

キナーゼの種類を選ばないユニバーサルなキナーゼ測定法

Kinase-Glo™ Luminescent Kinase Assay のご紹介

By Richard Somberg, Ph.D., Becky Pferdehirt, and Kevin Kupcho, B.S., Promega Corporation

アブストラクト

Kinase-Glo™ Luminescent Kinase Assayは、キナーゼ反応の終了後に残存するATPレベルを定量することによりキナーゼ活性を測定するホモジニアスなアッセイ法です。このアッセイは、事実上あらゆるキナーゼと基質の組み合わせにご使用いただけます。等量の標準的なマルチウェルプレートに等量のKinase-Glo™ Reagentを添加し、発光を計測します。この方法により優れたZ'値が得られ、社内テストでは既知のキナーゼ阻害剤を簡単に検出でき、正確なIC₅₀値を示しました。

Kinase-Glo™ Assayは優れた Z' 値を示し、既知キナーゼ阻害剤を容易に検出でき、正確な IC₅₀ 値が得られます。

アッセイの原理とプロトコル

キナーゼはATPから基質へのリン酸基転移を触媒する酵素です。Kinase-Glo™ Reagentを使用することにより、ATPの消費を高感度にモニターすることができます。この試薬は、反応液中においてルシフェリン、酸素、ATPを基質としてオキシルシフェリンと光を発生します(図1)。発光シグナルは残存するATP量と正の相関性を示し、キナーゼ活性量とは負の相関性を示します。

Kinase-Glo™ Reagentの特性は、独自に開発した熱安定型のルシフェラーゼ (UltraGlow™ Recombinant Luciferase) の特性に負っています。このルシフェラーゼは、安定した“グロータイプ”の発光シグナルを生じ、多様なアッセイ条件においてすぐれた性能を示します。Kinase-Glo™ Reagentは、凍結乾燥Kinase-Glo™ Substrate を Kinase-Glo™ Bufferに混和することにより調製します。Kinase-Glo™ Reagent は用時調製することもできますが、1回量ずつ分注して-20℃で保存すれば数か月使用できます。

本アッセイのプロトコルでは、キナーゼ反応終了後の反応液 (ATP、精製キナーゼ、基質を含有) に等量のKinase-Glo™ Reagentを1回添加し、プレート内で混和したのち発光を測定します。

性能

Kinase-Glo™ Reagentによって生じる光は、キナーゼ反応液中の残存ATP量と正比例し、図2に示すように0~10μMで直線性を示します。また、この発光シグナルは非常に安定性が高く、室温で4時間放置したのちも反応液中のATP量にかかわらず発光シグナルは25%しか減少しません(図3)。そのため、試薬インジェクター付きのルミノメーターを使用する必要がなく、測定までプレートをスタックしておくことができます。

Kinase-Glo™ Reagentで実際に測定するのは、キナーゼ活性量と反比例する発光量です。キナーゼ活性で観察される発光量の変化を最大限にするため、実験によりATPおよびキナーゼ基質の至適量を決定しておく必要があります。これは、キナーゼ反応液中のATP量およびキナーゼ基質量をタイトレーションすることによって行います。ATP量およびキナーゼ基質量のタイトレーションを行う際、Kinase-Glo™ Reagentの使用方法に変更を加える必要はありません。

ATPおよびキナーゼ基質の至適濃度が明らかになれば、図4に示すように、キナーゼ活性の増加にしたがい発光量の大きな変化が認められます。当社の実施例では、1~3μMのATPを用いることによりセリン/スレオニンキナーゼとチロシンキナーゼの双方で500倍から1,000 倍も

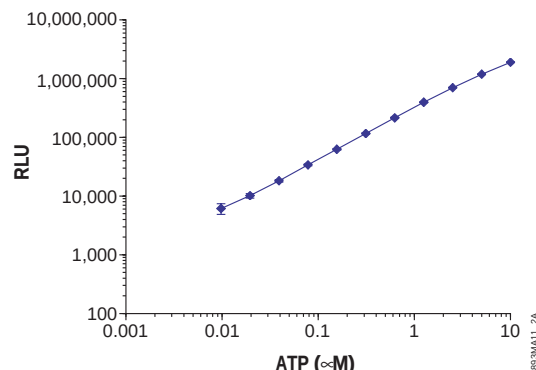
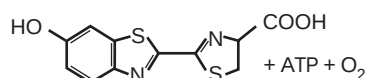


