

# 相分離生物学②

## 総説

細胞内相分離を理解するためのケミカルバイオロジー  
Chemical Biology: Dissecting the physicochemical traits of phase separation inside cells

金沢大学 雨森 翔悟 西山 嘉男 添田 貴宏 羽澤 勝治

生命科学の最前線 ～熊本大学若手研究者の現場から～

RNA修飾病と修飾ヌクレオシド

RNA modopathy and modified nucleosides

熊本大学 永芳 友 富澤 一仁

## 注目の研究

G-quadruplexとその機能解明

株式会社同仁化学研究所 成田 侑介

開発中 液-液相分離(LLPS)関連製品 P.6

新製品 オートファジー経路測定キット P.12

連載 抗酸化キットを使う前のサンプル前処理法(4) P.13



## CONTENTS

### Review

#### 細胞内相分離を理解するためのケミカルバイオロジー

Chemical Biology: Dissecting the physicochemical traits of phase separation inside cells

金沢大学 雨森 翔悟 西山 嘉男 添田 貴宏 羽澤 勝治

1

### Topics on Chemistry

#### G-quadruplexとその機能解明

株式会社同仁化学研究所 成田 侑介

5

### Review

#### 生命科学の最前線 ～熊本大学若手研究者の現場から～ RNA修飾病と修飾ヌクレオシド

RNA modopathy and modified nucleosides

熊本大学大学院 生命科学研究部 永芳 友 富澤 一仁

8

### 連載

#### 抗酸化キットを使う前のサンプル前処理法 〈第4回〉

株式会社同仁グローバル 山口 勝則

13

### Commercial

開発中

液-液相分離(LLPS)関連製品 ..... 6

新製品

オートファジー経路測定キット ..... 12

お役立ち

バックナンバーのご案内 ..... 4

製品改良のご案内 ..... 4

キットフィルター変更のご案内 ..... 11

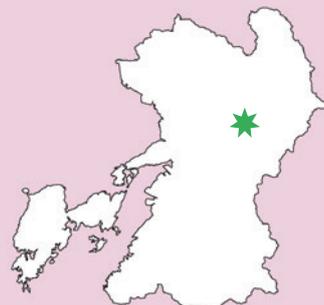
受託分析のご案内 - 同仁グローバル ..... 14



表紙:高森町 桜と菜の花

最近有名になりつつある「チェリーロード」の一幕。夕陽が正面から入り、ピンク色が更に色味を増すので夕刻を狙った。ここは造園屋さんの畑で、狙い通りの画が撮れた。

photo:永島 俊介氏



 X (旧ツイッター)

小社製品の最新情報や使用文献などを投稿しています。



フォロー  
お願いします

@dojindoinfo

※希望納入価格には消費税は含まれておりません。

※記載価格は本誌発行時における希望納入価格です。

予告なしに変更する場合がございますのでご注意ください。

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

# 細胞内相分離を理解するためのケミカルバイオロジー

Chemical Biology: Dissecting the physicochemical traits of phase separation inside cells



**雨森 翔悟**

金沢大学  
ナノマテリアル研究所  
助教



**西山 嘉男**

金沢大学  
理工研究域  
准教授



**添田 貴宏**

金沢大学  
理工研究域  
准教授



**羽澤 勝治**

金沢大学  
新学術創成研究機構  
准教授

## Abstract

Biomolecules undergo liquid-liquid phase separation (LLPS) to spatiotemporally compartmentalize and regulate diverse biological processes. Because of the limited numbers of tools to directly probe LLPS, the physicochemical traits of phase-separated condensates remain largely elusive. Here, we introduce a light-switching dipyrone probe (Pyr-A) that forms monomers in either hydrophobic or viscous environments, and intramolecular excimers in aqueous solutions, which could characterize LLPS and enhance our understanding of phase separation underlying biological functions.

## 1. はじめに

ゲノム計画が終了し、生物を構成する膨大な種類のタンパク質に関する情報が明らかとなった現代、細胞・組織内において時空間的にタンパク質の活性や相互作用が適切に調節され、生命システムを制御する仕組みを解明することが次世代生命科学の大きな課題である。従来、タンパク質は既定のアミノ酸配列から固有の構造を形成し、その構造によって機能を発現すると考えられてきた。一方、近年になって、タンパク質内に存在する、特定の構造

をとらない天然変性領域 (IDRs: Intrinsically Disordered Regions) の重要性が目ざされている。この IDRs は液-液相分離 (Liquid-Liquid Phase Separation (LLPS)) による会合・集合体を促進し、複雑ながらも秩序ある高次構造体を形成することで、転写や翻訳など多くの生命現象と密接に関わっている (図 1)。その一方で、不規則領域を構成するアミノ酸配列異常と相転移・相分離異常は、神経変性疾患やがんなどの病気が発症する要因となる<sup>1)</sup>。そのた

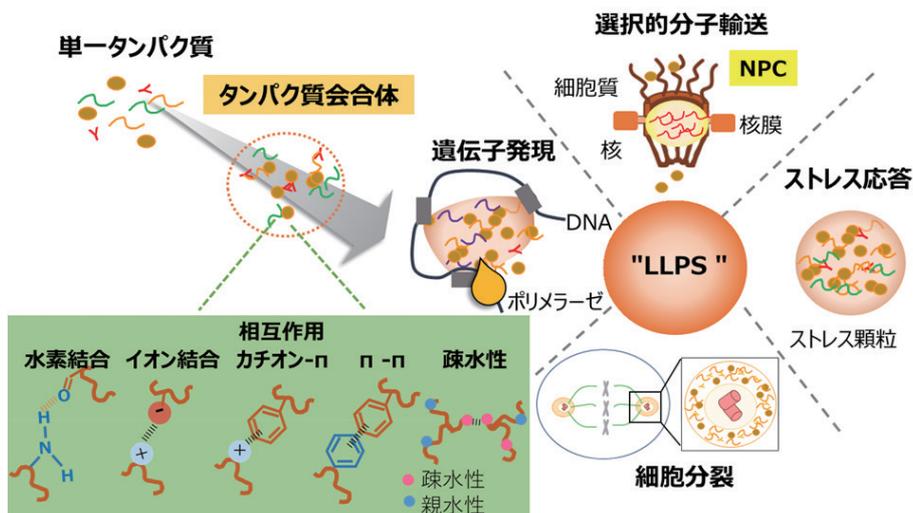


図 1 IDRs が惹起する LLPS は生命反応を調節する基盤機構

め、高次構造体 LLPS の形成機序の基盤となる物理化学的性質を明らかにすることは生命現象の理解や疾病機序解明につながる重要な課題である。私たちは生物学、化学、理工学の異分野融合研究を推進し、相分離の粘性・極性変化を解析できる蛍光プローブの開発に取り組んでいる。本稿では、私たちが開発した第一世代蛍光プローブの成果について紹介したい。

## 2. 相分離生物学の更なる発展を阻む課題

これまでに、細胞内における相分離の理解に向けて、観測環境中に標的分子動態を解析できる光退色後蛍光回復法 (FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching)、ラベルした二分子間の蛍光共鳴エネルギー移動法 (FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer) を評価する顕微鏡ベースの技術を用いた手法、核磁気共鳴 (NMR : Nuclear Magnetic Resonance) による化学シフトを介して化学環境と二次構造を解析することで、核オーバーハウザー効果や常磁性弛緩増強を指標にした近接相互作用に基づく分子ダイナミクスを評価するアプローチが展開されている<sup>2)</sup>。これらの技術はいずれも、興味のあるタンパク質 (POI : Protein of Interest) の拡散を評価するために有効な方法である。とりわけ、蛍光に依存する解析方法では、POI に蛍光タンパク質を融合したタンパク質を作製する必要があること、この蛍光タンパク質が POI のサイズや特性に悪影響を及ぼす可能性を否定できない一面がある。また、後者の NMR 解析では高い純度と濃度の POI が必要であることに加えて、タンパク質の配列の複雑性や分子量、スペクトルの重なりや検出信号の拡散が結果の解釈を複雑にするという短所がある。そのため、遺伝子工学やタンパク質精製などの複雑な手順なしに LLPS を評価できるケミカルツールを開発することは、現行アプローチの欠点を克服できるだけでなく、相分離の仕組みを理解するうえで重要な課題となる<sup>3)</sup>。

## 3. ピレンの蛍光特性を活用した 周囲環境モニタリング蛍光プローブ

ピレンは 4 個のベンゼン環が菱形のように結合した平面構造を持つ芳香族炭化水素であり、溶液中の存在濃度に依存して異なる蛍光を示す特性がある。希薄溶液においてはモノマー発光 (励起波長 350 nm / 発光波長 ~ 380 nm) を濃厚溶液においては二分子が近接し励起錯体を形成することでエキシマー発光 (励起波長 350 nm / 発光波長 ~ 480 nm) を示す。ピレンは化学修飾がし易いことに加え、エキシマー発光を示す性質を利用することで、DNA、タンパク質、細胞膜といった生体分子の位置・空間情報を得るための研究が数多く行われてきた<sup>4)</sup>。

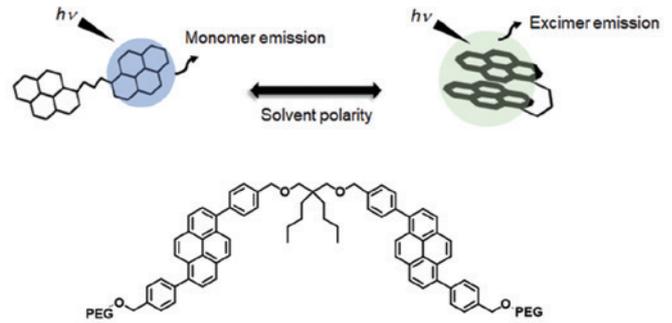


図2 第一世代ピレンダイマー型プローブ

筆者らは、相分離から成る生体高分子液滴 (バイオ液滴) の粘性・極性変化を評価できるケミカルツールの創出に向けて、ピレンの蛍光特性を生かした蛍光プローブ開発に取り組んでいる。図 2 に示すように、筆者らの開発した第一世代・蛍光プローブ (Pyr-A) はピレンをリンカーでつなげたピレンダイマー型の構造を特徴とする<sup>5)</sup>。異なる極性溶媒における Pyr-A の蛍光発光スペクトル解析の結果から、本プローブは極性溶媒ではエキシマー発光を示すが、疎水性溶媒中ではモノマー発光を示すことが明らかになった (図 3A)。また、この蛍光発光スペクトルは Pyr-A 濃度に依存しなかったため、分子内エキシマー発光が起こっていることが確認できた。さらに、異なる粘性溶媒中での蛍光発光スペクトル解析の結果から、粘性環境下ではモノマー発光を示すことが明らかになった (図 3B)。これらエキシマー発光 (E) とモノマー発光 (M) の蛍光強度比 E / M を測定することで、Pyr-A の濃度に関係なく観測対象の状態 (極性、粘性) を定量化できることに成功した。

