



DOJIN NEWS

2015 No.153

ISSN 0385-1516

ドージンニュース

CONTENTS

●Review

ミトコンドリアに局在化する過酸化物質感受性
蛍光プローブ

福岡大学理学部 塩路 幸生

連載

膜タンパク質の X線結晶構造解析における
界面活性剤の役割

大阪大学大学院薬学研究科 青山 浩

●Topics on Chemistry

ミトコンドリア内グルタチオン
選択的赤外蛍光プローブ

株式会社同仁化学研究所 山本 純史





表紙撮影：阿蘇高岳
photo：永島俊介氏

CONTENTS

Review

- ミトコンドリアに局在化する過酸化水素感受性蛍光プローブ ●—— [1]
福岡大学理学部 塩路 幸生

連載

- 膜タンパク質のX線結晶構造解析における界面活性剤の役割 ●—— [6]
大阪大学大学院薬学研究科 青山 浩

Topics on Chemistry

- ミトコンドリア内グルタチオン選択的赤外蛍光プローブ ●—— [10]
株式会社同仁化学研究所 山本 純史

Commercial

新製品

- ミトコンドリア膜脂溶性過酸化水素検出蛍光試薬 ●—— [5]
LDH 活性測定キット ●—— [11]
レドックス応答性タンパク質解析キット ●—— [12]
生体硫黄研究用試薬 ●—— [13]

関連製品

- 膜タンパク質可溶化剤 ●—— [9]
その他デタージェント ●—— [9]
生細胞数測定キット ●—— [11]

お知らせ

- 第25回フォーラム・イン・ドージン開催後記 ●—— [14]

新製品案内

*容量・価格等の詳細は各ページをご覧ください。

ミトコンドリア膜脂溶性過酸化水素検出 蛍光試薬

MitoPeDPP

LDH 活性測定キット

Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST

レドックス応答性タンパク質解析キット

-SulfoBiotics- Protein Redox State
Monitoring Kit

-SulfoBiotics- Protein Redox State
Monitoring Kit Plus

生体硫黄研究用試薬

サルフェン硫黄ドナー類

-SulfoBiotics- Sodium disulfide (Na₂S₂)

-SulfoBiotics- Sodium trisulfide (Na₂S₃)

-SulfoBiotics- Sodium tetrasulfide (Na₂S₄)

-SulfoBiotics- Sodium Polysulfide Set

サルフェン硫黄検出用蛍光プローブ

-SulfoBiotics- SSP4

※希望納入価格には消費税等は含まれておりません。

ミトコンドリアに局在化する過酸化物感受性蛍光プローブ



塩路 幸生

福岡大学理学部 准教授

Mitochondria are functionally important subcellular organelles for our life. Reactive oxygen species (ROS) are produced without interruption in mitochondria. Some enzyme can be quenching of ROS in normal cells. Once the redox balance has broken down, ROS produced in mitochondria turn into intrinsic weapon. Thus, mitochondria are major source of ROS in mammalian cells and are major target of oxidative damage. Types of damages caused by ROS to mitochondrial components include lipid peroxidation, protein oxidation, and mitochondrial DNA mutation. In order to detect oxidative damage in living cells, some fluorescence probes have been developed. A new type of fluorescence probe, diphenylpyrenylphosphine-conjugated alkyltriphenylphosphonium iodide (MitoDPPP) which was accumulated in mitochondria, has been synthesized. This probe was detected peroxide in living cell. Comparison of the reactivity toward several peroxide indicated that the probe was existed in mitochondrial membrane. Using this probe, generation of peroxide in mitochondria of living cell was successfully visualized.

はじめに

活性酸素種 (ROS) とは、スーパーオキシドアニオンラジカル ($O_2^{\cdot-}$)、ヒドロキシルラジカル (OH^{\cdot})、一重項酸素 (1O_2) および過酸化水素 H_2O_2 の総称で生物の生存に必須のエネルギー獲得機能そのものに含まれる酸化化学因子(ラジカル)あるいは加齢、紫外線・放射線、大気汚染、薬物の長期服用、煙草の有害成分の吸入などにより生じる。それらは、高反応活性で脂質過酸化、遺伝子の損傷やタンパク質の酸化等を引き起こし、動脈硬化、アルツハイマー病などの疾病の引き金になる。高齢化が加速する我が国において活性酸素やそれらの化学種により引き起こされる生体内での酸化を分析する手段を構築し、それらの分子病態解析を深化することが急務である。

1. 生体内での活性酸素種発生機構

生体内でのエネルギー生成機構に重要な役割を果たしているのがミトコンドリア内の電子伝達系であり、それらはミトコンドリア内膜に存在するタンパク質複合体で構成されている。その複合体を通して、ミトコンドリア膜間スペースにプロトンを放出し、そのプロトン駆動力として ATP を合成している。細胞内に取り込まれた酸素分子の多くはミトコンドリア内に運ばれ、そこで電子を受け渡されることで活性酸素種へと変換される (図 1)¹⁾。

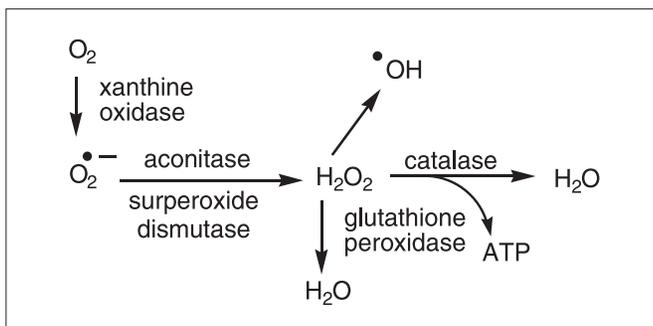


図 1 ミトコンドリア呼吸鎖より産生される活性酸素種

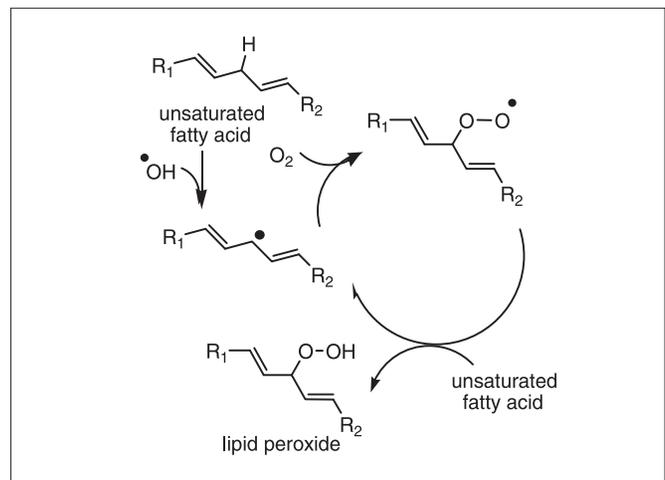


図 2 連鎖的脂質過酸化反応

すなわちミトコンドリアは、このエネルギー生成過程 (電子伝達系) で、様々な活性酸素種を生成し続ける生体内の活性酸素種発生源となっている。生成した活性酸素種は、スーパーオキシドスムターゼ (SOD)、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼなど、様々な酵素がそれらを除去することで細胞の営みは正常に保たれている²⁾。しかしながら、ひとたびこの発生と除去機構のバランスが崩れると、ミトコンドリアで発生した活性酸素種は、更なる強力な酸化力をもつ化学種を生み出す³⁻⁵⁾。この過程で発生する OH^{\cdot} は、タンパク質、脂質、DNAなどを酸化し、生体に酸化的損傷(酸化ストレス)を与え、ガン、脳卒中、アルツハイマー病などの引き金となる⁶⁾。多くの活性酸素種はミトコンドリアで発生することから、ミトコンドリアは生体内で最も酸化ストレスを受けやすい細胞内微小器官であるといえる⁷⁻⁹⁾。

ミトコンドリア内での酸化ストレスは膜中に存在する不飽和脂質の連鎖的脂質過酸化反応として現れる (図 2)。この反応は、ミトコンドリア膜を構成する不飽和脂肪酸が、 OH^{\cdot} により酸化を受

け脂質ラジカルを形成し、更に酸化を受け脂質ペルオキシドラジカルを経て、脂質過酸化物を与える反応である。不飽和脂肪酸が酸化を受けると、連鎖的に反応が進行し、脂質過酸化物を蓄積させる。この脂質過酸化物の蓄積もまた、老化、動脈硬化やガンなどの病気を引き起こすことから、酸化ストレスの指標となる¹⁰⁾。この脂質過酸化物の検出には、従来ヨウ素滴定法やチオバルビツール酸 (TBARS) 法が用いられていたが、これらの測定法は破壊的分析であり生細胞中での観測ではない。また TBARS 法は、試料中のマロンジアルデヒドを検出する測定法で、これは脂質過酸化物の二次的物質であるため、選択的に脂質過酸化物を検出しているわけではない¹¹⁾。

近年、蛍光顕微鏡の時間と空間の分解能の向上と、有機小分子で構成される蛍光色素を利用し、様々な生体内のシグナルに感受性のある蛍光プローブが開発された。それにより、生細胞中で今まさに何が起きているのかを調べることができるようになってきた。今回、過酸化水素を含む過酸化物の蛍光プローブをいくつか紹介したいと思う。

2. 細胞膜透過性蛍光プローブ

細胞膜を透過し細胞内に導入することができる蛍光プローブがいくつか報告されている。ジクロロフルオレセインジアセテート (DCF-DA) や Peroxyfluor-1 (PF1)¹²⁾ は細胞膜を比較的容易に透過し細胞質に集積される (図3)。特に DCF-DA は、アセチル基が細胞内の加水分解酵素により加水分解を受け、細胞内滞留性が高くなる。しかし、この蛍光プローブは生細胞中で細胞質に産生される活性酸素種や高活性ラジカル種を捕捉するが、化学種への選択性を持たない。PF1 は、プローブ自身に立体的かさ高さを持たせることで小さな化学種にのみ反応するように選択性を持たせている。しかしながら、脂質過酸化物のように立体的にかさ高い化学種とは反応せず、その産生を細胞中で検出することは困難である。このようにかさ高い化学種にのみ反応するような選択性を持たせることは蛍光プローブの分子設計だけでは踏破することができない。

