Luciferase Reporters: Less is More



pGL4 Vector: 新世代のルシフェラーゼレポーターベクター

By Aileen Paguio, M.S., Brian Almond, Ph.D., Frank Fan, Ph.D., Pete Stecha, B.S., Denise Garvin, M.S., Monika Wood, M.S., and Keith Wood, Ph.D., Promega Corporation

アブストラクト

レポーター遺伝子技術は、遺伝子の発現や調節について研究する上 で強力なツールとして利用されています(1,2)。ルシフェラーゼは、感 度の高さ、柔軟性、簡便な定量法、広範なダイナミックレンジなどの 特性から哺乳動物細胞で使用されるレポーターの中で最も汎用されて います(3)。我々が新たにデザインし、開発したホタルおよびウミシイ タケルシフェラーゼレポーターは、細胞生物学における転写活性の測 定から薬剤開発分野におけるハイスループットスクリーニングなど 様々な用途に利用することができます。この新しいベクターは、高い シグナル/ノイズ比で優れた発現効率を示し、転写動態に対してより迅 速に反応します。また、本ベクターは変則的な影響によるリスクを低 減します。

我々のゴールは以下のような理想的なレポーターを 作製することでした。

- i) 宿主細胞で一様に、しかも最適に発現
- ii) 標的外の反応を最小限に抑制(変則的な発現を 低減)
- iii) 転写動態に対する迅速な反応を実現

イントロダクション

我々は新しいレポーターベクターシリーズpGL4 Luciferase Reporter Vector を開発しました。これらのベクターをデザインする上で設定し た我々のゴールは、i) 宿主細胞で一様に、しかも最適に発現し、ii) 標 的外の反応を最小限に抑制(変則的な発現を低減)し、さらに iii) 転写 動態に対する迅速な反応を実現する理想的なレポーターを作製するこ とでした。野生型ルシフェラーゼから改良したレポーターを開発する ためにこれら3つの基準を設けました。

まず、我々は哺乳動物細胞におけるルシフェラーゼレポーターの発 現レベルを増加させるために、哺乳動物での遺伝子発現に適したコド ンを用いてルシフェラーゼ遺伝子をデザインしました(4,5)。2つめに、 我々は変則的な発現のリスクを抑えるために変則的な調節配列を除去 しました(4,6-8)。最後に、野生型ルシフェラーゼに比べ応答性が飛躍 的に改善された不安定化ルシフェラーゼ遺伝子(Rapid Response™ Reporter)を開発しました(9)。

レポーター遺伝子を宿主細胞に導入するために使用するベクターは、 レポーターアッセイ全体のパフォーマンスに関わる重要な要素です。 ベクターのバックボーン上に見られる転写因子結合サイトやプロモー ターモジュールなど潜在的な制御配列は高いバックグラウンド、変則 的な反応性の原因になります (10, 11)。この問題は全ての哺乳動物用レ ポーターベクターに共通していますが、今までにこれらの問題を修正 する試みはほとんどありませんでした。我々はベクターのバックボー ン全域から、本来の機能を損なわないようにできるだけ多くの潜在的 な制御配列を排除する戦略をとりました。このようにデザインされた

表1. pGL4 Vectorの構成								
	マルチ			発現用				
	クローニング	レポーター	タンパク質	プロモーター				
ベクター	領域	遺伝子	分解配列	(哺乳動物)				
pGL4.10[<i>luc2</i>]	Yes	luc2	No	No				
pGL4.11[<i>luc2P</i>]	Yes	и	hPEST	No				
pGL4.12[<i>luc2CP</i>]	Yes	н	hCL1-hPEST	No				
pGL4.13[<i>luc2</i> /SV40]	No	и	No	SV40				
pGL4.70[<i>hRluc</i>]	Yes	hRluc	No	No				
pGL4.71[hRlucP]	Yes	и	hPEST	No				
pGL4.72[hRlucCP]	Yes	и	hCL1-hPEST	No				
pGL4.73[hRluc/SV40)] No	и	No	SV40				
pGL4.74[<i>hRluc</i> /TK]	No	и	No	HSV-TK				
pGL4.75[hRluc/CMV] No	u	No	CMV				

ベクターバックボーンに加え、pGL4にはルシフェラーゼの広範な選択 肢(Rapid Response[™] Reporter バージョン、プロモーターレス[basic] およびプロモーター付 [control] ベクター)など様々な特長を備えてい ます。表1にはpGL4 Luciferase Reporter Vector 10種類の構成を示しま した。また、pGL4 Vectorの概略図を図1に示します。

