

クリックビートル由来の新しいルシフェラーゼ:Chroma-Luc[™] テクノロジー

By Brian Almond, Ph.D., Erika Hawkins, M.S., Pete Stecha, B.S., Denise Garvin, M.S., Aileen Paguio, M.S., Braeden Butler, B.S., Michael Beck, M.S., Monika Wood, M.S., and Keith Wood, Ph.D., Promega Corporation

アブストラクト

Chroma-Luc[™] Reporter Vectors は 緑色および赤色の発光を生じるル シフェラーゼをコードするベクターです。これらのルシフェラーゼは アミノ酸配列で98%の相同性を有していますが、発光のピーク波長は 75nm 以上離れています。培地中の哺乳動物細胞をそのまま利用するホ モジニアスアッセイを行うために開発されたChroma-Glo[™] Reagentを1 回添加することにより2色の発光が生成します。これらの新しいベクタ ーは、より類似したレポーター構造が望まれる場合や1回の試薬添加が 要求されるデュアル測定に有用です。

Chroma-Luc[™] Reporter Vectorには、汎用される ホタルルシフェラーゼと同類で異なる発光色を生 じるルシフェラーゼをコードするChroma-Luc[™] 遺伝子が含まれます。

イントロダクション

細胞生理学研究における分析では、それぞれの細胞内プロセスに付 随する複数のパラメーターを関連付けることが望まれます。こうした 相関性を用いれば、これらのパラメーター間における関係を明らかに したり、あるいはパラメーターを内部標準と関係づけたりすることが 出来ます。レポーター遺伝子を転写制御と関連したプロセス研究に使 用する場合、コレポーターなどの方法で複数のパラメーターを測定す ることができます。1つのサンプルからホタルとウミシイタケの両ルシ フェラーゼを測定するDual-Luciferase® Reporter Assay System (カタロ グ番号E1910) は汎用される方法の1つです。これら2つのルシフェラー ゼ発光は、酵素学的な特性が異なるため、容易に区別することができ ます。しかし、アプリケーションによっては、構造的、化学特性的に より類似性の高いレポーター遺伝子が望まれる場合があります。

このような目的のためにChroma-Luc™ Reporter Vectorsを開発しま した。これらのベクターには、汎用されるホタルルシフェラーゼと同 類で異なる発光色を生じるルシフェラーゼをコードするChroma-Luc™ 遺伝子が含まれます。CBG68luc およびCBG99luc遺伝子は共に緑色の 発光を生じるルシフェラーゼを、CBRluc遺伝子は赤色の発光を生じる ルシフェラーゼをコードしています。両発光色はホタルルシフェラー ゼと同じ触媒機構で生じますが、これらのレポーターではたった1種類 の試薬だけが必要です。これとは対照的にDual-Luciferase® Reporter Assayでは、ホタルおよびウミシイタケの発光反応でそれぞれ異なる試 薬を添加します。これらのルシフェラーゼは、ホタルルシフェラーゼ と触媒機構を同じくしますが反応条件とキネティクスが幾分異なりま す。Chroma-Luc[™] Reporter Vectorsのパフォーマンスを最適化するた めに、Chroma-Glo[™] Reagent (カタログ番号E4910, E4920および E4950)も開発しました。この試薬は、哺乳動物培養細胞に直接働くホ モジニアスアッセイを行うためにデザインされています。試薬の添加 により細胞が溶解し、半減期30分以上の安定した発光シグナルを発生 します。発光の安定性により、インジェクターを搭載していないプレ ートリーディングルミノメーターでの定量を容易にします。緑色およ

び赤色の発光反応は同時に開始され、それぞれのルシフェラーゼ活性 はカラーフィルターを用いて識別することができます。

発光性クリックビートルからデザイン

Chroma-Luc[™]遺伝子は、発光性クリックビートル, Pyrophorus plagiophthalamus (図1, パネルA)の天然ルシフェラーゼ遺伝子をもとに開 発されました。このクリックビートルはカリブ原産の大型甲虫で、異 なる色の発光を生じる発光器官を2セット持っています。1セットは頭 部にあり、一般に緑色に発光し、腹部の腹側中裂にある一つの器官は 通常黄橙色に発光します。この特殊な発光性の甲虫は、単一標本の2つ の発光器官から異なる発光色が得られる珍しい生物です。腹側発光器 官からクローニングされたcDNAは、緑色からオレンジ色(593nm~ 544)に及ぶ発光を生じる4つのルシフェラーゼをコードしています。 コードされたルシフェラーゼの配列は95~99%の相同性を有し、たっ た数個のアミノ酸が色の違いに寄与していることが分かりました。

