



## UV 照射により誘導されたアポトーシスの Caspase-Glo™ 3/7 Assayを用いた検出

By Ronald Lai, Ph.D., Allergan, Irvine, CA

### アブストラクト

アラガン (Allergan) 社は、神経筋、皮膚、眼のケア製品や特殊な医薬品を取り扱う世界的なヘルスケア会社です。我々は、UV照射のアポトーシス誘導効果を阻害する化合物に強い関心があります。ここでは、抗アポトーシス化合物のハイスループットスクリーニングに使用したプロメガのCaspase-Glo™ 3/7 Assayのアプリケーションについて紹介します。

Caspase-Glo™ 3/7 Assayは迅速、簡便であるためカスパーゼ活性のハイスループットな検出に非常に適しています。

### はじめに

生細胞へのUV照射効果は、UV誘導アポトーシスを含め関心の高い領域です。我々はUV誘導アポトーシスを防御する化合物のハイスループットスクリーニングについて興味を持っています。UV照射はCHO細胞を含む細胞培養システムで細胞死を誘導します。

アポトーシスのプロセスはアネキシン-V/PI染色、カスパーゼ-3活性化のウエスタンブロット検出、ミトコンドリアの膜電位変化をモニタリングするJC-1色素などを用いて可視化することができます。しかし、これらの手法は、ハイスループットスクリーニングにうまく適応できません。迅速、便利で定量的なカスパーゼ3/7アッセイとUV照射/CHO細胞システムを組み合わせれば、アポトーシスの阻害効果を示す化合物を評価するハイスループットな手段になりえます。我々のゴールは、プロメガのCaspase-Glo 3/7 Assayが迅速、簡便にカスパーゼ3/7の活性化を定量的に評価できるかを調べることです。

### Caspase-Glo™ 3/7 Assay

カスパーゼカスケードの活性化はアポトーシス経路の中で欠くことのできないイベントです。カスパーゼ-3は、細胞崩壊へと導く数多くのタンパク質切断の引き金となる重要な“執行人”カスパーゼ酵素の1つです。カスパーゼ-3活性化の検出はアポトーシスの陽性マーカーとして汎用されてきました。Caspase-Glo™ 3/7 Assay は、細胞または精製酵素からカスパーゼ活性化をモニタリングする感度の良い手法を提供します。このアッセイでは、カスパーゼ-3および-7により認識される配列を持つ発光基質前駆体 DEVD-アミノルシフェリンを利用します。

この製品にはこの発光基質前駆体であるカスパーゼ-3/7基質および特殊なバッファーシステム (カスパーゼ-3/7活性、ルシフェラーゼ活性、細胞溶解に最適化) に保存された耐熱性ルシフェラーゼを供給します。“添加-混和-測定”フォーマットでCaspase-Glo™ 3/7 Reagentを1回添加すれば、細胞の溶解に引き続きカスパーゼによる基質の切断が起こります。この結果生じた遊離アミノルシフェリンはルシフェラーゼにより消費され、“グロータイプ”の発光シグナルを生成します(1)。生成した発光シグナルは存在するカスパーゼ活性量に比例します。

Caspase-Glo™ 3/7 Assayでは、カスパーゼおよびルシフェラーゼ活性が定常状態 (約1時間) に達すると、最大の感度を示します。最大シグナルに到達するまでの正確な時間はアッセイシステムや培養条件に

依存します。このアッセイにおけるバックグラウンド発光は非常に低いため、他のカスパーゼアッセイフォーマットでは実現できない卓越したシグナル/バックグラウンド比と感度を示します (1-3)。本アッセイでは0.1pgの活性化カスパーゼ-3を検出することができます (4)。また、この感度の高さにより、1ウェルあたりの細胞が少数でも正確なカスパーゼ活性を測定でき、インヒビタースクリーニングを行う場合でも使用するリコンビナント酵素量を抑えることができます。

Caspase-Glo™ 3/7 Reagentで生成される発光量はカスパーゼ-3/7活性と直接的に比例します。発光はカスパーゼ濃度規模 4オーダー以上または広い細胞密度幅で直線性が得られます (4)。発光シグナル強度は幾分減少するものの4時間以上に渡り安定です。この安定性により、試薬インジェクターの無いルミノメーターが使用でき、またバッチプロセスが要求される場合でも測光を遅らせることもできます。

### 結果

我々は、UV照射後のCHO細胞におけるカスパーゼ-3/7活性の経時的増加を示すためにCaspase-Glo™ 3/7 Assayを使用しました。我々は、CHO細胞を血清の無い状態で24時間インキュベーションし、照射時間を増加しながらUV処理を行いました (図1)。この結果は、我々が先に行ったアネキシンV/PI染色、カスパーゼ-3活性化のウエスタンブロット検出、ミトコンドリア膜電位変化のJC-1モニタリングなどの方法を用いた観察結果の確証を得るものでした。我々が使用したCHO細胞システムでは、Caspase-Glo™ 3/7 Reagent添加後に移動ステップが要求されるため、ライセートの移動が均一に一貫して行われるにはCaspase-Glo™ 3/7 Reagentが完全に細胞を溶解することが重要でした。この問題は他のアッセイ法では存在しましたが、Caspase-Glo™ 3/7 Reagentを用いた場合は不十分な細胞溶解は無く、スクリーニングを成功させるために必要な一貫性のあるアッセイを行うことができました。以前、我々はLDHアッセイ (CytoTox96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay; カタログ番号G1780) を用いた実験で、MAPキナーゼキナーゼ阻害剤であるU0126 (10<sup>-6</sup>M)がCHO細胞におけるUV-B 誘導細胞死を阻害することを発見していました。我々はプロメガのCaspase-Glo™ 3/7 Assayを用いて、UV-B処理CHO細胞のカスパーゼ-3/7活性が、10<sup>-6</sup>M U0126存在下で顕著に低下することを確認しました (図2)。これらの結果は再び、CHO細胞でのUV照射により誘導されるアポトーシス細胞死がU0126により阻害されるという我々の実験結果 (アネキシンV/PI染色、カスパーゼ-3のウエスタンブロット検出、ミトコンドリア膜電位変化のJC-1色素モニタリングなどの方法による可視化実験) をサポートするものでした。

