

Getting the Most from Your Transfections: Increasing Throughput and Sensitivity

トランスフェクションを最大限に活用する: スループットと感度の向上

By Jolanta Vidugiriene, Trista Schagat, Denise Garvin and Gediminas Vidugris, Promega Corporation

アブストラクト

レポーター遺伝子のトランスフェクションは、細胞を用いる遺伝子研究や制御配列の機能の研究にとって強力なツールとなっています。さまざまな発光テクノロジーによりトランスフェクション量のスケールダウンが可能となり、少ない材料で、より多くの変量を、短時間で試験して、多くのデータを取得できるようになりました。

イントロダクション

細胞生理学の解明は、トランスフェクションで培養哺乳動物細胞に天然遺伝子や改変遺伝子を導入するテクノロジーによって大幅に進みました。遺伝子導入の成否は導入条件の最適化にかかっており、細胞種や実験要件によっても変化します。高い発現レベルは必ずしも有用なわけではありませんし、機能的に適したシステムを構築できるわけでもありません(1)。最適なトランスフェクション条件は、ルシフェラーゼや緑色蛍光タンパク質 (GFP) などのレポーターを使用することにより実験的に決定する必要があります。

スループットを向上させたいという要望 (ゲノムワイドな遺伝子機能の解明や、ゲノムワイドなRNAiスクリーニングの実施など) を満たすには、トランスフェクションをますますスケールダウンさせていく必要があります。ルシフェラーゼアッセイは頑健かつ迅速であり、ハイスループットアプリケーションに適しています。本稿では、96ウェルプレートでのトランスフェクション実験においてルシフェラーゼと標準的なGFPとを比較し、96ウェルフォーマットにおけるルシフェラーゼを用いたトランスフェクション最適化について論じます。

ルシフェラーゼとGFPの比較

レポーターテクノロジーの進歩に伴い、煩雑で感度の低いアッセイ (クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) や β -ガラクトシダーゼなど) を必要とするレポーターから、GFPやルシフェラーゼなどの検出が容易なレポーターテクノロジーへと切り替わってきました。GFPとルシフェラーゼはどちらも簡便性や検出感度の点から従来法より優れており、現在ではトランスフェクション効率や遺伝子発現の定量マーカーとしてルーチンに用いられています。トランスフェクションの今後は、どれだけ少ない量でどれだけ高いスループットの

アッセイを行うことができるかにかかっており、そのようなアッセイとしてはルシフェラーゼの方が明らかにすぐれた利点を備えています (表1)。

レポーターの特性

GFPレポータータンパク質とルシフェラーゼレポータータンパク質をはっきりと区別する特徴として、内在性の活性とタンパク質の半減期の2つが挙げられます。哺乳動物細胞は本来GFPを持ちませんが、初代細胞の中には自己蛍光を発するものがあります (単球、マクロファージなど)。このような自己蛍光性はバックグラウンドに影響し、蛍光レポーターの検出に限界を生じさせます。自己発光は、哺乳動物細胞では問題とはなりません。また、GFPの半減期 ($t(1/2)$ 約26時間; 2) はルシフェラーゼの半減期 ($t(1/2)$ 約3~4時間; 3) よりも長く、そのためGFPが内在性タンパク質本来の発現パターンを再現する可能性が低下します。

検出方法

ルシフェラーゼ活性は、基質を添加してルミノメーターでシグナル検出することにより測定します。ルミノメーターには光を検出するフォトマルチプライヤーチューブが搭載されており、きわめて高感度で、広いダイナミックレンジを示します (4)。一方、GFPの場合には基質を添加する必要はなく、蛍光の検出方法にはいくつかの選択肢があります。最もよく用いられる検出方法は顕微鏡観察とフローサイトメトリーの2つで、どちらの場合も高額な装置を必要とします。蛍光アッセイの場合、本質的にダイナミックレンジと感度には限界があります。蛍光プレートリーダーは感度が限られているため、GFPが高レベルで発現されている時にしか有用ではなく、したがってこの検出方法は推奨できません。

表1. GFP レポーターとルシフェラーゼレポーターの比較

レポーター	標準的な検出法	利点	弱点
蛍光タンパク質 (例: GFP)	顕微鏡、フローサイトメトリー (プレートリーダーは推奨されません)	・視覚化がシンプル ・単一細胞または細胞集団の分析 ・セルソーティングが可能 ・試薬不要	・低い感度 ・限定的なダイナミックレンジ ・高価な機器 ・主観的 (顕微鏡) ・大量のDNAを使用 ・長いタンパク質半減期
ルシフェラーゼ	ルミノメーター	・細胞集団全体を分析 ・高感度 ・広いダイナミックレンジ ・ハイスループット ・マルチプレックスが容易 ・少量のDNAを使用 ・平均的なタンパク質半減期	・単一細胞分析不可 ・定量試薬が必要