これら自然発生したルシフェラーゼの研究をさらに進めることによ り、色の違いを担う構造的な塩基配列を知るだけでなく、発光域を赤 色にまで広げることができました(図1,パネルB)。クローニングした ルシフェラーゼの中で、発光強度の観点から黄緑色の発光を生じるも のを選び、新しいレポーター遺伝子のセットを作製するための鋳型と して利用しました。ホタルレポータールC+と同様に、哺乳動物細胞の 細胞質にレポーターを保持させるために、クリックビートルルシフェ ラーゼのペルオキシゾーム標的配列を除去しました。また、ルシフェ ラーゼの耐熱性を約40 に上げるための変異導入を最低限行い、哺乳 動物細胞の培養条件に適応させました。緑色または赤色の発光レポー ターを作製するために、このルシフェラーゼ内に存在する特定のアミ ノ酸を置換しました。また赤色発光ルシフェラーゼの発光強度を最適 化するためにさらなる変異導入を行いました。作製したレポーターが 生じる発光ピークの差は75nm以上です(緑色発光ルシフェラーゼ約 537nm,赤色発光ルシフェラーゼ約613nm)(図2)。

改変遺伝子の効率

発現を最大に上げるために、ルシフェラーゼをコードする遺伝子を 哺乳動物で使用頻度の高いコドンで置換し、開始コドン部分にKozak配 列を導入しました。さらにコンセンサスな哺乳動物転写因子結合サイ トを本質的に欠失したデザインになっています。これにより、宿主細 胞の内在性調節タンパク質とレポーター遺伝子の見せ掛けの相互作用 が原因となる変則的な発現を最低限に抑えます。

CBG99luc遺伝子は、CBRluc遺伝子と99%相同になるようデザインされており、実質的に2つのレポーターは構造上同一でありながら、異なる色の発光を生じることになります。類似性の高い2つの遺伝子間のクロスオーバーが懸念されるアプリケーションのために、CBRlucとの相同性を68.9%に抑えたCBG68luc モデザインしました。これら遺伝子の配列は顕著に異なりますが、CBG68lucおよびCBRluc によりコードされているルシフェラーゼのアミノ酸配列の相同性は98%と高いものです。これらのレポーター遺伝子は、pGL3 Reporter Vectorsのデザインをベースとした一般目的のレポーターベクターに搭載され、コントロールベクターにはSV40プロモーター、SV40エンハンサーが含まれています。



図1. Pyrophorus 種のクリックビートルとクローン化ルシフェラーゼ遺伝子によ る各種発光色 パネルA:この写真では、クリックビートルの頭部にある緑色光 を生じる発光器官一対が容易に認められる。腹部の腹側中裂にある、黄橙色の発 光を生じる発光器官は、飛行中にのみ発光する。パネルB(左から右へ):クリッ クビートルからクローニングした遺伝子の緑色と橙色の発光。ルシフェラーゼ変 異遺伝子により生じた赤色発光。

哺乳動物細胞内での改変レポーター遺伝子発現は、野生型の黄緑ル シフェラーゼの発現よりも実質的に増加しています(図3)。*CBG99luc* および*CBG68luc*遺伝子のSV40プロモーターによる発現レベルは、黄 緑ルシフェラーゼ遺伝子からの発光に比べ、それぞれ660倍および550 倍でした。また、このプロモーターからの*CBRluc*遺伝子発現は黄緑ル シフェラーゼ遺伝子の28倍でした。しかし、このデータはルミノメー ターによる光子検出のスペクトル効率で補正されていないため、赤色 発光レポーターは緑色発光レポーターまたはホタルルシフェラーゼに 比べ弱く見えることになります。ほとんどのルミノメーターでは、赤 色域で感度が落ちるフォトマルチプライアーチューブを使用していま す。このパイアスはCCDベースのルミノメーターなどのソリッドステ ート光子検出器では認められていません。

