

# ハイスループットスクリーニング研究への生物発光およびセルベースアッセイの応用例

By Frank Fan and Michele Arduengo, Promega Corporation

## アブストラクト

本稿は、新規ハイスループットスクリーニングへのプロメガの試薬および技術の応用を報告しているいくつかの査読済み論文に焦点を当てます。

## イントロダクション

この10年間、ハイスループットスクリーニング (HTS) は主として、製薬およびバイオ業界で創薬を目的として使用されてきましたが、その状況には近年、若干の変化が生じています。大学、政府機関および病院には、医薬品のリード候補の特定のみならず化学プローブの特定をも目的とする各種スクリーニングセンターが設立され、公的にアクセスできるようになっています。さらに、HTSは新興成長市場への拡大も遂げており、独自の化合物または抽出物コレクションが使用されています。

本稿は、プロメガの試薬、レポーターおよび生物発光アッセイが使用されている4報の査読済み論文に焦点を当てました。Lynch らの論文は、スクリーニングアッセイにおいて、一般的な作用（細胞毒性など）の検討でなく、特異的な作用を検討する場合のルシフェラーゼレポーターアッセイの有用性を例示しています。Rossiらの論文は、少数の初代培養細胞を用いたスクリーニングへの生物発光アッセイの応用例について報告しています。JunkerとClardylは、細菌性バイオフィルム阻害剤の特定を目的として、生物発光HTSアッセイを開発しました。Seversonらの研究では、バイオセーフティーレベル3 (BSL3) の封じ込めを必要とする新興感染症病原体 SARS-CoVの細胞変性効果 (CPE) を阻害する化合物の特定を目的として、生物発光を用いた細胞生死判別アッセイを検証しています。

Lynch, R.A. *et al.* (2007) A small-molecule enhancer of signal transducer and activator of transcription 1 transcriptional activity accentuates the antiproliferative effects of IFN- $\gamma$  in human cancer cells. *Cancer Res.* **67**, 1254-61.

STAT1はさまざまな細胞内プロセスに関与する転写因子で、腫瘍抑制因子に類似した挙動をさまざまな形で示します。アポトーシスやサイクリン依存性キナーゼ阻害に関与するほか、IFN- $\gamma$ の抗腫瘍作用を媒介し、血管新生を阻害します。この論文の著者らは、STAT1依存性の遺伝子発現を促進する低分子の特定を目的として、生物発光レポーターアッセイをデザインしました。

STAT1 (STAT1luc/3T3) プロモーター制御下のホタルルシフェラーゼ遺伝子を、NIH3T3 細胞株へ安定的にトランスフェクションしました。対照細胞株は、NF $\kappa$ B プロモーター (NF $\kappa$ Bluc/3T3) 制御下のホタルルシフェラーゼ遺伝子を安定的にトランスフェクションした細胞株、ならびに構成的に活性化する CMV プロモーター制御下のホタルルシフェラーゼ遺伝子を安定的にトランスフェクションした細胞株としました。384ウェルプレートに細胞を4,000個/ウェルの密度で播種し、Peakdale Libraryの5,120化合物をピントランスファー方式で細胞に添加しました。細胞と化合物の混合液を1時間インキュベーション後、IFN- $\gamma$ を添加しました。2回目のインキュベーション後、Bright-Glo<sup>TM</sup> Luciferase Assay Systemを用いてルシフェラーゼ活性を評価しました。

STAT1luc/3T3システムを用いた生物発光レポーターアッセイは、Z'-因子が0.92と頑健なアッセイであることが実証されました。このアッセイから、3化合物がSTAT1依存性ルシフェラーゼ活性を1.5倍上昇させることが確認されました。ルシフェラーゼ活性の上昇はNF $\kappa$ Bluc/3T3系では認められませんでした。3化合物のうち2-NPが詳細に検討されました。2-NP単独では、ルシフェラーゼ活性は誘導されませんでした。IFN- $\gamma$ 共存下では、ルシフェラーゼ活性がIFN- $\gamma$ 単独で誘導された最大活性の2.5倍に上昇しました。著者らは、2-NPの主な作用が、IFN- $\gamma$ により誘導されるSTAT1依存性転写イベントの媒介であると結論づけました。

