

ONE-Glo™ Luciferase Assay System : 新たな基質による試薬の改良

By Erika M. Hawkins¹, Michael P. Valley¹, Mike A. Scurria², James Unch², Troy Good², Dave Good², Laurent Bernard², Dieter H. Klaubert², Keith V. Wood¹, ¹Promega Corporation and ²Promega Biosciences

アブストラクト

初期のルシフェラーゼアッセイ試薬は、測光前に培地、血清、被験化合物といった成分を除去する必要がありました。ホモジニアスなルシフェラーゼアッセイが登場すると、測光前の培地除去が不要になり、長時間にわたる測光が可能になることで、反応が簡素化されました。さらに今回、新規ルシフェリンアナログが開発され、より低いpHで反応を実施できるルシフェラーゼアッセイ試薬が実現しました。このシンプルな変化により、改良前のルシフェリン含有試薬と比較して、取り扱いが容易で、反応条件に影響を受けにくく、さらに硫黄臭が低減された試薬が誕生しました。

イントロダクション

ホタルルシフェラーゼアッセイは、15年以上にわたりレポーター遺伝子発現の定量に利用されてきました。この間、ルシフェラーゼ遺伝子、ルシフェラーゼアッセイ試薬の両方が改良されたことにより、ルシフェラーゼアッセイは現行のレポーターテクノロジーのなかで、“実施”と“測定”の両面で最も簡便な手法の1つとなっています。今回、新規のルシフェリン基質アナログが開発されました。この基質をベースとするONE-Glo™ Luciferase Assay Systemは、標準的なルシフェリン試薬より安定性および頑健性に優れ、硫黄臭が低減されたユニークなホモジニアスルシフェラーゼ試薬です。

ルシフェラーゼ酵素の発現はしばしば、シグナル伝達、タンパク質間相互作用、転写といった幅広い研究において定量されています(1,2)。ホタルルシフェラーゼは翻訳後修飾を必要としない単量体で、このような用途に適しています。さらに、プロメガはpGL4 Luciferase Reporter Vectorの開発により、哺乳類細胞における発現を最適化し、オフターゲット応答を低減したほか、タンパク質の半減期を能動的に制御することにより、生物学的ツールとしてのルシフェラーゼ遺伝子の性能を向上させました(3,4)。

ルシフェラーゼをハイスループット条件やウルトラハイスループット条件で定量するためには、高感度で頑健な試薬が必要です。ホモジニアス試薬の導入により、ルシフェラーゼ試薬のテクノロジーは大幅に向上しました。このような初期のホモジニアス試薬には、ルシフェラーゼ反応速度を低下させて発光シグナルの持続時間を延長させるための阻害剤が含まれていました。その後開発された全ての試薬とも、同じ発想の下で開発されました(5-7)。これらの試薬は優れたパフォーマンスを示しますが、ルシフェリンの化学反応および発光シグナルの安定化に必要な添加剤には潜在的な限界があります。

我々は、ルシフェリン基質アナログである5'-フッ化ルシフェリン(図1)を含有する新たな試薬を独自に開発しました。5' 位にフッ素を付加すると、ルシフェラーゼ試薬に関するいくつかの基本的特性が改善されます。ルシフェラーゼアッセイにフッ化ルシフェリンを使用すると、従来のルシフェラーゼ試薬に比べてチオール濃度を下げることができ、チオール臭(硫黄臭)が低減されます。また、フッ化ルシフェリンを含有する構成成分(凍結乾燥品)および溶解試薬(バッファーによる溶解済み試薬)は、類似のルシフェリンベース試薬と比較して機能的安定性が大幅に向上しています。ONE-Glo™ Reagentは、フッ化ルシフェリンを使用しているため、他の化合物(フェノールレドや、ルシフェラーゼ阻害作用を有する低分子など)がルシフェラーゼ反応に及ぼす影響も低減されています。