優れた発現効率に加え、改変遺伝子はレポーター遺伝子としての感 度がより優れています(図4)。感度はレポーターベクターの基底発現 を超えるプロモーター反応性を測定できることにより証明されます。 基底発現が低ければ、弱いプロモーターでも検出することができます。 SV40プロモーターを基準とした場合、改変レポーター遺伝子は10倍以 上の感度の改善が認められました。この感度の改善は、野生型遺伝子 から変則的な発現効果を除去したことが一因であると考えられます。 例えば、エンハンサーのみが存在する野生型遺伝子の発現は非常に高 く、SV40プロモーターと組合わせた場合よりも高い値を示すこともあ ります。プロモーターエレメントが存在しなければ、エンハンサー単 独では発現が活性化されないことが理想的です。対照的に、エンハン サー存在下での改変レポーター遺伝子の発現は非常に低く、理想に近 い挙動を示しました(図4)。

発現の独立性

信頼性のあるコレポーターとして、緑色および赤色ルシフェラーゼ 遺伝子の発現は、一方と他方を区別されなければなりません。これに ついては*E. coli*を用いてテストしました。片方のルシフェラーゼ発現 の影響を受けずに他方のルシフェラーゼの細胞内濃度がプロモーター 制御により1000倍以上変動しました(データー未掲載)。

哺乳動物細胞で異なる生理的経路とプロモーターの組合わせにより、 それぞれに個別にモニターすることができることを示しました(図5)。 TNF α により活性化されるNF κ B (nuclear factor kappa B) コンセンサス 配列と緑色ルシフェラーゼ遺伝子 *CBG99luc*を組み合わせました。異 なるプラスミドでは、isoproterinol (ISO) により活性化されるCRE (cAMP response element) 配列と赤色ルシフェラーゼ遺伝子 *CBRluc*を 組み合わせました。これらのプラスミドをコトランスフェクションし た細胞でレポーター発現の分析を行いました。TNF を培地に添加する ことにより緑色ルシフェラーゼが、ISO添加により赤色ルシフェラーゼ が特異的に活性化され、両因子を加えた場合、両方の色が活性化しました。さらに、2つの共存するレポーターの活性化は、各レポーター個別の活性化の程度と同様でした。



図2. Chroma-Luc[™] 酵素の発光スペクトル

個別のCHO細胞集団にpCBR-Control、pCBG68-ControlまたはpCBG99-Controlを トランスフェクションした。トランスフェクション24時間後に、Glo Lysis Buffer (カタログ番号E2261)を加えて細胞を溶解した。細胞溶解液と Chroma-Glo™ Reagent を等量ずつ混合し、室温で5分間インキュベーションした。Spex Fluorolog®-2 spectrofluorometerを用いて、励起光源をオフにしまま発光スペクト ルを作製した。発光データは450nm-700nmの波長範囲で測定した。



図3. 改変 Chroma-Luc[™] 遺伝子からの発現増加

人為的に改変した3種類のChroma-Luc[™] 遺伝子 (*CBRluc、CBG68luc*および *CBG99luc*) および野性型黄緑色ルシフェラーゼ遺伝子 (*YGluc*) を、pGL3-Control Vectorの *luc*+と置換し、個別にクローニングした。CHO細胞へのトランスフェク ション24時間後に、培地および細胞と等量の Chroma-Glo[™] Reagent を添加した。 Berthold Centro LB 960 ルミノメーターを用いて相対発光ユニット (RLU) を検出 した。全ての数値はトランスフェクション効率で補正済み。

結論

Chroma-Luc[™]技術は、赤色/緑色の発光を生じるルシフェラーゼと2 つの色を同時に定量するために最適化されたアッセイ試薬で成り立っ ています。レポーター酵素は構造上非常に類似(配列の相同性>98%) しているため、これらは理想に近いコレポーターシステムであると考 えられます。さらに、これらのレポーターのDNAとmRNA構造もまた、 特に*CRG99lucをCBRluc*と組み合わせる場合などは高度な類似性が認 められています。

