



# ルシフェラーゼが照らし出すもの

## Luciferase Lights the Way

細胞生理学の情報が蓄積されるにつれ、遺伝子発現制御の相互依存性に関する理解がますます複雑化しています。さらにゲノム分野からの膨大な情報が、新発見のペースを日々速めている中、細胞の増殖、分化、環境変化への反応を司るたくさんの新規遺伝子が次々に発見されるようになりました。このことは、レポーター遺伝子テクノロジーの進展により、これら新規遺伝子がどのようにゲノム制御を行っているか理解する手法が簡素化されたことによると言えないでしょうか。

このPromega Notes No.74では、遺伝子発現分野を始め、ライフサイエンス分野の研究に役立つ製品やアプリケーションを数多く紹介しています。

プロメガは約十年前、既にルシフェラーゼを基盤とするレポーターベクターやそのアッセイ用試薬を最初に市場導入することで、この分野の著しい進展の先駆けとなりました。当時、既存のレポーター遺伝子のシステムに比べ、バイオルミネセンス（生物発光）によるレポーター試験は速さ、感度、簡便性において明確な優位性を示しました。特に有用な点は、遺伝子の微妙な発現量の差が定量できたことです。このためホタルルシフェラーゼ遺伝子を利用したレポーターアッセイはすばやく遺伝子制御の分野で認知されました。

従来の実験方法では、一次レポーターにホタルルシフェラーゼを使い、ベクター導入（トランスフェ

クション）効率を補正するための二次レポーターにガラクトシターゼ、GUS、CATを利用していました。これらの二次レポーターをコントロール（対照）として使うことにより、1検体を2種類のレポーター試験用に分割する必要が生じます。この作業のために試薬、準備、そして実験自体の時間を費やさなければなりません。この対照レポーターに付随する煩雑さにより、ホタルルシフェラーゼの有用性が分りにくくなっていました。

Dual-Luciferase™ Reporter Assay System(DLRS)はこの問題を解決するために、ウミシイタケより単離した異なる発光酵素を二次レポーター遺伝子として導入しました。このDLRSでは、一次レポーター試験と二次レポーター試験の反応が一つの試験管で順番に行われる為に、検体を分割する必要がありません。このことにより、かなりの労力と時間が節約され、マニュアル操作のルミノメーターを使用した場合は30秒、デュアル用のオートインジェクター付きのルミノメーター(TD20/20)ではたったの4秒で一次、二次レポーターの反応・測定が終了します。

DLRSは哺乳類や植物細胞での遺伝子発現研究、無細胞系の翻訳実験などにも利用されていますが、最も著名な利用方法は転写因子結合領域、エンハンサーエレメント、プロモーター領域の活性調査実験などに代表される転写制御実験です。現在、DLRSは細胞信号伝達経路、細胞周期制御、免疫反応経路、ウイルス遺伝子発現制御の研究や創薬スクリーニン

グの場で常用されています。また、タンパク質タンパク質結合実験用の CheckMate™ Two-Hybrid SystemにもDLRSを使うことができます。例えば、創薬においてタンパク質-タンパク質結合を阻害する物質のスクリーニングに応用することができます。この場合、ホタルルシフェラーゼの発光の減衰として、物質による結合阻害を確認できます。

次世代の生物発光レポーターシステムとして Steady-Glo™ と Bright-Glo™ Luciferase Assay System が登場しています。これらホモジニアス（ワンステップ）方式の試薬は短時間にホタルルシフェラーゼのレポーター活性定量を完了させることができます。このタイプの試薬は培養細胞に、培地を取り除くことなく直接加えるだけで、細胞溶解と発光ステップが行われます。また、これら試薬では発光半減期が延長されているため、多検体の遺伝子発現系実験の処理に適しています。Steady-Glo™ は5時間以上の半減期を示します。また、Bright-Glo™ の半減期は30分ですが、Steady-Glo™ の約7倍の発光量を示し、微弱な遺伝子発現の調査や CCD カメラを利用したルミノメーター、特に 384 穴プレートによる小型化されたアッセイ系に適した試薬になっています。

