

Improve the Quality and Specificity of Cell-based Caspase-Glo® 8 and 9 Assays with a Protease Inhibitor



プロテアーゼ阻害剤添加によるCaspase-Glo® 8 & 9 Assayのパフォーマンスの向上

By Rich Moravec, Julie Chancellor, Sandra Hagen, Brian McNamara, Pam Guthmiller and Terry Riss, Promega Corporation

アブストラクト

本稿では、プロテアーゼ阻害剤の使用によるカスパーゼ-8および-9セルベースアッセイにおける非特異的なバックグラウンドの低減およびデータのばらつきに対する著しい改善について報告いたします。

イントロダクション

数多くの既知カスパーゼに対するペプチド基質の特異性は、ポジショナルスクランニング合成法によるコンビナトリアルライブラリー技術(1)により決定されてきた歴史的背景があります。これらの先駆的な実験の中では、アスパラギン酸-アミノメチル-クマリン (Asp-AMC) が末端となり、残りのP2-P4の各位置に20種類の異なるアミノ酸が割り当てられた蛍光テトラペプチド配列が用いられました。様々な組換えカスパーゼとともにインキュベーションした後、著者はカスパーゼ1-9の基質に最適な配列を決定することができました。これら最適化された配列の妥当性や適用性は今日でも通用し、広く使われ続けており、poly(ADP-リボース) ポリメラーゼ、DNA依存性プロテインキナーゼや70kDa U1低分子リボヌクレオプロテインなど多くの既知カスパーゼ高分子基質配列とも良く相関しています。

Ac-LETD-AMCおよびAc-LEHD-AMCは、カスパーゼ-8および-9の最適な蛍光基質であることが明らかであるため、Caspase-Glo® -8および-9 Assayにはそのアミノシルフェリンバージョンが導入されました。バッファー条件はカスパーゼ活性、発光シグナルに最適化され、培養細胞で使用できるようにするために強力な溶解作用のある界面活性剤も含まれています。組換え酵素を用いてこれらのアミノシルフェリン基質とその対照となるアミノメチルクマリンを直接比較した結果、Caspase-Glo® -8および-9 Assayの両方で蛍光アッセイよりも約100倍以上感度が高いことが示されました(2)。この感度における利点は、細胞ベースアッセイにおける1液添加方式のホモジニアスなカスパーゼ活性検出を標準的な細胞密度で実施することを可能にしています。

しかし、細胞ベースのプロテアーゼアッセイは、多くのプロテアーゼが競合物として存在する複雑な状況を強いられます。LEHDなど“人工的”な基質を利用する場合、基質の配列やアッセイバッファー組成(pH、塩類、安定化剤、界面活性剤など)の選択によって特定酵素の特異性や活性に対してある程度狙いを絞ることはできますが、完全かつ絶対的というわけではありません。

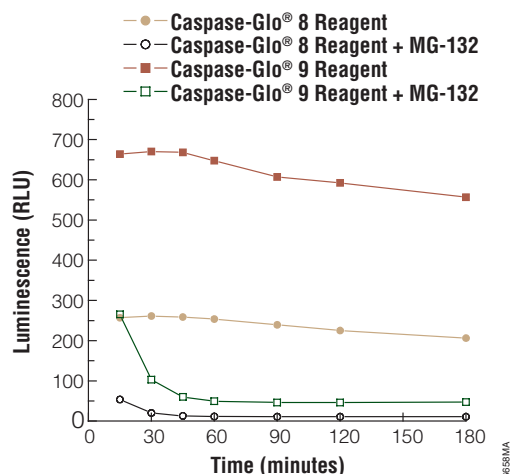


図1. MG-132で補完されたCaspase-Glo® Reagentは細胞における非特異的な発光を低減する

Caspase-Glo® 8および9シグナルの挙動および非特異的な細胞内バックグラウンドの阻害に関する実験は、U266細胞を用いて行った。未処理の細胞は、10% FBSおよび1mM ビルビン酸ナトリウムを含むRPMI 1640培地で培養した。細胞は96ウェルプレートで1ウェルあたり25,000個 播種した。加湿したインキュベーター(37 °C、5% CO₂)で3時間平衡化した後、Caspase-Glo® 8または9 ReagentにMG-132阻害剤 (+) または等量のDMSO ビークル(-)を添加したものを調製した。使用前に22 °C、30分間平衡化し、その間アッセイプレートも同様に22 °Cで平衡化した。試薬を添加し、プレートを振とう攪拌した。発光はDynex MLX® plate luminometerで長時間記録し、プレートは測光後すぐに22 °Cのウォーターバスに戻した。細胞を除いた培地をバックグラウンドコントロールとして使用し、このバックグラウンド発光値を細胞から得られたデータの各セットより差し引いた。

