

アポトーシス & ネクローシスをリアルタイムに一発測定

細胞が増殖するのか、それとも細胞死が起こるのか…細胞が起こる現象を調べることは、遺伝子機能の解析や創薬開発などの研究における初期ステップの1つです。これまでに種々のマーカーを用いて、細胞の増殖やプログラムされた細胞死(アポトーシス)を評価・測定する手法が開発されています。アポトーシスマーカーであるカスパーゼのアッセイ法は操作性もシンプルであり、スクリーニングなどの用途に最適ですが、細胞内の酵素を測定するために細胞を溶解するエンドポイントアッセイであり、最も活性の高いタイミングを事前に見極める必要がありました。Annexin V を利用した測定方法は細胞表面に起こる変化を捉えているため細胞を破壊せずにアポトーシスの形成過程(細胞死メカニズム)を詳細に観察するためにはきわめて有用です。今回プロメガが開発した発光 Annexin V アッセイは、従来のフローサイトメトリーによる検出法で抱えていた簡便性、スループットなどに開く問題を解決すると同時に経時的な観察を可能にしたアポトーシスアッセイの決定版とも言えるツールです。

アポトーシスと Annexin V

アポトーシスは不要な細胞や老化した細胞、異常な細胞を取り除く、分子機構に制御された細胞死です。DNA のフラグメント化やミトコンドリア膜電位の変化などがアポトーシスの特徴として知られており、アポトーシスの検出マーカーに活用されています。細胞膜の内側に存在するリン脂質、フォスファチジルセリン(PS) もその1つです。

PS は細胞膜の内側のみに局在しますが、アポトーシスが起ると PS は細胞膜の外側に露出ようになります。Annexin V はカルシウムイオン依存的に PS に強く結合するリン脂質結合タンパク質です。Annexin V の特性を活用し、初期アポトーシスの検出に利用されています。

発光法を用いた Annexin V・PS の検出

従来法では蛍光標識した Annexin V と、細胞膜非透過性の DNA 結合蛍光色素を用いて、アポトーシスとネクローシスをフローサイトメトリーを使って評価しています。アポトーシス初期には PS を介して結合した蛍光 Annexin V により標識された細胞が検出されます。後期アポトーシスでは、細胞膜の完全性が失われるため、より強い Annexin V の標識がなされるのに加え、DNA 結合蛍光色素が細胞膜を透過し、DNA に結合することで蛍光シグナルを発するようになります。

フローサイトメトリーを使用するメリットの1つとして、細胞集団中の生細胞、アポトーシス、ネクローシスの細胞の割合を出せる点があります。その一方で、フローサイトメーターでの測定ではサンプル調製が煩雑・スループット性が低いというデメリットがあります。

従来法のデメリットを改善するため、プロメガは得意の発光測定技術を活用し、Annexin V をプレートリーダーで測定可能にしました。図 1 にはその原理を示しています。

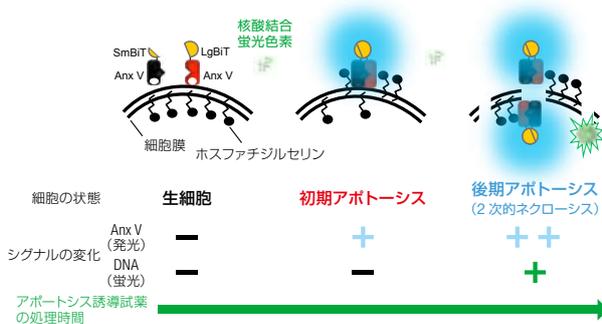


図 1. Real-time™ Glo Annexin V Apoptosis Assay の原理

プロメガは、NanoLuc® をもとに開発した NanoBiT® の各タグと Annexin V の融合タンパク質(SmBiT-AnxV および LgBiT-AnxV)を合成しました。これら融合タンパク質を試薬としてアポトーシスを起こした細胞に振りかけると、細胞膜外に露出した PS と SmBiT-AnxV / LgBiT-AnxV が結合、PS との結合を介して AnxV が重合し、SmBiT : LgBiT が接合、NanoLuc® の酵素活性が回復します。すなわち、Annexin V と PS の結合を発光シグナルにて評価します。また、細胞膜非透過性の DNA 結合色素も加える事で、従来法と同じく後期アポトーシスも同時に解析することが出来ます。

(NanoBiT® については、かわら版 2016 年春号をご覧ください: www.promega.co.jp/pdf/kawara_1604_p2.pdf)