続いて、試験管内において IDRs を介して液滴を形成する BRD4 タンパク質、細胞内における相分離体の一つである中心体の粘性・極性変化の評価を行った。BRD4 の IDRs を介して形成されるバイオ液滴のサイズが大きくなると、E / M 比が減少することから、バイオ液滴の内部環境が低極性・高粘性になることが明らかとなった (図 4A)。また、中心体は細胞分裂の過程で成熟・肥大化することが知られている。Pyr-A を用いた解析より、細胞分裂期における中心体内部環境は、E / M 比が低下していることが明らかとなった (図 4B)。これらの結果は、相分離したバイオ液滴はサイズの肥大化に伴い、極性の低下ならびに粘性上昇を起こしていることが明らかになった (図 5)。

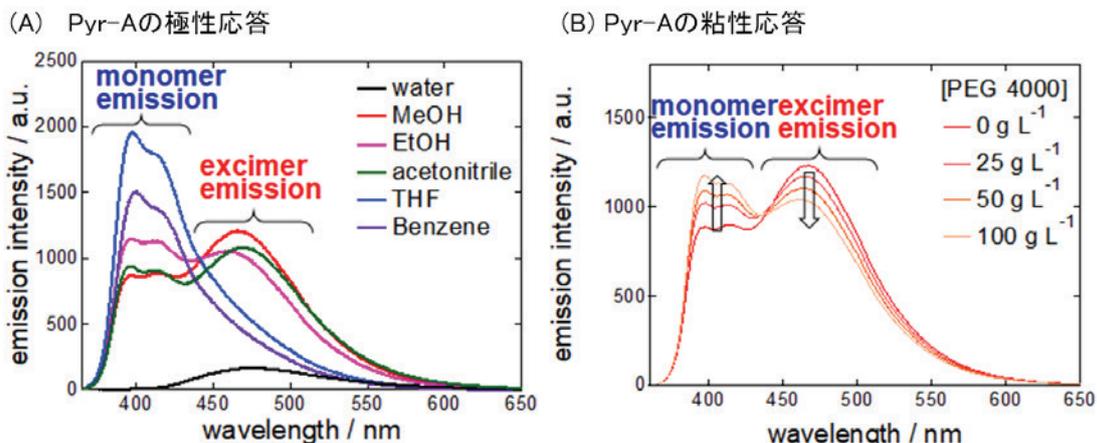
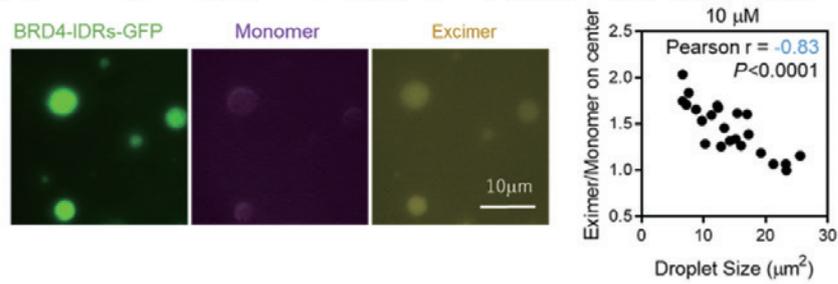


図3 周囲環境に応じた PyrA の蛍光特性

(A) BRD4タンパク質IDRsが形成するバイオ液滴の粘性・極性の評価



(B) 生細胞を用いた中心体の粘性・極性の評価

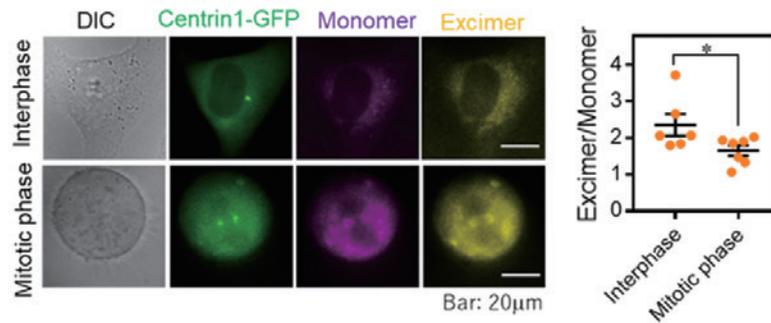


図4 Pyr-Aを用いた極性・粘性イメージング

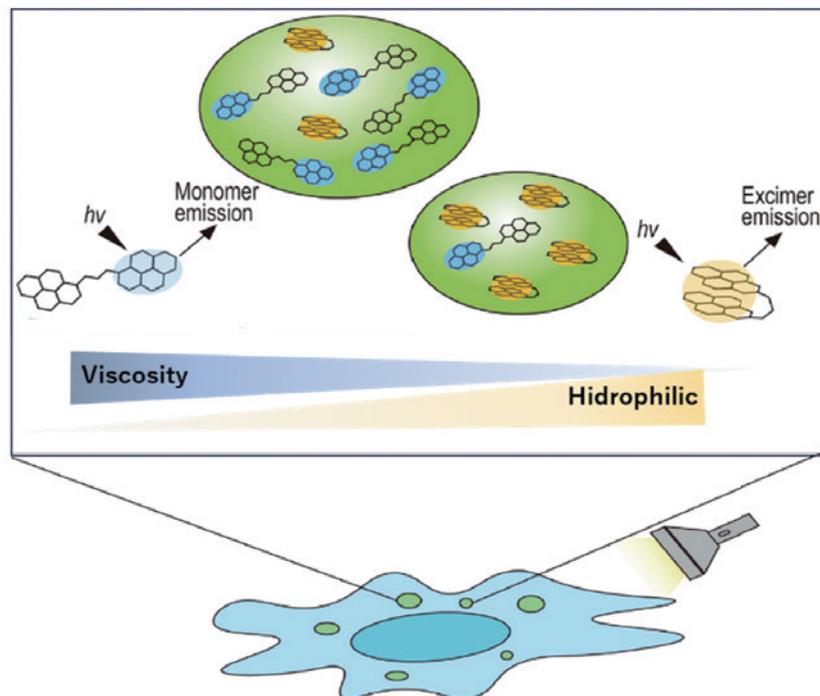


図5 Pyr-Aのプロープ特性の概要

#### 4. おわりに

本稿では、筆者らが開発した相分離したバイオ液滴の物理化学的性質を評価できる蛍光プローブについて紹介した。現在取り組んでいるが、リンカー部位の最適化や残基修飾による標的指向性の獲得など本プローブの実用化にむけた課題は多い。煩雑ながらも LLPS による時空間的なタンパク質ダイナミクスの仕組みを調べるケミカルツール開発により、基本生命現象から疾患の発症機序解明など生命科学が発展することが期待される。

[参考文献]

- 1) M. Fuxreiter and M. Vendruscolo, *Nat. Cell. Biol.*, **2021**, 23, 587-594.
- 2) L.R. Ganser and S. Myong, *Trends Biochem. Sci.*, **2020**, 45, 1004-1005.
- 3) T.C. Owyong, J. Zhao and Y. Hong, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2023** 76, 102354.
- 4) K. Fujimoto, *YAKUGAKU ZASSHI*, **2010**, 130, 1283-1287.
- 5) M. Hazawa, S. Amemori, Y. Nishiyama, Y. Iga, Y. Iwashima, A. Kobayashi, H. Nagatani, M. Mizuno, K. Takahashi and R.W. Wong, *iScience*, **2021**, 24, 02865.

著者プロフィール

氏名：雨森 翔悟 (Shogo Amemori)  
 所属：金沢大学・ナノマテリアル研究所  
 〒 920-1192 石川県金沢市角間町  
 Tel：076-264-5924  
 E-mail：amemori@staff.kanazawa-u.ac.jp  
 出身学校：北海道大学総合科学院物質化学コース  
 学 位：博士 (理学)  
 専門分野：超分子化学、高分子化学  
 現在の研究テーマ：高分子中における分子会合体評価、刺激応答性高分子の開発、ガス分離膜の開発

氏名：西山 嘉男 (Yoshio Nishiyama)  
 所属：金沢大学・理工研究域  
 〒 920-1192 石川県金沢市角間町  
 Tel：076-264-5704  
 E-mail：yosi1166@se.kanazawa-u.ac.jp  
 出身学校：京都大学大学院理学研究科  
 学 位：博士 (理学)  
 専門分野：分光分析化学  
 現在の研究テーマ：貴金属ナノ粒子の生成過程の解明、新規時間分解分光法の開発および相互作用解析への応用

氏名：添田 貴宏 (Takahiro Soeta)  
 所属：金沢大学・理工研究域  
 〒 920-1192 石川県金沢市角間町  
 Tel：076-264-5732  
 E-mail：soeta@se.kanazawa-u.ac.jp  
 出身学校：京都大学大学院薬学研究所  
 学 位：博士 (薬学)  
 専門分野：有機合成化学  
 現在の研究テーマ：触媒的不斉反応、低分子ゲル化剤の開発、多成分反応の開発、機能性小分子の合成研究

