

ミトコンドリア

総説

ミトコンドリアダイナミクス研究のこれまで、
そして今後の課題

大阪大学大学院 石原 直忠

連載

生命科学の最前線 ～熊本大学若手研究者の現場から～ ⑥

体の形を決める遺伝子・細胞・環境の相互作用

大阪大学大学院 進藤 麻子

注目の研究

腫瘍微小環境におけるメトホルミンの影響

株式会社同仁化学研究所 山本奈緒子

新製品 アポトーシス(Annexin V)プレートアッセイキット P.12

細胞内銅(I)イオン検出蛍光色素 P.13

細胞内酸素検出キット P.14

LLPS 性質評価蛍光色素セット P.15

精子染色キット P.16



CONTENTS

Review

ミトコンドリアダイナミクス研究のこれまで、そして今後の課題

Mitochondrial dynamics research: past and future perspective

大阪大学大学院 石原 直忠

1

Topics on Chemistry

腫瘍微小環境におけるメトホルミンの影響

株式会社同仁化学研究所 山本奈緒子

8

連載

生命科学の最前線～熊本大学若手研究者の現場から～ ⑥

体の形を決める遺伝子・細胞・環境の相互作用

Interplay of genes, cells, and environment during morphogenesis

大阪大学大学院 進藤 麻子

9

Commercial

新製品

アポトーシス (Annexin V) プレートアッセイキット 12

細胞内銅 (I) イオン検出蛍光色素 13

細胞内酸素検出キット 14

LLPS 性質評価蛍光色素セット 15

精子染色キット 16

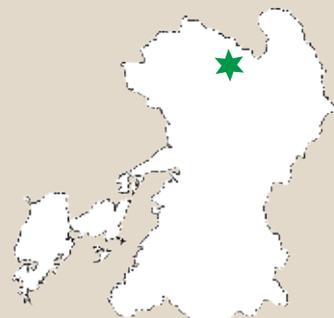
関連製品

ミトコンドリア関連製品 5 ~ 7

お役立ち

バイオフィルム受託分析ー形成量比較、形成阻害効果・除去効果の評価・・・17

フォーラム・イン・ドージン開催後記 18

表紙：菊池市 菊池渓谷の氷筍
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。

ミトコンドリアダイナミクス研究のこれまで、そして今後の課題 Mitochondrial dynamics research: past and future perspective



石原 直忠

大阪大学大学院
理学研究科 生物科学専攻
教授

Abstract

Mitochondria are essential organelles for intracellular energy production, and also have important functions in the metabolism and cellular signaling. Live cell imaging in cultured mammalian cells revealed that elongated network structure of mitochondria moves and change their morphology, with active fusion and fission. “Mitochondrial dynamics” has been actively studied for the past quarter century, and it has been revealed that mitochondrial dynamics are involved in the maintenance and quality control of mitochondrial function in various physiological and pathological conditions. However, the molecular details of the membrane dynamics including mitochondrial fusion and fission, especially their integrated regulation, remain largely unknown. The past progress and future prospects of this research field will be reviewed, with particular reference to the author’s own research progress.

1. ミトコンドリアの融合と分裂によるダイナミクス

ミトコンドリアは酸素呼吸によって細胞内の主要な「エネルギー生産」を担う細胞小器官（オルガネラ）である。また、様々な物質の合成と分解からなる「代謝」や、細胞死・自然免疫応答等の「細胞応答」の制御においても重要な機能を持つ。これらの多彩な機能が変化することで細胞分化・細胞応答時の細胞変化を支えている。電子顕微鏡観察でミトコンドリアは内膜クリステを持つ2重膜の特徴的な構造として容易に特定でき、組織によって、また病変時にその構造を大きく変化させることも古くから知られていた。

組織切片の電子顕微鏡ではミトコンドリア断面の多くが円型または楕円形として観察され、ミトコンドリアのモデル図の多くは豆粒状の構造体として記載されてきた。しかし特異的な抗体や蛍光試薬、また蛍光タンパク質を用いてミトコンドリアを標識し蛍光顕微鏡下に観察を行うと、様々な哺乳動物培養細胞でミトコンドリアは一定の豆状構造ではなく、小さな粒子状の分布に加えて、細長く伸びたチューブがさらに枝分かれしたネットワーク状の構造体として観察される（図1）。さらに経時的に生細胞観察を行うと、ミトコンドリアが細胞内を活発に動きその形を変化さ

せる様子を観察することができる。その動きの中で、複数のミトコンドリアが繋がって一つになる「融合」と、ちぎれて複数の小さなミトコンドリアになる「分裂」が頻繁に観察される（図2A）。このように、ミトコンドリアの大きさと形態は複雑な多様性を有し、その形態は融合と分裂を介して変動する。これらの現象・過程は「ミトコンドリアのダイナミクス」と呼ばれており、この四半世紀にわたり活発に研究されてきた¹⁾。

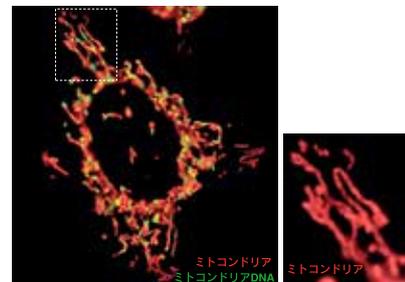


図1 HeLa 細胞のミトコンドリア

ミトコンドリアは MitoBright LT Deep Red で、ミトコンドリア DNA は SyberGreen I で染色し、生細胞を Leica Thunder 顕微鏡システムにて観察した（撮影：細野創太 大阪大学理学部生物科学科）。ミトコンドリアの大きさと形態は複雑な多様性を有しており、その形態は融合と分裂を介して変動する。

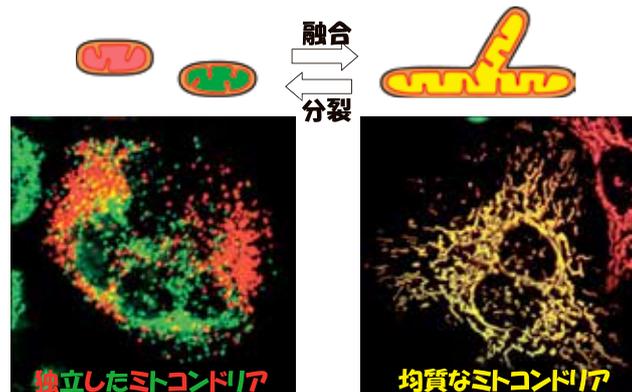


図2A ミトコンドリアの融合と分裂を制御する GTPase タンパク質群

ミトコンドリアの形態は融合と分裂のバランスにより維持されており、その変動によりミトコンドリアの大きさ・長さが変動する。

2. ミトコンドリアの融合と分裂を制御する GTPase タンパク質群の同定

20 世紀終盤において、酵母等のモデル生物の遺伝学およびヒトゲノムプロジェクト等の遺伝情報集積の両面から、ミトコンドリア形態制御に関与する遺伝子群の同定が進んだ (図 2B)。中でもショウジョウバエの雄性不稔変異から同定された、精子形成時のミトコンドリア融合 (この現象は昆虫に独特のものである) に関わる因子 Fzo は酵母からヒトに至るまで種を超えて広く保存されており、哺乳動物ホモログとして 2 つの mitofusin (Mfn1, Mfn2) が同定された²⁾。その後 Mfn2 は、末梢神経障害となる Charcot-Marie-Tooth (CMT) 病の原因遺伝子としても同定された。また、常染色体優性視神経萎縮症 Autosomal Dominant Optic Atrophy (ADOA) の原因遺伝子として同定された OPA1 は内膜の融合に機能することがわかった。一方で、神経細胞のシナプス小胞形成に関わるダイナミンに配列が類似したタンパク質であるダイナミン様タンパク質 Drp1 (Dlp1, Dnm1 とも呼ばれる) が、ミトコンドリア分裂に働くことが見出された。これらの初期研究から、「核ゲノムにコードされ、種を超えて保存された GTPase タンパク質群が融合・分裂に働く」ことが明らかになった³⁾。これらの GTPase 群およびそれらの関連因子群の同定を契機として、ミトコンドリアダイナミクスの研究分野が大きく発展していった。一方で、植物細胞ではミトコンドリアの融合は活発に観察されるにもかかわらず⁴⁾、融合制御に関わる分子は未だに見いだされておらず、進化的な側面からも興味深い。

3. ミトコンドリアダイナミクスの生理的な役割 (1) 融合と分裂のバランスによる形態制御

ミトコンドリアの融合と分裂に働く基本因子群が同定されたことで、生体における意義・役割の理解が進められるようになった。先行した酵母の遺伝学的解析から、融合因子を抑制すると分裂のみが進みミトコンドリアが短くなり、逆に分裂因子を抑制すると融合のみが進みミトコンドリアが長くなることを見出された。この結果に基づいて、「ミトコンドリアの形態は融合と分裂のバランスにより維持されており、その変動によりミトコンドリアの大きさ・長さが変動する」、とのミトコンドリアの形態制御の基本概念が提唱された (図 2A)⁵⁾。

融合因子を欠損した酵母株は、非発酵培地では生存できず呼吸不全となるが、一方で分裂因子の欠損では、ミトコンドリアは長く網目状に繋がるものの、細胞増殖や酸素呼吸活性には大きく影響しない。興味深いことに、融合因子の機能抑制による呼吸不全は、分裂因子を同時に抑制することで、ミトコンドリア形態のみならず呼吸活性をもほぼ正常レベルに回復する。このことから、融合と分裂のバランスによってミトコンドリア機能が維持され

る、との細胞レベルにおけるミトコンドリアダイナミクスの生理機能の基盤が理解された。

これらの結果から、ミトコンドリアダイナミクスに関する根源的な疑問が生まれた。酵母の融合・分裂の 2 重欠損細胞では、ミトコンドリアはほぼ正常に機能しており、すなわち融合と分裂の制御は細胞・呼吸機能には必須ではない。それではなぜ融合・分裂を制御する GTPase 群は種を超えて保存されているのか、「細胞内におけるミトコンドリアの融合と分裂の重要性」という基本的な概念の研究・理解は未だに残されている。

(2) 細胞応答の制御

哺乳動物細胞においてミトコンドリア分裂因子を抑制すると、ミトコンドリアからのシトクロム c の放出が抑制され、細胞死が抑制されることがわかった⁶⁾。当時、急速に進展していた細胞死研究との関連性が見いだされ、ミトコンドリアダイナミクスが生命科学・医科学の分野から大きく注目を集める契機となった。後の解析により、様々なミトコンドリア形態制御因子がアポトーシス制御因子と関与すること、また逆にアポトーシス制御因子がミトコンドリア形態制御に関わることも見出され、「ミトコンドリアダイナミクスはエネルギー生産のみならず、細胞応答・制御においても重要な機能を持つ」、との基本概念が理解された。

これまでに、ミトコンドリア融合・分裂因子群の多くが細胞死制御因子群と関連・連携して機能することが見出されているが、一方で融合と分裂による膜の変形自体がどのように細胞死制御に関わるのか、なぜ多くの融合・分裂因子群がそれぞれに細胞死制御に関わる必然性があるのか、等の分子詳細にはまだ不明な点が多く残されている。

また、ミトコンドリアは抗 RNA ウイルスに対する自然免疫応答に関与することが知られており、ミトコンドリアダイナミクス関連因子がミトコンドリア代謝と自然免疫応答を仲介する役割を持つことも明らかになりつつある^{7,8)}。

