



ホモジニアスな生物発光法カスパーゼアッセイの開発

Review By: Kari Kenefick, M.S., Promega Corporation

Review of: O'Brien, M.A. et al. (2005) Homogeneous, bioluminescent protease assays: caspase-3 as a model. *J. Biomol. Screen.* 10, 137-48.

イントロダクション

細胞内で起こるアポトーシス（プログラム細胞死）のメディエーターであるカスパーゼは、薬剤開発において潜在的な標的として重要視されている分子です。カスパーゼ-3は“中心的な実行カスパーゼ”として認識されており、カスパーゼ-3の活性化はアポトーシス経路が不可逆的な段階へ進んでいることを示します。研究者の興味はカスパーゼの阻害と誘導の両方に注がれています。カスパーゼを阻害する能力は細胞内でのアポトーシス経路を遮断し、カスパーゼを誘導する能力はアポトーシスを誘導する可能性があります。そのためアポトーシスはがん治療と密接に繋がっています。

研究者がより経済的に新薬を開発するために製薬企業はハイスループットスクリーニング（HTS）を実施しています。自動化された液体分注システムでマルチウェルプレート进行处理することにより、数千の化合物を同時にテストすることができます。1回の自動化工程で試薬を添加できる迅速、高感度でホモジニアスなアッセイは、HTSには必須です。カスパーゼアッセイを行う従来の蛍光ホモジニアスアッセイでは、ペプチド結合蛍光基質の蛍光が残存することからバックグラウンドが上がるため感度に限界があり、ペプチド結合基質とその蛍光産物のスペクトルがオーバーラップするという問題がありました(1, 2)。

カスパーゼ活性測定のためのワン-ステップ発光アッセイの開発

本稿ではカスパーゼ活性測定のためのワン-ステップ・ホモジニアス発光アッセイの開発についてご紹介いたします。彼らはまずペプチド結合アミノルシフェリンである Z-DEVD-アミノルシフェリンを蛍光基質として合成し、この基質と安定な組換えホタルルシフェラーゼ Ultra-Glo™ Luciferase（非売品：Promega Corporation, 参考文献 3）を組合せました。この組換え酵素を用い、96および384ウェルプレートでセルベースを行うためのホモジニアスな発光アッセイを最適化しました。

最後に、ホモジニアス発光カスパーゼアッセイを、現在利用可能なホモジニアス蛍光アッセイと比較しました。各アッセイのシグナル/ノイズ比およびZ'-factor値を用いてアッセイ感度およびHTSシステムへの適正を比較しました。図1では、蛍光基質を用いた2つのアッセイとZ-DEVD-アミノルシフェリンを用いた発光アッセイを比較しました。アッセイは並行して行い、ルミノメーターまたはフルオロメーターを用いて複数の経過時間ごとに測定しました。シグナル/ノイズ比 (S/N) は試薬添加1または3時間後のデータをプロットしました。パネルAはカスパーゼ酵素のタイトレーションデータを、パネルBではanti-Fas処理したJurkat細胞を用いたデータを示しました。

パネルAでは、Z-DEVD-アミノルシフェリンを用いた場合の1時間後のS/N比は、(Z-DEVD)₂-R110よりも約80倍高く、Z-DEVD-AMC蛍光基質よりも1,000倍以上高い値を示しました。3時間後のS/N比の変化の割合は少なく、蛍光基質は(Z-DEVD)₂-R110の60倍以上、その他の蛍光基質の1,000倍以上の値を示しました。

パネルBでは、生物発光と蛍光の両アッセイはanti-Fas処理したJurkat細胞を用いて並行して実施しました。バックグラウンドレベルは細胞を含まない培地のみのウェルを用いた場合の値です。基質添加1時

間後のS/N比を比べると、発光アッセイの値は(Z-DEVD)₂-R110蛍光アッセイの値の20倍高いものでした。生物発光アッセイの検出限界は誘導細胞約30個で、蛍光アッセイでは約600個でした。

カスパーゼのタイトレーションデータおよびanti-Fas処理Jurkat細胞における誘導カスパーゼ検出のレビューは、ホモジニアスな生物発光法によるカスパーゼアッセイの感度および検出限界が同様のワンステップ蛍光アッセイよりも優れていることを示しました。また、Z'-factorのデータはホモジニアス・生物発光アッセイがHTSでの使用に適したZ'-factor値を生み出すことも示しました。

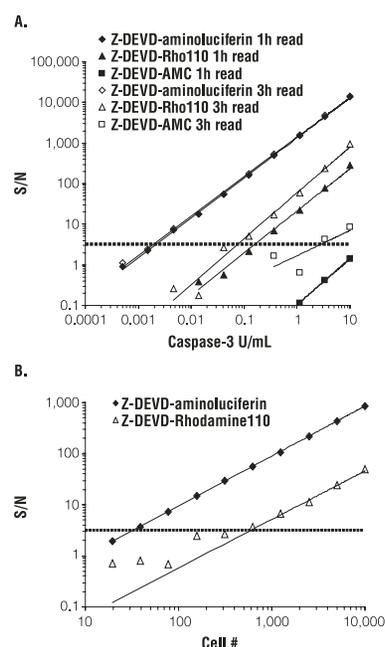


図1. 生物発光法または蛍光法によるカスパーゼアッセイの比較
Journal of Biomolecular Screening (SAGE publications) の許可を得て転載しました。

参考文献

- Leytus, S.P., Mehado, L.L. and Mangel, W.P. (1983) *Biochem. J.* **209**, 299-307.
- Liu, J. et al. (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**, 3231-6.
- O'Brien, M. et al. (2005) *J. Biomol. Screen.* **10**, 137-48.

プロトコル

- ◆ Caspase-Glo® 3/7 Assay Technical Bulletin #TB323
(www.promega.com/tbs/tb323/tb323.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