

強力なハイスループット アポトーシス検出法

Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 Assay

By Andrew Niles, M.S., Promega Corporation

製品概要

近年、アポトーシス過程の生物学的重要性はますます大きく注目されてきており (1)、総合的な機能から特異的機能まで広く分析が行われ、研究分野も発生生物学から毒性学に至るまでさまざまな研究領域を網羅しています。しかし、実験に用いられる多くのアポトーシス検出法には何らかの制約があり、アポトーシスアッセイの情報量、複雑性、スループット、技術的成功率のいずれかを犠牲にすることが余儀なくされていました。カスパーゼを利用したタンパク分解アッセイの出現は、アポトーシスイベントを迅速かつ確実に確認する道を開くものとなりました。本稿では、簡単、高感度で、自由度の高いアポトーシス検出アッセイをご紹介します。このアッセイ法を用いることにより、最先端のロボット工学を利用した自動化システムでも、ラボでの手動操作と同等の強力な情報量の多い結果を得ることができます。

Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 Assay は、面倒な操作が必要で技術的にも困難な他のアポトーシス検出法に代わる、迅速で感度の高い検出法です。

はじめに

多細胞生物のホメオスタシス維持は、個体の生存に必要ななくなった細胞を慎重かつ協調的に取り除くことによりかなりの部分を負っています。このような細胞の排除はアポトーシスと呼ばれ、リガンド (アンタゴニスト / アゴニスト) - 受容体間の相互作用に基づく細胞受容体シグナル伝達イベントや、ミトコンドリア内の機能に影響を及ぼす分子によって媒介されます (2)。その結果として、カスパーゼと呼ばれるタンパク質分解酵素が関与する一連のエネルギー依存性の酵素カスケード反応が誘発され、細胞内の必須要素である DNA 修復因子、構造ポリペプチド、およびシグナル伝達キナーゼが破壊されます。このプロセスでは、カスパーゼ-3 とカスパーゼ-7 という 2 種類のタンパク質分解酵素が中心的役割を果たしているため、これらの酵素を用いることでタイムリーかつ信頼性の高いアポトーシスイベント検出を行うことが可能となります。Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 Assay は、面倒な操作が必要で技術的にも困難な他のアポトーシス検出法に代わる、迅速で感度の高い検出法です。

多彩なアポトーシス検出アプリケーション

Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 Assay は簡便で柔軟性が高いため、アポトーシスの検出を目的とした多様な実験アプリケーションに利用することができます。近年、標的インヒビターやイニシエーターを用いて組織特異的なアポトーシスのメカニズム面の解析を行うことにより、ホメオスタシスと調節不全に関与するプロセスを解明しようとする努力が重ねられつつあります。重要な制御ポイントとなっている分子を同定し、そのような分子の活性を調節できれば、癌や神経変性疾患の根本的な治療介入となります。本製品は特異的なアポトーシス検出アプリケーション以外にも用いることができます。毒性アプリケーションでは、治療薬や化合物の総合的な特性や因果関係を迅速かつ高感度で検出することができます。

