

Normalizing Genetic Reporter Assays: Approaches and Considerations for Increasing Consistency and Statistical Significance

レポーター遺伝子アッセイの標準化：整合性と統計的有意性向上のためのアプローチと検討材料

By Trista Schagat, Ph.D., Aileen Paguio, M.S., And Kevin Kopish, B.S., Promega Corporation

アブストラクト

レポーター遺伝子アッセイは、遺伝子発現をコントロールするDNA配列と細胞内プロセスの研究に使用されています。一般的なレポーターアッセイでは、レポータータンパク質をコードする配列の上流に目的の配列を付加したベクターを細胞にトランスフェクションします。レポーターの活性は、実験条件下で遺伝子発現を制御するテスト配列の能力に対する指標として利用されます。レポーター活性は異なるコンストラクトのベクター（例：プロモーター配列の欠失分析; 参考文献2）、または処理条件（例：Gタンパク質共役受容体経路の調節化合物スクリーニング; 参考文献2）で比較されます。細胞数やトランスフェクション効率などの変動により、レポーターの発現規模に対して予想外の影響が現れる可能性があるため、レポーターデータは標準化する必要があります。本稿では標準化に対するアプローチについて論じ、データ分析を成功へと導く主な検討材料について焦点をあてています。

標準化とは？

標準化とは、実験を行う上で直接的に試験する対象以外の要素によりデータを補正するプロセスです。レポーターデータを標準化するためには、特定のサンプルのレポーター活性値を同一サンプルに特有な第2の値で割ります。標準化の第一の目的は、実験で試験されている対象以外の因子により起こるサンプル間の変動を取り除くことです。これらの因子として細胞の播種具合、トランスフェクション効率、ピペティングの不均一性、毒性による変動などが挙げられます。各サンプルから得られるデータは、テストグループ間の比較を行う前に標準化されます。データの標準化は変動を抑え、データを比較する上で信頼性を飛躍的に向上させます。

標準化に用いられる方法とは？

標準化には、総タンパク質含量、総ATP含量や細胞数に対する補正やコントロールレポーターベクターに対する補正など様々な方法が用いられています。総タンパク質含量とコントロールレポーターベクターによる方法を表1で比較しました。タンパク質による標準化はレポーターアッセイの結果を厳密にし、安定なトランスフェクション細胞を用いる場合に有用です。しかし、多くのレポーターアッセイは一過性のトランスフェクション細胞を用いて行われ、顕著な変動はトランスフェクション自体に起因します。このためベクターによる標準化は一過性のトランスフェクション細胞で推奨されます。

ベクターによる標準化は、テストベクターとともにコントロールベクター（内部ベクターコントロールとしてしばしば言及される）をコトランスフェクションすることにより実施されます。内部ベクターコントロールは恒常的な活性を持つプロモーターにより駆動し、第2のレポータータンパク質を発現します。コントロールレポーター活性は細胞にトランスフェクションされたDNA量およびタンパク質を発現する細胞の全般的な能力に相関します。この内部コントロールから得られるレポーター活性はテストレポーターとともに測定され、テストレポーターのデータの標準化に使用されます。テストレポーターデータは、このような方法でウェル間で起こるトランスフェクション効率の変動について標準化されます。

ベクターによる標準化の利点とは？

ベクターによる標準化はサンプル間で起こるトランスフェクション効率の違いを調整します。図1ではトランスフェクション効率が大きく異なる2つのサンプルを示しました（標準化前のデータ比較）。このような大きな違いがあっても内部ベクターコントロールによる標準化後のデータは比較可能です。

ベクターによる標準化は、トランスフェクション効率を控除することでデータの変動を低下させ、テストグループ間で統計的に有意性のある差異を与えます。図2では3種類の異なるプロモーターを有するコンストラクトを分析する上で標準化法の与える影響について示しました。コンストラクトAとCのように大きく異なるレポーター活性を持つサンプル間を比較すると、ベクターによる標準化法は他の分析法に比べ非常に高い変動係数が得られます。データのばらつきの基準値である変動係数は、ベクターにより標準化されたデータで顕著に低い値を示しました。