トランスフェクション効率

選択したレポーターとアッセイ方法は、トランスフェクション効率の測定法に影響を与えます。ルーチンに用いられているトランスフェクション効率の測定方法としては、トランスフェクト細胞の割合を求める方法と、細胞集団におけるレポーターの平均発現量を求める方法の2つがあります。

1つめの方法であるトランスフェクト細胞の割合を求めるやり方は、GFPと顕微鏡観察またはフローサイトメトリーを用いて行います (図1、パネルAおよびB)。全細胞数に対する、検出可能なGFPを発現した細胞数としてスコアされます。ただし、細胞内のレポーター発現量を測定できるわけではなく、数桁のオーダーではばつく可能性があります (図1、パネルBおよびC)。また、顕微鏡観察による細胞のスコアリングは主観的で、時間もかかります。

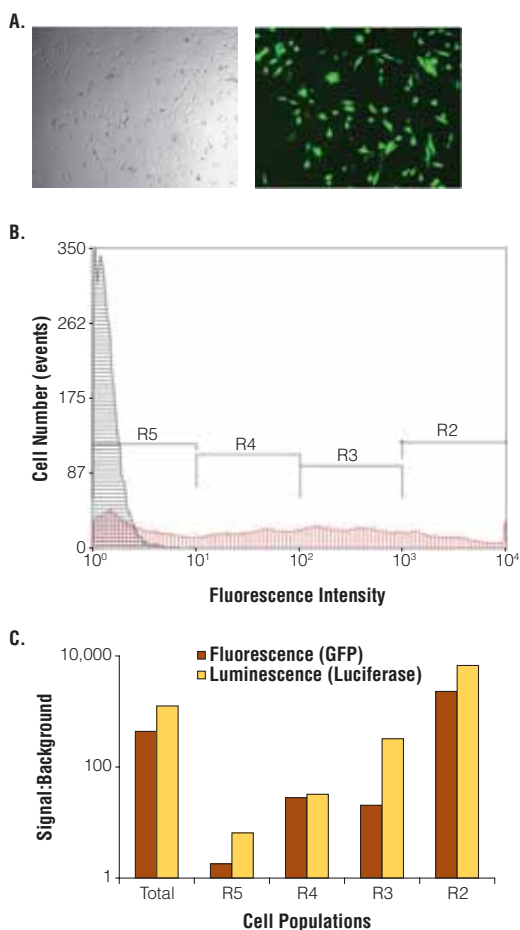


図1. トランスフェクション効率の測定

パネルA: 蛍光顕微鏡で観察したGFPレポーター発現HeLa細胞 (右) と、光学顕微鏡で観察した全細胞 (左) から、トランスフェクト細胞の割合を算出。 **パネルB:** Jurkat細胞にGFPレポーターとpGL4.10[*luc2*]-CMV Luciferase Reporter Vectorをコトランスフェクションした。GFPの発現はフローサイトメトリーで分析した (赤線)。偽トランスフェクト細胞を対照として用いた (黒線)。トランスフェクト細胞をGFPの発現強度に基づいて5つの領域に分離し、再ソーティングした。各細胞集団 (R2~R5) について約10,000 のイベントを収集した。 **パネルC:** パネルBに示したソーティング後の各細胞集団の平均蛍光量をフローサイトメトリーにより測定し、発光量はONE-Glo™ Luciferase Assay Systemを使ってルミノメーターにより測定した。データは、シグナル/バックグラウンド比 (偽トランスフェクト細胞が発する光量に対する、レポーター遺伝子トランスフェクト細胞が発する光量の比) として表す。

2つめの方法であるレポーター活性の平均値を求めるやり方は、GFPとフローサイトメーターを用いるか、ルシフェラーゼとルミノメーターを用いて行います。レポーター活性の平均値からは、トランスフェクションされた細胞の割合は得られませんが、サンプル内のレポーター活性の合計値を得ることができます。ほとんどの遺伝子発現実験は細胞集団で行われているため、目的遺伝子の発現レベルとレポーターの発現レベルを直接関連させることができます。