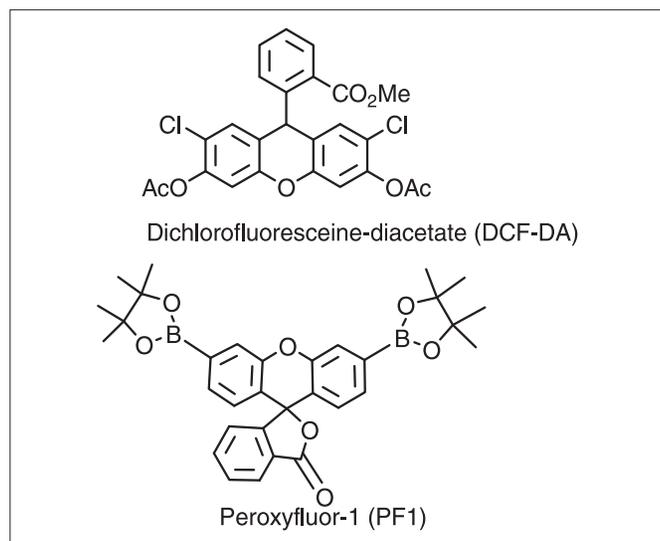


図3 フルオレセインを骨格としてもつ活性酸素捕捉蛍光プローブ

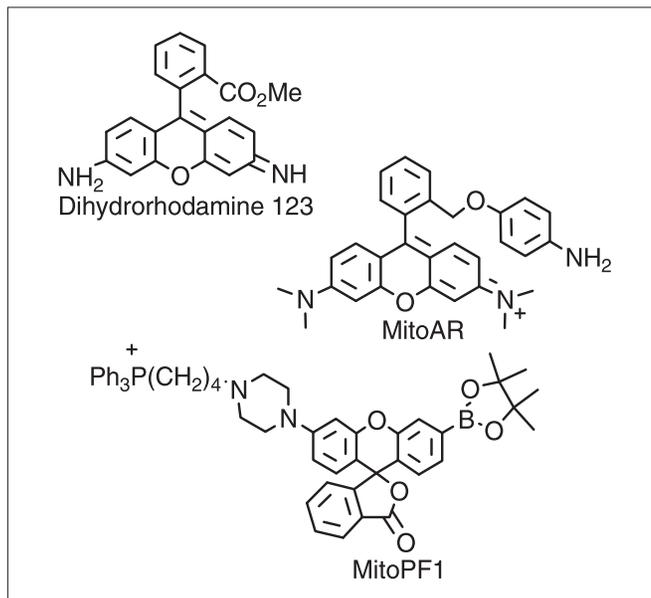


図4 ミトコンドリアに局在化する活性酸素種捕捉蛍光プローブ

3. 細胞内微小器官局在化蛍光プローブ

先にも記したように、ミトコンドリアは、活性酸素種産生と密接な関係をもつことから、ミトコンドリアに特異的に局在化する蛍光プローブの開発も進んでいる。図4に示すジヒドロローダミン123やMitoARはローダミンを基本骨格にもつ活性酸素種感受性蛍光プローブである。ミトコンドリアは、ATP合成の際に膜間スペースにプロトン蓄積させるため、内膜と外膜との間に電位差が生じ、その電位差は細胞形質膜よりも高い。その特質にตอบสนองしてローダミンはミトコンドリアに局在化する。ジヒドロローダミン123やMitoARは細胞内微小器官に局在化する特性は持つものの脂質過酸化物に対する選択性がない¹³⁾。トリフェニルホスホニウム塩のような脂溶性カチオンは細胞内へ取り込まれると、電位差が高いミトコンドリアへ局在化することが近年Murphyらにより報告されている¹⁴⁻¹⁷⁾。そのトリフェニルホスホニウム塩をPF1に結合させたMitoPF1が過酸化水素特異的な感受性をもつ蛍

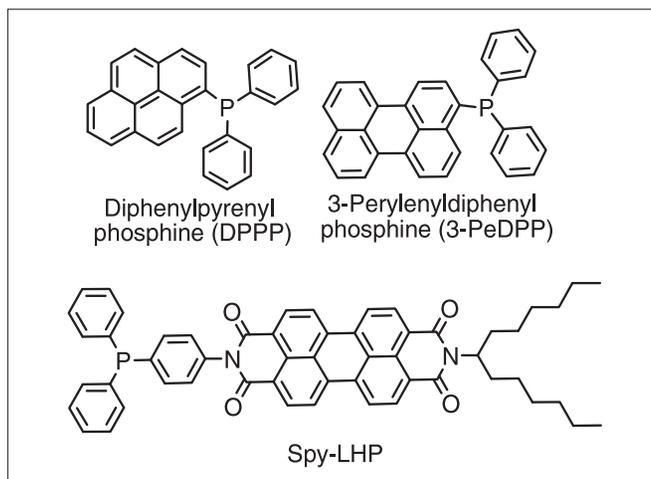


図5 トリアリールホスフィン骨格をもつ過酸化物捕捉蛍光プローブ

光プローブとして開発された。MitoPF1は、PF1の特性をそのまま受け継いだミトコンドリアに局在化する蛍光プローブで、立体的にかさ高い活性種との反応性に乏しい。このように細胞内でOH[•]、O₂^{•-}、H₂O₂など、多くの活性酸素種が存在する中、ミトコンドリア内脂質過酸化物を選択的に識別し可視化するような蛍光プローブは、ミトコンドリア内での酸化ストレスの度合を推し量るために必要となる。

4. トリアリールホスフィンを用いた過酸化捕獲剤

3価リン化合物であるトリアリールホスフィンを用いた蛍光プローブとして利用した報告例がいくつかある(図5)^{18,19}。蛍光発光する原子団であるピレンやペリレンを置換基としてもジフェニルピレニルホスフィン(DPPP)や3-ペリレンジフェニルホスフィン(3-PeDPP)は還元状態であるホスフィンではリン原子上の孤立電子対を介した分子内光電子移動反応により蛍光団を消光する。ところがひとたび酸化を受けホスフィンオキシドになるとその消光は解消され蛍光団の強い蛍光発光が見られるようになる。すなわち、過酸化物により酸化されることで、相当するホスフィンオキシドとなり、蛍光強度が増大する特徴をDPPPや3-PeDPPはもつ(図6)。このようなトリアリールホスフィン誘導体は、脂溶性が高く、細胞内導入が困難である。近年、Sohらにより報告されたSpy-LHPは脂溶性の高さを利用し、さらにアルキル鎖を導入することで細胞形質膜に局在化する過酸化捕獲蛍光プローブに特化した優れた蛍光プローブであるといえる²⁰。

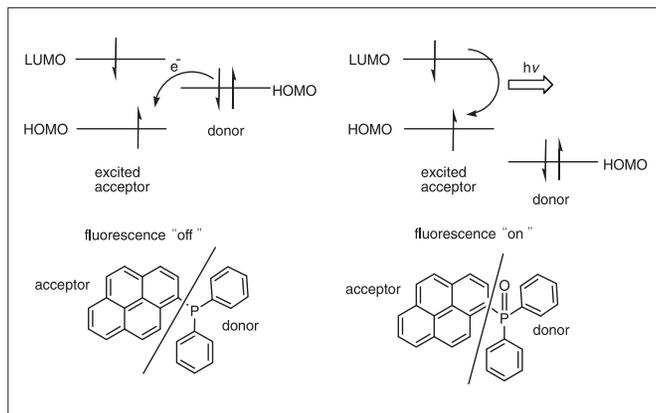


図6 蛍光性置換基をもつトリアリールホスフィンの消光現象

5. ミトコンドリアに局在化する脂質過酸化物感受性蛍光プローブ

ミトコンドリアに局在化し過酸化物を捕獲する蛍光プローブとして、我々はトリフェニルホスホニウム塩をDPPPに結合させたMitoDPPPを開発した(図7)。この蛍光プローブは、351 nmの光で励起すると380 nmに蛍光発光を示し、酸化されてMitoDPPPOになると光誘起電子移動反応による消光が解消され、その蛍光強度は約35倍増大する。また、MitoDPPPは、容易に細胞内導入され、ミトコンドリアに局在化する。Methyl linoleate hydroperoxide (MeLOOH)、Cumene hydroperoxide (CumOOH)、tert-Butyl hydroperoxide (t-BHP) および過酸化水素との反応性を検討したところ、均一溶媒中では若干の違いは見られるが、どの過酸化物によっても一様に酸化され過酸化水素との反応においても他の脂溶性の過酸化物とほぼ同等の反応性が見られた(図8)。

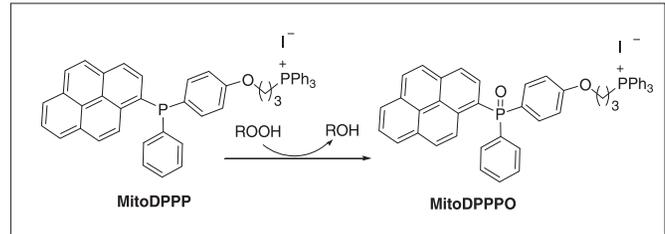


図7 MitoDPPPの過酸化物による酸化反応

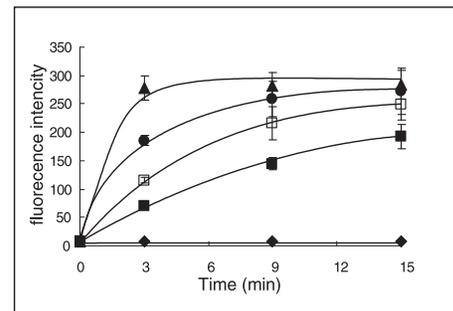


図8 メタノール中でのMitoDPPPの種々の酸化物との反応性；● CumOOH 1.0 mM, ■ t-BHP 1.0 mM, □ H₂O₂ 1.0 mM, ▲ MeLOOH 1.0 mM, ◆ Control.

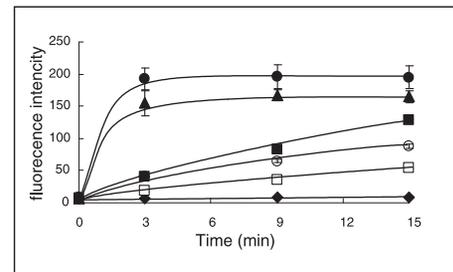


図9 リポソーム中でのMitoDPPPの種々の酸化物との反応性；● CumOOH 1.0 mM, ■ t-BHP 1.0 mM, □ H₂O₂ 1.0 mM, ○ H₂O₂ 1.0 mM + Fe²⁺ 10 μM, ▲ MeLOOH 10 μM, ◆ Control.