(3) マウス個体内での生理機能の解析

ミトコンドリア融合因子 Mfn1、Mfn2 の遺伝子欠損マウスが構築され、その生理的意義の解析が進んだ⁹⁾。細胞レベルでの呼吸不全、初期発生期での胎生致死、また神経特異的 Mfn2 抑制による神経変性の誘導等の研究が進められ、それらの結果から「ミトコンドリアの融合は細胞レベルから個体レベルにおいてミトコンドリア機能維持に重要な働きを持つ」ことが強く示唆されている。

一方で、ミトコンドリア分裂の哺乳動物個体内での意義を知る目的で、我々は世界に先駆けて Drp1 の遺伝子欠損マウス及び組織特異的欠損マウスを構築したところ、組織・分化細胞に応じて特徴的な表現型・病態が観察された¹⁰⁾ (図 3B)。Drp1 欠損によ

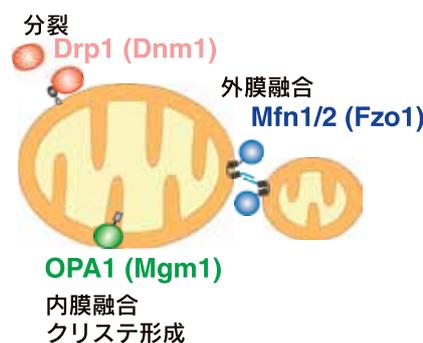


図 2B ミトコンドリアの融合と分裂を制御する GTPase タンパク質群 比較的大きな 3 つのグループの GTPase タンパク質群は、核ゲノムにコードされており、ミトコンドリア 2 重膜のダイナミクスの制御に関わる。

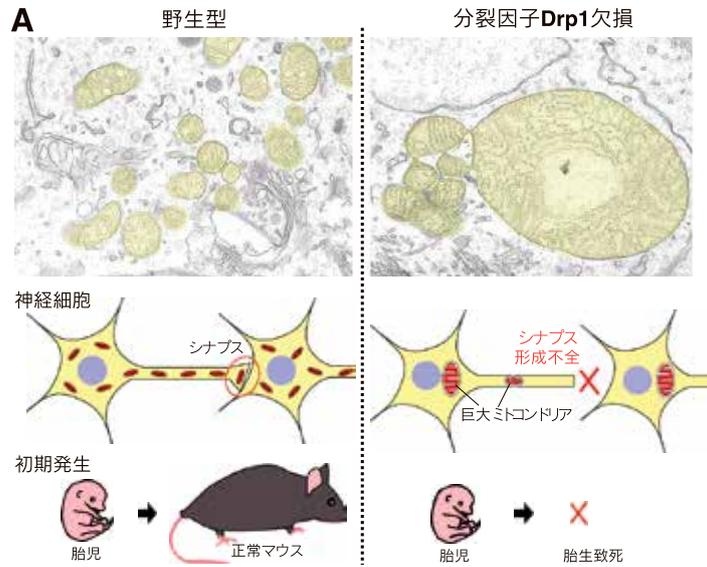


図 3A ミトコンドリア分裂因子 Drp1 の初期発生と神経における役割
神経細胞のミトコンドリア分裂不全により、神経突起内でのミトコンドリアの分布不全・シナプス形成不全・神経変性死が誘導された。

り呼吸不全となる組織、一方で呼吸活性低下が顕著に認められない組織もみられた。一例として、神経細胞ではミトコンドリア分布不全により、ミトコンドリアが大きくなりまた数が減少することで、神経突起内でのミトコンドリアの分布不全となり、シナプス形成不全・神経変性死が誘導された (図 3A)。また Drp1 を欠損したマウス卵子では、ATP 濃度を正常に維持するものの、カルシウム応答の変動により卵子の成熟が不全となる。ミトコンドリアと小胞体の接触構造 (MAM) を介してカルシウム応答が制御されており、卵子ではその制御に Drp1 が関わる可能性が考えられる¹¹⁾。

また我々は最近、骨格筋におけるミトコンドリア分裂の新しい役割を見出した¹²⁾ (図 4)。筋細胞はミトコンドリアの分裂抑制により筋萎縮となるが、その分子詳細は不明であった。我々は骨格筋特異的 Drp1 欠損マウス及び Drp1 欠損培養筋芽細胞を用いて筋分化及び細胞応答への効果を詳細に解析したところ、Drp1 を抑制すると速筋の分化が大きく低下することを見出した。Drp1 抑制時には、ミトコンドリアの形態変化に伴い mTORC2 の構成成分 Rictor がミトコンドリアに効率的に局在し活性化すること、またミトコンドリア病のバイオマーカーとしても注目されているサイトカイン GDF15 が誘導され、これが速筋分化を抑制することを見出した。速筋のエネルギー生産は主に解糖系に依存しておりミトコンドリアが比較的少ないことが知られているが、Drp1 は筋タイプに特異的な役割を持っており、速筋の分化・発達過程に関与する、との興味深い結果が得られた。

4. ミトコンドリア融合の分子機構

(1)2 重膜の融合

哺乳動物細胞ではミトコンドリア外膜の融合に機能する Mfn1 と Mfn2 は GTPase ドメインを細胞質側に露出しており、外膜上で多量体を形成している (図 2B)。また内膜の融合に機能する OPA1 の GTPase ドメインは膜間スペース部分に存在している。外膜と内膜の融合は協調的に連携しながら起きると考えられており、実際に内膜融合因子 OPA1 を抑制するとミトコンドリアが断片化し、即ち外膜の融合も強く阻害されると考えられる。酵母細胞においては、外膜融合因子 Fzo1 と内膜融合因子 Mgm1 を繋ぐ外膜貫通タンパク質 Ugo1 が 2 重膜を協調的に融合させている。しかし哺乳動物細胞では 2 重膜が連携して融合する機構の理解

はごく限られている。

(2)mitofusion による外膜の融合

外膜の 2 つの Mfn タンパク質は GTP 加水分解に依存して多量体を形成することで 2 つの外膜を結合させ (繋留)、その後に外膜の融合過程が起きると考えられている¹³⁾。しかし、膜結合後に膜が融合する分子機構はまだ十分には理解されていない。GTP 加水分解の意義、膜融合のエネルギーはどのように与えられるのか、など興味深い問題が多く残されている。Mfn タンパク質の構造解析から複合体変化や GTP 加水分解の意義が理解されつつあり、その発展が期待されている。

細胞内では、融合に先行して 2 つのミトコンドリアが近接し結合する必要がある。哺乳動物細胞ではミトコンドリアは主に微小管に沿って細胞内を移動するが、一方で微小管は融合に必ずしも必須ではない。ミトコンドリアの融合前の挙動は、融合の特異性 (融合すべきミトコンドリアの選別・マッチング) に関与し品質管理の観点からも重要と考えられる。

(3)OPA1 による内膜の融合

内膜の融合に機能する OPA1 は、GTPase ドメインを含む C 末端側領域を膜間スペースに配向して N 末端側の疎水性領域を内膜に挿入し (L-OPA1)、さらに膜貫通ドメイン近傍を内膜に存在するタンパク質分解酵素 Oma1、あるいは Yme1L によりタンパク質切断を受ける (S-OPA1)。ヒトでは複数の選択的スプラ



図 3B ミトコンドリア分裂因子 Drp1 欠損マウスの病態
Drp1 の遺伝子欠損マウス及び組織特異的欠損マウスを構築したところ、組織・分化細胞に応じて特徴的な表現型を示した。その中で筆者らの研究グループの関わる報告を抜粋した。

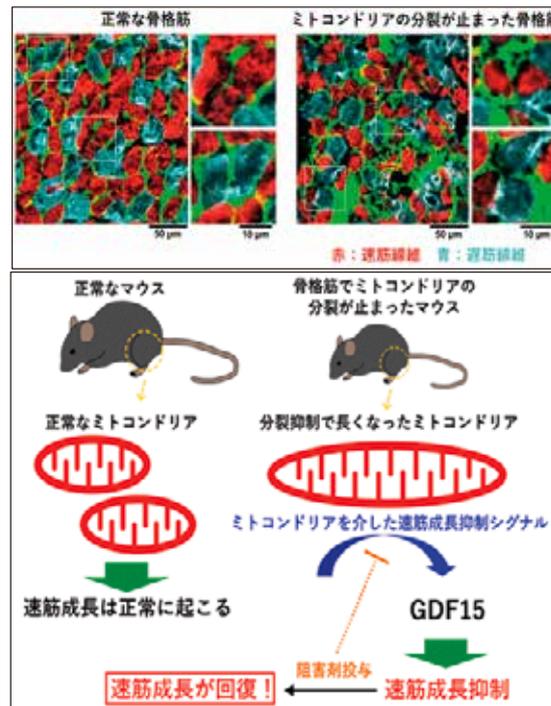


図4 ミトコンドリア形態制御を介した骨格筋萎縮
Drp1は筋タイプに特異的な役割を持っており、速筋の分化・発達過程に関与する。

イシングにより OPA1 の切断点及び切断効率が変化し、またこの切断により融合の活性が変動する¹⁴⁾。

ミトコンドリア融合の分子理解を目指して、我々は活性を保った L-OPA1 を発現・精製し、内膜を模したリン脂質組成の人工リポソームに組み込むことで、試験管内で生化学的に融合反応を観察できる実験系の構築に成功している¹⁵⁾。この反応系を用い、L-OPA1 を持つ膜と、ミトコンドリア内膜に特異的なリン脂質カルジオリピン (CL) を持つ膜との間で、GTP 加水分解エネルギーに依存した膜融合がおきる、との一方向性の独特な膜融合反応系を見出している。この実験系を用いて生化学解析を進めることで、OPA1 による内膜融合の分子詳細の理解が可能となった。特に OPA1 はミトコンドリア活性に応じて融合活性を大きく変動させるため、ミトコンドリアの機能制御・品質管理に重要な役割を持つと考えられている。この試験管内反応系を活用して、ミトコンドリアの機能低下を抑制し、さらに活性化する分子 (新規タンパク質・化合物) の同定が期待される。

5. ミトコンドリア分裂の分子機構

(1) Drp1 のミトコンドリア局在化受容体群

ミトコンドリアの分裂にはダイナミン様タンパク質 Drp1 が機能しており、これらにより細胞質に分布する Drp1 がミトコンドリア分裂点に集められる。酵母で Drp1 受容体として見出された Fis1 は哺乳動物にも保存されているが、HeLa 細胞を用いた我々の解析系では、Fis1 の抑制による Drp1 局在化やミトコンドリア分裂への効果は限定的であった¹⁶⁾。一方で、哺乳動物細胞では Drp1 の局在化に関わる主要因子として Mff、MiD49、MiD51 が見出されており、これらがそれぞれ独特な分裂制御に関わると考えられる¹⁷⁾。ミトコンドリア分裂時には、必ずしもミトコンドリアの中央で分裂するわけではなく、しばしば2つは不均等なミトコンドリアとなる。受容体により中央付近での切断と、末端付近での分裂が起きる可能性が議論されている。しかしこれらの機能分担の詳細はまだ十分には理解されていない。

