



Choosing The Right Luciferase To Light Your Way

実験目的に適したルシフェラーゼシステムの選び方

By Keith Wood, Ph. D., Promega Corporation

アブストラクト

バラエティーに富むルシフェラーゼのアッセイ試薬や遺伝子が利用できるようになり、実験に応じた最適な組み合わせが選べるようになりました。本稿ではプロメガが供給するいくつかの発光レポーター技術について解説し、これらの技術を各研究者の要望に適合させるヒントについて記述しています。

イントロダクション

レポーター遺伝子は、様々な実験的条件下で影響を受ける細胞生理の変化を測定する便利な方法として広く使用されています。アプリケーションの種類は広範で、その数も膨大です。代表的なものとして遺伝子の転写調節の分析、レセプター機能、細胞内シグナリング、タンパク質のフォールディングと代謝、宿主細胞と病原体の相互作用、RNA干渉による遺伝子機能の抑制などが挙げられます。遺伝子レポーターの概念的な考え方はシンプルで、遺伝子発現と簡便に観察できるパラメーターとを関連付けるというものです。技術的進歩は飛躍し続けており、最も適した遺伝子とアッセイ法の組み合わせは常に決まっているわけではありません。

この総説の目的は、プロメガの生物発光レポーター技術のオプションについて概説することです。一般的に、生物発光レポーターは特に高い感度、正確な定量、多検体の迅速な分析が求められる場合に有効です。また、後述のようにデュアルの生物発光アッセイは、培養細胞からの情報を効果的に引き出すことができるため特に有用です。

この概説は、実験上の要求に合う最適なレポーター法を選択するためのガイドです。しかし、大枠の説明したものであり、特別な条件下における詳細な情報を与えるものではありません。詳細な情報についてはプロメガの技術資料やテクニカルサポートをご利用ください。表1には、ご利用いただける様々なルシフェラーゼ遺伝子およびアッセイ試薬の概要を示しています。

生物発光レポーター技術は、高い感度、正確な定量、多検体の迅速な分析が求められる場合に特に有効です。

シングルとデュアルアッセイの選択について

シングルレポーターをベースにしたアッセイは、遺伝子発現実験で細胞からデータを得る際に最も迅速で低コストな方法を提供します。しかし、細胞は本質的に複雑系であるため、信頼性のある結果を得るにはシングルレポーターの定量データだけでは不十分です。レポーター法を選択する場合に最も考慮すべきポイントの1つは、シングルレポーターだけで実験課題を充足できるか？ またはデュアルアッセイを用いてより多くの情報を得る必要はないか？ という観点から検討することです。デュアルアッセイは豊富な情報を提供しますが、操作効率も非常に進歩しているため、シングルアッセイより労力が増えるようなことはありません。

一般的に、デュアルアッセイで付加された情報は、2つの意味で実験から得られる情報の質を向上させます。1) 有意な関連性を不明瞭にするおそれのあるランダムな変動を低減。2) 生物システムに内在する干渉現象を補正。

ランダムな変動の低減

細胞を再現性よく取り扱うことは難しいため、実験内のサンプル間や実施時間の異なる実験間で顕著なバラツキが起こる場合があります。これらの原因には、サンプル間に存在する細胞密度や生存性の不均一性やDNAトランスフェクションの低い再現性などがあります。また、マルチウェルプレートを用いる場合、同一プレート内のウェル間の熱容量や湿度の違いにより引き起こされる“エッジ エフェクト”がバラツキの原因になることがあります。デュアルアッセイは、これらの変動の多くをコントロールすることにより、サンプル間の比較をより正確、有意に行うことができます (1-4)。

干渉現象の補正

実験条件とレポーター遺伝子の発現を関連付ける場合、細胞生理に関連する他のイベントがレポーター遺伝子発現に影響を及ぼすことがしばしば認められます。特に重大なものが細胞毒性による影響で、シングルアッセイを用いると遺伝子レベルのダウンレギュレーションとして観察されてしまう可能性があります。デュアルアッセイの場合、レポーター発現と細胞生存性をそれぞれ個別にモニタリングしているため、誤ったデータの解釈を防ぐことができます。また、デュアルアッセイは、RNA干渉による標的の抑制とそれによる細胞生理現象の結びつきなど、細胞内において相互に関わるイベントを明らかにします (5, 図1)。

