

Anti-ACTIVE® Caspase-3 pAbを使ったアポトーシスの検出

By Terry Riss, Ph.D., Rich Moravec, B.S., and Martha O'Brien, Ph.D.
Promega Corporation



アポトーシス検出の*in situ*マーカーとしてお使いいただける Anti-ACTIVE® Caspase-3 pAbがプロメガからリリースされました。この抗体はアポトーシスを起こしている細胞に存在する活性化型caspase-3を認識し、*in situ*での簡単なアポトーシス検出法を提供します。本稿では新製品Anti-ACTIVE® Caspase-3 pAbを、アポトーシスを立証するために使われているその他の手法と比較しながらその特徴についてご紹介します。

はじめに

アポトーシスは、多数の異なる信号伝達経路を含む複雑なプロセスを経て起こり、死んでいく細胞において多段階の変化を引き起こします。アポトーシスの過程で起こる多くの事象は、カスパーゼと呼ばれるシステインプロテアーゼファミリーによって仲介されます(1)。カスパーゼは、膜貫通型レセプターにおける外部因子への応答から細胞内成分のプロテアーゼによる分解まで、アポトーシスの過程のいくつかの信号伝達の段階でその機能を発揮します。これらのタンパク質分解活性は、最終的に細胞の崩壊を引き起こし、これがカスパーゼがアポトーシスの主要な死刑執行人と呼ばれる由縁です。現在までにヒトで同定された1種類のカスパーゼ群では、caspase-3がアポトーシスを仲介する主要なカードとして認識され、もっとも広く研究されています。

カスパーゼは生細胞の細胞質で合成された後、不活性化状態の前駆体酵素としてそのほとんどが細胞質に存在します。カスパーゼの酵素前駆体の活性化は、アポトーシスのプロセスにおける初期イベントです。カスパーゼの活性化は、annexin Vの結合によって示される脂質二重層の外側部分のリーフレットにおけるフォスファチジルセリンの露出に先行します(annexin Vの結合はアポトーシスの初期マーカーとして歴史的に知られています) (2,3)。上流のアポトーシス初期信号伝達イベントに応じて、カスパーゼ前駆体は活性化酵素を生成するために酵素によるプロセッシング(切断)を受けます。caspase-3のp32前駆体は、はじめにアミノ末端のプロドメインを除くためにAsp²⁸のC末側での切断を受けます。さらに、Asp¹⁷⁵のC末端側の切断によりp17とp12断片が産出されます(4)。caspase-3のX線結晶構造解析では、2つの小サブユニットと2つの大サブユニットからなる4量体構造が示されました(5)。この4量体が活性化型酵素であると考えられています。プロセッシングされる部位を示している前駆体酵素の図を図1に示します。

前駆体カスパーゼの酵素による活性化の結果、構造的な変化と新しいエピトープの生成が起こります。これらの変化は、両方とも特異的な抗体によって選択的に検出できます。プロメガでは、アポトーシスの特異的なマーカーとして役立つ抗体を作製するためにカスパーゼのプロセッシング中に生じる新しいエピトープの出現を利用しました。

