

DOJIN NEWS

ドージンニュース

2025 No.193

ISSN 0385-1516

ラマンプローブ

総説

機能性ラマンイメージングプローブの開発

東京科学大学 藤岡 礼任、神谷 真子

連載

生命科学の最前線～熊本大学若手研究者の現場から～⑧

栄養素代謝物によるエピゲノム制御の 分子メカニズム

熊本大学 日野 信次朗

注目の研究

植物細胞における膨張顕微鏡法の適用

株式会社同仁化学研究所 立中 佑希

関連製品 DNA ダメージ検出抗体 P.10

核小体染色試薬、ストレスマーカー検出試薬 P.11

老化細胞検出製品 P.12

細胞内代謝測定キット P.13

脂肪滴染色蛍光試薬・キット P.16



CONTENTS

Review

機能性ラマンイメージングプローブの開発

Development of functional Raman imaging probes

東京科学大学 藤岡 礼任、神谷 真子

1

Topics on Chemistry

植物細胞における膨張顕微鏡法の適用

株式会社同仁化学研究所 立中 佑希

5

連載

生命科学の最前線～熊本大学若手研究者の現場から～ ⑧

栄養素代謝物によるエピゲノム制御の分子メカニズム

Nutritional control of the epigenome

熊本大学 日野 信次朗

6

Commercial

関連製品

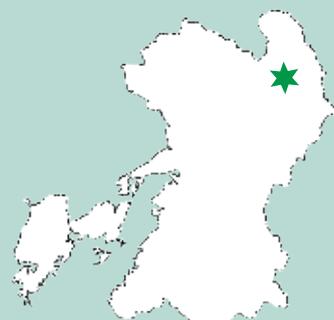
| | |
|---------------|----|
| DNA ダメージ検出抗体 | 10 |
| 核小体染色試薬 | 11 |
| ストレスマーカー検出試薬 | 11 |
| 老化細胞検出製品 | 12 |
| 細胞内代謝測定キット | 13 |
| 細胞内代謝測定キット | 14 |
| 細胞外 ATP 測定キット | 15 |
| 脂肪滴染色蛍光試薬 | 16 |
| 脂肪滴測定キット | 16 |

お役立ち

| | |
|---------------------|----|
| 脂肪酸分析のご案内 - 同仁グローバル | 17 |
|---------------------|----|



表紙：阿蘇市
外輪山の雲海とゆうすげ
photo：永島俊介氏



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。

機能性ラマンイメージングプローブの開発 Development of functional Raman imaging probes



藤岡 礼任

東京科学大学
総合研究院・化学生命科学研究所
助教



神谷 真子

東京科学大学
総合研究院・化学生命科学研究所
教授

Abstract

Recently, Raman imaging has attracted significant attention for its higher multiplexed detection capability than fluorescence imaging. Lower sensitivity of Raman imaging compared to fluorescence imaging has been improved by the progress of Raman microscopy and Raman probes, however, most Raman probes showed constant Raman signal, that is called “always-on” probe. We focused on resonance Raman effect that enhanced Raman signal significantly when the molecular absorption approaches to pump wavelength, and developed several functional Raman probes. In this review, we would like to overview our recently developed functional Raman probes and the frontiers of vibrational imaging.

1. はじめに

生体を観察する手法として、有機小分子蛍光色素や蛍光タンパク質といった蛍光プローブを用いた蛍光イメージングが幅広く普及し、生命現象の解明に多大なる貢献をしてきた。一方で、蛍光イメージングではスペクトルの幅広い線幅のために color barrier が存在すると言われ、同時多重検出数に一定の限界がある点が課題として挙げられている。これに対し、分子振動を検出するラマンイメージングでは蛍光スペクトルよりも 50–100 倍狭いラマンスペクトルの特徴により、特に細胞由来の信号が生じない silent region に信号を示すラマンタグ構造を有したプローブを利用することで、蛍光を凌駕する多重検出数を達成できる点において近年注目を浴びている¹⁾ (図 1)。

2. 吸収波長変化を利用したラマン信号制御

第 1 章で述べたような利点を有しているラマンイメージングであるが、検出するラマン散乱の典型的な散乱断面積は 10^{-30} cm^2 であり、一般的な蛍光分子の吸収断面積 10^{-16} cm^2 と比べて 10^{14} 倍も小さい。このため検出感度が低く、特に生体イメージングにおいては撮像時間に数十分から数時間かかってしまうことが大きな課題であった²⁾。そのような中、誘導ラマン散乱 (stimulated Raman scattering, SRS) 現象を利用することでビデオレートでの高速撮像が可能となった SRS 顕微鏡³⁾ や、共鳴ラマン散乱を利用したラマン色素プローブの登場によって、ラマンイメージングの生体適合性が大きく向上した。特に Min 教授らによって報告された、前期共鳴ラマン (electronic pre-resonance, EPR) 条件と SRS 顕微鏡を組み合わせた EPR-SRS

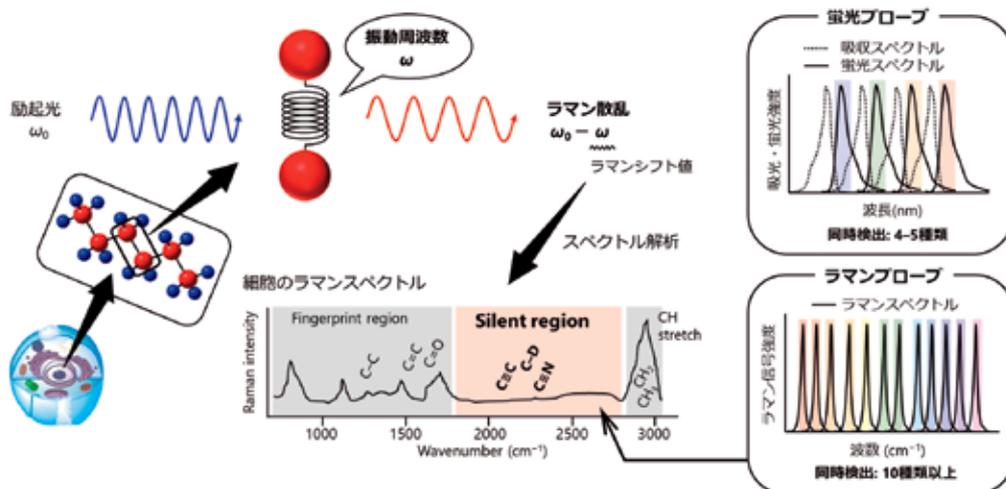


図 1 ラマンイメージングの概要

励起波長から分子の振動数だけ波長が変化した散乱光をラマン散乱と呼ぶ。この波長の変化量をラマンシフト値と呼ぶが、ラマンシフト値は分子固有の値であるため蛍光分子などで標的分子をラベル化しなくても分子を直接検出することが可能である。また、生体由来の信号が生じない波数域を silent region と呼ぶが、silent region に信号を示すラマンタグプローブを用いることで 10 種類以上の標的分子を同時に可視化可能であることが近年報告された。

検出系は、10種類以上の標的を高感度に同時検出した例として大きな注目を浴びた⁴⁾。しかし、このようなラマンプローブの多くは常に一定の信号を発する always-on 型のラマンプローブであり、特定の化学反応に伴ってはじめて信号を発するような機能性を有した activatable なラマンプローブの設計法は確立されていなかった。そこで我々は特に、共鳴ラマン散乱が「励起波長に対して分子の吸収波長が近づくにつれてラマン散乱強度が著しく増大する」現象であることに着目し、分子の吸収波長変化を制御できればラマン信号の off/on を制御できるようになるのではないかと着想し研究を行った (図2)。本稿では、このような制御原理に基づいて最近著者らのグループが報告した機能性ラマンプローブについて紹介する。

3. 酵素活性検出ラマンプローブ

生体内では様々な酵素が化学反応を触媒しているため、一度に複数の酵素活性を検出することができれば生命現象をより包括的に理解できる可能性があり、多重検出能の高いラマンプローブでの複数酵素活性検出を目指した。著者らのグループではこれまでに酵素活性を検出可能な蛍光プローブを数多く開発してきた^{5), 6)}が、その開発過程でプローブとして使用している蛍光色素が標的酵素による加水分解反応を受ける前後で吸収波長を変化させる特性を見出してきたため、この吸収波長変化を利用することで activatable 型のラマンプローブが設計できるのではないかと考えた。第3章では、はじめに概念実証を行った activatable 型ラマンプローブ、およびその細胞内滞留性を改善した凝集型ラマンプローブについて概説する。

3.1. 酵素活性検出 activatable プローブ

Activatable 型ラマンプローブを開発するにあたってキサンテン環3位の amid 結合が加水分解されて1級アミンへと変換されることで吸収波長が長波長化する性質を利用できると考えた。すなわち、はじめは吸収波長が短波長であり共鳴ラマン効果が得られずラマン信号が off となっているが、加水分解酵素との反応によって吸収波長が長波長化し EPR 条件を満たすようになることでラマン信号が on となる分子設計を考案した。そこで、キサ

ンテン色素に silent region に振動を生じるラマンタグとしてニトリル基を導入した 9CN-pyronin を誘導体展開した結果、9CN-JCP が生理的条件下でも安定なプローブ母核であることを見出した。実際に 9CN-JCP に amid 結合を介して GGT (γ -glutamyl transpeptidase) の酵素基質部位を導入した gGlu-9CN-JCP は、9CN-JCP よりも吸収波長が大きく短波長化することでラマン信号強度が 60 倍程度低下し、GGT との反応によって 9CN-JCP を生成することでラマン信号を activate 可能であることが確認された。さらに、ラマンイメージングの多重検出能に基づけばニトリル基の炭素原子および窒素原子を安定同位体で置換することによってラマンシフト値を変化させることができ、異なる波数で検出可能なプローブ母核に対してそれぞれ異なる酵素反応部位を導入することで、4種類の酵素活性検出ラマンプローブを開発することに成功した。これらを生きた細胞に用いることで4種類の酵素活性をライブイメージングすることができ、細胞種によって酵素活性パターンが異なることが示された⁷⁾ (図3.1.)。

3.2. 細胞内滞留性プローブ

前節の 9CN-pyronin を母核としたラマンプローブは、酵素活性を検出可能であることが実証された一方で、酵素反応後に生成される色素母核の細胞内滞留性が低く、標的酵素活性が高い標的細胞と低い非標的細胞が混在するような生体組織サンプルにおいては、activate された色素の漏出のために標的細胞のみを選択的に検出することができないという課題が明らかとなってきた。そこで細胞内滞留性を改善した新規プローブの開発に着手したところ、9CN-pyronin のアミノ基をヒドロキシ基に置換した 9CN-rhodol が生理的条件下で高い凝集性を示す特性が見出された。そこで、この性質を利用して酵素反応後に凝集性を獲得するようなプローブ設計ができれば細胞内滞留性を改善できるのではないかと考えた。実際に 9CN-pyronin と 9CN-rhodol の性質を精査したところ、分子全体の電荷が cationic である 9CN-pyronin や酸性条件下の 9CN-rhodol は凝集性を示さなかったのに対し、分子全体の電荷が neutral となる中性条件下の 9CN-rhodol は顕著な凝集性を示すことが明らかとなった。更なる誘導体展開を経て開発した 9C¹⁵N-JCR-Bn- β Gal は、標的酵素である β -Gal (β -galactosidase)

