



Bright Light, No Lysis

生細胞におけるウミシイタケルシフェラーゼ発光の測定

By Erika Hawkins¹, M.S., James Unch², Ph.D., Nancy Murphy¹, B.S., Jolanta Vidugiriene¹, Ph.D., Mike Scurria², Dieter H. Klaubert², Ph.D., and Keith V. Wood¹, Ph.D., ¹Promega Corporation and ²Promega Biosciences, Inc.

アブストラクト

ViviRen™ およびEnduRen™ Live Cell Substrateは生細胞でウミシイタケルシフェラーゼを測定するために開発されており、セレンテラジンやセレンレテラジン-hよりもシンプル、高感度に測定することが可能です。ViviRen™ Substrateは非常に明るい発光を生じ、セレンテラジンに比べ約3倍程度の発光レベルを示します。EnduRen™ Substrateは非常に安定な光を生成し続けるため、24時間以上にわたるインキュベーションを行いながらその間に複数回繰り返して測定することができます。両基質はCellTiter-Glo® Reagentと組み合わせることにより、生細胞数で補正することができます。また、Chroma-Luc™ Red Luciferaseと併用すれば、生細胞数またはトランスフェクション効率による補正を行うことができます。

EnduRen™およびViviRen™ Live Cell Substrateは、酸化を受ける部位をエステルまたはオキシメチルエステルで防護したデザインになっています。この保護基は、培地中におけるLive Cell Substrateの半減期を保護基のないセレンテラジンの17~25分間から5~11時間にまで延長させました(1-3)。生細胞内部に透過すると、エステラーゼおよびリパーゼがLive Cell Substrateの保護基を切断し、細胞内のウミシイタケルシフェラーゼにより使用されるセレンテラジン-hが生成されます(図1)。培地中におけるフリーのセレンテラジン-h濃度を低下させることにより、自己発光によるバックグラウンドが10~100倍低下し、発光のシグナル/バックグラウンド比が増加する結果となりました(図2、パネルAおよびB)。

2つのLive Cell Substrateの違い

ViviRen™およびEnduRen™ Live Cell Substratesはどちらもウミシイタケルシフェラーゼの生物発光をサポートしますが、生じる発光シグナルの特性は大きく異なります。ViviRen™ Substrateが生じる発光シグナルは非常に明るいものですが、発光時間は短くなっています。図2、パネルCの例のようにViviRen™ Substrateによる最大発光強度はセレンテラジンの約3倍です。さらに、自己発光が非常に低く抑えられているためViviRen™ Substrateのシグナル/バックグラウンド比はセレンテラジンの288倍にもなります。低い自己発光はViviRen™およびEnduRen™ Substrateの大きな特長です。

ViviRen™ Substrateがより高レベルの発光を生成するのに対して、EnduRen™ Substrateは持続型の発光を生じます。エステラーゼは、ViviRen™ Substrateの持つエステル基よりもEnduRen™ Substrateのオキシメチルエステル部を緩やかに切断します(図1の構造を参照、エステラーゼのデータは未掲載)。セレンテラジン-h濃度の低下は発光強度を低くしますが、発光シグナルはより安定します。EnduRen™ Substrateにより生成した発光シグナルは24時間まで安定です。

研究者はできるだけ細胞への影響を与えないように細胞活性をモニタリングする努力を行っています。しかし、ほとんどのレポーターの場合、正確で信頼性のある測定を行うために細胞を完全に破碎する必要があります。

イントロダクション

研究者はできるだけ細胞への影響を与えないように細胞活性をモニタリングする努力を行っています。しかし、ほとんどのレポーターの場合、正確で信頼性のある測定を行うために細胞を完全に破碎する必要があります。しかし、ウミシイタケルシフェラーゼの場合、基質である酸素およびセレンテラジンは毒性が無く、細胞膜を容易に透過できるため例外的なレポーターです。しかし、これまでのセレンテラジンは水溶液中での安定性が低く、通常の細胞培養条件下での使用は困難で不便な点がありました。EnduRen™およびViviRen™ Live Cell Substrateはこれらの難問を解決するためにデザインされており、さらに生細胞数を決定するような発光アッセイ法を併用したマルチアッセイを行うことができます。

