

発現性・信頼性・感度がパワーアップした Synthetic *Renilla* Gene と *Renilla* Assay のご紹介

By Yao Zhuang, Ph.D., Braeden Butler, B.S., Erika Hawkins, M.S., Aileen Paguio, M.S., Laurie Orr, B.S.,
Monika G. Wood, M.S., and Keith V. Wood, Ph.D., Promega Corporation

はじめに

レポーター遺伝子テクノロジーは遺伝子発現やシグナル伝達イベントの研究やモニターにおいて強力なツールとして使われてきました(1,2)。一般的に使われているいくつかのレポーターのなかで、高感度で広範囲の直線性と簡便さを備え持つことから、ルシフェラーゼは好んで用いられています。ルシフェラーゼアッセイは異なる機器やアッセイ形式への適用が容易であることから、ラボでのルーチンの使用やハイスループットスクリーニングのアプリケーションに適するものとなっています。

ウミシイタケルシフェラーゼは、遺伝子レポーターとして、特にホタルルシフェラーゼと組み合わせたデュアルレポーター試験として近年人気が上昇しています(3)。ウミシイタケルシフェラーゼは、36kDaの単量体タンパク質で、その活性には翻訳後修飾を必要としません(4)。そのため、ホタルルシフェラーゼと同様に、この酵素は翻訳後すぐに遺伝子レポーターとして機能するものと考えられています。さらに、ウミシイタケルシフェラーゼは、細胞内の Mg^{2+} や、ATP に発光反応が依存しないことから、*in vivo* のレポーターとして優れた能力を持ちます。

ウミシイタケルシフェラーゼの酵素学的特性がレポーター試験に非常に適する一方で、その天然型の遺伝子 (*Rluc*) には内在性の限界と潜在的な問題がありました。この遺伝子はシーパンジー (*Renilla reniformis*; 5) からクローンされており、そのコドン使用は哺乳類細胞における発現に対して最適化されていません。実際、コドンの 10% は哺乳類では最も使用頻度が低いものでした。その結果、天然型遺伝子を用いると遺伝子レポーターとして最大の感度は得られない可能性があります。さらに、天然の環境では発現に都合のよい遺伝子中の転写因子結合サイトが、哺乳類のシステムで予測できない作用をもたらす可能性があります。ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子の分析により、哺乳類の転写因子結合のための多数のコンセンサス配列が存在することが明らかになりました。これらのコンセンサス配列は、哺乳類細胞において条件によっては異常な転写作用を引き起こす可能性があります。

ウミシタケルシフェラーゼレポーターの感度や信頼性を向上させるために、哺乳類細胞における発現向けに遺伝子配列の再設計を行いました。特に、使用頻度の高い哺乳類コドン的合成遺伝子に導入し、哺乳類転写因子結合サイトのほとんどを除去しました(図1)。こうして作られた合成ウミシタケルシフェラーゼ遺伝子(hRluc)は、より高い感度と信頼性を与えられ、主レポーターあるいはコントロールレポーターベクターとしての能力が一段と向上しました。新しい合成遺伝子の配列は天然型の遺伝子と大きく異なり、72%のホモロジーを残すのみです。それでもコードされたウミシタケルシフェラーゼのアミノ酸配列は実質的には変わっていません。

新しい合成ウミシタケルシフェラーゼ遺伝子は、デュアルレポーター試験用にホタルルシフェラーゼと組み合わせた場合に特に有用です。この組み合わせにより、ひとつのルシフェラーゼを他のレポーターの正確な分析に影響する可能性のある実験のばらつきを補正するための有力なツールとして使うことができます。通常、ホタルルシフェラーゼは主レポーターとして、ウミシ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。場合によっては、実験で用いられる異なるプロモーターと組み合わせられ、両方のルシフェラーゼが

主レポーターとして使用されることもあるでしょう。

プロメガは、ひとつのサンプルからホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼの両方の効率的な定量を行うDual-Luciferase® Reporter (DLR™) Assay Systemを開発しました。DLR™ Assayを行うには、まず最初のアッセイ試薬をサンプルに加え、ホタルの生物発光反応を開始します。発光の定量に続いて、2番目の試薬を添加することにより、ホタルの生物発光を止め、ウミシイタケの生物発光を開始します。両方のアッセイの反応は高感度で、酵素濃度で数桁にわたって直線性を示します。

