

Monitor GPCR Modulation of Cellular cAMP with an HTS, Bioluminescence-Based Assay



cAMP-Glo™ Assay: HTS生物発光ベースcAMPアッセイによるGPCR変調のモニタリング

By Said A. Goueli, Kevin Hsaio, and Jolanta Vidugiriene, Promega Corporation

アブストラクト

cAMP-Glo™ Assayは、細胞内cAMP濃度の変化を高感度(30 fmol ± 5 SEM cAMP/ウェル)、再現性良く(Z' >0.8) モニターするための生物発光アッセイです。本アッセイは、シングルチューブフォーマットまたはハイスループットスクリーニング (HTS) フォーマットによるcAMP濃度の測定に使用することができ、蛍光ベースのアッセイと比較して蛍光化合物による干渉を受けにくいという特長があります。本研究では、アデニレートシクラーゼ活性を変化させるGPCR (G_{α_s} および G_{γ_i}) について、それに対するアゴニストの EC_{50} 値およびアンタゴニストの IC_{50} 値を、cAMP-Glo™ Assayを用いて求めました。cAMP-Glo™ Assayは付着細胞、浮遊細胞、凍結細胞を問わず使用できるため、研究に柔軟性と利便性をもたらします。また、cAMP-Glo™ Assayは組織抽出液中のcAMP濃度の測定にも使用できます。

イントロダクション

Gタンパク質共役型受容体 (GPCR) は、ヒトゲノム最大の受容体ファミリーのひとつで、GPCRを標的とする薬剤は全処方薬の半数近くにのぼります(1)。これらの薬剤が標的とするGPCRは、特性が十分に検討されている40~50%のGPCRにすぎず、これより多くのGPCRは未だ十分に研究されていません。したがって、オーファン受容体に対する新規リガンドには、候補薬剤としてだけでなく、細胞生理解明の薬理学的ツールとして、その開発に強い関心が寄せられています。

GPCRに細胞外リガンドが結合すると、三量体Gタンパク質の高次構造が変化することにより、 G_{α} と $G_{\beta\gamma}$ 複合体タンパク質の解離が生じ、細胞内イベントのカスケードが始動します(2)。活性化された受容体と三量体Gタンパク質の相互作用が触媒となり、グアノシン三リン酸 (GDP) がグアノシン三リン酸 (GTP)に変換されます。この交換により、 $G_{\beta\gamma}$ 複合体から G_{α} -GTP複合体が解離し、 G_{α} -GTPと $G_{\beta\gamma}$ 二量体の両方が下流の各種エフェクターと相互作用できるようになります(2)。 G_{α_s} はエフェクターであるアデニレートシクラーゼを活性化することにより、cAMP濃度を上昇させる一方、 $G_{\alpha_{i/o}}$ はアデニレートシクラーゼの活性を阻害することにより、細胞内cAMP濃度を低下させます。

リガンド結合ベースのアッセイや、グアニンヌクレオチド変換の測定のみならず、受容体の機能的活性ベースのアッセイにも関心が集まっています。機能的活性ベースのアッセイには、レポーターベースのアッセイやセカンドメッセンジャー (cAMPまたはカルシウム) の細胞内濃度をモニターするアッセイが使用されます(3-5)。レポーターベースのアッセイの特長は、広範な直線性と高い感度にあり、弱いアゴニストやアロステリックモジュレーターを検出することができます(6,7)。しかし、長時間のインキュベーションを必要とするため、結果が偽陽性になりやすいほか、他のシグナル伝達経路との相互作用や、受容体の脱感作などの制約があります。シグナルがシグナル伝達経路により増幅されるため、弱いアゴニストが強力なアゴニストとして検出される可能性もあります。このような問題に対処するため、他の機能アッセイが誕生しています(8)。本稿では、cAMP-Glo™ Assayを用いた GPCR 変調のモニタリングについて報告します。このアッセイは、

