

セルベースのカスパーゼアッセイ：データの解析について

By Martha O'Brien, Ph.D., Promega Corporation

カスパーゼアッセイはこの数年間に劇的に進歩しました。従来のセルベースのカスパーゼアッセイは感度が比較的低く、濃縮細胞抽出物を調製する必要がありましたが、今日ではカスパーゼアッセイはきわめて高感度になり、マルチウェル細胞培養プレートで直接アッセイすることができます。また、ホモジニアス発光アッセイ、蛍光アッセイの両バージョンが揃っています。こうした進歩に伴い、データ解析時により細心の注意が必要であるとの考えが新たに生じてきました。アポトーシスのパラダイムを構築する際や、ホモジニアスカスパーゼアッセイの結果を解析する際には、細胞システムについてのいくつかの特徴を考慮に入れる必要があります。発光Caspase-Glo™ Assayに関するいくつかの一般的な質問から、こうした特徴が浮き彫りになります。

Caspase-Glo™ 3/7 Assayは高感度であるため、血清中のカスパーゼ活性が検出できるほか、未処理細胞から生成する発光シグナルは同アッセイの直線範囲内に十分含まれます。

Q 未処理細胞中の発光「バックグラウンド」シグナルはなぜこのように高いのでしょうか？

アポトーシスは培養細胞の種類を問わず、自然発生的な比率で生じます。形質転換した不死化細胞は高い増殖速度を有します。これに付随してアポトーシスが高率に認められることは、形質転換細胞の適応機序のひとつではないかとの指摘が複数存在しています。栄養が限られた環境下では、こうした機序は生細胞数の安定化に役立つものと思われます (1)。機序を問わず、未処理細胞中のシグナルは本質的にカスパーゼ活性であって、非特異的シグナルと定義されるバックグラウンドではありません。未処理細胞が特異的カスパーゼ活性を有すること、ならびにその活性は「無細胞」対照を設けることによりバックグラウンドと区別できることを心得ておく必要があります。無細胞の培地が生成するシグナルを測定することにより、自然発生的なアポトーシスとは無関係なバックグラウンドがより正確に反映されます。細胞に無関係な発光シグナルの発生源は主に血清です。血清はカスパーゼ-3/7様の活性を有しますが、カスパーゼ選択性阻害剤により除去することができます。従来のカスパーゼアッセイ法では、マルチウェルプレート中の血清または典型的な未処理細胞群中のカスパーゼ活性は、検出下限未満、あるいは検出下限付近でした。この高感度なCaspase-Glo™ 3/7 Assay、血清中のカスパーゼ活性が検出できるため、未処理細胞から生成する発光シグナルは同アッセイの直線範囲内に十分収まることとなります。次の例には、発光Caspase-Glo™ 3/7 Assayの感度の高さが未処理細胞からのシグナルを相対的に高く見せる様子を示します。Caspase-Glo™ AssayとApo-ONE® Assayの比較では、発光シグナルに関しては未処理細胞と無細胞対照の間に明らかな差が認められる一方、蛍光シグナルに関しては未処理細胞が無細胞対照をわずかに上回るに過ぎないことが明らかになっています。図1には、未処理細胞が明らかにカスパーゼ-3/7活性を有することを示します。

表1. Caspase-Glo™ Assayは未処理細胞中の有意なカスパーゼ-3/7活性を検出する10%ウシ胎児血清を含むRPMI-1640中で増殖させたJurkat細胞を抗Fas抗体 (100ng/ml) 処理するか、未処理のままとした。細胞は96ウェルプレートに10,000 cells/wellの密度で分注した。抗Fas抗体で4時間処理後、Caspase-Glo™ 3/7 ReagentまたはApo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Reagentを両細胞群、ならびに細胞培地のみを分注した対照ウェルに添加した。1時間後 (発光アッセイの至適時間) 各アッセイに応じてルミノメーターまたはフルオロメーターによる測定を行った。

RLU = 相対発光ユニット (relative light unit) RFU = 相対蛍光ユニット (relative fluorescent unit) S.D. = 標準偏差 (standard deviation)

	Caspase-Glo™ Assay (RLU)			Apo-ONE® Assay (RFU)		
	Treated	Untreated	No Cells	Treated	Untreated	No Cells
RLU or RFU	143,757.5	17,380	2,136.3	2,804.8	1,565.3	1,419
S.D.	2663.5	719.6	82.3	235.7	30.8	38.1

