

生命現象をリアルタイムで理解しよう!:

プレートリーダーでシンプルに経時的アッセイをするためのコツとテクニック

概要

- アポトーシスや転写活性、タンパク質相互作用、タンパク質存在量などをリアルタイムに測定できるアッセイ
- プレートリーダーでリアルタイムアッセイをするためのマル秘テクニック
- プロメガのプレートリーダーと様々なリアルタイムアッセイ試薬で簡単に動的なバイオロジーを解析

はじめに

同一サンプルを用いて経時的に測定するリアルタイムアッセイは、データを効率的に収集して、薬剤化合物の細胞への長期的な影響を研究するための優れた手法です。これらのアッセイは細胞を溶解せずに生きたまま測定するので、同じサンプルを用いて複数のポイントで取得することができ、最適な測定タイミングを推測で決定する必要がなくなります。さらに、処理に対する応答についても同じ細胞集団で観察することができるので、アッセイのばらつきを低減することができます。

ここでは、GloMax® Discoverとプロメガのリアルタイムアッセイを使用して得られる生物学的情報についてご紹介します。また、リアルタイムアッセイを成功へ導くための重要なヒントも含まれています。

リアルタイムでの細胞の健康状態のモニタリング

リアルタイムアッセイで測定することにより、より有用なデータを引き出すことができます。処理の影響を受けているかを判断するだけでなく、処理がいつ、どの程度素早く細胞に影響を与えたかを理解することができます。

RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assayでは、アポトーシス表現型であるアネキシンVのホスファチジルセリン(PS)への結合、ならびに膜透過性の有無によるネクローシスの両方を同じウェルで長時間にわたりモニタリングすることができます。PSに標識アネキシンVタンパク質が結合すると発光シグナルが生成され、同時にネクローシス検出試薬は蛍光シグナルを生成します。これらのシグナルの経時的な変化を観察することで、アポトーシスまたはネクローシスが誘導されたかを判断することができます(図1)。

細胞の状態をリアルタイムでモニタリングするアッセイは細胞、プレートだけでなく研究者の貴重な時間も節約することができます。エンドポイントアッセイではタイムポイントごとに多数のパラレルプレートが必要になりますが、リアルタイムアッセイはたった1枚のプレートのみで十分です。図2に示すように、7枚のプレートを消費してカスパーゼ活性化を測定するエンドポイントアッセイ、RealTime-Glo™ Annexin V Assayでは1枚のプレートだけでモニタリングすることができます。リアルタイムアッセイにより、1ウェルあたりのデータ量が増え、生命現象をより深く理解できることを示しています。

リアルタイムで発光レポーター活性のモニタリング

ルシフェラーゼレポーターアッセイは通常、細胞を溶解して行われています。一方で細胞を溶解しないリアルタイムでのレポーター活性のモニタリングは、多種多様な細胞応答のダイナミクスをよりよく理解するためのオプションとなります。

NanoLuc® ルシフェラーゼは小さく、高感度な発光レポーター酵素であり、その基質は膜透過性を示します(NanoLuc®の詳細はかわら版2016年夏号および秋号をご覧ください)。生細胞アッセイに至適化されたNano-Glo® Live Cell Assay Systemは2時間までの実験において非常に明るいシグナルと広範なダイナミックレンジを示します。Nano-Glo® Endurazine™ Live Cell SubstrateとNano-Glo® Vivazine™ Live Cell Substrateはプロメガの技術を用いて開発された新規基質であり、数日にわたる実験を可能にします。(図3)。これらの基質により、研究者が求める様々な実験に対応することが可能となっています。