Live Cell Substrateの安定性

EnduRen™およびViviRen™ Live Cell Substrateは、発光による細胞アッセイで汎用される効率的な構造類似体であるセレンテラジン-hの基本構造をベースとしています。これまで、セレンテラジンベースの化合物は、生細胞を維持するために用いられる溶液中では非常に不安定であるため使いづらいものでした。例えば、セレンテラジン-hは10%ウシ胎児血清(FBS)を含む培地中、37℃、約25分間で濃度が50%減少し、セレンテラジンではさらに短時間(約17分)で50%減少します(1)。セレンテラジンおよびセレンテラジン-hの濃度が減少する理由の1つが自己酸化です。この自己酸化は、発光バックグラウンドの上昇とアッセイ感度の低下の2つの問題を引き起こします。

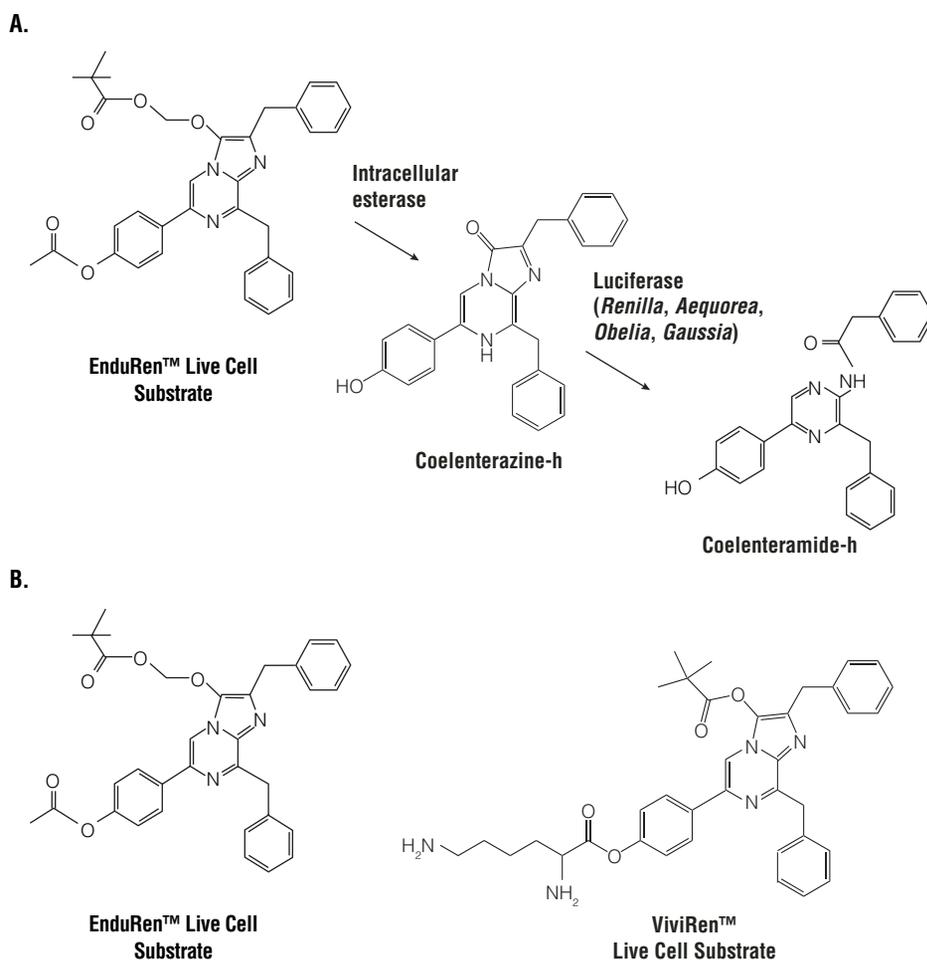


図1. Live Cell Substrateの構造特性

パネルA. EnduRen™ Live Cell Substrateは細胞内でウミシイタケルシフェラーゼの基質セレンテラジン-hに変換される。同様の変換がViviRen™ Live Cell Substrateでも生じる(未掲載)。パネルB. EnduRen™およびViviRen™ Live Cell Substrateの構造