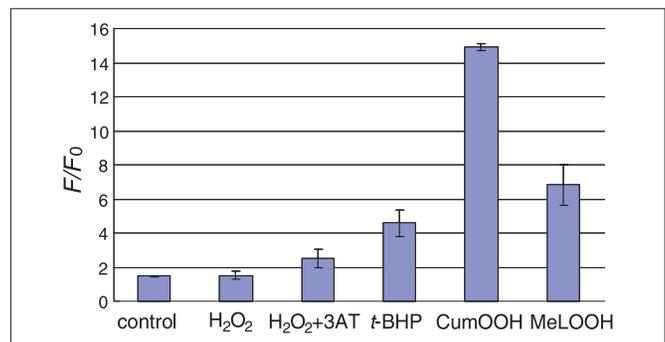


図10 HepG2細胞中のMitoDPPPの種々の過酸化物との反応性。MitoDPPPを導入したHepG2細胞を1.0 mMの過酸化物(MeLOOH: 10 μM)を含む緩衝液で処理。励起波長350 nmで380 nmの蛍光波長を観測。縦軸は相対蛍光強度。

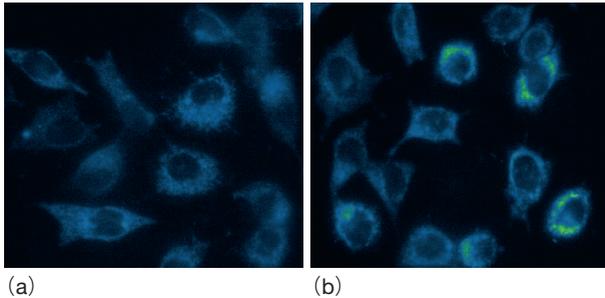


図 11 MitoDPPP を導入した HepG2 細胞の輝度分布画像：(a) H₂O₂ 添加前に DPBS 緩衝液で洗浄；(b) H₂O₂ 添加前に 5% DMSO を含む DPBS 緩衝液で洗浄

一方、リボソーム中においては、脂溶性の過酸化物をを用いた反応に比べると、過酸化水素のそれは遅くなるのが明らかとなった (図 9)。さらにヒト肝がん由来の HepG2 細胞中で種々の過酸化物との反応性を比較すると、脂溶性の過酸化物によって速やかに酸化を受けるが、過酸化水素での酸化は極めて遅いことが明らかとなった (図 10)。カタラーゼ阻害剤である 3-アミノトリアゾール (3-AT)^{21, 22)} の添加によっても、この酸化は促進されないことから、カタラーゼによる過酸化水素の消去が原因ではなく、この蛍光プローブがミトコンドリア膜中に存在し、過酸化水素との反応を妨げているためであると考えられる。実際に細胞膜透過性増強剤として知られる DMSO^{23, 24)} で処理した細胞を用いて過酸化水素による MitoDPPP の酸化を行うと、ミトコンドリア膜中で速やかに MitoDPPPO への変換が起こり蛍光強度の増大が確認できた (図 11)。すなわち MitoDPPP は脂質過酸化物のみを捕捉する新しい蛍光プローブである²⁵⁾。

しかしながら、この蛍光プローブは、蛍光団としてピレン基を用いていることから、共雑自家蛍光の影響とその励起光の細胞への光毒性が危惧されるため蛍光顕微鏡の連続測定には適していない。この課題を克服するには、蛍光波長を長波長側に有する蛍光プローブの開発が求められる。蛍光、励起波長ともピレン基よりも長波長側に有するペリレニル基に換えた蛍光プローブ MitoPeDPP はこの課題を克服したプローブである (図 12)²⁶⁾。

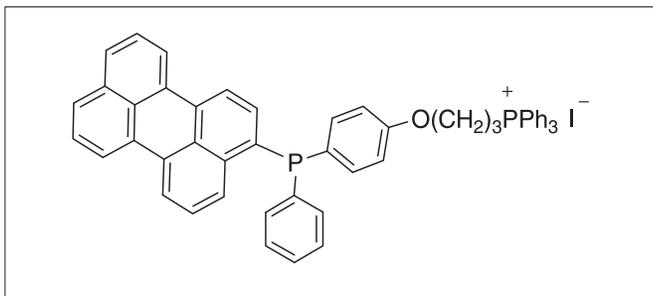


図 12 MitoPeDPP の構造

おわりに

今回、細胞内微小器官に局在化し、細胞内のシグナル物質を検出する蛍光プローブをいくつか紹介した。部位特異的かつシグナル特異的な種々の蛍光プローブを複数組み合わせることで細胞内の微小器官近傍におけるシグナル物質の局所的な動態を観測でき

ることから、今まで見ることのできなかつた事実の発見につながるであろう。また、これらのプローブを利用した抗酸化剤の探索・開発にも期待がもてる。

[参考文献]

- 1) M. Saraste, *Science*, **1999**, 283, 1488.
- 2) H. Sies, *Eur. J. Biochem.*, **1993**, 215, 213.
- 3) *Oxidative stress, Disease and Cancer*; K. K. Singh, Ed.; Imperial College Press: London, **2006**.
- 4) Douglas, C. W., Lott, M. T. In Stevnsner, T., Ed., *Molecular Biology of Aging*, **1999**, 125-147.
- 5) C. Giulivi, A. Boveris and E. Cadenas, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1995**, 316, 909.
- 6) M. T. Lin and M. F. Beal, *Nature*, **2006**, 443, 787.
- 7) A. Boveris, N. Oshino and B. Chance, *Biochem. J.*, **1972**, 128, 617.
- 8) J. St-Pierre, J. A. Buckingham, S. J. Rocbuck and M. D. Brand, *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 44784.
- 9) P. S. Brookes, Y. Yoon, J. L. Robotham, M. W. Anders and S. S. Sheu, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **2004**, 287, C817.
- 10) E. Niki, Y. Yoshida, Y. Sato and N. Noguchi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2005**, 338, 668.
- 11) I. Matot, Y. Nanevich, A. Al-Mehdi, C. Song and A. B. Fisher, *Free Radic. Med.*, **2003**, 34, 785.
- 12) M. C. Y. Chang, A. Pralle, E. Y. Isacoff and C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 15392.
- 13) Y. Koide, Y. Urano, S. Kenmoku, H. Kojima and T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 10324.
- 14) M. P. Murphy and R. A. J. Smith, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2000**, 41, 235.
- 15) R. J. Burns and M. P. Murphy, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1997**, 339, 33.
- 16) G. F. Kelso, C. M. Porteous, G. Hughes, E. C. Ledgerwood, A. M. Gane, R. A. J. Smith and M. P. Murphy, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **2002**, 959, 263.
- 17) M. L. Jauslin, T. Meier, R. A. Smith and M. P. Murphy, *FASEB J.*, **2003**, 17, 1972.
- 18) K. Akasaka, S. Ijichi, K. Watanabe, H. Ohruai and H. Meguro, *J. Chromatogr.*, **1992**, 596, 197.
- 19) Y. Okimoto, A. Watanabe, E. Niki, T. Yamashita and N. Noguchi, *FEBS Lett.*, **2000**, 474, 137-220.
- 20) N. Soh, T. Ariyoshi, T. Fukaminato, H. Nakajima, K. Nakano and T. Imato, *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, 5, 3762.
- 21) M. Ueda, H. Kinoshita, T. Yoshida, N. Kamasawa, M. Osumi and A. Tanaka, *FEMS. Microbiol. Lett.*, **2003**, 219, 93-98.
- 22) E. A. Havir, *Plant Physiol.*, **1992**, 99, 533-537.
- 23) A. C. Williams and B. W. Barry, *Adv. Drug. Del. Rev.*, **2004**, 56, 603-618.
- 24) Z. W. Yu and P. J. Quinn, *Mol. Membr. Biol.*, **1998**, 15, 59-68.
- 25) K. Shioji, Y. Oyama, K. Okuma and H. Nakagawa, *Bioorg. Med. Chem., Lett.* **2010**, 20, 3911-3915.
- 26) K. Shioji, Y. Ogawa, H. Iwashita, Y. Oyama, N. Nagahora, K. Okuma and H. Nakagawa, submitted

[プロフィール]

氏名：塩路 幸生 (Shioji Kousei)

所属・職位：福岡大学理学部化学科 准教授

連絡先：〒 840-0142 福岡市城南区七隈 8-19-1

E-mail: shioji@fukuoka-u.ac.jp

出身大学：京都大学

学位：理学博士

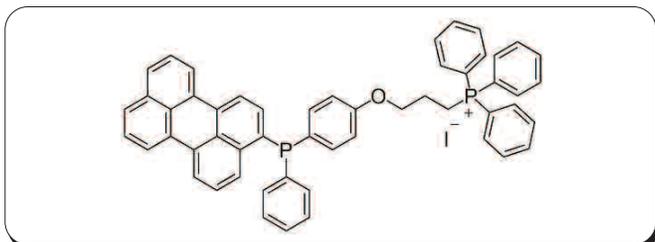
専門分野：有機化学, 生物有機化学

主な研究テーマ：細胞内微小器官に局在化するシグナル感受性蛍光プローブの開発

新製品

ミトコンドリア膜脂溶性過酸化検出蛍光試薬

MitoPeDPP



<特長>

- ・細胞内微小器官であるミトコンドリアに特異的に集積
- ・ミトコンドリア膜の脂溶性過酸化物を選択的に検出
- ・励起波長 488 nm、蛍光波長 535 nm で測定可能

小社では脂質過酸化検出試薬として DPPP、Spy-LHP、Liperfluo を販売しております。この度これら製品に加え、ミトコンドリア膜中の脂溶性過酸化物を検出する試薬を商品化致しました。

ミトコンドリアは ATP 産生のみならず、活性酸素を発生する細胞小器官として知られています。活性酸素に代表されるヒドロキシラジカル (HO[•])、スーパーオキシドアニオンラジカル (O₂^{•-})、過酸化水素 (H₂O₂) は膜中の不飽和脂肪酸を酸化的に損傷し過酸化脂質を形成します。このような酸化ストレスで生じる生成物を視覚化することで、ミトコンドリア機能への影響をリアルタイムに解析することが可能になります。

本製品は生細胞膜を透過してミトコンドリアに集積する性能を有しています。ミトコンドリアに集積した MitoPeDPP は、脂溶性過酸化物によって特異的に酸化され蛍光を発します (Fig. 1)。一般に汎用される 488 nm の励起波長で観測することが可能なため、蛍光顕微鏡を用いた脂溶性過酸化物のイメージングが可能です。

MitoPeDPP は福岡大学・塩路准教授により開発された試薬です。

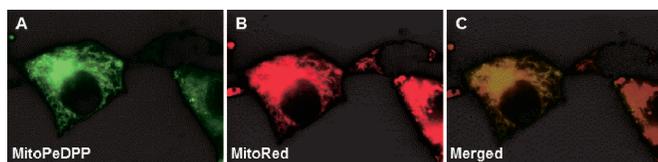


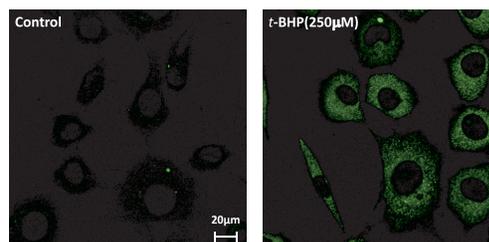
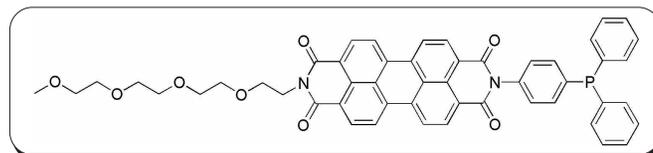
Fig. 1 HepG2 細胞での過酸化添加による過酸化物捕捉
(A) : MitoPeDPP を細胞にロード後、*t*-BHP* による外部刺激を加え 15 分後に観察
(B) : ミトコンドリア染色試薬 MitoRed 染色
(C) : (A) と (B) の重ね合わせ画像
* *t*-BHP: *tert*-Butylhydroperoxide

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
MitoPeDPP	5 µg × 3	18,000	M466

関連製品

Liperfluo

細胞用過酸化脂質検出蛍光試薬
励起波長 524 nm、蛍光波長 535 nm



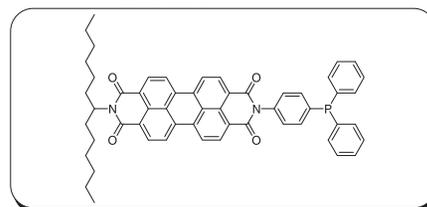
(データ提供：北里大学薬学部 今井浩孝先生、熊谷剛先生)