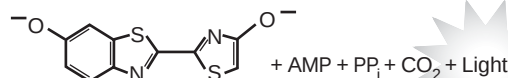
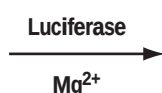
図2. 発光量とATP量の相関性

Kinase-Glo™ Reagentで測定した発光量とATP量との間には、正の相関関係が認められる。96ウェルプレートにおいて、キナーゼ反応バッファー (40mM Tris [pH 7.5], 20mM MgCl₂, 0.1mg/ml BSA) 50μl/wellでATPの2倍希釈系列を作製した。等量のKinase-Glo™ Reagentを添加し、10分後にWallac Victor™ 1420マルチラベルカウンターを使って発光を測定した。値は4連検体の平均±SDで示す。発光シグナル量とキナーゼ反応バッファー中のATP量との間には直線性が認められ、0~10μMでは $r^2 = 0.979$ 、0~1.25μMでは $r^2 = 0.998$ であった。

のダイナミックレンジが得られています。PKCは、ホスファチジルセリンやジアシルグリセロールの存在下でも問題なくタイトレーションできます。また本アッセイは、ミエリン塩基性タンパク質などのタンパク質基質や、ホスファチジルイノシトールなどの脂質基質の存在下でも使用することができます (データは示していません)。用量反応曲線の特異的な形状は、ATPとキナーゼ基質の相対的な量に応じて変化します。ATP量とキナーゼ基質量が同量に近づくほど勾配は緩やかになり、ダイナミックレンジは減少します。実験条件は容易に変更することができ、ユーザーが定めたほぼすべてのパラメーターに関して至適化を行うことができます。



Beetle Luciferin



Oxyluciferin

3897MA11_2A

図1. ルシフェラーゼ反応

ルシフェラーゼは、Mg²⁺、ATP、分子状酸素の存在下でルシフェリンへの一酸素添加を触媒する。1反応あたり1個の光子が生成される。

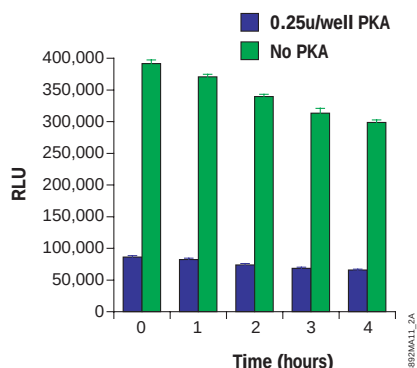


図3. 長い発光半減期

白色96ウェルプレートにおけるKinase-Glo™ Reagentのシグナル安定性 (n=32)。0.25 units/well PKAの存在下 (青色の棒グラフ) またはPKAの非存在下 (緑色の棒グラフ) でキナーゼ反応を行った。キナーゼは、5μMの基質 (カタログ番号V5601) および1μM ATPを含有するキナーゼ反応バッファー (40mM Tris [pH 7.5], 20mM MgCl₂, 0.1mg/ml BSA) 50μlに希釈した。キナーゼ反応を室温で20分間進行させた。等量のKinase-Glo™ Reagentを添加し、10分後 (時間0) にWallac Victor™ 1420マルチラベルカウンターを使って発光を測定した。発光量の測定は、図中に示した間隔で行った。4時間後におけるシグナル低下は25%未満であった。

