

# 発光基質の溶媒の検討と アッセイバッファー中の BSAの濃度の検討



イクオリン (Aequorin) は、発光クラゲ *Aequorea aequorea* より単離された発光タンパク質で、アポタンパク質アポイクオリン (Apoaequorin)、発光基質セレンテラジン (Coelenterazine) の複合体からなります。Ca<sup>2+</sup>がイクオリンと特異的に結合すると、アポイクオリンの高次構造変化により中心波長465 nmの青色瞬間発光を示し、副産物のセレンテラミドと二酸化炭素が生じます。この反応を利用して、生理的条件下の細胞内カルシウムイオン濃度変化の検出に利用することができます。

薬物の受容体結合試験、アゴニスト作用、アンタゴニスト作用の大量スクリーニングのため、近年、GPCR、Aequorinを発現させた培養細胞を用いたHTSが、以下の利点より注目され、盛んに行われるようになってきました。

- 高いS/N
- 少ない細胞で検出可能
- 化合物の自家蛍光の影響を低減でき、蛍光法と比較して擬陽性が少ない
- アッセイ自体が簡単 (mix and read)
- 細胞への毒性が少なく、アッセイできる時間が長い
- 生理的なCaイオン変化の検出が可能
- コストダウン化が可能で1536プレート向き

## 発光基質の溶媒の検討と、アッセイバッファー中のBSAの濃度の検討

### ■ 目的

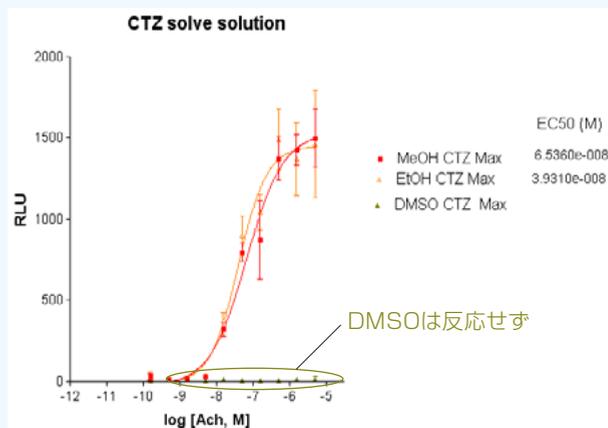
遺伝子組み換えの手法を用いて、GPCRとAequorinを発現する組み換え細胞を構築して薬物の応答を検出するためには、前述のアポイクオリンをイクオリンに変換する必要があります。そのため細胞には直前に、発光基質セレンテラジンをローディングします。その基質の最適な溶媒とアッセイバッファーを検討するため、HTSに代表的に用いられるCHO (Chinese Hamster Ovary) 細胞を用いて、溶媒の種類とアッセイバッファー中のBSAの濃度の比較実験を行いました。

### 実験1. 溶媒の検討

Neurotransmitterで刺激されるGPCRを発現させたCHO細胞を、1wellに10 000細胞分注しました。

基質の溶媒としてDMSO、MeOH、EtOHを用意し、セレンテラジンを溶解しました。

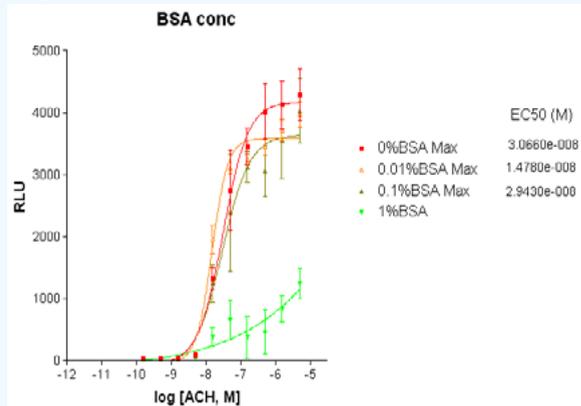
基質濃度5 μMで4時間ローディングした細胞を、内因性のリガンドであるACHで刺激しました。



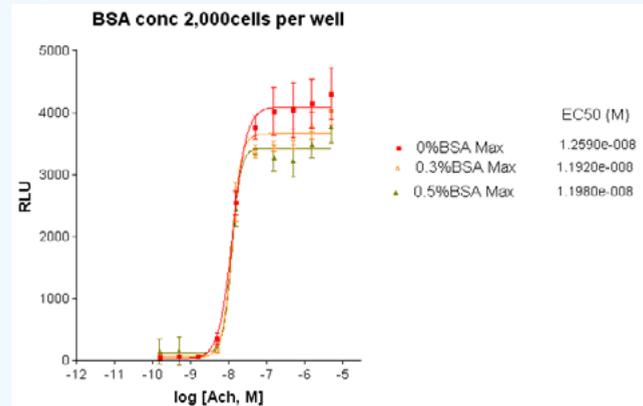
## 実験2. BSAの濃度検討

バッファー中のBSA濃度が0%、0.01%、0.1%、1%の場合で比較しました。  
発光基質濃度は5  $\mu$ M(EtOHで溶解)でローディングしました。

実験2-a



実験2-b



## まとめ

- 実験1の結果より、DMSOに溶解したセレンテラジンは、溶解後すぐに無色となり、発光能を失いました。
- 実験2-aの結果より、発光基質をローディングするバッファー中のBSA濃度は、1%近くになると極端にその用量依存的な発光が見られませんでした。
- 実験2-bより、発光基質をローディングするバッファー中のBSA濃度は、0.5%まではその影響も少ないことがわかりました。

### <参考文献>

- Adaptation of aequorin functional assay to high throughput screening.  
Le Poul E, Hisada S, Mizuguchi Y, Dupriez VJ, Burgeon E, Detheux M.  
J Biomol Screen. 2002 Feb;7(1):57-65.
- Aequorin-based functional assays for G-protein-coupled receptors, ion channels, and tyrosine kinase receptors.  
Dupriez VJ, Maes K, Le Poul E, Burgeon E, Detheux M.  
Receptors Channels. 2002;8(5-6):319-30.

★FDSSIは浜松ホトニクス株式の登録商標です。

その他の記載商品名、ソフト名は該当商品製造各社の商標または登録商標です。

※本カタログの記載内容は2009年11月現在のものです。本内容は改良のため予告なく変更する場合があります。

## 浜松ホトニクス株式会社

□システム営業推進部 〒431-3196 浜松市東区常光町812  
TEL (053)431-0150 FAX (053)433-8031  
E-Mail sales@sys.hpk.co.jp

□仙台営業所 TEL (022)267-0121 FAX (022)267-0135  
□筑波営業所 TEL (029)847-3821 FAX (029)847-8654  
□東京営業所 TEL (03)3436-0491 FAX (03)3433-6997  
□中部営業所 TEL (053)459-1112 FAX (053)459-1114  
□大阪営業所 TEL (06)6271-0441 FAX (06)6271-0450

WEB SITE [jp.hamamatsu.com](http://jp.hamamatsu.com)

**HAMAMATSU**

Cat. No. SBI/S0071J01  
NOV/2009 HPK