典型的な測定では、ViviRen™ Substrateが生じる初期発光はEnduRen™ Substrateの約20倍程度の明るさを持ちますが、約45分後にはEnduRen™ Substrateのシグナルと同等になります(図3)。EnduRen™ Substrateにより得られる非常に安定な発光シグナルは、1つのサンプルを用いた経時的な反復測定を可能にします。例えば、EnduRen™ Substrateを1回添加するだけで、CHO細胞で安定に発現するウミシイタケルシフェラーゼに対するRNAiの阻害効果を、siRNAトランスフェクション後33時間以上にわたり連続して測定することができます(図4)。

我々は、セレンテラジンまたはキャリアへ暴露したサンプルや未処理サンプルの結果と比較することにより、推奨する濃度および暴露時間で使用したViviRen™およびEnduRen™ SubstrateがCHO、HeLa、HEK293およびNIH/3T3細胞株に対して毒性が無いことを示しました(2, 3)。

細胞生存性試験と併用したLive Cell Substrateのマルチアッセイ

生細胞を用いたウミシイタケルシフェラーゼ生物発光のアッセイは細胞生存性試験とのマルチアッセイを可能にし、これは生細胞数で補正されたレポーター活性が得られることを意味します。この系は、総ATP量を測定することにより生細胞数を決定するCellTiter-Glo® Reagentを使用することにより、最も簡便に実施することができます。もう一つの補正法として、赤色の発光を生じるルシフェラーゼ(例: Chroma-Luc™ Luciferase)を恒常的に発現するコントロールプラスミド(例: pCBR-Basic Vector [カタログ番号 E1411]、pCBR-Control Vector [カタログ番号 E1421])をコトランスフェクションする方法があります。

CellTiter-Glo® Reagentを併用するマルチアッセイでは、同一サンプルに2種類の試薬を添加します。まず、EnduRen™またはViviRen™ Substrateを添加後、生細胞からウミシイタケルシフェラーゼを定量します。次にCellTiter-Glo® Reagentをサンプルに添加して細胞を溶解し、ATP量に依存したホタルルシフェラーゼシグナルを生成させます。CellTiter-Glo® Reagentは、ウミシイタケルシフェラーゼシグナルおよび、サンプル反応に残存するセレンテラジン-hにより生じるあらゆる