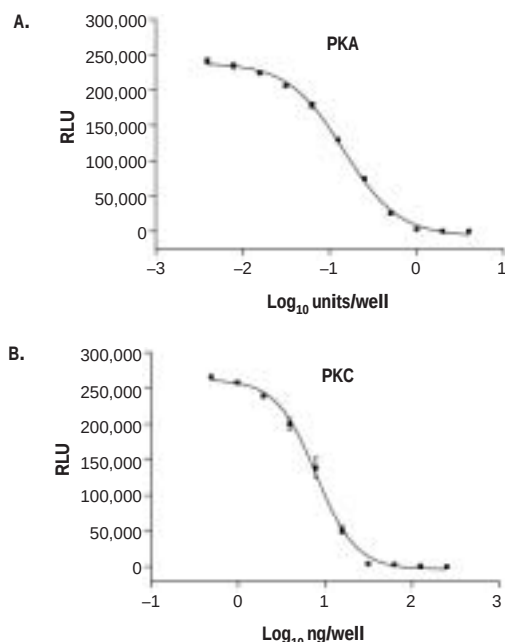


図4. キナーゼ活性量と発光シグナル量の負の相関性

Kinase-Glo™ Reagentを用いて測定した発光量とキナーゼ活性量との間には、負の相関性が認められた。白色96ウェルプレートにおいて、下記条件下にキナーゼ反応バッファー50μl/wellでキナーゼの2倍希釈系列を作製した。等量のKinase-Glo™ Reagentを添加し、10分後にWallac Victor™ 1420マルチラベルカウンターを使って発光を測定した。曲線近似は、GraphPad Prism® シグモイド用量反応曲線 (可変勾配) 用ソフトウェアを用いて行った。パネルA: PKA (カタログ番号V5161) を、5μMの基質 (カタログ番号 V5601) および1μM ATPを含有するキナーゼ反応バッファー (40mM Tris [pH 7.5], 20mM MgCl₂, 0.1mg/ml BSA) 50μlに希釈した。キナーゼ反応を室温で 20分間進行させた。値は8連検体の平均±SDで示す。R² = 0.99、EC₅₀ = 0.15u/well。パネルB: PKC (カタログ番号 V5601) を、10μMの基質 (Neurogranin (28-43) (PKC) Peptide Substrate; カatalog番号 V5611) および1μM ATPを含有するキナーゼ反応バッファー (20mM Tris [pH 7.5], 10mM MgCl₂, 0.1mg/ml BSA, 250μM EGTA, 400μM CaCl₂, 0.32mg/mlホスファチジルセリン, 0.032mg/mlジアシルグリセロール) 50μlに希釈した。キナーゼ反応を室温で90分間進行させた。値は2連検体の平均±SDで示す。R² = 0.99、EC₅₀ = 7.9ng/well。

HTSへのKinase-Glo™ Assayのアプリケーション

HTS用としてのKinase-Glo™ Assay の有用性を検討するため、モデルキナーゼとしてPKAを使用し、Z'因子の検討 (1)、既知阻害剤の検出、IC₅₀値の決定を行いました。

図5は、96および384ウェルプレートフォーマットのどちらにおいても0.8を上回るZ'値が得られることを示したものです。これらの実施例で使用したキナーゼ量から得られる発光量は、キナーゼタイトレーション曲線の直線部分における低濃度側の末端部分に該当します (図4)。タイトレーション曲線の直線内に該当するキナーゼ量を選択すれば、阻害剤に対する感受性は最も良好となります。Kinase-Glo™ Assayでは%CVがきわめて良好であるため、わずかな発光量の変動でもスクリーニングに有用です。

当社では、Kinase-Glo™ Assayを使用することにより、既知のPKA阻害剤数種を含む72種類の化合物についてスクリーニングを行いました。いずれのキナーゼ阻害剤も、対照ウェル (キナーゼ基質無添加) では発光量が最大値を示すと予想されます。結果は、図6に示すとおり、6種類の化合物において20%を上回る阻害が認められました。4種類は既知のPKA阻害剤でしたが、2種類はPKA阻害作用に関して未報告の化合物でした (表1)。

偽陰性を示す化合物の数について検討するため、Kinase-Glo™ ReagentとATPを用いて全LOPAC library (640化合物) のスクリーニングを行いました。発光を阻害する化合物は認められませんでした。このように化合物からの干渉が少ないのは、UltraGlow™ ルシフェラーゼと独自開発のバッファー組成という、独自の組み合わせに拠るものです。

