

GSH-Glo™ 発光グルタチオンアッセイ を用いた毒性反応の検出

By Nancy Murphy, John Shultz, Wenhui Zhou and Keith V. Wood, Promega Corporation

アブストラクト

本稿では、細胞または組織抽出液内の還元型グルタチオン濃度測定のための新しい発光アッセイシステムについてご紹介いたします。生物発光フォーマットは、テスト化合物による干渉を抑え、プロトコルを簡単にハイスループットスクリーニングアプリケーションに適応させることができます。

イントロダクション

トリペプチド (L γ -glutamyl-cysteinyl-glycine) であるグルタチオン (GSH) は、真核細胞中で豊富に存在する主要な非タンパク質チオールです (1-3)。GSHは、多くの代謝経路で重要な役割を演じています。グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) およびグルタチオンペルオキシダーゼなどの細胞内酵素の補因子として機能し、また、アミノ酸の輸送を助け、生体異物および活性酸素種 (ROS) の解毒に必須です。さ

らに、GSHは細胞内の還元制御シグナル伝達の維持に関連しています。活性酸素種および不測の薬物間相互作用は、チオール基の反応によるGSHレベルの低下をひき起こします。そのためGSHレベルの測定は、酸化ストレスの促進やアポトーシスおよび細胞死への誘導などの毒性反応を評価する上で重要です (4)。

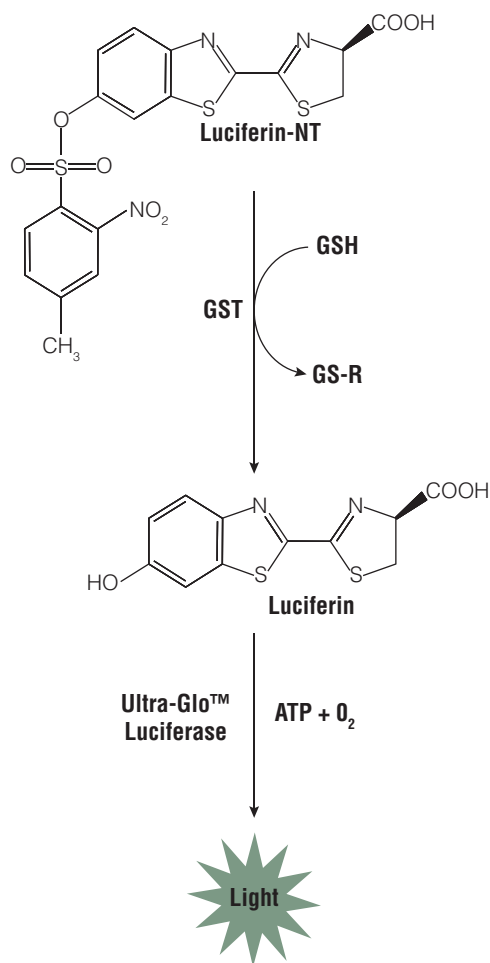


図1. GSH-Glo™ グルタチオンアッセイの概要

アッセイ化学反応は2つのステップから構成される。最初に発光前駆体基質 Luciferin-NTとグルタチオン S-トランスフェラーゼの存在下で細胞を溶解し、細胞内の GSHがルシフェリンへの変換を駆動する。次にLuciferin Detection Reagentを添加すると、Ultra-Glo™ Luciferaseがルシフェリンと反応し、その産物として光を放出する。放出された光の量は、細胞内の還元型GSH濃度に比例する。

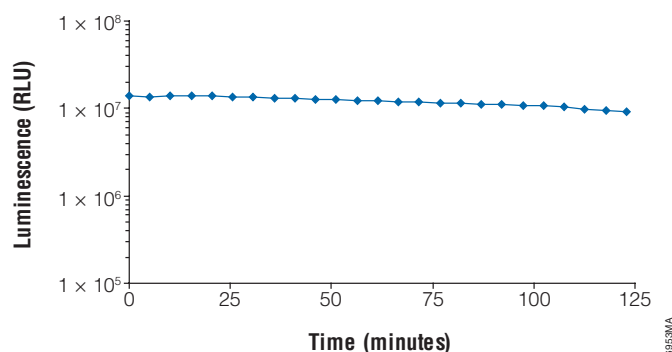


図2. 安定な発光

GSH (5μM) をGSH-Glo™ 反応混合液100μlに添加し、30分間インキュベーションした。Luciferin Detection Reagent 100μlを添加して反応を停止させ、GloMax® 96 Microplate Luminometer (カタログ番号 E6501) を用いて長時間モニタリングした。GSH-Glo™ シグナルの半減期は、アッセイ条件下で2時間以上と算出された。