生細胞におけるウミシイタケルシフェラーゼ発光の測定

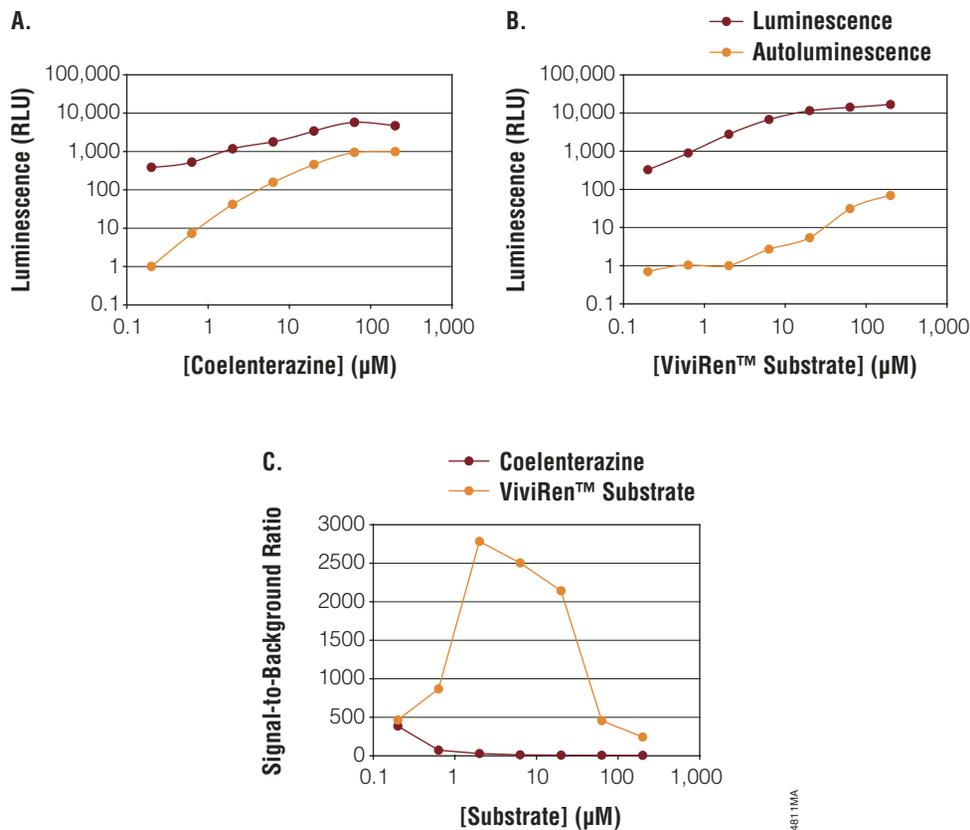


図2. 自己発光抑制によるin situにおける発光測定感度の顕著な増加

ウミシイタケルシフェラーゼを安定発現するCHOからの発光を測定し、自己発光についてはトランスフェクションを行っていないCHO細胞を用いた。10% FBS F12培地でCHO細胞を培養する各ウェル内で、セレンテラジン（パネルA）またはViviRen™ Substrate（パネルB）のタイトレーションを行った。セレンテラジンまたはViviRen™ Substrate（n=6）添加約2分後、発光および自己発光をTurner BioSystems Veritas™ Luminometerを用いて測定した。シグナル/バックグラウンド比（発光値から自己発光値を差し引いた値を自己発光値で割った値）はパネルAおよびBからのデータから算出し、パネルCに表した。

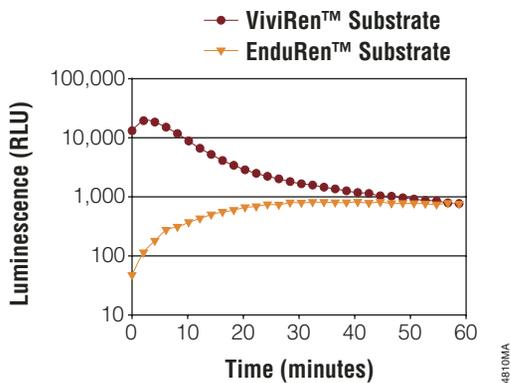


図3. ViviRen™ Substrateにより生成した最大発光強度はEnduRen™ Substrateよりも約20倍高い値を示したが、基質添加45分後には同レベルに収束した

ウミシイタケルシフェラーゼを安定発現するCHO細胞を60µMのViviRen™またはEnduRen™ Substrateに暴露し、1時間、2分おきにTurner BioSystems Veritas™ Luminometer（n=6）で測光した。約45分後、2つのサンプルセットからの発光強度は同等になった。

酵素非依存的な発光を効率的に排除します。極端な例では、精製ウミシイタケルシフェラーゼ 2×10^{-12} moles（ほとんどの細胞調製物よりも1000倍以上）を60µMセレンテラジン-hに暴露した場合に得られる発光および自己発光のシグナルはCellTiter-Glo® Reagent添加後に $107,000 \pm 10,900$ 倍消光しました。残存する発光は、CellTiter-Glo® Reagent、DMEM培地+10%血清（細胞なし）存在下で得られた発光のたった $56\% \pm 4.7\%$ であり、この環境下での細胞由来の発光レベルはさらに低いことを意味します。

In situでのビートルルシフェラーゼ測定とLive Cell Substrateとのマルチアッセイには波長を分離できるフィルターを持つルミノメーターの使用が要求されます。赤色Chroma-Luc™ Luciferaseは611nmで最大強度の発光を生じ、ウミシイタケルシフェラーゼは488nmで最大強度の発光を示します（図5A）。この大きなスペクトルの差が、適切な赤および青のフィルターを用いることで、同一サンプルからの2つのシグナル測定を可能にします。

マルチアッセイの有効性は、応答性CREエレメントをプロモーターとして制御されるウミシイタケルシフェラーゼの発現と恒常的なSV40プロモーターにより制御される赤色発光Chroma-Luc™ ルシフェラーゼ発現の実験により実証されました。