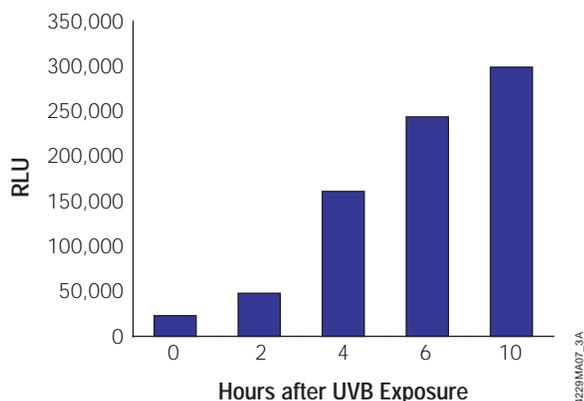


図1. Caspase-Glo™ 3/7 Assayにより測定されたUV処理後のCHO細胞における特異的なカスパーゼ-3/7活性

CHO細胞は24ウェルプレートで90%コンフルエントになるまで5% FCS/F-12培地で培養した。培地は血清なしのF-12培地で交換した。24時間後、血清なしの条件下で4ウェルずつのグループにUV-Bを1分間照射し、0、2、4、10時間後に測定した。各ウェルを洗浄し、PBS 0.3mlを添加した。各タイムポイントの2つのウェルに全カスパーゼ阻害剤 z-VAD-FMK ( Calbiochem, San Diego, CA ) 10<sup>-6</sup>Mを添加し、非特異的バックグラウンドのコントロールとした。Caspase-Glo™ 3/7 Reagent (0.5ml) を各ウェルに添加し、プレートシェイカーで10分間緩やかにプレートを振盪した。各ウェルからサンプル200μlを96ウェルプレート (白) に移した。この移動は、細胞を前処理した24ウェルプレート (白プレートでは無いためルミノメーターによる測定は不適) で培養する必要があったため、不可避なステップであった。発光はMicroLumatPlus LB96V ( EG&G Berthold, Perkin Elmer Life Science ) で測定し、相対発光ユニットで表した。特異的な発光は、非特異的バックグラウンドを差し引いて算出した。

## 結論

CHO細胞培養でアポトーシスを誘導するためにUV-B処理を用い、Caspase-Glo™ 3/7 Assayにより検出されたカスパーゼ-3/7活性が、他の方法による我々の先の発見と一貫していることを認めました。Caspase-Glo™ 3/7 Assayは非常に迅速で使いやすいため、カスパーゼ-3/7活性検出のためのハイスループットアクセスに良く適しています。

## 参考文献

1. Karvinen, J. *et al.* (2002) *J. Biomol. Screen.* **7**, 233–231.
2. Preaudat, M. *et al.* (2002) *J. Biomol. Screen.* **7**, 267–274.
3. Gopala-Krishnan, S.M. *et al.* (2002) *J. Biomol. Screen.* **7**, 317–323.
4. O'Brien, M. *et al.* (2003) *Cell Notes* **6**, 13–15.

## プロトコール

- ◆ Caspase-Glo™ 3/7 Assay Technical Bulletin #TB323, Promega Corporation. ([www.promega.com/tbs/tb323/tb323.html](http://www.promega.com/tbs/tb323/tb323.html))

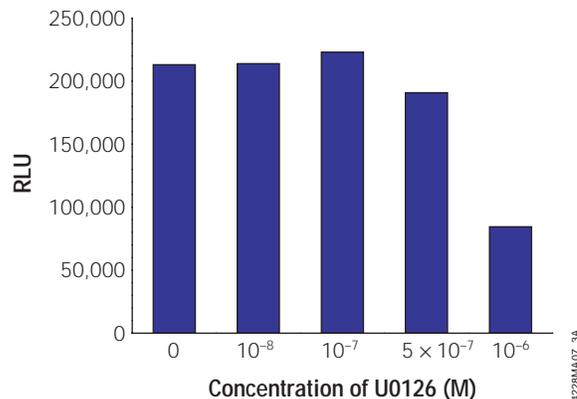


図2. CHO細胞におけるUV-B誘導カスパーゼ-3/7活性化のMAPキナーゼキナーゼ阻害剤 U0126による防御効果

血清なしのCHO細胞はUV照射60分前に10<sup>-8</sup>M、10<sup>-7</sup>M、5 × 10<sup>-7</sup>M、10<sup>-6</sup>M MAPキナーゼキナーゼ阻害剤 U0126 (Tocris, Ellisville, MO) で処理した (その他の処理は図1と同じ)。UV処理は1分間行いました。特異的なカスパーゼ-3/7活性は6時間後、図1と同様にCaspase-Glo™ 3/7 Assayを用いて測定した。

## 製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 ( ¥ )
Caspase-Glo™ 3/7 Assay	2.5ml	G8090	16,000
	10ml	G8091	60,000
	100ml	G8092	290,000
CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	1,000回分	G1780	35,000
Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK	50μl	G7231	35,000
	125μl	G7232	59,000
CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay	200–800回分	G7890	16,000
	1,000–4,000回分	G7891	49,000
MEK Inhibitor U0126	5mg (5 × 1mg)	V1121	32,000