ベクターによる標準化は、アッセイを行う際に優れた利便性も提供します。ルシフェラーゼ活性の測定は広いダイナミックレンジと高い感度を有するため、ルシフェラーゼは最も汎用されるレポーター遺伝子として使用されています。この特長により複数のサンプル希釈物をテストしたり細胞を大量に調製する必要がなくなるため、多くのサンプル処理に理想的です（ルシフェラーゼレポーターおよび定量試薬の選択に関する詳細については参考文献3をご覧ください）。ベクターによる標準化を行う場合、ホタルおよびウミシイタケの2つのルシフェラーゼ活性を同じ細胞あるいはライセート分取サンプルから測定すること

表1. 標準化法の比較

	標準化法		
	なし	タンパク質	ベクター
算出法	なし	レポーター活性 総タンパク質量	レポーター活性 コントロールレポーター活性
アッセイ	レポーター	レポーターとタンパク質	2つのレポーター
推奨される使用先	予備実験 特定の安定トランスフェクション	安定トランスフェクション細胞	一過性 トランスフェクション細胞
排除される変動	なし	細胞数	トランスフェクション効率

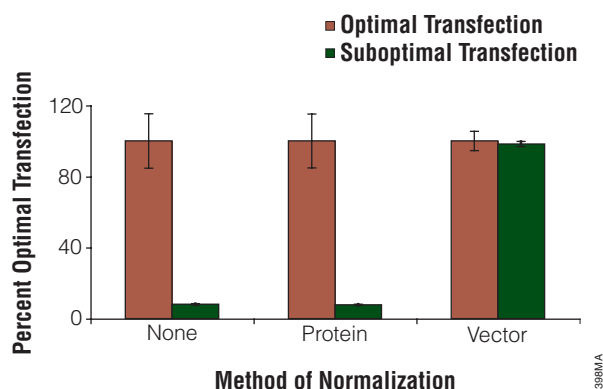


図1. 異なる標準化法を用いたレポーター分析におけるトランスフェクション条件の影響

HEK293細胞にホタルルシフェラーゼを発現するpGL4.13[*luc2*/SV40]およびウミシイタケルシフェラーゼを発現するpGL4.74[*hRluc*/TK]をトランスフェクションした。トランスフェクションは、最適または未最適な脂質/DNA比条件の両方で実施した。ホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼ活性はDual-Luciferase® Reporter Assay System (カタログ番号 E1960) を用いて各サンプルより測定した。タンパク質濃度はCoomassie® Plus Bradford Reagent (Pierce) を用いて測定した。ホタルルシフェラーゼのデータは、標準化しないもの (None)、総タンパク質量で標準化したもの (Protein)、ウミシイタケルシフェラーゼ活性で標準化したもの (Vector) で示した。データは、トリPLICATEサンプルの平均±標準偏差を示し、各標準化条件ごとに最適なトランスフェクションに対するパーセントで表した。

ができます (表2)。タンパク質による標準化の場合、ルシフェラーゼアッセイ (表3) とタンパク質アッセイを行うためにサンプルを分けなければなりません。溶解用バッファーに認められる界面活性剤はタンパク質アッセイを妨げることがあるため適切なタンパク質アッセイ法の選択に注意を払う必要があります(4)。