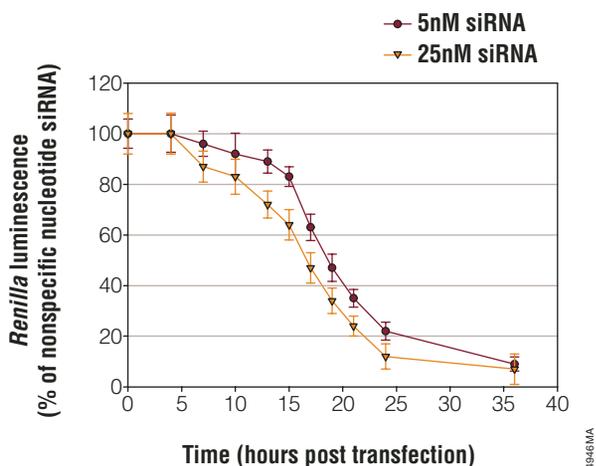


図4. EnduRen™ Substrateは生細胞からのウミシイタケルシフェラーゼを反復測定できるため、同じ細胞集団を用いた長時間のRNAi効果モニタリングが可能。ウミシイタケルシフェラーゼを安定発現するCHO細胞を用いたウミシイタケルシフェラーゼに対するsiRNAの効果モニタリングのために生細胞から減少する発光を測定することが可能。細胞には5nMまたは25nMの非特異的なネガティブ配列に対するsiRNAまたはウミシイタケルシフェラーゼ標的配列に対するsiRNAをトランスフェクションした。ウミシイタケルシフェラーゼ活性は図示した時点で測定された。データは、非特異的コントロール配列をトランスフェクションした細胞に対する特異的標的配列をトランスフェクションした細胞でのウミシイタケルシフェラーゼ活性の%として補正した。結果は12ウェルの平均値。

EnduRen™ Substrateおよびビートルルシフェリンを細胞に加えることにより、生存する細胞数で補正された細胞のCRE応答性を測定することができます(図5)。予想通り、内部標準による補正は、実験データ内の相対的なエラーを低減させました。図5Bに示すように、同一ウェルのウミシイタケルシフェラーゼの発光値を赤色Chroma-Luc™発光値で補正すると、算出された誘導率の相対エラーが43%から24%に低下しました。

結論

ウミシイタケルシフェラーゼレポーターシステムは、光を生じるための基質として酸素とセレンテラジンだけを要求します。in situでのウミシイタケルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイでは、細胞で発光させるためにただ1つ必要なものが供給されるセレンテラジンです。しかし、これまで、セレンテラジンの培地(水溶液)中での安定性の低さがこのアプローチの感度や実用性を制限していました。しかし、化学的に防護されたEnduRen™ および ViviRen™ Live Cell Substrateが安定性に関する問題を解消することにより、高感度で一貫性のあるウミシイタケルシフェラーゼ発光の測定をリアルタイム、簡便なアッセイフォーマットで利用できるようになりました。