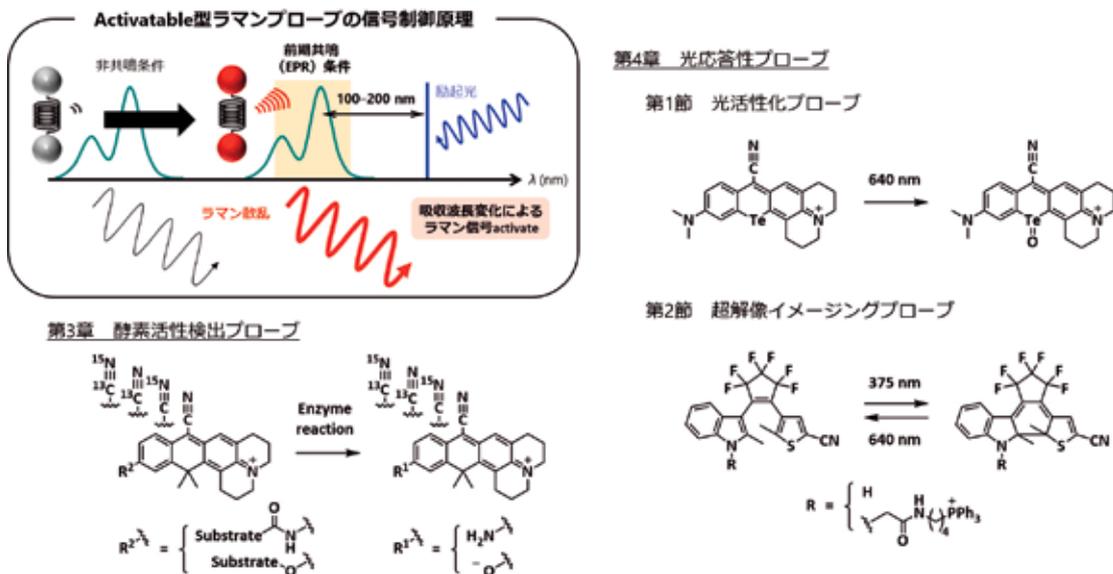


図2 共鳴ラマン効果を用いた activatable 型ラマンプローブの分子設計

励起波長が分子の吸収波長に近づくにつれてラマン散乱強度が著しく増大する現象を共鳴ラマン散乱と呼び、特に分子の吸収よりやや長波長の光を用いる前期共鳴条件が高感度ラマンイメージングに適していることが報告された。著者らのグループでは、共鳴ラマン効果を利用すれば分子の吸収波長変化に基づいてラマン信号の off/on を制御できるのではないかと考え、機能性を有したラマンプローブ開発を行ってきた。

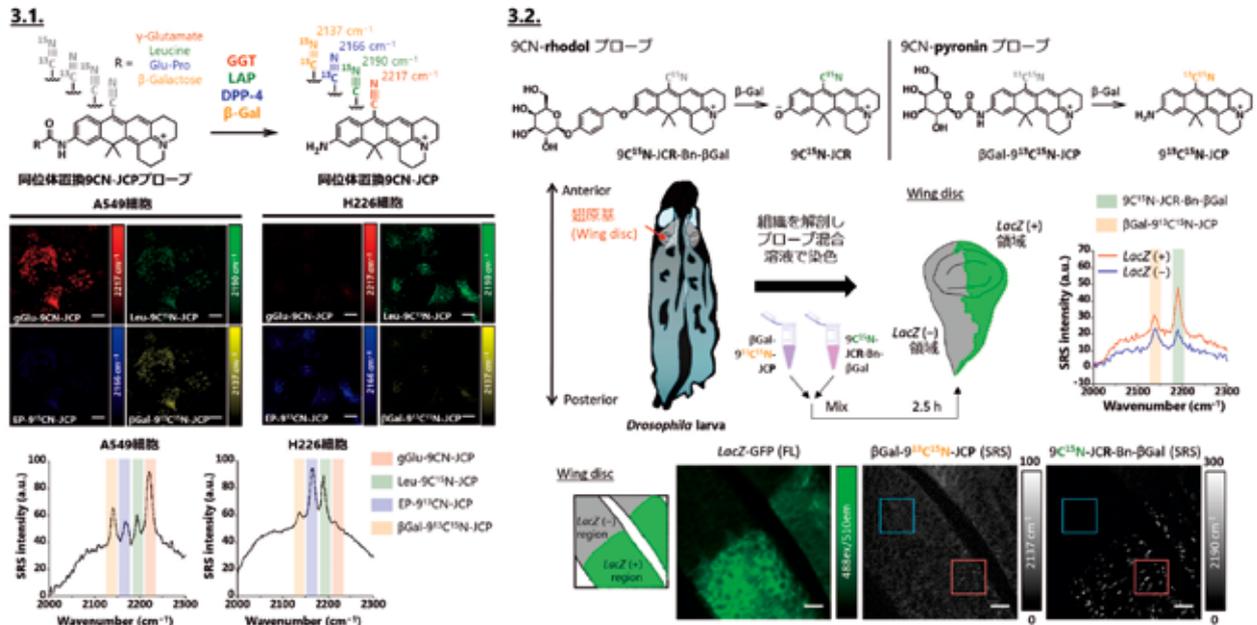


図3 酵素活性検出ラマンプローブ

3.1. 9CN-pyroninをプローブの母核構造とし、アミド結合を介して導入した酵素基質部位が加水分解されることに伴う波長変化によってCN基のラマン信号がactivateされるプローブの開発に成功した。CN基を安定同位体で置換することによってラマンシフト値を調節することが可能であり、異なる4種類の酵素活性を同時に検出可能なラマンプローブを開発し、生きた細胞で細胞種によって酵素活性パターンが異なることを実証した。3.2. 9CN-pyroninプローブでは酵素反応後に色素が標的細胞から漏出するために組織でのイメージングが困難であったが、9CN-rhodolを母核としたプローブでは酵素反応後に生成する色素が凝集体を形成することで細胞内滞留性を改善することができた。一部の領域にのみβ-galactosidaseを過剰発現させたショウジョウバエ組織に対して9CN-rhodolプローブと9CN-pyroninプローブを同時に添加して比較した実験では、9CN-rhodolが9CN-pyroninよりも高い領域選択性で組織を染色可能であることが示された。

との反応前は吸収波長が短波長なためラマン信号強度がoffでありかつ凝集性も低いが、β-Galとの反応後には長波長化によってラマン信号強度がonになると同時に凝集性を獲得することが確認された。このようにして新規開発した9CN-rhodolプローブでは、標的酵素と非標的細胞が混在するショウジョウバエ組織を用いたex vivoイメージングにおいても、標的細胞の存在領域を高選択的に検出可能であることが実証された⁹⁾(図3.2.)。

4. 光応答性ラマンプローブ

第3章では酵素反応を起点とした波長変化に基づいた分子設計を行ったが、近年では光をトリガーとした機能性ラマンプローブの報告も増えつつある^{9), 10), 11)}。著者らのグループでも最近いくつかの光応答性ラマンプローブを報告しており、第4章ではこれらのプローブについて概説する。

4.1. 光活性化プローブ

10位元素をTe原子に置換したrhodamine類は、10位のTe原子の酸化によって吸収波長が長波長化することが知られており¹²⁾、これを利用すれば10位元素を反応点とした新規ラマンプローブが開発可能ではないかと考えた。そこで、第3章・第1節でプローブ母核として活用した9CN-pyroninの10位元素をTeに置換した一連の誘導体を合成・評価したところ、9CN-diMeJTePを最適な構造として見出した。9CN-diMeJTePは640nmの照射によって10位のTe原子が(Te=O)構造へと酸化され、この構造変化に伴う吸収波長変化によってEPR効果が強くなりSRS信号強度が増大することが確認された¹³⁾(図4.1.)。

4.2. 超解像イメージングプローブ

光照射によってラマン信号がスイッチングするプローブを開発するべく、紫外光照射により長波長吸収の開環構造に、可視光照射により短波長吸収の開環構造に変換されるDAE(diarylethene)

色素を母核としてDAE620を設計・開発した。開発したDAE620は、375nm光と640nm光の照射によって閉環体と開環体をスイッチングする特性を示し、長波長吸収を有する閉環体では、共鳴ラマン効果により開環体と比べてC=C振動ピークが大きくactivateされることが明らかとなった。さらに本プローブを、紫外光とドーナツ状に成形した可視光を用いた光学系に適用することによって狭小領域の分子のラマン信号のみをactivateし、RESOLFT(reversible saturable optical fluorescence transitions)と同様の原理に基づいた超解像ラマンイメージングを行えるのではないかと考えた。本手法をRESORT(reversible saturable optical Raman transitions)と命名し、RESORT実証に向け、DAE620にミトコンドリア指向性リガンドを導入したDAE620-Mitoで染色した細胞を用いてRESORT観察を行ったところ、細胞内のミトコンドリアを高い分解能でイメージング可能であることが示された¹⁴⁾(図4.2.)。

5. おわりに

本稿では、著者らのグループの研究成果を基に機能性ラマンプローブの開発について概説した。ラベル化剤としてだけでなく、activatableな機能性を有したラマンプローブによる多重イメージングが進めば、生命現象のより包括的な理解が深まると期待される。

最後に、本稿で紹介した著者らの研究は、東京大学先端科学技術研究センターの小関泰之教授との共同研究成果であり、この場を借りて深く感謝申し上げます。

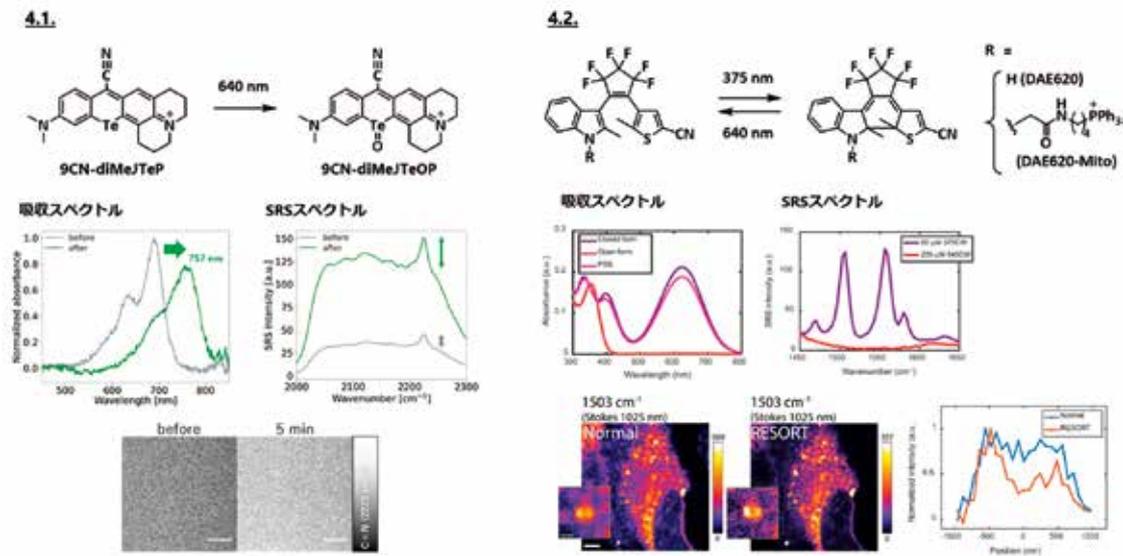


図 4 光応答性ラマンプローブ

4.1. 9CN-pyronin の 10 位元素を Te 原子に置換した 9CN-TeP 誘導体は 640 nm の可視光照射によって吸収波長が長波長化し、これに伴って CN 基のラマン信号強度が増大することが確認された。4.2. DAE620 は 375 nm の紫外光と 640 nm の可視光によって閉環体と開環体をスイッチする特性があり、C=C 結合のラマン信号も大きくスイッチングする性質が見出された。この性質を利用することで RESOLFT と同様の原理に基づいた超解像ラマンイメージング (RESORT) が可能であり、細胞内のミトコンドリアを高い分解能でラマンイメージングすることに成功した。