(2) 2重膜を分裂させる分子機構

ミトコンドリアの分裂点に集められた Drp1 は多量体を形成してミトコンドリアに巻き付き、GTP 加水分解に伴う構造変化によりその直径が小さく絞り込まれることで膜が切断されると考えられている。一方で、細胞内でミトコンドリアを取り囲む Drp1 によるリング構造は (一部の藻類等を除き) ごく限られた観察例しか知られていない。これまでの解析は主に大腸菌で発現・精製したタンパク質が利用されているが、多量体化や膜結合に関して、これらの実験では生理的な状況を反映しているのか、との疑問も残されている。生体内での挙動の本質解析を進めるための新しい解析系の構築などのブレイクスルーが必要であろう。

また、ミトコンドリア内膜は膜電位が維持されているが、現在のモデルでは Drp1 が細胞質側から2重膜を一気にくびり取り、2重膜のそれぞれがうまく繋がって分裂が起きるとされている。酵母では内膜の分裂を促進するタンパク質が近年見出されており¹⁸⁾、哺乳動物においても2重膜を分裂させる機構理解の進展が期待されている。

6. 今後の展望と期待

近年の生命科学において、生理・病理におけるミトコンドリアの多彩な役割の理解が大きく発展している。ミトコンドリアはさらにその重要性を増し、広い研究分野で活発に研究が進められている。しかし、ミトコンドリア自体の理解、すなわちどのように維持され、増加し、遺伝していくか、(たとえば、リン脂質等の膜成分の合成と輸送、複雑な2重膜構造の形成と制御、ミトコンドリア DNA のミトコンドリア内・娘細胞での配置、ミトコンドリアの量の制御)、等の基盤的理解はまだ不十分であるにも関わらず、応用を目指したミトコンドリア関連研究のフロンティアは広がるばかりである。

日本の若い研究者が基礎的な観点からミトコンドリアの本質を理解する研究に参入し、ミトコンドリア理解の飛躍的発展に活躍してくれることを強く期待している。

[参考文献]

- 1) 石原孝也, 前田真希, 石原直忠, “ミトコンドリアダイナミクス 機能研究から疾患・老化まで”, 株式会社エヌ・ティー・エス, **2021**.
- 2) K. G. Hales and M. T. Fuller, “Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase”, *Cell*, **1997**, 90, 121-9.
- 3) K. Okamoto and J. M. Shaw, “Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes”, *Annu. Rev. Genet.*, **2005**, 39, 503-36.
- 4) S. Arimura, “Fission and Fusion of Plant Mitochondria, and Genome Maintenance”, *Plant Physiology*, **2018**, 176(1), 152-161.
- 5) H. Sesaki and R. E. Jensen, “Division versus Fusion: Dnm1p and Fzo1p Antagonistically Regulate Mitochondrial Shape”, *J. Cell Biol.*, **1999**, 147(4), 699-706.
- 6) S. Frank *et al.*, “The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis”, *Dev. Cell*, **2001**, (4), 515-25.
- 7) Y. Hanada *et al.*, “MAVS is energized by Mff which senses mitochondrial metabolism via AMPK for acute antiviral immunity.”, *Nature Communications*, **2020**, 11, 5711.
- 8) Y. Hanada *et al.*, “Alternative splicing of Mff regulates AMPK-mediated phosphorylation, mitochondrial fission and antiviral response”, *Pharmacol Res.*, **2024**, (209), 107414.
- 9) H. Chen *et al.*, “Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development”, *J. Cell Biol.*, **2003**, 160(2), 189-200.
- 10) N. Ishihara *et al.*, “Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice”, *Nature Cell Biol.*, **2009**, 11, 958-966.
- 11) O. Udagawa *et al.*, “Mitochondrial fission factor Drp1 maintains oocyte quality via dynamic rearrangement of multiple organelles”, *Curr. Biol.*, **2014**, 24, 2451-2458.
- 12) T. Yasuda *et al.*, “Mitochondrial dynamics define muscle fiber types by modulating cellular metabolic pathways”, *Cell Rep.*, **2023**, 42(5), 112434.
- 13) N. Ishihara *et al.*, “Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity”, *J. Cell Sci.*, **2004**, 117, 6535-6546.
- 14) N. Ishihara *et al.*, “Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1”, *EMBO J.*, **2006**, 25, 2966-2977.
- 15) T. Ban *et al.*, “Molecular basis of selective mitochondrial fusion by heterotypic action between OPA1 and cardiolipin”, *Nature Cell Biol.*, **2017**, 19, 856-863.
- 16) K. Onoue *et al.*, “Fis1 acts as a mitochondrial recruitment factor for TBC1D15 that is involved in regulation of mitochondrial morphology”, *J. Cell Sci.*, **2013**, 126, 176-85.
- 17) H. Otera *et al.*, “New insights into the function and regulation of mitochondrial fission”, *Biochim. Biophys. Acta.*, **2013**, 1833, 1256-68.
- 18) T. Fukuda *et al.*, “The mitochondrial intermembrane space protein mitofusin drives mitochondrial fission required for mitophagy”, *Mol. Cell*, **2023**, 83(12), 2045-2058.

[著者プロフィール]

氏名：石原 直忠 (Naotada Ishihara)
 所属：大阪大学大学院 理学研究科 生物科学専攻 教授
 〒 560-0043 大阪府豊中市待兼山町 1-1
 E-mail : naotada@bio.sci.osaka-u.ac.jp
 出身学校：九州大学
 学位：博士 (理学)
 専門分野：細胞生物学、生化学、分子生物学
 現在の研究テーマ：オルガネラ膜のダイナミクス、ミトコンドリアの構造制御、膜の融合と分裂

関連製品

酸素消費速度プレートアッセイキット

Extracellular OCR Plate Assay Kit

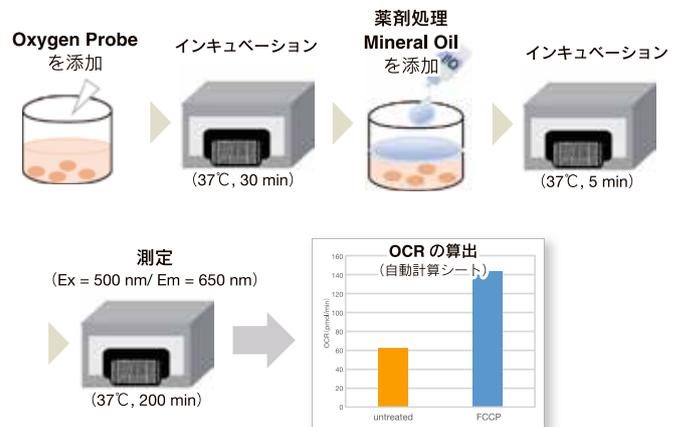
<特徴>

- ・細胞の OCR を汎用の蛍光プレートリーダーで測定できる
- ・専用の装置や培地、プレートは不要
- ・必要な試薬と OCR 自動計算シート付き*

* 自動計算シートは小社 Web からダウンロードが必要です。

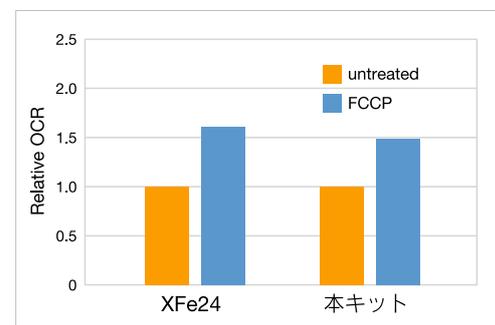
<本キットで OCR の算出まで>

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。



<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。



細胞：HepG2 細胞数：5 × 10⁴ cells/well
 薬剤：FCCP 薬剤濃度：2 μmol/l

※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。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Extracellular OCR Plate Assay Kit	100 tests	51,400	E297

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。

各製品の詳細と使用論文は、

メーカーコード 同仁 [検索](#)

検出対象	製品名	染色・観察		細胞内長期滞留性	血清入り培地中での染色	励起 / 蛍光 (nm)	染色時間*1	メーカーコード
		生細胞 (染色後固定)*2	固定細胞					
ミトコンドリアの膜電位差	MT-1 MitoMP Detection Kit	○ (○)	×	—	—	530-560 / 570-640	30 分	MT13
	JC-1 MitoMP Detection Kit	○ (×)	×	—	—	Green: 514 / 529 Red: 585 / 590	10 ~ 60 分	MT09
ミトコンドリアの局在	MitoBright LT series	○ (○)	×	○	○	Green: 493 / 508 Red: 547 / 563 Deep Red: 643 / 663	10 分~	MT10 MT11 MT12
	MitoBright IM Red for Immunostaining	○ (○)**	×	×	○	561 / 560-620	30 分~	MT15
細胞の酸素消費速度 (OCR)*3	Extracellular OCR Plate Assay Kit	—	—	—	—	500 / 650	200 分 (測定時間)	E297

* 1 試料の種類や試薬濃度に応じて変わる
 * 2 PFA による固定 (**メタノール固定も可能)
 * 3 OCR: Oxygen Consumption Rate

関連製品

ミトコンドリア関連製品

各製品の詳細と使用論文は、

メーカーコード 同仁 [検索](#)

検出対象	製品名	染色・観察		励起/蛍光 (nm)	染色時間*1	メーカーコード
		生細胞 (染色後固定)*2	固定細胞			
マイトファジー	Mitophagy Detection Kit	○ (×)	×	530 / 700	30分～	MD01
脂溶性過酸化物	MitoPeDPP	○ (×)	×	452 / 470	15分～	M466
一重項酸素	Si-DMA	○ (×)	×	644 / 670	45分～	MT05
スーパーオキシド	MitoBright ROS Deep Red - Mitochondrial Superoxide Detection	○ (×)	×	540 / 670	30分～	MT16

検出対象	製品名	染色・観察		励起/蛍光 (nm)	染色時間*1	メーカーコード
		生細胞 (染色後固定)*2	固定細胞			
ミトコンドリアのCa	Rhod 2-AM	○ (×)	×	553 / 576	30～60分	R002
ミトコンドリアの鉄	Mito-Ferro Green	○ (×)	×	505 / 535	30分～	M489

* 1 試料の種類や試薬濃度に応じて変わる
 * 2 PFAによる固定

★これからはじ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。

これからはじめる

ミトコンドリア検出

目次

- ・ミトコンドリアとは？
- ・関連セミナー／学術動画
- ・ミトコンドリア関連 研究用試薬の比較
- ・ミトコンドリア膜電位と疾患の関係性
- ・関連の学術情報



これからはじめる ミトコンドリア 検索

Topics on Chemistry

腫瘍微小環境におけるメトホルミンの影響

株式会社同仁化学研究所 山本奈緒子

がん細胞はワールブルグ効果により解糖系に依存してエネルギー産生を行っており、糖を取り込み、解糖系の亢進によって乳酸を産生している。さらに、その腫瘍微小環境は、低酸素、低pH、低栄養な環境であることが知られている。また、免疫細胞が機能を発揮するには糖を栄養として必要としているため、がん細胞と免疫細胞間では、糖を巡る代謝競合が起こってしまう。これまでも解糖系阻害剤を用いた抗がん剤の開発が行われてきたが、がん細胞だけでなく免疫細胞の解糖系も低下させてしまう等の課題があり、未だ有効な抗がん剤の開発には至っていない¹⁾。2型糖尿病治療薬であるメトホルミンを服用している糖尿病患者では、前立腺、膀胱、子宮頸、食道、胃、頭頸部、口腔、肺、卵巣、甲状腺のがん罹患リスクの低下が報告されている¹⁾。メトホルミンがミトコンドリア複合体 I (Complex I) を阻害することによって、細胞の AMP/ATP 比が増加し、最終的には細胞のエネルギー恒常性維持に寄与する AMPK を活性化し、腫瘍の進行を抑制するというものである²⁾。本稿では、メトホルミンの抗腫瘍効果が腫瘍微小環境である腫瘍関連マクロファージ (TAM) やリンパ球などの免疫細胞にも影響を及ぼす可能性について紹介する³⁾。