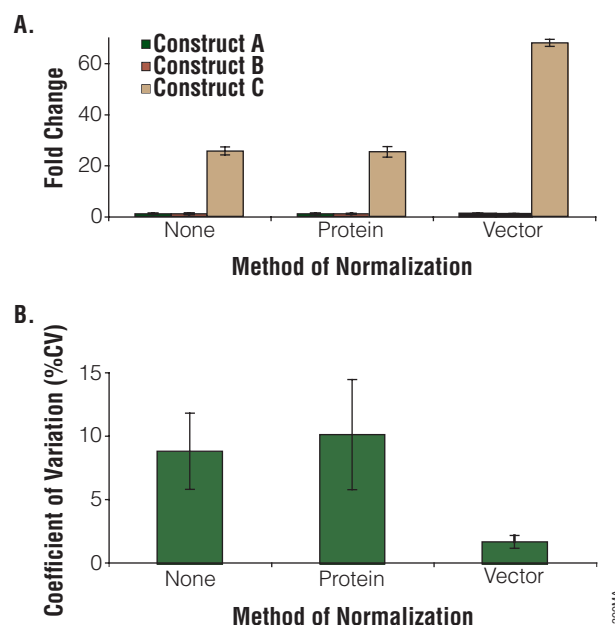


図2. データの有意性および変動に対する標準化法の影響

3つの異なるプロモーター (Construct A, B, またはC) の1つを含むpGL4.10[*luc2*] (ホタルルシフェラーゼ) レポーターベクターをpGL4.74[*hRluc*/TK] (ウミシイタケルシフェラーゼ) とともにHEK293細胞にコトランスフェクションした。ホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼ活性およびタンパク質濃度は図1の脚注の記述と同様に測定した。ホタルルシフェラーゼデータは標準化しないもの (None)、総タンパク質量で標準化したもの (Protein)、ウミシイタケルシフェラーゼ活性で標準化したもの (Vector) で示した。**パネルA.** 各標準化法ごとにホタルルシフェラーゼ活性を算出し、Construct Aと比較した倍率変化として表した。データはトリPLICATEサンプルの平均±標準偏差を示す。**パネルB.** 変動係数 (標準偏差/平均) を標準化したコンストラクトデータについて算出し、全てのコンストラクトの平均±標準偏差を各標準化法について示した。

内部コントロールベクターはどのように選択するか？

内部コントロールベクターはテスト用コンストラクトで使用されていないレポーターをコードしていなければなりません。一般的にホタルルシフェラーゼはテストレポーターとして、ウミシイタケルシフェラーゼはコントロールレポーターとして使用されます。これらテスト用-コントロール用を逆に使用してはいけない技術的な理由はありませんが、異なるプロモーターを持つウミシイタケベクターがより多く利用できるため、内部コントロール用としてはウミシイタケが便利です (表4)。

実験条件に適したコントロールベクターを用いる上で、プロモーターの選択は重要です。プロモーターは低～中程度のレポーター発現を示し、試験を行う実験条件下でも一貫した発現を示すものが理想的です。最適なプロモーターは実験的に決定しなければなりません。最も汎用されるプロモーターにはTK、SV40、CMVなどがあります。

表2. デュアル・ルシフェラーゼレポーターアッセイ

	Dual-Luciferase® Assay	Dual-Glo™ Assay
フォーマット	NH	H
サンプル処理	ベンチスケール	バッチ
ステップ数	5	2
感度	高	中
ホタルシグナルの半減期	約9分	約2時間
ウミシイタケシグナルの半減期	約2分	約2時間
精度	高	高
細胞溶解時間	10分以下	15分以下

NH= Non-Homogeneous (予めライセートを調製)
H= Homogeneous (培養中の細胞に試薬を直接添加)

表3. シングル・ルシフェラーゼレポーターアッセイ

	Bright-Glo™ Reagent	Steady-Glo® Reagent	Luciferase Assay Reagent
フォーマット	NH or H	NH or H	NH
サンプル処理	連続	バッチ	ベンチスケール
ステップ数	1	1	4
感度	高	中	高
ホタルシグナル半減期	約30分	約5時間	約12分
精度	高	高	高
細胞溶解時間	2分以下	5分以下	システムによる

