

発光基質の濃度と ローディング時間の条件検討



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。Ca²⁺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

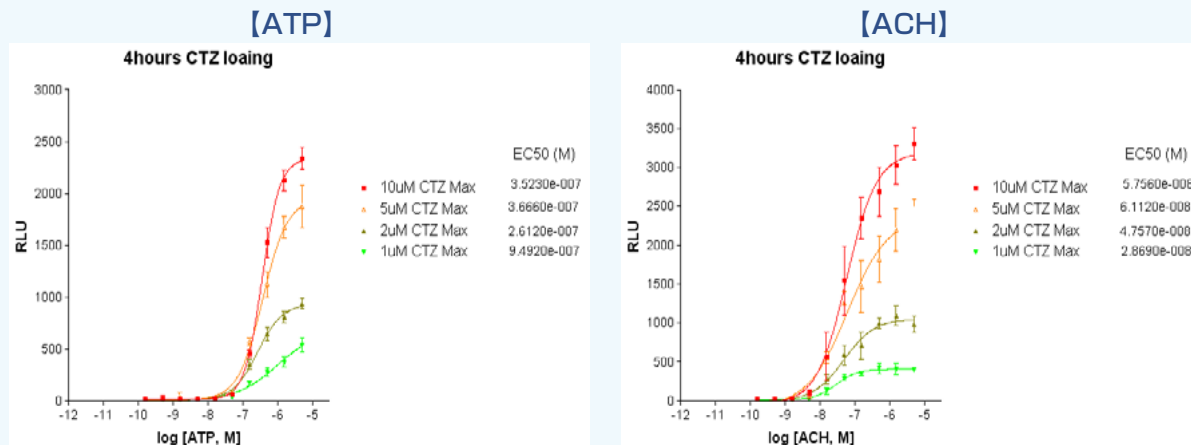
発光基質の濃度と、細胞に対するローディング時間の条件検討

■ 目的

遺伝子組み換え的手法を用いて、GPCR-Aequorinを発現する組み換え細胞を用いて発光測定を行うためには、直前に細胞に対して発光基質セレンテラジンをローディングする必要があります。その最適な基質濃度とローディング時間を検討するため、HTSに代表的に用いられるCHO (Chinese Hamster Ovary) 細胞を用いて実験を行いました。

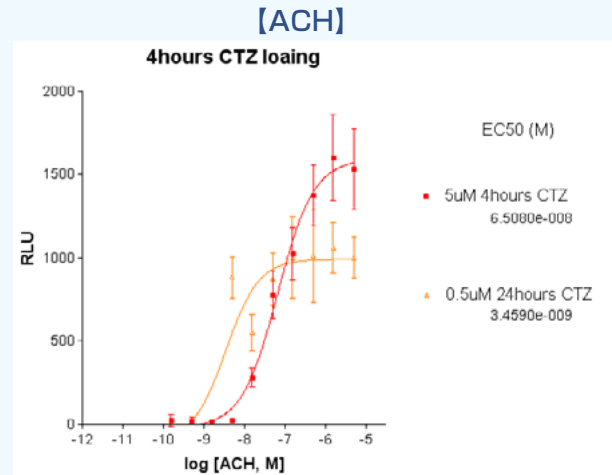
実験1. 発光基質濃度の検討

Neurotransmitterで刺激されるGPCRを発現させた遺伝子組み換えCHO細胞を、1wellに10,000細胞分注しました。基質濃度1 μM、2 μM、5 μM、10 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ATPとACHで刺激しました。



実験2. 発光基質のローディング時間の検討

発光基質セレンテラジンを5 μM で4時間ローディングしたものと、0.5 μM で24時間ローディングしたものとの比較しました。



まとめ

- Aequorinの発光基質であるセレンテラジンは、通常5 μM で当日(4時間)ローディングされますが、実験1の結果から、さらに濃度を上げることにより発光の最大値を上げられることがわかりました。
- 24時間で発光基質をローディングする場合は、通常0.5 μM で、チューブを回転しながら添付されますが、その場合は、細胞内の再構築されたAequorinがより多く生産され、より低濃度のリガンドに刺激されて放出されるカルシウムイオンを検出することができます。

<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.hpkk.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

HAMAMATSU

Cat. No. SBIS0070J01
NOV/2009 HPK