[参考文献]

- 1) F. Hu *et al.*, *Nat. Methods*, **2019**, 16(9), 830-842.
- 2) H. Yamakoshi *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133(16), 6102-6105.
- 3) Y. Ozeki *et al.*, *Opt. Express*, **2009**, 17(5), 3651-3658.
- 4) L. Wei *et al.*, *Nature*, **2017**, 544(7651), 465-470.
- 5) M. Kamiya *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133(33), 12960-12963.
- 6) M. Sakabe *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135(1), 409-414.
- 7) H. Fujioka *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, 142(49), 20701-20707.
- 8) H. Fujioka *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2023**, 145(16), 8871-8881.
- 9) J. Ao *et al.*, *Nat. Commun.*, **2021**, 12(1), 3089.
- 10) J. Du and L. Wei, *J. Am. Chem. Soc.*, **2022**, 144(2), 777-786.
- 11) Y. Yang *et al.*, *Nat. Commun.*, **2024**, 15(1), 1-12.
- 12) Y. Koide *et al.*, *Chem. Commun.*, **2012**, 48(25), 3091-3093.
- 13) M. Kawatani *et al.*, *Chem. Asian J.*, **2023**, 18(2), e202201086.
- 14) J. Shou *et al.*, *Sci. Adv.*, **2023**, 9(24), eade9118.

[著者プロフィール]

氏名：藤岡 礼任 (Hiroyoshi Fujioka)
 所属：東京科学大学 総合研究院・化学生命科学研究所
 〒 226-8501
 神奈川県横浜市緑区長津田町 4259
 Tel : 045-924-5233
 E-mail : fujioka.h.af@m.titech.ac.jp
 出身学校：東京大学大学院薬学系研究科
 学位：博士 (薬科学)
 専門分野：ケミカルバイオロジー
 現在の研究テーマ：機能性ラマンプローブの開発

氏名：神谷 真子 (Mako Kamiya)
 所属：東京科学大学 総合研究院・化学生命科学研究所
 〒 226-8501
 神奈川県横浜市緑区長津田町 4259
 Tel : 045-924-5233
 E-mail : kamiya.m.ad@m.titech.ac.jp
 出身学校：東京大学大学院薬学系研究科
 学位：博士 (薬学)
 専門分野：ケミカルバイオロジー
 現在の研究テーマ：光機能性プローブの開発

Topics on Chemistry

植物細胞における膨張顕微鏡法の適用

株式会社同仁化学研究所 立中 佑希

現在、光学顕微鏡業界の発展は目覚ましく、それに伴い解像度限界を超える超解像イメージング技術は、細胞生物学の研究に革命をもたらしてきた。しかし、これらの技術は、特殊な装置を必要とするため高価であり、その利用と普及には制約があった。2015年にChenらが提唱した膨張顕微鏡法(ExM)¹⁾は、試料をゲルマトリックス内で物理的に膨張させることで、従来の共焦点顕微鏡を用いても超解像イメージングを可能にする革新的な手法であり、イメージング技術の新たな可能性が期待されている。もともと動物細胞と組織用に開発されたExMだが、植物細胞の微細構造を観察するための手法としての応用が求められている。しかし、植物細胞特有の堅固な細胞壁や高い自家蛍光による影響は、ExMの適用において大きな障壁となっていた²⁾。本稿では、この課題を解決した一例として植物細胞への膨張顕微鏡法(PlantEx)の適用可能性について紹介する³⁾。

Galleiらの研究チームは、シロイヌナズナの根をモデルとして、4倍の解像度向上を実現するExMを植物細胞に適用するために最適化された手法「PlantEx」を開発した。まず、シロイヌナズナの苗を免疫標識(アンカー基でプライミング)し、ハイドロゲル溶液で処理後、植物試料の膨張を容易にするため、セルラーゼやペクチナーゼといった細胞壁分解酵素を用いて細胞壁の物理的な強度を低下させる処理を施す。次に、プロテイナーゼKを使用し、細胞内のタンパク質を部分的に分解することで、細胞内構造の均一な膨張を促進する。最後に、これら2段階の処理をした植物試料をポリアクリルアミドゲルに包埋し、等方的に膨張させることで物理的に拡大し、従来の光学顕微鏡で高解像度の観察を可能とした。これにより、障壁となっていた細胞壁の問題を克服し、ExMの適用が可能となった。さらに、PlantExの有効性を検証するため、複数の抗体で免疫標識したシロイヌナズナの根組織にPlantExを試みた。従来の手法では、COPI小胞とゴルジ体が近接しているため(トランスゴルジネットワーク)、二つのシグナルはオーバーラップしがちであったが、PlantEx処理後のイメージング解析では、COPI小胞がゴルジ体から小胞体へ向かって局在する様子が明確に観察された。従来の手法では識別できなかった個々の線維の配向や密度の変化が明確になり、植物細胞の内部構造に関する新たな知見が得られた。

本稿では、シロイヌナズナの根を用いたPlantExMの適用例を示したが、他の植物種への適用についてはさらなる研究が必要である。植物ごとに細胞壁の構造や組成が異なるため、酵素処理の条件やプロトコルの最適化が求められる。また、膨張後の植物試料の形状変化や蛍光シグナルの保持率など技術的な課題も残されており、自家蛍光の影響を最小限に抑えるための工夫や前処理方法の検討が重要である。本研究は、膨張顕微鏡法を植物細胞に適用するための革新的なアプローチを示しており、植物科学研究における超解像イメージング技術の新たな可能性を切り開いた。ExM技術の普及とさらなる改良により、植物細胞の微細構造解析が進展し、植物生物学の理解がより深まることが期待される。

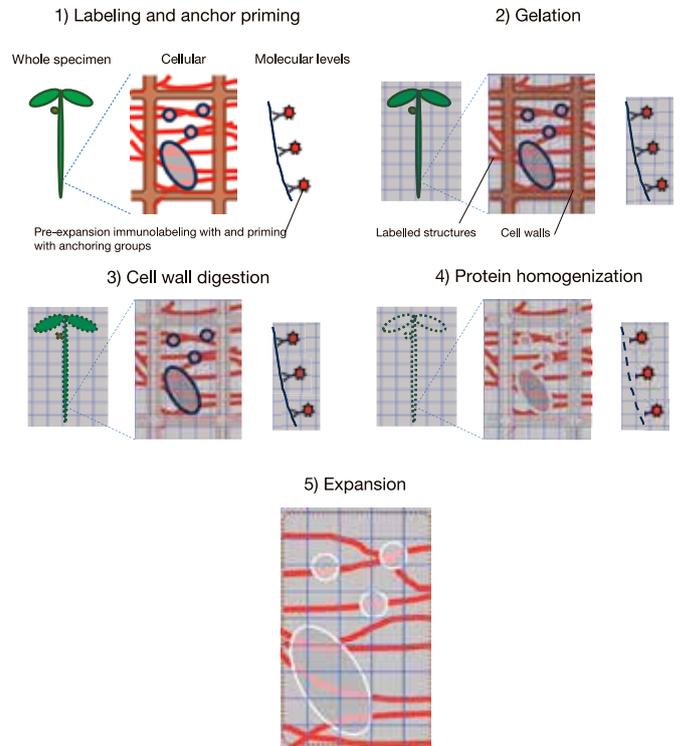


図1 PlantExの概略図³⁾

[参考文献]

- 1) F. Chen *et al.*, "Expansion microscopy", *Science*, **2015**, 347(6221), 543-548.
- 2) S. Chakraborty, "Super-califragilisticexpialidocious-resolution microscopy: How expansion microscopy can be applied to plants", *The Plant Cell*, **2025**, 37(2).
- 3) M. Gallei *et al.*, "Super-resolution expansion microscopy in plant roots", *The Plant Cell*, **2024**, <https://doi.org/10.1093/plcell/koaf006>.

Fig.1 was reprinted from Referenced 3).

Copyright © M. Gallei et al. licensed under CC BY 4.0.

連載

生命科学の最前線 ～熊本大学若手研究者の現場から～ ⑧

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。

栄養素代謝物によるエピゲノム制御の分子メカニズム Nutritional control of the epigenome



日野 信次朗

熊本大学
発生医学研究所
細胞医学分野
准教授

Abstract

Organisms fine-tune their gene expression in response to environmental cues such as nutrients, oxygen, and pathogens, thereby enabling environmental adaptation. Epigenetic gene regulation, through DNA methylation and histone modifications, is essential for this adaptive gene expression. In particular, food-derived metabolites such as acetyl-CoA, S-adenosylmethionine, and flavin adenine dinucleotide play central roles, as they serve either as substrates for the modifications or as essential cofactors for the modifying enzymes. This review will focus on the specific mechanisms by which metabolites regulate DNA/histone modifications, especially in light of newly identified metabolite-epigenome relationships.