上記の2つの方法の比較を図2に示します。5種類のNucleofector® プログラム (Lonza) を用いて、Jurkat細胞にpmaxGFP® ベクターとpGL4.10[*luc2*]-CMVベクターの両方をトランスフェクションしました。トランスフェクト細胞の割合はGFPを用いて測定し、レポーター活性の平均値はGFPとルシフェラーゼの両方を用いて測定しました。どちらの方法でも類似の傾向が認められましたが、レポーター活性における差は、トランスフェクト細胞の割合における差を大きく上回る結果となりました。たとえば、トランスフェクト細胞の割合においてG10プログラムとS18プログラムの間に見られた1.5倍の差は、レポーター活性では10倍の差として表れました。また、S18プログラムとT14プログラムではトランスフェクションされた細胞の割合は類似していましたが、レポーター活性はT14プログラムがS18プログラムの2~3倍となりました。この例は、レポーターの平均発現活性をモニタリングする方が、トランスフェクト細胞の割合をモニタリングするより有用であることを明確に表しています。

最後に、ルシフェラーゼレポーターの検出感度が高いということは、強いシグナル/バックグラウンド比を得るのに必要なルシフェラーゼレポーターベクター量がGFPに比べて著しく少なく済むことを意味します。これは、複数のベクターを用いてトランスフェクションを行う場合に大きな柔軟性をもたらします。たとえば、図2では、GFPベクターの使用量はルシフェラーゼベクターの使用量の10倍にのぼります。

最適化された96ウェルトランスフェクション

96ウェルプレートでのトランスフェクションを最適化するには、理想的な細胞数、トランスフェクション試薬条件、DNA濃度、処理や回

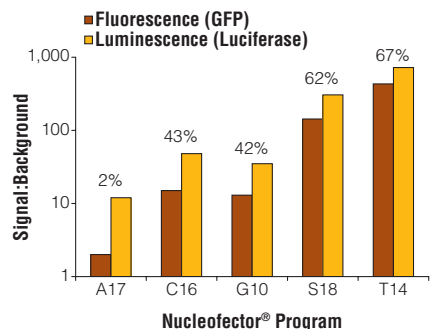


図2. トランスフェクション最適化のための GFP とルシフェラーゼの比較

Jurkat細胞に、5種類のNucleofector® プログラムのもとにpGL4.10[*luc2*]-CMV とpmaxGFP® ベクターを1:10の比でコトランスフェクションした。maxGFP® の発現レベルとトランスフェクト細胞の割合はフローサイトメトリーにより測定した。ルシフェラーゼ活性は、ONE-Glo™ Luciferase Assay Systemを使用してルミノメーターにより測定した。両レポーターの発現レベルは、対照細胞のシグナル強度に対するトランスフェクト細胞とのシグナル強度の比として表し、トランスフェクト細胞の割合を数値で示した。

収のタイミングを決定する必要があります。このような条件は、実験的に決定する必要があり、使用する細胞株やトランスフェクション方法に関して基礎的な文献やトランスフェクション試薬の供給業者から先例を見つけ、それを開始点とすることが有用です (5)。

条件を最適化するには、1枚のプレートにおいて、それぞれの条件についてトリPLICATEでトランスフェクションを行い、トリPLICATEサンプルの平均値を求めます。この平均値をその実験に関して N=1 とみなします。特定の条件のレプリケートを全てプレート周囲のウェルに配置してしまわないよう注意してください。インキュベーターの湿度が至適値を下回ると、プレート周囲のウェルではサンプルが蒸散して“エッジ効果”と呼ばれるばらつきが生じる恐れがあります。トリPLICATEのサンプルのうち1サンプルのみをプレート周囲のウェルに配置することにより、潜在的なばらつきを均分または容易に同定でき、必要に応じて培養条件を改良できます。

細胞生存率

最善のトランスフェクション結果を得るうえで重要となるのは、正しいレポーターやトランスフェクション効率測定法を選択することだけではありません。細胞の健康状態のモニタリングも同様に重要です。ルシフェラーゼアッセイは細胞生存率アッセイと並行してマルチプレックスに実施できますので、96ウェルフォーマットのルシフェラーゼアッセイを用いればこの点を単純化できます (6)。