最近、プロモカではウミシイタケの生物発光の単独での測定用に新しく *Renilla Luciferase Assay System* を販売開始しました。この新しいアッセイ試薬により、ウミシイタケルシフェラーゼの定量を最も高感度に行うことができます。

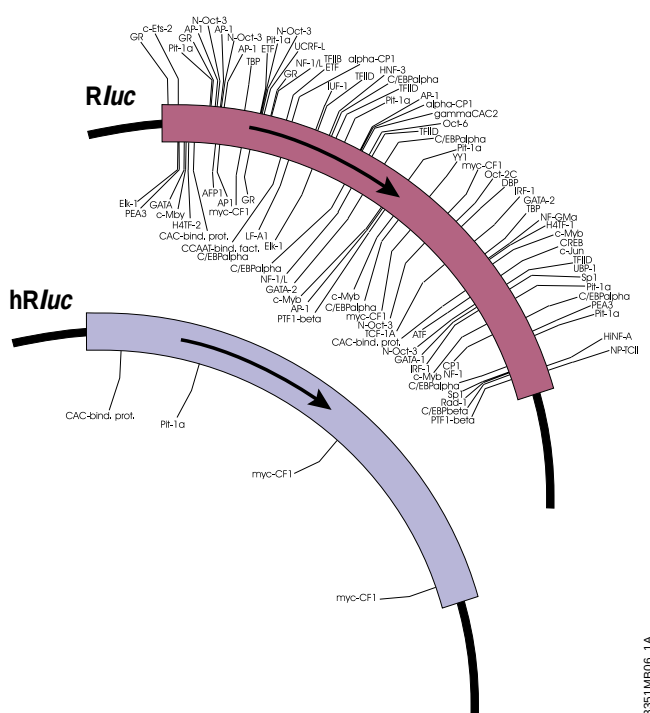


図1. 天然型ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子と合成遺伝子に存在する転写因子結合コンセンサスサイトを示した

合成ウシイタケルシフェラーゼ遺伝子 (*hRluc*) および天然型遺伝子 (*Rluc*) を、転写因子結合サイトのコンセンサス配列のおおよその位置と共に示した。天然型遺伝子に見られる半分の結合サイトは誌面の都合上省いた。

ホタルルシフェラーゼの生物発光と異なり、ウミシイタケルシフェラーゼのアッセイ条件では一般的にバックグラウンドの発光が見られます。この酵素の非存在下における発光は自家発光といわれ、ウミシイタケルシフェラーゼアッセイ感度の限界となっています。DLR™ System は、自家発光を最小限にするように調製されていましたが、あるレベルのバックグラウンドは存在しました。その結果、DLR™ System では、ホタルルシフェラーゼのほうが、ウミシイタケルシフェ

レーザーよりも約 10 倍感度が高くなっていました。しかし、新しい *Renilla Luciferase Assay System* は全く新しく調製されたバッファシステムに基づき、自家発光をほとんどなくしたものになっています。この新しいアッセイはより強い発光強度を示します。これらの特長により、卓越したアッセイ感度が得られます。他のルシフェラーゼアッセイと同様に、この新しいアッセイは迅速で数桁の酵素濃度の範囲で直線性を示します。

コントロールレポーターとしての合成ウミシイタケルシフェラーゼ

コントロールレポーターとしてのウミシイタケルシフェラーゼの性能を改善するために、プロモーターは合成ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を含む第 2 世代のベクターを開発しました。異なる研究ニーズに合わせ、様々な構造を持つ 2 つのシリーズのコントロールベクター、pHRL および pHRG が開発されました。天然型ルシフェラーゼ遺伝子を持つ従来のコントロールベクターと比較し、顕著な性能の改善を達成することができました。以下に改善点を示します。

