

ハイスループットアプリケーションにおけるアポトーシスの迅速検出

Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 Assay

By Jean Humpal-Winter, M.S., Andrew Niles, M.S., and Michael Bjerke, M.S., Promega Corporation

要約

Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 Assay は感度が高く、幅広いアプリケーションに適用することができ、試薬の調製にもほとんど時間を要しません。本システム固有の柔軟性により、広範なアッセイ量に対応することができ、Beckman Biomek® 2000 を使用してハイスループットのカスパーゼ検出を容易に自動化することができます。Apo-ONE™ Assay は、細胞系と精製酵素系の両方に対して最適化されたアポトーシス検出用試薬です。本稿では、アポトーシスを誘導する治療試薬候補のスクリーニングを、Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 Assay を用いて 96 および 384 ウェル形式で行なう方法についてご紹介します。

Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 Assay は、ハイスループットフォーマットで活性のある化合物を探すための迅速・多用途なスクリーニングツールです。

はじめに

アポトーシスは、多細胞生物の正常な発生・成長・維持において引き起こされる、一種の制御された細胞死です。アポトーシスは、細胞表面の細胞死受容体の刺激や、ミトコンドリアからのシトクローム C の放出によって活性化されます。このようなシグナルによって引き起こされたカスケードにおいて、カスパーゼと呼ばれるシステインアスパルチルプロテアーゼが切断されて、不活性な酵素前駆体から活性を有するヘテロダイマーへと変化します。こうして生じた活性型のカスパーゼは、DNA 修復因子、構造タンパク質、細胞シグナル伝達ペプチドといった細胞の生存に欠くことのできないいくつかの成分を分解します(1)。カスパーゼ-3 は細胞死の主要なエフェクターで、細胞表面の細胞死受容体と、ミトコンドリアからのシトクローム C 放出の双方によって活性化されるため、アポトーシスのモニタリングの重要なターゲットとなります(2)。

アポトーシスを制御するシグナルの乱れはさまざまな病的状態を引き起こす恐れがあるため、アポトーシスは医薬品開発や治療においてきわめて注目度の高い重点領域となっています。たとえば、アポトーシスを阻害する化合物は、パーキンソン病などの神経変性疾患の治療薬となる可能性があります(3)。逆に、アポトーシスを誘発する薬剤は、癌治療に効果を発揮する可能性があります。Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 Assay は、ハイスループットフォーマットで活性のある化合物を探すための迅速・多用途なスクリーニングツールです。

細胞系でのワンステップのカスパーゼ検出

プロメガ独自の溶解/活性バッファーを、Z-DEVD-Rhodamine 110 基質と組み合わせることにより、接着細胞、浮遊細胞、あるいは初代培養細胞におけるカスパーゼ-3/7 検出用の高感度でワンステップの試薬が得られます。このワンステップの Homogeneous Caspase-3/7 Reagent では、他のカスパーゼ検出システムで採用されている凍結融解を繰り返す操作を行なう必要がなく、有効なデータの取得にかかる時間を劇的に短縮することができます。また、Homogeneous Caspase-3/7 Reagent と培地中の培養細胞の比が 1 : 1 に保たれている限り、サンプル量の多少にかかわらずこのアッセイフォーマットを使用することができます。

柔軟かつ容易な使用方法

本システムの柔軟性を明らかにするため、プロメガでは Jurkat 細胞を使って、96 および 384 ウェル形式で Biomek® 2000 を用いてアッセイを行ないました。また、Jurkat 細胞を用いた 384 ウェル形式での薬物スクリーニング環境を模倣し、アポトーシスを誘導することが判明しているいくつかの化合物について試験しました。本システムの感度を調べるため、Homogeneous Caspase-3/7 Buffer を用いて Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 Assay で使用されている Z-DEVD-Rhodamine 110 基質を一般に使用されている Ac-DEVD-AMC 基質と 96 ウェル形式で比較しました。

