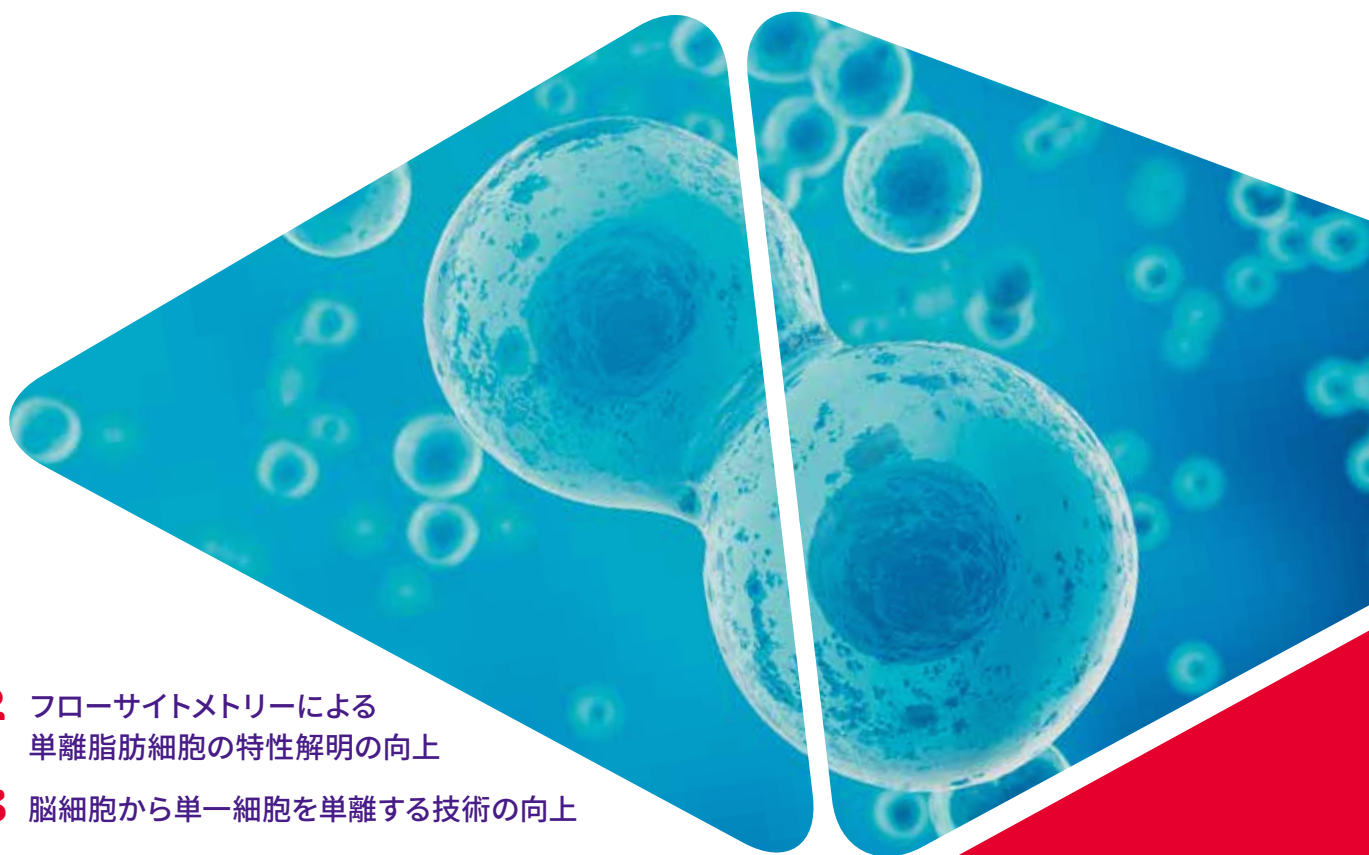


タンパク質および酵素 発展と応用



page 2 フローサイトメトリーによる
単離脂肪細胞の特性解明の向上

page 3 脳細胞から単一細胞を単離する技術の向上

page 4 単一細胞 DNase シーケンシングで
希少細胞集団の調節 DNA をマッピング

page 5 VHL-AURKA シグナリングの
特性解明によって生まれた、
がん腫治療の新しい標的

フローサイトメトリーによる 単離脂肪細胞の特性解明の向上

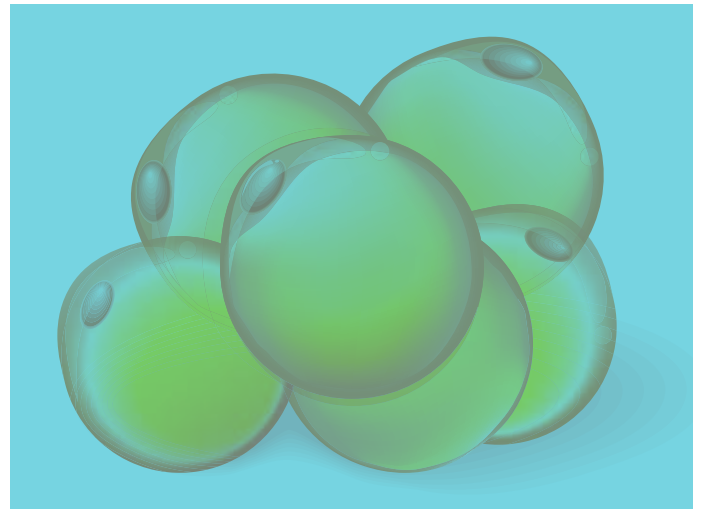
かつては単なる貯蔵容器と考えられていた脂肪細胞が、多彩かつ卓越した内分泌能力を持つことがわかりました。この発見によって、脂肪細胞の発生と機能に新たな関心が注がれることになりました。しかし、既存の方法では単離した脂肪細胞の研究は非常に困難だと考えられています。この問題について、*Cell Reports* 誌¹に掲載された記事に、生体から単離した脂肪細胞をフローサイトメトリーによってソート、解析する新しい方法について詳細がまとめられています。