がん組織に浸潤しているマクロファージである TAM は、M1 と M2 に分極される。M1 マクロファージは、がん細胞の増殖や転移を抑制し、炎症を促進する作用を持っている。また、M2 マクロファージは、がん細胞の増殖や転移を促進し、炎症を抑制する作用を持っている。メトホルミンは、TAM において炎症性サイトカインの発現を減少させる一方で、抗炎症性サイトカインの発現を増加させた⁴⁾。メトホルミン処理したマクロファージとがん細胞を共培養した条件においては、抗炎症性の M2 マクロファージの増加がみられなかった⁵⁾。このようなメトホルミン治療によって起こる変化から、メトホルミンが腫瘍微小環境の機能に間接的な影響を及ぼす可能性が示唆された (図 1)。

リンパ球 T 細胞の一種で、がん細胞などを認識して破壊する細胞傷害性 T 細胞は、受容体 PD-1 を持ち、がん細胞表面に発現している PD-L1 によって疲弊する。その疲弊した細胞傷害性 T 細胞によって、免疫抑制が起こり、がん細胞が生存する⁶⁾。また、メトホルミンによって活性化された AMPK が、PD-L1 の S195

を直接リン酸化することで、折りたたみ構造をとれなくなり、ERAD (小胞体関連分解) を引き起こす。その結果、がん細胞表面の PD-L1 が減少し、細胞傷害性 T リンパ球の効果を高めた⁷⁾。

最近の研究において、鶴殿らはメトホルミンと免疫チェックポイント阻害薬である抗 PD-1 抗体を併用した治療によって、細胞傷害性 T 細胞の腫瘍内への流入を促進し、抗腫瘍効果を改善する可能性を報告している⁸⁾。

今回紹介した報告では、メトホルミンはがん細胞の増殖を阻害する以外にも、腫瘍微小環境を調節することによって腫瘍の進行に影響を及ぼす可能性があることが明らかとなった。メトホルミンの作用機序が明らかになりつつある現在、がん細胞だけでなく、腫瘍微小環境の非悪性細胞集団においても研究が進むことで、新たな治療法の開発が進むことを期待している。

[参考文献]

- 1) L. Connor *et al.*, "Association of metformin use and cancer incidence: a systematic review and meta-analysis", *Journal of the National Cancer Institute*, **2024**, *116*(4), 518-529.
- 2) W. Wheaton *et al.*, "Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis", *elife*, **2014**, *3*, e02242
- 3) K. Inava *et al.*, "The multifaceted effects of metformin on tumor microenvironment", *Semin. Cell Dev. Biol.*, **2020**, *98*, 90-97.
- 4) Z. Yan *et al.*, "Metformin suppresses UHMWPE particle-induced osteolysis in the mouse calvaria by promoting polarization of macrophages to an anti-inflammatory phenotype", *Mol. Med.*, **2018**, *24*(20), s10020-018-0013-x
- 5) M. Chen *et al.*, "Metformin affects the features of a human hepatocellular cell line (HepG2) by regulating macrophage polarization in a co-culture microenvironment", *Diabetes Metab. Res. Rev.*, **2015**, *31*(8), 781-789
- 6) M. Nishino *et al.*, "Monitoring immune-checkpoint blockade: response evaluation and biomarker development", *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **2017**, *14*, 655-668.
- 7) J. Cha *et al.*, "Metformin prompts antitumor immunity via endoplasmic-reticulum-associated degradation of PD-L1", *Mol. Cell*, **2018**, *71*(4), 606-620.
- 8) M. Tokumasu *et al.*, "Metformin synergizes with PD-1 blockade to promote normalization of tumor vessels via CD8T cells and INF γ ", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2024**, *121*(30), e2404778121.

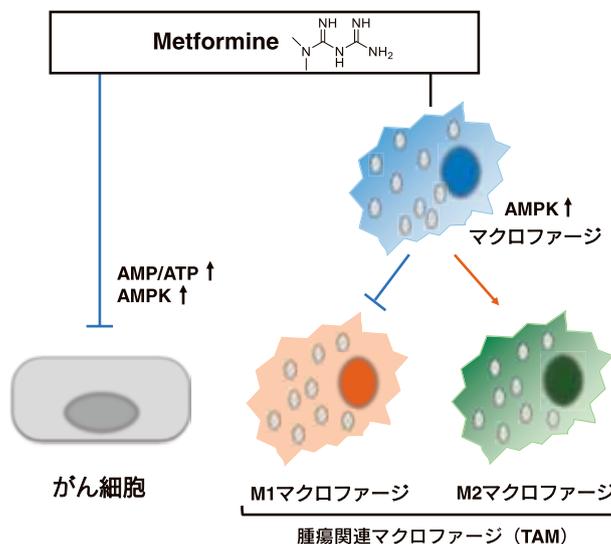


図 1 メトホルミンによるがん増殖抑制と TAM への影響

生命科学の最前線

～熊本大学若手研究者の現場から～ ⑥

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。

体の形を決める遺伝子・細胞・環境の相互作用

Interplay of genes, cells, and environment during morphogenesis



進藤 麻子

大阪大学大学院
理学研究科生物科学専攻
教授

*編集部注

進藤麻子先生は 2024年3月まで熊本大学・発生医学研究所に在籍されていました。

1. はじめに

動物の発生は受精をきっかけに連続して起こる遺伝子発現によって自律的に進行すると理解されている。自律的に進行する発生過程には、細胞が集団となって動き、各組織や器官の最終形を組み上げていく自己組織化も含まれる。この際、各細胞を動かす細胞骨格、隣接細胞同士を密着させる細胞接着、細胞移動の足場となる細胞外マトリックス (Extracellular matrix: ECM) が適切な場所に適切な量で局在する必要がある。これら細胞内外の分子の挙動は胚の体内でも共焦点顕微鏡などを用いて精細に捉えられ、細胞集団の自律的・自発的な運動を実行する分子の制御機構も明らかにされてきている。

一方で、温度や pH、重力、光、栄養などの環境の因子が発生現象に重要であることはよく知られており、環境が正常な胚発生にどう関わるかは古くから検証されてきた。「最適」環境が発生に必要なことは明白であり、現在の研究現場で使用されるモデル動物の飼育温度、胚を育てるための培養液の組成と pH は厳密に調整されて実験が行われている。ところが最近、そのような環境が条件によっては組織や器官を形づくる分子と細胞に指令をだし、発生過程を変化させることが見えてきている。環境によって制御されるということは非自律的な現象ということになり、発生とは環境に応じてそのプロセスを柔軟に変化または調整する、想定以上に融通のきく過程のようである。本稿では、環境がどのように発生を制御するのか、特に細胞集団の運動を支えるメカニズムとそれを改変する栄養環境に着目して紹介する。

2. 細胞を動かす分子と形態形成：細胞骨格、細胞接着、ECM

動物胚では卵割期が終わり、原腸形成期に入ると外胚葉・中胚

Abstract

Morphogenesis is a process involving collective cell movements to form tissues and organs during development. Although this process is driven autonomously by gene expression, there may also be non-autonomous mechanisms triggered and regulated by environmental factors. In this article, I introduce key intracellular molecules, such as cytoskeleton, cell adhesion molecules, and extracellular matrix, which act as the actual molecules executing changes in the shapes of tissues and organs. While these molecules are regulated by gene expression, we recently found that external nutrients can serve as their regulators using *Xenopus laevis* as a model. I will discuss the potential targets of environmental factors during morphogenesis, with a focus on the non-autonomous regulation of cell behavior.

葉・内胚葉の細胞はそれぞれ集団となってダイナミックな動きを示し、体の基本形を作り出す。特に中胚葉は胚の表面から胚体内部に潜り込むように移動しながら脊索や体節などの背側の体軸組織を形成する。この時、細胞骨格や細胞接着は時間的、空間的に精密に制御され、各細胞を正しい方向に動かし、組織の最終形を正しく作ることに貢献する。

筆者は過去に、両生類モデル動物であるアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の胚を用いた研究で、背側の正中線の脊索が形成される際、細胞骨格アクチンとモータータンパク質ミオシンが作る複合体・アクトミオシンが胚の短軸（前後軸と垂直の軸）に沿って配向する細胞膜直下に局在することを報告した（図 1A: 組織、緑の線）。アクトミオシンは細胞内に収縮力を発生し、前後軸に垂直に配向する細胞辺を短縮する（図 1A: 細胞）。この短縮により隣接細胞が牽引され、細胞集団が胚の長軸上に細長く並ぶことで背骨のような細長い組織・脊索の形が出来上がる¹⁾。脊索の位置や細胞集団運動については引用文献 1) も参考されたい。

アクトミオシンが細胞内の一部に方向性をもって局在するのは非古典的 Wnt 経路である平面内細胞極性 (Planar cell polarity: PCP) 経路によって制御されているためである。PCP 経路が阻害されると脊索は細くならず、その後の神経管閉鎖も阻害され、二分脊椎症の原因となることも知られる。脊索のような単純な形態の組織であっても、一つ一つの細胞内では精密な制御が行われ、隣接細胞と協調しながら細胞集団が正しく動いて作られている^{2), 3)}。

上述のような PCP 経路による細胞骨格動態の制御は、一旦 PCP 経路の構成分子が発現すると自律的に進行する。アクトミオシンは一定のリズムでオシレーションしながら細胞辺を短縮し、向かいあう隣接細胞のアクトミオシンはそれと交互のリズムでオシレーションして同じ細胞辺を協力して短縮する（図 1B）。

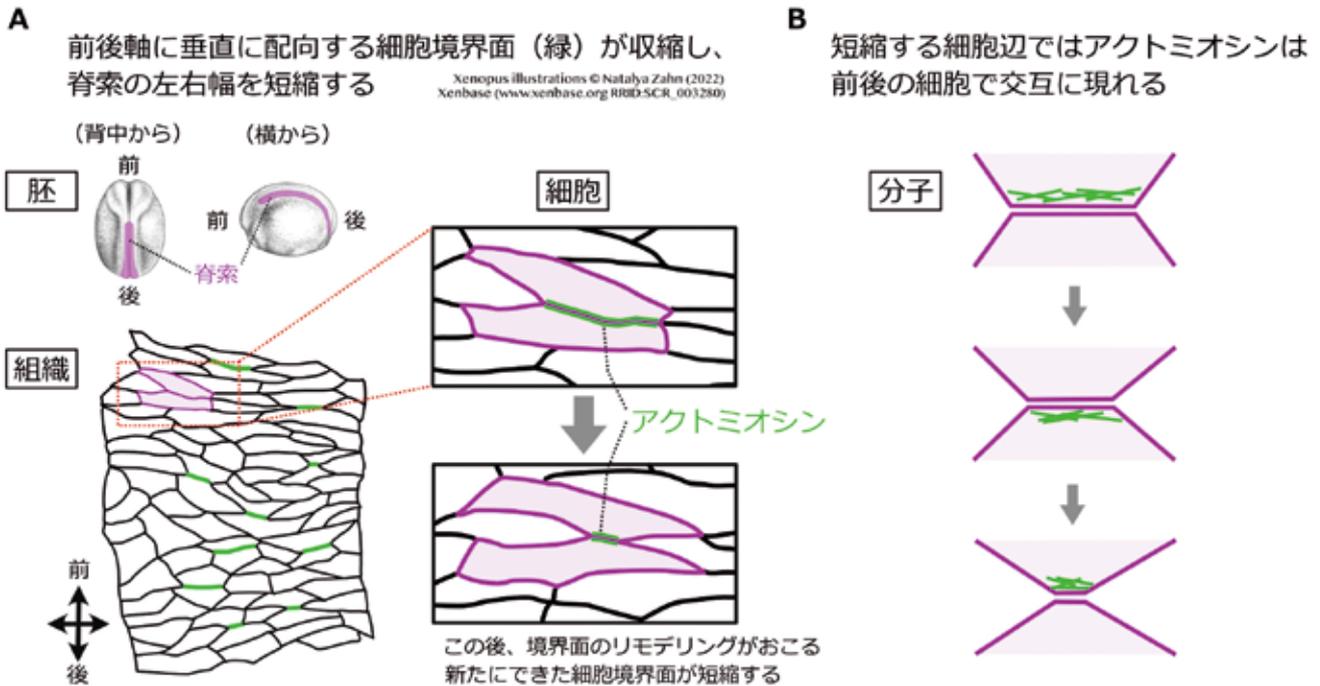


図 1

細胞内の一部に局在するアクトミオシンが、隣接細胞と接する面という局所のコミュニケーションによって全体の形を作り上げており、その基盤には自律的かつ組織特異的な遺伝子発現があることがわかる良い例である。

