



Detect Caspase-8 And-9 Activities Using The Caspase-Glo™ Assays

Caspase-Glo™ Assayを用いたカスパーゼ-8および-9活性の検出

By Andrew Niles, M.S., Kay Rashka, B.S., Deborah Bishop, B.S., Rich Moravec, B.S., Martha O'Brien, Ph.D., And Terry Riss, Ph.D., Promega Corporation

アブストラクト

我々はカスパーゼ-8および-9活性を測定する高感度でホモジニアス方式を採用した発光法を開発し、現行の蛍光ベースの方法を超越した存在になっています。このアッセイの感度ならば、96ウェルフォーマットで典型的に使用される細胞数からでもカスパーゼ-8および-9活性を充分検出することができます。本アッセイは、生化学的アッセイで特異的カスパーゼ阻害剤をスクリーニングすることができる効果的な方法です。この頑強なホモジニアスアッセイは、アポトーシスにおけるカスパーゼカスケードの役割を研究する上で理想的なツールです。

イントロダクション

細胞内環境における動的なフラックスは多細胞生物の恒常性に結びついています。細胞の生と死は、正または負の刺激により制御される時間的および空間的に調和されたプログラムに依存しています。これらのプロセスを統制しているパラメーターやファクターはまだ解明されていませんが、近年の研究ではアポトーシスによるプログラムされた細胞死の複雑な経路について徐々に解明されています。

システインプロテアーゼであるカスパーゼファミリーは、細胞死や易感染細胞排除に導くタンパク質分解型カスケードの中心的な仲介者です。このようなカスパーゼは、産生による活性化をブロックするために転写レベルおよび内在性抗アポトーシスポリペプチドにより厳密に制御されています(1)。さらに、このプロセスに関わる酵素は明確に経路を決定付け、主要な生物学的役割と調和して特殊機能を示します(2)。

アポトーシス促進性の刺激は、2つの主要な機構によりカスパーゼの活性化を引き起こします。外因性の経路としては自己触媒性カスパーゼ-8前駆体を含むDISC (death-inducing signaling complex) の形成を促進するTNFスーパーファミリーの“死受容体”への結合やクロスリンクがあります。活性化カスパーゼ-8になると、さらに“下流”の死執行カスパーゼ(-3, -6, -7)をプロセシングして活性化させ、構造分子や修復酵素の破壊へ導きます(5)。

内因性およびミトコンドリア経路は、ウイルス、紫外線(UV)または細胞膜損傷により開始され、細胞質へのシトクロムc放出に至ります。

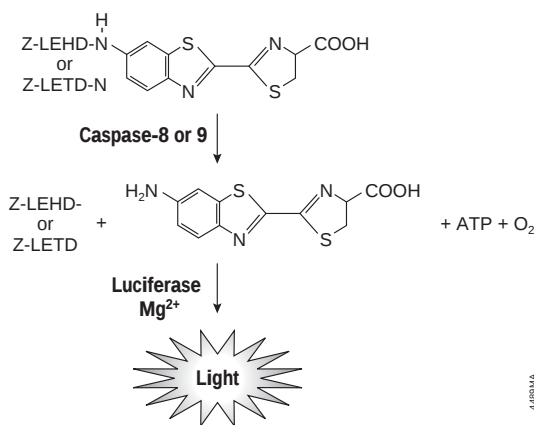


図1. カスパーゼ-8、-9によるLETDおよびLEHDを含む発光源性基質の切断。カスパーゼによる切断後、ルシフェラーゼの基質(アミノルシフェリン)が開放され、ルシフェラーゼ反応により発光する。

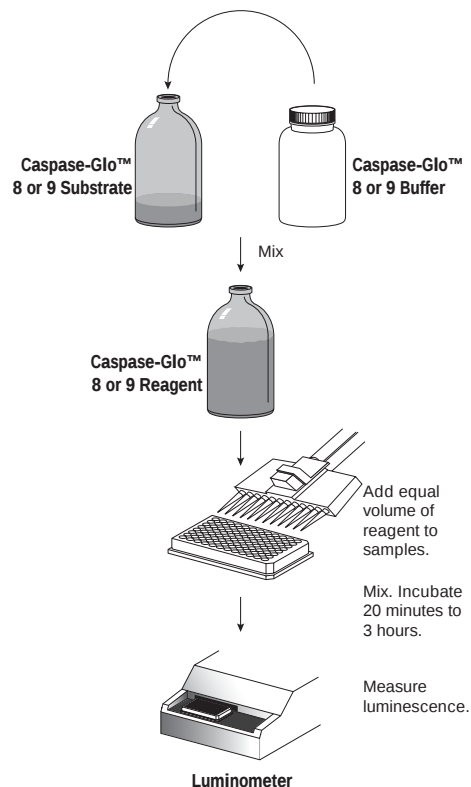


図2. Caspase-Glo™ Assay プロトコルの概略

イベントの複雑な流れを通して、プロ-カスパーゼ-9、Apaf-1、dATP、シトクロムcはより触媒活性の高い複合体“アポソーム”を形成します(6, 7)。カスパーゼ-8の場合、先端のカスパーゼ複合体はアポトーシスを仲介する執行カスパーゼの活性化を誘導します。