従来の細胞を扱う場合、研究者は確立された手法であるフローサイトメトリーや蛍光活性化セルソーティング (FACS) に目を向けます。しかし、脂肪細胞は典型的な細胞よりもサイズが大きく脆いため、扱いが困難です。脂溶性色素を使えば脂肪細胞の FACS 検出が容易になりますが、脂溶性色素を取り込む細胞は脂肪細胞だけではありません。

カロリンスカ研究所の Carolina Hagberg らは、フローサイトメトリー／FACS を使った脂肪細胞のより良い研究方法を自ら開発するために遺伝子工学を取り入れることにしました。チームは、全ての脂肪細胞が蛍光標識 tdTomato タンパク質を発現する「AdTomato」マウスモデルを作成しました。tdTomato 発現脂肪細胞は色素や染色剤を加えなくても FACS で検出することができ、非特異的なシグナルを排除し、脂肪細胞集団だけの分析を可能にしてくれます。

tdTomato 発現脂肪細胞を用いて、脂肪細胞のフローサイトメトリーに必要な不可欠なステップを特定しました。より口径の大きなノズルを使ったり、シーズ圧を下げたり、より大きなイベントの検出力を高めたりするなど、その多くは機器の設定の変更を必要としました。Hagberg らは脂肪細胞の検出にチューブ内の攪拌が重要であることも見出しました。得られたデータから、従来のフローサイトメトリーの設定は多胞性脂肪細胞、成熟中の前脂肪細胞、脂肪滴、および細胞破片の検出には良いものの、無傷の成熟脂肪細胞の大部分を見落としてしまうことがわかりました。