1. はじめに

環境に応じた適切な遺伝子発現において、DNAやヒストンタンパク質の化学修飾であるエピゲノムが重要な役割を果たす。エピゲノムは環境に応じて変化することで、環境応答遺伝子の転写されやすさを調節する。特に興味深いのは、栄養素代謝物がエピゲノム修飾の基質として利用される点である。また、エピゲノム制御に関わる酵素も代謝物に依存した活性を示す。これらの代謝物は、栄養摂取、酸素供給、酸化ストレスなどの環境因子の影響下で増減する。つまり、環境に応じたエピゲノムの変化やその結果生じる遺伝子発現や細胞機能の変化は、仲介する代謝物（ハブメタボライト）によって制御される。実際に、さまざまなハブメタボライトが発生、細胞分化、老化、発がん、生活習慣病など、多岐にわたるエピジェネティックな生命現象と深く関わることが報告されている¹⁾。

本稿では、活発に研究が進められてきたハブメタボライトを概観しつつ、最近注目されている新しいエピゲノム修飾や筆者らが取り組んでいるフラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）依存性

エピゲノム制御機構について解説する。

2. 栄養素代謝物によるエピゲノム制御の概要

真核生物の膨大な遺伝情報をコードするゲノムDNAは、ヒストンタンパク質に巻き付けられた状態（クロマチン）でコンパクトに折りたたまれて小さな核内に収納されている。4種類のヒストンタンパク質（H2A、H2B、H3、H4）がそれぞれ2分子ずつ集まり、合計8個のヒストンが複合体を形成する。そこに146塩基対のDNAが巻き付いて、クロマチンの最小構成単位であるヌクレオソームとなる。一般に、転写の起点となるプロモーター領域や転写量の調節を司るエンハンサー領域では、クロマチンは緩んだ状態（オープンクロマチン）になっており、遺伝子発現に必要なRNAポリメラーゼや転写因子がアクセスしやすい状態になっている。

クロマチン構造はエピゲノムと密接に関わっている（図1）。すなわち、DNAやヒストンがアセチル化、メチル化、リン酸化などの修飾を受けることで、ヌクレオソームの化学的性質や他の

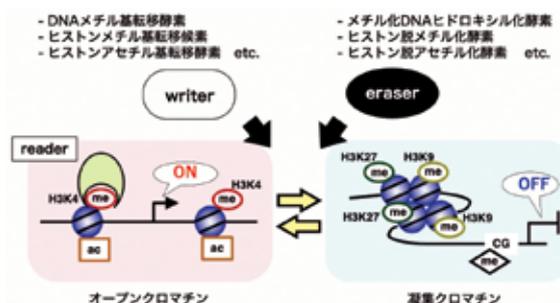


図1 エピゲノムとクロマチン構造

ac: アセチル化, me: メチル化, H3K4, K9, K27: ヒストン H3 の 4, 9, 27 番目のリジン残基

分子との相互作用に変化が生じ、その結果クロマチンのアクセスしやすさが決まる。一般に、プロモーターやエンハンサーにおいて、ヒストンのリジン残基アセチル化 (Kac) やヒストン H3 の 4 番目のリジン残基のメチル化 (H3K4me) はオープンクロマチンと強い相関があり、DNA メチル化やヒストン H3 の 9 番目または 27 番目のリジンメチル化 (H3K9me, H3K27me) は転写されにくい凝集クロマチンと結びついている。

エピゲノム修飾には、さまざまな栄養素代謝物が利用される (図 2)。例えば、糖や脂肪酸の代謝によって生じるアセチル CoA やアシル CoA は、ヒストンのアセチル化・アシル化の基質となる。また、DNA やヒストンのメチル化には S- アデノシルメチオニン (SAM) がメチル基供与体として利用されるが、SAM 合成経路はメチオニンや葉酸、コリン、ビタミン B₉ などの栄養素代謝と連動している。さらに、ケトン体を基質としたヒストンのヒドロキシブチリル化や、後述する乳酸や神経伝達物質によるヒストン修飾など、新たなエピゲノムマーカーが発見され、代謝-エピゲノムネットワークは広がり続けている²⁾。

エピゲノムの制御には、修飾を導入する酵素 (writer)、除去する酵素 (eraser)、修飾の有無を認識するタンパク質 (reader) が関与する (図 1)。これらの役割を担う因子たちが連携することで、エピゲノムの書き換えと維持、転写やクロマチン構造の制御が行われる。これらの中で、eraser は栄養素代謝物に強く依存した活性を示す (図 2)。ヒストン脱メチル化酵素は、FAD を必須の補因子とするアミノオキシダーゼ型と、 α -ケトグルタル酸 (α KG) に依存した活性を持つジオキシゲナーゼ型に分けられる。FAD はビタミン B₂ であるリボフラビンに由来する物質であり、 α KG は TCA 回路の中間代謝物であることから、両タイプとも栄養摂取や細胞内代謝に強く依存している。また、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) は、ニコチンアミドジヌクレオチド (NAD⁺) 依存性の sirtuin ファミリーと Zn²⁺ 依存性の HDAC1-11 に大別される。NAD⁺ は食事由来のナイアシンやトリプトファン、内因性のニコチンアミドから合成されるため、sirtuin の活性はこれらの物質代謝の影響を強く受ける。HDAC1-11 については、短鎖脂肪酸である酪酸によって阻害される。

クロマチン構造は、細胞が置かれた環境または過去に経験した環境によって変化することで、環境への即時応答や長期的な適応を可能にする。上記の代謝物は、栄養、酸素、温度、pH など、さまざまな環境因子の影響下で動的に制御されているため、環境応答性エピゲノムのハブとして機能することができる。

3.1 乳酸とヒストンラクチル化

乳酸は、近年最も注目されているハブメタボライトの 1 つである。2019 年にヒストンのリジン残基に乳酸が付加されたラクチル化 (Kla) の存在が報告されたのを皮切りに、その生物学的役割や制御機構に関する論文が頻繁に見られるようになった (図 3)³⁾。乳酸は解糖の最終産物であり、解糖活性と乳酸産生の間

には強い相関がある。そのため、ヒストンラクチル化の研究は、解糖系が著しく活性化されているがん細胞を用いて活発に進められている⁴⁾。最近では、神経系や免疫細胞など、さまざまな細胞種を用いた研究が多く行われており、ラクチル化ヒストンはエピゲノムを構成する主要な因子として認識されつつある⁵⁾。

Zhang らは、ヒト乳がん細胞やマウスマクロファージ由来のコアヒストンを用いた質量分析により、ヒストン H3K9・K14・K18 や H4K5・K8 をはじめとして、28 箇所のリジン残基がラクチル化されることを明らかにした³⁾。ヒストンラクチル化は、アセチル化と同様にヒストンの正電荷を減少させることで DNA との相互作用を弱め、オープンクロマチンを誘導すると予想された。実際に、マクロファージ極性化に伴って発現が上昇する遺伝子の多くで H3K18Ia レベルの亢進が認められたことから、このマークは転写活性化に関わることが示唆された。その後の多くの研究でも、ヒストン K1a は転写活性化とよく相関することが示されている⁴⁾。

ヒストンラクチル化の writer は、ヒストンアセチル基転移酵素の 1 つである p300 であることが示されている³⁾。アセチル化やアシル化の直接の基質がアセチル CoA やアシル CoA であるのと同様に、p300 とラクチル CoA の存在下でラクチル化ヒストンが生成されることが実証された。乳酸には光学異性体である D 体と L 体が存在するが、解糖によって生じるのは L-乳酸である。培養細胞を用いた実験で、グルコース欠乏や解糖系阻害によりヒストンラクチル化が抑制されたことから、L-乳酸が基質として利用されることが予想された³⁾。実際に、¹³C ラベルされた L-乳酸から細胞内で L-ラクチル CoA が産生されることが示され⁶⁾、また細胞内に内在性のラクチル CoA が検出された⁷⁾。さらに、最近ラクチル CoA の合成経路も明らかになってきた。EGFR/ERK 経路によってリン酸化されたアセチル CoA 合成酵素 -2 (ACSS2) が核移行し、L-乳酸から L-ラクチル CoA を合成することが報告された⁸⁾。別の報告では、脳腫瘍 (グリオーマ細胞) でグアノシン三リン酸特異的スクシニル CoA 合成酵素 (GTPSCS) が核内ラクチル CoA 産生を担うことが示された⁹⁾。これらの研究により、解糖からヒストンラクチル化までの一連の流れが明らかになった。

一方、ラクチルグルタチオンに由来する酵素に非依存的なヒストンラクチル化経路も存在するが、こちらは D-ラクチルリジンを生み出す。ラクチルグルタチオンもグルコース代謝産物であるメチルグリオキサールに由来するが、D-ラクチル化は細胞内グルコース濃度や解糖フラックスの影響を受けないことが報告されている⁴⁾。

11 個の Zn²⁺ 依存性 HDAC と 7 個の NAD⁺ 依存性 HDAC (sirtuin) の系統的な解析により、HDAC3 が最も強力なヒストンラクチル化 (D-/L-いずれも) の eraser として働くことが示された¹⁰⁾。Sirtuin の中では、Sirt1、2、および 3 に脱ラクチル化活性がある。その中で最も活性の強い Sirt2 は主に細胞質に局在するので、生

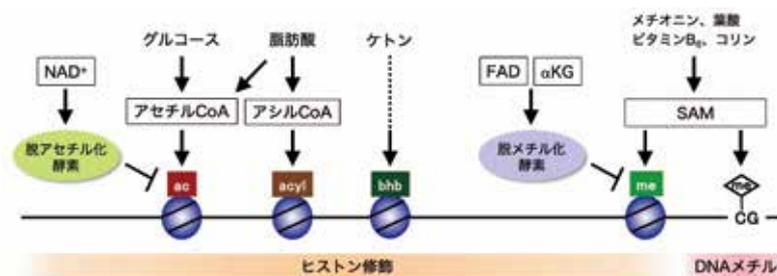


図 2 栄養素代謝物によるエピゲノム修飾制御

NAD: ニコチンアミドジヌクレオチド, FAD: フラビンアデニンジヌクレオチド, α KG: α ケトグルタル酸, CoA: コエンザイム A, SAM: S- アデノシルメチオニン, ac: アセチル化, acyl: アシル化, bhb: β ヒドロキシブチリル化, me: メチル化, CG: シトシン-グアニンジヌクレオチド

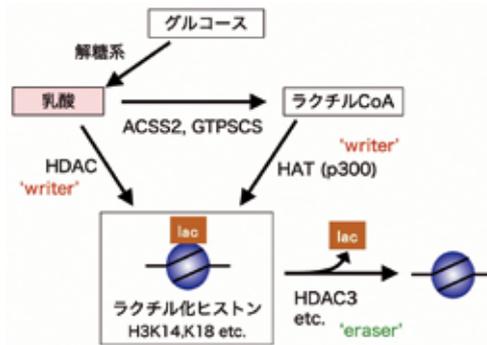


図3 乳酸とヒストンラクチル化

HDAC: ヒストン脱アセチル化酵素、HAT: ヒストンアセチル基転移酵素、ACSS2: アセチル CoA 合成酵素 2、GTPSCS: グアノシン三リン酸特異的スクシニル CoA 合成酵素

体内のヒストン脱ラクチル化にはあまり関与しないかもしれない。最近、HDAC3 を含むクラスI HDAC は、逆に writer として働き細胞内の大部分の K1a 形成に寄与する可能性が報告された¹¹⁾。興味深いことに、この反応はL-乳酸を基質とするが、ラクチル CoA を介さない。K1a 形成にはさまざまな writer/eraser が複雑に関係しているように思われる。細胞種や基質濃度などさまざまな細胞コンテキストに応じて経路が選択されるのかもしれない。