氏名：羽澤 勝治 (Masaharu Hazawa)  
 所属：金沢大学・新学術創成研究機構  
 〒 920-1192 石川県金沢市角間町  
 Tel：076-264-6206  
 E-mail：mhazawa@staff.kanazawa-u.ac.jp  
 出身学校：弘前大学大学院保健学研究科  
 学 位：博士 (保健学)  
 専門分野：分子細胞生物学、ゲノム情報機能学、放射線生物学、ケミカルバイオロジー  
 現在の研究テーマ：核構造ダイナミクスと遺伝子発現、相分離解析プローブの開発、スーパーエンハンサーの機能化メカニズム

バックナンバーのご案内

ドージンニュースのバックナンバーから、相分離に関連する記事を紹介します。

- 186号 (2023年9月発行)  
 総説「相分離生物学の先へ」(白木 賢太郎)
- 186号 (2023年9月発行)  
 TOPICS「神経変性疾患とLLPSの関わり」(末永 元輝)
- 174号 (2020年9月発行)  
 総説「小胞体 - ミトコンドリア接触領域の形成因子と細胞機能」(山本 真寿・山口 知也)
- 95号 (2000年7月発行)  
 総説「界面活性剤水溶液物質研究のための化学熱力学」(杉原 剛介)
- 85号 (1997年9月発行)  
 総説「両親媒性高分子:ナノ組織体の構築と機能」(秋吉 一成)

閲覧ご希望の方は小社 HP よりご覧頂けます。  
<https://www.dojindo.co.jp/dojinnews/>

冊子媒体をご希望の方は下記の小社 HP のお問い合わせよりご連絡下さい。  
<https://www.dojindo.co.jp/contact/>



製品改良のご案内

過酸化脂質検出蛍光試薬 Liperfluo (メーカーコード：L248)の性状が変わります。

Liperfluo は色素の脂溶性が高く DMSO などの溶媒への溶解には時間を要していましたが、小社の独自技術により溶解性を向上させることができました。従来製品と同一の化合物ですので、実験結果に変わりはありません。

改良型の製品は、2024年3月小社出荷分より変更となります。

〈従来型と改良型 Liperfluo の溶解性の比較〉

従来型と改良型の Liperfluo に DMSO 添加後、3分間のボルテックスのみで溶解操作を行いました。従来型は30秒間のボルテックスのみでは溶け残りが見られるのに対し改良型は完全に溶解したことを確認しました。

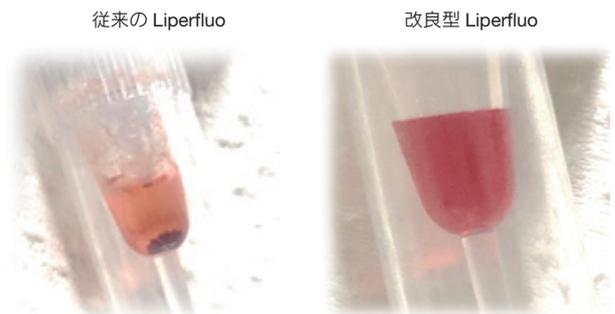


図 DMSO への溶解性の違い

# Topics on Chemistry

## G-quadruplex とその機能解明

株式会社同仁化学研究所 成田 侑介

G-quadruplex (G4) はDNAやRNAの高次構造の一種でグアニンに富む核酸配列で形成され、4つのグアニンが四量体を作った面 (G-カルテット) が2面以上重なった構造体である。ヒト細胞の約2,300種類のmRNA中にはG4が約3,800カ所形成されることが予測されており、mRNA中に存在するG4の役割はこれまで未解明だった。しかし近年の研究でG4は、ゲノムの安定性や遺伝子発現の調節に重要な役割を果たすことが分かってきている<sup>1)2)</sup>。

G4特異的に結合する化合物をグリオーマ幹細胞にさらすとDNA損傷が起き、最終的にアポトーシスが誘導されることが分かり、G4が新たながん治療の標的となる可能性が示唆されている<sup>3)</sup>。

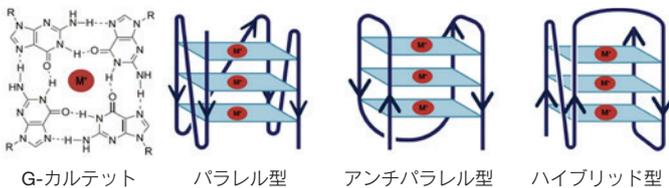


図1 グアニン4重鎖の特殊高次構造<sup>4)</sup>

また、新たにG4とストレス顆粒の関連についても塩田らから報告されている。ストレス顆粒は神経変性疾患の創薬ターゲットとして注目されている。そのストレス顆粒の形成時にG4が核となり、制御因子となることが分かった<sup>5)</sup>。

ストレス顆粒は、細胞の様々なストレスにตอบสนองして形成する膜のないオルガネラ (非膜オルガネラ) である。細胞が低酸素や異常な蛋白質の蓄積及びウイルスへの感染などのストレス状態になった際に、細胞質内のmRNAや蛋白質が、相分離現象<sup>\*</sup>により集合して生じる構造体である。ストレス顆粒の形成は、ストレス環境下で細胞損傷を防御するストレス適応機構であると考えられている。そのため、ストレス顆粒の形成異常や異常が、癌、神経変性疾患、ウイルス感染などの様々な疾患に関与することが報告されている。ストレス顆粒がこれら難治性疾患に対する新たな治療標的となる可能性が示されている。

塩田らはG4構造に特異的に結合するタンパク質としてDNAPT6を見出した。タンパク質ドメイン解析により、DNAPT6は2つの大きな天然変性領域 (IDR) を含むことがわかった。IDRを持つタンパク質は三次元構造を柔軟に変化させながら、複数の弱い非共有結合を介して相分離を引き起こす。DNAPT6は濃度が高くなると球状の液滴を形成し、さらに液滴同士が融合する現象を観測された。そのため、DNAPT6は液-液相分離を引き起こすタンパク質であることが分かった。

一方で、G4自体も高い自己集合性を有し、G4が核となるRNAで相分離現象を引き起こすことが知られている。興味深いことに、G4を持つRNAはDNAPT6の相分離現象を促進することが分かった。相分離によって形成された液滴が融合することでストレス顆粒の一部が形成された。さらには、神経細胞でのDNAPT6の発現量を抑えると、ストレス顆粒が形成されにくくなり、神経細胞の機能低下と細胞死が引き起こされた。DNAPT6は、ヒト骨格筋芽細胞においてリボソームRNAの合成や酸化ストレス下における翻訳調節に関与することが報告されており、神経細胞における機能は不明であったが、その役割の一端が明らかとなった。

本報告は、G4が神経細胞においてストレス顆粒の形成において重要な役割を果たし、神経変性疾患の発症と関連している可能性を示唆している<sup>5)</sup>。

G4の研究は現在、生命科学の魅力的な分野の1つとなっており、今回主に紹介した神経変性疾患やがんを含む様々な疾病への新しい治療法や予防策の開発ターゲットとして注目されている。

今後、G4の生物学的プロセスや疾患メカニズムへの影響の解明が更に進み、多くの疾患の原因究明に貢献することを期待する。

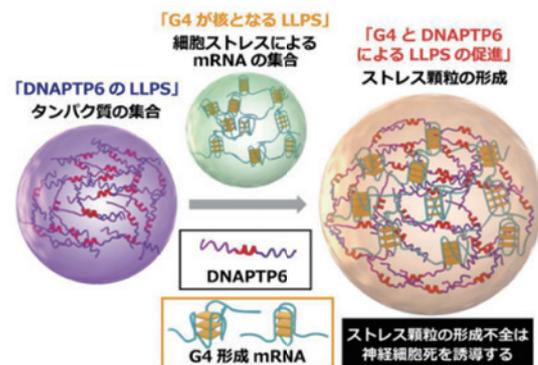


図2 タンパク質がストレス顆粒を形成するプロセス<sup>5)</sup>

<sup>\*</sup>相分離：液-液相分離 (liquid-liquid phase separation: LLPS) は細胞内でRNAやタンパク質などの高分子が局所的に集まり、水と油のように細胞質から分離して液滴を形成する現象。

### [参考文献]

- Balasubramanian S, Neidle S. "G-quadruplex nucleic acids as therapeutic targets." *Chem Biol.* **2009**, 345-53.
- がん化学療法センター, "グアニン4重鎖を標的としたがん創薬", [https://www.jfcr.or.jp/chemotherapy/department/molecular\\_biotherapy/research/002.html](https://www.jfcr.or.jp/chemotherapy/department/molecular_biotherapy/research/002.html) (閲覧日:2024年1月12日)
- Nakamura et al., "Targeting glioma stem cells in vivo by a G-quadruplex-stabilizing synthetic macrocyclic hexaoxazole" *Sci Rep*, **2017**, 3605.
- V. J. Sahayashela et al., "Mitochondria and G-quadruplex evolution: an intertwined relationship", *Cell Press, Trends Genet.*, **2022**, 39(1), 15-30.
- Sefan Asamitsu et al., "RNA G-quadruplex organizes stress granule assembly through DNAPT6 in neurons" *Science Advances*, **2023**, 9.

Fig. 1 was adapted from Reference 4).  
Copyright© 2022, V. J. Sahayashela et al. / CC BY 4.0.