3. 器官の形態形成を制御する外来の栄養

では、そのような自律的かつ局所的な組織形態形成運動が個体の「環境」から制御されることはありうるだろうか。筆者らは最近、両生類モデルを用いて、個体が体外から取り入れる栄養が特定の器官の形態形成に重要であることを見出した⁴⁾。アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) は上述の脊索研究で用いられたように、発生生物学分野で長らく活躍している両生類モデル動物である。この動物は主に初期胚の研究に用いられ、原腸形成前の背腹軸の決定機構やオーガナイザー因子の探索と発見など、発生生物学の発展の歴史に大いに貢献してきた。ところが、初期発生の研究と比較して、発生後期に生じる器官（臓器）形成の研究にアフリカツメガエルを使用することは比較的新しい。筆者らは、アフリカツメガエルの幼生（オタマジャクシ）は、哺乳類の出生前に相当する器官形成期から泳ぎ出し、同時に餌を食べはじめ、食べながら体を作りつづけることの重要性を改めて認識する発見をした。すなわち、アフリカツメガエルの幼生では、餌を食べることが特定の器官の形態形成を開始、進行させるために必須であることを見出した（図 2）⁴⁾。

その研究では甲状腺の形態形成に着目していた。甲状腺は濾胞と呼ばれる球形で内部に単一の腔をもつ組織の集合体である（図 2, 右上）。この多腔構造は甲状腺ホルモンを産生し、貯蔵するために必須であり、下垂体から刺激を受けてホルモンを分泌する際もこの腔から分泌される。発生過程においては、甲状腺ホルモンが一部の器官を除いて多くの器官形成に必須であること、両生類ではカエルに変態するために必須であることが知られているが、甲状腺の濾胞構造がどのように形成されるのか、甲状腺自身の形態形成機構についてはほとんどが不明なままであった。筆者ら

は、幼生が栄養を摂取すると甲状腺の濾胞形成が開始・進行し、摂取しない場合（給餌しない場合）は甲状腺の濾胞形成は停滞することを見出した。さらに、給餌しない状態を経てもひとたび餌を食べ始めると正常な濾胞形成を開始することも発見した（図 2）。このことは、体外から取り入れる栄養が甲状腺の形態形成を開始するスイッチを押していることを意味する。

甲状腺の研究を開始した当初、器官の形態形成も初期胚と同様に自律的に進行すると信じていた筆者は甲状腺濾胞が出来上がるのをひたすら待っていたが、餌を与えていなかったためいくら待っても甲状腺の濾胞ができあがらず、免疫抗体染色を行っても見つからなかった。いきなり研究が停滞する中、ふとエサをあげてみると甲状腺濾胞が見つかり、それが器官の形態形成における栄養の重要性に気づいた経緯である。なお、餌を与えなくても異常を検出できないほどオタマジャクシは元気に泳いでおり、体内の発生が止まっていることに気がつくまでそれなりの時間を要した。このことは、器官の形態形成の進み具合が個体の活動の活発さと必ずしも相関しないことも示している。つまり、栄養を源とするエネルギーが足りず、「元気がない」ため甲状腺の発生が止まっているのではなく、栄養が足りない状態では甲状腺の発生を積極的に進行させないシステムがある可能性が高いと考えた。

研究を進めると、摂食後に形成される甲状腺濾胞形成には消化管ホルモンである Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) が必要であること、糖代謝が重要であること、マウス胚の正常な甲状腺形成にも GIP 受容体が必要であることなどがわかった。さらに最近、細胞極性や細胞接着分子の局在など、初期胚の形態形成で着目される現象を甲状腺で見てみたところ、多腔構造を作る多細胞は単一の腔を作る過程とは異なる動態を示すことなどもわかってきた⁴⁾。引き続き、初期胚では自律的に進む形態形成運動が、甲状腺では外来の栄養に依存してどのように進むのか、細胞骨格の役割にも着目しつつ検証中である。

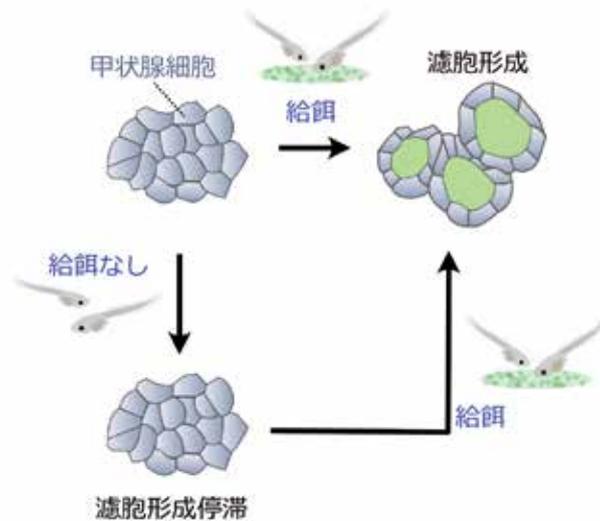


図 2

4. 細胞運動を操作する栄養

甲状腺の濾胞形成と栄養の関係のように、発生における栄養の役割は興味深いところでありながら、形態形成を担う細胞運動に対して栄養がどのような制御を行なっているのかについては未だ不明な点が多い。細胞生物学分野では、個々の栄養素が細胞骨格や細胞接着分子を制御することが長らく知られている。例えば、膵臓のβ細胞ではグルコースが細胞骨格アクチンを制御してインスリンの分泌を促す⁵⁾。免疫細胞のT細胞では、糖代謝で誘導されたアクチンの再構築が細胞の遊走を刺激すること^{6), 7)}、細胞運動におけるアクチンや微小管の動態が脂肪酸で制御されることなども知られる⁸⁾。さらには乳癌細胞ではアミノ酸飢餓によって誘導されることが知られるmTORC1が細胞運動の基質にもなるECMの分解を促進することも報告されている⁹⁾。これらのことは、個々の栄養素が細胞運動を担う細胞骨格とECMを制御していることを示しており、栄養に制御される胚発生でもこのようなことが生じている可能性は十分に考えられる。

上述の栄養が細胞内外の分子を制御するケースとは逆の、細胞骨格・細胞接着分子・ECMが細胞内の代謝を調整することもわかってきている。興味深いことに、これには環境からの「力」がかかわることも示唆されている。これらも培養細胞の研究であるが、細胞同士を接着する分子、E-cadherinに細胞外から物理的な力がかかると、グルコースの細胞内取り込みが促進することが報告されている¹⁰⁾。また、培養細胞の基質を柔らかくすると解糖系の酵素の活性が抑えられ、結果糖代謝が低下することも報告されている^{11), 12)}。これらの反応には細胞骨格アクチンが関わることも見出されており¹³⁾、細胞外からの力や、基質の硬さといった物理的な環境がアクチンを介して細胞内代謝を変化させる、というメカノバイオロジーの観点からも栄養は注目されている¹⁴⁾。今後、発生過程において細胞を動かすために必須の細胞骨格・細胞接着・ECM制御に栄養がどう関わるか、前述したアフリカツメガエルの甲状腺形態形成でもその解明を目指し、研究を進めている。

5. 栄養以外の環境因子と形態形成

両生類や魚類は薄い卵膜で囲まれた状態で外界にさらされながら発生する。特に、水環境の温度やpH、バクテリア、塩濃度など、水質の影響を直接受けるはずであり、それらは実験室内では

厳密に整えられて発生学の研究は行われている。一方で、pHがどこまで上がると胚発生が異常を示すのか、示したとしてなぜそうなるのかはよく知られていない。細胞生物学や分子生物学では、細胞や分子周囲のpHがカドヘリンやクロロゲンといった上皮系の細胞接着分子の接着力を変化させることが知られる。ある研究では、pH4から8までの環境で、クロロゲン2の接着力を定量化したところ、中性>酸性>アルカリ性の順に接着力が高かったと報告している¹⁵⁾。また、カドヘリン分子のダイマー形成がpHによって変化することも知られる^{16), 17)}。癌細胞ではpHを低下させると細胞接着が弱まり、浸潤能が高まるとされている¹⁸⁾。個体や細胞のpH調整機能を考えると、個体環境のpHと、細胞周囲のpH、細胞内のpHは一致しないことには注意が必要であるが、古典的な発生生物学の研究で胚から体表組織の細胞を解離するためにアルカリ溶液が使用されたことを考えると、環境pHが組織の形態形成に与える影響や、それに対する防御機構は今後の興味深い研究対象である。

6. おわりに

栄養は個体の全ての生命活動を支えるエネルギー源であり、「動物胚の発生に栄養が必要である」ということは至極当然で何ら驚きではないように聞こえる。しかしながら、最近注目されている発生における栄養の役割は、そのようなあらゆる生命活動に共通の土台であるだけでなく、特定の栄養素や代謝が特定の組織・器官の細胞運動を制御する、という具合に機能することもありうる。これはつまり、胚が十分な栄養を得られない場合、発生を一時的に停滞させて栄養状態の改善を待つといった対応が可能になることも意味し、ある範囲の環境変動であれば対応できる頑強な発生を支えるシステムの1つであることも考えられる。今後、環境の温度やpH、バクテリアに関しても、「発生のために整えられるべき環境」に留まらない、形態形成や細胞運動を制御する「機能」が発見されれば、今後の発生生物学、形態形成学の新たな展開が期待される。

[参考文献]

- 1) A. Shindo, *WIREs Developmental Biology*, **2017**, 7(1), e293. Review
- 2) A. Shindo and J. B. Wallingford., *Science*, **2014**, 343(6171), 649-652.
- 3) A. Shindo, Y. Inoue, M. Kinoshita and J. B. Wallingford, *Developmental*

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

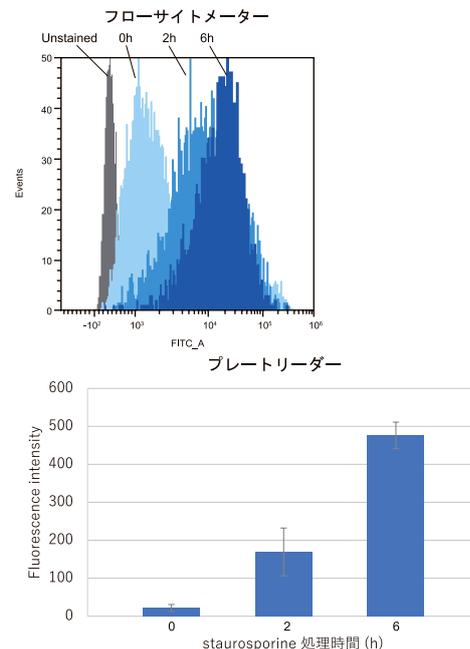
<特長>

- ・ 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

本製品は、ホスファチジルセリン (PS) と特異的に結合する Annexin V を蛍光標識することでアポトーシス初期の細胞を蛍光検出することが可能です。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いますが、本製品には蛍光標識体のバックグラウンド蛍光を消去する試薬 (Quencher Buffer) を同梱しているため、洗浄不要でプレートリーダーで迅速に多検体処理することが可能です。

<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

Biology, 2019, 446(2), 159-167.