カスパーゼ経路をさらに詳細に解明することは、固有のアポトーシスチェックポイントやそれらが健康維持や疾患にあたえる影響を理解する上で必要なことです。簡便、効率的で、費用対効果に優れたカスパーゼネットワークの研究を行うには、現行の方法論は一般的に感度不足です。我々はこの研究を促進させるための改良されたカスパーゼアッセイについて言及します。

Caspase-Glo™ Assayの原理

Caspase-Glo™ Assayは、特殊なバッファーに溶解された発光源性のカスパーゼ-8テトラペプチド基質(Z-LETD-aminoluciferin)またはカスパーゼ-9テトラペプチド基質(Z-LEHD-aminoluciferin)および安定性ルシフェラーゼを使用します。バッファーはカスパーゼ-8および-9活性、細胞溶解、ルシフェラーゼ活性に最適化されています。活性化カスパーゼが存在しないと、カスパーゼ基質はルシフェラーゼの基質として機能しないために光を生成しません。各カスパーゼにより基質が切断されると、アミノルシフェリンが遊離し、発光反応における光の生成に寄与します(図1)。生成した発光シグナルは、サンプルに存在するカスパーゼ活性量に直接比例します。

シンプルな操作性

Caspase-Glo™ 8, 9 Assayは操作が簡便になるように設定されています。試薬の調製は、凍結乾燥された基質に直接バッファーを添加するだけです。これらのホモジニアスな試薬は、1:1の割合（図2）でサンプルに添加できる利便性を持っており、別途に細胞を溶解するステップはありません。発光シグナルは“フラッシュ”タイプではなく“グロー”タイプなので試薬用のインジェクターは不要です。

迅速に得られる結果

Caspase-Glo™ Assayからの最適なシグナルは、サンプルへの試薬添加後 数分以内に得られます（図3）。カスパーゼ反応とルシフェラーゼ反応間の定常状態は迅速に得られ、発光シグナルを数時間維持する結果となり、データの記録に柔軟性を与えます（図3）。有意なシグナルを得るために長時間のインキュベーションを必要とし、S/N比を制約する特有の高いバックグラウンドを示す蛍光アッセイに較べ結果を得るまでの時間が短縮化されます。

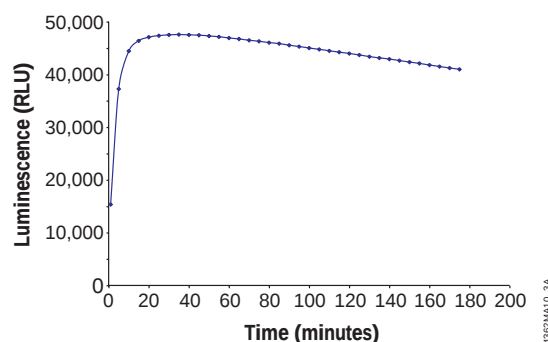


図3. Caspase-Glo™ Assayは数分以内に最適な感度が得られ、“グロー”タイプの発光を持続する
リコンビナント カスパーゼ-8精製酵素 (Biomol) は、ホワイテ96ウェルプレート（総容量200μl/ウェル）でCaspase-Glo™ 8 Assay Reagent を用いてアッセイした。カスパーゼ-8酵素は、0.1% Prionex® stabilizerを含む10mM HEPES/バッファーで125U/mlに希釈した。1Uのカスパーゼ-8は30 で1分間に1pmolの基質（Ac-LETD-pNA）を切断するために必要な量（製造元のユニット定義）。各ポイントは4ウェルの平均を表す。（カスパーゼ-8活性のユニット定義は製造元により異なります。そのためユニット数は、異なるメーカー間で直接置き換えることはできません。）

改良された感度

Caspase-Glo™ Assayは、カスパーゼ濃度に対して直線的に反応し、蛍光ベースの基質を用いたアッセイに較べ数桁以上の高いシグナルウィンドウを有します（図4）。この改善された感度により、標準的な濃度の細胞を用いたマルチウェルプレートでのセルベースアッセイにおいてホモジニアスなカスパーゼ活性検出を可能にします（図5）。対照的に蛍光アッセイでは通常、活性化カスパーゼを検出できる濃度にするために細胞の洗浄、ライセートの濃縮調製が要求されます。

