

Light Up Your Calpain Activity

カルパインの活性生物発光アッセイ

By Martha O'Brien¹, Ph.D., Mike Scurria², Kay Rashka¹, B.S., Bill Daily², Ph.D., and Terry Riss¹, Ph.D. ¹Promega Corporation and ²Promega Biosciences, Inc.

アブストラクト

我々は、プロテアーゼであるカルパインIおよびIIを定量する非常に感度の高いアッセイ法を開発しました。Calpain-Glo™ Protease Assayは、サンプル中に存在するカルパイン量に比例した発光シグナルを生じる迅速で、ホモジニアスなアッセイシステムです。Calpain-Glo™ Protease Assayでは、組換え耐熱性ルシフェラーゼであるUltra-Glo™ Luciferaseを利用しており、感度が飛躍的に改善され、広い活性測定レンジを有しています。

カルパイン活性の量に比例した発光シグナルが得られます。このアッセイはカルパイン濃度のダイナミックレンジが広く、結果として非常に感度が高くなります（図2）。

in vitroにおいて最大値の半分の活性を示すに必要なカルシウム要求濃度は、カルパインIでは2~80μM、カルパインIIでは0.2~0.8mMです（8）。Calpain-Glo™ Protease Assayを用いてカルシウム滴定を行った結果、EC₅₀値はカルパインIで7μM（図3）、カルパインIIで0.6mM（データ未掲載）となりました。

急速に不活性化する酵素に最適な試薬

このホモジニアスな酵素連動フォーマットでは、カルパインとルシフェラーゼ酵素の活性は定常状態に達するので、発光シグナルも迅速にピークへ達し、5~10分で最大感度になります（図4）。カルパイン酵素はカルシウムによる活性化の後に自己分解して不活化するので、発光シグナルはカルパイン活性に直接比例していることから、その発光シグナルは減少します。図4のパネルAでは、広い濃度範囲におけるヒトカルパインIのシグナル減少の典型的な時間経過を示しています。室温におけるシグナルの半減期は、一般的にはカルパインIで30~70分（図4、パネルB）、カルパインIIで10~20分です。カルパインIとIIの不活性化率に影響を及ぼす要因は数多く、温度、イオン強度、pH、カルシウム濃度、そして酵素の供給源などが挙げられます（11）。これらの要因によってシグナルの半減期が決まります。カルパインIIの発光シグナルの半減期がより短いのは、2つの酵素の自己分解の違いと一致します（11）。このホモジニアス酵素連動フォーマットは、特にカルパインのような急速に自己分解する酵素に適しています。酵素が完全に活性を有している間に、迅速に最大感度へ達します。

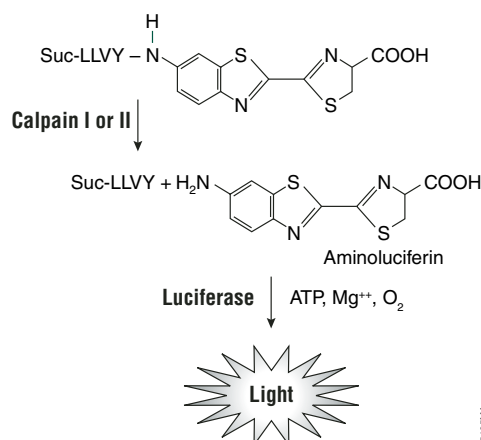


図1. カルパインによって認識されるSuc-LLVY配列を含む発光基質
カルパインによる切断に伴い、ルシフェラーゼの基質（アミノルシフェリン）が遊離し、ルシフェラーゼ反応がおきて発光する。

このホモジニアスな酵素連動フォーマットは、カルパインのように、急速に自己分解する酵素を測定する際、特に適しています。酵素が最大活性を有している間に、最高感度に達します。