Fig.2 was adapted from Reference 5).  
Copyright © 2023, S. Asamitsu et al. / CC BY-NC

開発中

液 - 液相分離 (LLPS) 関連製品

近年、生命現象を解き明かす新たな研究として、細胞内で生じる液-液相分離 (liquid - liquid phase separation: LLPS) が注目を浴びています。LLPS は細胞内でタンパク質や RNA などの高分子が局所的に集まり、水と油のように細胞質から分離して液滴を形成する現象です。LLPS の研究をはじめののに最適なキットや液滴形成の条件検討のキット、液滴の染色色素のスクリーニング用セットなど開発中の3つの製品を紹介します。  
 ※開発中の製品は内容や仕様の変更がある場合があります。

■キット相分離の作製や観察方法が分かる初めての方向けオールインワンセット

相分離液滴 作製・観察スターキット (仮)

<特長>

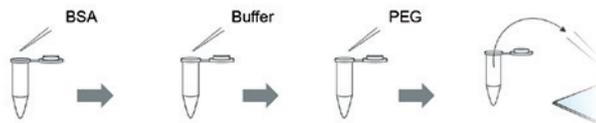
- ・ BSA タンパク質を用いて相分離液滴の作製ができるオールインワンキット
- ・ 1セットで4回の作製が可能
- ・ BSA の濃度は変更可能
- ・ 計算例や操作の詳細を記載した取扱説明書付き



<キット内容写真>

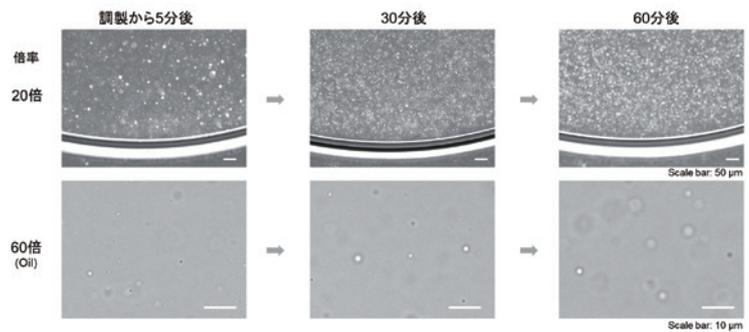
本開発品はドロプレットの作製・顕微鏡観察に必要な試薬や観察容器を同梱した、初めて相分離を観察される方向けのオールインワンキットです。BSA (ウシ血清アルブミン) を用いて、*in vitro* で相分離により形成したドロプレットの基本的な顕微鏡観察が可能です。

<操作方法の概略>



※開発品には操作詳細を掲載した取扱説明書を添付の予定です

<本開発品を用いた時間経過による相分離液滴の観察例>



■液滴形成の最適条件スクリーニングセット

相分離液滴 作製条件検討キット (仮)

<特長>

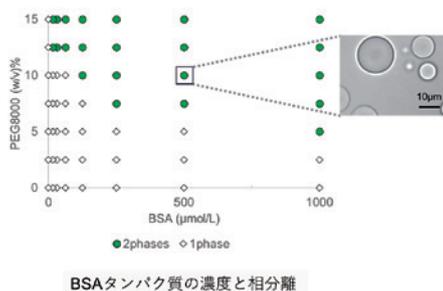
- ・ 相分離液滴の作製条件の検討を実施するために必要な試薬のセット
- ・ pH の異なる緩衝液を混合することで必要な pH 緩衝液の調整が可能
- ・ 計算シートや緩衝液の pH 調整方法を記載した取扱説明書付き



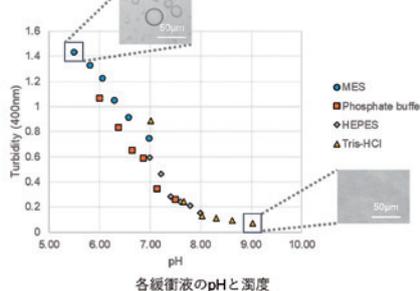
<キット内容写真>

本開発品はお手持ちのタンパク質の最適な相分離液滴の作製条件を検討するためのキットです。必要なクラウディング剤、緩衝液、塩が同梱されています。4種類の緩衝液を同梱し、pH の異なる2液を指定の比率で混合することで種々の pH の緩衝液を調整することが可能です。なお、標準タンパク質などは同梱されておりませんのでご注意ください。

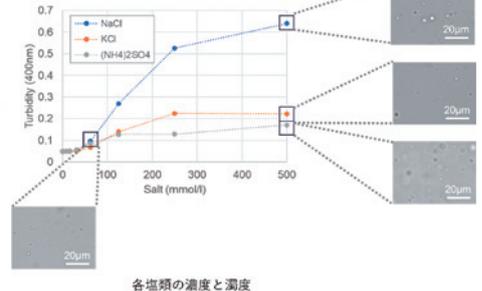
< BSA タンパク質の液滴形成濃度検討例 >



< 緩衝剤および pH の条件検討例 >



< 塩類の条件検討例 >

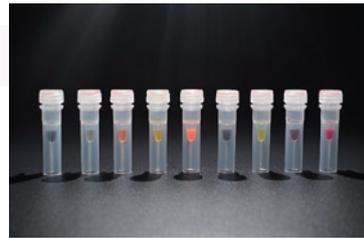


■液滴を染色又は液滴に集積する蛍光色素のセット

相分離液滴 染色・集積蛍光色素セット (仮)

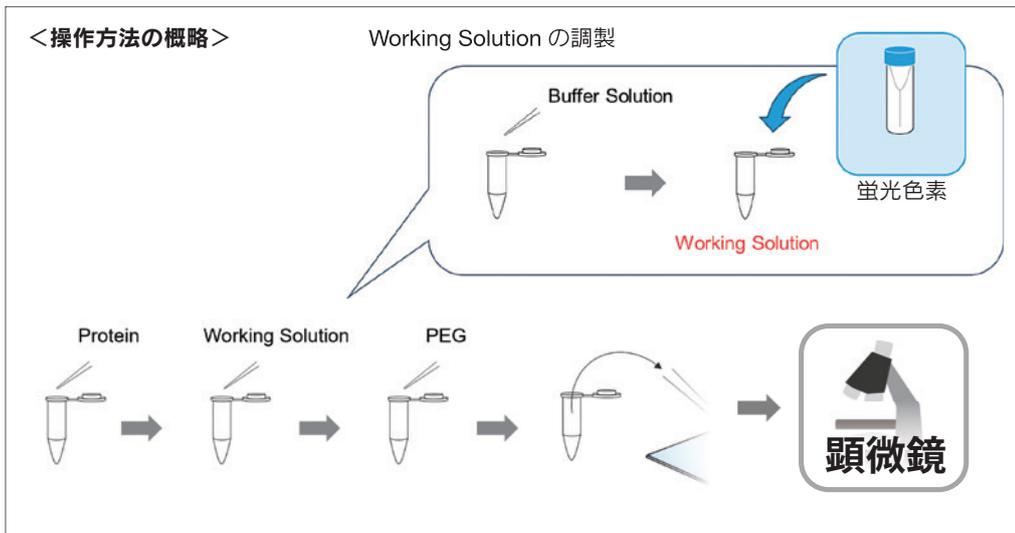
<特長>

- ・相分離液滴の染色に適した色素の選定が可能
- ・簡便な操作プロトコル
- ・9種の色素が同梱された豊富な色素ラインナップ



< 9種の色素をセット >

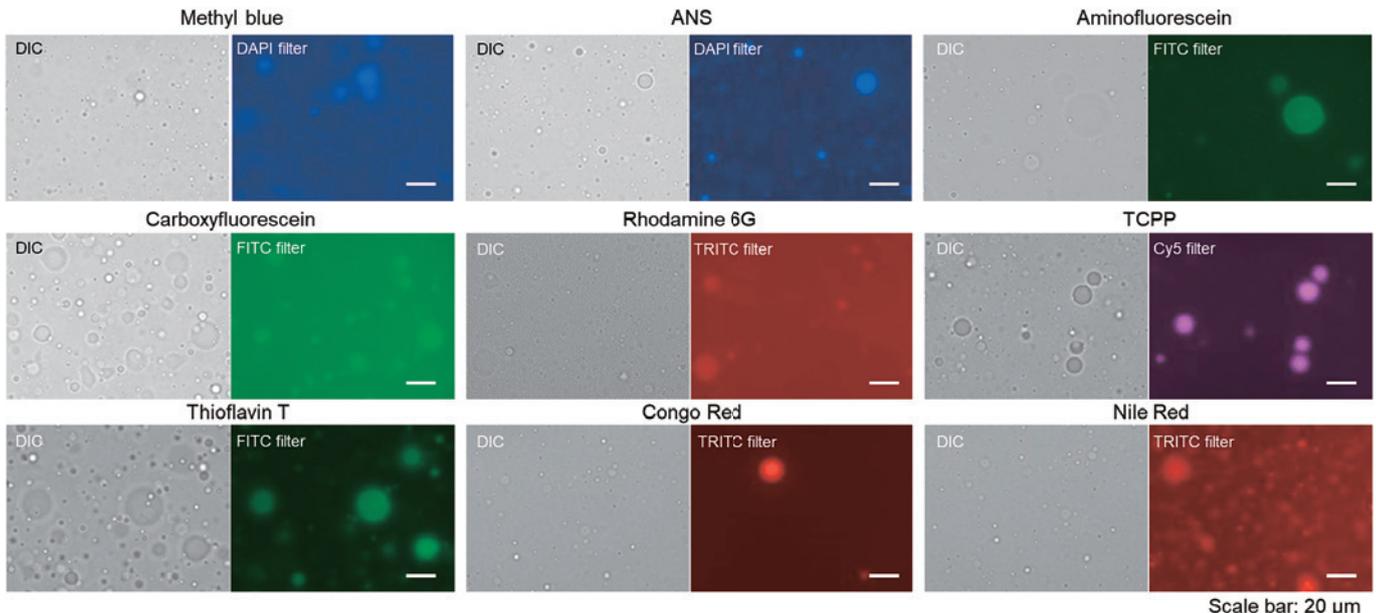
本キットは、相分離液滴を染色する代表的な蛍光色素 9 種類を同梱しています。相分離液滴の観察には、サンプルに応じた蛍光色素の選択が求められています。本キットには、標準タンパク質、クラウディング剤、緩衝液等は同梱されておりませんのでご注意ください。



キット同梱の蛍光色素

- 01 Methyl blue
- 02 ANS
- 03 Aminofluorescein
- 04 Carboxyfluorescein
- 05 Rhodamine 6G
- 06 TCPP
- 07 Thioflavin T
- 08 Congo Red
- 09 Nile Red

< BSA タンパク質の相分離液滴の染色検討例 >



その他の関連製品

非膜オルガネラである核小体の蛍光試薬を小社では取り扱っております。Nucleolus Bright 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 の産生のある核小体で特に強い蛍光を示します。

核小体 同仁 [検索](#)

## 生命科学の最前線

## ～熊本大学若手研究者の現場から～ ③

小社が立地する熊本県の生命科学研究最前線を、熊本大学の若手研究者が連載（8回）でお届けします。

## RNA 修飾病と修飾ヌクレオシド

RNA modopathy and modified nucleosides



永芳 友

熊本大学大学院  
生命科学研究部  
特任助教



富澤 一仁

熊本大学大学院  
生命科学研究部  
教授

## Abstract

More than 100 chemical modifications of RNA have been reported in bacteria, archaea, and eukaryotes. RNA modifications are involved in various biological functions, especially protein synthesis. Moreover, the deficits of these modifications cause various diseases, such as type 2 diabetes, mitochondrial myopathy, and intellectual disability. We also focus on the metabolites of modified RNA. The modified nucleosides have many physiological functions and potential for biomarker of diseases. In this topic, we introduce about (1) the relationships between FTSJ1, a human tRNA 2'-O-methyltransferase and X-linked intellectual disability (XLID) and (2) the efficacy of modified nucleosides as a potential biomarker for COVID-19.