細胞内cAMP濃度を測定することにより、アデニレートシクラーゼ活性を変調させるアゴニストおよびアンタゴニストのモニタリングに使用することができます。

アッセイの原理

cAMP依存性プロテインキナーゼ (PKA) はごく低濃度の cAMPにより活性化されるため、cAMP濃度の変化によりPKA の活性化に変化が生じると考えられます。PKAは不活性状態では、触媒サブユニット2個と調節サブユニット2個からなるヘテロ四量体として存在します。cAMP存在下で、調節サブユニットから触媒サブユニットが解離し、酵素活性を有する触媒サブユニット2個と調節サブユニット二量体1個に解離します。 G_{α_s} および G_{α_i} 共役受容体に変調すると、細胞内cAMP濃度に変化が生じるため、キナーゼアッセイを用いてPKAの活性化をモニタリングすることにより、GPCRの機能的活性を評価することができます(図1)。発光キナーゼアッセイを用いたこの手法の有用性を実証するため (9)、cAMPによるPKA活性化の EC_{50} 値を求めました(10,11)。本アッセイにより求めた EC_{50} 値は8.3 nMと、他の手法から得られた値(10,11)や、文献報告値と比較して遜色ないものでした(図2; 12)。20 nMまたは100 nM cAMP存在下におけるシグナル/ノイズ比はそれぞれ91および254で、本アッセイにより、ごく低濃度のcAMPを検出できることが示されました。 Z' -factor値 (再現性および頑健性に関する統計的な値; 13) は、384ウェルプレート、1536ウェルプレートを問わず0.8 以上 (表1) です。

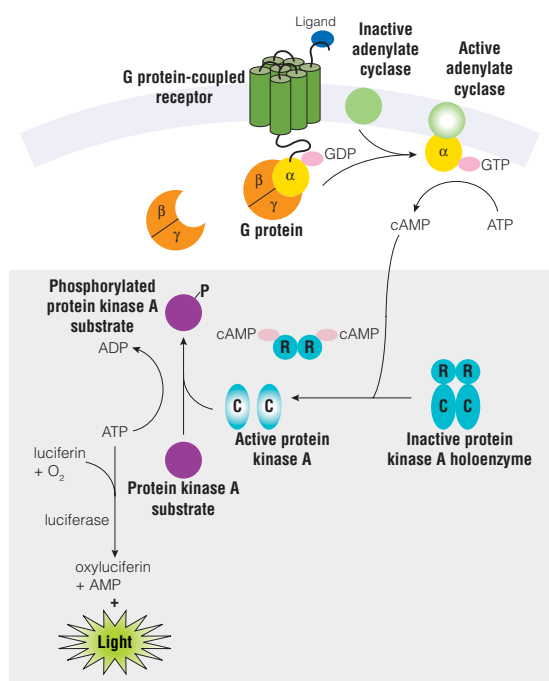


図1 . cAMP-Glo™ Assayの原理の概略図

GPCRにリガンドが結合すると、三量体Gタンパク質からGαおよびGβγ複合体への解離が引き起こされ、Gα-GDPがGTPに変換される。Gα-GTPはアデニレートシクラーゼ (AC) との相互作用により、AC活性を活性化 (G_{αs}) または阻害 (G_{αi}) する。細胞内cAMP濃度の変化により、ヘテロ四量体として存在する不活性化状態のcAMP依存性プロテインキナーゼ (PKA) が修飾され、調節サブユニット二量体から酵素活性を有する触媒サブユニット2個が遊離する。PKAの活性化は、キナーゼ反応におけるATP基質の減少によりモニターでき、残存するATPはルシフェラーゼ反応により定量できる。検出される発光量は細胞内cAMP濃度と反比例関係にある。したがって、G_{αs}タンパク質共役型受容体が活性化されると、相対発光量 (RLU) が低値となり、これらの受容体が阻害されるとRLUが高値となる。これに対して、G_{αi}タンパク質共役型受容体が活性化されると、RLUが高値となり、これらの受容体が阻害されるとRLUが低値となる。

フォルスコリンのタイトレーション

フォルスコリンは受容体およびGタンパク質と無関係にアデニレートシクラーゼを活性化するため、フォルスコリンの細胞内cAMP濃度に対する作用を検討しました。HEK293細胞にさまざまな濃度のフォルスコリンを添加し、15分間インキュベーションした結果、cAMP濃度が上昇し、EC₅₀値は4.38 μM (図3) と、文献値2.44 μM (8) と同等でした。Z'-factor値が0.7以上であったことから、本アッセイの再現性が裏づけられました(表1)。