操作手順

- ・使用細胞：L929 細胞 (マウス繊維芽細胞由来培養細胞株)
35mm ガラスボトムディッシュに播種 (2.5×10⁵ cell/well)
↓ 1 昼夜培養 (37°C, CO₂ インキュベート)
- ・培地除去後、Liperfluo を含む新しい培地を添加 (終濃度: 1 µM)
↓ 30 min (37°C, CO₂ インキュベート)
- ・培地除去後、*t*-BHP を含む新しい培地を添加 (終濃度: 250 µM)
↓ 2h (37°C, CO₂ インキュベート)
- ・共焦点レーザー顕微鏡にて観察
装置：Zeiss LSM510 META
フィルターセット：FITC (GFP, Alexa488) wide filter
HFT UV/488
NFT490
BP505-550

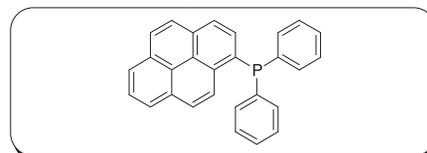
Spy-LHP

細胞用過酸化脂質検出蛍光試薬 (低水溶性)
励起波長 524 nm、蛍光波長 535 nm



DPPP

過酸化脂質検出蛍光試薬
励起波長 352 nm、蛍光波長 380 nm



品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Liperfluo	50 µg × 5	20,000	L248
Spy-LHP	1 mg	21,000	S343
DPPP	10 mg	12,800	D350

連載

膜タンパク質の X 線結晶構造解析における界面活性剤の役割

青山 浩

大阪大学大学院薬学研究科

1. はじめに

膜タンパク質は、細胞膜を介した情報伝達、物質輸送およびエネルギー生産など生体内できわめて重要な役割を担っている。さまざまな生物のゲノムにおいて全遺伝子の 30% 近くは膜タンパク質がコードされていると見積もられており¹⁾、膜タンパク質の構造・機能の解明は生命現象の理解に不可欠である。また、上市されている医薬品の約 60% が G タンパク質共役受容体 (GPCR) やイオンチャネルなどの膜タンパク質をターゲットにしているため²⁾、膜タンパク質の立体構造情報は、候補化合物の最適化による合理的な薬物設計を可能にする。1985 年に最初の膜タンパク質の X 線結晶構造が解明されて以来³⁾、立体構造の報告例が増加していることに疑いの余地はない⁴⁾。これは、組換え膜タンパク質の大量生産技術の開発、遺伝子工学的手法での変異や欠損による安定化、抗体や融合タンパク質による親水性領域の拡大、脂質を利用した結晶化法の開発、解析ソフトウェアの充実と計算機速度の向上、放射光施設ビームラインの改良など数多くの技術開発の賜物である。

その一方で、細胞膜の脂質二重層に取り囲まれた膜タンパク質研究において、膜部分を模倣する界面活性剤がきわめて重要な役割を担っていることに変化はない。界面活性剤の選択は、膜タンパク質を取り囲んでいる細胞膜からの可溶化、精製そして結晶化と膜タンパク質研究のすべての段階で鍵を握る。そこで本連載第二回では、第一回の膜タンパク質の機能解析のための結晶構造解析の重要性に関する考察に引き続き膜タンパク質 X 線構造解析における界面活性剤の役割について記述する。

2. 界面活性剤の性質

界面活性剤とは「2 物質間の界面に集まりやすい性質を持ち、その 2 物質間の界面の性質をいじりやすく変えるもの」と定義される⁵⁾。本来、界面活性剤は水系で使用されるため「界面の性質を変える」ということは、水と油の混ざらない物質同士を分離させず混ぜ合わせることができることを意味する。この性質は界面活性剤の分子構造に由来しており、油になじむ性質「疎水基」と水になじむ「親水基」の 2 つの相反する性質が、油と水が反発して分離してしまうのを防ぎ、両者をつなぎとめる役目を果たしている。

界面活性剤を水に溶かすと疎水基と水の反発の少ない状態になろうとして、安定化するために 2 つの方法をとる。1 つは、親水基

を水中に残して疎水基だけを空气中に突き出す方法であり、もう 1 つは界面活性剤分子どうして疎水基を寄せ合せて、少しでも疎水基と水との接触面を減少させようとする方法である。前者は界面活性剤分子が水面へ吸着されて一定の方向に配向した単分子膜を作り、後者はミセルを形成する。ミセルは、最初はできかけの 2 ~ 3 分子からなるが、濃度が増加すると完全に発達した球状ミセルを形成する。ミセルがほぼ完成すると考えられる最低の濃度を臨界ミセル濃度 (critical micelle concentration, cmc) と呼ぶ。ミセルは中心部が疎水性であるため、水に溶けにくい物質をミセルの内部に取り込むことができる。この性質を利用して、疎水性領域を持ち水に不溶な膜タンパク質を可溶化することができる。

3. 界面活性剤の種類

界面活性剤は大きくイオン性界面活性剤と非イオン性界面活性剤に分けることができる。イオン性界面活性剤は、分子中に解離基をもち、陽イオン性、陰イオン性および両性のものがある。代表的な陰イオン界面活性剤である SDS (ドデシル硫酸ナトリウム、図 1a) は、タンパク質への結合力が強い (タンパク質 1g あたり 1.4g) ため電気泳動に用いられる変性剤である。このような長鎖アルキル基をもつイオン性界面活性剤は、一般に可溶化させる能力は高いが、膜タンパク質の可溶化に用いる濃度ではほとんどのタンパク質を変性・失活させるため、可溶化・精製には不向きである。

一方、ステロイド骨格を有するコール酸系のイオン性界面活性剤 (コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウムなど) は、親水基が分子内に分散している。例えば、コール酸では、末端にカルボキシル基を有するとともに、ステロイド骨格に 3 つのフェノール性水酸基がある (図 1b)。デオキシコール酸では水酸基が 2 つである (図 1c) ためコール酸より親水性が弱く、より強い界面活性作用を示す。一般にコール酸系統の界面活性剤のミセルサイズは小さいため、透析などにより除去しやすい。また直線型のイオン性界面活性剤よりは、タンパク質に対する作用は温和である。

イオン性界面活性剤の使用には、以下の注意点がある。1 つは、イオン性界面活性剤の作用は、共存するイオンの影響を受けることである。イオン性界面活性剤のミセル形成では、親水基の電荷の反発力が利用されているので、対イオンの存在がこの反発を弱め、cmc を低下させミセルサイズを増大させる⁶⁾。この効果は対イオンの種類により異なる。もう 1 つは、イオン性界面活性剤で可溶化した膜タンパク質標品は、イオン交換カラムクロマトグラフィーでの精製は困難となることである。逆に、界面活性剤を取り除きたい場合は、イオン性のはイオン交換クロマトグラフィーによって除去しやすいという利点もある。また、膜タンパク質の結晶形成に必須な分子間相互作用を、イオン性界面活性剤の電荷が妨げることから、結晶化には好ましくないといわれている。両性イオン性界面活性剤は分子内に陽イオン、陰イオンの両方の電荷を持ち、イオン性界面活性剤よりは温和であると考えられている。しかし、後述する非イオン性界面活性剤と比較すると変性作用が強いため β -バレル型膜タンパク質で用いられる場合が多く⁷⁾、 α -ヘリックス型膜タンパク質での成功例はきわめて少ない⁸⁾。

非イオン性界面活性剤は、水中でイオン解離しない水酸基やエーテル結合などを親水基として持つ界面活性剤のことである。しかし、水酸基やエーテル結合は水中でイオン解離しないために親水性がかなり弱く、それひとつだけで大きな疎水基を水に溶解させることはできない。たった 1 個の親水基で水溶性を確保した

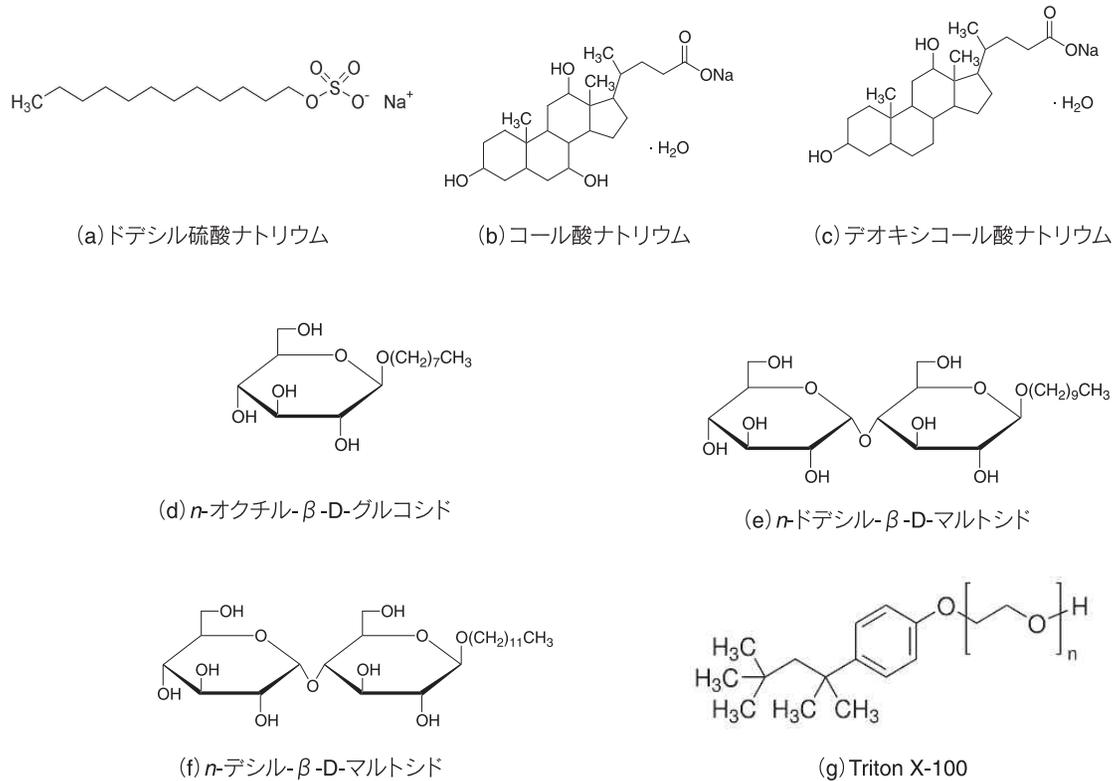


図1 界面活性剤の構造と名称

イオン性界面活性剤とは大きく異なる。そのため、複数の水酸基を有する糖（マルトシドやグルコシド）やエーテル結合を複数導入したポリオキシエチレンを親水基に用いる。このタイプの界面活性剤は、膜タンパク質に対する作用が温和であるため、可溶化、精製、安定化、結晶化、機能解析に最もよく使用されている。これは、タンパク質-タンパク質間の相互作用より、脂質-脂質間相互作用や膜タンパク質-脂質間相互作用に影響を及ぼす傾向が強いからだと考えられている⁹⁾。糖にアルキル基がついたアルキルグルコシド、アルキルマルトシド、アルキルチオグルコシドの類似体が合成されているが、アルキル基の短い (C_7 - C_{10}) *n*-オクチル-β-D-グルコシド (図 1d) などの界面活性剤では、目的の膜タンパク質が失活する場合がある⁹⁾。一方、*n*-ドデシル-β-D-マルトシド (β-DDM, 図 1e) や *n*-デシル-β-D-マルトシド (β-DM, 図 1f) は温和で変性作用もないため最も多く使われている界面活性剤である。アルキルポリオキシエチレンエーテルは一般式 $C_nH_{2n+1}(OCH_2CH_2)_xOH$ と表され、通常 C_nE_x と書く。この種の界面活性剤は、オキシエチレン鎖の長さが一定でないものもある。アルキル基とポリオキシエチレン基の間にフェニル基が入った Triton X-100 (図 1g) のような界面活性剤は、多くの膜タンパク質を可溶化できるが、紫外部で吸収を示す欠点がある。280 nm の吸収でタンパク質の定量を行う場合、Triton X-100 などが共存すると測定を妨害するため、別の定量法を用いる。Triton 系の界面活性剤は cmc が低いので透析によって除去することが困難である。