2-NPの作用が細胞種に特有のものか否かを明らかにするため、Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporterを用いた第2のスクリーニングアッセイを使用しました。MCF-7およびSK-N-MC 神経芽腫細胞株に、STAT1lucレポーターコンストラクトと、チミジンキナーゼプロモーター制御下のウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を連結したプラスミドを一過性にトランスフェクションしました。実験の結果、2-NPの作用は生物種および細胞種に特有のものでないことが示唆されました。

このハイスループットアッセイに用いた生物発光レポーターアッセイは、遺伝子を安定的にトランスフェクションした細胞および一過性にトランスフェクションした細胞の両方を評価することができました。さらに、このアッセイでルシフェラーゼ活性をデフォルトで上昇させた化合物は細胞透過性を有するか、細胞の化学処理を行わなくても標的に到達できたことから、このアッセイデザインは非特異的毒性を示す化合物を排除することができました。

Rossi, *et al.* (2007) Identifying druglike inhibitors of myelin-reactive T cells by phenotypic high-throughput screening of a small-molecule library. *J. Biomol. Screen.* **12**, 481-9.

多発性硬化症などの疾患の発症機序には、中枢神経系に存在するミエリンタンパク質の免疫系による攻撃が関与しますが、炎症性T細胞はそのなかで重要な役割を果たすと考えられています。この研究では、ミエリンプロテオリピドタンパク質 139-151 (PLP139-151) を認識するT細胞受容体 (TCR) を発現させたトランスジェニックマウスから分離した脾臓細胞の初代培養を用いて、ミエリンPLP139-151に対するT細胞の増殖反応を阻害する薬物様化合物をCellTiter-Glo<sup>®</sup> Assayによりスクリーニングしました。経口バイオアベイラビリティおよび血液脳関門透過性に基づきあらかじめ選別されているLaboratory for Drug Discovery in Neurodegeneration Libraryの化合物を、384ウェルプレートに分注し希釈しました。希釈した化合物を384ウェルのアッセイプレートに移し、トランスジェニックマウスから分離した脾臓細胞懸濁液（培地のみ、あるいはPLP139-151を添加した培地に懸濁）を添加しました。脾臓細胞懸濁液をインキュベーション後、陰性対照細胞（培地 + 溶媒、PLP139-151無添加）および陽性対照細胞（培地 + 溶媒、PLP139-151添加）と比較評価しました。このHTSアッセイのZ' 因子は頑健で (> 0.5)、スクリーニングした41,184化合物のうち302化合物が「ヒット」しました。続いて、この302化合物のJurkat細胞における非特異的毒性を、CytoTox-ONE<sup>®</sup> Assayを用いて試験しました。その結果、非特異的作用を有する63化合物が検討対象から排除され、残る239化合物が次の段階の評価に進みました。

Junker, L.M. and Clardy, J. (2007) High-throughput screens for small-molecule inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **51**, 3582-90.

緑膿菌は感染抵抗性が低下した患者の体内にバイオフィームを形成し、持続感染を確立するおそれがある日和見病原体です。緑膿菌感染は、嚢胞性線維症や重度熱傷に随伴しますが、その他に、カテーテル、人工呼吸器、人工関節、臓器などの表面がバイオフィーム形成を促進する場合もあります。バイオフィーム内の細菌細胞は、ポリマー・マトリクスを足場としてきわめてゆっくりと増殖し、抗生物質、宿主の免疫応答や、その他の環境ストレスに対する抵抗性が高まった状態にあります。

緑膿菌細胞は最も溶菌しにくい細菌細胞のひとつですが、バイオフィームが形成されると、さらに溶菌しにくくなります。この論文の著者は、バイオフィーム形成阻害剤の特定を目的として、BacTiter-Glo™ Assayを用いたハイスループットスクリーニングを確立し、溶解-抽出-測定を1ステップで行うことに成功しました。BacTiter-Glo™ Assayを用いることにより、Z'-値および簡便性が向上したほか、標準的なクリスタルバイオレットアッセイと比較して、はるかに広範囲の細菌数 (OD) にわたり再現性の高い結果が得られることが明らかになりました。

著者は66,000個を超える化合物を384ウェルプレートでスクリーニングしました。菌体を $1 \times 10^5$  CFU/mLの密度でプレートに播種後、被験化合物を添加しました。その後、培養プレートのウェルにピントランスファーツールを挿入し、バイオフィーム形成の担体としました。24時間後、ピンを静かに洗浄し、BacTiter-Glo™ Reagentの入ったアッセイプレートに移した後、ピンツールに付着した細菌細胞数の指標として発光を測定しました。同様の手順を用いた脱離アッセイにより、一次スクリーニングの「ヒット」化合物の特性を詳細に検討しました。6種類の構造に分類される30化合物が、強力なバイオフィーム形成阻害剤として特定されました。

Severson, W.E. et al. (2007) Development and validation of a high-throughput screen for inhibitors of SARS CoV and its application in screening of a 100,000-compound library. *J. Biomol. Screen.* **12**, 33-40.