凍結乾燥品および溶解試薬の安定性が向上

フッ化ルシフェリンを用いたルシフェラーゼ反応のユニークな特長のひとつは、反応の至適pHが従来のルシフェリンを用いた反応より大幅に低いことです。ルシフェラーゼ-ルシフェリン反応の至適pHは約7.8ですが(8)、ルシフェラーゼ-フッ化ルシフェリン反応の至適pHは7.0です(図2)。ルシフェラーゼの基質として機能するためには、ルシフェリンの6'-OHが脱プロトン化される必要があります。5'-フッ化ルシフェリンのフッ素は電子受容体として機能し、6'-OHのpKを下げるため、中性pH域でも6'-OHの大部分が脱プロトン化された状態となります。

フッ化ルシフェリンベースの試薬はpHが弱酸性であるため、従来のルシフェリンベースの試薬と比較して、使用、保存および再使用の面で利便性が向上しています。ルシフェラーゼ試薬が失活する主な原因は酸化であると考えられており、試薬のpH低下は、溶解済み試薬を酸化から防護する結果となります。Bright-Glo™ Reagentや他の高発光型(bright-type)試薬のようなルシフェリンベースの試薬は高レベルの発光を生じますが、機能性については比較的速く減衰します(一般的に22 条件で4~5時間あたり10%)。一方、ONE-Glo™ Reagentは、溶解後の機能低下がルシフェリンベースの試薬より非常に緩やかです(22 条件で12~20時間に10%ずつ、図3)。安定性は4 においても同様であり、ONE-Glo™ Reagentは5日間で12% 減少するにすぎません。

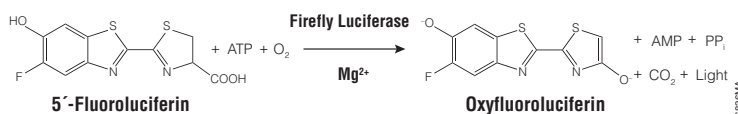


図1. 5'-フッ化ルシフェリンを用いたルシフェラーゼ反応

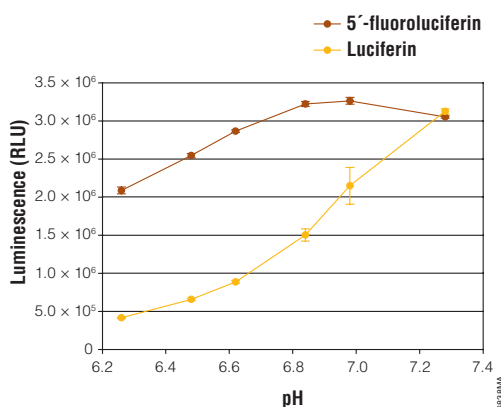


図2 . 5'-フッ化ルシフェリンを含有するルシフェラーゼ反応液は、ルシフェリンを含有する反応液より低 pH 条件で強い発光を生じる
5'-フッ化ルシフェリンを含有しないONE-Glo™ ReagentのpHを6.26 ~ 7.28に調整した後、5'-フッ化ルシフェリンまたはルシフェリンを添加した。0.1% Prionex® (キャリアとして添加) および14.9 ng/mlルシフェラーゼを含有するDMEMを等量添加することにより、反応を開始させた。反応開始3分後に測光した (n = 3)。

ONE-Glo™ Systemの凍結乾燥状態の基質構成成品も、pHが中性ないし弱酸性であるため安定です。ほとんどのルシフェリンベースの基質とは異なり、ONE-Glo™ Substrateは凍結乾燥状態では、室温保存で3週間に11%活性低下するにすぎません。また、4 で保存すれば、機能性の低下が測定可能になるまでに数ヶ月間を要します。