はじめに

カルパインはカルシウムによって活性化されるシステインプロテアーゼの1ファミリーで、広範囲のタンパク質切断に関与しています。このファミリーには、あらゆる細胞に偏在するカルパインI (μ) とII (m)、そして非常に多くの組織特異的なカルパインが含まれています。カルパインは、プロテアーゼの限定分解によって基質となるタンパク質の生物学的活性を調節し、細胞運動や細胞周期の進行、細胞増殖、アポトーシス、ネクローシス、分化、膜融合や血小板活性化といった、非常に多くのカルシウムにより制御された細胞過程に関わっています（1-7）。カルパインはまた、数多くの病態にも関係していると考えられており、薬剤の重要なターゲットにもなっています（8-10）。カルシウム恒常性の欠如によってカルパイン活性の制御を失うと、心筋梗塞、脳卒中、脳損傷などが起こり、組織がダメージを受けます（3, 8）。これまで、カルパインの生理学的な基質を特定することは非常に難しいことでした。これはカルパインが迅速に自己分解し、カルシウムによる活性化の直後に不活性化されるため、カルパイン酵素の研究を困難にし、また、従来の蛍光や発色によるアッセイ法の感度や有効性に限界があったためです（3, 11）。

Calpain-Glo™ Assayの原理

Calpain-Glo™ Protease Assayは、カルパインIおよびIIの活性を測定するホモジニアスな蛍光アッセイです。Calpain-Glo™ Assayでは、カルパイン活性とルシフェラーゼ活性に最適なバッファー系で、発光を生じるスクシニル化カルパイン基質であるSuc-LLVY-アミノルシフェリンを用います。“添加-混合-測定”フォーマットにおいてたった1つのCalpain-Glo™ Reagentを加えるだけで、カルパインが基質を切断し、ルシフェラーゼ反応によって発光シグナルが発生します（図1）。Calpain-Glo™ Reagentは、独自に開発した熱安定性の高いルシフェラーゼ（Ultra-Glo™ Recombinant Luciferase）の性質を利用しています。このルシフェラーゼは、広範囲のアッセイ条件にわたり“グロータイプ”の発光シグナルを生じ、パフォーマンスを向上させます。カルパインによる基質切断とルシフェラーゼによる遊離アミノルシフェリンの消費が同時に進行する酵素連動システムによって、存在するカ

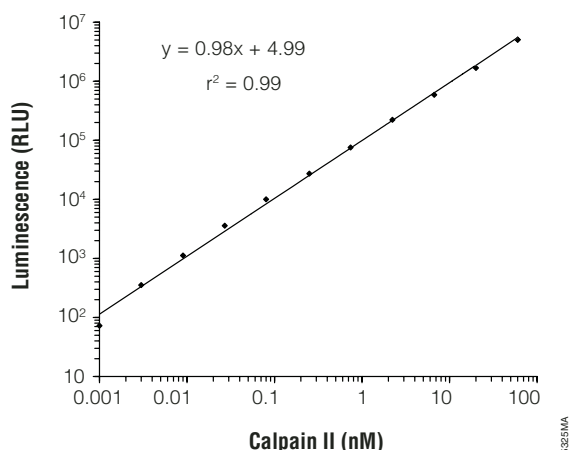


図2. カルパイン活性に比例した発光量

カルパインの滴定アッセイを、96ウェルプレートでCalpain-Glo™ Protease Assayを用いて行った。ラット組換えカルパインIIを10mM HEPES (pH 7.2)、10mM DTT、1mM EDTA+0.1% Prionex®で段階希釈した。Calpain-Glo™ Reagentを添加した5分後に、Veritas™ Microplate Luminometer上で相対発光量 (RLU) として発光を記録した。結果はカルパイン濃度4桁以上にわたり直線を示した ($r^2 = 0.99$ 、傾き = 0.98)。各ポイントは、4ウェルの平均値。それぞれの値はバックグラウンド (カルパインなしのブランク) を差し引いた値 (平均のブランクRLU = 995)。 r^2 と傾きは $\log_{10}$ - $\log_{10}$ プロットにデータを移した後に計算した。

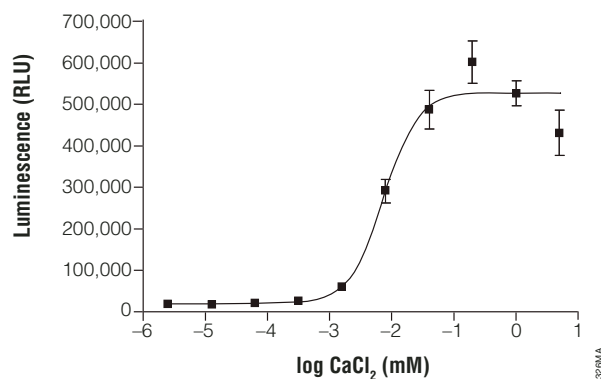


図3. 予想されたEC₅₀ 値を示したカルシウム滴定

カルシウム滴定は、Calpain-Glo™ Protease Assayを用いて行った。CaCl₂ は96ウェルのプレートで段階希釈し、ヒト-カルパインI (10nM) をバッファー (10mM HEPES [pH 7.2]、10mM DTT、1mM EDTA + 0.1% Prionex®) に添加した。Calpain-Glo™ Reagentを添加した5分後に、Veritas™ Microplate Luminometer上で相対発光量 (RLU) として発光を記録した。GraphPad Prism®ソフトウェアを用いて計算した結果、EC₅₀は7μM。