4) M. Takagishi, B. M. Aleogho, M. Okumura, K. Ushida, Y. Yamada, Y. Seino, S. Fujimura, K. Nakashima and A. Shindo, *Current Biology*, 2022, 32(7), 1485-1496.

5) D. C. Thurmond, C. Gonelle-Gispert, M. Furukawa, P. A. Halban and J. E. Pessin, *Mol. Endocrinol.*, 2023, 17, 732-742.

6) M. Kishore, K. C. P. Cheung, H. Fu, F. Bonacina, G. Wang, D. Coe et al., *Immunity*, 2017, 47, 875-889.

7) G. Liu, J. Li and C. Wu, *Eur. J. Cell Biol.*, 2022, 101, 151281.

8) M. Masner, N. Lujea, M. Bisbal, C. Acosta and P. Kunda, *Sci. Rep.*, 2021, 11, 1-17.

9) C. Colombero, D. Remy, S. Antoine-Bally, A.S. Macé, P. Monteiro, N. Elkhatib et al., *Adv. Sci.*, 2021, 8, 1-10.

10) J. L. Bays, H. K. Campbell, C. Heidema, M. Sebbagh and K. A. DeMali, *Nat. Cell Biol.*, 2017, 19, 724-731.

11) M. A. Luthernd J. C. Lee, *J. Biol. Chem.*, 1986, 261, 1753-1759.

12) S. J. Roberts and G. N. Somero, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1989, 269, 284-294.

13) G. DeWane, A. M. Salvi and K. A. DeMali, *J. Cell Sci.*, 2021, 134.

14) J. S. Park, C. J. Burckhardt, R. Lazcano, L. M. Solis, T. Isogai, L. Li et al., *Nature*, 2020, 578, 621-626.

15) T. S. Lim, S. R. Vedula, S. Hui, P. J. Kausalya, W. Hunziker and C. T. Lim, *Exp. Cell Res.*, 2008, 314(14), 2643-51.

16) J. M. Jungles, M. P. Dukes, N. Vunnam and S. Pedigo, *Biochemistry*, 2014, 53(47), 7436-44.

17) R. B. Troyanovsky, O. Laur and S. M. Troyanovsky, *Mol. Biol. Cell.*, 2007, 11, 4343-52.

18) V. Estrella, T. Chen, M. Lloyd, J. Wojtkowiak, H. H. Cornnell, A. Ibrahim-Hashim, K. Bailey, Y. Balagurunathan, J. M. Rothberg, B. F. Sloane, J. Johnson, R. A. Gatenby and R. J. Gillies., *Cancer Res.*, 2013, 73(5), 1524-35.

[著者プロフィール]

氏名：進藤 麻子 (Asako SHINDO)
 所属：大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻
 〒 560-0043 大阪府豊中市待兼山町 1-1
 TEL：06-6850-5808
 E-mail：shindo.asako.sci@osaka-u.ac.jp
 出身学校：総合研究大学院大学
 学位：博士 (理学)
 専門分野：発生生物学、形態形成
 現在の研究テーマ：環境が制御する形態形成

新製品

細胞内銅(I)イオン検出蛍光色素

CuprosGreen

<特長>

- ・銅(I)イオンに対する高い金属選択性
- ・蛍光顕微鏡と蛍光プレートリーダーで検出可能
- ・生細胞での銅(I)イオンのライブセルイメージングが可能

銅は、生体内に微量しか存在しないにもかかわらず、呼吸・代謝といった生命現象を司る酵素の活性中心として機能する遷移金属として知られて、ヘモグロビン合成のための鉄の運搬を補助することで鉄代謝を活発にしたり、SOD1 と結合することで活性酸素の除去を行います。このように、銅は我々の生命維持に重要な役割を果たしています。また、近年の細胞死に関する研究においても注目されています。新しい経路の細胞死として、鉄(II)イオンが起点となる Ferroptosis が知られていますが、Ferroptosis や Apoptosis とは異なった経路の銅(I)イオンが起点となる新しい細胞死 (Cuproptosis) も発見されています¹⁾。CuprosGreen は細胞内の銅(I)イオンと選択的に反応して蛍光を発する蛍光プローブです。細胞膜透過性を有しているため、銅(I)イオンのライブセルイメージングが可能です。

1) Tsvetkov et al., *Science*, **2022**, 375, 1254-1261.

<原理>

本製品は、細胞膜透過性を有していることから、生細胞に添加するだけで細胞内に取り込まれます。細胞内に取り込まれた後、銅(I)イオンと選択的に不可逆反応し、蛍光を発します。

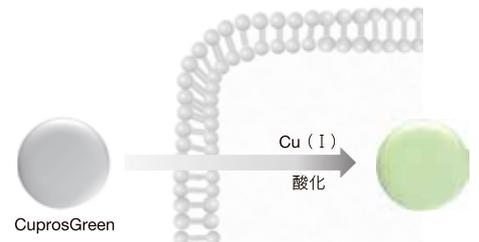
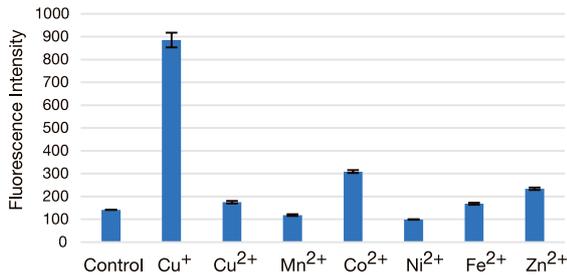


図 CuprosGreen の原理

<銅(I)イオンとの高い金属選択性>

CuprosGreen は銅(I)イオンに対する高い選択性を持つことが分かりました。

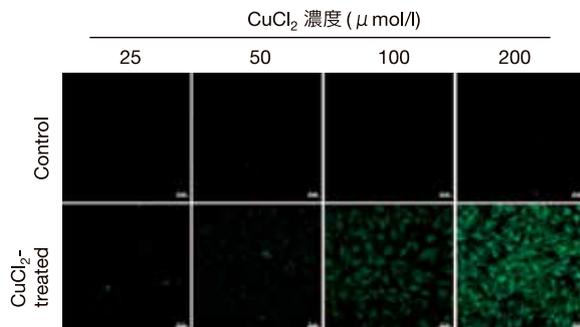
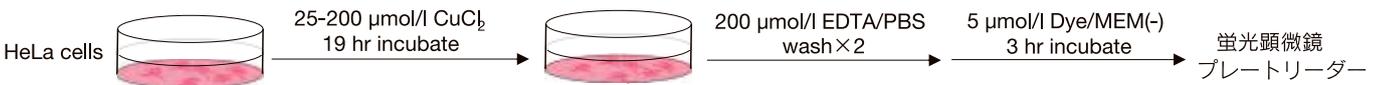


【実験条件】
 金属イオン濃度：20 μmol/l
 CuprosGreen 濃度：1 μmol/l
 Buffer：50 mM HEPES (pH 7.2)
 反応時間：1 時間

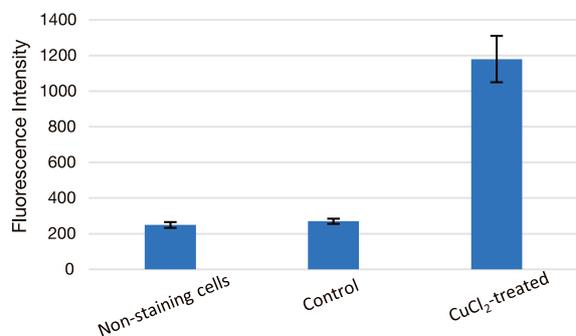
【検出条件】
 蛍光プレートリーダー
 infinite M200 PRO (TECAN 社)
 Ex/Em：470/510 nm

<実験例：HeLa 細胞内の銅(I)の検出>

HeLa 細胞に 25-200 μmol/l 濃度の CuCl₂ を培地中に添加することで銅を取り込ませ、CuprosGreen で検出しました。その結果、添加した銅の濃度依存的な蛍光強度変化をライブセルイメージングすることができました。また蛍光プレートリーダーでも検出できました。



【検出条件】
 共焦点レーザー顕微鏡 Zeiss LSM800
 Ex/Em：488 / 500 - 550 nm
 Scale bar：20 μm



【検出条件】
 蛍光プレートリーダー
 infinite M200 PRO (TECAN 社)
 Ex/Em：470 / 510 nm

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
CuprosGreen	20 μl	29,800	C557

新製品

細胞内酸素検出キット

Intracellular Oxygen Detection Kit

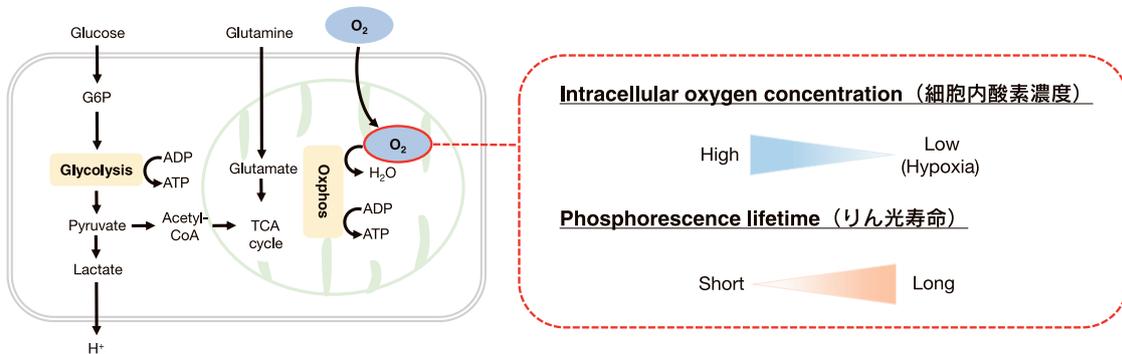
<特長>

- ・細胞内の酸素濃度変化をりん光で検出可能
- ・温度調節機能付き・時間分解蛍光測定可能なプレートリーダーと蛍光顕微鏡を用いて検出可能
- ・空気中の酸素流入を遮断するためにミネラルオイルを同梱

<原理>

好気性生物は主にミトコンドリアの酸化的リン酸化で ATP を産生しており、その過程で酸素は消費されるため、酸素は我々の生命維持に必要な不可欠な物質の一つです。しかしながら、何らかの要因によって細胞内が慢性的な低酸素状態になると、がんや虚血性疾患などが引き起こされます。