この論文では、SARS-CoVの細胞変性効果 (CPE) を阻害する化合物特定を目的とする生物発光アッセイが検証されています。SARS-CoVは標準的な抗ウイルス治療に抵抗性を示すことが判明しており、感染者の死亡率は15%にのぼります。人畜共通ウイルスであるため、SARS-CoVの今後の流行は予測できず、有効な治療薬の特定がきわめて重要な課題となっています。

SARS-CoVの研究は、BSL3の封じ込め実験室にて実施することが義務づけられています。そのため、有効なSARS-CoV治療薬の特定を目的とするHTSアッセイは、使用が簡単で、操作手順ができる限り少ないものでなければなりません。この論文では、細胞生死判別アッセイの試薬3種類 (MTS、Neutral Redおよび生物発光を利用したCellTiter-Glo® Reagent) が評価されました。CellTiter-Glo® Reagentには、他の試薬と比較していくつかの利点 (細胞の洗浄や培地の除去が不要、ピペット操作が最小限、短いインキュベーション時間など) があることから、BSL3実験室の滞在時間が短縮されました。

アッセイは、細胞を10,000個/ウェルの密度で96ウェルプレートに播種し、24時間インキュベーション後、被験化合物を添加し、BSL3実験室内でSARS-CoVのToronto-2株を細胞に感染させました。感染72時間

後にCellTiter-Glo® Reagent を添加し、発光を測定することにより細胞の生死を判別しました。

このアッセイを、2種類の小規模な化合物ライブラリー (Microsources SpectrumライブラリーおよびPrestwickライブラリー) を用いて検証しました。一次スクリーニングでは、化合物を1種類の濃度でスクリーニングしました。アッセイのZ'-因子は $>0.6$ 、シグナル/バックグラウンド比は $>16$ 、シグナル/ノイズ比は $>3$ でした。最後に、検証が完了したアッセイを用いて、National Institute of Neurological Disorders and Strokeライブラリーの100,000化合物をスクリーニングしました。一次スクリーニングの結果、CPEを阻害するが、細胞の生死にほとんど影響を及ぼさない化合物が数個特定されました。詳細な検討の結果、うち3種類の化合物分類に属する3化合物が「高活性」と判定され、魅力的なリード化合物であると報告されました。

## まとめ

以上4報は、生物発光を利用したスクリーニング技術により、生物学分野の難問が解決できる可能性があることを例示しています。生物発光は感度がきわめて高いため、初代培養細胞などの少数の細胞や、複数の細胞集団からなる混合細胞液をアッセイすることができます。また、生物発光は、被験化合物の干渉がスクリーニングアッセイにもたらすバックグラウンドを大幅に低減します。さらに、ルシフェラーゼは哺乳動物細胞に由来するものでないため、特異性の高い作用の検討を目的とするハイスループットアッセイをデザインすることができます。

ハイスループット領域におけるその他の生物発光技術 応用例をご覧になりたい研究者のために、プロメガでは、最近発表された査読済論文のうち、セルベースアッセイと生物発光技術の利点をハイスループット研究に最大限に利用した論文のリストをご用意しています。この引用文献データベースは当社ウェブサイト ([www.promega.com/citations](http://www.promega.com/citations)) でご覧いただけます。検索ページの「high-throughput screening (ハイスループットスクリーニング)」のボックスにチェックを入れた後、「submit」をクリックするだけです。

## 製品案内

| 製品名                                               | サイズ                | カタログ番号 | 価格(¥)   |
|---------------------------------------------------|--------------------|--------|---------|
| Bright-Glo™ Luciferase Assay System               | 100 ml             | E2620  | 89,000  |
| Dual-Luciferase® Reporter Assay                   | 1,000 assays       | E1960  | 198,000 |
| CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay   | 100 ml             | G7572  | 45,000  |
| CytoTox-ONE® Homogeneous Membrane Integrity Assay | 1,000-4,000 assays | G7891  | 49,000  |
| BacTiter-Glo™ Microbial Viability Assay           | 100 ml             | G8232  | 47,000  |