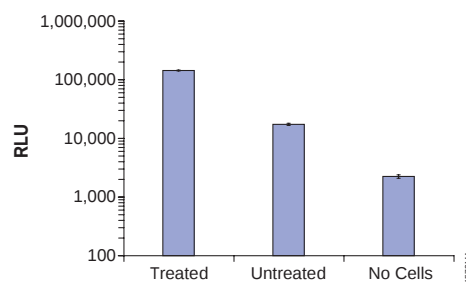


図1. 培養中の未処理細胞は有意なカスパーゼ-3/7活性を有する
表1に示したCaspase-Glo™ Assayの結果の対数プロット

Q Caspase-Glo™ Assayと他の方法はどのように比較したらよいのでしょうか？ シグナル/バックグラウンド比には、方法間で差がないようです。

上記のJurkat細胞を例にとれば、さまざまなパラメーターの解析によりアッセイを評価することができます。シグナル/バックグラウンド比、シグナル/ノイズ比はいずれも細胞アッセイの標準的な評価法であり、それぞれ別個の情報を提供します。シグナル/バックグラウンド比とは、平均シグナル/平均バックグラウンドの比率と定義されます。しかし、既報にあるように、細胞系のシグナル/バックグラウンド比はさまざまな定義方法があります。細胞系のシグナル/バックグラウンド比は通常、次のように定義されます。

$$\frac{(\text{処理細胞の平均シグナル}) - (\text{無細胞対照})}{(\text{未処理細胞の平均シグナル}) - (\text{無細胞対照})}$$

上記定義を用いれば、Caspase-Glo™ AssayおよびApo-ONE® Assayにより得られたJurkat細胞データに関するシグナル/バックグラウンド比は、それぞれ9.3および9.5です。これを図2に示します。絶対値は異なりますが、非特異的バックグラウンドを減じた後のシグナル/バックグラウンド比は等しくなります。このことから、両方法とも等しいカスパーゼ誘導率を示すと考えられます。発光アッセイとは異なり、蛍光アッセイでは絶対値が経時的に上昇します。シグナル/バックグラウンド比が主に提供する情報は、実験系におけるカスパーゼ活性の誘導率です。カスパーゼ誘導率は実験系の生物学的特性に依存しますが、アッセイの化学的特性には依存しませ

んので、処理細胞・未処理細胞間のシグナル/バックグラウンド比（無細胞対照を減じた条件）は、アッセイ方法を問わず等しくなるはず。シグナル/バックグラウンド比は、細胞パラダイムの評価、あるいは薬剤がカスパーゼ活性化に及ぼす影響のモニタリングにきわめて有効です。シグナル/バックグラウンド比からは、アッセイ感度に関する情報、アッセイの変動性に関する情報は得ることはできません。アッセイ間の感度の比較に関しては、シグナル/ノイズ比からより多くの情報が得られます。シグナル/ノイズ比は次のように定義されます (2)。

$$\frac{\text{平均シグナル} - \text{平均バックグラウンド}}{\text{バックグラウンドの標準偏差}}$$

シグナル/ノイズ比はアッセイにおけるバックグラウンドの変動性を明らかにします。バックグラウンドの標準偏差で除することから、シグナル/ノイズ比はさまざまな相対単位で表される各種測定機器からのデータを補正する方法としても使用できます。細胞系のバックグラウンドをどのように定義するかによって、シグナル/ノイズ比は3種類の方法で算出することができます。全3種類の算出法とも細胞系に関する情報を提供することができます。表2にこれらの定義が意味するところを示します。

表2の例2および例3に示したシグナル/ノイズ比は、処理細胞または未処理細胞をそれぞれ「無細胞」バックグラウンドと比較しています。これらの方法により、両細胞群の非特異的活性に対するカスパーゼ活性が測定されるため、感度の指標となります。1時間後の時点では、発光アッセイは蛍光アッセイより高いシグナル/ノイズ比を有します。インキュベーション時間を延長するほど、蛍光アッセイのシグナル/ノイズ比も上昇します。カスパーゼアッセイの検出限界はシグナル/ノイズ比で3（すなわち、バックグラウンドに対してバックグラウンドの標準偏差の3倍以上高いカスパーゼ活性）と定義することができます。表2に示す両アッセイの例では、シグナル/ノイズ比から、未処理細胞10,000個当たりのカスパーゼ-3/7活性は両アッセイの検出下限を上回ることが示唆されます（Caspase-Glo™ Assay = 185、Apo-One® Assay = 4）。

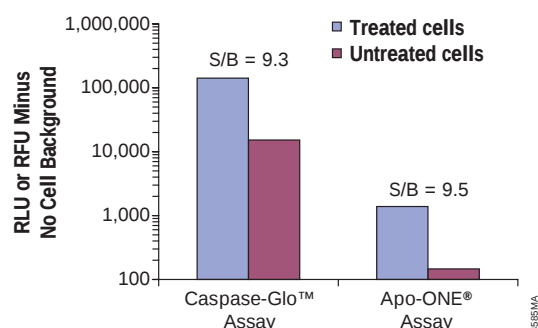


図2. 発光カスパーゼ-3/7アッセイと蛍光カスパーゼ-3/7アッセイのシグナル/バックグラウンド比は等しい
 表1に示した処理細胞および未処理細胞の結果から「無細胞」バックグラウンドをそれぞれ減じた。