様々なシングルアッセイの特長

最も一般的には、遺伝子レポーター発現はエンドポイントアッセイにより測定されます。このようなアッセイの場合、細胞を様々な実験条件下で規定時間培養した後、細胞を溶解して細胞内で合成・蓄積されたレポーターを測定します。また、細胞を破壊せずに生きたままの状態でもレポーターアッセイを行うことも可能です。このようなアッセイは、生細胞内でのレポーター発現を連続的にモニタリングすることができます。

エンドポイントアッセイ

エンドポイントアッセイで最も汎用される生物発光レポーターはホタルルシフェラーゼです。このレポーターは、細胞あたり数個の分子でも測定できる極めて高い感度を持ち、非常に広い直線性も有しています。これらの特長は、実験状況に応じてその都度最適化せずにレポーターアッセイができることを意味しています。エンドポイントアッセイとしてウミシイタケルシフェラーゼもしばしば使用されますが、アッセイの選択肢は限定的です。通常、ウミシイタケルシフェラーゼはデュアルアッセイの一部として、または非破壊アッセイで使用されます。両方のレポーター遺伝子はコドンが最適化されたものが作製されており、哺乳動物細胞で最大の発現効率を示します。

実験目的に適したルシフェラーゼシステムの選び方... continued

表1. ルシフェラーゼ-レポーター遺伝子およびアッセイシステムのまとめ

シングル-レポーターアッセイ		遺伝子	アッセイ
エンド-ポイント			
ホタル	<i>luc+</i> （改良型ルシフェラーゼ遺伝子）		Luciferase Assay System（予め細胞溶解が必要）
	<i>hLuc+</i> （コドン最適化）		Steady-Glo® Luciferase Assay System（添加→測定, $t_{1/2}$ 5時間）
	<i>hLucP+</i> （コドン最適化; 細胞内不安定化）		Bright-Glo™ Luciferase Assay System（添加→測定, $t_{1/2}$ 30分間）
	<i>hLucCP+</i> （コドン最適化; 細胞不低安定化 [大]）		
ウミシイタケ	<i>Rluc</i>		<i>Renilla</i> Luciferase Assay System（予め細胞溶解が必要）
	<i>hRluc</i> （コドン最適化）		
	<i>hRlucP</i> （コドン最適化; 細胞内不安定化）		
	<i>hRlucCP</i> （コドン最適化; 細胞不低安定化 [大]）		
非破壊性			
ウミシイタケ	上記ウミシイタケ遺伝子群と同様		EnduRen™ Live Cell Substrate（培地に添加するだけ）
デュアル-レポーターアッセイ		遺伝子	アッセイ
デュアルルシフェラーゼ			
ホタル & ウミシイタケ	上記 ホタルおよびウミシイタケ 遺伝子群と同様		Dual-Luciferase® Reporter Assay System（予め細胞溶解が 必要; 2種類の試薬を添加）
			Dual-Glo™ Luciferase Assay System（添加→測定）
デュアルカラー			
クリックビートル	<i>lucRD</i> （赤色発光）		Chroma-Glo™ Luciferase Assay System（添加→測定）
	<i>lucGR99</i> （緑色発光; <i>lucRD</i> との相同性99%）		
	<i>lucGR68</i> （緑色発光; <i>lucRD</i> との相同性68%）		
レポーター & 細胞増殖性			
ウミシイタケ	上記 ウミシイタケ遺伝子群と同様		EnduRen™ Live Cell Substrateと CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assayの併用

転写率の変化に対するレポーター遺伝子の応答スピードは、細胞内におけるレポーターの安定性に関連しています。安定性の高いレポーターは細胞内で高レベルに蓄積されますが、その濃度は転写の変化に応じて緩やかに変化します。逆に、安定性の低いものはあまり蓄積されず、応答性が向上します。異なる実験ニーズのためにデザインされたレポーターを供給するために、細胞内での安定性が異なるルシフェラーゼ遺伝子を開発し、これらの低い安定性を持つ遺伝子をRapid Response™レポーターと名づけました。高い応答性を持つ場合、通常、感度が低減しますが、この影響はステイブルな細胞株を作製することでしばしば緩和されます。