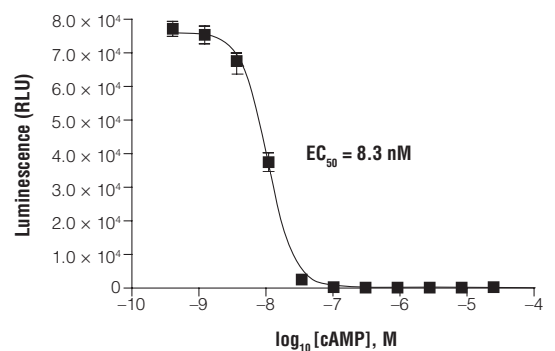


図2 . cAMP濃度がPKA活性化に与える影響

cAMP濃度が上昇すると、PKAが活性化する。PKA活性の上昇は、相対発光量 (RLU) と反比例関係にある。PKA反応は参考文献18に示す方法で実施し、PKA活性はKinase-Glo® Reagentを用いて検出した(18)。データは平均±SEM (n=3) で表示する。

Gαsタンパク質共役型受容体の評価系としてのアッセイ性能

Gαsタンパク質共役型受容体の評価系におけるcAMP-Glo™ Assayの有効性を確認するために、ドーパミン (D1) 受容体を発現するD293細胞を作製しました。図4のパネルAに示すように、D1受容体アゴニストをさまざまな濃度で試験し、用量反応曲線を作成することにより、各被験アゴニストのEC₅₀値を求めました。ドーパミン、SKF38393、アガモルヒネおよびSKF82958のEC₅₀値は、それぞれ35.7 nM、78.1 nM、89.3 nMおよび23.4 nMでした。

表1 . cAMP¹ (0、20または100 nM) を含有する溶液と、ドーパミン² (0または100 nM) またはフォルスコリン (0、5または100 μM) を含有する培地中のDRD1細胞で得られた誘導倍率およびZ'-Factor値

添加した化合物 (濃度)	誘導倍率	Z'-Factor 値
cAMP (20 nM)	91	0.84
cAMP (100 nM)	254	0.85
ドーパミン (100 nM)	25.5	0.86
ドーパミン ³ (100 nM)	15	0.63
フォルスコリン (5 μM)	8	0.70
フォルスコリン (100 μM)	26.6	0.88

1 PKAのホロ酵素、ATP、ペプチド基質およびバッファーを含む反応液にcAMPを濃度0、20または100 nMで添加し、20分間インキュベーション後、Kinase-Glo® Reagentを添加した。PKAの活性化を参考文献18に示す方法でモニタリングした。誘導倍率は、対照 (溶媒のみ) で得られたRLUシグナルを、cAMP 20または100nM存在下で得られたRLUシグナルで除することにより算出した。

2 DRD1を安定的に発現する細胞を384ウェルプレートに5,000個/ウェルになるよう播種し、ドーパミンまたはフォルスコリンでインキュベーション後、所定の処理を行い、cAMP-Glo™ AssayによりcAMP濃度を測定した。

3 DRD1を安定的にトランスフェクトした細胞を、1536ウェルプレートに2,500個/ウェルになるよう播種し、ドーパミン添加条件または非添加条件でインキュベーションした。誘導倍率は、対照 (溶媒のみ) で得られたRLUシグナルを、ドーパミンまたはフォルスコリン添加条件で得られたRLUシグナルで除することにより算出した。Z'-factor値は参考文献17に示す方法で算出した。

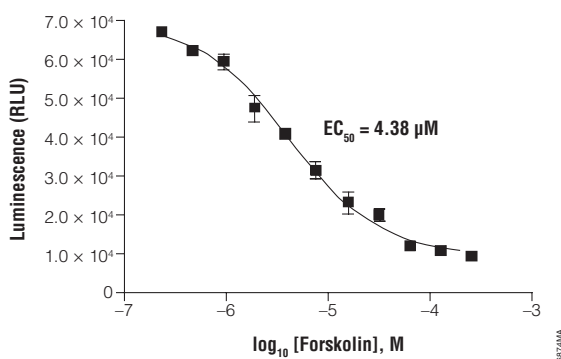


図3．HEK 293細胞を用いたフォスコリンのタイトレーション
384プレートに播種したHEK 293細胞 (5,000個/ウェル) にさまざまな濃度のフォスコリンを添加してインキュベーションした後、参考文献 18に示す方法で処理し、cAMP検出に供した。データは平均±SEM (n = 3) で表示する。