変則的発現リスクを低減

pGL4 Vectorのバックボーンは、pGL3 Vectorのバックボーンが鋳型 として使用されました。pGL3 Vectorバックボーンには数多くのコンセ ンサス転写因子結合サイトが存在しています(図2)。変則的な発現の リスクを低減し、レポーター遺伝子発現の信頼性を向上させるために、 我々はpGL3 Vectorバックボーンのレポーター遺伝子の開始点からバク テリア由来の複製開始配列までの領域に存在するコンセンサス転写因 子結合サイトの数を大幅に減少させました(図2)。その他の変更点と して、マルチクローニング領域の再設計、f1由来複製開始点の除去、イ ントロン配列の除去、プロモーターモジュール数の削減(プロモータ ーモジュールは、スペーサーにより分断された2つ以上の転写因子結合 サイトから成る制御領域群)などがあります。合成poly(A)シグナル/転



図1. pGL4.10[*luc2*] Vectorのサークルマップ



図2. pGL3およびpGL4 Vector バックボーン上のコンセンサス転写因子結合サイトの比較

写停止サイトは、マルチクローニング領域(プロモーターレスベクタ ー)または哺乳動物用プロモーター(プロモーター付ベクター)のそ れぞれ上流に維持されています。レポーター遺伝子の下流に位置する バクテリア由来の複製開始領域およびSV40 late poly(A) シグナルの変 更はありません。

新しくデザインされたpGL4 VectorはpGL3に比べDNA配列が著しく 変更されていますが、大腸菌における複製、選択、保持については同 様に機能します。

改良されたルシフェラーゼ発現

pGL4 Vectorは、改良されたホタル ルシフェラーゼ遺伝子luc2で特徴 づけられます。pGL3 Vectorに含まれる旧型のluc+に比べ、luc2はコド ンが最適化され、潜在的な制御配列が減少しています(図3)。遺伝子 は哺乳動物細胞で最も汎用されるコドンに変更すると同時に転写因子 結合サイトの多くのコンセンサス配列を除去し、再設計されています。 さらに、luc2遺伝子の予想されるプロモーターモジュール数を1つのモ ジュールに減少させました。



図3. Iuc+およびIuc2遺伝子上のコンセンサス転写因子結合サイトの比較

図4で示したトランスフェクション実験では、合成ホタルルシフェラ ーゼ遺伝子*luc2はluc+*に比べ発現レベルの増加が認められました。発 現における合成遺伝子のみの影響を調べるために*luc+*および*luc2*遺伝 子をそれぞれpGL3-Control Vectorにクローニングしました。このベク ターをコントロールとともにコトランスフェクションし、24時間後、 相対発光ユニットを測定し、コントロール値で補正しました。*luc2*遺 伝子の発現は、*luc+*に比ベテストした4種類の哺乳動物細胞株で4.1~ 11.8倍に増加しました。

シグナル/バックグラウンド比の改善

合成レポーター遺伝子に加え、pGL4 Vectorバックボーンを改良する ことにより、対応するpGL3およびphRL Vectorと比較してシグナル/バ ックグラウンド比が改善される結果となりました。表2では、これらの ベクターはそれぞれに対応するプロモーターレスコントロールと比較 し、シグナル/バックグラウンド比の%増加を報告しました。最も低い 値でも、pGL4.13[*luc2*/SV40] Vectorで示された373%、最も増加した シグナル/バックグラウンド比はpGL4.75[*hRluc*/CMV] Vectorの6,388% でした。

<i>ベクタ</i>	シグナル/	增加率(%) (pGL4 Vector)
7 CL 4 12[/uo2/SV/40] vo pCL 4 10[/uo2]	2 1/2 . 227	272
pgL4.13[<i>IUC2</i> /SV40] VS.pGL4.10[<i>IUC2</i>]	3,102 ± 337	3/3
pGL3-Control vs. pGL3-Basic	668 ± 57	
pGL4.73[<i>hRluc</i> /SV40] vs. pGL4.70[<i>hRluc</i>]	628 ± 78	3,205
phRL-SV40 vs. phRL-null	19 ± 1.7	
pGL4.74[hRluc/TK] vs. pGL4.70[hRluc]	79 ± 8	3,335
phRL-TK vs. phRL-null	2.3 ± 0.9	
pGL4.75[hRluc/CMV] vs. pGL4.70[hRluc]	1,103 ± 115	6,388
phRL-CMV vs. phRL-null	17 ± 1.5	

CHO細胞に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、細胞 を溶解し、Dual-Luciferase® Assay Systemを用いて発光シグナルを測定した。 相対発光ユニットはトランスフェクション効率で補正した。シグナル/バックグ ラウンド比を算出するためにプロモーターを含むペクターからの補正後シグナ ル値を、対応するプロモーターを含まないペクターの補正後シグナル値で割っ た。実験はCHO、HeLa、NIH/3T3およびHEK293の各細胞で反復し、同様の結 果が得られた。