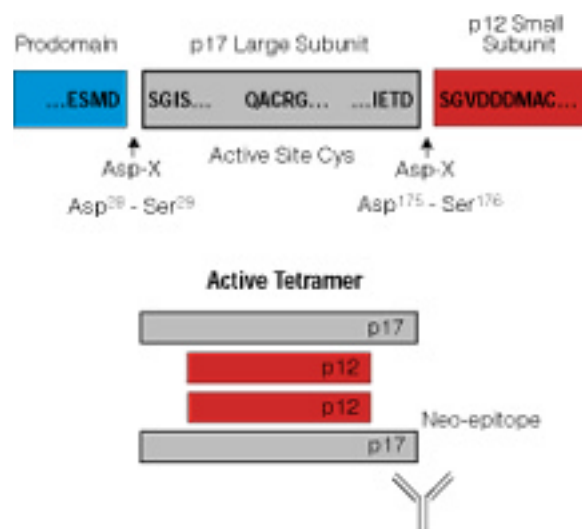


図1. caspase-3前駆体と切断部位

すべてのカスパーゼには活性部位に5アミノ酸からなるペプチド(QACXG)が含まれる。

Anti-ACTIVE® Caspase-3

Anti-ACTIVE® Caspase-3 pAb(カタログ番号 G7481) は、ヒト caspase-3のp17断片に由来するペプチドに対して作られたアフィニティ精製されたウサギポリクローナル抗体です。Anti-ACTIVE® Caspase-3 pAbは、アポトーシスを起こしている細胞で生じる活性化型のカスパーゼを検出するため、アポトーシスの*in situ*マーカーとして有用です。ヒト、マウス、ラット、ハムスターのタンパク質に共通するアミノ酸配列を抗原ペプチドとして抗体を産生したため、この抗体は幅広い種との交差性が予想されます。ウェスタンブロットの結果から、Anti-ACTIVE® Caspase-3 pAbによってリコンビナントcaspase-7の大サブユニットも検出される可能性が示されました。活性化型caspase-3よりも反応性はかなり低くなりますが、caspase-3とcaspase-7は同じカスパーゼスーパーファミリーであり、これらのアミノ酸配列は類似しているため、このような限定的な交差反応性があっても驚くに値しません。

図2の流れ図は、Anti-ACTIVE® Caspase-3 pAbを使った略式の染色プロトコールを示します。この一般的なプロトコールは、蛍光または光学顕微鏡のいずれでも使うことができます。詳細なプロトコールはプロメガのウェブサイト(www.promega.com)でご覧いただけます。抗体で一般的にいえることですが、抗体にはロット差があります。そのため、最良の結果を得るには1次抗体の濃度(希釈)を最適化することをお薦めします。

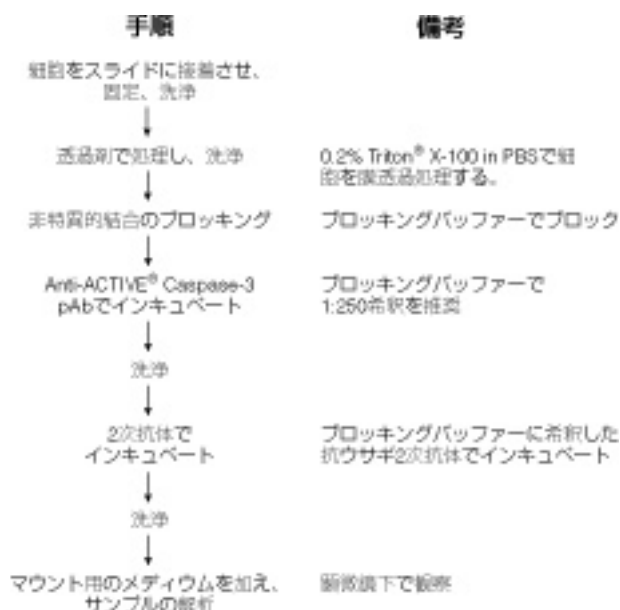


図2. Anti-ACTIVE® Caspase-3 pAbを使った一般的な免疫細胞染色による検出方法

図3は、Anti-ACTIVE® Caspase-3を用いて検出したアポトーシスを起こしたネズミの繊維芽細胞の特異的な免疫蛍光染色を示しています。アポトーシスを起こすように処理されたサンプルは、アポトーシスの形態学的な特徴を表す独特な細胞の染色パターンを示しています(パネルB)。コントロールの細胞では低いバックグラウンドの染色を示しています(パネルA)。アポトーシスを起こしたヒト神経芽腫のAnti-ACTIVE® Caspase-3 pAbによる染色像を図4に示します。この図においてもアポトーシスを起こしている細胞の強い染色が見られる(パネルB) 一方、未処理の細胞(パネルA)や活性型カスパーゼに結合するカスパーゼ阻害剤 Z-VAD-FMK で処理した細胞(パネルC)では、Anti-ACTIVE® Caspase-3 pAbによる染色はほとんど見られませんでした。