プロメガでは顧客の皆様への現在と未来のニーズに応えるため日々開発に努めています。そして、このことが、現代の生物発光レポーターシステムの開発に大きく貢献しているのです。



# ワンステップ型ルシフェラーゼ発光試薬の設計

## Design of Homogeneous Luciferase Assays

ワンステップ型ルシフェラーゼ発光試薬はレポーター定量試験をより簡単・迅速にしました。しかし、このタイプの試薬はデータの安定性に大きく影響し、それにより、実験結果の信頼性に影響する場合があります。その主な原因は、「サンプル中での発光のばらつき」に起因するものです。これは、発光試薬を加えたときに生じる濃度勾配によります。プロメガの Steady-Glo™ (a) ルシフェラーゼ発光試薬ではこの問題が革新的な技術により解決されています。

### はじめに

哺乳動物細胞における遺伝子制御実験では迅速で優れた精度を提供するホタルルシフェラーゼレポーター試験が広く利用されるようになってきました。ルシフェラーゼをレポーターとして利用することにより、培養細胞を含む培養液に発光試薬を加えるだけで高感度かつ定量性の高いデータを得ることができます。この新しいタイプの試薬は従来の試薬に比べ、培養細胞から培地を取り除くことなく発光試験を行なうことができるので、簡便性が非常に高くなりました。Steady-Glo™ はこのように高密度小型化傾向にある 96 穴、384 穴、1,536 穴培養プレートで発光試験を行うのに最適化された試薬です。つまり、細胞培養プレートに発光試薬を加え、そのままルミノメーターで発光測定できます。

効率の良いアッセイ方法を採用した場合、より多くの複製検体や対照検体を加えることができるためデータの信頼性が向上します。このような効率アップを目的としたスクリーニング系ではワンステップ型発光試薬を使うことがさらに多検体処理能力アップに貢献することになり、多検体処理に適した試薬である Steady-Glo™ がファーストチョイスとなりま

す。96穴プレートのサンプルを処理するために、通常2-10分の処理時間を要します。創薬業界では1製薬会社あたり1万から10万検体のルシフェラーゼレポーターアッセイが1日で行われています。しかし、従来のルシフェラーゼアッセイの安定した発光時間は約1分間ほどしかありません。一方、発光時間を延長したワンステップ型ルシフェラーゼ発光試薬では、この検体数を処理するために、プレート全てのウェルに試薬を投入し、20-40プレートの結果測定を終了できるだけの時間を発光しつづければなりません。この発光時間延長型試薬 Steady-Glo™ では発光量の半減期は優に5時間以上あり、このことが、効率的な多検体処理を実現します。

Promega Notes No.70 (1999) ([http://www.promega.com/pnotes/70/7618\\_07/7618\\_07.html](http://www.promega.com/pnotes/70/7618_07/7618_07.html))にてE. Hawkins等は性能の劣る試薬ではSteady-Glo™ に比べ5-6倍の幅でデータの可変性(実験誤差)が推移することを論じました。これでは簡便性を謳うワンステップ型発光試薬の有用性がデータ信頼度の損失により相殺されています。特に、稀なヒットを追う多検体処理スクリーニングを行なう場合に大きな問題となります。劣った発光試薬による実験誤差が統計上のノイズとなりデータ精度を劣化させてしまい、スクリーニング経費が膨らむどころか、検出されるべきヒットさえ見逃してしまう可能性を生じます。

本稿では、発光試薬の組成がどのようにルシフェラーゼレポーター試験の実験誤差に影響するか詳細に説明します。プロメガでは試験管内で一般的な発光が起こらないことが実験誤差を与える主要原因であることを発見しました。一般的にワンステップ型発光試薬

を投入すると、試験管内の反応液の全てが一様に発光反応を起こす(反応液全体が発光する)と考えられていますが実験誤差が大きいワンステップ型発光試薬ではウェルの上から下まで満遍なく発光していません。その原因として、二つのことが考えられます: 不完全な攪拌が原因となる試薬の濃度勾配、完全に攪拌した後に起こりうる発光の勾配。場合によっては、これらの原因によりかなり発光量が影響されることもあり、この発光の不均一性により実験誤差が生じる可能性が十分にありま