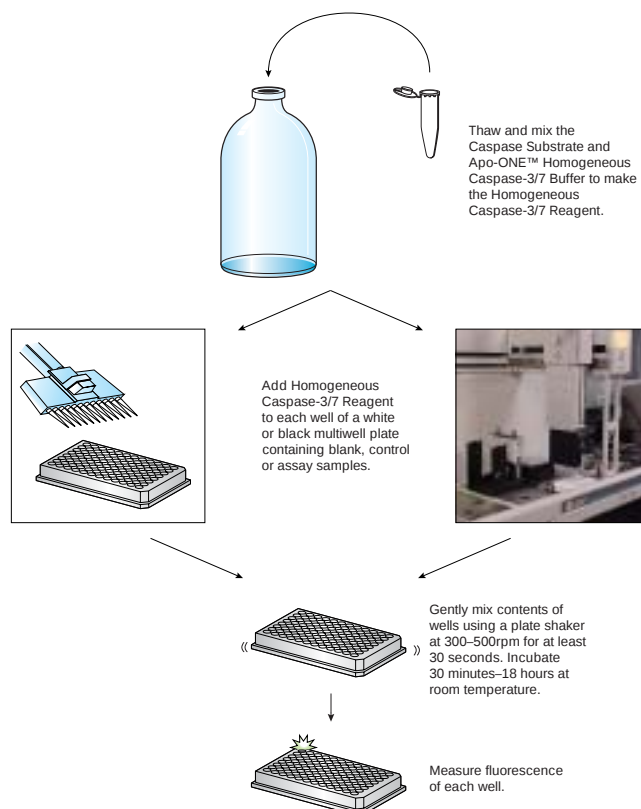


図1. Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 Assay における手動および自動分注装置による試薬分注

柔軟性の高い設計

Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 Assay は、研究規模の大小にかかわらず簡単に実施することができる使い易い仕様となっています。数サンプルの分析に用いる場合でも、膨大な化合物ライブラリーのスクリーニングに用いる場合でも、いずれも作用溶液の調製はきわめて簡単です。凍結保存したキットを取り出して室温で解凍したのち、Z-DEVD-Rhodamine 110 基質をホモジニアスフォーマットの溶解/活性バッファーに 1:100 の比率で添加するだけで Homogeneous Caspase-3/7 Reagent を調製することができます。調製する試薬の量は、細胞培養ウェルの容積とプレートの総数から求めることができます。

“ 添加、混和、測定 ” 方式

Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 Assay は、2 種類の主要な方式に対応しており、さまざまなスケールで実施することができます。図 1 に示すとおり、試薬は手動でも自動分注装置でも分注することが

できます。このプロトコールの中核をなすのは簡便な混和ステップです。このステップは、サンプルと試薬を均質に混和するとともに細胞の溶解・透過化も促進し、遊離したカスパーゼへの基質のアクセスを促します。混和液をインキュベーションすると、カスパーゼ-3 およびカスパーゼ-7 が基質を分解し、蛍光ローダミン 110 産物が遊離します。このプレートは、 $485 \pm 20\text{nm}$ の励起光源と $530 \pm 25\text{nm}$ の蛍光集積装置を備えた通常のプレートリーダーを用いて標準的な蛍光分析法により測定することができます。図2 に、Apo-ONE™ Assays を手動 (パネル A) および Biomek® 2000 ワークステーション (パネル B) で実施した結果を示します。図2の蛍光強度は相対的蛍光ユニット (RFU) で示しています。

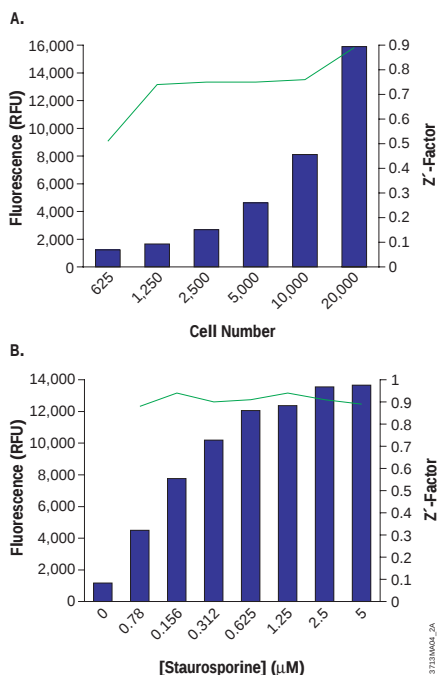


図2. Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 Assay Reagent は、手動でも自動化試薬分注システムによる 96 および 384 ウェル形式でのハイスループットアプリケーションでも使用できることがプロメガで確認されている (5)

このような方法により、ワンステップの Apo-ONE™ Reagent を確実に分注することができ、粘性や泡立ちによって妨害されることもない。Z'-因子 (6) は、シグナル強度と標準偏差の統計学的評価に用いられる無次元数である。上記のグラフに示されている Z'-因子の値は、これらのデータが高品質で再現性も良好であることを示している。パネル A および B では、縦棒は蛍光データを示し (左縦軸)、折れ線は Z'-因子の値を示す (右縦軸)。