タンパク質不安定化ドメインが付加されたNlucPレポーター(NanoLuc®-PEST)は、細胞内での半減期が短いレポーターであり、化合物処理後に

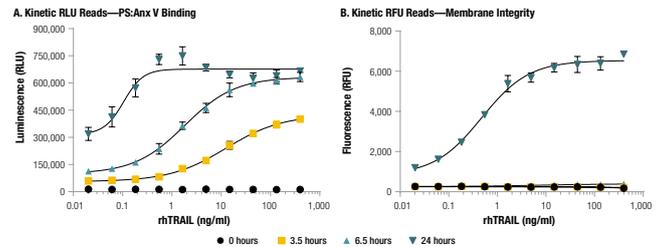


図1. ホスファチジルセリン(PS: Anx)へのアネキシンVの結合と細胞膜完全性の消失のリアルタイムアッセイ

U937細胞を、連続希釈したrhTRAILおよびRealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay Reagentの存在下、37°C /5% CO₂でインキュベートした。バックグラウンドを差し引いた発光、RLU(ホスファチジルセリンへのアネキシンVの結合、パネルA)およびバックグラウンドを差し引いた蛍光、RFU(細胞膜の完全性、パネルB)をGloMax® Discoverで0、3.5、6.5、および24時間後に測定した。時間依存的な発光の増加(ホスファチジルセリンへのアネキシンVの結合、パネルA)が時間依存的な蛍光の増加(細胞膜完全性の消失、パネルB)よりも先に起こったことはアポトーシスに続き2次ネクローシスが起っていることを反映している。

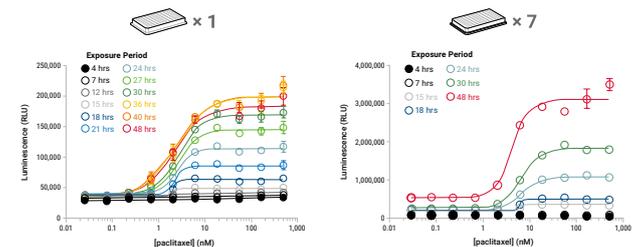


図2. リアルタイムアッセイとエンドポイントアッセイによる経時的測定

左パネル(リアルタイムアッセイ):各用量についてのデータは、RealTime-Glo® Annexin V Apoptosis Assay 試薬を1回添加した単一のアッセイプレートを用いて複数の時点で取得した。右パネル(エンドポイントアッセイ):エンドポイントアッセイを用いて7つの別々のプレートを用いてパラレルデータを取得した。

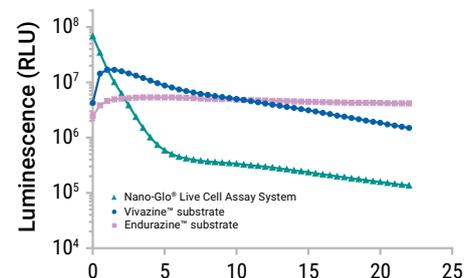


図3. Nano-Glo® Endurazine™、Nano-Glo® Vivazine™ Substrates および Nano-Glo® Live Cell Assay System の発光特性

HEK293細胞にPGKプロモーターよりNanoLuc®ルシフェラーゼを発現するプラスミドをトランジェントにトランスフェクションし、表示時間に発光シグナル強度を測定した。

起こる転写反応の変化をダイナミックに測定することができます。図4では、cAMP応答配列(CRE)を有するNlucPおよびNano-Glo® Vivazine™ Substrateを用いて、フォルスコリンによる細胞内cAMPの増加に続く転写活性化の用量依存的なタイムコース実験に使用できたことを示しています。転写の動態の変化は10時間にわたり観察することができました。

Nano-Glo® Live Cell Substrateは、タンパク質の動態タンパク質のリアルタイムな定量を可能にするNanoBiT®レポーターテクノロジーでも使用することができます。図5ではNano-Glo® Endurazine™ および Vivazine™

