

代謝物質をプレートリーダーで高速解析！

細胞は周囲を取り巻く環境に適応するために細胞内のシグナル経路や代謝経路を変化させ、生存・分化・増殖といった運命決定を行っています。近年では癌細胞や細胞分化の過程でエネルギー代謝に変化が現れることが明らかとなり、創薬や再生医療の分野で新たな標的としてエネルギー代謝が注目を集めています。プロメガでは細胞の多様な応答性を細胞内外の酵素や代謝物を指標として簡便、高感度に測定するアッセイ技術を数多く開発してきました。今回はエネルギー代謝の主要なマーカーであるグルタミン、グルタミン酸、グルコース、乳酸を高感度な発光法で検出できる新たなアッセイシステムをご紹介します。

エネルギー代謝アッセイへの注目の高まり

幹細胞はその多能性を維持するために、解糖系に依存した代謝特性を示す一方、分化段階が進むにつれてミトコンドリアでの酸化的リン酸化の活性が高まり、代謝経路が移っていく事が知られています (Int. J. Mol. Sci. 2016, 17, 253)。昨今、がん領域で注目を浴びている免疫系においても、代謝経路の変化はホットなトピックであり、T細胞の分化の際には解糖系からミトコンドリアでの代謝への変化が起きるといわれています (Nature Reviews, 2016, 16, 553)。

また代謝産物がエpiジェネティックな制御に関与したり、脳・神経組織のように代謝産物が神経伝達物質として働くことも知られています (Cell Metabolism, 2016, 23, 27-47; Neuron, 2015, 86, 883-901)。

細胞周囲の代謝産物量の変化、細胞内の代謝経路の評価は今後、重要なアッセイの1つになっていくでしょう。

発光でのエネルギー代謝産物の測定

これまで、生体反応に関わっている様々な代謝産物を解析するには煩雑なMS解析、HPLC、RIなどの技術が必要となり、ボトルネックとなっていました。

このような背景を受けて、プロメガでは発光法でエネルギー代謝産物を測定する技術を開発しています。図1にはグルコース-乳酸-グルタミン-グルタミン酸の測定原理の概要を示しています。各測定対象に特異的なデヒドロゲナーゼがルシフェリン前駆体を還元することにより発光反応に必要なルシフェリンを生成するため、各産物の濃度に比例した発光を生じます。発光シグナルはルミノメーターで簡便に測定できるため、高価な機器の導入や煩雑な準備を行う必要はありません。また特殊な前処理を行う必要はなく、試薬の添加・混合のみで測定することができます。加えて、この技術は細胞内の測定だけでなく、細胞外(培養上清)サンプルや組織サンプル、血液(体液)サンプルにも対応可能です(図1)。

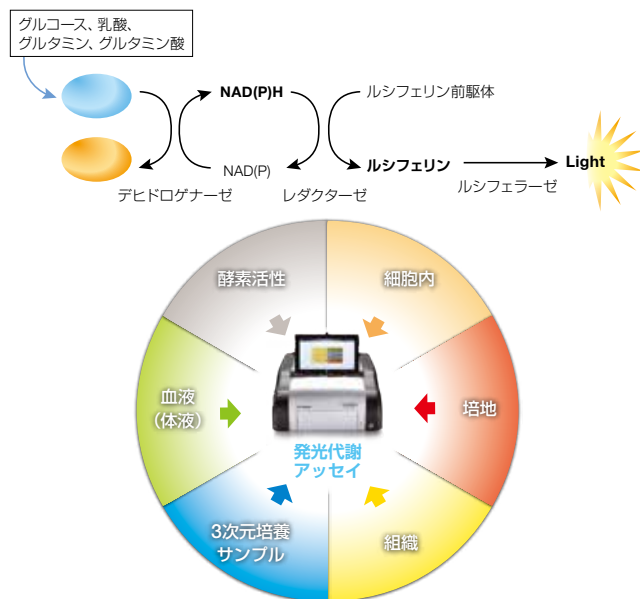


図1. (上図) グルコース、乳酸、グルタミン、グルタミン酸 測定原理。
(下図) 代謝産物測定アッセイで対応可能なサンプル例。

培養上清や分化誘導した細胞を使ったアプリケーション

この技術を使って培養上清中の代謝産物の経時的な変化を測定したアプリケーションを図2に示しました。一般的な細胞株では増殖の際にグルコースとグルタミンを細胞内に取り込み、代謝産物として乳酸とグルタミン酸を培地中に放出します。