Zhai らは、H3K14la レベルが亢進している子宮頸がん細胞において、自作の K1a プローブと結合するタンパク質として DPF2 を同定した¹²⁾。DPF2 は、ヒストン H3K4 のメチル化状態を認識するドメイン構造 PHD (plant homeodomain) をタンデムに持つ (double PHD finger) タンパク質で、クロマチンリモデリング複合体の構成因子として転写やエピジェネティックな制御に関わることが知られている。タンパク質構造および機能解析の結果、DPF2 の PHD が H3K14la の認識部位であること、ゲノム上で DPF2 と H3K14la が高頻度で共存することが明らかになった。DPF2 を欠損した子宮頸がん細胞は増殖能の著しい低下を示す。野生型 DPF2 の導入により回復したが、H3K14la と結合できない変異体では回復しない。これらの結果は、DPF2 が H3K14la の reader として働くことで、遺伝子制御や細胞機能に寄与することを示唆している。前述のように、H3K14 以外にもラクチル化されるリジン残基は多くあるため、他にも K1a reader が存在する可能性がある。

3.2 モノアミンによるヒストン修飾

三大栄養素のうち、糖質と脂質の代謝物がエピゲノム修飾の基質として利用される事例が多く報告されている¹³⁾。2019 年にヒストンのセロトニル化など、アミノ酸代謝物もエピゲノム形成に寄与することが明らかになった¹⁴⁾。セロトニンはトリプトファンからの脱カルボキシル化により生成されるモノアミンの一種であり、神経伝達物質として多様な生物学的プロセスに関わる。以前より、transglutaminase-2 (TG2) を介してタンパク質内のグルタミン残基にセロトニンを基質としたアミド転移反応 (transamidation) が起こることが知られていた¹⁵⁾。マウントサイナイ大学の研究グループは、この反応によりヒストン H3 の 5 番目のグルタミン残基がセロトニル化される (H3Q5ser) ことを示した¹⁴⁾。興味深いことに、H3Q5ser は隣にある H3K4 のメチル化を促進し、逆に脱メチル化酵素の反応を抑制することから、転写しやすいクロマチン環境を生み出す「permissive」なマークであることが示唆された。実際に、基本転写因子 TFIID を構成し H3K4me3 に結合して転写活性化を起こす TAF3 の結合が、H3K4me3/Q5ser の dual mark により促進されることが示された。これらの事象から、H3Q5ser は H3K4me3 を安定化し、遺伝子発現を長期的に維持する役割を持つ可能性が示唆された。さ

らに、TG2 はドーパミンによるヒストン修飾を仲介することも、同じ研究グループにより報告された¹⁶⁾。ドーパニル基は、セロトニル基と同様に H3Q5 に付加され (H3Q5dop)、permissive なマークとして働くことが示された。H3Qdop は、コカイン中毒を来したラットの症状の長期化 (薬物探求行動の持続) に関与する可能性が示された。

同様に、TG2 は H3Q5 のヒスタミル化も触媒することが示された (H3Q5his)¹⁷⁾。H3Q5his はメチル基転移酵素 MLL1 による H3K4 トリメチル化を抑制することから、ser/dop とは逆に転写抑制性の修飾であることが示唆された。さらに興味深いことに、TG2 は ser または dop が付加された H3Q5 からこれらのマークを除去し、his を付加する活性を持つことが示された。この機序によるモノアミル化の交換が遺伝子発現の概日リズムを生み出すことがわかった。この発見は、従来の writer-reader-eraser パラダイムに、「exchanger」という新しい概念を加える非常に興味深いものである (表 1)。エピゲノム制御の奥深さを物語る研究である。

3.3 FAD が仲介する代謝エピゲノムクロストーク

リボフラビン (Rf、ビタミン B₂) は、哺乳動物体内では合成できない必須栄養素である。食品添加物やサプリメントとして頻りに利用され、健康維持に欠かせないビタミンとして広く認識されている。しかし、この古典的な栄養素がどのようにして健康増進効果を発揮するかは明確ではない。特に、長期的な摂取の多寡が私たちの発生過程や老化、疾患発症にどのように作用するかは、知見が乏しい。

体内に取り込まれた Rf は各組織に分配された後、細胞内でフラビンモノヌクレオチド (FMN)、FAD へと順次変換される。FMN や FAD は酸化還元酵素の補因子として、脂肪酸β-酸化や TCA 回路など、さまざまな代謝プロセスに関わる。それに加えて、FAD はアミノキシダーゼ型のヒストン脱メチル化酵素 LSD1 と LSD2 の活性にも必須であるため、エピゲノム形成にも直接的な役割を持つ。筆者らは、細胞内 FAD 合成に依存した LSD1 活性化が脂肪細胞の「脂肪貯蔵型」の代謝表現型形成に必須であることを報告し、代謝物によるエピゲノム制御が代謝制御にフィードバックされる「代謝 - エピゲノムクロストーク」メカニズムの一端を明らかにした¹⁸⁾。その後の筆者らの研究で、LSD1 と LSD2 が細胞内外の環境に応じたエピゲノム制御に寄与し、がん細胞固有の代謝や脂肪・肝細胞における脂質代謝、筋肉の質と量の調節に重要な役割を果たすことを明らかにした¹⁹⁻²⁴⁾。

トリプルネガティブ乳がん (triple negative breast cancer, TNBC) は、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、および上皮成長因子受容体の発現がいずれも陰性の予後が極めて悪い乳がんサブタイプである。Song らは、ヒト TNBC 検体における

| モノアミン化合物 | セロトニン | ドーパミン | ヒスタミン |
|-------------|---------------|---------------|-----------------------|
| 修飾されるアミノ酸残基 | H3Q5 | H3Q5 | H3Q5 |
| 転写に及ぼす影響 | 活性化 | 活性化 | 抑制 |
| TG2の役割 | writer/eraser | writer/eraser | writer (exchanger) |

表1 モノアミン化合物によるヒストン修飾

ゲノム変異、特に代謝関連遺伝子のコピー数変異を探索した結果、FMNをFADに変換する酵素FADシンセターゼをコードするFLAD1遺伝子が高頻度で増幅されていることを見出した²⁵⁾。TNBCにおいて、FLAD1のコピー数は発現量と正の相関を示し、FLAD1高発現症例は低発現症例と比較して生存率が有意に低いことがわかった。さらに細胞レベルの解析により、LSD1が転写因子SREBP1(sterol regulatory element-binding protein 1)の発現をH3K9脱メチル化を介して誘導することで、TNBC細胞の生存に必要な脂質合成系遺伝子の発現を促進すること、そのLSD1機能にFLAD1が必須であることが示された。ハブメタボライトとしてのFADの重要性を改めて示す事例である。

FADは、脂肪酸β-酸化酵素の補因子としてアセチルCoA産生に寄与し、葉酸回路を構成する5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素を介してSAM合成にも関わる。したがって、FAD量の変化はエピゲノム形成に広範な影響を与えると予想される。

4. おわりに：統合的理解に向けて

今世紀初頭からDNA・ヒストン修飾や制御因子が相次いで発見され、その度に調節因子としての栄養素代謝物が注目されてきた。今後も新たなハブメタボライトが数多く発見され、エピゲノムとその制御の多様性がさらに広がっていくであろう。実際には、代謝物によるエピゲノム制御は常に同時多発的であり、各分子機構が相互作用しながらエピゲノムの全体像を構築しているはずである。ビッグデータの解析技術が発達した今日でも、エピゲノム制御の全体像を統合的に理解するための方策はまだ存在しない。今後の重要な課題である。

[参考文献]

- 1) A. Lempradl, J. A. Pospisilik and J. M. Penninger, "Exploring the emerging complexity in transcriptional regulation of energy homeostasis", *Nat. Rev. Genet.*, **2015**, 16(11), 665-681.
- 2) Y. Z. Chen *et al.*, "Association of histone modification with the development of schizophrenia", *Biomed. Pharmacother.*, **2024**, 175, 116747.
- 3) D. Zhang *et al.*, "Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation", *Nature*, **2019**, 574, 575-580.
- 4) M. Iozzo, E. Pardella, E. Giannoni and P. Chiarugi, "The role of protein lactylation: A kaleidoscopic post-translational modification in cancer", *Mol. Cell*, **2025**, 85, 1263-1279.
- 5) Y. Xie *et al.*, "The role and mechanism of histone lactylation in health and diseases", *Front. Genet.*, **2022**, 13, 949252.
- 6) D. Zhang *et al.*, "Lysine l-lactylation is the dominant lactylation isomer induced by glycolysis", *Nat. Chem. Biol.*, **2025**, 21, 91-99.
- 7) E. L. Varner *et al.*, "Quantification of lactoyl-CoA (lactyl-CoA) by liquid chromatography mass spectrometry in mammalian cells and tissues", *Open Biol.*, **2020**, 10(9), 200187.
- 8) R. Zhu *et al.*, "ACSS2 acts as a lactyl-CoA synthetase and couples KAT2A to function as a lactyltransferase for histone lactylation and tumor immune evasion", *Cell Metab.*, **2025**, 37(2), 361-376.e7.
- 9) R. Liu *et al.*, "Nuclear GTPSCS functions as a lactyl-CoA synthetase to promote histone lactylation and gliomagenesis", *Cell Metab.*, **2025**, 37(2),

- 377-394.e9.
- 10) C. Moreno-Yruela *et al.*, "Class I histone deacetylases (HDAC1-3) are histone lysine delactylases", **2025**, *Sci. Adv.*, 8(3), eabi6696.
- 11) T. Tsusaka *et al.*, "Class I histone deacetylases catalyze lysine lactylation", *bioRxiv*, **2025**, doi: 10.1101/2025.02.25.640220.
- 12) G. Zhai *et al.*, "DPF2 reads histone lactylation to drive transcription and tumorigenesis", *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **2024**, 121(50), e2421496121.
- 13) B. R. Sabari, D. Zhang, C. D. Allis and Y. Zhao, "Metabolic regulation of gene expression through histone acylations", *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2017**, 18(2), 90-101.
- 14) L. A. Farrelly *et al.*, "Histone serotonylation is a permissive modification that enhances TFIIID binding to H3K4me3", *Nature*, **2019**, 567(7749), 535-539.
- 15) A. Al-Kachak and I. Maze, "Post-translational modifications of histone proteins by monoamine neurotransmitters", *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2023**, 74, 102302.
- 16) A. E. Lepack *et al.*, "Dopaminylation of histone H3 in ventral tegmental area regulates cocaine seeking", *Science*, **2020**, 368(6487), 197-201.
- 17) Q. Zheng *et al.*, "Bidirectional histone monoaminylation dynamics regulate neural rhythmicity", *Nature*, **2025**, 637(8047), 974-982.
- 18) S. Hino *et al.*, "FAD-dependent lysine-specific demethylase-1 regulates cellular energy expenditure", *Nat. Commun.*, **2012**, 3, 758.
- 19) A. Sakamoto *et al.*, "Lysine demethylase LSD1 coordinates glycolytic and mitochondrial metabolism in hepatocellular carcinoma cells", *Cancer Res.*, **2015**, 75, 1445-1456.
- 20) H. Araki *et al.*, "LSD1 defines the fiber type-selective responsiveness to environmental stress in skeletal muscle", *Elife*, **2023**, 12, e84618.
- 21) K. Kohroggi *et al.*, "LSD1 defines erythroleukemia metabolism by controlling the lineage-specific transcription factors GATA1 and C/EBPα", *Blood Adv.*, **2021**, 5(9), 2305-2318.
- 22) K. Anan *et al.*, "LSD1 mediates metabolic reprogramming by glucocorticoids during myogenic differentiation", *Nucleic Acids Res.*, **2018**, 46(11), 5441-5454.
- 23) K. Nagaoka *et al.*, "Lysine-Specific Demethylase 2 Suppresses Lipid Influx and Metabolism in Hepatic Cells", *Mol. Cell. Biol.*, **2015**, 35(7), 1068-1080.
- 24) R. Takase *et al.*, "Lysine-specific demethylase-2 is distinctively involved in brown and beige adipogenic differentiation", *FASEB J.*, **2019**, 33(4), 5300-5311.
- 25) X. Q. Song *et al.*, "Copy number amplification of FLAD1 promotes the progression of triple-negative breast cancer through lipid metabolism", *Nat. Commun.*, **2025**, 16, 1241.