簡単なベクター間の移し換え

pGL4のその他の特長として、pGL4 Vectorシリーズ内またはpGL3か らpGL4 Vectorへのプロモーターやその他の転写調節エレメントの移し 換えを簡便にするために設計されたマルチクローニング領域がありま す(図5)。新しいマルチクローニング領域にはpGL3 Vectorに含まれる 主な制限酵素サイトに加え、2つのSfi Iサイトをマルチクローニング領 域の両端に導入しました(Sfi IはDNA配列GGCCNNNNNGGCCを認識 [NはA, T, GまたはC])。形成された各サイトはそれぞれユニークな付着 末端を形成します。そのため、1回のSfi I 消化を行うだけで片方の pGL4 Vectorのマルチクローニング領域からもう片方のpGL4 Vectorへ 方向性を維持したエレメントの移し換えが行えます。

結論

pGL4 Vectorシリーズは次世代ルシフェラーゼレポーターベクターと して開発され、様々な遺伝子やプロモーターで構成されるベクターの 中からお選び頂けます。従来型のpGL3に比べ、pGL4 Vectorは変則的な 発現のリスクが低減し、ルシフェラーゼ発現の向上とシグナル/バック グラウンド比の改善が実現されました。これらの特長およびベクター間 のサブクローニングの簡便さは、ルシフェラーゼレポーターベクター を選ぶ上でpGL4 Reporter Vectorが最も有用であることを証明していま す。

備考:現在、レポーター実験のニーズに対応して選択マーカーを含 むベクター等を開発しています。2005年に発売予定のこれら新しい pGL4 Reporter Vectorにご期待ください。



図4. ホタルルシフェラーゼ遺伝子luc2とluc+の発現比較

pGL3-Control Vector (カタログ番号 E1741)内の/uc+遺伝子を/uc2遺伝子で置換 し、これら2種類のルシフェラーゼの遺伝子をそれぞれ含むpGL3-Control Vector バックボーンから成るベクターを作製した。これら2つのベクターをそれぞれト ランスフェクションコントロールとしてのphRL-TK Vector(カタログ番号 E6241) とともにNIH/3T3、CHO、HEK293、HeLaの各細胞に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、Passive Lysis Buffer(カタログ番号 E1941)で 細胞を溶解し、Dual-Luciferase[®] Assay System (カタログ番号 E1901)を用いて 発光を測定した。相対発光ユニットは、トランスフェクションコントロールとして 同時にトランスフェクションしたphRL-TK Vectorから発現したウミシイタケルシ フェラーゼの発光値で補正した。発現値の増加倍率をグラフ内のバー上に示した。

参考文献

- 1. Wood, K.V. (1995) Curr. Biol. 6, 50-8.
- 2. Naylor, L.H. (1999) Biochem. Pharmacol. 58, 749-57.
- Wood, K.V. (2004) Progress in Biomedical Optics and Imaging, Nicolau, D.V. and Raghavachari, R., eds. SPIE–The International Society for Optical Engineering, Bellingham, 66–77.
- 4. Zhuang, Y. et al. (2001) Promega Notes 79, 6-11.
- 5. Almond, B. et al. (2003) Promega Notes 85, 11-4.
- 6. Annicott, J.S. et al. (2001) BioTechniques 31, 993-4.
- 7. Ho, C.K.M. and Strauss, J.F. (2004) BMC Biotechnology 4, 10.
- 8. Grimm, S.L and Nordeen, S.K. (1999) BioTechniques 27, 220-2.
- 9. Almond, B. et al. (2004) Promega Notes 87, 18–22.
- 10. Bert, A.G. et al. (2000) Plasmid 44, 173-82.
- 11. Thirunavukkarasu, K. et al. (2000) BioTechniques 28, 506–10.

RVprimer3

5′...ACAAAACAAACTAGCAAAATAGGCTGTCCCCAGTGCAAGTGCAGGTGCCAGAACATTTCTCT



図示したBgII およびEcoR VサイトはhRluc遺伝子内にも存在するためhRlucを含む(ウミシイタケルシフェラーゼベースの)pGL4 Vectorへのクローニングには使用できません。

プロトコル

 pGL4 Luciferase Reporter Vectors Technical Manual #TM259, Promega Corporation.
www.promega.com/tbs/tm259/tm259.html

製品案内			
製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
pGL4.10[luc2] Vector	20µg	E6651	58,000
pGL4.11[luc2P] Vector	20µg	E6661	58,000
pGL4.12[luc2CP] Vector	20µg	E6671	58,000
pGL4.13[luc2/SV40] Vector	20µg	E6681	58,000
pGL4.70[hRluc] Vector	20µg	E6881	58,000
pGL4.71[hRlucP] Vector	20µg	E6891	58,000
pGL4.72[hRlucCP]Vector	20µg	E6901	58,000
pGL4.73[hRluc/SV40] Vector	20µg	E6911	58,000
pGL4.74[hRluc/TK] Vector	20µg	E6921	58,000
pGL4.75[hRluc/CMV] Vector	20µg	E6931	58,000