レポーター発現量の増加：天然型遺伝子と比較し、合成ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子の発現効率が哺乳類細胞において増加したことで、レポーター感度がより高くなりました (図2)。改善の度合いは、細胞の種類、プロモーター、およびベクターの構造に依存しますが、一般的に発現は約 10 倍増加し、場合によっては、発現は数百倍まで増加しました。異なる実験条件下で最も適したプロモーターを選択できるように、新しいコントロールベクターは様々なタイプのプロモーターと共に提供されます。

異常なレポーター発現のリスクを低減：特定の実験条件によって活性化される可能性のある遺伝子中の潜在的なサイトは、遺伝子のレポーターとしての機能を損なうことがあります。合成ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子の構造は、哺乳類転写因子の潜在的結合サイトの数を最小化することによってこのようなリスクを低減させます。この効果は、プロモーター配列を欠くベクター中の合成遺伝子の発現を天然型遺伝子の発現と比較することによって確かめられます (図3)。プロモーターの非存在下で、生物学的に中性のレポーター遺伝子はほとんど発現されないと予測されます。このような発現は一般的に“バックグラウンド発現”と呼ばれます。合成ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子のバックグラウンド発現は、一般的に天然型遺伝子よりおよそ 90% 少ないという結果が示されています。このバックグラウンド発現の減少は、遺伝子配列中の潜在的サイトの影響を増強すると考えられるエンハンサー配列の存在下で特に顕著に見られます。

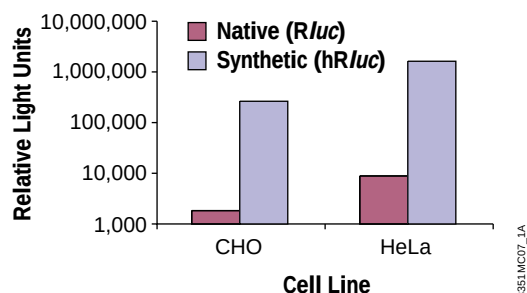


図2. 合成ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子は哺乳類細胞において天然型ルシフェラーゼ遺伝子よりも高い発現を示す

CHOおよびHeLa細胞は合成 (hRluc) または天然型 (Rluc) 遺伝子のいずれかを含む pGL3-Control Vector (SV40 プロモーターとエンハンサーを含む) をトランスフェクトされた。細胞はトランスフェクションから 24 時間後に回収され、ウミシイタケルシフェラーゼ活性は Dual-Luciferase® Reporter Assay System を用いて測定された。

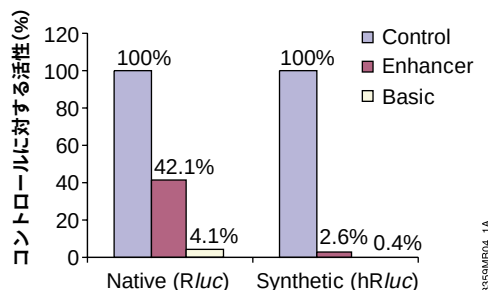


図3. 合成ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子 (hRluc) からの異常な発現の減少

合成ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子 (hRluc) および天然型遺伝子 (Rluc) を、pGL3-Basic Vector (プロモーターもエンハンサーも無し)、pGL3-Enhancer Vector (SV40エンハンサーを持つがプロモーターは持たない)、およびpGL3-Control Vector (SV40プロモーターとエンハンサーを持つ) にホタルルシフェラーゼ遺伝子と置きかえる形でクローニングした。これらのベクターをCHO細胞に重トランスフェクトし、発現レベルを対応するコントロールベクターに対するパーセントで示した。データは、バックグラウンド発現 (プロモーターの非存在下で測定できる発光) が合成レポーターでは大きく減少していることを示している。hRluc を持つ pGL3-Basic Vector のベース発現量は 90% 減少し、hRluc を持つ pGL3-Enhancer Vector からの発現は 94% 減少した。