従来のレポーター遺伝子のアッセイは、1回に1つのサンプルを測定するためにデザインされています。このようなアッセイ法では、細胞溶解バッファーによる処理で遊離したレポーターを定量するように設定されており、それらは最大の光強度が得られるように最適化されています。しかし、発光反応の持続時間は比較的短いため、ルミノメーターに自動分注装置が付属していない限り、一般的にこれらの試薬はマルチウェルプレートでの測定には適してきません。このような従来型のアッセイシステムとしては、ホタルルシフェラーゼの場合はLuciferase Assay Systemが、ウミシイタケルシフェラーゼでは*Renilla* Luciferase Assay Systemが該当します。

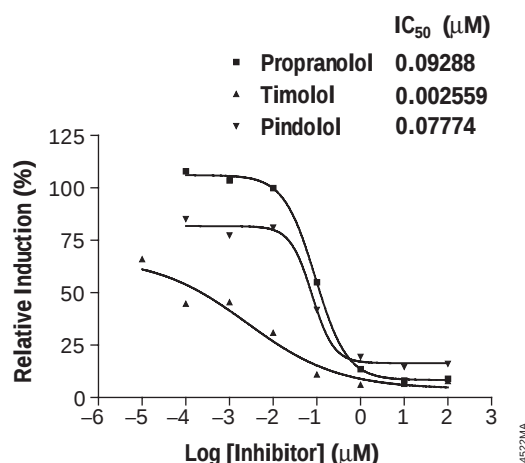


図1. 細胞内生物発光を利用したレセプターアゴニストの分析
HEK293細胞の内在性β-アドレナリンレセプターのイソプロテノール誘導に対する既知阻害剤(プロテノール、チモロール、ピンドロール)のタイトレーションをアゴニスト(6μM イソプロテノール/1μM Ro-20-1724)を含む培地中で実施した。レセプター活性は、PESTで不安定化したウミシイタケルシフェラーゼ(*RlucP*)をコードするレポーター遺伝子とCRE転写調節領域を組み合わせたものを利用してモニタリングした。発光の非破壊定量は、EnduRen™ Live Cell Substrateを培地に溶解することにより行った。

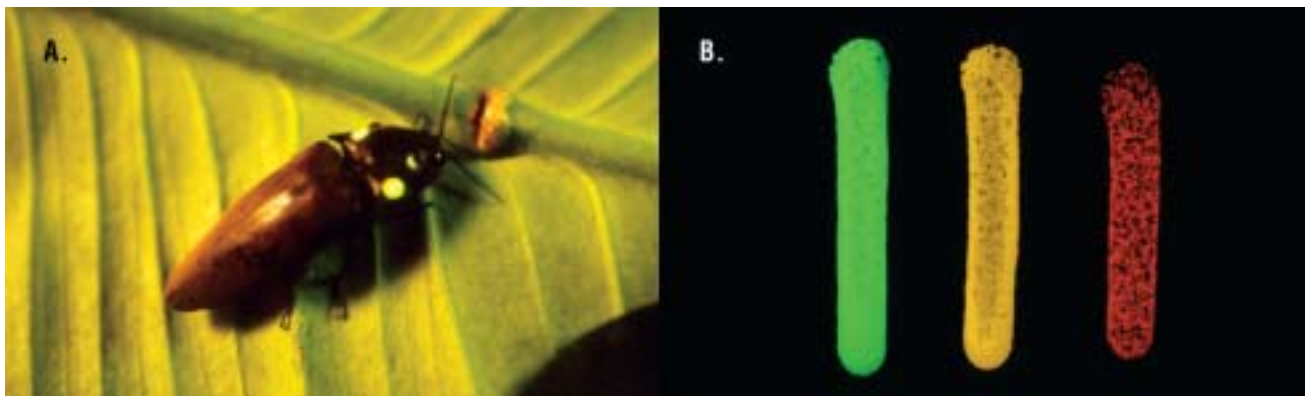


図2. *Pyrophorus* 種のクリックビートルとクローン化ルシフェラーゼ遺伝子による各種発光色

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。

マルチウェルプレートでアッセイを行う場合、安定な発光を生成するアッセイ試薬を使用すれば非常に便利です。残念ながら発光強度と持続時間には反比例的な関係があるため、より明るい発光を生じる反応は比較的急速に減衰してしまいます。Bright-Glo™ Reagentは、最大の発光強度を持ちながら、マルチウェルプレートでの分析でも十分な持続時間が得られるホタルルシフェラーゼアッセイのためにデザインされた試薬です。Steady-Glo® Reagent は発光の持続時間が延長され、発光強度を抑えたものです。両試薬は哺乳動物細胞での使用にあわせて培地中でもそのまま機能するようにデザインされており、あらかじめ細胞を溶解する必要はありません。この特性により、マルチウェルプレートで細胞を培養し、シングルステップで発現レベルを測定することができます。