Chroma-Luc[™] 遺伝子は、哺乳類細胞における高レベル発現や遺伝子 レポーターとしての高い感度を実現し、発現に関して想定されるアー ティファクトを低く抑えるよう最適化されています。コトランスフェ クションした場合にも互いに独立して作用し、同一細胞内での個別の 生理的経路を区別して測定できるようになっています。この技術は、 分子構造は類似していても区別可能なレポーターが適切である場合、 または両方のレポーターに対して試薬の添加は一回だけにした方がよ い場合などに有用であると思われます。Chroma-Glo™ Reagent は、 Chroma-Luc[™] レポーターのホモジニアスアッセイ用にデザインされて いるため、マルチウェルプレートやハイスループットのアプリケーシ ョンでの迅速な定量に適しています。



図4. 改変 Chroma-Luc™ 遺伝子の変則的発現の減少 改変遺伝子 CBRluc、 CBG68lucおよびCBG99lucの各遺伝子および野性型YGluc遺伝子(黄緑色ルシフ ェラーゼ)をpGL3-Control Vector (SV40プロモーターおよびエンハンサーを含 む)、pGL3-Enhancer Vector (SV40エンハンサーを含む) および pGL3-Basic Vector (プロモーターもエンハンサーも含まない) にクローニングした。ベクター はそれぞれ個別にCHO細胞にトランスフェクションした。細胞はトランスフェク ションの24時間後に、Chroma-Glo™ Reagent を加えて測定した。Berthold Centro LB 960 luminometerを用いて相対蛍光ユニット (RLU) を検出した。Basic およびEnhancerの各ベクターの発現レベルは、相対するControlベクターに対す る%として示した。データからは、プロモーターが存在していない場合に、この 改変レポーターの相対的発現率が大幅に低下していることが認められる。パネル A: 改変 Chroma-Luc[™] 遺伝子を用いた場合の pGL3-Enhancer Vectorのルシフェ ラーゼ発現は、平均してControlの1.8%と低くなっている。パネルB:改変 Chroma-Luc[™] 遺伝子を含む pGL3-Basic Vector のルシフェラーゼ転写の基底レ ベルは、平均してControlの0.6%と極めて低い。



図5. Chroma-Luc™ テクノロジーを使用した2種類のプロモーターの同時モニタ リング

CREまたはNF_KBコンセンサス配列を含むDNA断片をpCBG99-Basic (カタログ番 号E1431) またはpCBR-Basic (カタログ番号1411) にクローニングした。その結果 得られた構成物 pCRE-CBG99/uc および pNFκB-CBR/uc を、293細胞にコトラン スフェクションした。トランスフェクションの24時間後に、ISO (1µM) / RO (100μM)、TNFα (0.1µg/mL) / RO (100μM)、またはISO (1µM) / RO (100μM) プラ スTNFα (0.1µg/mL) の3種類の方法のうち、いずれか一つで細胞を処理した。コ ントロールウェルにはRO (100µM)のみを加えた。処理後6時間に細胞を採取し Chroma-Glo[™] Reagent を加えて測定した。相対発光ユニット (RLU)は Mithras LB 940 (Berthold Technologies) を用いて、赤色フィルター (600ロングパス) および 緑色フィルター (510/60) で検出した。赤色シグナルと緑色シグナルは Chroma-Luc[™] Calculator (www.promega.com/chromacalc/) を用いて判別した。誘導倍率 は、各処理済みサンプルの発光値をROコントロール値で割って算出した。(RO (RO-O-1724) はホスホジエステラーゼ (PDE) 阻害物質であり cAMP シグナルの継 続時間を延長させる。)

プロトコール

 Chroma-Luc™ Reporter Vectors Technical Manual, #TM059 Promega Corporation.

(www.promega.com/tbs/tm059/tm059.html)

 Chroma-Glo™ Luciferase Assay System Technical Manual, #TM062 Promega Corporation. (www.promega.com/tbs/tm062/tm062.html)

製品案内			
製品名	サイズ	カタログ番号	弓 価格(¥)
pCBR-Basic Vector	20µg	E1411	45,000
pCBR-Control Vector	20µg	E1421	45,000
pCBG68-Basic Vector	20µg	E1431	45,000
pCBG68-Control Vector	20µg	E1441	45,000
pCBG99-Basic Vector	20µg	E1451	45,000
pCBG99-Control Vector	20µg	E1461	45,000
Chroma-Glo™ Luciferase			
Assay System	10ml	E4910	25,000
	100ml	E4920	200,000
	10 x 100ml	E4950	1,600,000