[著者プロフィール]

氏名：日野 信次郎 (Shinjiro Hino)

所属：熊本大学発生医学研究所・細胞医学分野

〒860-0811 熊本県熊本市中央区本荘 2-2-1

TEL：096-373-6801

FAX：096-373-6804

Email：s-hino@kumamoto-u.ac.jp

出身学校：京都大学農学部

学位：博士(医学) 京都大学大学院医学研究科

専門分野：代謝エピジェネティクス

現在の研究テーマ：栄養素代謝物や内分泌因子によるエピゲノム記憶の形成機序

関連製品

DNA ダメージ検出抗体

DNA Damage Detection Kit - γ H2AX - Green / - Red / - Deep Red

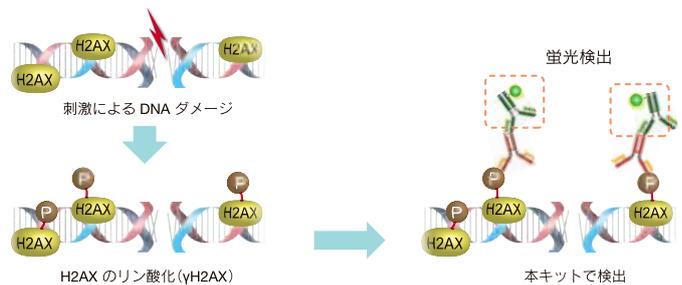
<特長>

- ・必要な試薬がセットになっているのですぐに評価ができる
- ・固定膜透過処理後に簡便な操作プロトコルで染色できる
- ・3色のカラーバリエーションで共染色ができる

本製品は、DNA ダメージの指標である γ H2AX を二次抗体法で簡便に検出するキットです。初めての方も使い易いよう、検出に必要な試薬をセットにしています。 γ H2AX を指標とした論文報告や実験例をご紹介します。

<原理>

DNA ダメージにより二重鎖切断が生じると、ヒストンタンパク質の一種であるH2AX が速やか、かつ広範囲にわたってリン酸化されます。リン酸化H2AX(γ H2AX)は、DNA ダメージの鋭敏なマーカーであることから、化学物質や活性酸素、紫外線や放射線などの遺伝毒性及び発がん性評価への応用が期待されています。また、 γ H2AX の検出は近年では細胞老化を評価する指標としても知られています。本製品はモノクローナル抗体研究所製の抗 γ H2AX 抗体を使用しています。



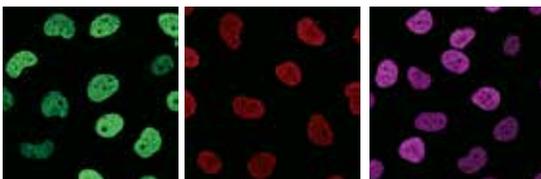
① 必要な試薬がセットになってます



② 細胞の固定化と膜透過処理後、試薬の添加・洗浄だけで染色できます。

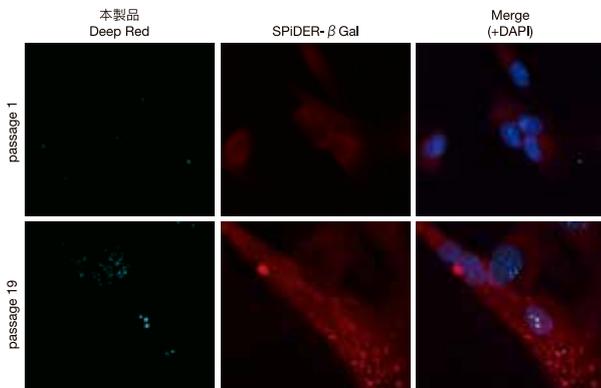


③ 3色のカラーから希望の色で共染色ができます



写真左より
Green: λ_{ex} : 494 nm、 λ_{em} : 518 nm
Red: λ_{ex} : 550 nm、 λ_{em} : 566 nm
Deep Red: λ_{ex} : 646 nm、 λ_{em} : 668 nm

<他マーカーと組合せた細胞の評価例>



継代数の異なるWI-38細胞を固定化後、Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER- β Galにて染色した。0.1% Triton-X/PBSを用い膜透過処理後、本キットにて γ H2AXを染色した。

<検出条件>
H2AX (Deep Red) : Ex. 590-650 nm / Em. 663-738 nm
SA- β -gal : Ex. 533-557 nm / Em. 570-640 nm
DAPI : Ex. 340-380 nm / Em. 435-485 nm

| 品名 | 容量 | 希望納入価格(¥) | メーカーコード |
|---|-------|-----------|---------|
| DNA Damage Detection Kit - γ H2AX - Green | 1 set | 42,400 | G265 |
| DNA Damage Detection Kit - γ H2AX - Red | 1 set | 42,400 | G266 |
| DNA Damage Detection Kit - γ H2AX - Deep Red | 1 set | 42,400 | G267 |

関連製品

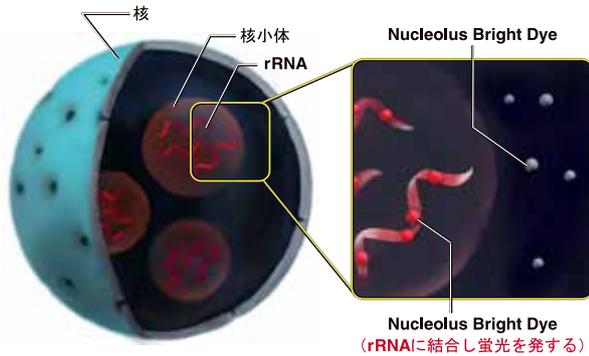
核小体染色試薬

Nucleolus Bright Green
Nucleolus Bright Red

<特長>

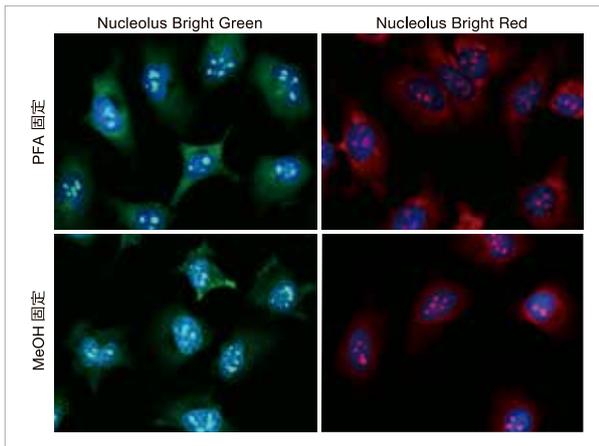
- ・ 試薬を添加するだけですぐにイメージングできる
- ・ 2色のカラーをラインナップ

本製品はRNAに結合し蛍光性となる低分子蛍光色素で、固定化した細胞に試薬を添加するだけで簡単にイメージングすることができます。なおNucleolus Brightは、核小体以外に存在するRNAにも反応しますが、RNAの中でも細胞内に最も多く存在するrRNAの産生の場である核小体で特に強い蛍光を示します。



<染色実験例>

HeLa細胞を4% PFAまたはメタノールで固定化(室温、5分間)後、PBS洗浄および膜透過処理(Triton X-100、20分)を行い、Nucleolus Bright GreenまたはRedおよび核染色試薬(DAPI)を添加、5分間インキュベーション後に共焦点蛍光顕微鏡により観察しました。その結果、DAPIにより染色された核内に(青)に複数個の核小体が存在することが確認されました。



<検出条件>

Nucleolus Bright Green : Ex. 488 nm / Em. 500-600 nm
Nucleolus Bright Red : Ex. 561 nm / Em. 565-650 nm
DAPI : Ex. 405 nm / Em. 450-495 nm

| 品名 | 容量 | 希望納入価格(¥) | メーカーコード |
|------------------------|---------|-----------|---------|
| Nucleolus Bright Green | 60 nmol | 34,900 | N511 |
| Nucleolus Bright Red | 60 nmol | 34,900 | N512 |

関連製品 **DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.**

ストレスマーカー検出試薬

-Nucleostain-
DNA Damage Quantification Kit
-AP Site Counting-

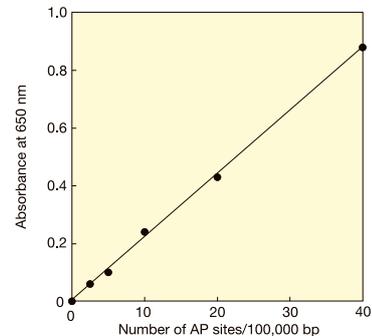
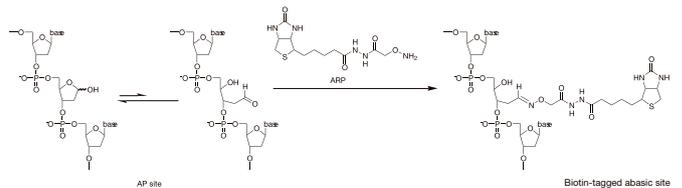
<特長>

- ・ 96穴プレートでDNA中のAP siteの定量が可能

DNA損傷部位には修復機構が働き、その一つとして塩基除去修復があり、この時AP site (apurinic / apyrimidinic site) と呼ばれる塩基除去部位が出現します。つまりAP siteの検出はDNA損傷部位を測定できる有効な方法です。

ARP(Aldehyde Reactive Probe)はこのAP siteと特異的に結合しビオチン化できる試薬として知られています。-Nucleostain-DNA Damage Quantification Kit -AP Site Counting-は、ARPを用いてDNAをビオチン化し96穴マイクロプレートに固定化して検体DNA中のAP siteを簡単に定量できるキットです。キットには、AP site数が既定された標準DNAが含まれており、HRP標識ストレプトアビジンによるビオチン検出法を用いることによってAP siteの定量ができます。