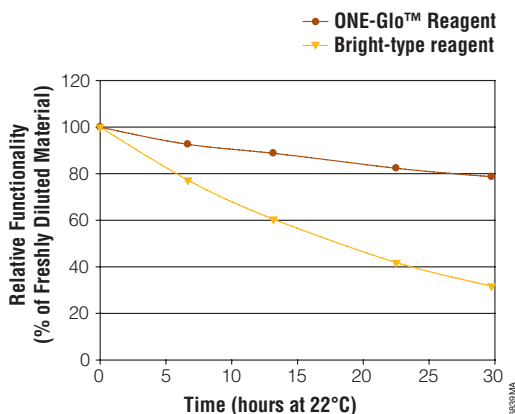


図3 . ONE-Glo™ Reagentは溶解後、他社の高発光型試薬より長時間使用できる
凍結乾燥試薬をバッファーで溶解した後、22 条件で規定された時間インキュベーションし、-70 で凍結させた。融解後、反応液に14.9 ng/ml QuantiLum® Luciferaseおよび0.1% Prionex® を含有するDMEMを等量混合した。相対活性は、-70 で凍結保存したサンプル (22 条件でのインキュベーションを行っていないもの) の発光強度に対する、酵素添加3分後における各サンプルの発光強度の相対値として算出した (n = 3)。

基質以外の反応構成成分に対する寛容性の増大

ONE-Glo™ Reagentは、フッ化ルシフェリンの使用とpHの低下により、フェノールレッド、ルシフェラーゼ阻害作用を有する低分子といった反応構成成分に対する寛容性が増大しています。

ONE-Glo™ Reagentは、ルシフェラーゼ反応環境に必須でない化合物の影響を低減する目的で設計されました。例えば、フェノールレッドは哺乳動物組織細胞の培地に一般的に含まれる成分です(9)。通常のルシフェラーゼ試薬のpHでは、フェノールレッドは発光の一部を吸収してしまいます。pHが通常より低下すると、フェノールレッドの吸収スペクトルがシフトし、カラークエンチングが低減されます。したがって、ONE-Glo™ Reagentにより生じる発光は、フェノールレッドのような化合物の影響を大幅に受け難くなっています。

ONE-Glo™ Reagentは、ルシフェラーゼ酵素の阻害により発光シグナルを低下させる化合物の影響も受け難くなっています。レスベラトロールはホタルルシフェラーゼの阻害剤としてよく知られています。Bakhtiarovaら(10) は、10 μMレスベラトロール存在下でルシフェラーゼ活性が約80%阻害される (20%のルシフェラーゼ活性が残存する) という結果を得ています。表1に、14.9 ng/mlホタルルシフェラーゼ/DMEM溶液に0.1% Prionex® と10 μMレスベラトロールを添加した反応液の試験結果を示します。ルシフェラーゼの寛容性向上は、MPEP (Sigmaカタログ番号 M5435)、SIB 1893 (Sigma カタログ番号 S9311)といった阻害剤についても認められました (表1)。

表1. 各種ルシフェラーゼ阻害剤存在下における相対残存発光量

阻害剤	ONE-Glo™ Reagent	Bright-Glo™ Reagent	高発光型試薬
レスベラトロール*	86 ± 2	71 ± 1	24 ± 2
MPEP	79 ± 1	—	34 ± 2
SIB1893	84 ± 1	—	46 ± 3
相対残存発光量は、阻害剤存在下で測定した発光シグナルの割合を示す (= 阻害剤存在下における発光量/阻害剤非存在下における発光量 × 100)。 * n = 3			

