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)

※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。



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 Tel:0120-489548 Fax:0120-021557

お申し込みはコチラ



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

ミトコンドリア