細胞内酸素検出キットは、培養細胞内の酸素濃度変化（りん光寿命変化）を測定することができるキットです。本キットは、細胞中の酸素濃度が低下すると、りん光強度が高くなる特性を持つプローブと空気中の酸素流入を遮断するためのミネラルオイルを同梱しています。



<操作手順>

細胞を染色後、
培地で洗浄



インキュベーション
(37°C)



測定
(37°C)

薬剤添加



Mineral Oil
添加



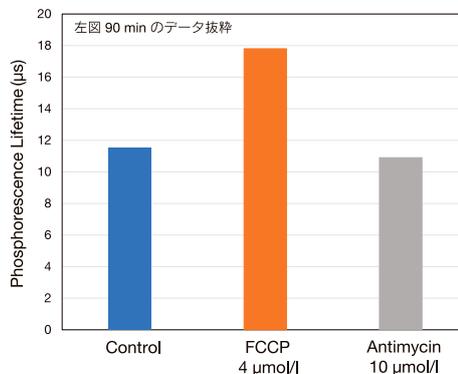
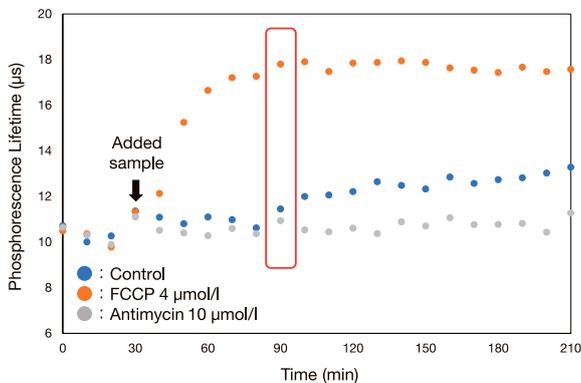
インキュベーション
(37°C)



測定
(37°C)

<実験例：HepG2 細胞の FCCP 処理による細胞内酸素濃度変化（りん光寿命変化）>

HepG2 細胞に FCCP（脱共役剤）を添加することによって、Control と比べてりん光寿命の増加がみられ、細胞内の酸素濃度が減少していることを検出できました。



【検出条件】
Mode：蛍光、
Bottom リーディング
Ex/Em：480 / 590 nm
Temperature：37°C
Integration Time：20 μs
Lag Time：10 μs、40 μs

※本製品は、群馬大学理工学府 吉原准教授らにより開発された製品です。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Intracellular Oxygen Detection Kit	100 tests	60,000	I306
	300 tests	90,000	

新製品

LLPS 性質評価蛍光色素セット

LLPS Characterization-dye Set

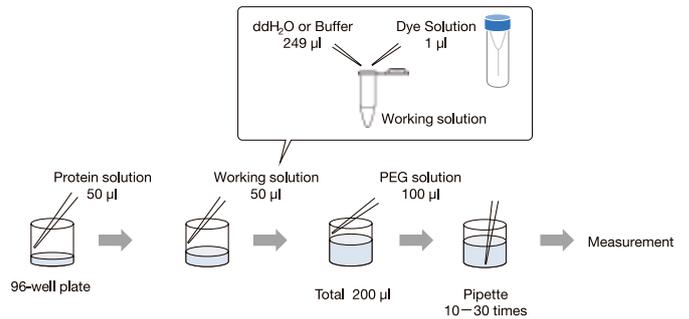
<特長>

- ・ *in vitro* (細胞外) で作製した相分離液滴の主な性質を確認するための色素セット
- ・ 液滴に含まれる疎水性相互作用の強いタンパク質やアミロイドを染色
- ・ 液滴のゲル化や凝集体への変化を捉える色素も同梱

本キットは、タンパク質間の疎水性相互作用に応答する色素 (ANS, SepaFluor) とアミロイド結合性の蛍光染色色素 (Thioflavin T, Congo Red) の4種類をセットにしています。SepaFluorを用いることで疎水性相互作用だけでなく、相分離液滴がゲル化していく様子も観察可能です。凝集体の確認や相分離液滴の染色により、相分離液滴の性質の理解につながります。

コンポーネント	性質
ANS	疎水場で青色蛍光を発する色素
SepaFluor	疎水場で紫色蛍光を発する色素 また液滴のゲル状、凝集体への変化も観察可能
Thioflavin T	アミロイド結合性の緑色蛍光を発する色素
Congo Red	アミロイド結合性の赤色蛍光を発する色素

<操作>

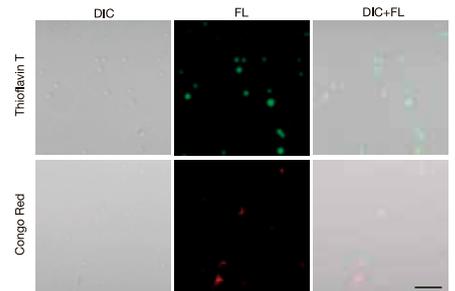


<実験例：Heparin を用いた Tau タンパク質の凝集体の染色>

Tau タンパク質と Heparin を用いて作製した Tau タンパク質の凝集体を Thioflavin T および Congo Red にて染色しました。

【サンプル】
 Tau-441 (2N4R) WT : 10 µmol/l
 Heparin : 20 %
 Buffer : 10 mM HEPES (pH 7.4)
 150 mM NaCl
 色素濃度 : 10 µmol/l
 インキュベート (37°C) : 10 日間

【検出条件】
 共焦点レーザー顕微鏡 Zeiss LSM800
 ○ Thioflavin T
 Ex / Em : 488 / 500 - 600 nm
 ○ Congo Red
 Ex / Em : 561 / 550 - 700 nm
 Scale bar : 10 µm

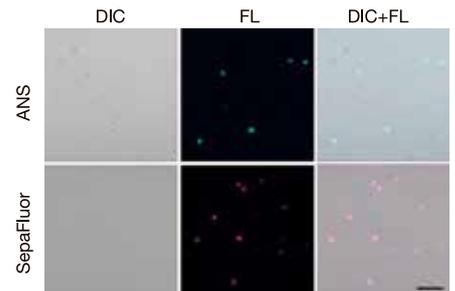


<実験例：クラウディング剤 PEG8000 を用いた BSA タンパク質の染色>

LLPS Starter Kit (LL01) のウシ血清アルブミン (BSA) タンパク質とクラウディング剤 PEG8000 を用いて相分離液滴を作製し、ANS および SepaFluor にて染色しました。

【サンプル】
 BSA : 150 µmol/l
 PEG8000 : 15 %
 Buffer : 50 mM HEPES (pH 7.4)
 150 mM NaCl
 色素濃度 : ANS 10 µmol/l
 SepaFluor 100 nmol/l
 インキュベート (25°C) : 1 時間

【検出条件】
 共焦点レーザー顕微鏡 Zeiss LSM800
 ○ ANS
 Ex / Em : 405 / 400-550 nm
 ○ SepaFluor
 Ex / Em : 640 / 650-700 nm
 Scale bar : 10 µm

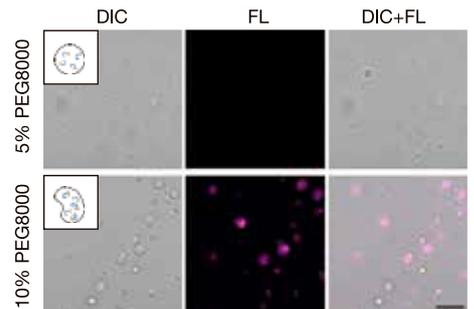


<実験例：PEG8000 を用いた Lactoferrin タンパク質の染色>

Lactoferrin タンパク質は主に静電相互作用を介して相分離液滴を形成することで知られています。このタンパク質を用いて、LLPS Forming Condition Screening Kit (LL02) を活用し、PEG8000 の濃度を検討しました。その結果、濃度を上げることで Lactoferrin の相分離液滴がゲル化する様子を確認し、その変化を SepaFluor で観察しました。

【サンプル】
 Lactoferrin : 20 µmol/l
 PEG8000 : 5 % or 10 %
 Buffer : 20 mM HEPES (pH 7.4)
 色素濃度 : SepaFluor 100 nmol/l
 インキュベート (25°C) : 1 時間

【検出条件】
 共焦点レーザー顕微鏡 Zeiss LSM800
 ○ SepaFluor
 Ex / Em : 640 / 650-700 nm
 Scale bar : 10 µm



品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
LLPS Characterization-dye Set	1 set	39,800	LL03

新製品

精子染色キット

Sperm Staining Kit

<特長>

- ・精子を簡便かつ迅速に染色することが可能
- ・蛍光二重染色による FRET を利用した精子特異的な観察
- ・高い視認性

生殖細胞である精子は、その形成過程で核タンパク質がヒストンからプロタミンに置換されます。プロタミンはジスルフィド結合によって高次構造を形成します。これにより、体細胞核と異なり、精子核ではクロマチン構造が高度に凝集しています。

<原理>

本キットは、プロタミンに多く含まれるジスルフィド結合を還元し、チオール反応性蛍光色素（Thiol-specific Dye Blue）を還元したチオール基に結合させ、同時に DNA 染色蛍光色素 AO（Acridine Orange）により二重染色することができるキットです。UV 光（Blue）で Thiol-specific Dye Blue を励起させることで生じた蛍光エネルギーが、その近傍の DNA と結合した AO に蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）を起こし、精子頭部が強い緑色蛍光を発します。

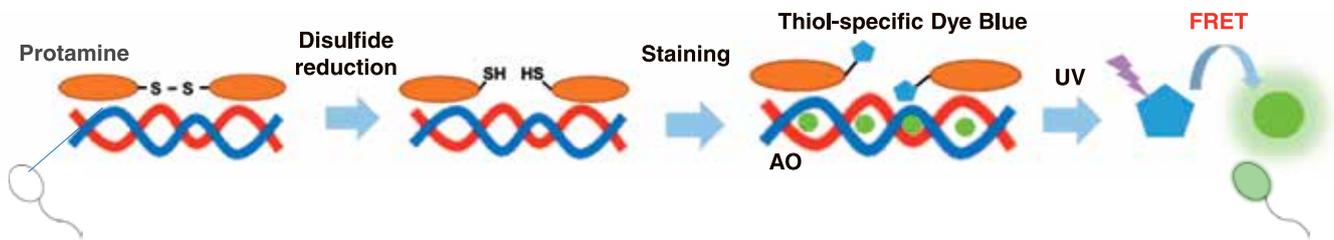


図1 精子プロタミン-DNA 複合体の染色原理

<共焦点顕微鏡を用いた精液と口腔細胞の染色実験>

精液、口腔内細胞を付着させた綿棒からスライドガラスに塗布したサンプルを準備しました。その後、サンプルを固定化し（4% paraformaldehyde PBS, 5 min）、本キットを用いて、ジスルフィド結合の還元処理（RA Solution, 5 min）、続いて蛍光色素による染色（Staining solution, 5 min）を行いました。

蛍光顕微鏡（LSM 800, Zeiss）により 405 nm で蛍光プローブを励起させ、一定の検出感度及びレーザー強度で蛍光画像を取得した結果、精液のみ緑色蛍光（Blue/Green）で精子を観察することができました。