脂肪細胞は白色脂肪細胞、褐色脂肪細胞、および「ブライト (ベージュ) 脂肪細胞」に種別され、褐色脂肪細胞およびブライト脂肪細胞には熱産生などのためにエネルギーを消費させる能力があります。この能力は、大多数の白色脂肪細胞に紛れた上記の細胞を単離する新しい方法を探索していた肥満研究者の注目を集めます。Hagberg のチームは脱共役タンパク質 (UCP1) 標的抗体を利用して開発した新手法を用いて褐色脂肪細胞とブライト脂肪細胞を定量し、仕分けました。これは素晴らしい功績です。なぜなら、研究



者達はこれまで、UCP1 陽性脂肪細胞を可視化するために遺伝子組み換えマウスを作成せざるを得なかったからです。

Hagberg らは、前述の手法が個々の脂肪細胞のハイスループット特性評価にも利用できることも証明しました。チームは、ヒト腹部皮下脂肪生検標本を採取し、*Clostridium histolyticum* 由来コラゲナーゼ I (Sigma-Aldrich カタログ番号 C0130) を使って成熟脂肪細胞を分離し、脂肪分解に関与することで知られている $\beta 2$ アドレナリン受容体 (ADRB2) を調べました。そして、代謝の健康レベルおよび血清中インスリン濃度によって発現レベルに違いがあることがわかりました。具体的には、健康な肥満者は不健康な肥満者よりも ADRB2 陽性細胞の割合が有意に高いことがわかりました。ADRB2 シグナル伝達は脂肪分解を仲介することから、この発見はインスリン抵抗性とエネルギー動員の間に分子的な繋がりのあることを示しています。

脂肪細胞研究者らが直面する技術的障壁を乗り越えることによって、Hagberg らは脂肪細胞の分子生物学および細胞生物学の解明の糸口を見出しました。脂肪細胞のプロファイリングが可能になったことは、健康・疾病時の肥満および代謝を制御する脂肪細胞関与のメカニズムの理解に大いに役立つでしょう。

(文献につきましては、裏表紙をご参照ください。)

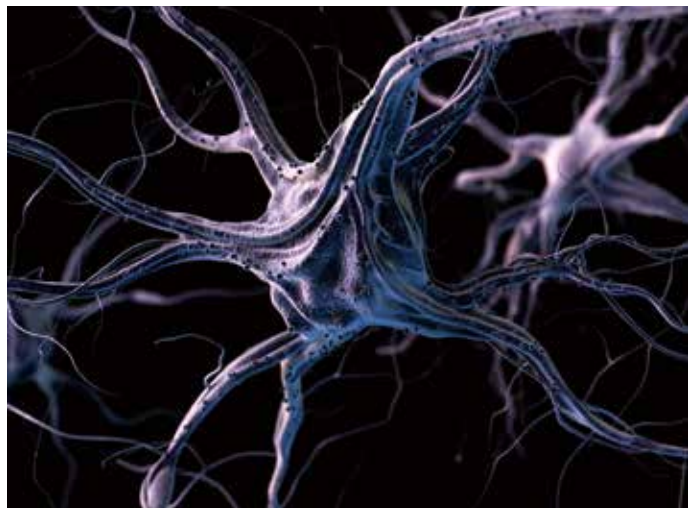
脳細胞から単一細胞を単離する技術の向上

脳腫瘍内での生理学、分子シグナル伝達、および免疫学の関係性を研究するためには生存可能な単一細胞が欠かせません。ワクチンや細胞ベースの治療選択肢を調べる研究にも不可欠です。生存可能な単一細胞の単離には、より大きな組織片からこうした細胞を分離する必要があります。研究者達は、収率を最大化しつつ生存能力へのダメージを抑えられる新しい分離技術の開発に日夜奮闘しています。こうした中、テルアビブ・スーラスキー・メディカルセンターの1チームが2016年に *BMC Neuroscience* 誌¹に *Clostridium histolyticum* 由来中性プロテアーゼ (NP) という、これまで脳組織で試験が行われたことのない酵素を用いた新しい方法を発表しました。