全てのカスパーゼは、アスパラギン酸の後部を切断する強力な特異性を有しています。細胞ベースのアッセイにおいてカスパーゼ基質としてLETDあるいはLEHD配列を用いた場合、プロテアソームのカスパーゼ様活性による交差反応への懸念が生じます。プロテアソームは真核細胞の細胞質および核に存在します。20Sプロテアソームの活性はATP非依存性で、ユビキチン化に関わらずLETDやLEHD (P1にアスパラギン酸残基が位置するその他のカスパーゼ基質も同様)などの短鎖ペプチド基質を切断することができます。我々は細胞ベースの実験で発光 Caspase-Glo® 8または9 Assayを用いる場合に、プロテアーゼ阻害剤 MG-132をCaspase-Glo® Reagentに補足することで顕著な非特異的なバックグラウンドシグナルを抑制できることをつきとめました。求められるカスパーゼ活性を維持しながら非特異的なプロテアーゼ活性やバックグラウンドを抑えることにより、アッセイにより得られた結果の質と信頼性を向上させることができます。

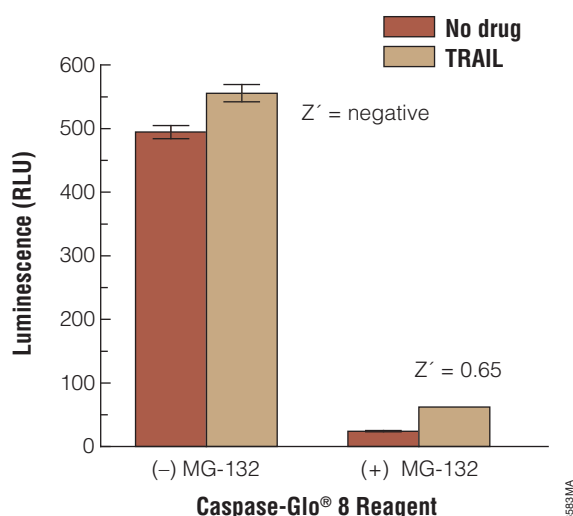


図2. Caspase-Glo® 8データの質と信頼度の向上

U937細胞（ウェルあたり15,000個の細胞を10% FBSおよび1mM ビルビン酸ナトリウムを含むRPMI 1640培地で培養した。）を96ウェルプレートの各ウェルに90 µl播種した。その後、細胞は一昼夜37 °C、5% CO₂で培養した。溶解性組換えTRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand; Biomol) を培地で10 µg/mlに希釈し、プレートの一部のウェルに10 µlを添加し、他のウェルには培地のみを10 µl添加した。アポトーシスは37 °C、5% CO₂で5時間アポトーシスを誘導した。プレートは22 °Cで30分平衡化した後、MG-132阻害剤添加または無添加のCaspase-Glo® 8 Reagentをウェルあたり100 µl添加した。発光は、試薬添加1時間後にDynex MLX® luminometerで測定した。アッセイの質が向上したことを示すために、MG-132添加、無添加でのZ'-factor値を決定した。各試薬とも、培地のみで処理した細胞を含む16ウェル分とTRAILで処理した細胞を含む16ウェル分を実施した。MG-132無添加の試薬で得られたZ'-factor値はネガティブ。MG-132を添加した試薬では、バックグラウンドが著しく低下し、Z'-factor値が0.65にまで改善された。