表2. Caspase-Glo™およびApo-One® Assayのシグナル/ノイズ比の算出 算出には表1のデータを用いた。

	Signal/Noise	
	Caspase-Glo™ Assay	Apo-One® Assay
1. <u>処理細胞の平均シグナル - 未処理細胞の平均シグナル</u> 未処理細胞の標準偏差	176	40
2. <u>処理細胞の平均シグナル - 無細胞対照の平均シグナル</u> 無細胞対象の標準偏差	1,721	36
3. <u>未処理細胞の平均シグナル - 無細胞対照の平均シグナル</u> 無細胞対象の標準偏差	185	4

Caspase-Glo™ Assayを使用する場合、細胞系のシグナル/バックグラウンド比またはシグナル/ノイズ比はどのようにすれば改善できますか？

シグナル/バックグラウンド比およびシグナル/ノイズ比に影響を及ぼしうる因子は存在しますが、これらの比のほとんどの部分は細胞系の生物学的特性により規定されることに留意することが重要です。測定結果はカスパーゼの活性化程度により決定され、アッセイの化学的特性により変化することはありません。これらの比には、次の3要因が負の影響を及ぼします。

- 1) 処理細胞が生成する発光シグナルの飽和。シグナルがルミノメーターの測定限界に達すると、シグナル/バックグラウンド比およびシグナル/ノイズ比は見かけ上、低下します。
- 2) 細胞が健全でない場合には未処理細胞が生成するシグナルが上昇し、シグナル/バックグラウンド比およびシグナル/ノイズ比が見かけ上、低下します。一方、培養状態が不健全であると、アポトーシスがより早く誘導される場合があることも事実です。そのため、不健全な培養状態では変動性が極めて高くなることが予想されます。一般に、処理中の培養細胞の「健康状態」を最適化することで、最も一貫性の高い結果を得ることができます。
- 3) 再現性はシグナル/ノイズ比に劇的な影響を及ぼします。変動性が存在する中で意味するものを正確に捉えるためには十分な反復実験を行うことが重要です。

実験条件を変更することによりシグナル/バックグラウンド比およびシグナル/ノイズ比が改善される場合があります。このことが関連質問をもたらします。

他の方法ではカスパーゼ活性が認められているにもかかわらず、処置細胞と未処理細胞との間にカスパーゼ活性の差が認められていません。なぜでしょうか？

ライセートを用いるカスパーゼアッセイとは異なり、Caspase-Glo™ Assayは直接的なホモジニアスアッセイですので、タンパク質含量または細胞数に関する補正を行いません。カスパーゼシグナルに有意な影響を及ぼしうる細胞系のパラメータは、処理時間、処理薬剤の用量や種類などです。アポトーシスを起こした細胞は最終的に死に至るため、カスパーゼはやがて分解されます。このため、カスパーゼシグナルはピークを迎えた後、低下しはじめ、シグナル/バックグラウンド比が低下していきます。

薬剤はアポトーシス作用と増殖抑制作用を併せ持つ場合があります。このような薬剤を用いる場合には、薬剤処理の有無により、ア

アッセイ開始までの間にウェル当たりの細胞数に差が生じる可能性があります。未処理細胞では、細胞数が増加すると自然発生的に有意なアポトーシスが生じ、カスパーゼ活性も上昇することを念頭に置いてください。同様に、一部の処理細胞がアポトーシス経路を経て死に至ると、カスパーゼ活性は低下します。図3では予想通り、カスパーゼ活性と細胞数は直線関係にあることが示されています。実験系を構築しようとする場合には、細胞数の影響を考慮する必要があります。アッセイ時に処理ウェルと未処理ウェルの間で細胞数に偏りがあると、カスパーゼ活性がマスクされるおそれがあります。理想を言えば、アッセイはカスパーゼ活性がピークに達しているものの、処理ウェル・未処理ウェル間に細胞数の有意な差が生じる前のタイムポイントより開始するべきです。時間経過および用量反応曲線を慎重に検討すれば、このタイムポイントを特定できるはずですが、そうした対策を講じない場合には、パラレルなウェルで細胞生存性アッセイ（すなわち、CellTiter-Glo® Assay、CellTiter-Blue™ Assay、CellTiter 96® AQueous One Solution、あるいはCytoTox-ONE™ Assay）などの別個の方法を用いて細胞数による補正を行う必要があります。

Q Caspase-Glo™ Assayを使用する場合、細胞系のZ'-factorはどのように算出すればよいですか。また、Z'-因子からどのようなことがわかりますか？