## 1. はじめに

2023年、ノーベル生理学・医学賞の栄誉に輝いたのはカタリン・カリコ博士とドリュー・ワイスマン博士であった。両氏の受賞理由は新型コロナウイルス感染症に対する効果的な mRNA ワクチンの開発を可能にしたヌクレオシド塩基修飾に関する発見である。2019年より世界的大流行を来した COVID-19 の原因ウイルスである SARS-CoV-2 に対して、本知見による迅速な mRNA ワクチン開発により世界中がその恩恵に預かった。このワクチン開発の中心的な役割を果たしたのが、RNA の化学修飾である。mRNA ワクチンの内部にはウリジンの修飾塩基である  $N^1$ -メチルシュードウリジン ( $m^1\Psi$ ) が挿入されることで、宿主の外部 RNA に対する免疫活性が抑制され、ワクチンとしての役割を果たした (図1)。現在、RNA の化学修飾は、全生物において 100 種類以上報告されている。

我々はこれまでに、RNA の化学修飾がタンパク質合成を中心としたさまざまな生命現象と密接に関係していることに加え、修飾酵素欠損による疾患発症メカニズムを明らかにしてきた。また現在は、これら修飾を受けた RNA が最終的に単一ヌクレオシドまで分解され、修飾ヌクレオシドは積極的に細胞外へ分泌される現象に注目している。今回は、RNA 修飾の重要性とその代謝物である修飾ヌクレオシドに関する知見を紹介する。

## 2. RNA 修飾の重要性と RNA 修飾病

ヌクレオシドとは前述にもある RNA の構成要素であるアデノシン・グアノシン・シチジン・ウリジンを指す。RNA は DNA より転写されるため、DNA と同様 4 つの塩基の羅列であると考えられていた。1957年に、RNA の加水分解産物から 5 つ目の塩基としてウ

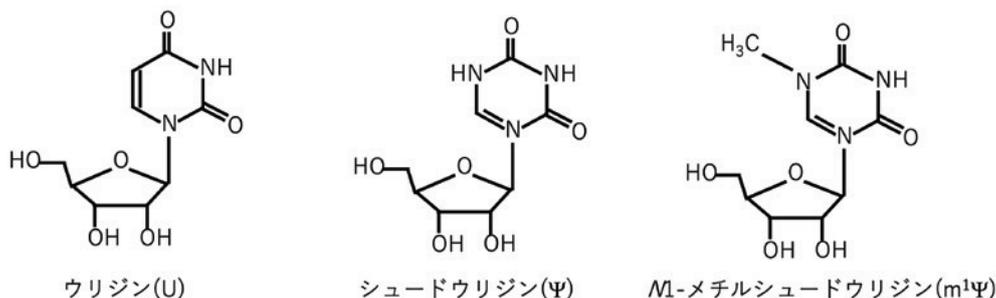


図1 mRNA ワクチンに使用された RNA 修飾の一例

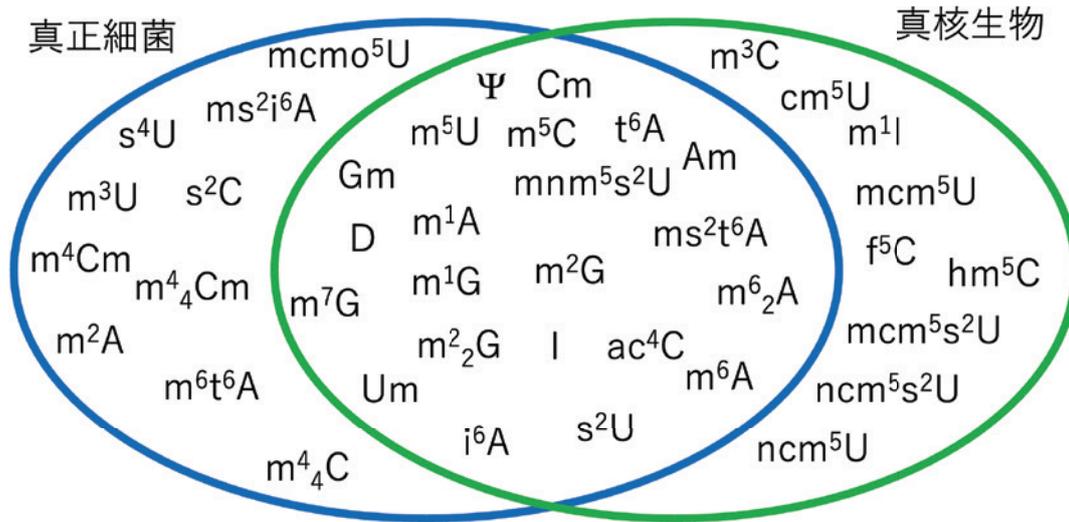


図2 多彩な RNA 修飾

リジンの化学修飾塩基であるシュードウリジンが発見されたことで RNA 修飾、またはエピトランスクリプトームと呼ばれる研究領域が産声をあげた<sup>1)</sup>。これら RNA 修飾は、質量分析器の測定技術向上に伴い、現在約 150 種類にも及ぶことが明らかとなった(図 2)<sup>2)</sup>。現在も新たな RNA 修飾様式が報告され続けている。

特に RNA 修飾が高度に付与されるのは、アミノ酸を運搬することが主たる役割である転移 RNA (tRNA) である<sup>3)</sup>。tRNA における化学修飾は tRNA の構造維持やタンパク質合成の効率に寄与する。特に我々が最近報告した知見として、tRNA メチル化酵素である FTSJ1 について解説する<sup>4)</sup>。FTSJ1 は、FtsJ と呼ばれる大腸菌 rRNA メチル化酵素のヒトにおけるホモログである。この遺伝子は進化の過程で保存されており、酵母のホモログは Trm7 で、tRNA のメチル化酵素である。また FTSJ1 遺伝子は、ヒトにおいて X 染色体上に存在し、機能喪失型変異により X 染色体連鎖性精神遅滞 (XLID) が発症することが報告されていたが、その発症メカニズムは未解明のままであった。我々は Ftsj1 欠損マウスを作成し、FTSJ1 によるメチル化を受ける tRNA を明らかにした。また FTSJ1 による修飾部位が tRNA の 32 位と 34 位とアンチコドンおよびその周辺部位であったため、Ftsj1 欠損に伴う修飾欠損はコドン特異的な翻訳効率変化を引き起こすと考えた。我々は本仮説を実証するためリボソームプロファイリング法を用い、Ftsj1 欠損マウスの脳内でのコドン特異的な翻訳効率評価を行った。その結果、Ftsj1 欠損マウスの脳内では、FTSJ1 が修飾を付与するフェニルアラニン tRNA で有意に翻訳効率が低下していた。また tRNA の化学修飾は tRNA を分解から保護することが知られている。Ftsj1 欠損マウスの脳内においてフェニルアラニン tRNA が積極的に断片化されていた。これらの結果から Ftsj1 の欠損により、フェニルアラニン tRNA の分解に起因する mRNA のフェニルアラニンコドンにおけるリボソームの停滞を介して、コドン特異的に翻訳効率を低下させていることを明らかにした。加えて、脳で翻訳効率の低下していた遺伝子に関して Gene Ontology 解析を行ったところ神経伝達や神経分化に関連する遺伝子が多く検出された。

また Ftsj1 欠損マウスの神経組織の形態学的評価を行った。古典的な神経細胞染色法であるゴルジ染色を行うと、樹状突起スパインに thin 型の未熟なスパインが増加していた。電子顕微鏡写真でも同様にシナプス後肥厚 (PSD) の有意な狭小化が観察された。これらの結果から、前述の翻訳効率低下に伴い、Ftsj1 欠損マウスに形態学的異常が引き起こされていることが推察された。加えて Ftsj1 欠損マウスの脳スライスを用いて、電気生理学的評価を行った。具体的には長期増強および長期抑圧という、学習機能と関連する反応に関して評価を行ったところ、Ftsj1 欠損マウスにおいて長期増強お

よび長期抑圧共に有意に低下していた。この結果から Ftsj1 欠損に伴う神経伝達機能異常が明らかになった。最後に、Ftsj1 欠損マウスを用いてバーンズ迷路試験および恐怖条件付け記憶を実施したところ、有意に学習機能が障害されていることが明らかになった。

以上より、我々は RNA 修飾が欠損することでコドン特異的にタンパク質合成障害が惹起され、その結果形態学的および電気生理学的異常を伴いながら学習障害という表現型に繋がっていることを明らかにした (図 3)。我々は、これまでも RNA 修飾欠損に伴うアジア人型 2 型糖尿病やミトコンドリア脳筋症の発症機構を解き明かし<sup>5,6)</sup>、これら RNA 修飾欠損に伴う疾患を RNA 修飾病 (RNA modopathy) と呼称した。今後も新たな疾患メカニズム解明を探究していきたい<sup>7)</sup>。