類似の蛍光アッセイよりも高感度

我々は、Suc-LLVY-AMC基質とFRET (fluorescence resonance energy transfer) ベースの基質、[H-Lys(FAM)-EVYGMK(Dabcyl)-OH]を用いて、発光法 Calpain-Glo™ Protease Assayと蛍光法 カルパインアッセイを比較しました (12)。Calpain-Glo™ Protease Assayは全てのタイムポイントにおいて他法より有意に高い感度を示しました (図5)。シグナル-ノイズ比 [(シグナル平均値-バックグラウンド平均値) / バックグラウンドの標準偏差] (13) を用いて、3種類の方法を比較しました。蛍光アッセイは切断された蛍光物質の蓄積を利用しているため、至適感度を得るためにより長い時間が必要となります。開始から12分後のCalpain-Glo™ Protease Assayのシグナル-ノイズ比は、30分後のFRETベースのアッセイよりも10倍高く、60分後のSuc-LLVY-AMCアッセイよりも1000倍高くなりました。同様に、検出できる下限についても、発光アッセイは非常に低い値となりました (図5)。Suc-LLVY-AMC基質では切断されたAMCが十分量 蓄積する前にカルパインが不活性化するため、ダイナミックレンジが非常に狭くなります。発光アッセイの感度は、カルパインの不活性化によって時間とともに低下しますが、1時間後でもシグナル-ノイズ比は蛍光カルパインアッセイよりも飛躍的に改善されていました。

カルパイン阻害剤のハイスループットスクリーニングに最適

アッセイの感度が高く、スピードが速いことから、Calpain-Glo™ Assayは阻害剤のスクリーニングにも適しています。化合物のライブラリーはDMSO中に保存されていることが多いため、アッセイにおけるDMSOの影響を調べました。2.5%の濃度までは、DMSOはアッセイに影響しませんでした。5% DMSOでのシグナルは26%だけ減少し、10% DMSOでのシグナルは54%減少しました (図6)。

Calpain-Glo™ Assayを用いて既知カルパイン阻害剤の試験も行いました (図7)。カルパイン阻害剤III (Z-Val-Phe-CHO) をDMSOに溶かし、バッファーで段階希釈したものを用いました。DMSOの最高濃度は0.1%でした。Z-Val-Phe-CHOは、Calpain-Glo™ Protease Assayでカルパインを強力に阻害しました。アッセイは、50% 阻害濃度 (IC₅₀) の正確な値を決める際にも使用することができます。