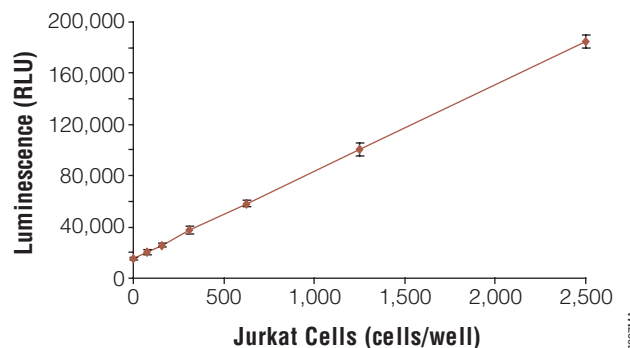


図3. 細胞数に応じて直線的な反応を示す GSH-Glo™ Assay

浮遊細胞 (Jurkat細胞) を採取し、カウントした後、PBSに再懸濁した。PBSで細胞の2倍希釈系列を384プレートに作成した。等量のGSH-Glo™ Reagent (2X) を各ウェルに添加し、30分間インキュベーションした。等量の再溶解したLuciferin Detection Reagentを添加し、GSH-Glo™ Assay反応を停止させ、15分後に発光を測定した。GSH標準曲線に基づき算出した、Jurkat細胞の検出限界は約20個。r²値は0.999。

表1. 生物学的サンプルを用いたグルタチオン測定における典型的な蛍光アッセイとGSH-Glo™ Assayの比較

GSH-Glo™ Assay Protocol	Fluorescent Assay Protocol
✓ マルチウェル培養プレートに任意の密度で細胞を播取	✓ $1 \times 10^6 \sim 10^8$ 細胞を調製
✓ テスト化合物で細胞を処理（オプション）	✓ テスト化合物で細胞を処理（オプション）
✓ 説明書に従い、GSH-Glo™ Reagentを調製	✓ 細胞を回収し、遠心
✓ GSH標準曲線を作成（オプション）	✓ PBSで洗浄
✓ マルチウェルプレートの各ウェルから培地を除去*	✓ 細胞を遠心
✓ GSH-Glo™ Reagentを添加	✓ 細胞を再懸濁し、溶解後にサンプルよりタンパク質を除去
✓ 30分間インキュベーション	✓ ライセートを遠心
✓ Luciferin Detection Reagentを添加	✓ ライセートの中和
✓ 15分間インキュベーション	✓ ライセートの容量を測定し、任意に希釈
✓ 発光を測定	✓ ライセートをマルチウェルプレートの各ウェルに分注
	✓ GSH標準曲線を作成
	✓ アッセイ基質を各ウェルに分注
	✓ 酵素再生溶液を各ウェルに分注
	✓ 蛍光を複数回測定（30分以上）

* 付着細胞を例にした場合

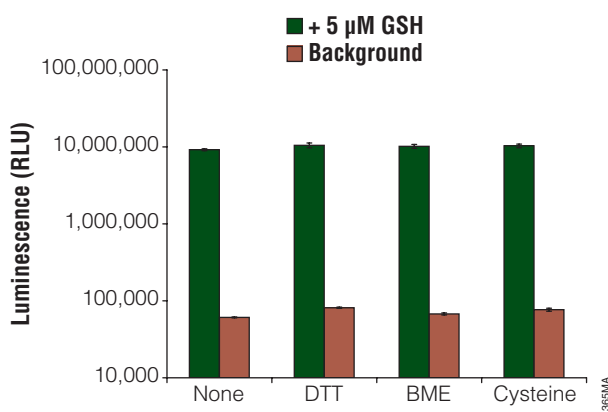


図4. Luciferin-NT基質の特異性

3種類の汎用還元剤 ジチオスレイトール (DTT)、β-メルカプトエタノール (BME) およびシステイン各1mMを含む反応混合液にGSH(5μM) を添加した。溶媒のみのコントロールとしてGSH reaction bufferを使用。等量のLuciferin Detection Reagentを添加し、15分後にGloMax® 96 Microplate Luminometerで測光した。バックグラウンド発光 (GSHなし) は、正味の発光を算出するためにシグナルから差し引いた。テストした還元剤はGSH-Glo™ Assay反応に影響を与えず、Luciferin-NT発光前駆体基質の特異性を明示した。