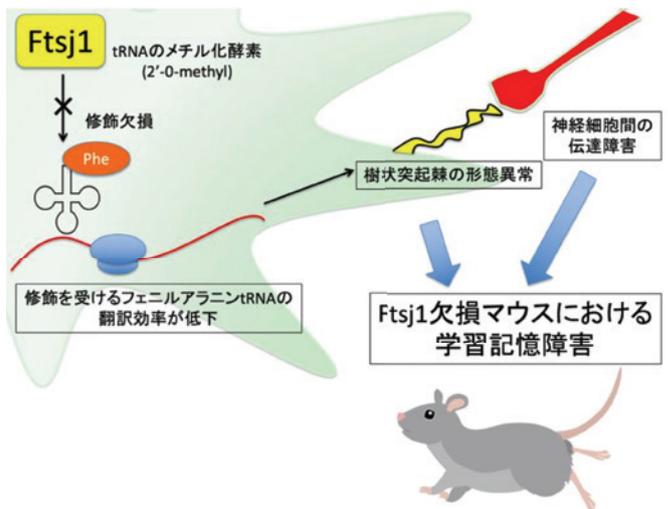


図3 Ftsj1 欠損による学習記憶障害メカニズム

### 3. 修飾ヌクレオシド排泄現象

これまでに世界中のグループが 100 種類を超える RNA 修飾および修飾酵素を報告し、研究を行ってきた。その過程で RNA に対する脱修飾酵素はほとんど報告がなかった。我々は一度修飾を受けた RNA の転帰に着目した。その結果、RNA は細胞内で一定期間経過すると単一ヌクレオシドまで分解され、無修飾ヌクレオシドは細胞内で再利用されるが修飾を担うヌクレオシドは積極的に細胞外へ排泄されることを明らかにした。特に哺乳動物においては平衡型ヌクレオシドトランスポーター (ENTs) を介して排泄されていた<sup>8)</sup>。

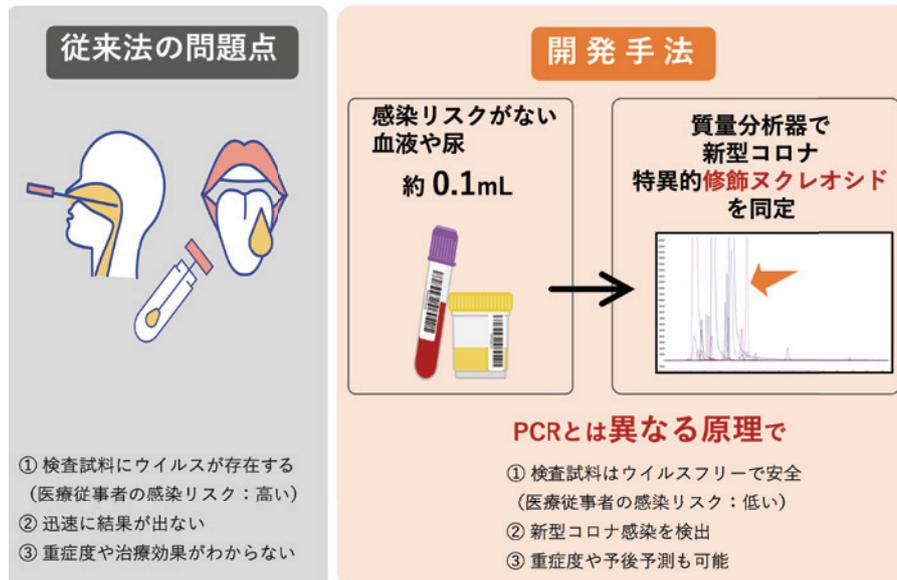


図4 修飾ヌクレオシド測定による COVID-19 検査システム

ENTはこれまでに1-4までサブタイプが報告されており、ENT1および2が修飾ヌクレオシド排泄に積極的に関与していた。また修飾ヌクレオシドは単なる分解産物ではなく、 $N^6$ -メチルアデノシン ( $m^6A$ ) は細胞外に排泄された後アデノシン受容体の真のリガンドとして機能することが明らかとなった<sup>9)</sup>。また培養細胞への $N^6$ -イソペンテニルアデノシン ( $i^6A$ ) の添加は細胞内RNAへの $i^6A$ 取り込みを引き起こし、抗腫瘍効果を発揮するなど、今後も修飾ヌクレオシドによるさまざまな生理活性の発見が期待される<sup>10,11)</sup>。またこれら修飾ヌクレオシドは細胞外へ排泄された後、哺乳動物では尿中へ多く排泄されていることを明らかにした。この点からもバイオマーカーとしての有用性が考えられる。次章でバイオマーカーとしての有用性に関する知見に関して解説する。

#### 4. 疾患バイオマーカーとしての修飾ヌクレオシド

修飾ヌクレオシドは積極的に細胞外へ排泄され、最終的に尿中に多く排泄される<sup>9)</sup>。この点に加え我々はRNA修飾の多種多様性に着目した。RNA修飾は種特異的なもの、多くの種で共有されているものが存在する。またHIVなどのウイルスでは宿主のRNA修飾酵素をハイジャックし、免疫逃避に関与していることが知られている<sup>12)</sup>。そこで、感染症に罹患すると、その病原に応じて修飾ヌクレオシド排泄が変化すると考えた。我々は2019年より世界中で流行を来したCOVID-19に着目し、バイオマーカーとなり得る修飾ヌクレオシドを同定したので、その知見に関して解説する<sup>13)</sup>。COVID-19はRNAウイルスの1種であるSARS-CoV-2による呼吸器感染症である。SARS-CoV-2内部のgenome RNAをナノポアシーケンスで解析したグループより、genome RNAに未知の化学修飾領域の存在が報告されていた。そのため、COVID-19患者では血中や尿中の修飾ヌクレオシド排泄状態が変化するのではないか?と仮説を立てた。まず我々は、バイオマーカーとなり得る候補物質を抽出するため、SARS-CoV-2をACE2過剰発現HEK293細胞に感染させ、抽出RNAを分解し修飾ヌクレオシドを網羅的に解析した。その結果、6種類の候補物質を明らかにした。その後、COVID-19感染患者の血清および尿中の修飾ヌクレオシドを解析したところ2種類の修飾ヌクレオシドが有意に上昇していた。また血清および尿中のこれら修飾ヌクレオシドは、重症度に応じて量が増え、症状改善に伴い低下した。また感染拡大に伴い、複数の変異株( $\alpha, \beta, \delta$ )が出現したが、いずれの変異株の感染者でも同様に有意な上昇を認めた。血液や尿はSARS-CoV-2のウイルス粒子が検出されず感染リスクも低いことから、唾液や咽頭ぬぐい液と比較して

安全に測定が可能である(図4)。今回の治験を基軸として今後は他の感染性疾患での修飾ヌクレオシド変化にも着目していきたい。

#### 5. まとめ

今回は、前半でRNA修飾の重要性からRNA修飾病について概説し、後半で修飾RNAの分解産物である修飾ヌクレオシドのバイオマーカーとしての有用性について紹介した。前半のRNA修飾病に関しては、まだ発症メカニズムまで解明されていない疾患も数多くあり、新たな診断法から治療法への展開が期待される。また後半の修飾ヌクレオシドに関しても感染症のみならず他の疾患での排泄変化や生理学的意義が明らかでないものが多数を占める。これらRNA修飾領域の研究展開に必須な事項として、これらRNA修飾および修飾ヌクレオシドをどのように評価していくか?という点である。これまでは質量分析機器によるRNA修飾の評価が主流であったが、ナノポアシーケンス法による配列と化学修飾の同時評価法の開発が日進月歩で進められている。各測定法の利点を把握した上で、より詳細な生命現象の解明に今後も尽力したい。

#### [参考文献]

- Cohn WE, Volkin E, "Nucleoside-5'-Phosphates from Ribonucleic Acid", *Nature*, **1951**, 167(4247), 483-84. doi: 10.1038/167483a0
- Boccalletto P, Stefaniak F, Ray A *et al.*, "MODOMICS: a database of RNA modification pathways, 2021 update", *Nucleic Acids Res*, **2022**, 50(D1), D231-D35. doi: 10.1093/nar/gkab1083
- de Crecy-Lagard V, Boccalletto P, Mangleburg CG *et al.*, "Matching tRNA modifications in humans to their known and predicted enzymes", *Nucleic Acids Res*, **2019**, 47(5), 2143-59. doi: 10.1093/nar/gkz011
- Nagayoshi Y, Chujo T, Hirata S *et al.*, "Loss of Ftsj1 perturbs codon-specific translation efficiency in the brain and is associated with X-linked intellectual disability", *Sci Adv*, **2021**, 7(13). doi: 10.1126/sciadv.abf3072 [published Online First: 20210326]
- Wei FY, Suzuki T, Watanabe S *et al.*, "Deficit of tRNA<sup>lys</sup> modification by Cdkal1 causes the development of type 2 diabetes in mice", *J Clin Invest*, **2011**, 121(9), 3598-608. doi: 10.1172/JCI58056 [published Online First: 20110815]
- Wei FY, Zhou B, Suzuki T *et al.*, "Cdk5rap1-mediated 2-methylthio modification of mitochondrial tRNAs governs protein translation and contributes to myopathy in mice and humans", *Cell Metab*, **2015**, 21(3),