パネル A: 96 ウェルプレートで Jurkat 細胞の 2 倍希釈系列を 500nM スタウロスポリン存在下に 37 °C、5% CO₂ で 5 時間インキュベーションしてアポトーシスを誘導した。Apo-ONE™ Reagent はマルチチャンネルピペッターを使って添加し、3 時間インキュベーションしたのち測定した。

パネル B: 上記とは別の研究で、Jurkat 細胞を 96 ウェルプレートに 20,000 cells/well の密度で 50μl ずつ分注し、さまざまな濃度のスタウロスポリン存在下にアポトーシスを誘導した。5 時間のインキュベーション後、Apo-ONE™ Reagent を Biomek® 2000 (Beckman Instruments; 図 1 参照) を使って添加した。得られた蛍光は 3 時間後に測定した。

アッセイの情報量を拡張

Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 Assay のレポーター蛍光分子 (ローダミン 110; 参考文献 3) はユニークなスペクトル特性を持つため、他の非干渉性の生物学的蛍光指示薬をマルチプレックスに使用できる可能性があることが、予備的研究によって判明しています。つま

り、Apo-ONE™ Assay で分析する前に、処理した細胞集団に酸化還元指示蛍光試薬 (4) を直接添加することによって細胞の“健康状態”を評価することもできます。図3 は、酸化還元指示蛍光試薬を Apo-ONE™ Assay と併用することにより細胞生存性の低下とカスパーゼの誘導を確認したものです。これらの測定値は、アポトーシスイベントを介した細胞死プロセスにおいて反比例的な関係にあると思われます。

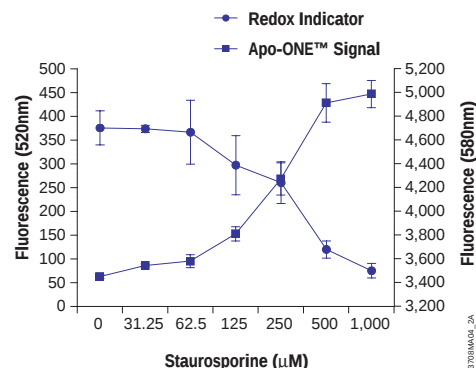


図3. マルチプレックスな蛍光アッセイにより、細胞生存性とカスパーゼ活性では反比例した測定値 (inverse measures) が得られる

Jurkat 細胞を不透明 96 ウェルプレートに 10,000 cells/well の密度で 50μl ずつ分注した。スタウロスポリンの希釈系列 (50μl) を細胞に添加し、直後に市販の酸化還元指示蛍光試薬 (10μl) を添加した。サンプルを旋回振とうして混和し、37 °C、5% CO₂ で 4 時間インキュベーションした。プレートを 530/580nm で測定し、次いで Apo-ONE™ Reagent を添加したのち 1 時間インキュベーションして 2 回目の測定を行った。酸化還元指示蛍光試薬が共存することで、Apo-ONE™ によるカスパーゼ媒介性の蛍光には著しい消光が見られたが (50 ~ 70%)、培養細胞で細胞生存性の低下とカスパーゼの誘導の双方をマルチプレックスで確認するのに十分なシグナルが残存していた。左の縦軸は酸化還元指示試薬による蛍光を、右の縦軸は Apo-ONE™ による蛍光を示す。

結論

Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 Assay は、培養細胞や精製酵素系におけるカスパーゼ活性の高感度で迅速な検出法です。本システム固有の簡潔性、柔軟性、強力さにより、手動分析でもハイスループットの自動分析でも多様なアポトーシスアレイアプリケーションを行うことができます。

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
Apo-ONE™ Homogeneous Caspase -3/7 Assay	1 ml	G7792	6,000
	10 ml	G7790	58,000
	100 ml	G7791	250,000
Apo-ONE™ Homogeneous Caspase -3/7 Buffer	100 ml	G7781	166,000