細胞を正しく分離することが実験の整合性をとる鍵です。組織検体から個々の細胞を分離する方法としては物理的な力、酵素による消化、あるいはその両者を併用する技術を使い、組織検体から個々の細胞を解放します。分離技術が非効率的であったり過剰であったりすると、細胞の構成材料が放出され、検体中の細胞を活性化させたり、変調させたり、殺したりすることでアーティファクトを発生させ、アッセイの精度に影響を与えます。筆頭著者の Ilan Volovitz と彼のチームは、ワクチンとして使用するため生存可能な膠芽腫の単一細胞が必要だったことから、細胞の収率と質を最大化できる最適な分離法を開発しました。

Volovitz らはまず、DNase-I (Sigma-Aldrichカタログ番号 AMP-D1)、IV 型コラゲナーゼ (M9070)、パパイン (P3125)、V 型ヒアルロニダーゼ (H6254)、およびディスパーゼ -II (D4693) という、汎用されている 5 種類の酵素をいろいろと組み合わせた既存の分離技術の評価しました。患者の脳腫瘍組織を断片化してハンクス平衡塩溶液に再懸濁し、細胞スラリーを調製しました。その後、この細胞スラリーに消化酵素混合液を添加し、2 種類の温度で培養時間を変えてインキュベートしました。分離後、細胞塊、細胞片、および細胞外 DNA の有無から細胞生存率および分離の質を検討しました。5 種類の酵素のうち、*Bacillus polymyxa* 由来中性プロテアーゼであるディスパーゼ -II を使った場合、生細胞の割合が最も高く、分離の質も最良でした。

残念ながら、Volovitz らは臨床グレードのディスパーゼ -II のサプライヤーを見つけることができませんでした。しかし、類似酵素である *Clostridium histolyticum* 由来 NP が臨床／非臨床グレードでサプライヤーより入手可能でした。脳腫瘍組織の分離にこれまで NP が使用されることがなかったため、チームは NP をディスパー



ゼ -II と比較しました。その結果、この新しい酵素は、神経膠腫、星状細胞腫、神経膠芽腫、転移性二次腫瘍など様々な脳腫瘍組織の分離において、生細胞の割合が高くなり、分離の質も優れていることがわかりました。収率および質は培養時間が 2 時間でも一晩でも同等であったため、NP を使った分離は過剰ではないという点が重要です。

臨床グレードの NP は容易に入手可能であり、海綿状脳症のリスクもないことから、NP による分離法は臨床への応用に理想的であろうと Volovitz らは考えています。NP は細胞培養培地中でも使用でき、輸送中に組織を分離して単一細胞にすることも可能なので、サンプルの一元処理が必要な多施設共同研究を促進することになります。

(文献につきましては、裏表紙をご参照ください。)

単一細胞 DNase シーケンシングで希少細胞集団の調節 DNA をマッピング

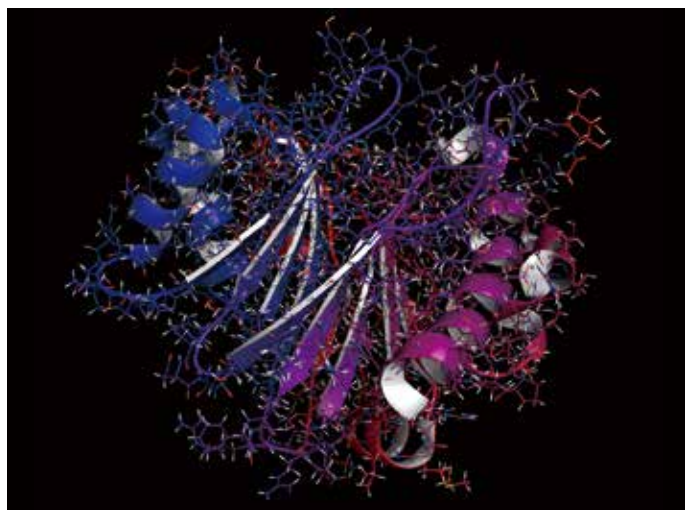
調節 DNA はクロマチンアクセシビリティを調節することによって、細胞種に特異的な遺伝子発現を調整します。研究者は、クロマチンアクセシビリティを測定することによって、調節 DNA 要素を同定することができます。しかし、その目的で汎用されている方法がバルクシーケンスを採用しているため、個々の細胞に特異的なデータが集積・集計中に失われる可能性があります。こうした制約があることから、アメリカ国立心臓血液研究所 (NHLBI) の Keji Zhao の研究チームは、個々の細胞を分析するための新しいシーケンシング技術の開発に邁進し、*Nature Protocols* 誌¹ にその成果を発表しました。

