

# Improved response ratio for NF- $\kappa$ B inhibition analysis using new luciferase reporter vector (pGL4.32[luc2P/NF- $\kappa$ B-RE/Hygro])

## 新規ルシフェラーゼレポーターベクター (pGL4.32[luc2P/NF- $\kappa$ B-RE/Hygro]) を用いることによるNF- $\kappa$ B阻害分析の反応比の向上

By marc schumacher, mario dicato and marc diederich

### アブストラクト

シングルまたはデュアルレポーター遺伝子測定用の新しいルシフェラーゼレポーターベクターがプロメガにより開発されました。我々は天然物によるTNF $\alpha$ 誘導性の核内転写因子 $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 活性の阻害を目的として種々の実験を行いました。プロメガの新規ベクターを用いたところ、他社のベクターに比べてホタルルシフェラーゼ発光のレポーター発現が向上しました。この新規ベクターを用いれば、生理活性化化合物によるNF- $\kappa$ B阻害をより正確かつ高精度に測定することができると同時に、ホタルルシフェラーゼベクターの使用量低下によりコストも削減することができます。

### イントロダクション

レポーター遺伝子の登場により、細胞内経路の迅速かつ効率的な研究が可能となりました。分子細胞生物学のツールとしてレポーター遺伝子のアプリケーションが初めて総説として発表されたのは1988年のことです (1)。プロメガのDual-Glo™ Luciferase Assay Systemを使用すれば、1つのサンプル内で異なる2つのレポーターを測定でき、どちらのベクターの発光シグナルについても迅速で再現性の高い正確な測定値を得ることができます。

我々の研究室では、さまざまな生物学的化合物のNF- $\kappa$ B阻害活性の測定において、このアッセイシステムを時間節約につながる迅速な分析手順として体系的に使用しました (2,3)。NF- $\kappa$ Bは細胞の生存調節に重要な役割を果たしています (4)。

NF- $\kappa$ Bはアポトーシスイベントや炎症に深く関与していると考えられているため、抗癌研究の魅力的なターゲットとなっています。全報告症例の20%においてはNF- $\kappa$ Bが発癌原因であるとの報告がなされており (5)、腫瘍の促進や進展への関与が指摘されています。また、この転写因子は多種多様な腫瘍で恒常的に活性化されています (6)。このため我々は、さまざまな癌細胞にアポトーシスを誘導する戦略として、NF- $\kappa$ B活性を阻害するという治療方針を探索することとしました。現在臨床試験や前臨床試験が行われている抗癌剤候補化合物のいくつかは、NF- $\kappa$ Bを阻害することが報告されています (7,8)。

我々の研究室では近年、海綿から抽出した天然化合物に焦点を当てて、二次代謝物に由来する有望な生理活性として研究を進めてきました (9)。この化合物は、捕食者に対する防御として宿主が産生している物質です (10,11)。本稿では、海綿動物門の特定の海綿から新たに単離されたテルペンのNF- $\kappa$ B阻害活性を、Dual-Glo™ Luciferase Assay Systemを用いて検討した実験についてご紹介します。新規ルシフェラーゼベクターpGL4.32 (luc2P/NF- $\kappa$ B-RE/Hygro) (以下、pGL4.32(NF- $\kappa$ B)と記載) を用いることによって得られた結果を、Stratagene社のpNF- $\kappa$ B-Lucを用いることにより得られた結果と比較します。

### 材料および方法

K562細胞を、 $1.5 \times 10^7$  cells/mlの細胞密度でBioRad Gene Pulser® を用いて 250V、500 $\mu$ Fでエレクトロポレーションしました。5 $\mu$ gのホタルルシフェラーゼベクターと5 $\mu$ gのウミシイタケプラスミド (プロメガ) を各キュベットに添加したのち、トランスフェクションしました。本試験の後半では、ホタルルシフェラーゼベクターの添加量をトランスフェクションあたり2.5 $\mu$ gに減らしました。5% CO<sub>2</sub>存在下に37°Cで24時間インキュベーションしたのち、細胞を遠心分離し、RPMI培地 (0.1% FCS、1% 抗生物質-抗真菌剤) で $10^6$  cells/mlの細胞密度の細胞懸濁液を調製しました。