4. 界面活性剤に含まれる不純物

膜タンパク質研究において界面活性剤の種類はもちろんであるが純度も重要である。不純物の存在が、可溶化や精製には影響を及ぼさないが、結晶化に影響を及ぼす場合がある。例えば、市販のコール酸は不純物による着色がみられることがある。筆者も非イオン性界面活性剤へ置き換えているにもかかわらず膜からの可溶化に用いたコール酸の純度が結晶化に大きな影響を与えた経験を有する。アルキルオキシエチレン系の界面活性剤は空気酸化を受けやすく、不純物として疎水性アルコール、過酸化物などの存在が知られている¹⁰⁾。糖アルキルの界面活性剤ではβ-型がα-型より水溶性が高いためによく用いられているが、α-型が混在すると結晶化を阻害することが報告されている¹¹⁾。最近の市販品の純度は向上しているものの、調製後すぐのものをフィルター等にかけて遮光しての使用が望まれる。

5. 膜タンパク質の結晶化と X 線回折実験

膜タンパク質と界面活性剤のミセル複合体の結晶化では、界面活性剤が膜タンパク質に結合していない親水性領域の相互作用で結晶を形成する。このため、界面活性剤ミセルの存在は、タンパク質同士が分子間相互作用できる領域を減少させるため、結晶中で分子が規則正しく並ぶのに不利となる。結果として結晶中の溶媒領域も大きくなるため、X 線による結晶の分解能はどうしても低くなるし、溶媒のバックグラウンドも高くなる欠点を持つ。最近では、脂質を利用した脂質メソフェーズ法¹²⁾などの成功例も多くなってきているが、界面活性剤で可溶化してからの結晶化が最

も一般的で成功例も多い。

膜タンパク質の結晶構造解析の報告例は指数関数的に増加していることから⁴⁾、特に α -ヘリックス型膜タンパク質での結晶化の成功例がデータベース化されつつある⁸⁾。例えば、イオンチャネルではアルキル基の短いオクチルグルコシド、トランスポーターや呼吸鎖複合体では β -DDM、ATPaseではポリオキシエチレングリコールが成功例が多い。これは、それぞれの膜タンパク質に対して、変性させずに可溶化しタンパク質同士の分子間相互作用を阻害しない固有の界面活性剤の存在を示唆している。

結晶化の方法は、水溶性タンパク質と同様に蒸気拡散法(sittingあるいは hanging)微量透析法、バッチ法(オイルを用いたマイクロバッチ法を含む)などが一般的である。また、水溶性タンパク質と同様に多くのパラメーター(緩衝液、沈殿剤、塩の種類と濃度、pHなど)が存在するが、現在では膜タンパク質結晶化用のスクリーニングキットが各社から販売されている(Molecular Dimensions, Hampton Research, Jena Biosciences, Emerald Biostructures, Qiagenなど)。結晶化に使用する沈殿剤は、用いた界面活性剤の種類に依存する。最も使用頻度の高い β -DDMや β -DMの場合、ポリエチレングリコール(PEG)での成功率が高い。その中でも、チャネルやトランスポーターでは分子量の小さいPEG(200-600)、呼吸鎖複合体では分子量の大きいPEG(3K-10K)での成功例が多い⁸⁾ため、目的の膜タンパク質に応じて適切な条件を容易に絞り込むことも可能かもしれない。

小さな両親媒性の化合物(ヘプタン-1,2,3-トリオール)の添加によるミセルのサイズの変化がタンパク質の分子間相互作用を増強して結晶作製に有効であるとの報告が膜タンパク質構造研究の初期では提唱されていた^{13,14,15)}。使用されない時期もあったが、最近では多価イオン、塩、有機化合物の添加の効果が報告されている⁸⁾。初期スクリーニングで結晶を作製し、分解能が不十分な場合での添加が有効である。

結晶ができれば、不凍剤に母液を置換して100Kなどの低温下でX線回折実験を行う。不凍剤の種類はグリセロールやエチレングリコールなど水溶性タンパク質と同様である。しかし、急激な溶媒環境の変化は結晶を壊す原因となるため、できるだけ温和な条件下で不凍剤を導入するべきである。膜タンパク質結晶は水溶性タンパク質結晶に比べて溶媒領域が多いので、結晶を脱水させて分子間相互作用を強めることで分解能の向上が期待できる。古くには塩溶液を結晶の近くに置くことで脱水処理を行っていたが^{16,17)}、湿度を制御した気流を結晶に吹き付けることで、脱水処理を行う方法が開発されており、欧米の放射光施設のビームラインには設置されている^{18,19)}。特に、膜タンパク質の場合、結晶作製までに多くの時間、労力、費用を要しており、別の結晶化条件を見出すのは簡単ではないため、十分に検討の余地のある方法である。

6. まとめ

膜タンパク質のX線構造解析においてどの界面活性剤をどの段階で用いるかが実験成功の可否を決めると言っても過言ではない。動物や植物などの組織からの膜タンパク質を対象とする場合は、可溶化、精製、結晶化で界面活性剤を置き換えることがよく行われていたが、発現系を用いて生産させた組換え膜タンパク質では、いずれの段階でも β -DDMや β -DMのみで構造解析に至っている場合が多くなっている。解析例は少ないが、複数の界面活性剤を混合させる方法も利用され始めており、これまでにないミセルサイズと分子間相互作用をもたらす可能性を秘めている。またマル

トースとアルキル基を2つにした複雑な界面活性剤が合成され、構造解析の報告例もあることから²⁰⁾、新規界面活性剤の出現も期待される。膜タンパク質と界面活性剤の関係は古く新しいテーマであり、今後も膜タンパク質研究の主題の一つであろう。本連載では、膜タンパク質の界面活性剤について基礎的な概略の記述に留めた。次回の連載でターゲットを絞った界面活性剤の使用について記述する。

[参考文献]

- 1) E. Wallin and G. von Heijne, *Protein Sci.*, **1998**, 7, 1029-1038.
- 2) G. C. Terstappen and A. Reggiani, *Trends Pharmacol. Sci.*, **2001**, 22, 23-26.
- 3) J. Deisenhofer, O. Epp, K. Miki, R. Huber and H. Michel, *Nature*, **1985**, 318, 618-624.
- 4) <http://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc/>
- 5) 藤本武彦 新・界面活性剤入門 三洋化成工業株式会社
- 6) A. Helenius, D. R. McCaslin, E. Fries and C. Tranford, *Methods in Enzymol.*, **1979**, 56, 734.
- 7) S. K. Buchanan, B. S. Smith, L. Venkatramani, D. Xia, L. Esser. M. Palintkar, R. Chkraborty, D. van der Helm and J. Deisenhofer, *Nat. Struct. Biol.*, **1999**, 6, 56-63.
- 8) J. L. Parker and S. Newstead, *Protein Science*, **2012**, 21, 1358-1365.
- 9) I. Moraes, G. Evans, J. Sanchez-Weatherby, S. Newstead and P. D. Shaw Stewart, *Biochim. Biophys. Acta.*, **2014**, 1838, 78-87.
- 10) G. N. Catraves, *Anal. Biochem.*, **1980**, 109, 55-62.
- 11) E. Screpanti, E. Pada, A. Rimon, H. Michel and C. Hunte, *J. Mol. Biol.*, **2006**, 362, 192-202.
- 12) E. M. Landau and J. P. Rosenbusch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1996**, 93, 14532.
- 13) P. A. Timmins, J. Hauk, T. Wacker and W. Welte, *FEBS Lett.*, **1991**, 280, 115-120.
- 14) G. F. Schertler, H. D. Bartunik, H. Micheal and D. Osterhelt, *J. Mol. Biol.* **1993**, 234, 156.
- 15) P. A. Timmins, E. Pebay-Peyroula and W. Welte, *Biophys. Chem.*, **1994**, 53, 27-36.
- 16) M. F. Perutz, *Trans. Faraday Soc.*, **1964**, 42, B187-B195.
- 17) L. Greenspan, *J. Res. Natl. Stand.*, **1977**, A 81, 89-96.
- 18) J. Sanchez-Weatherby, M. W. Bowler, J. Huet, A. Gobbo, F. Felisaz, B. Lavault, R. Moya, J. Kadlec, R. B. G. Ravelli and F. Cipriani, *Acta Crystallogr. D.*, **2009**, 65, 1237-1246.
- 19) S. Russi, D. H. Juers, J. Sanchez-Weatherby, E. Pellegrini, E. Mossou, V. T. Forsyth, J. Huet, A. Gobbo, F. Felisaz, R. Moya, S. M. McSweeney, S. Cusack, F. Cipriani and M. W. Bowler, *J. Struct. Biol.* **2011**, 175, 236-243.
- 20) P. S. Chae, S. G. F. Rasmussen, R. R. Rana, K. Gotfryd, R. Chandra, M. A. Goren, A. C. Kruse, S. Nurva, C. J. Loland, Y. Pierre, D. Drew, J. L. Popot, D. Picot, B. G. Fox, L. Guan, U. Gether, B. Byrne, B. Kobilka and S. H. Gellman, *Nat. Methods*, **2010**, 7, 1003-1008.