2008年に初めて開発された²、DNase シーケンシング (DNase-seq) は、DNA アクセシビリティのゲノムレベルでの同定に汎用されている方法で、DNase I 過敏性部位 (DHSs) での開裂をマッピングすることで DNA アクセシビリティを同定します。しかしながら、DNase シーケンシングには膨大な数の細胞が必要で、その有用性は細胞株や豊富な一次細胞に限られています。

DNase シーケンシングと同様、Zhao の新しい方法である scDNase-seq は DNase I (Sigma-Aldrich カタログ番号 4716728001) を使って細胞を融解・消化することから始まります。DNA が消失する可能性を減らすため、Zhao のチームは小型チューブを用いて管壁に付着する細胞を最小限に抑え、さらに DNase I 酵素活性を温存するためにボルテックスミキサーチューブを使わないようにしました。最も重要な点は、消化後のサンプルに細菌の環状キャリア DNA を導入し、処理中のサンプル内 DNA の消失を最小限に抑えたことです。その後の DNA 抽出・精製、ライブラリ調製は DNase-seq 法とほぼ同じです。

少ない細胞数で DNase-seq が行えるよう、Zhao らは核の単離およびアガロースゲルによる DNA 断片の分画を省略し、DNA を温存しました。また、DNase I の濃度と培養時間を最適化し、小さな DNA 断片を優先的に増幅するのに最も有効な PCR 条件を明らかにしました。

Zhao らは単一細胞 ATAC-seq 法などの他の方法と比べ、単一細胞ライブラリ作成用ゲノムにマッピングされたユニークで非冗長なリードの割合が少ないと述べています。また、scDNA-seq は他のシーケンシング法と比べてスループットが低いということも。現在のところ自動化はできず、新しい細胞種を使ったり開始細胞数を調整したりするたびに、滴定により DNase I 至適濃度を決める必要があります。



注意する点はあるものの、Zhao らは開始材料が少量でもゲノム全域での DHS 検出や細胞間 DHS 変異の検出を可能にする新しいシーケンシング技術を開発しました。scDNase-seq は様々な細胞種や組織、および新鮮細胞、ホルムアルデヒド架橋細胞、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織スライドから回収された細胞など多様な形で実践できます。scDNase-seq はすでに、発生過程の胚のみならず、胚性幹細胞および造血幹細胞の制御領域のマッピングに使用されています。この技術は、あらゆる一般分子生物学の研究室が利用できるため、幹細胞生物学およびがん生物学などの分野に幅広く応用されることを Zhao は願っています。

(文献につきましては、裏表紙をご参照ください。)