<検出原理>



ARP-DNA Standard Solution を用いて作成した検量線例



※本製品に使用するDNAは、予めRNase A処理後、RNAとタンパク質を除去しておく必要があります。

| 品名 | 容量 | 希望納入価格(¥) | メーカーコード |
|--|------------|-----------|---------|
| -Nucleostain- DNA Damage Quantification Kit -AP Site Counting- | 20 samples | 95,600 | DK02 |

関連製品

老化細胞検出製品

本製品群は、老化細胞を検出するための4種の製品です。それぞれの発色試薬は、老化細胞の指標として用いられるSA-β-gal (senescence-associated β-galactosidase) との酵素反応により細胞内タンパク質に固定化され蛍光を発します*。試薬が細胞内に固定化されることで優れた細胞内滞留性を有し、老化細胞を明確に検出することが可能となります。

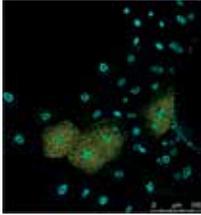
<製品ラインナップ>

* SPiDER-βGal はβ-gal 特異的な蛍光色素です

組織のライブイメージング

SPiDER-β Gal

- 高い細胞内滞留性でにじみがない
- β-ガラクトシダーゼ発現細胞を特異的に染色

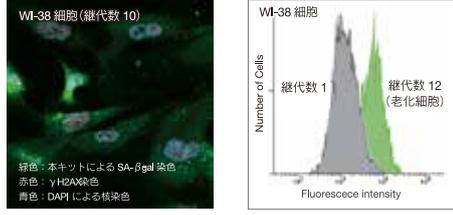


ショウジョウバエ組織のライブイメージング
(データ提供: 東京大学 浦野泰照先生)

蛍光顕微鏡、FCM※による高感度解析

Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER-β Gal

- X-gal では困難だった定量解析が容易に
- 生細胞、固定化細胞のSA-β-gal 活性を検出



WI-38 細胞 (継代数 10)

WI-38 細胞

継代数 1 継代数 12 (老化細胞)

Fluorescence intensity

Number of Cells

緑色: 本キットによるSA-βgal 染色
青色: X-gal染色
白色: DAPI による核染色

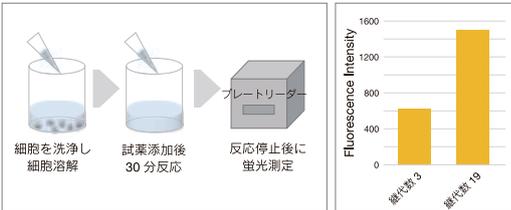
蛍光イメージング(多重染色) フローサイトメトリー定量解析

老化細胞のモデルとして継代培養を繰り返したWI-38細胞を用い解析。
※ FCM: フローサイトメトリー

プレートリーダーによる簡便な検出

Cellular Senescence Plate Assay Kit - SPiDER-β Gal

- 簡便な操作でSA-β-gal 活性を数値化
- マイクロプレートによる多検体処理



細胞を洗浄し細胞溶解 → 試薬添加後30分反応 → プレートリーダー → 反応停止後に蛍光測定

Fluorescence Intensity

継代数 3 継代数 19

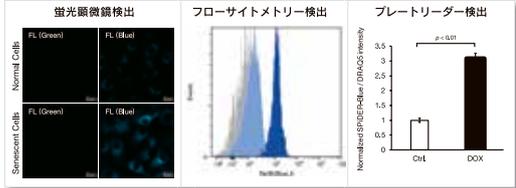
測定操作 プレートリーダー解析

継代数の異なるWI-38細胞を用いSA-βgal発現量の違いで数値化。

青色のカラーバリエーション

Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER Blue

- 緑・赤色との多重染色が可能
- 免疫染色との共染色が可能



蛍光顕微鏡検出 フローサイトメトリー検出 プレートリーダー検出

Normal Cells Senescent Cells

FL (Green) FL (Blue) FL (Green) FL (Blue)

Normal Cells Senescent Cells

Number of SPiDER-βGal/DOX intensity

Ctrl DOX

内源性β-ガラクトシダーゼのバックグラウンドの影響を抑えられる Assay Buffer も同梱

| 製品名 | サンプル | 対応装置 | 色素 / 検出波長 |
|---|--------------|------------------------------|---|
| SPiDER-β Gal | 組織 | Micro scope | SPiDER-β Gal Ex: 500-540 nm / Em: 530-570 nm |
| Cellular Senescence Detection Kit- SPiDER-β Gal | 生細胞 固定化細胞 | Micro scope FCM | |
| Cellular Senescence Plate Assay Kit- SPiDER-β Gal | 生細胞 | Plate Reader | |
| Cellular Senescence Detection Kit- SPiDER Blue | 固定化細胞 | Micro scope FCM Plate Reader | SPiDER-Blue Ex: 350-450 nm / Em: 400-500 nm |

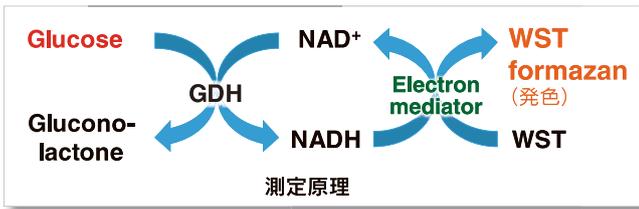
| 品名 | 容量 | 希望納入価格(¥) | メーカーコード |
|---|-----------|-----------|---------|
| SPiDER-βGal | 20 µg x 3 | 55,200 | SG02 |
| Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER-βGal | 10 assays | 49,700 | SG03 |
| Cellular Senescence Plate Assay Kit - SPiDER-βGal | 20 tests | 13,800 | SG05 |
| | 100 tests | 39,700 | |
| Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER Blue | 1 plate | 39,000 | SG07 |

関連製品

細胞内代謝測定キット

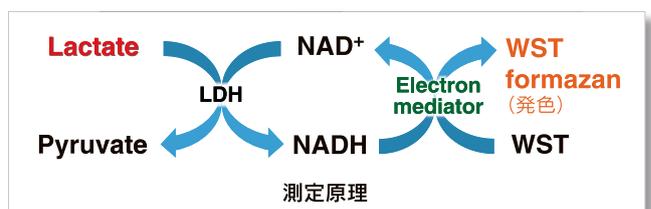
グルコース測定キット
Glucose Assay Kit-WST

グルコースは、主要なエネルギー代謝指標の1つです。糖尿病などの研究における糖代謝の指標としてだけでなく、がん研究においても、細胞内代謝の変化をモニタリングするための指標としてよく利用されています。本製品は、グルコース濃度 0.02 mmol/l から測定することができます。



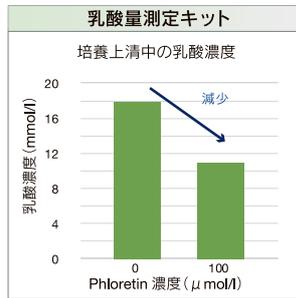
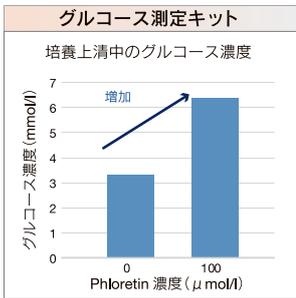
乳酸測定キット
Lactate Assay Kit-WST

本製品は解糖系の代謝産物である乳酸を定量（下限値：0.02 mmol/l）することができます。乳酸の定量は、細胞内代謝経路の変化をモニタリングするための指標としてがん研究分野では広く使われていますが、最近では幹細胞の分化や糖尿病研究、ミトコンドリアの機能解析においても乳酸を指標とした評価の報告が増えています。



■ 培養上清を2つの指標で評価

グルコーストランスポーター阻害剤である Phloretin を Jurkat 細胞に加えた際の代謝活性の変化を Glucose Assay Kit-WST 及び Lactate Assay Kit-WST にて確認しました。

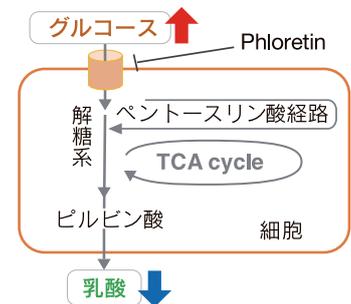


実験条件

細胞：Jurkat 細胞 (5 × 10⁵ cells)
薬剤：Phloretin (終濃度：100 μmol/l)
暴露時間：一晚
測定サンプル：培養上清

結果

Phloretin 添加によりグルコースの取り込みが阻害されグルコース消費量が減少し、培地中のグルコース量は増加、乳酸量は減少する結果が得られました。



| 品名 | 容量 | 希望納入価格(¥) | メーカーコード |
|-----------------------|-----------|-----------|---------|
| Glucose Assay Kit-WST | 50 tests | 22,400 | G264 |
| | 200 tests | 47,100 | |
| Lactate Assay Kit-WST | 50 tests | 37,100 | L256 |
| | 200 tests | 86,800 | |

その他の代謝関連キットや各キットの詳細や細胞内代謝を学べるページはこちらから

代謝 同仁

がん・神経疾患・老化を細胞の機能から理解を深める

がん 神経 同仁

関連製品

細胞外 ATP 測定キット

Extracellular ATP Assay Kit-Luminescence

< 特長 >

- ・ 繊細な細胞外 ATP 測定を正確に測定できるプロトコル付き
- ・ 他のキット製品と組み合わせて複数指標で評価ができる

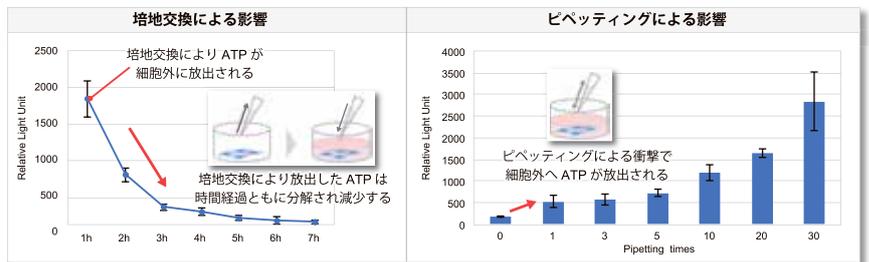


プロトコル詳細は
取扱説明書をチェック

ATP は細胞のエネルギー源として重要ですが、細胞外に放出されるとダメージ関連分子パターン (damage-associated molecular patterns; DAMPs) の一種として神経伝達や細胞増殖、炎症、免疫反応に関与します。例えば、ヒト肺繊維芽細胞では酸化ストレスによる ATP 放出が細胞老化を誘導すると報告されています。また、ATP は細胞死の初期に放出されるため、ネクロプトーシスやパイロトーシスの解明にも注目されています。本製品は細胞培養上清中の ATP を検出できる 96 ウェル対応のキットで、多検体の測定が可能です。

< より正確な測定のためのプロトコル >

細胞外への ATP の放出はかなりセンシティブで、培地交換やピペティングを行っただけでも放出されます。本製品では測定に影響を与えるファクターを考慮したプロトコルによって、容易に刺激による細胞外 ATP 量の変化を測定することができます。