その他のアポトーシス検出方法

類似した新しい(ネオ)エピトープを利用する方法は、基質のカスパーゼによる切断の結果生じる産物を特異的に認識する抗体を開発するために使われています。生物学的なマーカーとなりうる約10種類のカスパーゼの基質が同定されています(6,7)。カスパーゼによる基質タンパク質の分解によって生成された新しいエピトープは、インタクトな基質を認識することなく、切断された産物のみを免疫学的に検出する特異的な抗体を作成するための抗原として使われています(8,9)。poly-ADP ribose polymerase(PARP)のような数種類のカスパーゼの基質はいたるところに存在し、アポトーシスの一般的なマーカーとして良い候補となります。その一方で、基質によってはマーカーとして適さないものもあります(例えば、上皮細胞に幾分限定されて発現するcytokeratin 18; 10-12)。プロメガではAnti-PARP p85 Fragment pAb^(a) (カタログ番号G7341)を開発し、アポトーシスマーカーとしての有用性が示されました(13-15)。Anti-PARP pAbに対するアプリケーションは、フローサイトメトリー(16)やウサギ三叉神経神経節におけるニューロンの免疫組織学的な染色(17)によっても示されています。

Anti-PARP p85 Fragment pAbを用いた染色は、TUNELアッセイを使って測定されるDNAの断片化に先立つことが示されました(13)。DNAの断片化(TUNEL法を使用)、細胞表面へのフォスファチジルセリン(PS)の露出(annexin Vラベリングを使用)、切断産物に対する抗体の使用などのようなアポトーシスの下流イベントの観察が、caspase-3が介する活性やアポトーシスを非直接的にモニターするために使われてきました。

活性化型caspase-3の*in situ* 検出は、DNA断片化やカスパーゼ基質の切断のような二次的な過程の検出よりも直接的なアポトーシスの指標となるかもしれません。

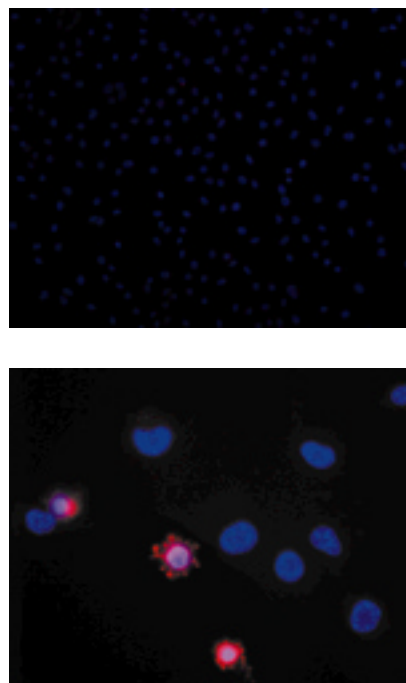


図3. アポトーシスを起こしたネズミ繊維芽細胞のAnti-ACTIVE® Caspase-3 pAbによるラベリング

ネズミ L929 細胞はコラーゲンコートしたスライドガラスの上で培養され、actinomycin D の存在下で5.5時間のTNF α 処理によってアポトーシスを誘導された。スライドは洗浄、ホルマリン固定後、Anti-ACTIVE® Caspase-3 pAb で標識、DAPIで対照染色された。**パネルA:** 未処理のコントロール細胞(200倍で撮影)。**パネルB:** アポトーシス細胞(630倍で撮影)。パネルAの細胞は抗体による染色を示さない。一方、パネルBでアポトーシスの形態学的変化を示す細胞は抗体で染色されている。