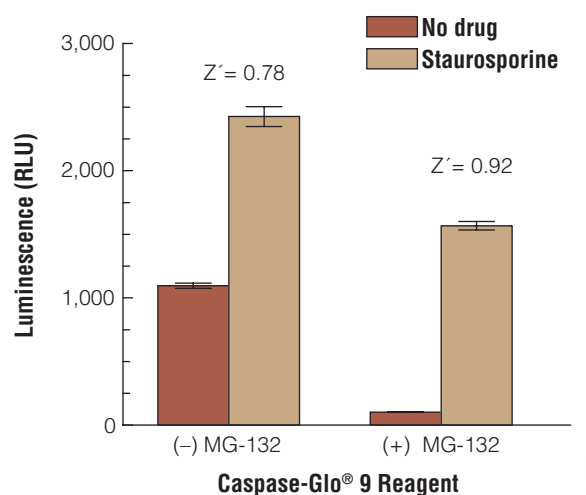


図3. Caspase-Glo® 9データの質と信頼度の向上

Jurkat細胞（ウェルあたり25,000個の細胞を10% FBSおよび1mM ビルビン酸ナトリウムを含むRPMI 1640培地で培養した。）を96ウェルプレートの各ウェルに90 µl播種した。その後、細胞は37 °C、5% CO₂で2時間平衡化した。スタウロスポリンを培地で50 µg/mlに希釈し、プレートの半分のウェルに10 µlを添加し、残りの半分のウェルには培地に溶解したDMSOを10 µl添加した。アポトーシスは37 °C、5% CO₂で3時間誘導した。プレートは22 °Cで30分間平衡化した後、MG-132阻害剤添加または無添加のCaspase-Glo® 9 Reagentをウェルあたり100 µl添加した。発光は、試薬添加45分後にDynex MLX® luminometerで測定した。アッセイの質が向上したことを示すために、MG-132添加、無添加でのZ'-factor値を決定した。各試薬とも、ピークルのみで処理した細胞を含む24ウェル分とスタウロスポリンで処理した細胞を含む24ウェル分を実施した。MG-132無添加の試薬で得られたZ'-factor値は0.78。MG-132を添加した試薬では、バックグラウンドが著しく低下し、Z'-factor値が0.92にまで改善された。

MG-132の任意的な使用

ペプチダルデヒドMG-132 (Z - Leu - Leu - Leu - CHO) は、カルパインとカテプシンと同様にプロテアソームに対する強力な可逆的阻害剤で (3, 4)、現在Caspase-Glo® 8および9 Assayに構成成分として添付されています。Caspase-Glo® 8および9 Reagentにこの阻害剤を追添することにより、細胞ベースのアッセイにおける非特異的なバックグラウンドを低減することができます。図1のデータは、未処理の健常な細胞では、MG-132阻害剤を含む試薬を使用することにより90%以上の発光シグナルが阻害されることを示しています。MG-132阻害剤含有試薬を添加した後、プロテアソーム活性は急激に阻害され、発光量も減少しました。細胞の培養条件に依存しますが、阻害のピークおよび発光シグナルの安定化は、通常Caspase-Glo® Reagent添加30 ~ 60分後に得られます。

細胞ベースアッセイにおける定量性の向上

アッセイ法を比べると、良質なアッセイ法はばらつきがほとんど無く、広いダイナミックレンジを有しています。非特異的なバックグラウンドが全体的に大きく低下した結果、MG-132を添加したCaspase-Glo® Reagentを用いた場合のZ'-factor値が全般的に改善されました (図 2, 3)。Z'-factorの値は、データの変動やシグナルのダイナミックレンジの変化に対して鋭敏です (5)。ここでは、シグナルのダイナミックレンジ (アポトーシス誘導処理あるいは未処理の細胞間で生じるRLUの違い) は、試薬へのMG-132添加、無添加に関わらず比較的一定に維持されていました。MG-132を追補したCaspase-Glo® 8および9 Reagentは、組換えカスパーゼ-8および-9を用いたアッセイに影響を与えませんでした (データ未掲載)。しかし、陽性対照と陰性対照の総和に関する変動が抑えられたため、算出したZ'-factor値は増加しました。

まとめ

細胞ベースの実験におけるCaspase-Glo® 8および9 Assayの結果は、プロテアーゼ阻害剤MG-132の添加により改善されました。カスパーゼ活性に負の影響を与えずに非特異的なバックグラウンドを約90%低減することができました。数値的な指標であるZ'-factor値をアッセイの質として算出した結果、阻害剤の使用により概して改善され、これは主にデータのバラツキが低減したためだと考えられます。これらの改良は、潜在的に活性の弱いイニシエーターカスパーゼの応答を調べる場合に特に重要です。

参考文献

1. Thornberry, N.A. *et al.* (1997) *J. Bio. Chem.* **272**, 17907 - 11.
2. Niles, A. *et al.* (2004) *Cell Notes* **8**, 9 - 12.
3. Rock, K.L. *et al.* (1994) *Cell* **78**, 761 - 71.
4. Wiertz, E.J. *et al.* (1996) *Cell* **84**, 769 - 79.
5. Zhang, J.H., Chung, T.D. and Oldenburg, K. (1999) *J. Biomol. Screen.* **4**, 67 - 73.

プロトコル

- ◆ 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

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Caspase-Glo® 8 Assay	2.5 ml	G8200	16,000
	10 ml	G8201	60,000
	100 ml	G8202	290,000
Caspase-Glo® 9 Assay	2.5 ml	G8210	16,000
	10 ml	G8211	60,000
	100 ml	G8212	290,000