生理活性テルペンを8.4~2.8 $\mu$ Mの濃度範囲となるよう調製しました。2時間インキュベーションしたのち、TNF $\alpha$ を20ng/mlの濃度で添加し、さらに6時間インキュベーションしました。次いで、この細胞懸濁液を96ウェルプレートに分注しました (75 $\mu$ l/well)。各濃度のテルペン、陰性対照、陽性対照 (TNF $\alpha$ 、20ng/ml) に対し、それぞれ8つのレプリケートを作製しました。

インキュベーションしたのち、各ウェルに75 $\mu$ lのDual-Glo™ Luciferase Assay Reagentを添加し、22°Cで10分間反応させました。発光シグナルを測定したのち、75 $\mu$ lのDual-Glo™ Stop & Glo® Renilla Reagentを各ウェルに添加しました。22°Cでさらに10分間反応させたのち、発光をBerthold Orion Luminometerで測定しました (積算時間10秒)。

本稿のデータは、ウミシイタケ発光に対するホタル発光の比として表しました。いずれの実験も、3回の独立したレプリケートを1セットとして実施し、代表的なデータを示しました。各濃度についてそれぞれ8回の試験を実施しました。

### 結果および考察

新規pGL4.32(NF- $\kappa$ B) とpNF- $\kappa$ B-Lucを識別するため、これら2つのベクターについて個別に測定し、同じウミシイタケプラスミドに対して標準化しました。

試験したテルペンは予想通りTNF $\alpha$ 誘導性のNF- $\kappa$ B活性を阻害しました。新たに開発されたルシフェラーゼベクターpGL4.32(NF- $\kappa$ B) を用いた場合、より高いルシフェラーゼ発光活性誘導が容易に観察されました。実際、TNF $\alpha$ 誘導性のNF- $\kappa$ B活性は、pNF- $\kappa$ B-Lucを使用した場合には対照の49倍であったのに対し、pGL4.32(NF- $\kappa$ B)を使用した場合には227倍でした。この5倍もの高い誘導が、新規ルシフェラーゼプラスミドのすぐれた反応直線性に寄与している可能性があります。このような優れた直線性 (図1) は、生理活性化合物の50%阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) を求めるうえでStratagene社のpNF- $\kappa$ B-Luc使用時 (図1、パネルB) よりも優れた点です。したがって、この新規プラスミドを使用すれば、測定に必要な数を効果的に減らすことができます。

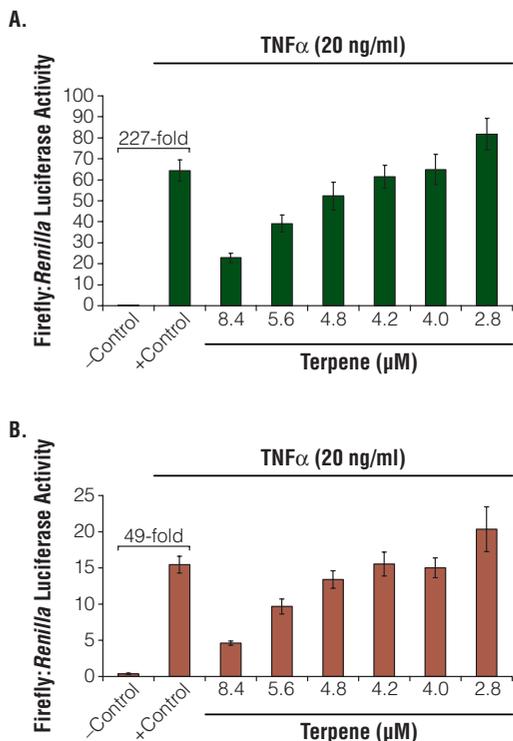


図1. 新たに開発されたルシフェラーゼベクター pGL4.32(NF-κB) (プロメガ) をトランスフェクション1回あたり5μg使用した場合 (パネルA) と、Stratagene社のpNF-κB-Lucを使用した場合 (パネルB) のトランスフェクション後のK562細胞の特性解析