最短時間で信頼性あるデータ

図 1 のパネル A は、96 ウェルアッセイにおいて、抗 Fas mAb で誘導した Jurkat 細胞と非誘導の Jurkat 細胞から得られたデータを示したものです。試薬添加後早くも 1 時間後には、アポトーシス性 (誘導) Jurkat 細胞と非誘導 Jurkat 細胞との間に有意な差が認められています。カスパーゼ試薬中での細胞のインキュベーション時間が長くなるほど、感度は上昇します (図 1、パネル B)。Homogeneous Caspase-3/7 Reagent と長時間のインキュベーション (最長 18 時間) を行なうことにより、きわめて細胞数の少ない系や、活性型カスパーゼ-3/7 の発現量が少ない系でも結果を得ることができます。

多くのカスパーゼアッセイでは、7-アミノ-4-メチルクマリン (AMC) を含有する蛍光ペプチド基質が使用されていますが、Z-DEVD-Rhodamine 110 は、特にインキュベーション時間が短い場合の感度の面で Ac-DEVD-AMC よりも優れています。625 個というきわめて少ない細胞を用いたところ、Z-DEVD-Rhodamine 110 基質とインキュベートした場合には、1 時間以内に抗 Fas mAb 誘導細胞と非誘導細胞の間に有意な差を観察することができました (図 2)。しかし、同様の処理群において Ac-DEVD-AMC 基質とインキュベートした場合には、試薬添加から 1 時間後に有意な差を検出するためには少なくとも 2,500 個の細胞を要しました。

図 3 は、アポトーシス誘導候補物質についての 384 ウェル形式スクリーニングから得られた典型的なデータを示したものです。Jurkat 細胞において、化合物によるアポトーシス誘導能に大きな差があることが認められました。アポトーシスの誘導は細胞種や薬剤の曝露時間によって大きく異なるため、このような差は特に意外なことではありません。

結論

Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 Assay は、アポトーシスの検出を飛躍的に改善し、迅速で高感度の結果をもたらすことが明らかになりました。また、本アッセイは、そのワンステップの操作性により、ハイスループットアプリケーションや二次スクリーニングアプリケーションにおける自動化にも柔軟に対応することができます。(この記事の全文はPN79でご覧いただけます。)

Apo-ONE™ Caspase-3/7 Assay...continued

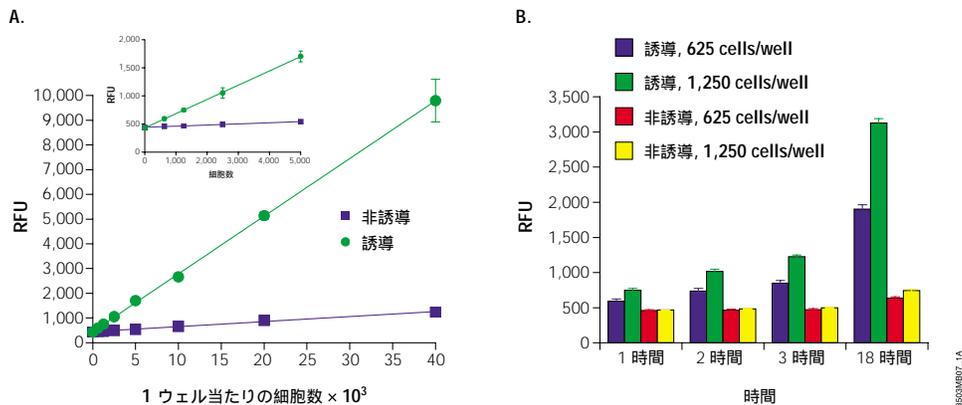


図 1. Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 Assay の感度

Jurkat 細胞を、RPMI 1640 中で 5.0×10^5 cells/ml の密度となるまで増殖させた。アポトーシスを誘導するため、細胞を 100ng/ml のヒト抗 Fas 抗体を含有する DMSO で処理し、96 ウェル中において 5% CO₂ 中で 37 °C で 5 時間インキュベートした。対照細胞は DMSO のみのコントロールとした。アポトーシス誘導後、Homogeneous Caspase-3/7 Reagent を細胞と 1 : 1 の容量比となるよう添加し、Cytofluor® II 蛍光プレートリーダーを使用して蛍光を測定した。パネル A : 625 個の細胞でアッセイした場合、Homogeneous Caspase-3/7 Reagent と 1 時間インキュベートしたのちに誘導細胞と非誘導細胞の間に有意 ($p < 0.02$; スチューデントの t 検定) な差が検出された。パネル B : Homogeneous Caspase-3/7 Reagent と細胞とのインキュベーション時間が長くなるほど、アッセイ感度は向上した。上記と同様の培養・処理方法により、625 または 1,250 cells/well の Jurkat 細胞を、Homogeneous Caspase-3/7 Reagent と 1、2、3、18 時間インキュベートした。