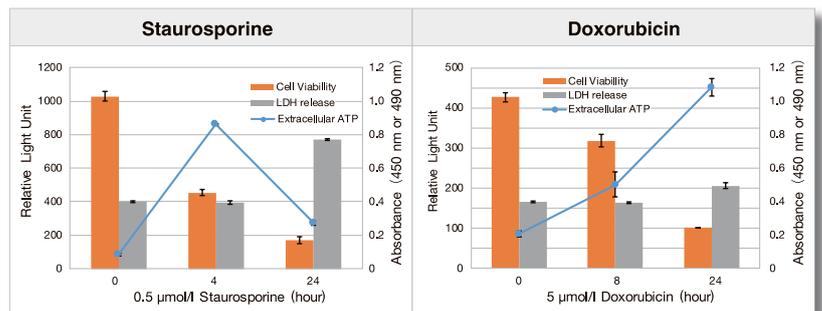
< 同一サンプルを複数指標で評価できる >

細胞サンプルを細胞と上清に分け、それぞれ異なる指標 (試薬の併用*) で測定することで、細胞死のより詳細な解析が実現します。
※ 本キットに併用実験のキットは含まれておりません。



< 実験例: アポトーシス阻害剤を用いた評価 >

アポトーシス誘導剤である Staurosporine または Doxorubicin で処理した Jurkat 細胞の細胞外 ATP 放出、細胞増殖、細胞外 LDH の時間変化を評価しました。その結果、Staurosporine を処理した細胞では 4 時間後に細胞外への ATP の放出が最大になり、Doxorubicin で処理した細胞では 24 時間後に最大となりました。これらの結果から、薬剤の違いにより挙動に差があることが確認されました。



| 品名 | 容量 | 希望納入価格(¥) | メーカーコード | |
|---|-----------|-----------|---------|------|
| Extracellular ATP Assay Kit-Luminescence | 100 tests | 29,800 | E299 | |
| < 関連製品 > ATP Assay Kit-Luminescence (細胞内 ATP 測定キット) | 50 tests | 30,200 | A550 | |
| | 200 tests | 54,200 | | |
| | 100 回用 | 6,800 | CK04 | |
| | 500 回用 | 17,000 | | |
| | 2500 回用 | 47,000 | | |
| Cell Counting Kit-8 | 5000 回用 | 87,300 | CK04 | |
| | 10000 回用 | 124,600 | | |
| | 100 回用 | 12,600 | | CK12 |
| | 500 回用 | 33,400 | | |
| | 2000 回用 | 49,900 | | |

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

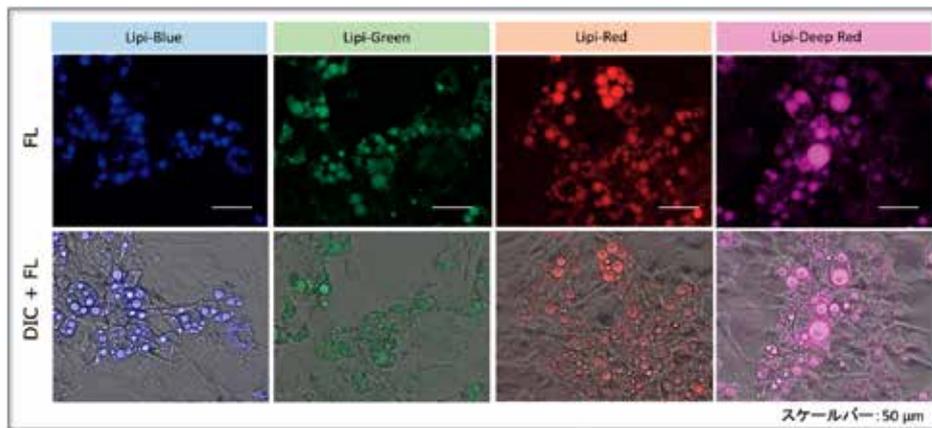
脂肪滴 同仁 検索

* Nile Red との比較

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

<実験例：脂肪細胞の脂肪滴イメージング>

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



3T3-L1 細胞 (1.5 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 | 23,500 | LD01 |
| Lipi-Green | 10 nmol | 23,500 | LD02 |
| Lipi-Red | 100 nmol | 23,500 | LD03 |
| Lipi-Deep Red | 10 nmol | 23,500 | LD04 |

脂肪滴測定キット

Lipid Droplet Assay Kit Blue / Deep Red

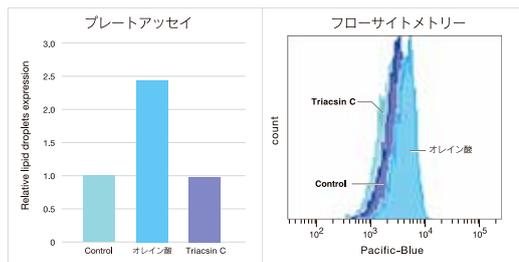
<特長>

- ・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、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

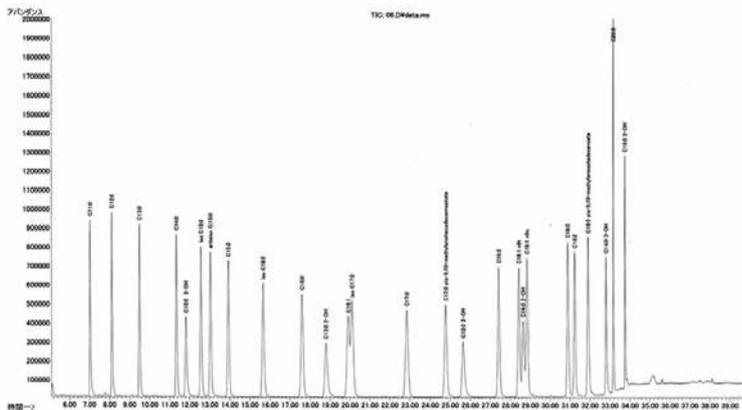
| 品名 | 容量 | 希望納入価格(¥) | メーカーコード |
|------------------------------------|-------|-----------|---------|
| Lipid Droplet Assay Kit - Blue | 1 set | 31,500 | LD05 |
| Lipid Droplet Assay Kit - Deep Red | 1 set | 31,500 | LD06 |

脂肪酸分析のご案内 – 同仁グローバル

分岐脂肪酸と水酸基脂肪酸分析

脂肪酸には多くの種類があり、飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸、さらに不飽和度の高い多価脂肪酸に区別されます。その他にも分岐鎖をもつ分岐脂肪酸、水酸基をもつ水酸基脂肪酸、シクロプロパン構造を持つシクロプロパン脂肪酸があり、バクテリア、プランクトン、藻類などの微生物に含まれています。

<標準物質 分析例 GC/MS>



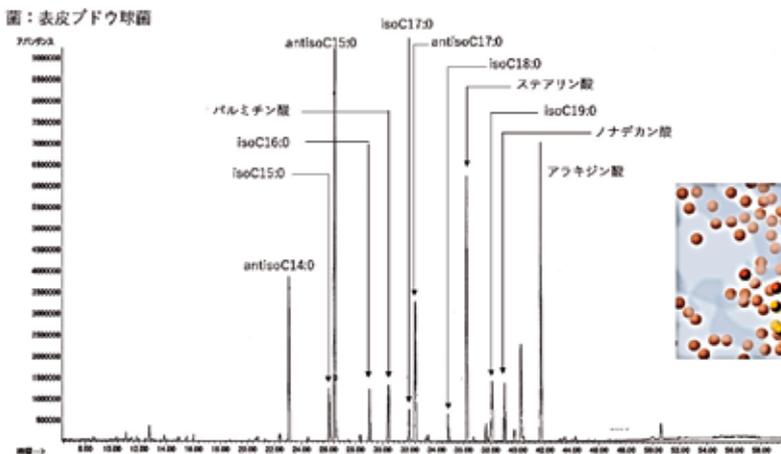
| 番号 ¹⁾ | 脂肪酸記号 ²⁾ | 番号 | 脂肪酸記号 |
|------------------|---------------------|----|---------------------------------------|
| 1 | C11:0 | 14 | C17:0 |
| 2 | C12:0 | 15 | C17:0 cyclopropane ^{9,10} |
| 3 | C13:0 | 16 | C12:0 3-OH |
| 4 | C14:0 | 17 | C18:0 |
| 5 | C10:0 2-OH | 18 | C18:1 ω9t |
| 6 | isoC15:0 | 19 | C14:0 2-OH |
| 7 | anteisoC15:0 | 20 | C18:1 ω9c |
| 8 | C15:0 | 21 | C19:0 |
| 9 | isoC16:0 | 22 | C18:2 |
| 10 | C16:0 | 23 | C19:0 cyclopropane ^{9,10} |
| 11 | C12:0 2-OH | 24 | C14:0 3OH |
| 12 | C16:1 | 25 | C20:0 |
| 13 | isoC17:0 | 26 | C18:0 2OH |

1) GC チャート左端ピークからの順

2) 脂肪酸記号の見方

- ・ C10 : 0 2OH : 炭素数 10、不飽和数 0、末端メチル炭素から 2 番目に OH 基
- ・ iso : 末端メチル炭素から二番目にメチル基が付加
- ・ anteiso : 末端メチル炭素から三番目にメチル基が付加
- ・ ω 9t : 末端メチル炭素から 9-10 番目の炭素が trans 不飽和結合
- ・ ω 6c : 末端メチル炭素から 6-7 番目の炭素が cis 不飽和結合
- ・ cyclopropane^{9,10} : 末端メチル炭素から 9,10 にシクロプロパン型構造を持つ

<表皮ブドウ球菌 分析例>



バイオフィーム評価試験で用いられる表皮ブドウ球菌について脂肪酸分析を行いました。パルミチン酸やステアリン酸などの飽和脂肪酸に加え、anteisoC15:0、anteisoC17:0 が多く含まれていました。

また、isoC15:0、isoC16:0、isoC17:0、isoC18:0、isoC19:0 も多く含まれています。

【分析方法】
誘導体化：メチルエステル化
分析装置：GC/MS（アジレント・テクノロジー）

<脂肪酸受託分析をご検討の皆様へ>

- ・ サンプルの前処理方法や脂肪酸分析のやり方が分からない
- ・ 研究や製品開発、品質管理において脂肪酸分析を行いたい
- ・ サンプル中の微量の脂肪酸を分析したい
- ・ 脂肪酸組成の変化を測定したい
- ・ 脂肪酸分析が必要だが、前処理や分析が面倒だ
- ・ 短鎖脂肪酸（ギ酸、酢酸、酪酸など）の分析

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

脂肪酸分析



DOJINDO DOJINDO DOJINDO DOJINDO DOJINDO DOJINDO

新キャラクター登場!

DOJINDO DOJINDO DOJINDO DOJINDO DOJINDO DOJINDO

DOJINDO DOJINDO DOJINDO DOJINDO DOJINDO DOJINDO



物語が はじまる

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

フェロトシス