

発光法によるレドックス細胞アッセイ

好気性生物は酸素を用いた代謝機構により、基質の酸化反応から大きなエネルギーを得ています。その一方で、好気性生物は酸化ストレスに曝されるという宿命を背負っており、進化の過程で様々な防御機構を発達させてきました。細胞内の酸化還元状態のバランスの乱れは、細胞の老化や疾患発症などにつながると考えられており、たとえば、Navdeepら (Current Biology, 2014) は H₂O₂ により NFκB 経路や MAPK 経路の活性化が誘導される発がんに寄与することや、酸化ストレスが幹細胞の自己複製能や分化に関与していることを述べています。ここでは幅広い研究分野にて注目されている細胞内の酸化還元に関する因子を発光にて測定する技術を紹介いたします。

発光テクノロジーによる活性酸素種と還元物質の測定

活性酸素種 (ROS) である過酸化水素 (H₂O₂) は細胞の ROS・酸化ストレスレベルを評価する指標の1つです。対して、グルタチオンは細胞内での還元物質であり、活性酸素種の除去を行っています。プロメガではこれらの因子を発光にて測定する技術を確認しており、その測定原理を図1に示しました。

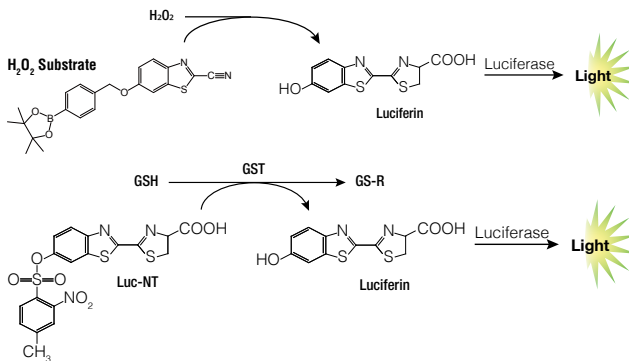


図1. 活性酸素種と還元物質の測定原理

(上図) H₂O₂ の測定法では、H₂O₂ とルシフェリン前駆体が反応し、ルシフェリンを生成。H₂O₂ 量を発光シグナルに変換して測定する。

(下図) グルタチオンの測定法では、グルタチオン S 転フェラーゼ (GST) を用いて、ルシフェリン前駆体と還元型グルタチオン (GSH) を反応させ、ルシフェリンを生成。GSH 量を発光シグナルに変換して測定する。

発光での測定メリットとして ROS アッセイのハイスループットスクリーニング (HTS) での比較の例をご紹介します。表1に LOPAC-1280 を用いて、ROS-Glo™ Assay と西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 法とを実際に比較した結果を示しました。75% 阻害を示す化合物数を比較すると HRP 法では系に影響が見られた化合物が 7.1% もありました。それに対し、ルシフェラーゼの発光を用いた ROS-Glo™ Assay では 0.5% でした。HRP は発光強度が弱く、発光の減衰が速いなどの欠点があり、さらに HRP に対する阻害効果が偽陽性の原因となるなどの問題点があります。プロメガの H₂O₂ 測定法では①ルシフェリン前駆体が H₂O₂ とまず反応する、②化合物の影響を受けにくい改良型ルシフェラーゼ Ultra-Glo™ Luciferase を使用しているなどの工夫がなされており、偽陽性が少なく、スクリーニングなどの薬効評価に威力を発揮します。

	ROS-Glo™ Assay		HRP 法	
	化合物の数	LOPAC に占める割合 (%)	化合物の数	LOPAC に占める割合 (%)
スクリーニングに用いた化合物数	1,280		1,280	
インヒビター: 活性 75% 以下	6	0.5	91	7.1
インヒビター: 活性 50% 以下	3	0.2	67	5.2
アクチベーター: 活性 150% 以上	2	0.2	0	0