(次ページに続く)

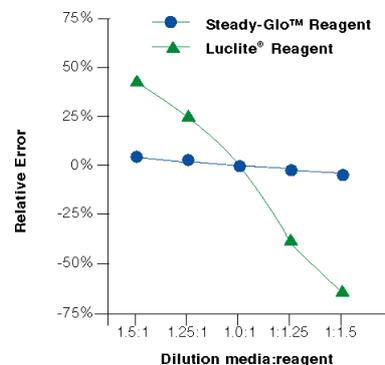


図1. 濃度勾配に依存した発光量。2.2 x 10<sup>10</sup>Mの精製ホタルルシフェラーゼを含むRPMI 1640培地+1mg/ml BSAを96ウェルプレートに1ウェルあたり100μlずつ加えた。Steady-Glo™試薬とLucLite™試薬を横軸に示した希釈率になるようにウェルに加えた。発光測定はDynex MLX®ルミノメーターを使って0.5秒以上測定した。サンプル:試薬=1:1で混合した結果を0%として、相対的なエラーの比率のパーセントを計算した。プロットされたデータは4ウェルの平均である(平均の相対的なエラー率は2.8%以下)。

# ワンステップ型ルシフェラーゼ発光試薬の設計

## Design of Homogeneous Luciferase Assays

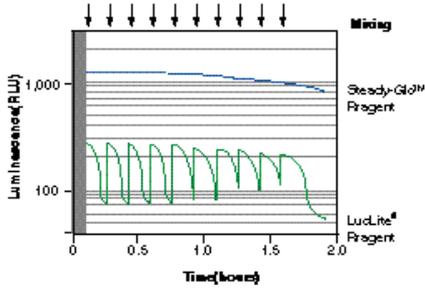


図2. サンプルを攪拌した時の発光勾配の影響。発光反応は100 $\mu$ lの2.4  $\times$  10<sup>-6</sup>Mの精製ルシフェラーゼを含むF12培地+1mg/ml BSAに100 $\mu$ lのアッセイ試薬を加えることで開始した。反応は96ウェルプレートの単一ウェルと類似したサイズの8  $\times$  15mm チューブで行った。発光はTurner Designs社製のルミノメーターモデル20eで連続的に測定した。10分毎にルミノメーターからチューブを取り出し、ボルテックスで攪拌し、ルミノメーターに戻した。攪拌に続く発光の減少は、アッセイ試薬による酸素の枯渇により引き起こされた。チューブの攪拌は酸素を再供給し、開始時の発光強度を回復させた。Steady-Glo™は発光の勾配を最低限に抑えるように設計された。同様の結果がルシフェラーゼを発現させた哺乳類細胞のサンプルでも確認された。

### 発光に対する試薬の濃度依存性

ワンステップ型発光試薬で発光時間を延長するような組成をデザインした場合、濃度勾配に依存した発光量の差を生じやすくなります。まだ詳細は解明されていませんが、ルシフェラーゼによる発光反応自体が酵素活性を阻害する現象を起こします。この現象は適切な試薬の組成をデザインすることによりある程度まで防ぐことができます。発光試験の感度を上げるために発光量を増す組成にすると、発光量の半減期は短くなる傾向を示します。例えば、プロメガのLuciferase Assay Systemの発光量の半減期は約15分程度です。その発光時間を延長するためには発光阻害現象を抑制すると共にルシフェラーゼの触媒作用速度も下げなければなりません。従って、長時間発光試薬の感度は当然低くなります。

発光試薬の感度の減少は、発光時間と発光阻害現象を防ぐ試薬の組成のデザインによります。この設計のもとに生まれたSteady-Glo™は5時間以上の発光半減期を有するワンステップ型発光試薬として完成しました。その感度は、長時間発光型試薬として最適化されているものの、発光量は従来の発光試薬の約20分の1です。ワンステップ型発光試薬は培地に直接加えられる為、何らかの影響を培地成分から受けますが、Steady-Glo™では感度の減少がデータのS/N比の劣化につながらないため、多くのアプリケーションに利用されています。