[著者プロフィール]

氏名：青山 浩 (Aoyama Hiroshi)

所属：大阪大学大学院薬学研究科

連絡先：〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-6

E-mail: haoyama@phs.osaka-u.ac.jp

大阪大学大学院理学研究科博士後期課程高分子学専攻

学位：博士(理学)

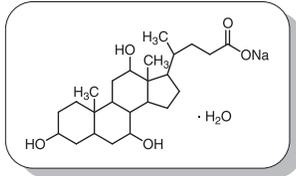
現在の研究テーマ：X線結晶解析に基づく生命現象の理解と薬学(領域への展開)

関連製品

膜タンパク質可溶化剤

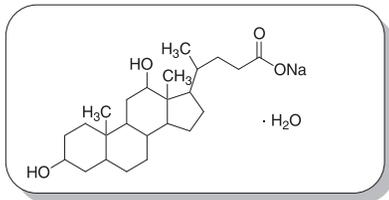
Sodium cholate (purified)

cmc = 14 mmol/l



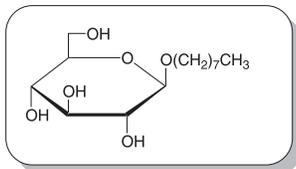
Sodium deoxycholate
(for protein crystallization)

cmc = 5 mmol/l



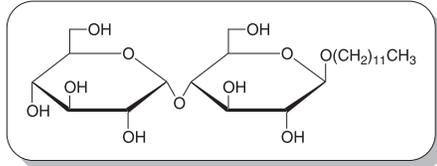
n-Octyl- β -D-glucoside

cmc = 25 mmol/l



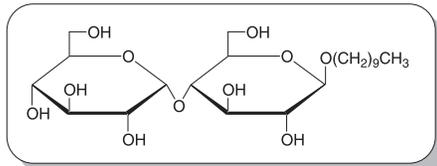
n-Dodecyl- β -D-maltoside

cmc = 0.17 mmol/l



n-Decyl- β -D-maltoside

cmc = 1.8 mmol/l

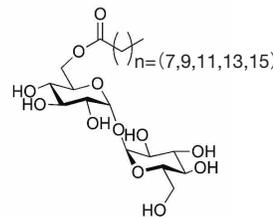


品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Sodium cholate (purified)	5 g	6,600	C321
	25 g	25,400	C321
Sodium deoxycholate (for protein crystallization)	1 g	9,000	D520
	5 g	35,800	D520
<i>n</i> -Octyl- β -D-glucoside	250 mg	3,800	O001
	1 g	7,400	O001
	5 g	26,800	O001
	25 g	Request	O001
<i>n</i> -Dodecyl- β -D-maltoside	1 g	13,400	D316
	5 g	54,000	D316
	25 g	Request	D316
<i>n</i> -Decyl- β -D-maltoside	1 g	13,400	D382
	5 g	54,000	D382

関連製品

その他デタージェント

Trehalose C8, Trehalose C10, Trehalose C12
Trehalose C14, Trehalose C16



品名	cmc (mmol/l)
Trehalose C8	5.6
Trehalose C10	3.0
Trehalose C12	0.15
Trehalose C14	0.012
Trehalose C16	0.0061

Trehalose 型デタージェントを用いた
膜タンパク質結晶化の例

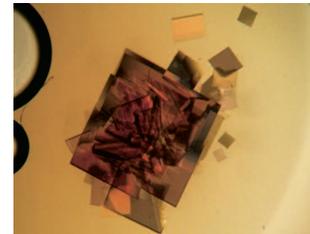
実験例①

膜タンパク質可溶化剤として知られている、*n*-Decyl- β -D-maltoside と Trehalose C8 を混合して使用することにより、1.55 Å の分解能を持つ X 線回折像を得ることが出来た。(未発表データ)

結晶化条件

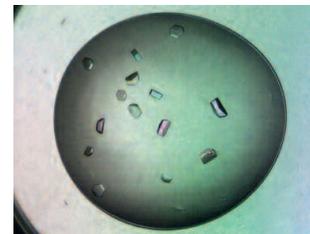
膜タンパク質	ウシ心筋子トクロム酸化酵素
Detergent	<i>n</i> -Decyl- β -D-maltoside + Trehalose C8
分解能	1.55 Å

(兵庫県立大学理学部教授 吉川信也先生よりご提供)



実験例②

Trehalose C12 を用いて、12 回膜貫通型膜タンパク質を可溶化し、結晶化することに成功している。(ユーザー様よりご提供)



品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Trehalose C8	500 mg	20,000	T459
Trehalose C10	500 mg	20,000	T460
Trehalose C12	500 mg	20,000	T461
Trehalose C14	500 mg	20,000	T464
Trehalose C16	500 mg	20,000	T465

Topics on Chemistry

ミトコンドリア内グルタチオン選択的近赤外蛍光プローブ

株式会社同仁化学研究所 山本 純史

ミトコンドリアは真核生物の細胞小器官で、炭水化物や脂肪を酸素によって分解して生体に必要なエネルギー形態である ATP を作り出す極めて重要な役割を担っている。同時に、アポトーシスを誘発する活性酸素種 (ROS) をも生成する。したがって、ミトコンドリアの酸化的損傷は細胞死を引き起こし、多くの神経変性疾患や病変につながる。このような酸化ストレスから細胞を保護するために、ミトコンドリアは多くの抗酸化機能を備えている。その内の一つがミトコンドリア内グルタチオン (GSH) プールである。その意味で、ミトコンドリア内の GSH の検出、可視化は生理的な機能を解明する上で極めて重要である。

ミトコンドリア内 GSH を標的にした近赤外 (NIR) 領域の蛍光プローブはこれまであまり報告されていない。近赤外領域蛍光は細胞内の自家蛍光に妨害されないため、非侵襲イメージングには理想的である。これまでに開発された数少ないミトコンドリア内 GSH 検出用蛍光プローブは、システイン (Cys) やホモシステイン (Hcy) と優先して反応するため、GSH を選択的に検出することがほとんどできていなかった。初めてミトコンドリア内 GSH 検出用蛍光プローブの合成に成功したのは Yang らである。彼らの報告したプローブは BODIPY を基本構造としたもので 556 nm に蛍光極大を持ち、Cys や Hcy と反応すると蛍光極大波長が 564 nm にシフトし、GSH と反応すると 588 nm にシフトするという特性を持っていた¹⁾。彼らはそのほかにも幾つかミトコンドリア内の GSH 検出用蛍光プローブを作製したが、彼らのプローブはミトコンドリア標的化能力に難点があった²⁾。

本稿では、最近 Lim らが開発した新たな GSH 選択性蛍光プローブについて紹介したい³⁾。Lim らが、設計・開発した蛍光試薬 (MitoGP) は、ミトコンドリア標的化部位として正電荷をもつヘプタメチン部分と GSH によって活性化を受けるニトロアゾアリアルエーテル部分から成っている。MitoGP と GSH の反応生成物の蛍光は、近赤外領域にあるので、細胞や生体レベルのイメージングには好都合である。なお、ヘプタメチン部分に、種々の置換基を導入することによって吸収・蛍光の波長特性を変えることができ (図 1)、ブチルエステルカルボキシル体 (3) やアミド体 (4) は、MitoGP と異なる分光学的波長特性と細胞内分布をもっている。

Lim らは、MitoGP の GSH に対する選択性を調べるために、HEPES 緩衝液 (0.10 mol/l, pH 7.4) 中で Cys と Hcy を含む種々のアミノ酸と MitoGP とを反応させた。Cys と Hcy 以外のアミノ酸は MitoGP と反応せず蛍光を示さなかったが、GSH を加えると MitoGP は 810 nm に大きな蛍光増大を示した。Cys、Hcy は弱いながら蛍光を生じたが、蛍光極大波長は 747 nm に短波長シフトしていた。Cys、Hcy 以外のアミノ酸では、GSH による MitoGP の蛍光増強を阻害しないのに対して、Cys、Hcy はそれを阻害した。Lim らは、Cys または Hcy のチオール基が MitoGP に置換反応でチオエーテル結合した後、アミノ基が硫黄原子と分子内置換して、より安定な C-N 結合をつくるためであると考察している (図 2)。

Lim らは、このことをモデル化合物 (メルカプトエチルアミン、メルカプトエタノール) と MitoGP の反応で確認している。メルカプトエチルアミンと MitoGP の最終産物の蛍光極大波長はメルカプトエタノールと MitoGP の最終産物のそれよりも短波長である。さらに MitoGP に GSH を加えて蛍光変化の滴定実験を行い、滴定曲線から、反応は 1:1 で進み、GSH の検出限界は 26 nmol/l であることが分かった。

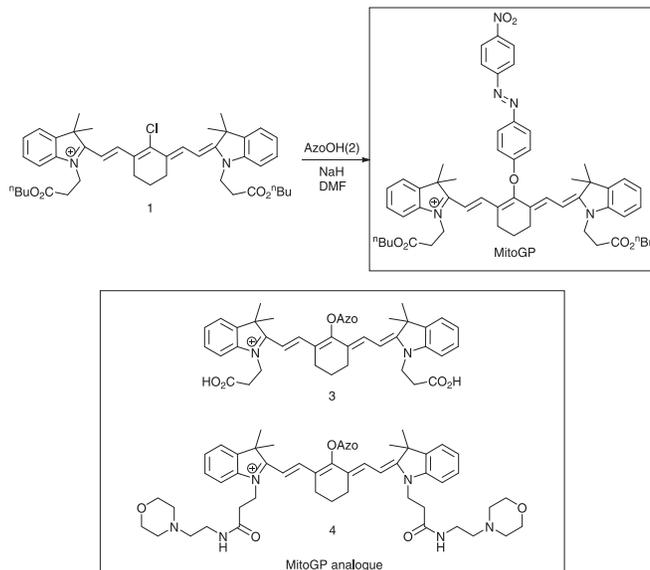


図 1. Synthesis of a mitochondrial GSH probe (MitoGP) and its Analogues

種々の分光学的 (紫外可視吸収、蛍光、NMR) な考察から、Lim らは MitoGP と GSH の水溶液中の反応を概説している。MitoGP そのものは、インドシアニン部からニトロアゾ部への光誘起電子移動 (Photoinduced Electron Transfer, PeT) および、可溶性の凝集体 (ベシクル、ミセル) を形成するため、蛍光を示さない。最初の GSH のチオールの MitoGP へのマイケル付加反応 (1,6 共役付加反応) に続いて、ニトロアゾ部の脱離が起こり、蛍光性物質が生成する。MitoGP のブチルエステル部を他の官能基に変えることによって、細胞内局在性や吸収スペクトル、チオール置換体の蛍光スペクトルの波長特性を変えることも可能である。

次に、HeLa 細胞を MitoGP 処理し共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、ミトコンドリアに選択的に蛍光画像が見られた。この画像は、ミトコンドリア特異性の蛍光プローブ (ローダミン 123) による画像と重なり、MitoGP のミトコンドリア選択性が確認できた。さらに、MitoGP 処理前に、GSH スカベンジャー (3-ヒドロキシペンテン酸、3-オキシペンテン酸) で前処理すると、蛍光が大幅に減少し、GSH 増強剤 (α -リポ酸) で前処理すると、蛍

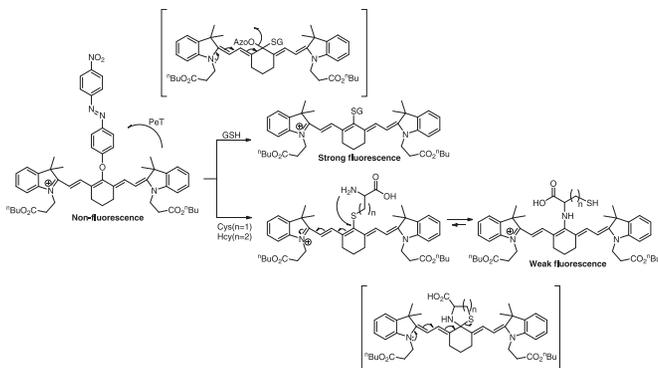


図 2. Proposed reaction mechanism of MitoGP with GSH vs Cys/Hcy

光が増強され、MitoGP が GSH 検出に有効であり、GSH 濃度にも敏感であることが分かった。したがって、MitoGP による細胞イメージングでは、ミトコンドリア内の GSH に特異的であることが明らかになった。

今回、Lim らは Cys や Hcy よりも選択的にミトコンドリア内 GSH を検出する新規 off-on 近赤外蛍光プローブの設計、開発に成功した。このプローブはミトコンドリア内 GSH を直接細胞イメージングによって観察し、かつその変動をも見ることができる。その性能は他の市販製品よりも優れていると Lim らはコメントしている。今後このプローブがミトコンドリア内 GSH 関連疾患の治療薬開発等の場で活躍することを期待したい。

[参考文献]

- 1) L.-Y. Nui, Y.-S. Guan, Y.-Z. Chen, L.-Z. Wu, C.-H. Tung and Q.-Z. Yang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 18928.
- 2) Y. Guo, X. Yang, L. Hakuna, A. Barve, J. O. Escobedo, M. Lowry and R. M. Strongin, *Sensors*, **2012**, 12, 5940.
- 3) S.-Y. Lim, K.-H. Hong, D.I. Kim, H. Kwon and H.-J. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 7018-7025.