VHL-AURKA シグナリングの 特性解明によって生まれた、 がん腫治療の新しい標的

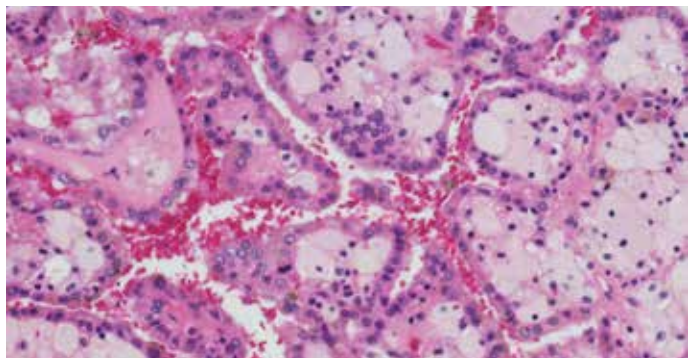
Von Hippel-Lindau (VHL) 遺伝子の変異は、VHL 疾患をもたらします。VHL 疾患は、将来的に腎細胞がん (RCC) を発症することが多い常染色体優性遺伝性がん症候群です。研究者たちは当初、VHL によってユビキチン化が起きると考えていました。ユビキチン化は VHL 仲介型腫瘍抑制の活性に必要で、酸素を必要とします。がん誘発性の低酸素症は確かに腫瘍抑制を阻害します。しかし、テキサス A & M ヘルスサイエンスセンターの研究グループが VHL は酸素非依存性のユビキチン化活性を有することを示し、がん介入法に新たな可能性があることを明らかにしました¹。

VHL が標的タンパク質の基質を認識するためには、酸素依存性プロリルヒドロキシラーゼ (PHD) 反応を介して基質がヒドロキシル化される必要があります。VHL の基質として低酸素誘導因子 (HIF) 1 α および 2 α がよく知られており、この 2 つは正常酸素状態で分解されることが特徴です。しかし、低酸素症は PHD ヒドロキシル化と VHL によるユビキチン化の両方を阻害し、HIF α の安定化と過剰発現を招き、ひいては血管新生、腫瘍増殖、転移を促進します。

Ruhee Dere と彼女のチームは、*Oncogene* 誌に掲載されたある重要な研究において、PHD 活性がない状態で VHL がオーロラ A キナーゼ (AURKA) を直接ユビキチン化できることを示しました。さらに、この相互作用が静止細胞における一次繊毛の形成を制御することを明らかにしました。

内因性 VHL 欠損細胞を使った検討で、遺伝子組み換え外因性 VHL (Sigma-Aldrich カタログ番号 23-044) を導入すると AURKA タンパク質濃度が低下することを Dere らは初めて見出しました。プロテアソーム阻害剤を添加するとこの傾向は逆転し、VHL が E3 リガーゼ能によって AURKA 濃度を調節していることが示されました。遺伝子組み換え VHL および AURKA (14-511) を用いた共免疫沈降実験およびユビキチン化アッセイの結果、VHL が直接 AURKA をユビキチン化するさらなる確証が得られました。

PHD が基質をヒドロキシル化すれば、VHL は基質をポリユビキチン化します。しかし、Dere らは静止細胞から抽出した内因性 AURKA がポリユビキチン化のみを検出する FK1 抗ユビキチン抗体に認識されないことに気づきました。しかし、モノユビキチン化とポリユビキチン化の両者を認識する P4D1 抗ユビキチン抗体は AURKA を検出しました。これは、VHL は AURKA をポリユビキチン化するのではなく、マルチモノユビキチン化することを示し、VHL による AURKA のユビキチン化は PHD の作用と無関係である可能性があるという初めての手がかりを得ました。続いて Dere らは、VHL が AURKA



を認識・ユビキチン化するのに AURKA のヒドロキシル化は不要であることを確認し、擬似低酸素症状態も PHD の阻害も AURKA の発現やユビキチン化に影響しないことを見出しました。

Dere らは次に、VHL 介在型 AURKA のユビキチン化および分解の目的が何かを明らかにする必要がありました。VHL がコンフルエントな細胞における AURKA の分解を促進することを鑑み、静止状態にした細胞における AURKA のユビキチン化について調べました。血清飢餓後にユビキチン化が増加し、この増加は VHL 存在比と正の相関性を示すとともに、プロテアソーム仲介型タンパク質分解を抑制することによって阻害されました。