触媒速度を減速させ、発光時間を延長するために組成中に阻害剤を加えますが、この方法は阻害効率が阻害剤の濃度に比例するために、発光量の濃度依存性がかなり高くなります。この現象はLucLite® Reagent(Packard Instruments)でかなり顕著に表れています。この現象は加える試薬と培地の比率を変えて発光量を測定することで確認できます(図1)。Steady-Glo™とLucLite®は双方とも培地に対して1対1の比率で加えるように設計されています。ところが、LucLite®では培地容量に対して1.25倍、1.5倍と加えた場合、阻害剤の濃度が上昇するために発光量が減少します。逆に1対1より少ない割合で加えられた場合は、発光反応が急激に起こり、発光時間が急激に減少します。一方、Steady-Glo™はLucLite®とは異なる設計により対処しているため、濃度差が生じて発光量と発光時間にほとんど影響が出ません。

発光試薬が毎回正確に注入され完全に攪拌される

のならば濃度勾配の問題は生じません。しかし、自動化されたロボットで多検体を処理する場合、この問題はより重要となります。多検体処理システムにおいて攪拌はピペッターの注入の勢いで行なわれます。したがって、正確な量の試薬が注入されたとしても、検体中に部分的な試薬の濃度勾配ができてしまうことは避けられません。Steady-Glo™はこのような濃度勾配に対して発光量が影響しないため、たとえ部分的な濃度勾配が生じたとしても不均一な発光によるデータのS/N比の劣化は起こりません。1検体あたりが少ない容量になる384穴プレートでの発光試験では、検体中の試薬濃度の部分的な不均一性がさらに深刻なものになります。

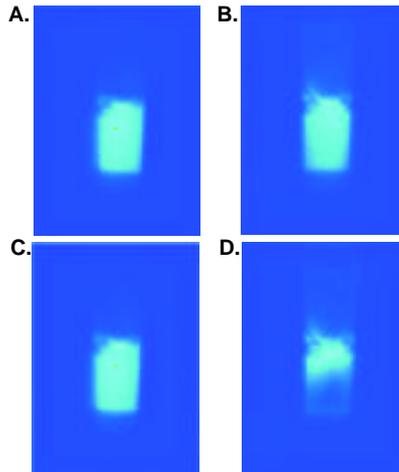


図3. 発光の勾配。発光の勾配をNightOwl™ CCD-imaging(EG&G Berthold)カメラを使った384ウェルプレートのウェルで可視化した。発光反応は20 $\mu$ lの2.2  $\times$  10<sup>-6</sup>Mの精製ルシフェラーゼを含むF12培地+1mg/ml BSAにアッセイ試薬20 $\mu$ lを加えて開始した。Steady-Glo™(パネルA)とLucLite®(パネルB)はサンプルの攪拌直後は均一な発光を示した。12分後、Steady-Glo™(パネルC)の発光は均一なままだが、LucLite®(パネルD)ではウェルの底で発光が減退した。より詳細な解析のため、各パネルの相対的な発光強度を調整した(図4参照)。

### 発光の勾配現象

発光試薬を完全に攪拌したとしても、サンプル中での発光の勾配が生じます。この原因は完全に解明されてはいませんが、酸素分子の発光反応への供給が不足するために起こると考えられています。ワンステップ型発光試薬をルシフェラーゼに加え、完全に攪拌するとその直後は均一な発光を得ることができます。しかし、時間が経過するとともにウェルの底の部分から発光が弱まり最後には表面だけが発光するようになります。これを再度攪拌すると、検体は均一に発光しますが、また同じパターンを経て表面だけの発光が残るようになります(図2)。この発光の勾配現象が起こるため、反応液全体からの発光量が減衰します。まして、この現象は単純な操作により解決できないため、試験系の精度に大きく影響していると考えられます。