Jurkat細胞のトランスフェクションに最適なNucleofector® 法と試薬を決定するため、pGL4.10[*luc2*]-CMV Vectorを用いて31種類の手法と3種類の試薬を1枚の96ウェルプレートで試験しました (図3)。トランスフェクトした細胞のルシフェラーゼ活性 (図3、パネルB) と細胞生存率 (図3、パネルC) を測定しました。ルシフェラーゼ活性が最も高く、かつ細胞生存率への影響を最小限に抑えた最適なトランスフェクション条件は、CL120プログラムとSE Reagentでした。これは、pmaxGFP® ベクターとフローサイトメトリーを用いた測定に基づいてLonzaが推奨している条件と相関していました。

CM150/SEサンプルでは、レポーター活性だけでなく細胞生存率のモニタリングも重要であることが明確に示されました。このトランスフェクション条件では、きわめて高いルシフェラーゼ活性が得られたものの、細胞生存率が65%にすぎなかったのです。このことは、以降の実験を進めるうえでこのような条件下の細胞の健康状態が適切ではないことを示しています。

結論

ルシフェラーゼは、トランスフェクションや遺伝子発現のレポーターとしてGFPよりも明らかにすぐれた利点を備えています。具体的には、半減期が短いこと、検出感度が高いこと、シグナル/バックグラウンド比が高いこと、ルミノメーターが比較的安価であることなどが挙げられます。ルシフェラーゼテクノロジーを用いれば、トランスフェクションを96ウェルプレートにスケールダウンすることができ、多くの条件を容易に最適化できるとともに、細胞の健康状態も同時にモニタリングできます。したがって、ルシフェラーゼレポーターテクノロジーを用いれば研究者はご自身のトランスフェクションと時間を最大限に活用できるようになります。

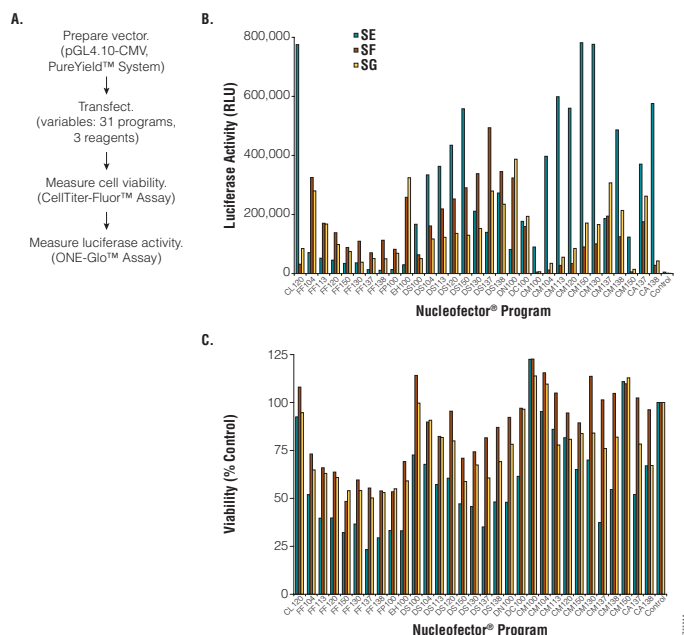


図3. 迅速なトランスフェクション最適化のためのハイスループット試験実施とマルチプレックス化

Cell Line Optimization 96-well Nucleofector® Kit (Lonza) を使用することにより、ルシフェラーゼレポーター (pGL4.10[*luc2*]-CMV Vector)、3種類のNucleofector® Solutions (SE, SF, SG)、31種類のプログラムを用いたJurkat細胞のトランスフェクションの最適化を行った (パネルA)。核内導入の24時間、レポーター活性 (パネルB) および細胞生存率 (パネルC) を、既報のとおりそれぞれONE-Glo™ Luciferase AssayおよびCellTiter-Fluor™ Assayを用いてマルチプレックスに分析した (6)。

参考文献

- Slater, M. (2008) *Promega Notes* **100**, 16–8.
- Corish, P. and Tyler-Smith, C. (1999) *Protein Eng.* **12**, 1035–40.
- Thompson, J.F. *et al.* (1991) *Gene* **103**, 171–7.
- Kopish, K. and Betz, N. (2006) *Promega Notes* **93**, 23–6.
- Transfection Assistant: www.promega.com/transfectionasst/
- Zakowicz, H. *et al.* (2008) *Promega Notes* **99**, 25–8.

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
ONE-Glo™ Luciferase Assay System	10 ml	E6110	17,000
pGL4.10[<i>luc2</i>] Vector	20 µg	E6651	58,000
CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay	10 ml	G6080	15,000
PureYield™ Plasmid Maxiprep System	10 回分	A2392	25,000