チオール濃度低下による硫黄臭の低減

ルシフェリンベースの試薬には、ルシフェラーゼのターンオーバーを遅くし安定したシグナルを得ることを目的として、しばしばAMP、リン酸塩、アンモニウムといった阻害剤や、不快な臭いを発する高濃度のチオールや還元剤が含まれています(5-7)。しかし、pHを低下させると酵素のターンオーバー自体が遅くなるため、中性または弱酸性域での反応では、これらの阻害剤含有量を飛躍的に低減させることができます。そのため、フッ化ルシフェリンを使用すれば、これらの阻害剤が不要になるため、高発光シグナルが得られるのみならず、試薬の組成を簡素化することができます。すなわち、ONE-Glo™ Reagentは、臭いを発するチオール濃度が従来のホモジニアス試薬の1/100近くにまで低減されています。このため、ONE-Glo™ Reagentは輸送、使用および廃棄時にも安全に取り扱うことができます。さらに、このような阻害剤を含有しないことは、ONE-Glo™ Reagentにより得られる発光シグナルが、Bright-Glo™ ReagentやSteady-Glo® Reagentと比較して高発光かつ安定性が高いことも意味します(図4)。

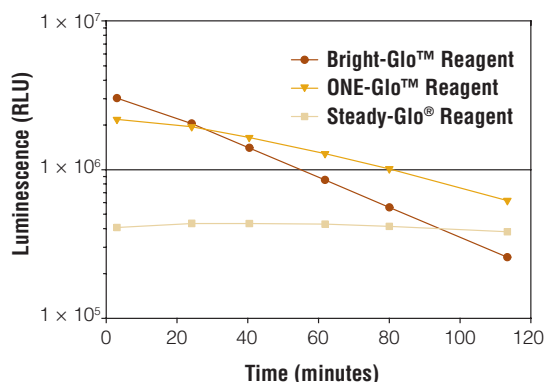


図4. ONE-Glo™ Reagentにより高発光かつ安定性の高い発光が得られ、数時間にわたり簡単に測定できる

96ウェルプレートに、精製ホタルルシフェラーゼ50 µl (0.1% Prionex® 含有DMEMに濃度14.9 ng/mlで溶解) と各試薬50 µlを添加した。酵素添加3分後に測光を開始し、約2時間にわたり定期的に測光した(1秒間の積分値/ウェル)。変動係数は3%未満(n = 3)。

まとめ

プロメガはホモジニアスなルシフェラーゼ試薬を改良し、ONE-Glo™ Reagentを開発しました。従来のルシフェラーゼアッセイも利便性に優れていましたが、5'-フッ化ルシフェリンテクノロジーの導入により、ルシフェラーゼアッセイの化学反応特性がさらに改良され、ハイスループットスクリーニング環境など、多数のサンプルを処理する場合に特に便利になりました。

参考文献

1. Alam, J. and Cook, J.L. (1990) *Anal. Biochem.* **188**, 245–54.
2. Wood., K.V. (1991) In: *Bioluminescence and Chemiluminescence: Current Status*, Stanley, P., and Kricka, L., eds., John Wiley and Sons, Chichester, NY 543.
3. Paguio, A. *et al.* (2005) *Promega Notes*, **89**, 7–10.
4. Almond, B. *et al.* (2004) *Promega Notes*, **87**, 18–22.
5. Scheirer, W. (1999) Bioluminescent Measurement System. U.S. Patent Number 5,866,348.
6. vanLune, H. and Bruggeman, J.J. Luciferase Detection Assay System. U.S. Patent Application U.S. 2007/0054342 A1.
7. Savage, M.D. Phosphine-containing Formulations for Chemiluminescent Luciferase Assays. U.S. Patent Application U.S. 2004/0219622 A1.
8. McElroy, W.D. and Seliger H.H. (1961) In: *Mechanisms of Bioluminescent Reactions. Light and Life*, McElroy and Glass eds., Johns Hopkins Press, Baltimore, 219–56.
9. *ONE-Glo™ Luciferase Assay System Technical Manual*, TM292 (2007) Promega Corporation.
10. Bakhtiarova, A. *et al.* (2006) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **351**, 481–4.

プロトコル

- ◆ ONE-Glo™ Luciferase Assay System Technical Manual, #TM292, Promega Corporation
www.promega.com/tbs/tm292/tm292.html

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
ONE-Glo™ Luciferase	10 ml	E6110	17,000
Assay System	100 ml	E6120	110,000
	1L	E6130	お問合せください