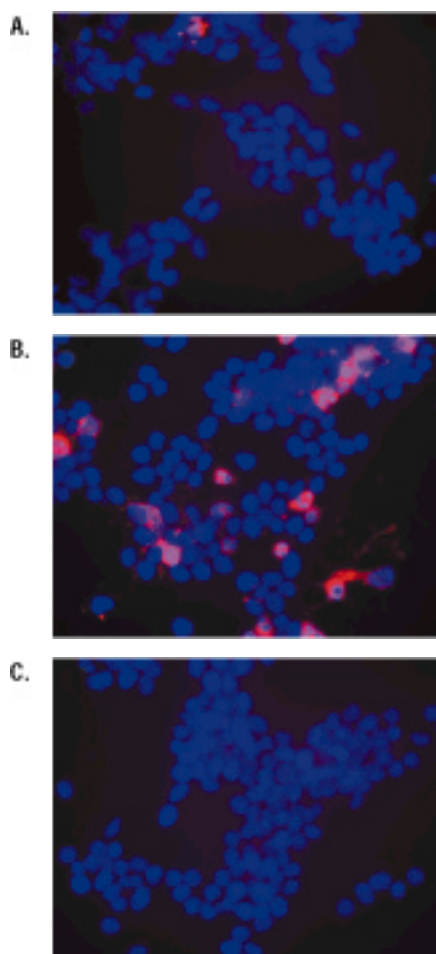


図4. ヒトの神経芽腫細胞のAnti-ACTIVE® Caspase-3 pAbによる標識

ヒトSH-SY5Y細胞はチャンバースライド上で培養され、プロテインキナーゼ阻害剤であるスタウロスポリンで時間の処理によりアポトーシスを誘導された。スライドは洗浄、ホルマリン固定後、Anti-ACTIVE® Caspase-3 pAbで標識、続いてAnti-Rabbit Cy™3結合2次抗体が結合された。対照染色はDAPIで行った。**パネルA:** 未処理のコントロール細胞。**パネルB:** スタウロスポリン処理されたアポトーシス細胞。**パネルC:** スタウロスポリン処理の前にカスパーゼ阻害剤-VAD-FMK (50μM) で前処理した細胞。カスパーゼの活性化がVAD-FMKにより阻害されている。

まとめ

現在、さまざまな方法がアポトーシスの検出に使われています。文献に報告されている2つの最も一般的な方法は、形態の観察とDNA断片化の検出です。これらの方法は有用であることが証明されていますが、両方のアッセイから得られる結果は、解釈の難しさや検出結果のアーティファクトなどの問題を包含します。アポトーシスは元来細胞死の時に現れる形態的な特徴をもとに定義されてきました(18)。細胞の縮小や核酸染色剤により染色される凝縮された核の出現は、アポトーシスの証拠として一般的に使われています。しかしながら、アポトーシスの唯一の検出方法として形態学だけに頼った場合、組織を処理する際にアポトーシスの特徴が失われてしまう、形態的基準について一貫性を持ってスコア化できる高度な能力を持つ観察者を必要とするなどの問題があります。caspase-3の活性化型やPARPのp85断片に対するマーカー抗体の使用は、形態学的な解析のみに依存した検出方法に付随する欠点を克服し、アポトーシスを立証するためのさらなる方法を与えます。

参考文献

1. Alnemri, E.S. *et al.* (1996) *Cell* **87**, 171.
2. Verhoven, B. *et al.* (1999) *Cell Death Differ.* **6**, 262.
3. Diaz, C. *et al.* (1999) *Cell Death Differ.* **6**, 218.
4. Nicholson, D.W. and Thornberry, N.A. (1997) *TIBS* **22**, 299.
5. Rotonda, J. *et al.* (1996) *Nature Struct. Biol.* **3**, 619.
6. Nicholson, D.W. (1999) *Cell Death Differ.* **6**, 1028.
7. Stroh, C. and Schulze-Osthoff, K. (1998) *Cell Death Differ.* **5**, 997.
8. Srinivasan, A. *et al.* (1998) *Cell Death Differ.* **5**, 1004.
9. Knaapen, M. *et al.* (1999) *Promega Notes* **72**, 7.
10. Lazebnik, Y. A. *et al.* (1994) *Nature* **371**, 346.
11. Duriez, P.J. and Shah, G.M. (1997) *Biochem. Cell Biol.* **75**, 337.
12. Caulin, C., Salvesen, G.S. and Oshima, R.G. (1997) *J. Cell Biol.* **138**(6), 1379.
13. Riss, T.L., O'Brien, M. and Moravec, R. (1999) *Mol. Biol. Cell* **10**(Suppl.) 190a.
14. Bernburg, M. *et al.* (2000) *EMBO J.* **19**, 1157.
15. Bushell, M. *et al.* (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 1083.
16. Li, X. *et al.* (2000) *Exp. Cell Res.* **255**, 125.
17. Perng, G.-C. (2000) *Science* **287**, 1500.
18. Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972) *Br. J. Cancer* **26**, 239.

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
Anti-ACTIVE® Caspase-3 pAb	50μl	G7481	39,000
Anti-PARP p85 Fragment pAb	50μl	G7341	58,000

関連製品

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
CaspACE™ Assay System, Colorimetric	100回分	G7220	65,000
	50回分	G7351	47,000
CaspACE™ Assay System, Fluorometric	160回分	G3540	83,000

Anti-ACTIVE is a trademark of Promega Corporation and is registered with the U.S. Patent and Trademark Office. CaspACE is a trademark of Promega Corporation.

Cy is a trademark of Amersham Pharmacia Biotech, Ltd.

^(a)Patent Pending.