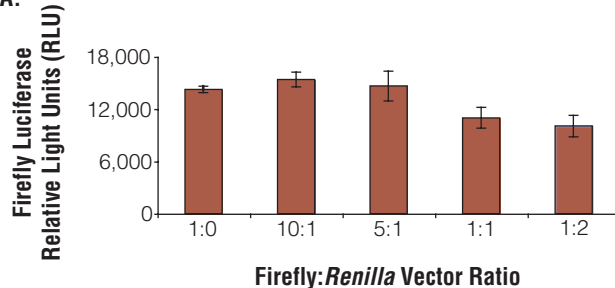
NH= Non-Homogeneous (予めライセートを調製)
H= Homogeneous (培養中の細胞に試薬を直接添加)

内部ベクターコントロールを含むトランスフェクションはどのように最適化するのか？

コトランスフェクションで使用するコントロールベクターの至適量は、バックグラウンドに対して有意に高いレポーター活性を示す最低量です（バックグラウンドはテストベクターのみをトランスフェクションしたサンプルで測定される値）。この至適量も実験的に決定しなければなりません。シングル-レポーターにおける最適なトランスフェクション条件（全般的なガイダンスは参考文献5をご覧ください）を用いて、様々な量のコントロールベクターをコトランスフェクションします。一般的にテストベクターとコントロールベクター比は 10:1 で使用しますが、100:1 でも十分な場合があります。必要なベクター量はコントロールプロモーターや細胞株に依存します。

図3では、テスト（ホタル）およびコントロール（ウミシイタケ）レポーター両方の発現における内部ベクターコントロール濃度の影響について例示しました。内部コントロールの存在がテストレポーター活性に影響をしないことが重要です。図3で1:1と1:2の比率が示すように、過剰な内部コントロールベクターはテストレポーターの発現を低下させる要因となる可能性があります。そのため必要最低限の濃度でコントロールベクターが使用されます。

A.



B.

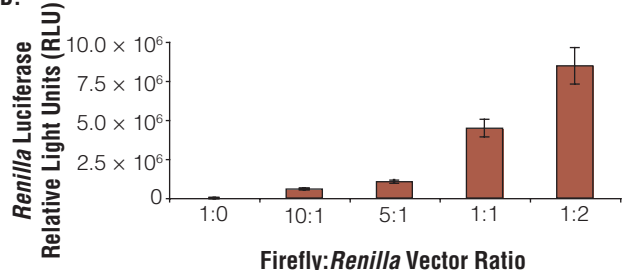


図3. テストプロモーター活性（ホタルルシフェラーゼ）に対する内部コントロール（ウミシイタケルシフェラーゼ）濃度変化にともなう影響

CHO細胞は、一定量 (50ng) のpGL3 Control Vector（ホタルルシフェラーゼ発現）と様々な量 (0-100ng) の内部コントロールベクターphRL-SV40（ウミシイタケルシフェラーゼ発現）をトランスフェクションした。総DNA濃度はキャリアDNAで調整して、一定になるようにした。ホタル（パネルA）およびウミシイタケ（パネルB）の各ルシフェラーゼ活性をDual-Luciferase® Reporter Assay Systemでアッセイした。データはトリプリケートサンプルの平均±標準偏差で表した。

ベクターによる標準化の計算はどのようにするのか？

1つの実験では、各テストグループでトリプリケートに実施し、トランスフェクションは同じ方法で行います。各サンプルはテストレポーター活性をコントロールレポーター活性で割ることにより標準化し、トリプリケートのサンプルの平均を求めました（備考：トリプリケートのテストおよびコントロール活性から得られた平均値を割っても同様の結果が得られた）。これは各テストグループで実施しました。表5では、テストレポーターとしてホタルルシフェラーゼ、内部コントロールとしてウミシイタケルシフェラーゼを用いた実験例を示しました。

データはトリプリケートでアッセイしましたが、これは科学的な結論を引き出すn=3と見なすべきではありません。真のリプリケートは単独のサンプルを異なる日に実施します。表5に示される結果はn=1であり、実験は最低3回繰り返すべきです。

