

発光で細胞内 Ca を測定したい

使用製品

Coelenterazine-WS [C397]

解析装置



I はじめに

エクオリン (aequorin) は発光オワンクラゲ (Aequorea) から単離された発光タンパク質であり、タンパク質部分であるアポエクオリン (apoaequorin)、発光種であるセレンテラジン (Coelenterazine)、および分子状酸素からなる複合体である。この複合体にカルシウムイオンが結合すると、タンパク質のコンフォメーションが変化し、セレンテラジンが酸化的に分解する過程で生じる励起カルボニル基が基底状態に戻るときのエネルギーが発光として放出されることが知られている。このエクオリンの発光は、極めて低濃度のカルシウムイオンの存在により起こるので、生理的条件下の細胞内カルシウムイオンの濃度測定にも使用することができる。

最近、分子生物学的手法を用いて細胞内にアポエクオリンを導入する方法が確立され、更にセレンテラジンを細胞内に導入することによりエクオリンを再生させ、細胞内カルシウムイオンの濃度変化を発光により測定する実験系が開発されている。

セレンテラジンのアポエクオリンとの複合体 (エクオリン) の発光メカニズムを図 1 に示す。

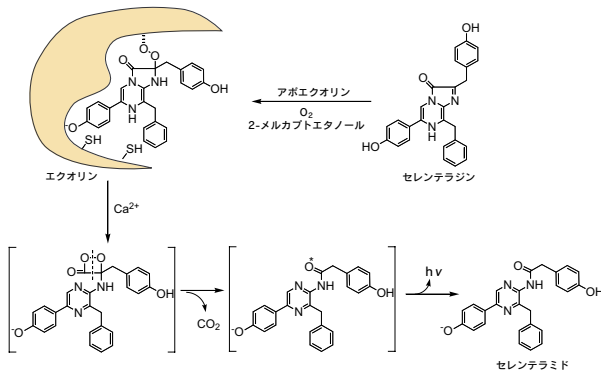


図 1 エクオリンの発光メカニズム

セレンテラジンおよびその類縁化合物は、生体試料において一般的な中性近傍の pH における水溶性が低く、細胞内への導入は容易ではない。一般的にはメタノールに溶解後、培養液に添加するなどして試料溶液に添加されている。しかしながら、メタノールを使用するため、細胞への毒性の影響を避けることはできない。

ここで紹介する水溶性セレンテラジン [Coelenterazine-WS (Code: C397)] は、セレンテラジンに包接化合物を添加して水溶性としたもので、中性領域における水溶性が飛躍的に向上し、そのため種々のバッファー溶液にも容易に溶解することができる。したがって、細胞への導入が容易になることによりエクオリンの発光性能を増加することができる¹⁾。

Coelenterazine-WS 中のセレンテラジン含量は 2% である。

II 使用例

Coelenterazine-WS の使用例として、アポエクオリンを発現させた酵母細胞の破碎溶液中での発光強度を測定する方法を紹介する¹⁾。

1. Coelenterazine-WS 溶液の調製

Coelenterazine-WS 1 mg を 10 mmol/l のリン酸バッファー (pH7) 0.1 ml に溶解したものをストック溶液として使用する (Coelenterazine 濃度 : 500 μmol/l)。

2. エクオリン活性測定^{2), 4), 5)}

アポエクオリンを発現した酵母の作成方法については、参考文献 2), 3) を参考のこと。

- 1) アポエクオリンを発現した酵母 (~ 1 × 10⁷ cells) を 1,600 x g で 3 分間、室温で遠心分離後、Triton-X100 を加え破碎する。
- 2) 30 mmol/l Tris-HCl(pH7.6)、10 mmol/l EDTA、1 mmol/l phenylmethylsulfonyl fluoride の溶液 100 μl を加えて混合する。
- 3) 10,000 x g で 10 分間、4°C で遠心分離し、上澄みを 30 mmol/l Tris-HCl(pH7.6)、10 mmol/l EDTA の溶液で希釈する。
- 4) 等分した 100 μl の溶液に 1 μl の 2-mercaptoethanol(14.2 mol/l) を加え、それに Coelenterazine-WS ストック溶液 30 μl を加え、氷浴中で 2 時間保存する (エクオリンの生成)。
- 5) 500 μl の 30 mmol/l CaCl₂、10 mmol/l Tris-HCl (pH7.6) に、4) の溶液 2.5 μl を添加し、フトンカウンターにて発光量を測定する。

3. アポエクオリンを発現させた酵母細胞内のカルシウム測定²⁾

- 1) アポエクオリンを発現した酵母 (5 × 10⁶ cells/ml) を SD (Synthetic medium) 培養液⁶⁾ 中、1,600 x g で 3 分間、室温で遠心分離する。
- 2) Coelenterazine-WS 1 mg を SD 培養液 0.1 ml に溶解したものを (Coelenterazine 濃度 : 500 μmol/l) 30 μl に懸濁する。
- 3) 室温で 10 分間インキュベートする。
- 4) Millipore の type HA (pore size, 0.45 μm) でろ過し、SD-Ca 培養液⁶⁾ (Ca 濃度 0.24 μmol/l) 10 ml で洗浄する。その後 SD-Ca 培養液 500 μl に再度懸濁する。
- 5) 細胞懸濁液をキュベット (φ 7.2 × 50 mm) に移す。
- 6) 1 mol/l の CaCl₂ 溶液を 5 μl 入れ、1 mmol/l のカルシウムイオノフォア、A23187 を添加して測定を開始し、フトンカウンターで発光強度を測定する。

参考文献

- 1) K.Teranishi, O. Shimomura, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1997**, *61*, 1219.
- 2) J. Nakajima-Shimada, H. Iida, F. I. Tsuji, Y. Anraku, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1991**, *88*, 6878.
- 3) S. Inoue, N. Noguchi, Y. Sakaki, Y. Takagi, T. Miyata, S. Iwanaga, T. Miyata, F. I. Tsuji, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1985**, *82*, 3154.
- 4) J. R. Blinks, P. H. Mattingly, B. R. Jewell, M. van Leeuwen, G. C. Harrer, D. G. Allen, *Methods Enzymol.*, **1978**, *57*, 292.
- 5) S. Inoue, Y. Sakaki, T. Goto, F. I. Tsuji, *Biochemistry*, **1986**, *25*, 8425.
- 6) H. Iida, Y. Yagawa, Y. Anraku, *J. Biol. Chem.*, **1990**, *265*, 13391.