HTSキナーゼアッセイでは正確なIC₅₀値が得られるため、阻害剤の検出だけではなく化合物の阻害力について評価することもできると考えられます。図7に、既知PKA阻害剤で得られたIC₅₀値を示しました。Kinase-Glo™ Assayを用いて決定したIC₅₀値は別のキナーゼアッセイを使った文献報告値ときわめて近い値でした。PKIおよびスタウロスポリンを用いた阻害剤タイトレーションでは、IC₅₀値はそれぞれ2.5nMおよび10nMでした (データは示していません)。これらのデータは、文献報告値 (3.0nM [PKI, 2], 18.0nM [スタウロスポリン, 3]) とほぼ同等でした。

要約

Kinase-Glo™ Luminescent Kinase Assayは、標識化合物や放射性化合物をHTSアッセイに使用することを好まないユーザーにとって、最適な代替法です。本アッセイはホモジニアスなキナーゼ活性測定法です。シグナルの半減期が長いため、試薬インジェクターを使用する必要がなく、プレートのパッチ処理が可能です。また、UltraGlow™ ルシフェラーゼと独自開発のバッファー組成という独自の組み合わせにより、ルシフェラーゼを利用した他のATP検出試薬と比較して、ライブラリ化合物により発光が受ける干渉をかなり低く抑えることができます。アッセイ手順は、反応終了後のキナーゼ反応液に1種類の試薬を直接添加するだけです。これによりキナーゼ活性量に反比例する発光シグナルが得られます。すべてのキナーゼは反応にATPを用いるため、このアッセイは非常に幅広いキナーゼに使用できる可能性があります。本アッセイを用いた試験を、セリン/スレオニンキナーゼとチロシンキナーゼの双方について実施済みであり、96および384ウェルプレートフォーマットのどちらでも0.8を上回るZ'値が得られています。本アッセイにより、IC₅₀値に関しても既知阻害剤の文献報告値と同等の値が得られており、他の化合物から容易に既知キナーゼ阻害剤を選択することができます。

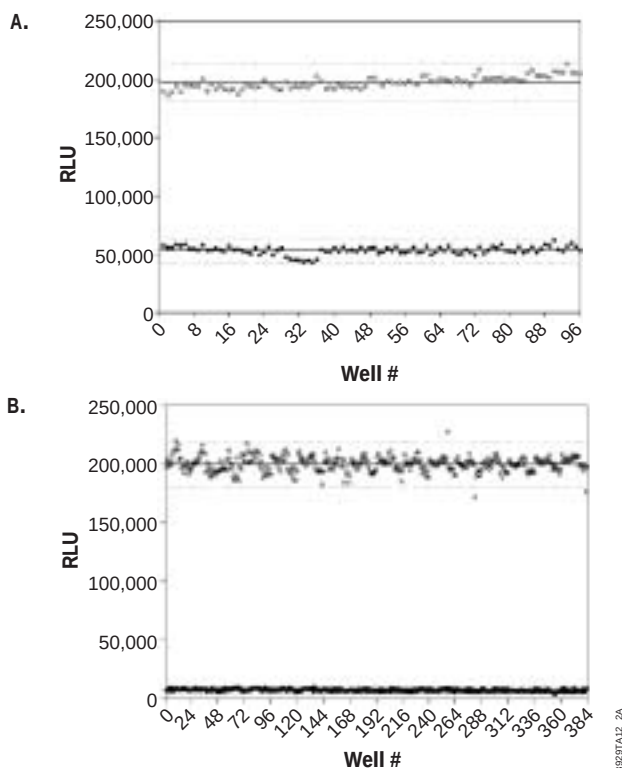


図 5. 優れた Z' 因子

白色平底96ウェルプレートおよび384ウェルプレートにおけるZ'分析の結果。パネルA：図4Aの説明文に記載にしたがい、0.25units/well PKAの存在下 (●) またはPKAの非存在下 (○) にアッセイを実施した。パネルB：384ウェルプレートを使って0.05units/well PKAの存在下 (●) またはPKAの非存在下 (○) にアッセイを実施した。96ウェルプレートおよび384ウェルプレートを使用したアッセイの最終容量は、それぞれ100μlおよび20μlであった。実線は平均値を示し、点線はその±3SDを示す。96ウェルプレートを用いた場合のZ'値は0.83、384ウェルプレートを用いた場合のZ'値は0.84であった。