HTSアプリケーション

Caspase-Glo™ Assayは、高い感度、優れたZ'-factor値を示すためハイスループットスクリーニングに適しています（図6；参考文献8）。このような1液添加型のアッセイは、アッセイボリウムを低下させ、使用する酵素やテスト化合物の量を抑えることができるため、スクリーニング費用の節約に結びつきます。さらに両アッセイともに自動液体分注ワークステーションで使用できることが確認されています。

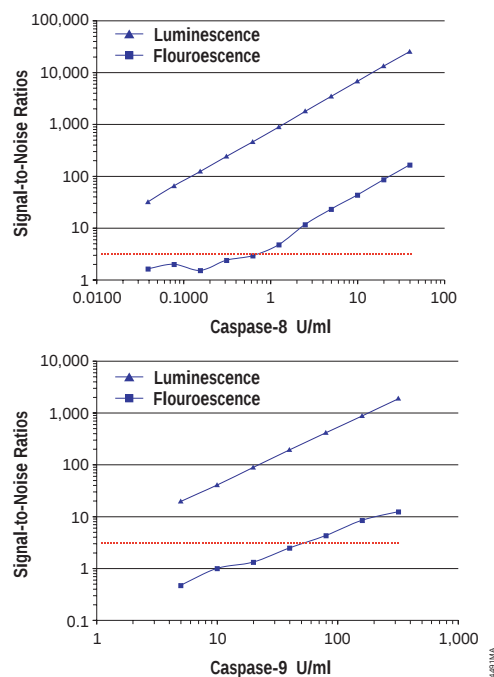


図4. 蛍光アッセイよりも高い感度を示すCaspase-Glo™ 8, 9 Assay

この例では、リコンビナント カスパーゼ-8または-9を0.1% Prionex® stabilizerを含む10mM HEPES (pH 7.6) で2倍段階希釈した。希釈したカスパーゼ-8または-9は、Caspase-Glo™ 8, 9 Reagentまたは10mM DTTを含むCaspase-Glo™ Bufferで希釈したそれぞれに対応するAFC標識蛍光基質と等量ずつ混和した。発光および蛍光シグナルは、1時間後にBMG FLUOstarまたはCytofluor® IIで測定した。三角形の記号はCaspase-Glo™ Assayのシグナル/ノイズ比を示し、四角形の記号はそれぞれ対応する蛍光アッセイのS/N比を示した。点線はS/N=3（バックグラウンド値の標準偏差の3倍に相当する検出限界を意味する）。これらのカスパーゼのタイトレーションでは、Caspase-Glo™ Assayの検出限界にまでは達しなかった。最低投与量は蛍光アッセイの検出限界より下であった。S/N比 = [(酵素を含む場合の平均シグナル) - (酵素を含まない場合の平均シグナル)] / [酵素を含まない場合のコントロールの標準偏差]。

慣例的なキネティックアプリケーション

通常、研究者はカスパーゼを誘導または阻害する場合、化合物や処理に対する力価を決定する必要があります。Caspase-Glo™ 8, 9 Assayは簡便、効果的に運動常数を決定でき、薬剤の選別や優先順位決定を行うために有用な情報を与えてくれます（図7）。ED₅₀やIC₅₀値は発光の定常状態で迅速に決定することができます。

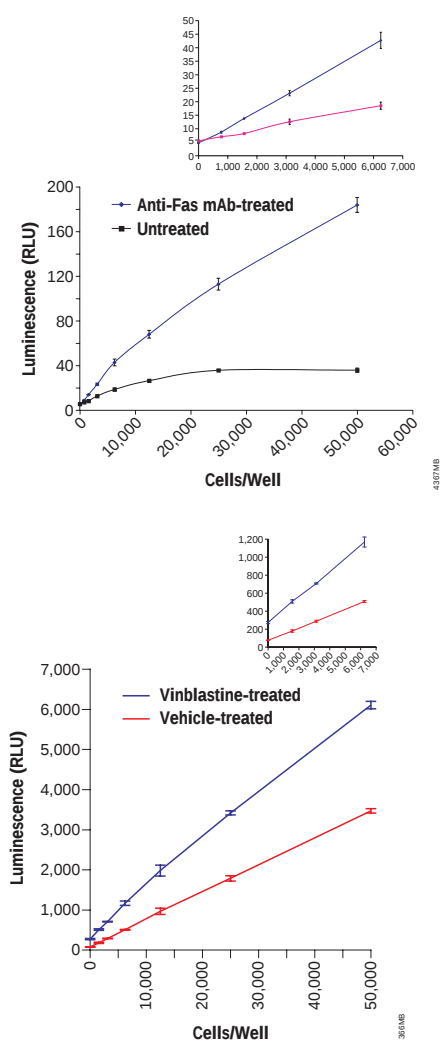


図5. Caspase-Glo™ Assayによるマルチウェルフォーマットでの高感度検出
クリアボトムプレートに10% FBSを含むRPMI 1640でJurkatまたはHL-60細胞の段階希釈系列を調製した。Jurkat細胞はAnti-Fas mAb（終濃度100ng/ml）で3時間処理した。HL-60細胞はビンブラスチン（終濃度50μM）で3時間処理した。培地で希釈した溶媒をコントロールとした。Caspase-Glo™ 8または9 Reagentを各ウェルに添加した後、プレートを簡単に旋回振とうした。その後、室温でインキュベーションし、30分後にBMG FLUOstarまたはDynex MLX® ルミノメーターでそれぞれ測光した。各ポイントは3ウェルの平均±S.D.で表した。