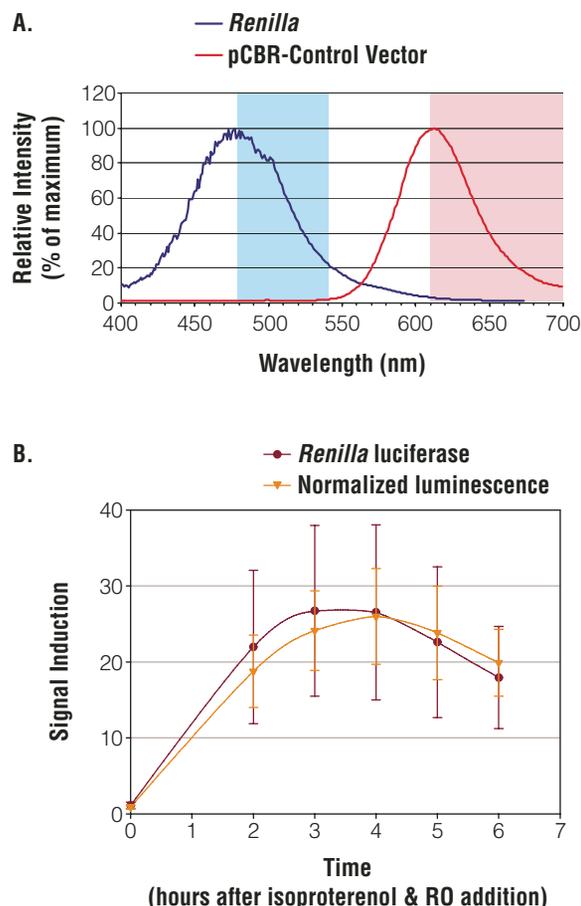


図5. ウミシイタケルシフェラーゼおよび赤色Chroma-Luc™ルシフェラーゼにより生じるスペクトルと発光の測定

パネルA. スペクトルは、精製ウミシイタケルシフェラーゼおよび赤色Chroma-Luc™ルシフェラーゼライゼート(pCBR-Control Vector [カタログ番号 E1421])を安定にトランスフェクションしたCHO細胞を用いて測定した。スペクトルは、発光データ収集用に設定したスキャニングスペクトロフォトメーターを用いて測定した。斜線部は使用した2つのフィルター(510/60nmフィルターおよび610ロングパスフィルター)の最大透過レンジを示した。パネルB. ウミシイタケルシフェラーゼおよび赤色Chroma-Luc™の発光はHEK293細胞を用いて6時間以上モニタリングした。%ウェルプレートの各ウェルの細胞に2つの異なる配列を持つ2種類のベクター(1: CREプロモーター制御下のPESTおよびCL1分解配列を持つウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子、2: SV40プロモーター制御下の赤色Chroma-Luc™ルシフェラーゼ遺伝子を含むpCBR-Control Vector [カタログ番号E1421])をトランジェントにトランスフェクションした。トランスフェクション約24時間後、細胞を60μM EnduRen™ Substrateおよび2mM ビートルルシフェリンに暴露した。2時間後、細胞を1μM isoproterenolおよび100μM Ro-20-1724 (Calbiochem, LaJolla, CA)に暴露し、Turner BioSystems Veritas™ Luminometer (カタログ番号 E6501)を用いて6時間にわたり定期的に測光した。各測定ではウミシイタケルシフェラーゼの発光は青色フィルター(510/60)、赤色Chroma-Luc™発光は赤色フィルター(610ロングパス)を用いた。各色のトータル発光シグナルはwww.promega.com/techserv/tools/の"Chroma-Luc Calculator"集計表ツールで算出し、誘導発光の平均を非誘導発光の平均(赤色発光値による補正値または非補正値)で割った。各データポイントでは標準偏差を示した(n=12)。

参考文献

1. Hawkins, E.M. *et al.* (2002) In: *Bioluminescence & Chemiluminescence Progress & Current Applications*. Stanley, P.E., and Kricka, L.J., eds. World Scientific, Singapore, 149.
2. *EnduRen™ Live Cell Substrate Technical Manual*, #TM244, Promega Corporation.
3. *ViviRen™ Live Cell Substrate Technical Manual*, #TM064, Promega Corporation.

プロトコル

- ◆ *EnduRen™ Live Cell Substrate Technical Manual*, #TM244, Promega Corporation.
(www.promega.com/tbs/tm244/tm244.html)
- ◆ *ViviRen™ Live Cell Substrate Technical Manual*, #TM064, Promega Corporation.
(www.promega.com/tbs/tm064/tm064.html)
- ◆ *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay Technical Bulletin*, #TB288, Promega Corporation.
(www.promega.com/tbs/tb288/tb288.html)
- ◆ *Chroma-Luc™ Series 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	価格(¥)
EnduRen™ Live Cell Substrate	0.34mg	E6481	21,000
	3.4mg	E6482	130,000
	34mg	E6485	1,040,000
ViviRen™ Live Cell Substrate	0.37mg	E6491	22,000
	3.7mg	E6492	135,000
	37mg	E6495	1,200,000
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	10 × 10ml	G7571	50,000
	100ml	G7572	45,000
	10 × 100ml	G7573	330,000

Red Chroma-Luc™ Vector

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
pCBR-Basic Vector	20µg	E1411	45,000
pCBR-Control Vector	20µg	E1421	45,000