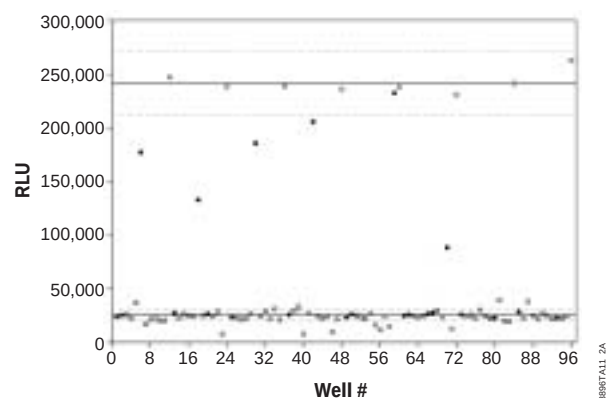


図 6. PKA 阻害剤の容易な検出

LOPAC library (Sigma-RBI) のプレート6を用いて72種類の化合物をスクリーニングした結果。白色平底96ウェルプレートを用い、化合物の10%DMSO溶液を各ウェル5μlずつ添加することにより10μMの化合物のスクリーニングを行った。DMSOの最終濃度は1%であった。反応条件は図4Aの説明文と同一とし、0.5units/wellのPKAを使用した。●は化合物無添加。○はキナーゼ無添加。実線は平均値を示し、点線はその±3SDを示す。四角はライブラリ化合物を示す。■はヒット化合物を示す (表1参照)。

表1. 72化合物スクリーニングにおける“ヒット”化合物

ウェル#	化合物	阻害
6	HA-1004	70.2%
18	H-7	49.6%
30	H-8	74.1%
42	H-9	83.3%
59	U-73122	95.7%
70	GW5074	29.1%

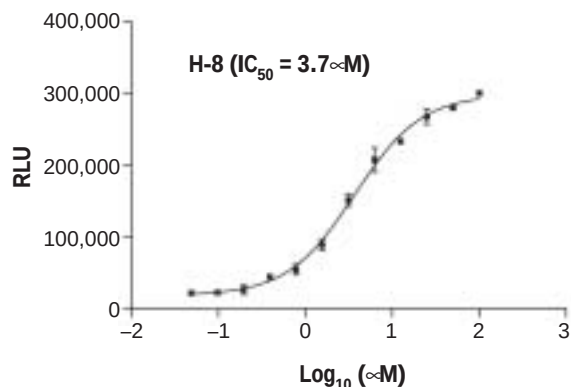


図7. 正確な IC₅₀値の決定

PKA阻害剤のタイトレーションを、白色平底96ウェルプレートにおいて総量50μl/wellで実施した。アッセイ条件は図4Aの説明文と同一とし、0.5units/wellのPKAと、図中に示した量の阻害剤を使用した。データポイントは2測定値の平均値であり、エラーバーは±SDである。得られたIC₅₀値は文献報告値 (1.2μM) とほぼ同等であった。曲線近似は、GraphPad Prism®シグモイド用量反応曲線 (可変勾配) 用ソフトウェアを用いて行った。

参考文献

- Zhang, J. et al. (1999) *J. Biomol. Screening* **4**, 67–73.
- Walsh, D.A. and Glass, D.B. (1991) *Methods in Enzymology* **201**, 304–16.
- Hidaka, H., Watanabe, M. and Kobayashi, K. (1991) *Methods in Enzymology* **201**, 328–39.

プロトコール

- ◆ Kinase-Glo™ Luminescent Kinase Assay Technical Bulletin #TB318, Promega Corporation.
(www.promega.com/tbs/tb318/tb318.htm)

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Kinase-Glo™ Luminescent Kinase Assay	10ml	V6711	13,000
	10×10ml	V6712	60,000
	100ml	V6713	50,000
	10×100ml	V6714	400,000