経時的なアポトーシスの評価・測定

プロメガは Annexin V 検出技術を発光アッセイに応用して従来法よりも高感度・低バックグラウンド測定を可能にただでなく、アポトーシスの経時変化を追跡できるリアルタイムアッセイを実現しました。アポトーシスの評価では測定タイミングが重要なファクターであり、従来法

では複数のサンプルを用意し、最適なタイムポイントを見出す必要がありました。

プロメガの Annexin V の発光測定では、**試薬を添加するのみで、細胞を培養した状態で経時的にアッセイできるため、1枚のプレートから多くの情報を引き出す事が可能**です([アポトーシス + ネクローシス] × 経時変化)。

図 2 にはアポトーシス誘導を行い、経時的に Annexin V の測定を行った例を示しました。Annexin V の発光シグナルの増加の後に、DNA 結合試薬の蛍光シグナルの増加が観察されており、1枚のプレートから最適な測定タイミングや細胞死の作用機序を調べる事が可能です。

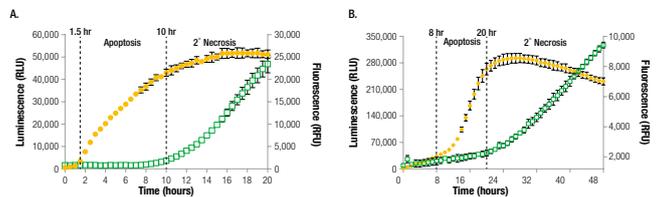


図 2. 経時的なアポトーシス/ネクローシスアッセイ

DLD-1 細胞を 400 ng/mL rhTRAIL (パネル A)、K562 細胞を 1.1 μM Bortezomib (パネル B) でそれぞれ処理してアポトーシスを誘導した。検出試薬を加えたタイミングを 0hr とし、各点線は Annexin V 検出試薬 (発光: ●) と DNA 結合試薬 (蛍光: □) のシグナルが検出され始めたタイミングを示す。

Annexin V に付加した NanoBiT® の発光は非常に強くプレートリーダーで高感度にアッセイすることができますが、さらにその発光強度によりオリンパス社 LV-200 を用いた発光イメージングにより初期アポトーシスの様子を観察することができます。

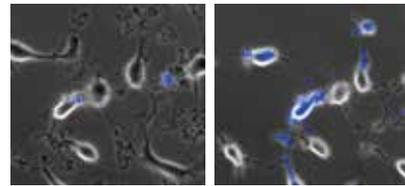


図 3. LV200を用いた Annexin V の発光イメージング

HeLa 細胞にスタウロスポリン(終濃度 1 μM)を添加し、アポトーシスを誘導した。添加 2.5 時間(左図)および 5 時間(右図)の代表的な像を示す。LV200(Olympus)にてイメージングを行い、位相差と発光の像を重ねあわせた。<オリンパス社社秋吉様の御厚意によりデータ提供>

最後に

今回紹介した Annexin V に加え、カスパーゼの活性化もアポトーシスの主要なマーカーとしてよく使用されています。Annexin V のシグナルが上がってきたタイミングでカスパーゼの活性評価を行うマルチアッセイも可能です。プロメガには発光でカスパーゼの活性を測定する技術もあります。Annexin V とカスパーゼ活性の同時評価についてもお気軽にお問い合わせください。

キーポイント

- ✓ **簡単な測定プロトコル** ⇒ Add to Measure の簡単プロトコル・最大 48 時間までの経時的なアッセイが可能。
- ✓ **フローサイトメーター不要** ⇒ 発光測定と蛍光測定に対応したプレートリーダーにて簡便に測定可能! Throughput も格段にアップ!
- ✓ **様々なサンプルでの応用例** ⇒ 通常の 2 次元培養サンプルに加え、3 次元培養サンプルや共培養アッセイ(CTL アッセイ)にも応用可能。

RealTime-Glo™ Annexin V Assay については 7 月末発売予定

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay (アポトーシス & ネクローシス デュアルアッセイ)	100 回分	JA1011	80,000
	1000 回分	JA1012	400,000
RealTime Glo™ Annexin V Apoptosis Assay (アポトーシス シングルアッセイ)	100 回分	JA1000	68,000
	1000 回分	JA1001	340,000
Caspase-Glo® 3/7 Assay (アポトーシス: カスパーゼ 3/7 アッセイ)	10 ml (100 回分)	G8091	75,000