シグナル/バックグラウンド比およびシグナル/ノイズ比のほか、Z'-factorもハイスループットスクリーニングアッセイの品質評価に広く使用されます。Z'-factorは次のように定義されます (2)。

$$1 - \left[\frac{\text{陽性対照のSD} \times 3 + \text{陰性対照のSD} \times 3}{\text{陽性対照の平均値} - \text{陰性対照の平均値}} \right]$$

細胞のカスパーゼをアッセイする場合には、処理細胞が陽性対照、未処理細胞が陰性対照に相当します。Z'-factorが0.5を超えれば、優れたアッセイであると考えられます。Z'-factorはシグナル/バックグラウンド比に関する情報を含み、アッセイのすべての変動性（バックグラウンドおよびシグナルの両方について）が加味されている、きわめて情報量の多い因子です。しかし、Z'-factorの算出条件が実際のスクリーニングを模したものである場合には、Z'-factorが実際のスクリーニングを反映するものに過ぎないことに留意することが重要です。アッセイの変動性に影響を及ぼす条件はすべてZ'-factorにも影響を及ぼします。

結 論

アポトーシスに関する細胞パラダイムを定義する際や、データを解析する際には、この新たな発光ホモジニアスカスパーゼアッセイの感度および直接的なアッセイであるという性質を考慮する必要があります。マルチウェルプレートの単一ウェルに分注された典型的な未処理細胞が有するカスパーゼ活性は、Caspase-Glo™ Assayの直線範囲内に十分含まれるため、意味を有するシグナルといえます。真のバックグラウンド（無細胞条件で得られたバックグラウンド）を定義する必要があり、データ解析時には、この区別を明確にする必要があります。シグナル/バックグラウンド比、シグナル/ノイズ比およびZ'-factorはいずれも有用なデータ解析法で、それぞれ別個の情報を提供します。本アッセイは直接的なアッセイであるため、結果を正確に解釈するためには細胞系に関するその他のパラメーターが必要とされます。ダイナミックなアポトーシス系を解析する場合、使用する細胞群に対する特定処理の時間および用量が及ぼす影響について考慮する必要があります。

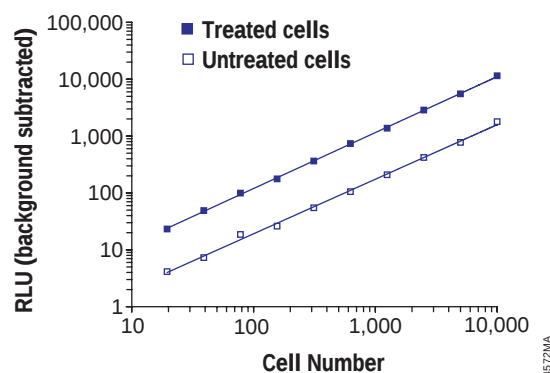


図3. カスパーゼ-3/7活性は細胞数と直線関係を有する
1%血清を含むOpti-MEM®培地中で増殖させたHeLa細胞は10～10,000細胞/ウェルの密度で培養し、キナーゼ阻害剤スタウロsporin処理（1μM）によりアポトーシスを誘導するか、溶媒対照で処理した。スタウロsporinで4.5時間処理後、Caspase-Glo™ 3/7 Reagentを両細胞群、ならびに培地のみ分注した対照ウェルに添加した。発光は1時間後に記録した。処理細胞および未処理細胞のRLU値から「無細胞」対照のRLU値をそれぞれ減じた。

参考文献

1. Dedov, V.N., Dedova, I.V. and Nicholson, G.A. (2004) *Cell Cycle* 4 (epub ahead of print).
2. Zhang, J.H., Chung, T.D. and Oldenburg, K.R. (1999) *J. Biomol. Screen* **4**, 67–73.

プロトコル

- ◆ Caspase-Glo™ 3/7 Assay Technical Bulletin #TB323, Promega Corporation. (www.promega.com/tbs/tb323/tb323.html)
- ◆ Caspase-Glo™ 8 Assay Technical Bulletin #TB332, Promega Corporation. (www.promega.com/tbs/tb332/tb332.html)
- ◆ Caspase-Glo™ 9 Assay Technical Bulletin #TB333, Promega Corporation. (www.promega.com/tbs/tb333/tb333.html)
- ◆ Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay Technical Bulletin #TB295, Promega Corporation. (www.promega.com/tbs/tb295/tb295.html)

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
Caspase-Glo™ 8 Assay	2.5ml	G8200	16,000
	10ml	G8201	60,000
	100ml	G8202	290,000
Caspase-Glo™ 9 Assay	2.5ml	G8210	16,000
	10ml	G8211	60,000
	100ml	G8212	290,000
Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay	1ml	G7792	6,000
	10ml	G7790	58,000
	100ml	G7791	250,000

10mlは96ウェルプレートで100ウェル分、384ウェルプレートで400ウェル分。バルク注文については弊社までお問合せ下さい。