肺がん細胞株のA549細胞を異なる細胞数で播種し、3日間培養を続け、各タイムポイントで培養上清を回収しました。各サンプルは希釈して発光アッセイのタイミングまで凍結保存し、最後のサンプリング後に発光アッセイを行いました。

細胞数および培養日数に依存してグルコースとグルタミンの減少が観察され、その一方で、培地中の乳酸とグルタミン酸量の増加が観察されました。グルコースとグルタミンが細胞内に取り込まれ、代謝産物の放出がなされた結果を反映しています。

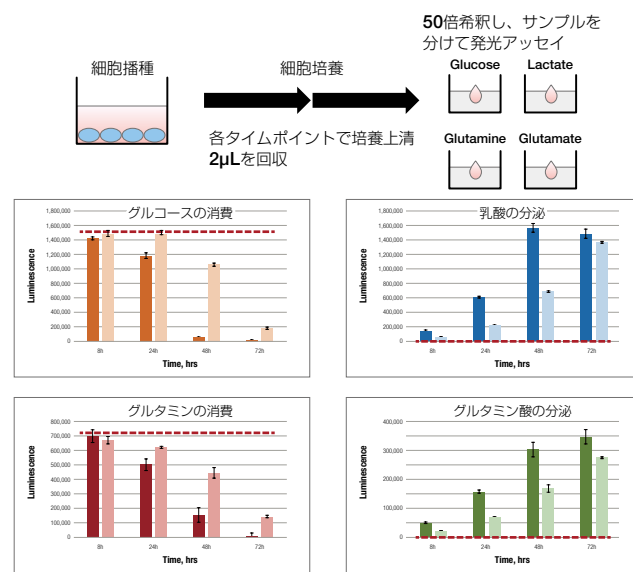


図2. 培養上清を用いた、各代謝産物の経時的測定

各代謝産物のグラフにおいて、濃い棒グラフは15,000細胞の条件を示し、薄い棒グラフは5,000細胞の条件を示す。また、赤い点線は培地のみの測定値を示す。培地はDMEM, 5mM glucose, 2mM glutamine, 10% dialyzed serumを使用した。

図3にはマクロファージ様に分化誘導した細胞を用いた例を示しました。マクロファージには大きく分けてM1型とM2型と呼ばれる2つのサブグループが存在し、M1型は炎症の惹起、M2型は抗炎症反応に関与すると言われています。また、M1型は解糖系が亢進している事が明らかになっています。

ヒト単球細胞株THP-1細胞を分化誘導し、各サブグループの代謝活性を評価したところ、M1型ではグルコースの取り込み量と乳酸の分泌量が亢進している結果が観察されました。このような分化誘導による代謝活性の評価にも対応可能です。

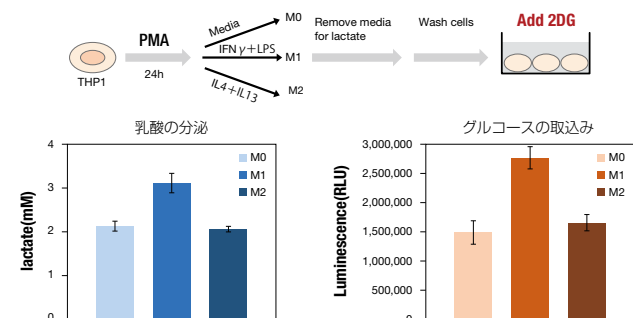


図3. T細胞における代謝活性の比較

THP-1細胞をPMAで刺激し、マクロファージ様に分化誘導した。その後、M1型はIFN γ +LPS刺激にて、M2型はIL4+IL13刺激にて分化誘導した。その後、培養上清中の乳酸量(左グラフ)およびグルコースの取り込み量の評価(右グラフ)を行った。