次に、VHL 欠損細胞が不完全な繊毛形成を示すことに気づいた Dere らは、AURKA が何らかの関わりを持つのではないかという仮説を立てました。これは特に、低酸素症に無関係な機序により VHL が繊毛形成を促進していると研究者たちの間で考えられていたからです。VHL 発現をノックダウンすると対照細胞と比べて繊毛頻度が減少し繊毛の長さが短くなることを見出した Dere らは、AURKA 阻害によってこの 2 つの現象を救済できることも突き止めました。さらに、AURKA を活性化するヒストン脱アセチル化酵素 6 (HDAC6) も同じ効果を有していました。一次繊毛形成は有糸分裂および細胞増殖の構造的チェックポイントとして機能するので、これらの知見によって、腫瘍形成中のいくつかの早期事象を明らかにできるかもしれません。

Dere らは、静止細胞の繊毛形成を制御する低酸素非依存的 VHL-AURKA-HDAC6 シグナリング軸を明らかにしました。このシグナリング軸の立証により、RCC および結腸直腸がんなど各種がんの介入法を見出すチャンスが生まれます。

(文献につきましては、裏表紙をご参照ください。)

References

Article 1: Flow Cytometry Improves Isolated Adipocyte Characterization

1. C.E. Hagberg et al., "Flow cytometry of mouse and human adipocytes for the analysis of browning and cellular heterogeneity," *Cell Rep*, 24(10):2746-56.e5, 2018.

Article 2: An Improved Technique for Isolating Single Cells from Brain Tissue

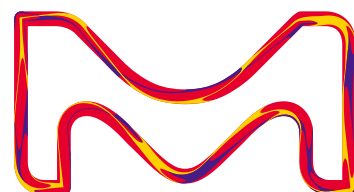
1. I. Volovitz et al., "A non-aggressive, highly efficient, enzymatic method for dissociation of human brain-tumors and brain-tissues to viable single-cells," *BMC Neurosci*, 17:30, 2016.

Article 3: Single-cell DNase Sequencing Maps Regulatory DNA in Rare Cell Populations

1. J. Cooper et al., "Genome-wide mapping of DNase I hypersensitive sites in rare cell populations using single-cell DNase sequencing," *Nat Protoc*, 12(11):2342-54, 2017.
2. A.P. Boyle et al., "High-resolution mapping and characterization of open chromatin across the genome," *Cell*, 132(2):311-22, 2008.

Article 4: A Newly Characterized VHL-AURKA Signaling Axis Offers Targets for Carcinoma

1. E. Hasanov et al., "Ubiquitination and regulation of AURKA identifies a hypoxia-independent E3 ligase activity of VHL," *Oncogene*, 36(24): 3450-63, 2017.



本紙記載の製品は試験・研究用です。ヒト、動物への治療、もしくは診断目的として使用しないようご注意ください。掲載価格は希望販売価格（税別）です。実際の価格は弊社製品取扱販売店へご確認ください。なお、品目、製品情報、価格等は予告なく変更される場合がございます。予めご了承ください。記載内容は2020年12月時点の情報です。Merck, the vibrant M, and Sigma-Aldrich are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources. ©2020 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved.

シグマ アルドリッチ ジャパン リサーチ事業部

〒153-8927 東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー 5F

製品の最新情報はこちら www.sigmaaldrich.com/japan

製品に関するお問い合わせは、テクニカルサービスへ

E-mail: jpts@merckgroup.com Tel: 03-6756-8245

在庫照会・ご注文に関するお問い合わせは、カスタマーサービスへ

E-mail: sialjpcs@merckgroup.com Tel: 03-6756-8275 Fax: 03-6756-8301

シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社はメルクのグループ会社です。

RBM211-2012-4K-H