まとめ

アポトーシスプログラムは異なる方向から活性化、ブロッキングされるため、疾病モデルでアポトーシス異常を誘導する因子を同定することは治療において有用です。Caspase-Glo™ Assayのホモジニアスな特性、感度、シンプル、操作性は重要な恒常性のメカニズムを注意深く解明する手助けをしてくれます。確立された他の手法（ウエスタンブロットング、免疫化学的な標識、RNA干渉など）と組み合わせで使用した場合、Caspase-Glo™ Assayによるカスパーゼ活性の測定は、アポトーシス過程のメカニズムに関する貴重な情報を与えてくれます。

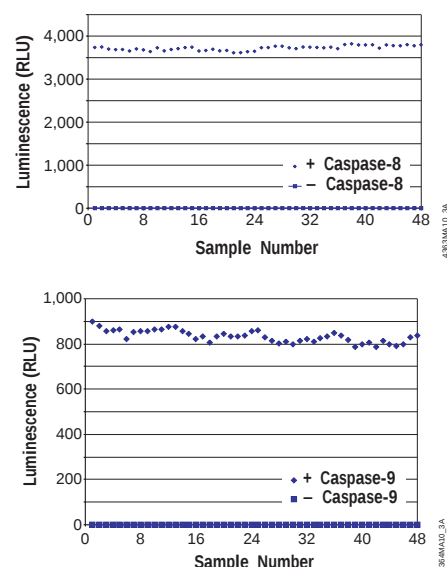


図6. HTSアプリケーションに適したCaspase-Glo™ Assay
Z' factor (8) は、リコンビナント カスパーゼ-8または-9 (Biomol) 10U/mlおよびカスパーゼを含まないバッファーをブランクとして使用し、算出した。アッセイはホワイト96ウェルプレート（48ウェル/サンプル、コントロール）で総容量200μl/ウェルで実施した。各プレートの半分のウェルはバッファーと精製カスパーゼ-8または-9（+Caspase-8または-9）を分注し、残りの半分はバッファーのみ（-Caspase-8または-9）を分注した。今回のアッセイでのZ' factorはそれぞれ0.957および0.903であった。

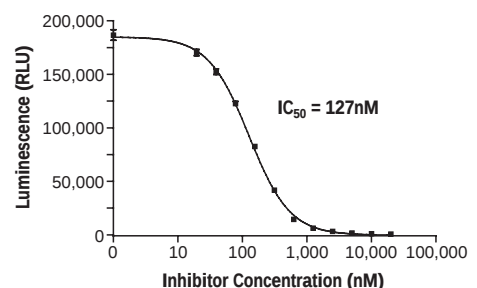


図7. Caspase-Glo™ Assayによる迅速で信頼性のある阻害力価決定
可逆的カスパーゼ阻害剤 Ac-LETD-CHO（sigma）を0.1% Prionex® Stabilizerを含む10mM HEPPES buffer（pH 7.4）で2倍段階希釈し、ホワイト96ウェルプレートに50μlずつ添加した。10U/mlリコンビナント カスパーゼ-8（Biomol）をプレートに等量加えた。旋回振とうにより混和し、阻害平衡に導いた（30分）。Caspase-Glo™ Reagent 100μl加え、BMG FLUOstarルミノメーターを用いて1時間で測光した。データはGraphPad Prism® softwareでグラフ化し、化合物のIC50を決定するために非線形回帰に適合させた。

参考文献

1. Earnshaw, W.C. *et al.* (1999) *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 383–424.
2. Stennicke, H.R. *et al.* (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 8359–62.
3. Boldin, M.P. *et al.* (1996) *Cell* **85**, 800–15.
4. Muzio, M. *et al.* (1996) *Cell* **85**, 817–27.
5. Stroh, C. *et al.* (1998) *Cell Death and Differ.* **5**, 997–1000.
6. Zou, H. *et al.* (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 11549–56.
7. Costantini, P. *et al.* (2002) *Cell Death and Differ.* **9**, 82–8.
8. Zhang, J.H. *et al.* (1999) *J. Biol. Screen.* **4**, 67–73.

製品案内については23ページをご覧ください。