※ Glucose Uptake はかわら版 2016 年夏号をご覧ください ▶ http://www.promega.co.jp/pdf/kawara1607_p3.pdf

マルチプレックスアッセイへの対応

分化誘導や化合物刺激の後に、細胞の代謝を調べたい場合、化合物処理や分化誘導が細胞にダメージを与えてしまったり、生存性に影響を及ぼしてしまい、アッセイ結果に影響が出てしまう事はありませんか？特に図3のような分化誘導をおこなったサンプルや生体由来の細胞、未分化な細胞といった貴重なサンプルには、出来る限り1つの実験で複数のパラメーターが取得できる実験が望ましいのではないのでしょうか？

プロメガではマルチプレックスアッセイ（同一のサンプルに対して、複数パラメーターを取得するアッセイ）にて、より精度の高いデータを取得する実験を推奨しており、様々な組み合わせの事例があります。

図4は細胞内のグルタミン酸量の測定と合わせて、生存細胞数と細胞内ATP量を測定したアプリケーションです。まず、生細胞の還元能を指標とした RealTime-Glo™ アッセイまたは生細胞に特異的なプロテアーゼ活性を測定する CellTiter-Fluor™ 蛍光アッセイで生細胞を測定しました。次に細胞ライセートを用いたグルタミン酸量の測定や CellTiter-Glo® アッセイを用いて生細胞由来のATPを測定しています。貴重なサンプルでのアッセイにおいて余すところなくデータを取得することができます。

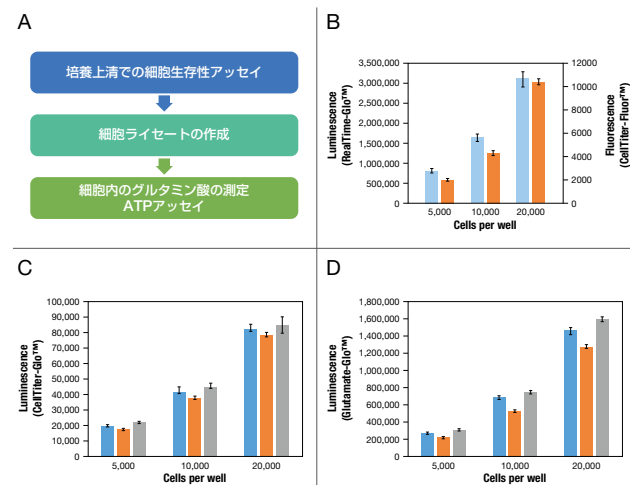


図4. グルタミン酸量の測定アッセイのマルチプレックス例

A549細胞を各細胞数でwellに播種し、生存細胞、細胞内グルタミン酸量、ATP量の測定を行った。

A. アッセイの概要と流れ

B. 培地中での生細胞試験（青色のバー：RealTime-Glo™）と、蛍光法での生細胞試験（オレンジ色のバー：CellTiter-Fluor™）

C. 調製した細胞ライセートに含まれるATP量をCellTiter-Glo® 2.0 Assayにて測定（青色のバー：RealTime-Glo™）実施後の細胞（オレンジ色のバー：CellTiter-Fluor™）実施後の細胞（グレーのバー：未処理の細胞）