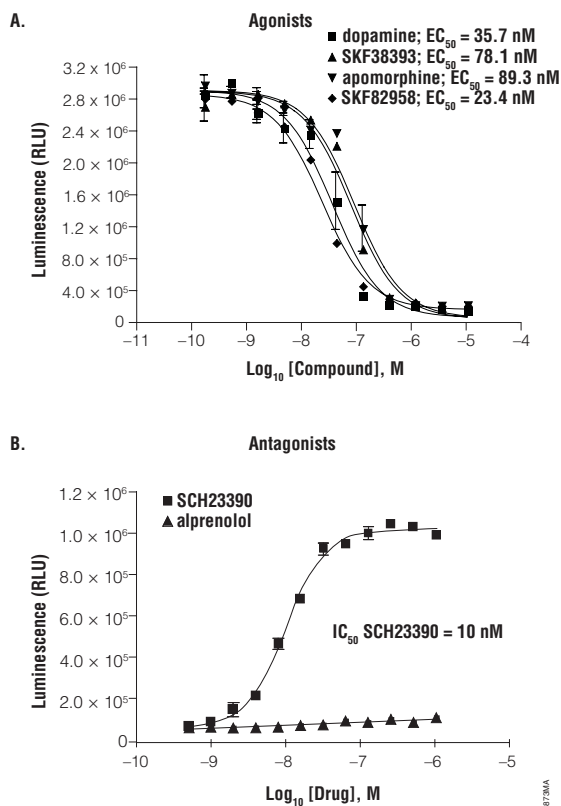


図4．D1受容体アゴニストとアンタゴニストのタイトレーション
パネルA．アゴニスト。ドーパミンD1受容体を安定的に発現するD293 細胞 (DRD1; 5,000個/ウェル) を384ウェルプレートで一晩、80%コンフルエントになるまで培養した。培地を除去した後、さまざまな濃度のアゴニストを含有する誘導バッファーを添加し、さらに30分間インキュベーションした。続いて、溶解バッファーを添加し、参考文献18に示す方法でcAMP濃度をモニタリングした。データは平均±SEM (n = 3) で表示する。パネルB．アンタゴニスト。ドーパミンD1受容体を安定的に発現するD293細胞 (5,000個/ウェル) をインキュベーションし、参考文献18に示す方法で処理した。誘導バッファーは、ドーパミン100 nM およびさまざまな濃度のアンタゴニスト (SCH23390) または対照化合物 (-) を含有する。データは平均±SEM (n = 3) で表示する。

これらの値は、¹²⁵I-標識cAMPを用いた競合ラジオイムノアッセイにより測定されたこれらのアゴニストの文献値(14) と一致します。また、一定濃度のアゴニスト (100 nM ドーパミン) 存在下で、さまざまな濃度のD1アンタゴニストを添加し細胞をインキュベーションすることにより、D1アンタゴニストに対するD1受容体の反応も試験しました。アンタゴニストの反応曲線は用量依存性で、SCH23390に関して得られたIC₅₀値10 nM (図4、パネルB) は、放射性標識物を用いた競合的結合アッセイにより報告されたIC₅₀値(15)と同等です。予想どおり、アルブレノロール (既知のβ-アドレナリン作動性受容体アンタゴニスト) による阻害は認められませんでした。Z'-factor値は、96ウェルプレートおよび384ウェルプレートを用いた場合で0.8以上、1536ウェルを用いた場合で0.63であり、本アッセイの高い性能が浮き彫りになりました(表1)。