コントロールレポーターとしての合成ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子の有用性は、異なる実験条件下で一定した発現レベルを供することからも示されました (図4)。これが明かに示されたひとつの実験条件は、MCF-7 細胞を TPA (phorbol-12-myristate-13-acetate) で処理したケースです。コントロールレポーターの発現における TPA の効果は、合成ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子が用いられた場合に大きく減少しました。ベクター選択が適切であれば、影響は本質的に取り除くことができます。予想されたように、主レポーターの TPA による誘導は大きく、コントロールレポーターの選択には影響を受けませんでした。

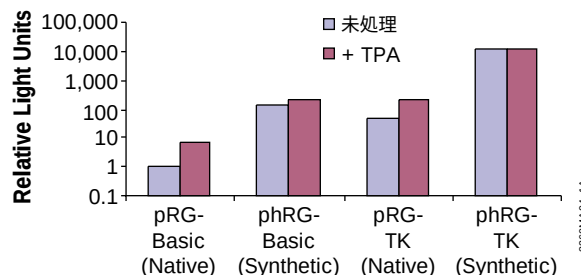


図4. Synthetic *Renilla Luciferase* Reporter Vectors はコントロールレポーターとしてより改善した信頼性を示した

(実験の詳細は PN79 をご覧ください。)

プロモータークロストークのリスクを低減：異なる発現ベクターを同じ細胞に導入した場合、ひとつのベクターのプロモーターが他のベクターの発現に影響を与える可能性があります。プロモーター間のこの相互依存は、ときとして“クロストーク”と呼ばれます。一般的に、大量の DNA や強力なプロモーターが使用された場合にクロストークは増加します。合成ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子からの発現量が大きく増加したため、少量の DNA や弱いプロモーターを用いてそのまま定量することができます。コントロールレポーターとして用いた場合、主レポーターとのクロストークのリスクを低減できます。

総じて、新しいウミシイタケルシフェラーゼベクターは、発現効率を増加し、実験に干渉するリスクを減らすことによりレポーターコントロールとして改善された性能を与えます。

コントロールレポーターベクターの選択

合成ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を含む7つの新しいレポーターベクター (図5) は、広範な実験条件に適した選択ができるように設計されました。これらのベクターを設計する上で、2 タイプのベクターバックボーンが用いられました。ひとつは phRL で、高レベルの発現を実現します。もうひとつは phRG で、バックボーンに由来するバックグラウンド発現を最小化します。特に、phRG ベクターは poly(A) 付加サイトおよびプロモーターまたはマルチブルクローニングサイトの upstream に 3 つのリーディングフレームに対応する翻訳終止コドンを含みます。さらに、phRG Vectors にはイントロンが含まれず、phRL Vectors よりも発現が低くなります。

特定のアプリケーションに最も適するコントロールベクターを決定するために、プロメガでは目的の実験の特定の条件下でベクターを試験することをお勧めいたします。コントロールベクターが主レポーターの発現にマイナスに作用するかどうか、またコントロールレポーターが実験条件によって不適切に影響を受けないかどうか注意することが重要です。もちろん、コントロールレポーターからの一般的な発現レベルも調べる必要があります。一般的にコントロールの発現は定量に信頼性を持てる最低レベルまで減少させるべきです。

phRG-TK Vector は、広範囲のアプリケーションに適します。TK プロモーターは、多くの細胞株で低レベルから中程度のレベルの発現を実現します。また、レポーター遺伝子が、異常な発現を減少させるように設計された phRG バックボーンに含まれます。このベクターは一般的に信頼性の置ける適切なレベルのレポーターを発現させます。phRG-TK Vector からの発現が不十分な場合は、phRL-TK Vector を用いると同様の長特長とより高い発現量が得られます。最も高レベルの発現には、phRL-SV40、またはphRL-CMV を試されることをお勧めいたします。これらの両方のベクターは、強いプロモーター活性のためにプロモータークロストークの問題があるかもしれないことに注意してください。さらに、これらはSV40およびCMVプロモーター中に多くの転写因子結合サイトが含まれるため実験条件に左右され易いという問題があります。特に、CMVプロモーターは、結合サイトが比較的多数存在するため、他のプロモーターとのクロストークが知られています。