2ステップ酵素反応を利用したアッセイ法によるGSH濃度の検出

GSH-Glo™ Assayは、培養細胞内およびその他の生物学的サンプルのGSHを検出し定量するための発光ベースのアッセイシステムです。このアッセイは、グルタチオンの存在下でのグルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST)により触媒されるルシフェリン誘導体のルシフェリンへの変換反応をベースにしています (図1)。ホタルルシフェラーゼを利用した複合反応により生じる発光シグナルは、サンプル中に存在する還元型グルタチオン量に比例します。発光シグナルは15分で定常状態に達し、消光は最小限に抑えられたまま数時間にわたり発光が維持されます (図2)。2ステップの酵素反応によるアッセイは、安定な発光シグナルを生成し、迅速で96または384ウェルプレートフォーマットに容易に適応させることができます。キットにはGSH溶液が含まれるため、標準曲線を作成することができ、サンプルより得られた発光シグナルをGSH濃度に変換することができます。

スタートサンプル量を抑え、化合物による影響も低減

発色アッセイや蛍光アッセイと比較した場合、GSH-Glo™ Assayは非常に感度が高く、3nM以下のGSHでも検出できるため、スタートサンプル量を抑えることができます。GSH-Glo™ Assayは384ウェルフォーマットで10mg以下の組織や300個/ウェルの細胞からでもGSHを容易に検出することができます (図3)。発光前駆体基質はグルタチオンに特異的で、ジチオスレイトール、β-メルカプトエタノールやシステインなどの還元化合物とは反応しません (図4)。GSHレベルのモニタリングに発光を利用することで、テスト化合物によるほとんどのシグナル干渉を排除することができます。

蛍光GSHアッセイよりも高感度であることに加え、ライセート調製後1時間以内に結果を得ることができます。サンプルからタンパク質を除去する必要が無いため、標準的な蛍光プロトコルに付随する遠心や分注など時間のかかるステップを省略することができます。標準的な蛍光アッセイ手順に比べてシンプルなGSH-Glo™ Assayプロトコルを表1に示します。

実験処理後の細胞内グルタチオンの検出

我々は、GSH-Glo™ Assayを用いてHepG2細胞 (ATCC, 図5) および冷凍保存したラット肝細胞 (Xenotech, 図6) のGSHレベルの変化を測定しました。GSH合成を阻害し、細胞内GSHレベルを低減させるBSO L-buthionine-sulfoximine (Sigma カタログ番号 B-2515) を様々なレベルでHepG2細胞に暴露しました。BSOは最大72時間まで毒性を示しませんでした(4)。ラット肝細胞はP450の応答を誘導するプレグネノロン16α-カルボニトリル (PCN) 単独またはPCNとアセトアミノフェン (APAP, 5)で処理した後GSHレベルを測定しました。