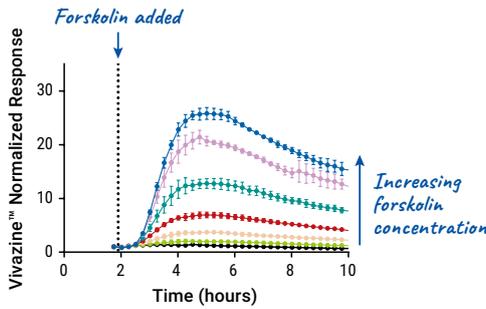


図 4. cAMP 応答配列 (CRE) プロモーターを有する NlucP 発現コンストラクトをトランジェントにトランスフェクションした HEK293 細胞

Vivazine™ substrate を 0 時間に添加し、GloMax® Discover、37°C で連続的に発光を測定した。約 2 時間後に様々な濃度のフォルスコリンを添加し、細胞内 cAMP 濃度上昇による NlucP の発現を誘導した。グラフはウェルごとに補正された 10 時間にわたるデータ。この基質により cAMP レベル増加に応じた CRE レポーター活性の用量依存的な上昇を検出した。

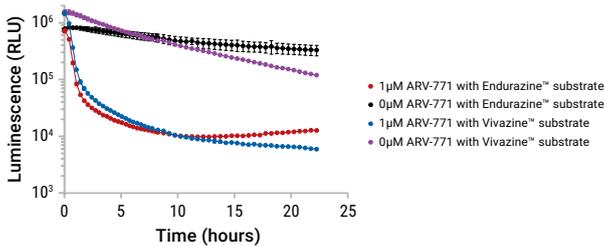


図 5. 内因性 BRD4 レベルの動的モニタリング

LgBiT を安定に発現する HEK293 細胞を CRISPR-Cas9 で編集し、内在性の BRD4 ローカスで HiBiT-BRD4 融合タンパク質を発現する細胞を作成した。ARV-771 (BRD4 標的デグレイドー [PROTAC]) による処理の後に Endurazine™ および Vivazine™ で HiBiT-BRD4 融合タンパク質の発現レベルをモニタリングした。

Substrate を用いて、LgBiT 発現細胞内での HiBiT タグタンパク質の発現レベルをリアルタイムにモニタリングしています (HiBiT の詳細はかわら版 2017 秋号をご覧ください)。内在的な発現条件でモニタリングするために図 5 の実験ではゲノム編集技術により HiBiT タグを BRD4 ローカスの N 末端へ導入しました。BRD4 を標的として分解する化合物 ARV771 を処理し、BRD4 タンパク質量の変化を発光シグナルにて定量しました。高感度な HiBiT タグを活用することで、BRD4 タンパク質量のリアルタイムな追跡が可能となることを示しています。

リアルタイム生細胞アッセイのキーポイント

これまでに示した結果はどれもエキサイティングですが、リアルタイムの生細胞アッセイを実施するにはいくつかの検討事項があります。多くの研究者は、実験用培養プレートに CO₂ ガス、湿度および温度制御されたインキュベーターに保存し、測定する時間にプレートをプレートリーダーに移します。これは最も経済的なアプローチですが、課題があります。手でプレートを移動させる場合、測定前にプレートのふたを取り外すことによって効率よくシグナルを得ることができますが、インキュベーターからプレートを取り出す時間が長いほど、結果のばらつきが大きくなります。また、プレートの蓋を外した際の微生物による汚染を懸念する研究者もいます。

これらの懸念を克服するためのアプローチの 1 つは、CO₂ ガスと温度を制御できるプレートリーダーを使用することです。この場合、環境条件を気にすることなく簡単に測定できますが、湿度は制御されないため 2 つの問題を引き起こします。まず、外側ウェルでの蒸発が起こりえるため、96 ウェルプレートの内側 60 ウェル程度しか使えずスルーポットを制限してしまいます。第二に、湿度管理のために蓋をして測定すると、ウェル間クロストークが増大し、感度も低下します。また、実験を通して結露が蓋に付着することもあり、アッセイの測定値に悪影響を及ぼします。