パンフレットのご案内

はじめてシリーズ

小社ではお寄せいただいたお問合せを基にプロトコル「はじめてシリーズ」を作成しております。



第一弾「はじめての細胞内 Ca²⁺ 測定プロトコル」
原理・Ca²⁺ プローブの特徴・測定方法・トラブルシューティングなど問い合わせ担当者がわかりやすく解説したプロトコルです。



第二弾「はじめての抗体標識プロトコル」
直接標識法の利点や実施例などをわかりやすくまとめました。はじめて抗体を標識される方にご覧いただきたいプロトコルです。



第三弾「はじめての酸化ストレスマーカー測定プロトコル」
各酸化ストレスマーカーの説明や試料の前処理方法、小社製品を使用している測定方法などをまとめたプロトコルです。

各資料のご請求は小社マーケティング部までご連絡下さい。
フリーダイヤル：0120-489548
E-mail: info@dojindo.co.jp

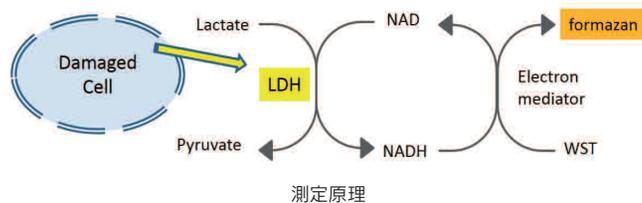
新製品 **DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.**

LDH 活性測定キット

Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST

<特長>

1. 生細胞存在下（ホモジニアス）、および細胞培養液のみ（ノンホモジニアス）の両方の系で死細胞数の測定が可能。
2. 測定毎の溶液調製が不要。
3. [⁵¹Cr] リリースアッセイのようなラジオアイソトープは不要。



Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST は、細胞から培地中に放出された乳酸脱水素酵素(LDH)活性を測定することにより細胞傷害を測定するキットです。

LDH は細胞質に存在する酵素で、通常は細胞質に留まっていますが、細胞膜が傷害を受けると培地中に放出されます。放出された LDH は安定なので、死細胞または細胞膜に傷害を受けた細胞数を測る指標として広く用いられています。

本キットは、生細胞と反応せず、かつ、細胞にダメージを与えないため、生細胞と死細胞が混在する細胞培養液中に直接試薬を加えても細胞傷害を測定することが可能です（ホモジニアスアッセイ）。なお、一般的に用いられる細胞培養液を取り出して LDH 活性を測定する方法も可能です（ノンホモジニアスアッセイ）。また、安定性の高い試薬を用いているため、調製した溶液は長期間保存でき、用時調製する必要がありません（表 1）。そのため、多検体アッセイから、少ない検体数の測定にも対応することができます。

表 1 各社指定の Working solution の保存方法

製品	保存条件	使用期限
Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST	冷蔵	2 か月
他社 P(ノンホモジニアス)	冷凍	6 ~ 8 週間
他社 R(ホモジニアス)	-	用時調製
他社 R(ノンホモジニアス)	-	用時調製

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST	100 tests	9,600	CK12

関連製品：生細胞数測定キット

Cell Counting Kit-8

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Cell Counting Kit-8	100 回用	4,800	CK04
	500 回用	12,800	CK04
	2500 回用	36,200	CK04
	10000 回用	100,000	CK04

新製品

DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

レドックス応答性タンパク質解析キット

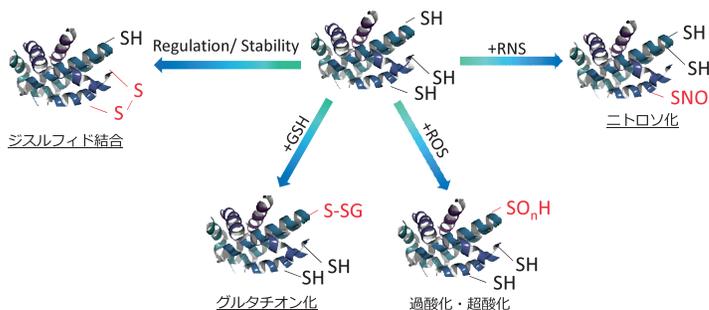
-SulfoBiotics- Protein Redox State Monitoring Kit
-SulfoBiotics- Protein Redox State Monitoring Kit Plus

<特長>

- ・タンパク質のSH 基数が目視で分かる
- ・ウェスタンブロット解析が可能 (Kit Plus)
- ・使いきりタイプで操作が簡便

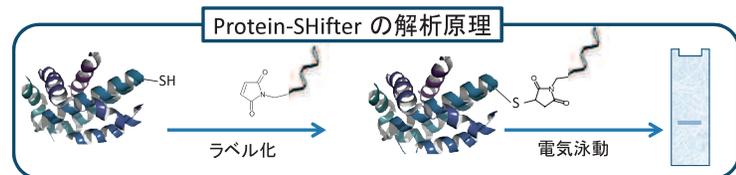
タンパク質システインのチオール基修飾は、代表的な翻訳後修飾の一つであり、生体内のレドックス変化にตอบสนองして生じます。近年、このようなチオール基の修飾が、転写やタンパク質発現、細胞死などの様々な細胞応答を制御していることが明らかにされてきています。チオール基の翻訳後修飾によるタンパク質の機能制御を理解するためには、個々のチオール基の酸化還元状態を解析することが必要不可欠です。

本製品を用いることで、タンパク質のチオール基のレドックス状態を可視化することが可能です。さらに Kit Plus においては、ウェスタンブロット法に適用可能です。



複数種の修飾が生体内でコントロールされ、様々な生命現象に関わっている。

-SulfoBiotics- Protein Redox State Monitoring Kit の解析原理



マレイミド基を有する Protein-SHifter はタンパク質の SH 基と反応することで、結合したタンパク質の分子量を増加させます。そのため、タンパク質の SH 基数は Protein-SHifter の結合数に応じて、異なるバンドとして分離することが可能となります。

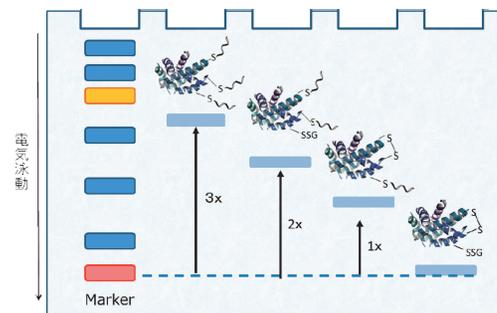
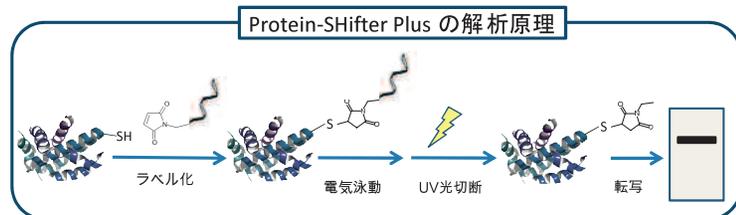


図 1. 電気泳動によるタンパク質 SH 基数の可視化

-SulfoBiotics- Protein Redox State Monitoring Kit Plus の解析原理



Protein-SHifter Plus では、タンパク質へのラベル化後に UV 光の照射によりラベル化物を切断することが可能であるため、ウェスタンブロットによる解析が可能となります。* Kit Plus は、動物細胞用に最適化されています。

実験例：GAPDH チオールの酸化剤応答

酸化剤である Diamide や H₂O₂ 刺激にตอบสนองして、HeLa 細胞中の GAPDH の SH 基が酸化されていることを確認した。



1. 未処理, ラベル化
2. Diamide 酸化, ラベル化
3. H₂O₂ 酸化, ラベル化

[参考文献]

- 1) S. Hara, Y. Tatenaka, Y. Ohuchi and T. Hisabori, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2015**, 456(1), 339-343.
- 2) S. Hara, T. Nojima, K. Seio, M. Yoshida and T. Hisabori, *Biochim. Biophys. Acta.*, **2013**, 1830(4), 3077-3081.

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
-SulfoBiotics- Protein Redox State Monitoring Kit	5 samples	18,000	SB11
-SulfoBiotics- Protein Redox State Monitoring Kit Plus	5 samples	23,000	SB12

本製品は東京工業大学の久堀教授らにより開発された製品です。

新製品

生体硫黄研究用試薬

サルフェン硫黄ドナー類

硫化水素の細胞内機能を議論する上で、硫黄原子が連結したパルスルフィドやポリスルフィドのようなサルフェン硫黄は欠かせない存在となってきました。このようなサルフェン硫黄は、硫化水素の産生や貯蔵、放出だけでなく、スルフヒドリル化などのタンパク質内チオールをターゲットとしたシグナル伝達にも関与していることが示唆されており¹⁾、硫化水素に関連する研究分野は大きな広がりを見せております。木村らは、実際に脳内で硫化水素からポリスルフィドが生成することを発見し、このポリスルフィドが脳内の神経伝達を増強していることを明らかにしています²⁾。また小池らは、ポリスルフィドである四硫化ナトリウムが Keap1 のスルフヒドリル化を介して Nrf2 を活性化し、酸化ストレスに対する高い細胞保護機能を発揮することを示しています³⁾。

小社ではこのような幅広い硫化水素関連の研究に対応するため、硫化水素研究用として高品質のポリスルフィドを製品化致しました (Fig. 1)。有機合成用として三硫化ナトリウムや四硫化ナトリウムは市販されていますが、メーカーやロットによって品質が異なります (Fig. 2)。

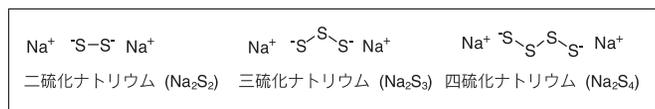


Fig. 1 サルフェン硫黄ドナーの構造

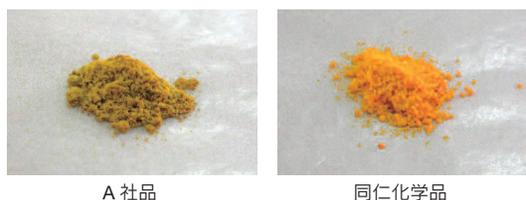


Fig. 2 四硫化ナトリウムの性状 (A 社品と同仁化学品の比較)
* A 社品は緑がかった黄土色粉末で、水に溶解すると多くの不溶物(不純物)が観察された。

[参考文献]

- 1) B. D. Paul and S. H. Snyder, *Nat. Rev. Mol. Cell. Bio.*, **2012**, 13, 499.
- 2) Y. Kimura, Y. Mikami, K. Osumi, M. Tsugane, J. Oka and H. Kimura, *FASEB J.*, **2013**, 27, 2451.
- 3) S. Koike, Y. Ogasawara, N. Shibuya, H. Kimura and K. Ishii, *FEBS Lett.*, **2013**, 587, 3548.