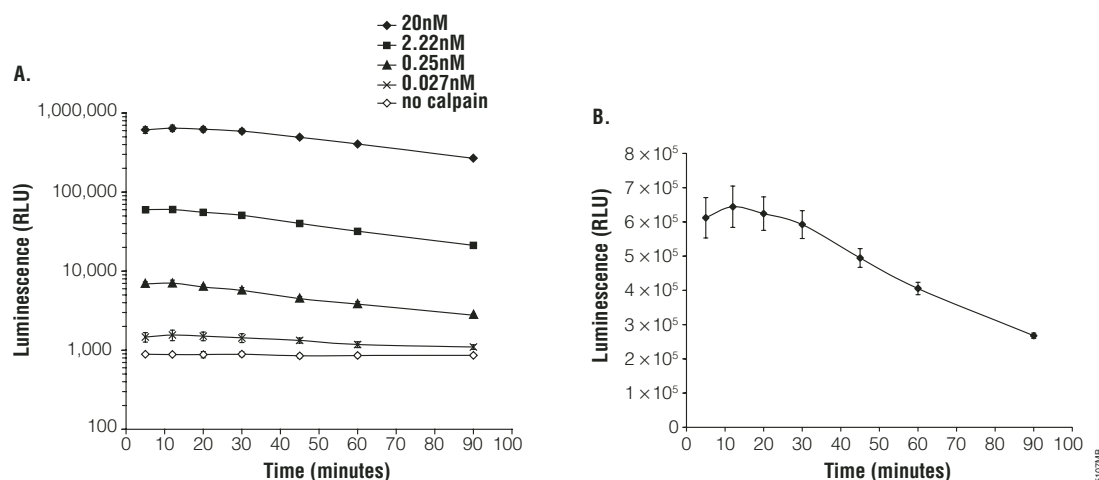


図4. Calpain-Glo™ Protease Assayのシグナル半減期

Calpain-Glo™ Assayを用いて、血漿からのヒトカルパインIを96穴プレートで滴定およびアッセイした。発光はVeritas™ Microplate Luminometer上で1.5時間にわたり様々なタイムポイントで記録した。パネルA：広いレンジ幅のカルパイン濃度においてシグナルは急速にピークに達し、その後は一様に減少した。パネルB：発光シグナルの半減期は60分以上（20nM カルパイン）。シグナルの減少は、主にカルシウム活性化後のカルパインの不活性化による。

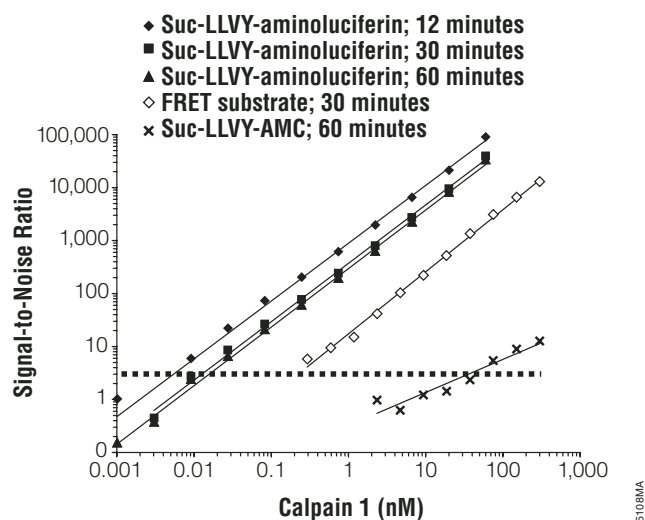


図5. 蛍光カルパインアッセイと比較した場合のCalpain-Glo™ Protease Assayの優れた感度

Calpain-Glo™ Assay、Suc-LLVY-AMC蛍光基質、またはFRETベースの基質、[H-Lys(FAM)-EVYGMK(Dabcyl)-OH]を用いて、ヒト-カルパインIを96穴プレートで滴定およびアッセイした。発光は試薬の添加後、Veritas™ Microplate Luminometerで様々なタイムポイントごとに記録した。蛍光はLabSystems Ascent fluorometerでモニタリングした。結果はシグナル・ノイズ比としてプロットした (7)。検出限界はシグナル/ノイズ比が3となるカルパイン量として定義した (点線)。生物発光アッセイでは、検出限界は12分で5pMであったが、FRETベースの蛍光アッセイでは30分後でも200pM、Suc-LLVY-AMC基質の検出限界は60分後で30nMであった (それより早い時間では、蛍光はバックグラウンドのレベルを超えなかった。)

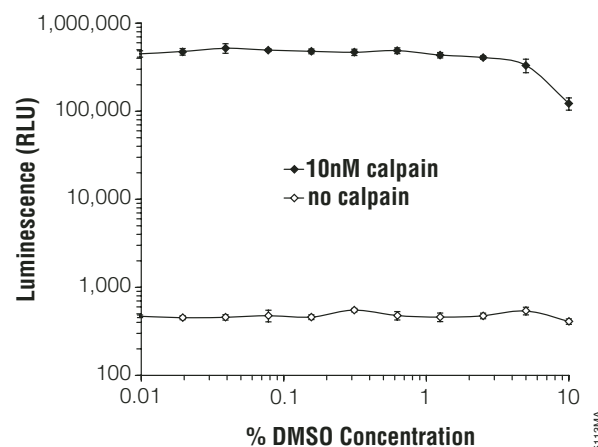


図6. Calpain-Glo™ AssayにおけるDMSOの影響

96ウェルプレート (50μl/ウェル) において、ヒト-カルパインI (10nM HEPES [pH 7.2], 10mM DTT, 1mM EDTA, 1mM EGTA + 0.1% Prionex®) と組み合わせてDMSOの滴定を行った。Calpain-Glo™ Reagent + 2mM CaCl₂を加え、発光は10分後にVeritas™ Microplate Luminometerで測定した。