- 428-42. doi: 10.1016/j.cmet.2015.01.019
- 7) Chujo T, Tomizawa K. "Human transfer RNA modopathies: diseases caused by aberrations in transfer RNA modifications", *FEBS J*, **2021**, 288 (24), 7096-122. doi: 10.1111/febs.15736 [published Online First: 20210216]
- 8) Shi SL, Fukuda H, Chujo T *et al.*, "Export of RNA-derived modified nucleosides by equilibrative nucleoside transporters defines the magnitude of autophagy response and Zika virus replication", *RNA Biol*, **2021**, 18 (sup1), 478-95. doi: 10.1080/15476286.2021.1960689 [published Online First: 20210812]
- 9) Ogawa A, Nagiri C, Shihoya W *et al.*, "*N*<sup>5</sup>-methyladenosine (*m*<sup>5</sup>A) is an endogenous A3 adenosine receptor ligand", *Mol Cell*, **2021**, 81 (4), 659-74 e7. doi: 10.1016/j.molcel.2020.12.038 [published Online First: 20210119]
- 10) Yamamoto T, Fujimura A, Wei FY *et al.*, "2-Methylthio Conversion of N6-Isopentenyladenosine in Mitochondrial tRNAs by CDK5RAP1 Promotes the Maintenance of Glioma-Initiating Cells", *iScience*, **2019**, 21, 42-56. doi: 10.1016/j.isci.2019.10.012 [published Online First: 20191008]
- 11) Yakita M, Chujo T, Wei FY *et al.*, "Extracellular *N*<sup>6</sup>-isopentenyladenosine (*i*<sup>6</sup>A) addition induces cotranscriptional *i*<sup>6</sup>A incorporation into ribosomal RNAs", *RNA*, **2022**, 28 (7), 1013-27. doi: 10.1261/rna.079176.122 [published Online First: 20220412]
- 12) Ringgaard M, Marchand V, Decroly E *et al.*, "FTSJ3 is an RNA 2'-O-methyltransferase recruited by HIV to avoid innate immune sensing", *Nature*, **2019**, 565 (7740), 500-04. doi: 10.1038/s41586-018-0841-4 [published Online First: 20190109]
- 13) Nagayoshi Y, Nishiguchi K, Yamamura R *et al.*, "*t*<sup>6</sup>A and *m*<sup>s</sup>*t*<sup>6</sup>A Modified Nucleosides in Serum and Urine as Strong Candidate Biomarkers of COVID-19 Infection and Severity", *Biomolecules*, **2022**, 12 (9). doi: 10.3390/biom12091233 [published Online First: 20220903]

[著者プロフィール]

氏名：永芳 友 (Yu Nagayoshi)  
 所属：熊本大学大学院生命科学研究部 加齢医学寄附講座  
 〒 860-8556 熊本県熊本市中央区本荘 1-1-1  
 Tel : 096-373-5164  
 FAX : 096-366-8458  
 E-mail : ynagayoshi@kumamoto-u.ac.jp

出身学校：熊本大学  
 学 位：博士 (医学)  
 専門分野：RNA 生物学、腎臓内科学  
 現在の研究テーマ：RNA 修飾病、修飾ヌクレオシドと疾患

氏名：富澤 一仁 (Kazuhiro Tomizawa)  
 所属：熊本大学大学院生命科学研究部 分子生理学講座  
 〒 860-8556 熊本県熊本市中央区本荘 1-1-1  
 Tel : 096-373-5051  
 FAX : 096-373-5052  
 E-mail : tomikt@kumamoto-u.ac.jp

出身学校：岡山大学  
 学 位：博士 (医学)  
 専門分野：分子生理学  
 現在の研究テーマ：RNA 修飾病、修飾ヌクレオシドと疾患

## キットフィルター変更のご案内

「エクソソーム精製キット」のフィルターを変更致します。フィルターの性能に変化はありません。変更の移行期間中はお客様のお手元に従来のフィルターと変更後のフィルターが混在する可能性があります。フィルターの取扱い方法が異なりますので、小社 HP にて変更内容を確認いただき、ご利用いただきますようよろしくお願いいたします。フィルターは2024年2月小社製造分より変更となります。

〈該当する製品〉

品名	メーカーコード
Exo/solator Exosome Isolation Kit	EX10
Exo/solator Isolation Filter	EX11

〈外装での見分け方〉

「NEW FILTER」シールが貼付されている場合は、変更後のフィルターです。



〈フィルターでの見分け方〉

フィルター袋に「How to set the filter」のシールが貼付けてある場合は、変更後のフィルターになります。



〈変更内容や使用方法の詳細〉

詳細な変更内容と使用方法については下記よりご参照下さい。(動画あり)

<https://www.dojindo.co.jp/products/EX10/>  
<https://www.dojindo.co.jp/products/EX11/>

新製品

オートファジー経路測定キット

Autophagic Flux Assay Kit

<特長>

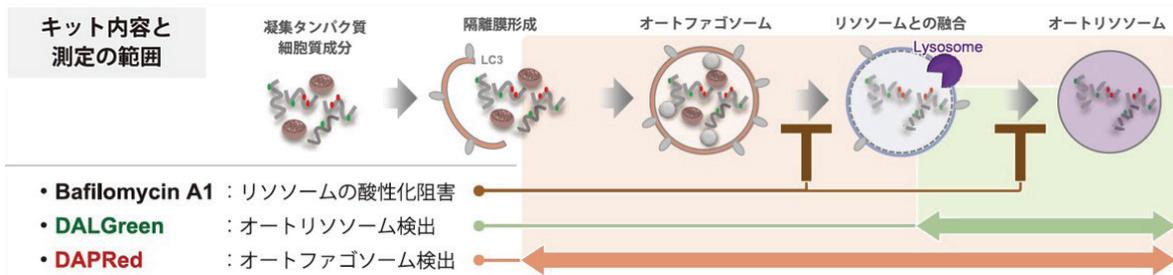
- ・オートファジーの誘導もしくはオートリソソームの阻害を解析できる
- ・誘導評価、阻害評価それぞれのプロトコルを準備
- ・リソソーム酸性化阻害剤同梱のオールインワンキット

細胞内の不要なタンパク質や細胞小器官を再利用または代謝するための分解過程であるオートファジーは、パーキンソン病などの神経変性疾患、老化に関与していることが分かってきており盛んに研究されています。近年では、オートファジーを詳細に解析するため、オートファゴソームが増えた要因がオートファジー誘導によるものなのか、またはオートリソソーム阻害によるものなのかを区別する事が求められてきており、オートファジーによる一連の分解の流れ (Flux) を理解することが重要視されています。本キットには、オートファゴソームおよびオートリソソームを検出する DAPRed と、オートリソソームを検出する DALGreen、および、リソソーム酸性化阻害剤 Bafilomycin A1 (Baf. A1) が同梱されています。オートファジーの形成からオートリソソームの分解までをモニタリングし、オートファジーの活性を正しく評価できます。<sup>1)</sup>

1) H. Sakurai et al., iScience, 2023, 26, 107218.

<原理>

本キットに同梱される DAPRed はオートファゴソーム膜に取り込まれ蛍光を発します。一方、DALGreen は凝集タンパク質等が分解されるオートリソソーム段階で蛍光を発します。この様に DAPRed と DALGreen は、オートファゴソーム形成およびリソソームとの融合・内容物の分解の過程を試薬の添加だけでモニタリングすることができます。<sup>2,3)</sup>



- ・ Bafilomycin A1 : リソソームの酸性化阻害
- ・ DALGreen : オートリソソーム検出
- ・ DAPRed : オートファゴソーム検出

2) X. Chen et al., Am J Transl Res., 2020, 12(9):4902-4922.  
 3) C. Oh et al., J Neurosci., 2022, 42(14), 3011-3024.

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

<オートファジー経路を解析する>

本キットを用いて、リソソーム酸性化阻害剤 Bafilomycin A1 (Baf. A1) を用いたオートファジー経路の解析を行いました。HBSS で培養した HeLa 細胞において、DAPRed と DALGreen の蛍光が増大し飢餓培養によるオートファジーの誘導を確認しました。また、Baf. A1 添加に伴うオートリソソーム形成阻害によりオートファゴソームが蓄積し、DAPRed の蛍光は増加しましたが、DALGreen は蛍光の低下が観察されました。オートファゴソームを検出する DAPRed と、オートファゴソームおよびオートリソソームを検出する DALGreen を組み合わせ、オートファジー経路として測定できました。

	CTRL	Starvation	Starvation + Baf. A1	
DALGreen				【実験条件】 細胞：HeLa  【検出条件】 DALGreen (緑) : Ex = 488 nm Em = 490 – 550 nm  DAPRed (赤) : Ex = 561 nm Em = 600 – 700 nm  Scale bar: 50 μm
DAPRed				

<キットコンポーネント>

- ・ オートファゴソームおよびオートリソソーム検出試薬 DAPRed
- ・ オートリソソーム検出試薬 DALGreen
- ・ リソソーム酸性化阻害剤 Bafilomycin A1

図 2 リソソーム酸性化阻害剤 A1 (Baf. A1) を用いたオートファジー経路の解析

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Autophagic Flux Assay Kit	1 set	39,000	A562

連載

抗酸化キットを使う前のサンプル前処理法 〈第4回〉

株式会社同仁グローバル 山口 勝則

最終回は、既存の代表的な抗酸化能測定法の比較についてです。

5. 抗酸化能測定方法の比較

抗酸化能の評価には、様々な方法が用いられていますが、今のところ「公定法」と言われる測定方法はありません。しかしながら、一般的に多用される手法やそれを基にした各種キット類が市販されており、これらの特性について触れていきます。

抗酸化能の測定方法では、【A. 検出方法】、【B. 活性酸素、ラジカル物質等の発生方法】、【C. 試料の前処理方法】の3つの要素についてそれぞれの特性を考慮する必要があり、測定の目的によってこれらを適切な組み合わせで設定する必要があります。

【A. 検出方法】として、吸光度法、化学発光法、蛍光法、ESR法などがあります。吸光度法では DPPH 法、ABTS 法、DMDP 法、WST 法 (WST-1)、FRAP 法 (鉄-TPTZ)、銅イオン還元法 (銅-バソクプロイン) などがあり、化学発光法では MPEC 法、ルミノール法など、蛍光法では ADHP 法、フルオレセイン法などが知られています。これらのうち、DPPH 法は DPPH 自体が比較的安定な紫色のラジカル物質で、抗酸化能による退色を評価する方法で、選択性はありますが非常に簡便であるため、様々な分野での測定データが多く、比較検証しやすい利点があります。ABTS 法、DMDP 法では酸化物を用いて着色したラジカル物質を用いるので、DPPH 法と類似した手法になります。FRAP 法、銅イオン還元法では、無色の酸化体が抗酸化能により有色の還元体 (鉄(II) (A<sub>max</sub>=593 nm 付近)、銅(I) 化合物 (A<sub>max</sub>=450 nm 付近)) になることで評価します。WST 法は WST-1 とスーパーオキシド(O<sub>2</sub><sup>-</sup>) による呈色物 (450 nm) を追跡しますが、従来のテトラゾリウム法の欠点であった脂溶性の呈色成分を水溶性色素の WST-1 を用いて改善した方法です。