この発光勾配現象は、酸素分子が反応溶液中で不足したとき、酸素分子がとけ込みやすい反応溶液の表面だけで発光が持続することに起因すると考えられます。この発光勾配現象は予想通り表面積の狭く深いウェルでより早く起こり、浅く表面積が大きくとれる容器(例: 96穴に対して384穴プレート)では、起こりにくくなります。

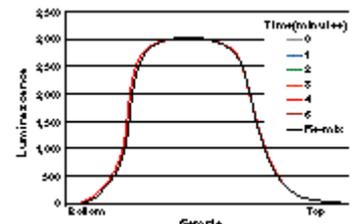
精製されたルシフェラーゼを含むF12培地にLucLite®を指示どおり加えた場合、(384穴プレートの1ウェルを使用)、10分後にはウェルの底部分の発光が事実上消滅してしまいます(図3, 写真D)。

発光が反応溶液の表面だけで起こっている様子が見られ、その表面の発光も酸素分子の拡散率によっても制限されています(図4, グラフB)。ここで、再攪拌すると発光反応は均一な状態に戻ります。全く同様の実験をSteady-Glo™で行なった結果、発光勾配現象は全く起こりませんでした(図3, 写真Cおよび図4, グラフA)。このようにSteady-Glo™は試薬中における酸素消費を極力抑える工夫をした結果、発光量の減衰を抑制することができました。また、上記の酸素消費は発光反応による酸素消費ではありません。例えば、LucLite®試薬はSteady-Glo™よりも感度が低い(発光量が少ない)にもかかわらず、急速に発光勾配現象が起こることからわかります。

また、発光勾配現象が起こることは不安定な化学的環境を作ることになり、これが実験誤差に大きく影響します。特に濃度勾配を生じた検体が機械的な振動により混合されると、全体的な発光量の変化をもたらす、データにバラツキを与える原因となります。このような振動を防ぐのは、マニュアル操作あるいは自動化されているシステムの操作であってもかなり困難です。また、たとえ振動が防げたとしても、酸素分子の拡散状況を毎回同じにすることは、ほとんど不可能であると考えられます。このバランスは、ウェルの形状、反応液の毛細管現象、気泡の形成、空気流動などにより左右されます。また、発光勾配現象が起こると全体の発光量が減少する、すなわち感度が下がることを認識しなければなりません。緩衝生理食塩水を使用することでこの勾配現象をかなり防げますが、ワンステップ発光試薬の利点である簡便性が「培地を取り除く」作業により失われてしまうために、スループット(検体処理能力)が低下します。そこで、上記に述べてきた問題を解決するために、Steady-Glo™の利用を提案します。

最後に、今回の実験ではLucLite®が最も認識されているワンステップ型ルシフェラーゼ発光試薬のためSteady-Glo™の比較対象としました。

#### A. Steady-Glo™ Reagent



#### B. LucLite® Reagent

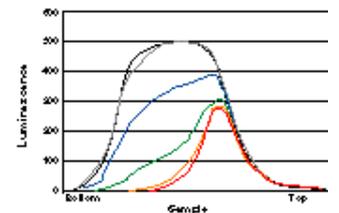


図4. 発光勾配の形成。発光勾配の形成をNightOwl™ CCD-imagingカメラでおおまかに定量した。プラスチックのマルチウェルプレートによる光学的な影響を除くために、発光はガラスキュベット(幅2mm、長さ1cm)で測定した。発光反応は50 $\mu$ lの2.2  $\times$  10<sup>-6</sup>Mの精製ルシフェラーゼを含むF12培地+1mg/ml BSAにアッセイ試薬50 $\mu$ lを加えて開始した。発光勾配の形成比率は測定容器の容量と形状により384ウェルプレートの方がキュベットよりも大きかった。パネルA: Steady-Glo™、パネルB: LucLite®。この結果はLucLite®の発光がサンプルの底からどのように減衰しているか、また上部ではその差が小さいことを示す。サンプルを再攪拌した後、均一な発光がサンプル全体において回復された。対照的に、Steady-Glo™の発光は均一なままだった。