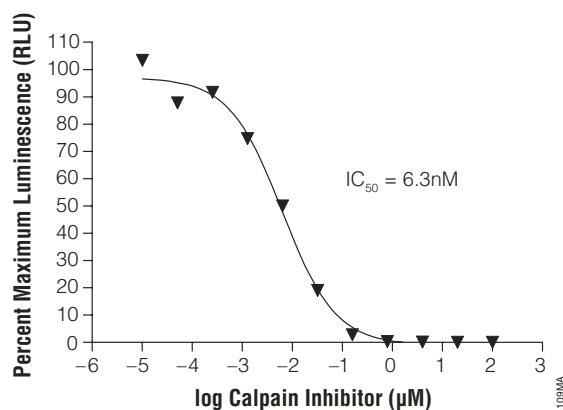


図7. IC₅₀ 値の決定

Calpain-Glo™ Protease Assayを用いてカルパインの競合阻害剤であるZ-Val-Phe-CHO (阻害剤III) の50% 阻害を示す阻害剤濃度 (IC₅₀) を決定した。阻害剤はDMSOに懸濁して段階希釈し、96ウェルプレートにおいて10mM HEPES (pH 7.2)、10mM DTT、1mM EDTA、1mM EGTA + 0.1% Prionex®中のヒト-カルパインI (20nM) と組み合わせた。Suc-LLVY-Glo™ Substrate を見かけ上のK_m値で用い、2mM CaCl₂をCalpain-Glo™ Reagentに加えた。発光は試薬添加後10分で測定し、GraphPad Prism®ソフトウェアを用いて計算した結果、IC₅₀は6.3nMであった。これは、Calbiochemによって示されているK_i値 (8nM; カタログ番号208722) によく一致していた。

結果

新しいCalpain-Glo™ Protease Assayは、生物発光を用いた初めてのカルパインアッセイです。このホモジニアスな酵素連動フォーマットは、カルパインのような急速に自己分解して不活性化する酵素に適しています。アッセイ感度は切断産物の蓄積には依存せず、カルパインによって切断された基質はすぐにルシフェラーゼによって変換され、カルパインとのインキュベーション後5~10分で発光強度が最大になります。アッセイの感度は従来の蛍光カルパインアッセイと比較すると非常に優れており (12,14)、カルパイン活性に対して広範囲な直線性を示すため少ない酵素量でも正確な結果を得ることができます。Calpain-Glo™ Protease Assayにより、迅速で感度が高く、正確なカルパインアッセイが実現します。

参考文献

1. Moldoveanu, T. *et al.* (2002) *Cell* **108**, 649–60.
2. Lokuta, M.A. *et al.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 4006–11.
3. Goll, D.E. *et al.* (2003) *Physiol. Rev.* **3**, 731–801.
4. Rami, A. (2003) *Neurobiol. Dis.* **13**, 75–88.
5. Suzuki, K. *et al.* (2004) *Diabetes Suppl.* **1**, S12–8.
6. Franco, S.J. *et al.* (2004) *Nat. Cell Biol.* **6**, 977–83.
7. Satish, L. *et al.* (2005) *Mol. Cell. Biol.* **25**, 1922–41.
8. Ray, S.K. *et al.* (2003) *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* **2**, 173–89.
9. Chen, M. *et al.* (2005) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **330**, 714–21.
10. Higuchi, M. *et al.* (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 15229–37.
11. Koohmaraie, M. (1992) *J. Anim. Sci.* **70**, 3071–80.
12. Mittoo, S. *et al.* (2003) *Anal. Biochem.* **319**, 234–8.
13. Zhang, J.H. *et al.* (1999) *J. Biomol. Screen.* **4**, 67–73.
14. Tompa, P. *et al.* (1995) *Anal. Biochem.* **228**, 287–93.

プロトコル

- ◆ Calpain-Glo™ Protease Assay Technical Bulletin #TB344, Promega Corporation.

www.promega.com/tbs/tb344/tb344.html

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
Calpain-Glo™ Protease Assay	10ml	G8501	55,000
	50ml	G8502	225,000