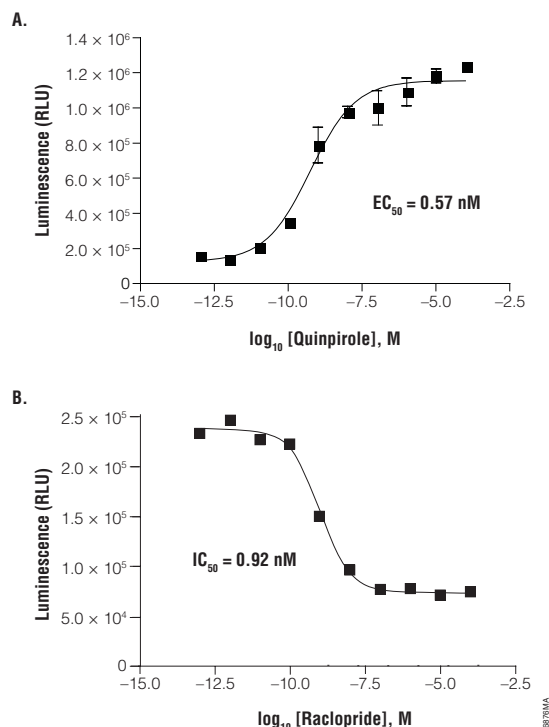


図5．D2受容体アゴニストとアンタゴニストのタイトレーション
パネルA．ドーパミンD2受容体アゴニスト (キンピロール) のタイトレーション。ドーパミンD2 (DRD2) 受容体を安定的にトランスフェクションしたD293細胞 (5,000個/ウェル) を、10 μMフォスコリンおよび漸増濃度のD2アゴニスト (キンピロール) を含有する誘導バッファーで誘導後、細胞を溶解し、参考文献18に示す方法でcAMPを検出した。データは平均±SEM (n=3) で表示する。パネルB．ドーパミンD2受容体アンタゴニストのタイトレーション。DRD2を安定的にトランスフェクションした D293 細胞 (5,000個/ウェル) を、10 μMフォスコリン、10 nMキンピロールおよびさまざまな濃度のラクロプライドを含有する誘導バッファーで誘導した。細胞を参考文献18に示す方法で処理した。データは平均±SEM (n = 3) で表示する。

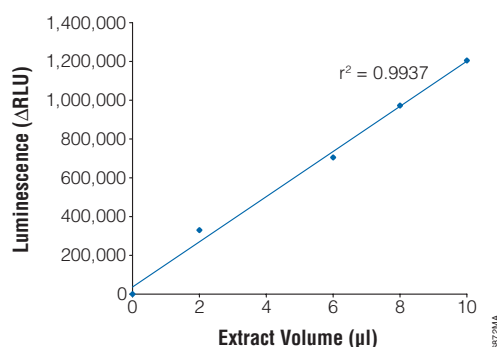


図6. 組織抽出液の cAMP-Glo™ Assay

ラット脳抽出液2 ml/gmを、0.5 mM IBMXおよび100 μM Ro20-1724を含有するcAMP-Glo™ Lysis Bufferでホモジナイズし、70 °Cで5分間加熱した。0、2、4、6、8および10 μlのサンプルに等量の Krebs Ringerバッファーを添加した後、cAMP-Glo™ 反応バッファーを添加することにより試験を行った。反応液を室温で20分間インキュベーションした後、等量のKinase-Glo® Reagentを添加した。10分後の相対発光量を測定し、溶解バッファーのみのRLU値から各サンプルのRLU値を減じることで、ΔRLUを算出した。ΔRLU = RLU (0 μl) - RLU (サンプル)