化学発光法、蛍光法ではプローブ物質が活性酸素等と反応して生じる (あるいは消失する) 化学発光や蛍光を、抗酸化能により抑制 (あるいは遅延) させることで評価します。各方法により、検出感度 (通常、吸光度法<蛍光法<化学発光法)、選択性 (酵素反応の関与、特定の活性酸素種との選択性など)、極性 (親水性~疎水性) に差があるため、試料の性質、測定目的により適切な方法を選択する必要があります。

【B. 活性酸素、ラジカル物質等の発生方法】として、一重項酸素(O<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) は EP 試薬 (Endoperoxide) の熱分解 (35°C)、スーパーオキシド(O<sub>2</sub><sup>-</sup>) は、キサンチンオキシダーゼなどにより発生させ、過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) は試薬をそのまま使用することができ、ヒドロキシラジカル(・OH) は過酸化水素に鉄(II)イオンなどを作用させるフェントン反応により発生させることができます。これらの方法で発生する活性酸素を限定することで、個別の活性酸素種に対する抗酸化能として評価することが可能です。また、ORAC 法は、米国農務省 (USDA) で開発された抗酸化能の評価方法で、ラジカル開始剤の AAPH を熱分解 (37°C) して生じる有機物のペルオキシラジカル (ROO・) により蛍光プローブ (フルオレセイン) の蛍光消失を抗酸化物質が遅延させることを利用して抗酸化能を評価するもので、より生体内の挙動に近い反応系を再現しています。ORAC 法は、前処理の違いで親水性物質を対象にした H-ORAC とカロテノイド類等の疎水性物質を対象にした L-ORAC があります。L-ORAC では高濃度の溶媒で抽出し、シクロデキストリンなどを用いて溶媒系で測定し、H-ORAC と L-ORAC の合計値を総 ORAC とします。

SOAC 法では、エンドペルオキシドの加熱により発生する一重項酸素による色素 (DPBF) の分解による吸光度の減衰により評価し、ORAC 法では測定できない疎水性のカロテノイド類等の抗酸化能の評価に用いられます。

【C. 前処理方法】については、目的成分の極性 (水溶性~脂溶性) の程度により水~有機溶剤による抽出操作を行います。有機溶剤はエタノール、メタノール、アセトン、クロロホルム等が用いられますが、操作過程での自己分解、不溶物の析出、酵素の失活、構成成分同士の相乗効果、拮抗作用、等の影響があるので、再現性の良いデータを得るには、これらの影響をより小さくする工夫 (低温での破碎・抽出操作等) が必要です。

同じ物質でも出展によって抗酸化能のデータが整合しないケースがよく見られますが、方法論や前処理の差を考慮すれば致し方ないところがあります。詰まるところ、目的に応じて、適切な手法を選択することが重要です。

最後に「失敗は成功の準備運動」です。最終回までお読みいただきありがとうございます。

【主な抗酸化能関連の測定方法の比較】

検出原理	測定方法	プローブ	測定原理	活性酸素、ラジカル物質等【発生剤、開始剤】	対象の抗酸化能	〇メリット ▲デメリット	市販キット
吸光度	DPPH法	なし	ラジカル色素成分(DPPH)の抗酸化物質による退色。(517 nm)	DPPH	抗酸化物質(やや疎水性)	〇操作が非常に簡便。 ▲抽出操作の影響が大きい。生体内の挙動に必ずしも反映しない。	●
	ABTS法	なし	ラジカル色素成分(ABTS+)の抗酸化物質による退色。(734 nm、退色後は420 nm)	ABTS+ 【ABTSを酸化剤で酸化】	抗酸化物質(やや疎水性)	〇操作が簡便。 ▲抽出操作の影響が大きい。生体内の挙動に必ずしも反映しない。	●
	DMPD法	なし	ラジカル色素成分(DMPD+)の抗酸化物質による退色。(553 nm)	DMPD+ 【DMPDを酸化剤で酸化】	抗酸化物質(親水性)	〇操作が簡便。 ▲疎水性成分があまり反映されず、生体内の挙動に必ずしも反映しない。	●
	FRAP法	TPTZ	抗酸化物質により、鉄IIIイオンを鉄IIイオンに還元し、呈色(593 nm)。	鉄III-TPTZ	抗酸化物質	〇操作が簡便。 ▲強キレート剤が妨害	●
	銅イオン還元法	バソクプロイン	抗酸化物質により、銅IIイオンを銅Iイオンに還元し、呈色(450 nm)。	銅II-バソクプロイン	抗酸化物質	〇操作が簡便。 ▲強キレート剤が妨害	●
	WST法	WST-1	WST-1とスーパーオキシド(O <sub>2</sub> <sup>-</sup> )による呈色物(450 nm)の生成を抗酸化能により抑制。	スーパーオキシド(O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) 【キサンチンオキシダーゼ】	SOD、抗酸化物質(親水性)	〇操作が簡便。 ▲疎水性成分があまり反映されない。	●
	UV法	なし	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> の抗酸化能による分解、吸光度(240 nm)減少。	過酸化水素(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	カタラーゼ	〇操作が簡便。 ▲着色、懸濁物が妨害。	●
	SOAC法	DPBF	一重項酸素がDPBFを分解することによる吸光度(413 nm)の減少を抗酸化能により抑制。	一重項酸素(・O <sub>2</sub> ) (EP試薬)	抗酸化物質(疎水性)	〇一重項酸素に対応した数少ない手法。 ▲有機溶剤による前処理操作があり、操作が煩雑。	—
化学発光	SOD(化学発光法)	MPEC	MPECとスーパーオキシド(O <sub>2</sub> <sup>-</sup> )の反応により生じる化学発光(430 nm)をSOD様活性により減衰。	スーパーオキシド(O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) 【キサンチンオキシダーゼ】	抗酸化物質(親水性)	〇検出感度が高く、試料の着色や懸濁物の影響が小さい。 ▲測定が氷系であり、疎水性成分は抽出されない。	●
	ルミノール法	ルミノール	ルミノールと活性酸素等の反応による発光(425 nm)の消失を抗酸化物質により遅延。	ペルオキシラジカル(ROO・) 【AAPH試薬】	抗酸化物質	〇検出感度が高く、試料の着色や懸濁物の影響が小さい。 ▲測定時間がかかる。	●
蛍光	HRP法(蛍光)	ADHP	ADHPと過酸化水素による蛍光物質(励起571 nm/蛍光585 nm)生成を抗酸化能により抑制。	過酸化水素(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	カタラーゼ等抗酸化物質	〇操作が簡便。 ▲蛍光用の装置、ウエルが必要。	●
	ORAC法	フルオレセイン	フルオレセイン(励起485 nm/蛍光535 nm)のラジカル物質等による蛍光消失を抗酸化能により遅延。	ペルオキシラジカル(ROO・) 【AAPH試薬】	抗酸化物質(親水性)	〇検出感度が高い。生体内での挙動に近い。 ▲蛍光用の装置、ウエルが必要。測定時間がかかる。	●
	ORAC法(-OH)	フルオレセイン	フルオレセイン(励起485 nm/蛍光535 nm)のラジカル物質等による蛍光消失を抗酸化能により遅延。	ヒドロキシラジカル(・OH) 【H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +Fe <sup>2+</sup> 等】	抗酸化物質(親水性)	〇検出感度が高い。生体内での挙動に近い。 ▲蛍光用の装置、ウエルが必要。測定時間がかかる。	●
ESR	スピントラップ剤(DMPO等)	スピンの反転により生じる電磁波の共鳴吸収現象で、物質中の不対電子を高感度に検出できる。	フリーラジカル	全般	〇フリーラジカル不対電子を測定できる唯一の方法。 ▲装置、スピントラップ剤が高価でコスト高。	—	

## 受託分析のご案内 – 同仁グローバル

### 皆様の研究・開発をサポートします。ご相談ください。

研究や開発において新たな分析や評価が必要な場合、技術の習得に加え、機器の手配や管理、妥当な前処理、測定条件の設定など、サンプル調製からデータ取得に至るまでに相応の期間を要します。  
 同仁グローバルは、受託分析における豊富な実績と知見で皆様の研究・開発をサポートいたします。  
 試験にあたっては、Teamsなどで面談を行い、目的と目標を確認し、前処理方法の提案から原理を含めた分析方法の説明、得られる結果の予測、得られた結果の説明を行います。

### ご依頼から分析結果の報告までの流れ



ホームページ「お問い合わせ」画面、お電話などでご質問、お問い合わせを承ります。当日中、もしくは20時間以内にご返事いたします。



お問い合わせの内容をもとに提案書を作成し、Teamsなどでオンライン面談を行い、提案書を補正します。補正した提案書をお渡しします。



提案書、見積書をご確認いただき、分析を進めるかどうかをご判断いただきます。提案書に従い、分析を行います。



結果のご説明をオンラインで実施し、ご質問などにお答えします。

### キャンペーン中の分析（2024年5月31日まで）



#### 抗酸化能測定

食品成分、抽出物、発酵物、合成化合物等の抗酸化能を DPPH 法、WST 法で測定します。抗酸化能は Trolox 換算値 (DPPH 法)、または IC50 値 (WST 法) で表示します。また抗酸化能の有無については、期間中、50% オフ価格 (¥2,500 / サンプル) で行います。詳細はお問い合わせください。

### 同仁グローバルが主に行っている分析（QRコードからアクセスください）



脂肪酸分析



酵素活性・  
阻害活性分析



バイオフィーム  
関連分析



細胞関連分析



糖分析



食品異物分析



Think Globally, Act Locally  
DOJIN GLOCAL

同仁グローバル

検索

www.dojin-glocal.com

〈お問合せ〉  
TeL 096-286-1311  
Fax 096-286-1312  
glocal@dojindo.co.jp

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  
**選択的オートファジー / アプタマー**