非破壊アッセイ

エンドポイントアッセイはシンプルで信頼性のあるレポーター発現の定量が行えますが、この方法ではサンプルを破壊しなければなりません。定期的に測定を繰返す場合、非破壊的なアッセイが有用なケースもあります。EnduRen™ Live Cell Substrateは、培養を継続しながら細胞内のウミシイタケルシフェラーゼを少なくとも24時間測定することができます。また、マルチウェルプレートにおいて総アッセイ容量の調節が重要である場合やアッセイ試薬の添加が問題となる場合に有効です。EnduRen™ Substrateは、培地の成分として添加できるので、発光測定時にさらに試薬を加える必要がありません。

様々なデュアルアッセイの特長

デュアルアッセイは、2つの異なるレポーター遺伝子の発現測定や1つのレポーター遺伝子の発現と細胞生存性を測定することができます。全てのケースで各サンプルから連続的に2つのアッセイを行い測定することができます。ほとんどのアッセイはマルチウェルプレートでの使用に最適化されています。

デュアルルシフェラーゼ

最も汎用されるデュアルアッセイは、ホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼの反応を組合わせたものがベースとなっています。これは2種類のルシフェラーゼが互いに異なる基質を用いる基質特異性を利用することにより、2つのシグナルを区別して測定します。この方法は、各サンプルに2種類の試薬を加え、各添加ごとに測光します。第1の試薬がホタルルシフェラーゼ反応を活性化し、第2の試薬がホタルルシフェラーゼを消光させ、ウミシイタケルシフェラーゼ反応を開始させます。

Dual-Luciferase® Assay 試薬は、アッセイを行う前に細胞を溶解することが前提となっており、マルチウェルプレートを用いる場合には試薬の分注装置を使用する必要があります。Dual-Glo™ Reagentはマルチウェルプレート用に最適化されており、長い発光時間が得られます。マルチウェルプレート用にデザインされた他の試薬と同様に、Dual-Glo™ Assayは前もって細胞を溶解する必要が無く、哺乳動物細胞を含む培地中で機能します。

デュアルカラー

1種類の試薬を添加するだけで同時に2種類のルシフェラーゼアッセイが行える機能が望まれるケースがあります。このような方法はアッセイ容量、液体分注操作の回数を抑えることができます。2種類のルシフェラーゼの発光は色の違いで区別することができます。我々はホタルルシフェラーゼの一種で、赤または緑の発光を生じるクリックビートルルシフェラーゼを開発しました（図2）。これら赤/緑ルシフェラーゼは構造的にほぼ同じで、異なる色を発生させるために必要ないいくつかのアミノ酸が置換されているだけです。この構造上の近似性により、コントロールおよび実験レポーターが細胞内で同様な生化学的ふるまいを示すことが予想されます。従って、コントロールを用いたより正確な補正が行える結果となります。

これらのレポーターをコードするChroma-Luc™ 遺伝子のコドンは哺乳動物細胞用に最適化されています。我々は緑色に発光するレポーターをコードする2種類の遺伝子を開発し、赤色の遺伝子に対して1つはほぼ同じ配列で、もう1つは最大限異なる配列を有し、しかも同じタンパク質をコードするものです。配列が相違する遺伝子はリコンビネーションが問題となる場合に有用であると考えられます。

Chroma-Glo™ Assay試薬は、マルチウェルプレートで使用するためにデザインされています。試薬の組成は、両レポーターが同時に最適な反応キネティクスを示し、また、培地中で直接機能するように調整されています。Chroma-Glo™ Assayには色の違いが要求されるため、光学カラーフィルターを利用できるルミノメーターが必要になります。光は光学フィルターを通過するため、他のアッセイ法に較べて感度は低下します。両ルシフェラーゼは相対濃度が約100倍違えば光学フィルターを用いて検出することができます。これは、1000倍以上異なる相対濃度でも検出できる化学特性の違いを利用したデュアルアッセイよりも低いことになります。