どちらにも同じウミシイタケプラスミドpRhRG-TK (プロメガ) をトランスフェクション 1回あたり5μgの濃度でコトランスフェクションした。プロトコルに関しては“材料および方法”の項を参照のこと。パネルA およびBは、pGL4.32 (NF-κB) ベクター (プロメガ) により導入したホタルルシフェラーゼの方が、pNFκB-Luc (Stratagene) により導入したホタルルシフェラーゼよりも強く誘導されていることを表している。TNFα添加時の活性は、Stratagene社のベクターが対照の49倍であったのに対し、プロメガのpGL4.32(NF-κB) Vectorは対照の227倍であった。

2セットめの測定では、ルシフェラーゼプラスミドの添加量をエレクトロポレーション1回あたり5μg から2.5μgに減らしました (図2)。この実験における反応直線性の質は、ルシフェラーゼベクターの量を減らしても問題がないことを明確に表しています。これにより、ルシフェラーゼプラスミドの消費量を50%抑えることができます。

## 要約

Dual-Glo™ Luciferase Assay Systemは研究現場で頻繁に用いられており、高い効率を達成しつつサンプルのスループットを向上させるうえで迅速かつ正確な測定がますます重要になってきています。新規ルシフェラーゼレポーターベクター [pGL4.32(NF-κB)] の開発はこのような目標の実現に貢献するものであり、分子細胞生物学研究における一歩進んだ分析ツールであると考えられます。

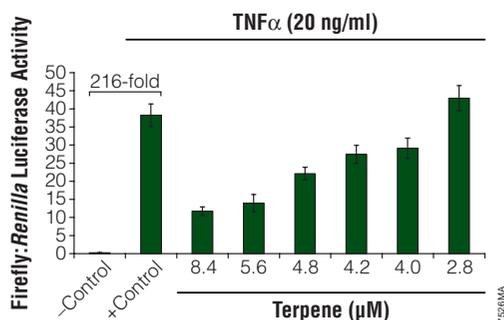


図2. エレクトロポレーションに使用するpGL4.32(NF-κB) プラスミド量を50%抑えてトランスフェクションあたり2.5μgに減らすことができる。

低濃度でも依然として相対ルシフェラーゼ活性測定値の直線性と質は進行中の分析研究に適したものであった。各測定値は3回測定した値。データは平均±SDとして示した。

## 参考文献

- Gould, S.J. and Subramani, S. (1988) *Anal. Biochem.* **175**, 5–13.
- Morceau, F. *et al.* (2004) *Biochem. Pharmacol.* **67**, 1227–38.
- Folmer, F. *et al.* (2008) *Biochem. Pharmacol.* **75**, 603–17.
- Dolcet, X. *et al.* (2005) *Virchows Arch.* **446**, 475–82.
- Coussens, L.M. and Werb, Z. (2002) *Nature* **420**, 860–7.
- Jost, P.J. and Ruland, J. (2007) *Blood* **109**, 2700–7.
- D'Incalci, M. *et al.* (2007) *Curr. Pharm. Des.* **13**, 2744–50.
- Gilmore, T.D. *et al.* (2006) *Oncogene* **25**, 6887–99.
- Blasius, R., Dicato, M. and Diederich, M. (2007) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1095**, 377–87.
- Rinehart, K. (1992) *Ciba Found Symp.* **171**, 236–54.
- Sipkema, D. *et al.* (2005) *Mar. Biotechnol.* (NY) **7**, 142–62.

## プロトコル

- ◆ Dual-Glo™ Luciferase Assay System Technical Manual, #TM058  
[www.promega.com/tbs/tm058/tm058.html](http://www.promega.com/tbs/tm058/tm058.html)

## 製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Dual-Glo™ Luciferase Assay System	10 ml	E2920	30,000
pGL4.74[hRluc/TK] Vector	20 μg	E6921	58,000
pGL4.32[luc2P/NF-κB-RE/Hygro] Vector	20 μg	E8491	58,000