表1. ROS-Glo™ H₂O₂ と一般的な HRP 法 (蛍光) の偽陽性率の比較

10μM H₂O₂ を各 well に加え、LOPAC-1280 を添加した際のシグナルへの影響を、ROS-Glo™ Assay と HRP 法を比較した。

以上細胞株レベルでの測定例でしたが、組織レベルでの酸化還元状態を検討したい場合にはグルタチオン測定法、GSH-Glo™ Assay がお勧めです。様々な細胞株や組織での測定報告がありますので、詳細はプロメガ HP のサイテーションリストをご覧ください。

www.promega.jp/resources/tools/citations/

関連製品

製品名	測定用途	サイズ	カタログ番号	定価 (¥)	特別価格 (¥)
ROS-Glo™ H ₂ O ₂ Assay	過酸化水素 (H ₂ O ₂) の測定	10ml	G8820	69,000	55,200
GSH-Glo™ Glutathione Assay	還元型グルタチオン (GSH) の測定	10ml	V6911	69,000	55,200
GSH/GSSG-Glo™ Assay	還元型および酸化型グルタチオン (GSH, GSSG) の測定	10ml	V6611	90,000	72,000
NAD/NADH-Glo™ Assay	NAD, NADH の測定	10ml	G9071	90,000	72,000
NADP/NADPH-Glo™ Assay	NADP, NADPH の測定	10ml	G9081	90,000	72,000

※ 期間限定プロメガクラブキャンペーン対象製品 ※ 期間: 2016年10月11日~12月22日

発光テクノロジーによる NAD・NADP の測定

ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) および、そのリン酸化型 NADP はともに生体内の酸化還元反応の補酵素として関与する重要な分子です。これらの分子もまた細胞内の代謝の状態や酸化還元状態を示す指標の1つです。

これまで、ELISA・HPLC などの煩雑な方法での測定がなされてきましたが、プロメガではこれらの分子種も簡便に測定できるよう、試薬の添加のみで測定できるようにデザインし、改良した測定法を確認しました。図2には一例として、NAD/NADH の測定原理を示しました。さらに、作製したライセートに対して酸やアルカリで前処理を行うことにより、片方の分子種を分解することで、酸化型・還元型それぞれの量や比率を測定することも可能です。

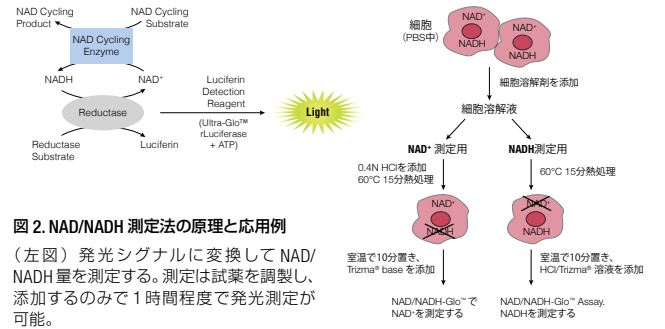


図2. NAD/NADH 測定法の原理と応用例

(左図) 発光シグナルに変換して NAD/NADH 量を測定する。測定は試薬を調製し、添加するのみで1時間程度で発光測定が可能。

(右図) 細胞株、組織、菌などのライセートサンプルに前処理を加えることにより、NAD, NADH (もしくは NADP, NADPH) をそれぞれ分けて測定可能

キーポイント

- ✓ **頑強なアッセイ** ⇒ 化合物の影響を受けにくいアッセイデザインと改良型 Luciferase を使用
- ✓ **簡単な測定プロトコル** ⇒ Add to Measure の簡単プロトコル
- ✓ **様々な生物種での応用例** ⇒ 哺乳動物細胞株に加え、組織やバクテリアの例もあり。もちろんマルチプレックスアッセイにも対応!

最後に

ここで紹介した NAD/NADH-Glo™, NADP/NADPH-Glo™ はかわら版夏号で紹介した Glucose Uptake アッセイなどの測定原理の基礎になっており、この技術をベースに種々の代謝産物の測定法の開発が進められています。また細胞株ベースでのアッセイのみならず、組織サンプルやバクテリアなどの応用例もありますので、詳細については弊社 Web サイトを参照いただくか、お気軽にお問い合わせください。