Gα_iタンパク質共役型受容体の評価系としてのアッセイ性能

D2受容体を安定的に発現するD293細胞の選択的D2アゴニスト (キンピロールなど) に対する反応は、10 μMフォルスコリンおよび漸増濃度のアゴニストを添加して37 °Cで15分間インキュベーションすることにより試験しました。図5のパネルAに示すように、キンピロールのEC₅₀値は0.57 nMと、ラット脳のD2受容体に対する放射性標識キンピロールの結合により検討された文献報告値(16) と同等です。アンタゴニストの試験にも同様の実験デザインを使用しました。ただし、細胞は10 μMフォルスコリン、10 nM D2アゴニスト (キンピロール) および漸増濃度のアンタゴニスト (ラクロブライド) を添加しインキュベーションしました。この実験では、フォルスコリンによるcAMP 濃度上昇作用を抑える一定濃度のアゴニスト (キンピロール) に対する反作用をアンタゴニストの機能的活性としてモニターしました。したがって、真のアンタゴニストは、用量増加に伴って、細胞内cAMP濃度を上昇させるはずですが、図5のパネルBに示すように、D2受容体アンタゴニスト (ラクロブライド) に関して得られたIC₅₀値は0.92 nMと、放射性標識物を用いた競合的結合アッセイを用いて検討された文献報告値と同等です(17)。

cAMP-Glo™ Assayを、付着細胞、浮遊細胞および凍結細胞のGα_sおよびGα_iタンパク質共役型受容体の評価系として検討したところ、アゴニストのEC₅₀値およびアンタゴニストのIC₅₀値がいずれも同等であったことから (データ未掲載)、本アッセイは利便性および柔軟性を備えた方法であることが改めて示されました。

組織抽出液中のcAMP測定

ラット脳をホスホジエステラーゼ阻害薬を含む溶解バッファーでホモジナイズし、70 °Cで5分間加熱後、系列希釈した抽出液を用いてcAMP濃度を測定しました。ラット脳抽出液を用いた典型的な実験結果を図6に示します。このプロトコルは肝臓、心臓といったラットの他の組織を用いても問題なく使用することができました (データ未掲載)。

結論

発光cAMP-Glo™ Assayは、細胞内または組織内cAMP濃度の変化を頑健かつ簡単にモニタリングすることができます。本アッセイは、シングルチューブから高密度プレートまで、あらゆる実験規模に適合することから、HTSアプリケーションに強く望まれる特性である柔軟性および利便性を備えているといえます。

参考文献

- Ellis, C. (2004) *Nature Rev. Drug Dis.* **3**, 577–626.
- Milligan, G. and Kostenis, E. (2006) *Brit. J. Pharmacol.* **147**, S46–S55.
- Leifert, W.R. *et al.* (2005) *J. Biomol. Screen.* **10**, 765–79.
- Thomsen, W. *et al.* (2005) *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 655–65.
- Niedernberg, A. *et al.* (2003) *J. Biomol. Screen.* **8**, 500–10.
- Dinger, M.C. and Beck-Sickinger, A.G. (2002) *Mol. Biotech.* **21**, 9–18.
- Wise, A. *et al.* (2004) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **44**, 43–66.
- Gabriel, D. *et al.* (2003) *ASSAY and Drug Dev. Technol.* **1**, 291–303.
- Goueli, S.A. *et al.* (2006) In: *Handbook of Assay Development in Drug Discovery*. Minor, L.K., (ed.), pp. 97–111, CRC Taylor & Francis, Boca Raton, FL, USA.
- Goueli, B.S. *et al.* (1995) *Anal. Biochem.* **225**, 10–17.
- Kupcho, K. *et al.* (2003) *Anal. Biochem.* **317**, 210–7.
- Taylor, S.S. *et al.* (2005) *Biochim. Biophys. Acta.* **1754**, 25–37.
- Zhang J-H. *et al.* (1999) *J. Biomol. Screen.* **4**, 67–73.
- Ryman-Rasmussen, J.P. *et al.* (2005) *Mol. Pharmacol.* **68**, 1039–48.
- Iorio, L.C. *et al.* (1983) *J. Pharm. Exper. Therap.* **226**, 462–8.
- Levant, B. *et al.* (1992) *J. Pharm. Exper. Therap.* **262**, 929–35.
- Kohler, C. *et al.* (1985) *Biochem. Pharmacol.* **34**, 2251–9.
- Kumar, M. *et al.* (2007) *ASSAY and Drug Dev. Technol.* **5**, 237–45.

プロトコル

- ◆ cAMP-Glo™ Assay Technical Bulletin, #TB357, Promega Corporation
www.promega.com/tbs/tb357/tb357.html

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
cAMP-Glo™ Assay	300 assays	V1501	48,000
	3,000 assays	V1502	260,000
	30,000 assays	V1503	お問合せください