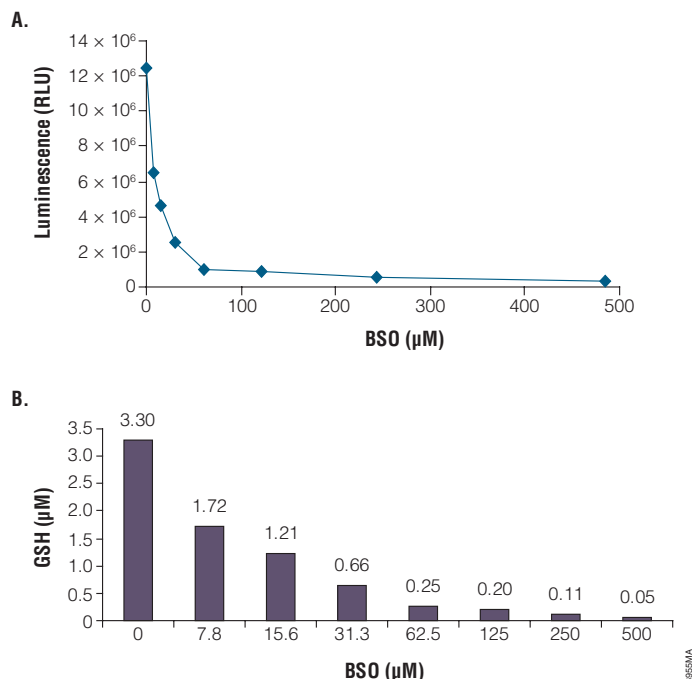


図5. L-buthionine-sulfoximine (BSO) によるHepG2細胞処理

BSO (Sigma カタログ番号 B-2515) はGSH合成を阻害し、細胞内GSHレベルを低下させるが、最大72時間までは毒性を示さない(5)。Hep G2細胞は96ウェルプレートに5,000/ウェルで播種し、約4時間で付着させた。様々な量のBSOを添加し、22時間細胞をインキュベーションした。各ウェルから培地を除去し、GSH-Glo™ Reagent 100μlを添加した。GSH標準曲線は、Technical Bulletin (TB369)に従い同時に作成した。等量のLuciferin Detection Reagentを添加してGSH-Glo™ Assay反応を停止させ、15分後に測光した (パネルA)。GSH量は標準曲線に基づき算出した (パネルB)。HepG2細胞は、最大投与時の20%以下でBSO暴露に対して劇的な用量反応を示した。毒性試験については、BSO処理した細胞と並行して実施し、CellTiter-Glo® Assayで測定して決定した (データ未掲載)。

まとめ

GSH-Glo™ Assayは、真核細胞内のGSHを検出するための発光法を提供し、他の市販キットよりも迅速で簡便です。本アッセイは、マルチウェルの細胞培養プレートでそのまま行うことができ、細胞の採取、洗浄、溶解、遠心、除タンパクなどの煩雑な多くのステップを省略することができます。発光法では、蛍光法に特有の蛍光シグナルバックグラウンドを回避でき、アッセイフォーマットをハイスループットスクリーニングに適応させることができるため、薬剤開発や創薬アプリケーションで有用なツールとなります。

参考文献

1. Sies, H. (1999) *Free Radic. Biol. Med.* **27**, 916–21.
2. Griffith, O.W. (1999) *Free Radic. Biol. Med.* **27**, 922–35.
3. Pompella, A. *et al.* (2003) *Biochem. Pharmacol.* **66**, 1499–1503.
4. Griffith, O.W. and Meister, A. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4668–72.
5. James, L.P. *et al.* (2003) *Drug Metab. Dispos.* **31**, 1499–1506.

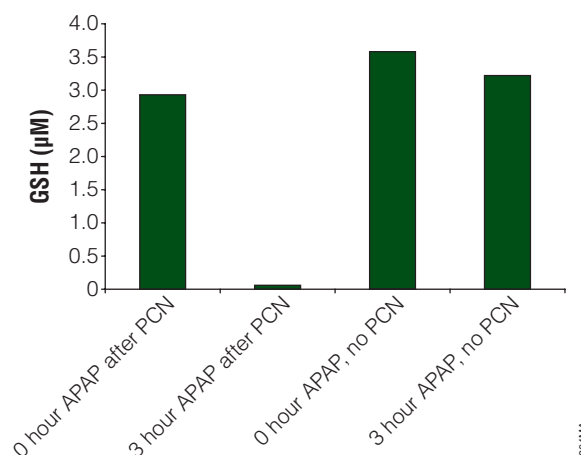


図6. ラット肝細胞におけるアセトアミノフェン (APAP) によるGSHの枯渇

24ウェルプレートで培養した付着細胞から調製したライセートのGSHレベルをGSH-Glo™ Assayで測定した。GSH濃度は、Technical Bulletin (TB369) に従い作成したGSH標準曲線より決定した。P450誘導剤30μMプレグネロン16α-カルボニトリル (PCN)による2日間の処理後に3時間5mM APAPに暴露した場合、大幅にGSH濃度が低下したが、APAPまたはPCNのみではGSHレベルはほとんど変化しなかった。

プロトコル

- ◆ GSH-Glo™ Glutathione Assay Technical Bulletin, #TB369
www.promega.com/tbs/tb369/tb369.html

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
GSH-Glo™ Glutathione Assay	10 ml	V6911	55,000
	50 ml	V6912	225,000