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
-SulfoBiotics- Sodium disulfide (Na ₂ S ₂)	1 set (100 mg x 5)	12,000	SB02
-SulfoBiotics- Sodium trisulfide (Na ₂ S ₃)	1 set (100 mg x 5)	12,000	SB03
-SulfoBiotics- Sodium tetrasulfide (Na ₂ S ₄)	1 set (100 mg x 5)	12,000	SB04
-SulfoBiotics- Sodium Polysulfide Set	1 set	12,000	SB13

※ SB13 : SB02, SB03, SB04 3種類の各 100 mg x 1

DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

サルフェン硫黄検出用蛍光プローブ

硫黄原子が連なって結合したサルフェン硫黄は、硫化水素の生体内プールとして存在するだけでなく、タンパク質の S-スルフヒドリル化を介したシグナル伝達に寄与していることが明らかとなり、近年非常に注目されてきております。M. Xian らが開発した蛍光プローブ SSP2 は、サルフェン硫黄と特異的に反応して強い蛍光を発する試薬であり、サルフェン硫黄の蛍光検出や細胞内動態の解析に有用です (Fig. 3, 4)¹⁻³⁾。小社では SSP2 よりも高感度な蛍光プローブ SSP4 を製品化致しました。SSP4 は SSP2 の約 300 倍感度が高く、細胞内イメージングへの適用も可能です (Fig. 5)。

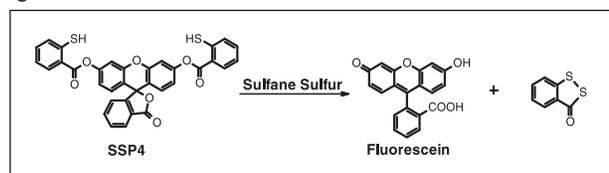


Fig. 3 SSP4 とサルフェン硫黄の反応

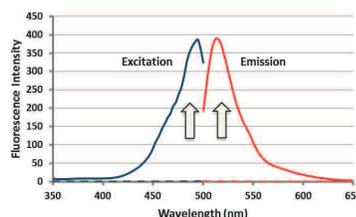
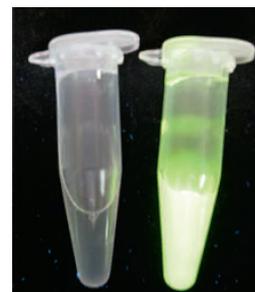


Fig. 4 サルフェン硫黄との反応に伴う SSP4 の励起および蛍光スペクトル変化



左: サルフェン硫黄なし
右: サルフェン硫黄あり

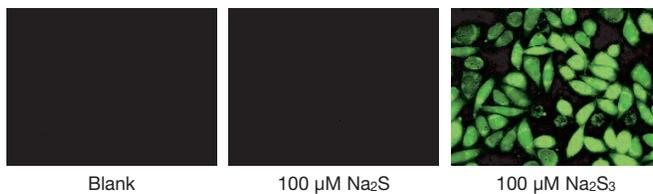


Fig. 5 サルフェン硫黄の細胞内イメージング
CHO 細胞に 20 μM SSP4 をロードした後、各試薬を添加し、蛍光顕微鏡で観察

[参考文献]

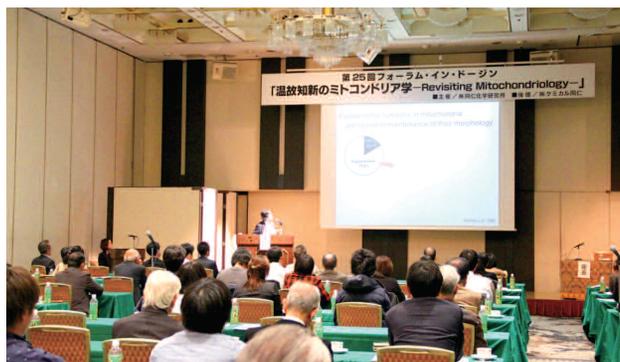
- 1) W. Chen, C. Liu, B. Peng, Y. Zhao, A. Pacheco and M. Xian, *Chem. Sci.*, **2013**, 4, 2892.
- 2) T. Ida, T. Sawa, H. Ihara, Y. Tsuchiya, Y. Watanabe, Y. Kumagai, M. Suematsu, H. Motohashi, S. Fujii, T. Matsunaga, M. Yamamoto, K. Ono, N. O. Devarie-Baez, M. Xian, J. M. Fukuto and T. Akaike, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **2014**, 111, 7606.
- 3) E. Marutani, M. Sakaguchi, W. Chen, K. Sasakura, J. Liu, M. Xian, K. Hanaoka, T. Nagano and F. Ichinose, *Med. Chem. Commun.*, **2014**, 5, 1577.

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
-SulfoBiotics- SSP4	1 mg	29,000	SB10

本製品は Washington State University の Dr. Xian により開発された製品です。

25th フォーラム・イン・ドージン開催後記 「温故知新のミトコンドリア学 – Revisiting Mitochondriology –」

25回目の節目となる本年度のフォーラム・イン・ドージンは、ミトコンドリアをメインテーマとして、11月14日熊本市で開催された。ミトコンドリアは古くから細胞の酸素呼吸によるATP産生を司る細胞内小器官として広く知られているが、近年、従来知られていなかった様々な機能が次々と明らかにされ、ミトコンドリア研究の新たな展開が注目されるようになった。そこで、ミトコンドリア学 (Mitochondriology) を新たな視点で問いなおしてみよう (Revisiting) という企画が今回のフォーラムの主題である。つまり、古くからの知識を整理し直し (温故)、新たな体系を知る (知新) という訳である。最近ミトコンドリアといえば、活性酸素や酸化ストレスの関連で何かと話題になっていることも多く、予約参加者以外に当日参加者数も予想以上であった。全体として例年になく多数の参加者で会場が狭く感じられるほどであった。会場からの質問・コメントも学生から現役の研究者まで幅広い層から出され、活発な討論が展開された。



ミトコンドリア内のATPレベルがその機能・作用に応じて時間空間的に変動することを示された。ランチブレイクの後、小柴琢己先生 (九州大学) が午後のセッションの最初の講演をされた。ミトコンドリアはRNAウイルスに対する宿主の自然免疫に密接に関与することを、宿主細胞に感染したウイルスによって活性化される細胞内シグナル伝達経路によって詳しく説明された。岡敏彦先生 (立教大学) は、ミトコンドリアの機能がどのような形態によって裏付けられているかを、内膜の形態 (変動) とくにクリステ構造の形成・維持に基づいて形態学的・細胞生理学的に示された。江崎雅俊先生 (熊本大学) は、ご自身の研究テーマであるAAAシャペロン分子種の一つがミトコンドリアの形態と機能を制御していることを述べられた。最後の演者の岡本浩二先生 (大阪大学) は、ミトコンドリアの品質管理システムについて、ミトコンドリアの選択的分解過程 (マイトファジー) の作動原理を中心に講演された。

同仁化学の関係部署の若手の人々による支援作業によってフォーラムの進行はスムーズに行われた。講演後に催されたミキサーでは、演者/座長の先生方・参加者・同仁化学関係者の相互の交流がなごやかに行われ、盛会裡にフォーラムを終えることができた。
(三浦洵)

25th Forum in DOJIN
温故知新のミトコンドリア学
- Revisiting Mitochondriology -
2014.11.14 (金) 10:00~17:00 (開場9:30)
熊本ホテルキャッスル2F (熊本市中央区城東町4-2)
代表世話人 山本 智郎 (立教大学大学院生命科学研究科分子細胞学専攻) / 主催 株式会社 同仁化学研究所 後援 株式会社 ケミカル同仁
参加費 無料 定員 140名
講演プログラム
10:00-10:05 主催挨拶 野田 繁二 (株式会社同仁化学研究所)
10:05-10:15 世話人挨拶 山本 智郎 (立教大学大学院生命科学研究科分子細胞学専攻)
Session 1: (議長: 山本 智郎) (熊本大学大学院生命科学研究科分子細胞学専攻)
10:15-11:15 中田 和人 (筑波大学大学院生命科学研究科分子細胞学専攻)
「ミトコンドリアタンパク質変異による多様な病態発症機構」
11:15-12:00 今村 博臣 (京都大学大学院生命科学研究科分子細胞学専攻)
「ライブイメージングで明らかになってきた細胞内ATP濃度の時空間変動」
12:00-13:30 ランチブレイク (ランチョンセミナー)
Session 2: (議長: 小柴 琢己) (九州大学大学院生命科学研究科分子細胞学専攻)
13:30-14:15 小柴 琢己 (九州大学大学院生命科学研究科分子細胞学専攻)
「哺乳動物におけるRNAウイルス免疫とミトコンドリアとの関係」
14:15-15:00 岡 敏彦 (立教大学大学院生命科学研究科分子細胞学専攻)
「ミトコンドリア形態とクリステ構造の形成機構」
15:00-15:15 コーヒーブレイク
Session 3: (議長: 江崎 雅俊) (熊本大学大学院生命科学研究科分子細胞学専攻)
15:15-16:00 江崎 雅俊 (熊本大学大学院生命科学研究科分子細胞学専攻)
「AAAシャペロンp97/Cdc48pによるミトコンドリア形態制御機構」
16:00-16:45 岡本 浩二 (大阪大学大学院生命科学研究科分子細胞学専攻)
「ミトコンドリアを丸ごと分解 - 寿命と代謝」
16:45-17:00 閉会の挨拶 三浦 洵 (株式会社同仁化学研究所)
17:00-18:30 ミキサー



要旨集の残部がございますので、ご希望の方は小社マーケティング部までお問い合わせください。

演者の先生方は、新進気鋭の若手研究者やミトコンドリア学を牽引する現役の研究者で、いずれの講演も分かりやすい中に、目を見張るばかりの最新の結果が盛り込まれていて、フォーラム全体としてはまとまりのある引き締まった内容であった。

講演は、筑波大学の中田和人先生による基調講演を兼ねたプレゼンテーションで幕を開けた。ご自身のミトコンドリアセントラルドグマと核セントラルドグマから成る細胞内の二重支配理論を展開され、ミトコンドリアDNA変異による病態について述べられた。今村博臣先生 (京都大学) は巧妙に設計・開発されたATPイメージング用バイオセンサー分子を用いて、細胞内画分とくに

<p>ホームページアドレス URL : http://www.dojindo.co.jp/ E-mail : info@dojindo.co.jp</p>	<p>フリーファックス 0120-021557 フリーダイヤル 0120-489548</p>
---	---