レポーターと細胞生存性

2つのレポーター遺伝子をベースとしたデュアルアッセイは、細胞の生存性への影響について自動的にモニタリングするために使用されることもあります。時にはより直接的な測定が好まれる場合もあります。CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assayは、生物発光ベースの細胞内ATP検出により細胞生存性を迅速、高感度にアッセイすることができます。CellTiter-Glo® Assayでは、試薬中に安定化されたホタルルシフェラーゼが使用されているため、ホタルルシフェラーゼ発現のレポーターアッセイにそのまま組合せることはできません。しかし、ウミシイタケルシフェラーゼの非破壊レポーターアッセイとは簡単に組合せることができます。

ウミシイタケルシフェラーゼの発現は、EnduRen™ Substrateを培地に添加することにより、定量的または連続的にモニタリングすることができます。このレポーターの測定が完了した後に、ウミシイタケルシフェラーゼの不活性化およびATP依存的発光を行うため、サンプルにCellTiter-Glo® Reagentを添加することができます。CellTiter-Glo® Assayはエンドポイントアッセイであるため、細胞生存性を測定した後は、サンプルのさらなるモニタリングは行えません。

まとめ

今回の利用可能な一連の生物発光レポーターとアッセイについての概説は、これらの手法で組み立てられる実験戦略の幅広さを示しました。我々はシングルまたはデュアルアッセイの適正、エンドポイントアッセイと非破壊アッセイの使用法、レポーターの細胞内での安定性とその転写率に対する応答性との関係、あるいは個別サンプル用とマルチウェルプレート用のアッセイ試薬のデザインについて考察しました。詳細については、各アッセイシステムごとに記述されたプロトコルや技術資料の情報をご覧ください。これらの資料や最新の製品、アプリケーション情報については http://www.promega.com/applications/genexp_reptr/ をご覧ください。また、技術的なご質問については prometec@jp.promega.com にお寄せください。

参考文献

1. Wood, K.V. (1998) *Promega Notes* **65**, 14–20.
2. Hawkins, E.H., Butler, B., Beck, M., O'Grady, M., Orr, L., Wood, K.V. (2002) *Promega Notes* **81**, 22–6.
3. Hannah, R., Jennens-Clough, M., Wood, K.V. (1998) *Promega Notes* **65**, 9–14.
4. Faridi, J. et al. (2003) *Clin. Can. Res.* **9**, 2933–39.
5. Hirose, F. et al. (2002) *Mol. Cell. Biol.* **22**, 5182–93.

プロトコル

- ◆ *Luciferase Assay System Technical Bulletin* #TB281
- ◆ *Renilla Luciferase Assay System Technical Manual* #TM055
- ◆ *EnduRen™ Live Cell Substrate Technical Manual* #TM244
- ◆ *Dual-Luciferase® Reporter Assay System Technical Manual* #TM040
- ◆ *Dual-Glo™ Luciferase Assay System Technical Manual* #TM058
- ◆ *Chroma-Glo™ Luciferase Assay System Technical Manual* #TM062
- ◆ *Steady-Glo® Luciferase Assay System Technical Manual* #TM051
- ◆ *Bright-Glo™ Luciferase Assay System Technical Manual* #TM052
- ◆ *Rapid-Response™ Reporter Vectors Technical Manual* #TM242
- ◆ *Chroma-Luc™ Reporter Vectors Technical Manual* #TM059
- ◆ *Synthetic Renilla Luciferase Reporter Vectors Technical Manual* #TM237

上記のプロトコルについては

www.promega.com/tbs/tbs.htm をご覧ください。

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Dual-Glo™ Luciferase Assay System	10ml*	E2920	30,000
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	100 回分*	E1910	25,000
Chroma-Glo™ Luciferase Assay System	10ml*	E4910	25,000
Steady-Glo® Luciferase Assay System	10ml*	E2510	14,000
Bright-Glo™ Luciferase Assay System	10ml*	E2610	16,000
Luciferase Assay System	100 回分*	E1500	13,000
Renilla Luciferase Assay System	100 回分*	E2810	15,000
EnduRen™ Live Cell Substrate	0.34mg*	E6481	21,000
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	10ml*	G7570	12,000

*その他のサイズも用意しております。