シンプルに対処できる方法として、光学的に透明でガス透過性を有するプレートシールを使用する方法が挙げられます。これらのシールを用いれば、プレートの蓋を通さず測定できるためウェル間のクロストークが抑えられ、しかもシールにより周囲の環境から各ウェルを防護することができます (図 6)。さらに、pH 変化に耐性があり、細胞を生存維持させる CO₂ 非依存性培地の使用も有用です。CO₂ 非依存性培地を使用す

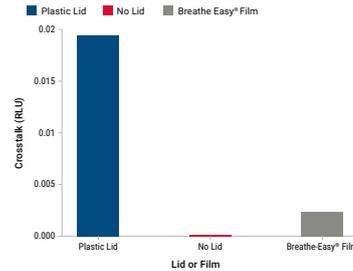


図 6. 蓋とシールを用いた際のクロストーク

Coring plates (Cat.# 3917) に付属するプラスチック製の蓋は、ブリーズイージー (株式会社 TOHO, 注文コード 0765050) あるいは蓋なしに比べ非常に高いクロストークを示した。Breathe-Easy™ Film は蓋なしに比べるとわずかなクロストークが認められた。

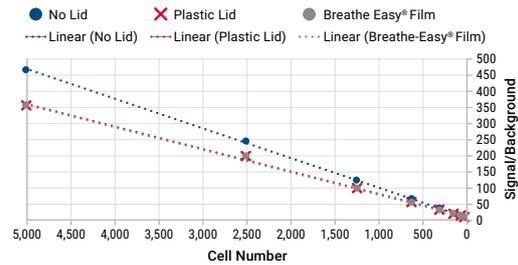


図 7. GloMax® Discover で、37°C で 24 時間、CO₂ 非依存培地で連続希釈した K562 細胞の細胞数ともなうシグナル/バックグラウンド

5,000 細胞 / ウェルを 20 細胞 / ウェルまで 2 倍希釈で調整した。同様のシグナル / バックグラウンドレベルおよび感度が、ブリーズイージー (株式会社 TOHO, 注文コード 0765050) および 96 ウェルプラスチック蓋の両方について観察された。

ることで、短時間であればアッセイの変動を心配せずに手でプレートをインキュベーターから出し入れしたり、環境制御機能の無いプレートリーダーでも使用することもできます (図 7)。

結論

プロメガは GloMax® を始めとするプレートリーディングルミノメーターだけで実施できるリアルタイム生細胞分析を、動的に変化するバイオロジーを簡単かつ経済的に調べる新たな手段として研究者に提供しています。

サイズ	カタログ番号	価格 (¥)	特別価格 * (¥)
リアルタイム (生細胞) アポトーシスアッセイ			
RealTime Glo™ Annexin V Apoptosis Assay	100 回分 JA1000	68,000	47,600
RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay	100 回分 JA1011	80,000	56,000
リアルタイム (生細胞) 細胞生存試験			
RealTime-Glo MT Cell Viability Assay	100 回分 G9711	21,000	14,700
NanoLuc® リアルタイム (生細胞) アッセイ			
Nano-Glo® Live Cell Assay System	100 回分 N2011	28,000	19,600
Nano-Glo® Endurazine™ Live Cell Substrate	0.1 ml N2570	30,000	21,000
Nano-Glo® Vivazine™ Live Cell Substrate	0.1 ml N2580	30,000	21,000
Nano-Glo® Extended Live Cell Substrate Trial Pack	0.2 ml N2590	38,000	26,600

* N2590 には N2570 と N2580 のセット品です。 *2019 年 8 月 23 日受注分まで

リアルタイムアッセイに最適なプレートフィルムをプレゼント!

上記のリアルタイムアッセイ製品ご注文先着 100 名様に、ブリーズイージーフィルム (注文コード 0765050) サンプル 5 枚セットをプレゼントいたします。ブリーズイージーフィルムは酸素や CO₂ のガス交換が可能なフィルムです (材質: ポリウレタン、UV 透過性: ~30 nm)

TOHO

日本総販売元: 株式会社トーホー
TEL: 03-3654-6611
URL: www.j-toho-kk.co.jp