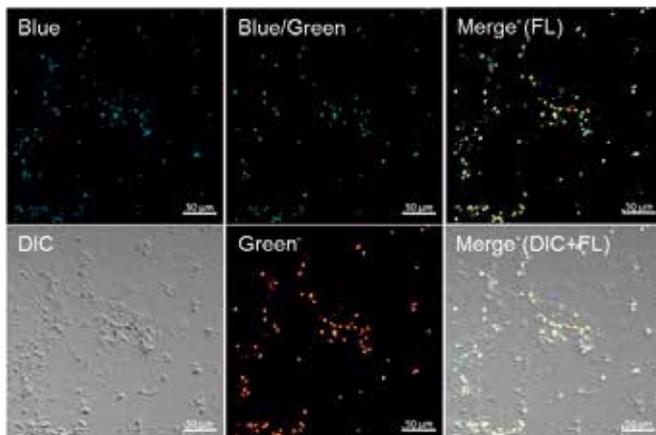


図2 精液の蛍光イメージング画像

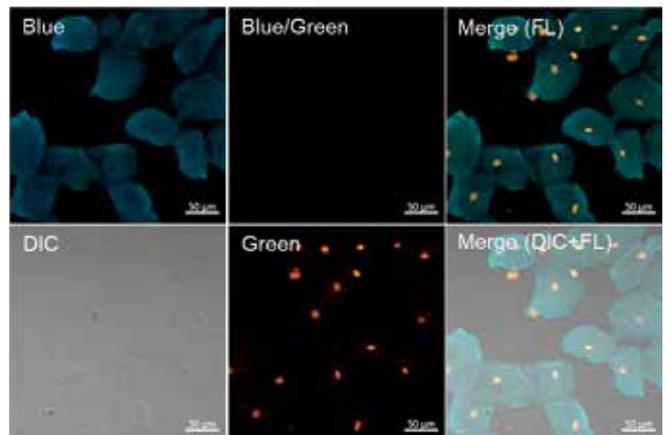


図3 口腔内細胞の蛍光イメージング画像

[検出条件]

Blue 検出波長 : Ex = 405 nm, Em = 450-510 nm, Gain: 0.15%, 550V
 Blue/Green 検出波長 : Ex = 405 nm, Em = 520-530 nm, Gain: 0.15%, 550V
 Green 検出波長 : Ex = 488 nm, Em = 520-530 nm, Gain: 0.10%, 550V

※本製品は、岐阜県警察本部 刑事部 科学捜査研究所 酒井優治 先生のご指導の下、製品化しました。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Sperm Staining Kit	100 tests	50,000	S395

バイオフィーム受託分析 - 形成量比較、形成阻害効果・除去効果の評価 - 同仁グローバル

抗バイオフィーム評価試験を行っています。バイオフィームに関わる製品開発にご活用ください。

高度な技術力：基板への抗バイオフィーム試験（ISO4768）に準じた評価に加え、薬剤によるバイオフィーム形成阻害試験、除去効果の確認、菌種によるバイオフィーム形成量比較、様々な場所からの採取菌によるバイオフィーム形成など、当社のバイオフィーム分析は、最新の技術を駆使して専門家チームが的確な評価方法をご提案します。
信頼性と実績：厳密に育成管理された菌を用い、複数回数分析（n = 4 ~ 8）によって信頼できる結果をご提供します。
柔軟な対応力：多様な目的に対応し、製造現場や医療機関、環境保全分野での特定のニーズに合わせた分析が可能です。

<バイオフィーム評価試験実績例>

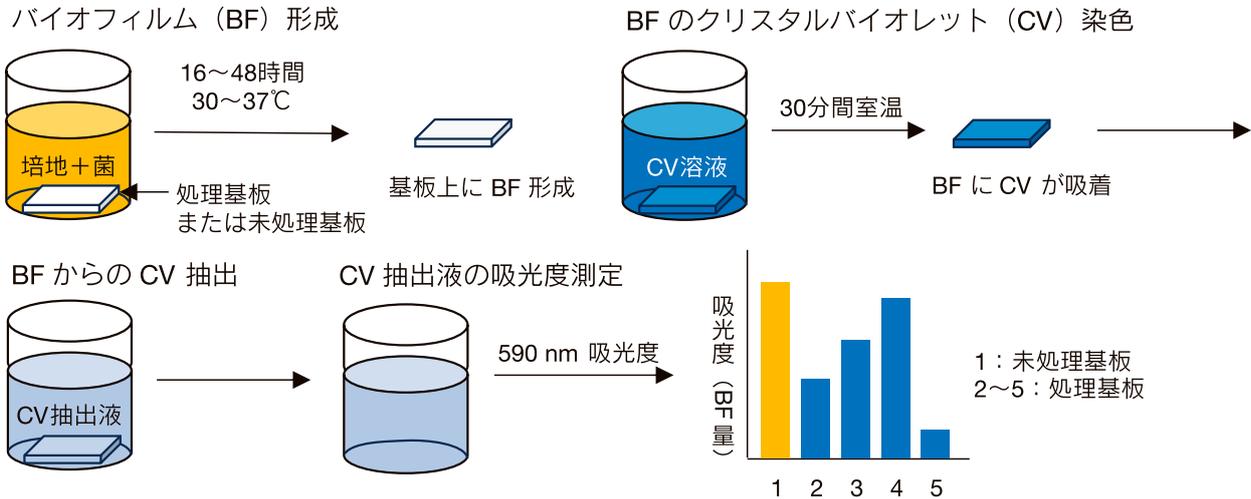
- ・ ISO4768 に準拠した抗バイオフィーム評価試験
- ・ 菌のバイオフィーム形成を阻害する効果の評価 - 基板、薬剤等
- ・ 菌が形成したバイオフィームの破壊（除去、分解）効果の評価 - 薬剤、処理方法等
- ・ 菌が形成したバイオフィーム中の菌に対する殺菌、増殖阻害の評価 - 薬剤、処理方法等
- ・ 処理した表面、基板等へのバイオフィーム形成阻害の評価
- ・ 処理した表面、基板等の周囲のバイオフィーム形成抑制の評価
- ・ バイオフィーム中の菌の活性評価・生菌数の分析（WST 法）

※株式会社同仁化学研究所のキット製品を用いた受託試験も行っております。

<クリスタルバイオレット（CV）染色法による処理基板の抗バイオフィーム活性値の求め方>

1. 表皮ブドウ球菌（*Staphylococcus epidermidis*）等を用いて、静置条件下で試験片（1 cm × 1 cm）上にバイオフィームを形成させます。試験片には抗バイオフィーム処理基板と比較のための未処理基板を用います。
2. 基板上に形成したバイオフィームを CV で染色した後、CV 色素を抽出し、吸光度（波長 590 nm）を測定することで、バイオフィームの形成量を測定します。
3. 未処理基板吸光度：A (untreated) 及び処理基板吸光度：A (treated) から、抗バイオフィーム活性値を算出します。

$$\text{抗バイオフィーム活性値 (\%)} = \left(1 - \frac{A(\text{treated})}{A(\text{untreated})}\right) \times 100$$



バイオフィーム除去剤の効果は、基板の代わりにピンやウェル内面にバイオフィームを形成させたのち、除去剤を含む溶液を加え、薬剤の使用 방법에準じた時間でインキュベーションし、残存したバイオフィーム量を CV により測定して、除去効果を算出します。

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



開催後記

第 34 回フォーラム・イン・ドージン

「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~」

第 1 回 Dojindo Forum in China

[Ferroptosis and Diseases]

第 34 回フォーラム・イン・ドージン

2023 年 12 月にアルツハイマー病治療薬である「レカネマブ」が発売され、また今年に入り「ドナネマブ」の認可への動きが出てきており、アルツハイマー病の治療に新たな光が差し込んできた。今回第 34 回目を迎えるフォーラム・イン・ドージンは、「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~」というテーマで 11 月 15 日に開催した。神経変性疾患研究にフォーカスし、この研究領域でトップランナーである 7 名の先生方を熊本に迎えご講演いただいた。講演は web 配信され、300 名を超える聴講者を数え、大変盛会であった。座長は例年通り、熊本大学 富澤一仁教授、三隅将吾教授に務めていただいた。以下講演タイトルと演者の先生方を記す（講演プログラム順）。

- ・「アルツハイマー病病態形成とグリアネットワーク」
名古屋市立大学 齊藤 貴志教授
- ・「TARDBP エキソトロンスプライシングを標的とした筋萎縮性側索硬化症に対するアンチセンス核酸治療」
新潟大学 須貝 章弘講師
- ・「 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」
順天堂大学 奥住 文美准教授
- ・「トランスサイレチンアミロイドーシスの病態解明と治療法の進歩」
熊本大学 三隅 洋平准教授
- ・「オートファジー促進によるパーキンソン病に対する治療戦略」
筑波大学 斉木 臣二教授
- ・「リポ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」
近畿大学 藤野 雄三研究員
- ・「アルツハイマー病治療薬開発の現状と展望」
東京大学 岩坪 威教授

今回はこれまでとは違い（これまででは基礎研究をテーマとしてきた）より臨床に近いテーマを選定したが、活発な討議がなされ神経変性疾患治療に対する関心の高さがうかがえた。アルツハイマー病やパーキンソン病に代表される神経変性疾患は、昔は治らない病気と思われていたが、抗体医薬等治療薬の開発が飛躍的に進み、今や治療できるところまで来ている。これらの疾患の治療が夢から現実になることを切に願う。

第 1 回 Dojindo Forum in China

日本では 1990 年よりフォーラム・イン・ドージンを開催し今年第 34 回目を迎える。「熊本から世界へ」を合言葉にその当時の先端の研究トピックスを発信してきた。中国での最新のトピックスを世界へ発信する目的で、11 月 1 日に上海にある Okura Garden Hotel に中国国内外で活躍されている 5 名の先生をお招きし、第 1 回 Dojindo Forum in China を開催した。講演は日本で開催しているフォーラムと同様、オンライン形式により中国全土に配信された。

第 1 回目は、「Ferroptosis and Diseases」というタイトルで、今中国で一番ホットな研究テーマであるフェロトーシス研究にフォーカスを当てた。南開大学の Quan Chen 教授にオーガナイザーをお引き受けいただき（講演演題：Molecular Regulation of Ferroptosis and Its Implication in Fighting Cancers and Other Diseases）、アメリカからは、Memorial Sloan Kettering Cancer Center の Xuejun Jiang 教授（講演演題：Ferroptosis, Mechanisms and Role in Disease）、日本からは岐阜薬科大学の平山祐准教授（講演演題：Fluorescent Probes for Imaging Fe(II) and Hem in Living Cells）、そして中国国内から南京大学の Kuanyu Li 教授（講演演題：Physiology and Pathology of Cellular and Mitochondrial Iron Metabolism）、同済大学の Ping Wang 教授（講演演題：Distal Cholesterol Biosynthesis Regulates Ferroptosis）をお迎えし、盛況のうちにフォーラムを終えることができた。

今回のテーマであるフェロトーシスは非アポトーシス細胞死の中の一つに分類され、リン脂質の過酸化によって駆動される鉄依存的な細胞死様式である。先生方の講演では、フェロトーシスが癌、虚血性心疾患や臓器虚血再灌流障害などの疾患の治療に重要な役割を果たすことが示された。フェロトーシスの制御メカニズムの研究が今後重要な臨床応用へつながっていく可能性が期待される。

聴講者は 5,500 名を超え、中国でのフェロトーシス研究の熱さを感じた。今やフェロトーシス研究は中国が世界をリードしている感が強い。第 2 回目のフォーラム開催に向け、中国から世界に情報発信できるテーマの選定を今から進めていきたい。

(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

細胞死