表4. 一般的なpGL4 Reporter Vectors

	マルチ クローニング 領域	レポーター 遺伝子	レポーター 遺伝子 プロモーター
pGL4.10[<i>luc2</i>]	Yes	<i>luc2</i> (ホタル)	No
pGL4.13[<i>luc2</i> /SV40]	No	<i>luc2</i> (ホタル)	SV40
pGL4.70[<i>hRluc</i>]	Yes	<i>hRluc</i> (ウミシイタケ)	No
pGL4.73[<i>hRluc</i> /SV40]	No	<i>hRluc</i> (ウミシイタケ)	SV40
pGL4.74[<i>hRluc</i> /TK]	No	<i>hRluc</i> (ウミシイタケ)	HSV-TK
pGL4.75[<i>hRluc</i> /CMV]	No	<i>hRluc</i> (ウミシイタケ)	CMV

全てのpGL4 Vectorを掲載したリストについては
www.promega.com/pGL4/ をご覧下さい。

どのように標準化したデータを表すか？

レポーターアッセイのデータは多くの方法で表されます。以下の等式は、テストグループ間における標準化された活性の変動倍率の決定に使用することができます：

$$\Delta \text{ 活性倍率} = \frac{\text{サンプルBの平均 (ホタル/ウミシイタケ)}}{\text{サンプルAの平均 (ホタル/ウミシイタケ)}}$$

表5に示した例では 各コンストラクトはコンストラクトA の活性と比較しました。この計算では1つの実験内におけるテストコンストラクト間の活性の相対的差異を算出します。各実験より得られ標準化した活性変動倍率から平均を求め、統計的な有意性を決定しました。データは、活性変動倍率に100を掛けた%活性として表すこともできます。また、平均比率 (ホタル/ウミシイタケ) は実施日の間での比較に使用できます。相対的差異の算出は必ずしも必要ではありませんが有用です。

アプローチに関わり無く、使用した算出方法を明示することが不可欠です。データの表し方を換えることは最低限に抑えるべきで、比較の有効性に不安がある場合は統計学専門の方に助言をお求めください。

まとめ

データの標準化は全てのレポーター遺伝子アッセイで考慮すべきです。一過性トランスフェクションでは特有のばらつきが起こるため、内部ベクターコントロールでの標準化を常に行うべきです。全てのテスト条件下で低～中程度の発現と一貫した結果が得られるベクターが理想的なコントロールベクターです。標準化はテストグループ間で比較する前に各サンプルで実施します。ベクターによる標準化を行うことで、ばらつきの低減、整合性の向上が得られ、サンプル間で優れた有意性を得られる可能性があります。

表5. Dual-Luciferase® Reporter Assay Systemを用いたトランスフェクション実験から得られたデータ例

Day1: テスト リプリケート	ルシフェラーゼ活性 (RLU)		比率 (F/R)	標準化した 活性の 変動倍率
	ホタル (F)	ウミシイタケ (R)		
コンストラクトA				
1	27711050	10058796	2.75	
2	25644674	8931007	2.87	
3	29384322	10448575	2.81	
			2.81	1.00
コンストラクトB				
1	26580010	11206405	2.37	
2	25141158	10424419	2.41	
3	30456170	12614460	2.41	
			2.40	0.853
コンストラクトC				
1	752839872	3877950	194	
2	692411968	3611589	192	
3	669367104	3585187	187	
			192	67.8

参考文献

1. Figueiredo, M.S. and Brownlee, G.G. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 11828-38.
2. Paguio, A. *et al.* (2006) *Cell Notes* **16**, 22-25.
3. Wood, K. (2004) *Cell Notes* **8**, 2-6.
4. Betz, N. (2000) Promega *eNotes* online
www.promega.com/enotes/applications/ap0029_print.htm
5. Chapter 12: Bioluminescence Reporters, *Protocols and Applications Guide* (2006) Promega Corporation
www.promega.com/paguide/chap12.htm