D. 調製した細胞ライセートに含まれるグルタミン酸量をGlutamate-Glo™ Assayにて測定（上記と同様）

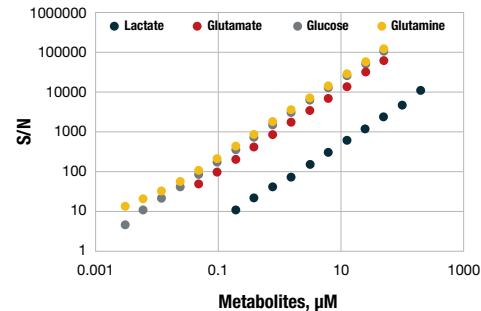
関連製品

Assay kit	測定用途	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Lactate-Glo™ Assay	乳酸量の測定（発光）	5 ml	J5021	74,000
Glucose-Glo™ Assay	グルコース量の測定（発光）	5 ml	J6021	67,000
Glutamate-Glo™ Assay	グルタミン酸量の測定（発光）	5 ml	J7021	74,000
Glutamine/Glutamate-Glo™ Assay	グルタミンとグルタミン酸量の測定（発光）	5 ml	J8021	80,000
CellTiter-Glo® 2.0 Assay	生細胞測定（ATP・発光）	10 ml (100 回分)	G9241	15,000
CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay	生細胞測定（生プロテアーゼ・蛍光）	10 ml (100 回分)	G6080	17,000
RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay	生細胞測定（還元能・発光）	100 回分	G9711	20,000
Glucose Uptake-Glo™ Assay	グルコース取り込み量の測定（発光）	5 ml (50 回分)	J1341	63,000

最後に

図2や4の例のように、プロメガの発光アッセイではわずか数μLのサンプルからでも測定を行う事が可能です。図5に各アッセイの測定レンジを示しました。この発光アッセイ法はpico mol レベルからの検出が可能であり、測定レンジも広いため従来の蛍光法では解釈が困難な実験結果を明瞭に示すことができます。

この他、様々なアプリケーション例を開発中であり、iPS細胞由来の分化細胞や分化誘導した脂肪様細胞、T細胞の代謝活性評価なども行っています。詳細は弊社 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。



測定サンプル	検出下限	直線性	S/B 比
Lactate	100nM (5pmol/50 μl)	Up to 200 μM	>240
Glucose	5nM (0.25pmol/50 μl)	Up to 50 μM	>1000
Glutamine	5nM (0.25pmol/50 μl)	Up to 50 μM	>1000
Glutamate	5nM (0.25pmol/50 μl)	Up to 50 μM	>500

図5. 乳酸・グルコース・グルタミン・グルタミン酸の測定レンジ

キーポイント

- ✓ **簡単な測定プロトコル・高価な機器不要** ➡ Add to Measureの簡単なホモジニアスアッセイでルミノメーターで測定可能！
- ✓ **頑強で高感度なアッセイ** ➡ バックグラウンドの低い発光測定で、幅広いレンジでの測定が可能！
- ✓ **様々なサンプルでの応用例** ➡ 培養細胞に加え、組織や体液サンプルの例もあり。もちろんマルチプレックスアッセイにも対応！

参考文献

- Donna Leippe et al. J Biomol Screen 2016 Nov. 1087057116675612.
- A Cacace and P Sonveaux et al. Oncogene, 1–11., 2016

「機器がないから…」 ← **大丈夫です、ご相談ください！**



RentaMAX: ルミノメーター貸出しプログラム
本稿でご紹介した発光法によるエネルギー代謝アッセイはルミノメーター（ルシフェラーゼアッセイでおなじみ発光測定装置）で測定することができます。ルミノメーターを利用

できない場合は弊社の GloMax ルミノメーターをお貸しいたします（詳細については www.promega.co.jp/rentamax/ をご覧ください）。プロメガの試薬 & 検出装置の組み合わせで最適なアッセイパフォーマンスが得られます。詳細はお気軽にお問い合わせください。

RentaMAX はプロメガのルミノメーター / 自動精製装置を無償で一定期間お貸しするプログラムで、試薬 / 機器の両面からのサポート・コンサルティングも行います。

代謝アッセイも

プロメガのルミノメーターが最適！

- ✓ **超高感度**
- ✓ **クロストークゼロ**
- ✓ **スーパーワイドダイナミックレンジ**