コントロールレポーター発現への実験条件の影響が最も心配される場合は、phRL-null およびphRG-B Vectors が phRL-TK およびphRG-TK に対する適切な代替品となります。phRL-null Vector は、いくつかの細胞株で十分量の発現を示すことが見つかり、実験的要因による望まれない干渉を受けにくいと考えられます(6)。phRG-B Vector の発現は通常非常に低く、プロモーターなしでは不十分な場合があります。

phRL-TK(Int-) Vector は、キメリックイントロンを欠き、スプライシングやRNAの輸送を含む研究に用いることができます。カスタム化したコントロールベクターを作製するために、phRL-null およびphRG-B Vector には、実験の要求に合わせて他のプロモーターを挿入できるマルチブルクローニングサイトが含まれます。

結論

プロメガの新しいベクターは、合成ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を含み、異常な転写反応のリスクが低減され、より高い発現効率を与えます。これらの遺伝子を含むベクターは、コントロール、あるいは主レポーターのいずれの目的にも使うことができます。ホタルシフェラーゼと組み合わせて使った場合、両方のルシフェラーゼは DLR™ System を用いて効率的に定量できます。別法として、新しく開発した Renilla Luciferase Assay System を用いてウミシイタケルシフェラーゼを定量することもできます。いずれのアッセイ

方法でも数桁にわたるレポーター濃度で直線性が得られ迅速な定量を行えます。Renilla Luciferase Assay System は、発光量が改善され、バックグラウンドが低減されたため、特に高感度です。

(この記事の全文は PN79 をご覧ください。また、日本語ホームページにQ&Aのページを設けましたのでご利用ください。)

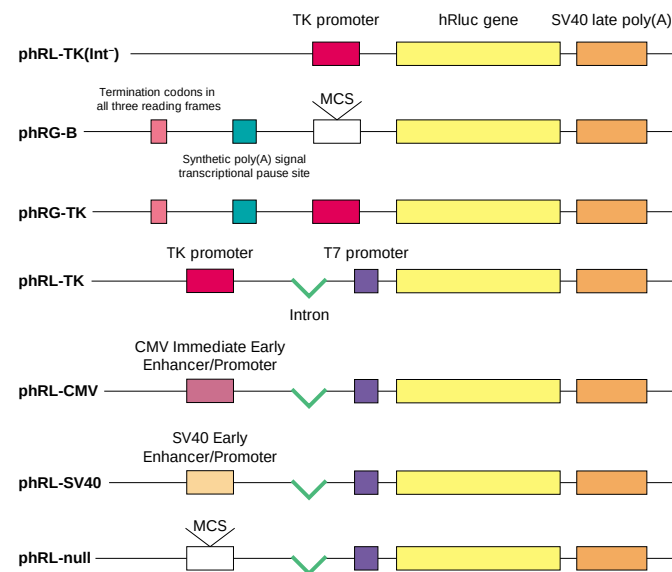


図5. 新しい合成ウミシイタケルシフェラーゼベクターは、レポータープロモーター構造の複数の選択ができる

参考文献

1. Alam, J. and Cook, J.L. (1999) *Anal. Biochem.* **188**, 245-254.
2. Naylor, L.H. (1999) *Biochem. Pharmacol.* **58**, 749-757.
3. Sherf, B.A. et al. (1996) *Promega Notes* **57**, 2-9
4. Matthews, J.C. et al. (1977) *Biochemistry* **16**, 85-91.
5. Lorenz, W.W. et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 4438-4442.
6. Behre, G. et al. (1999) *Bio Techniques* **26**, 24-26, 28.

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
Renilla Luciferase Assay System	100回分	E2810	15,000
	1000回分	E2820	80,000

Synthetic Renilla Luciferase Reporter Vectors

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
phRL-null Vector	20µg	E6231	45,000
phRL-TK Vector	20µg	E6241	45,000
phRL-TK(Int-) Vector	20µg	E6251	45,000
phRL-SV40 Vector	20µg	E6261	45,000
phRL-CMV Vector	20µg	E6271	45,000
phRG-B Vector	20µg	E6281	45,000
phRG-TK Vector	20µg	E6291	45,000