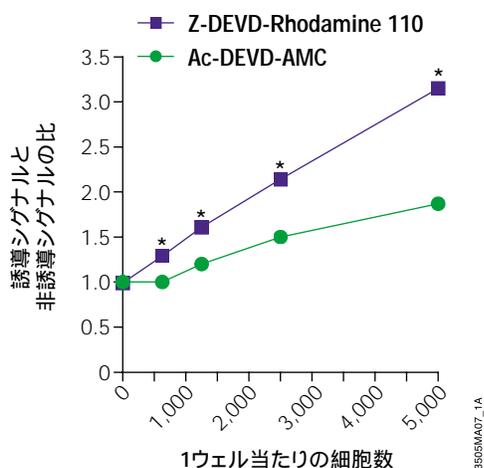


図 2. Z-DEVD-Rhodamine 110 基質の使用による高感度検出

Jurkat 細胞を図 1 に記載した方法で増殖させ、100ng/ml のヒト抗 Fas 抗体と共に 5 時間インキュベートしてアポトーシスを誘導したのち、50μM Z-DEVD-Rhodamine 110 または 50μM Ac-DEVD-AMC を含む Homogeneous Caspase-3/7 Buffer を添加した。プレートを室温で 1 時間インキュベートした後、Cytofluor® II 蛍光プレートリーダーを使用して蛍光を測定した (*、有意差、 $p < 0.01$ 、誘導細胞群と非誘導細胞群、スチューデントの t 検定を使用)。

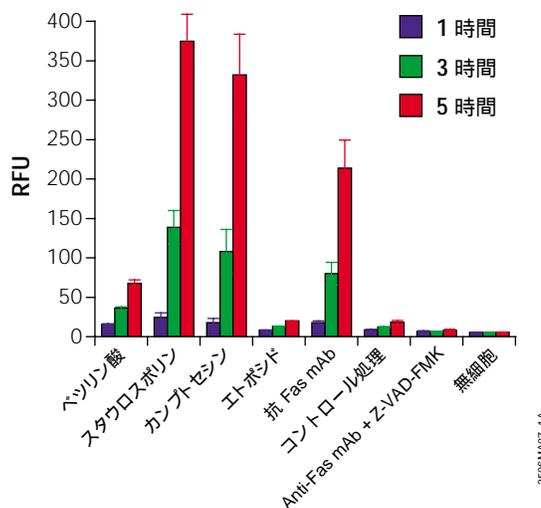


図 3. Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 Reagent を使用したアポトーシス誘導物質のスクリーニング

Jurkat 細胞を 5.0×10^5 cells/ml の密度となるまで増殖させ、384 ウェル中でアポトーシス誘導候補化合物 (12μM のベツリン酸、カンプトセシン、およびエトボシド; 625nM のスタウロスポリン; 100ng/ml の抗 Fas mAb) とインキュベートした。抗 Fas 抗体で処理した細胞を、アポトーシス誘導の陽性対照とした。アポトーシスを阻害する場合は、抗 Fas 抗体を添加する前に、細胞を最終濃度 20μM の Z-VAD-FMK (カタログ番号 G7231) で 30 分間処理した。細胞をアポトーシス誘導剤と 5% CO₂ 中で 37 °C で 5 時間インキュベートしたのち、Homogeneous Caspase-3/7 Reagent を添加し、FluoroSkan プレートリーダーを使用してさまざまな時点の蛍光を測定した。

参考文献

1. Earnshaw, W.C. *et al.* (1999) *Ann. Rev. Biochem.* **68**, 383-424.
2. Porter, A.G. *et al.* (1999) *Cell Death Differ.* **6**, 99-104.
3. Mattson, M.P. *et al.* (2001) *Apoptosis* **19**, 919-926.

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 Assays	10ml	G7790	58,000
Caspase Inhibitor, Ac-DEVD-CHO	100μl	G7791	250,000
Caspase Inhibitor, Z-VAD-FMK	50μl	G7231	35,000
	125μl	G7232	59,000