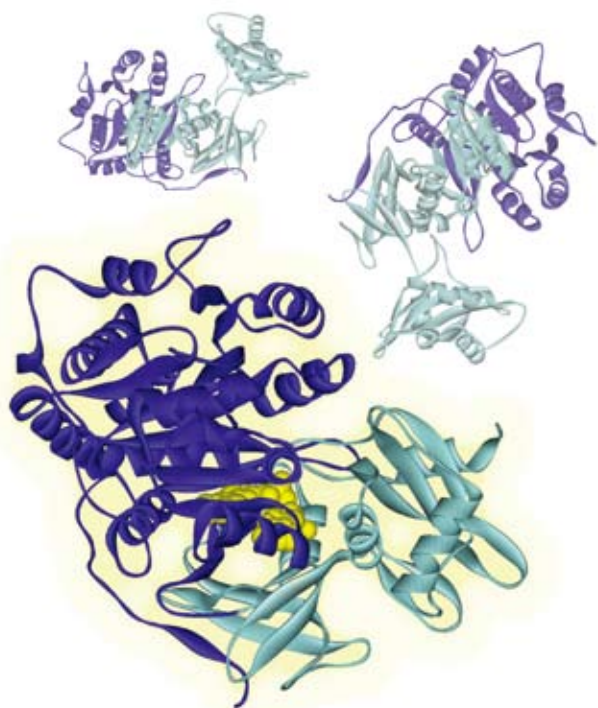


GloSensor™ テクノロジー

ルシフェラーゼを用いた新規なバイオマーカー



- GloSensor™ テクノロジー
- GloSensor™ cAMP Assay
- Protease-Glo™ Assay

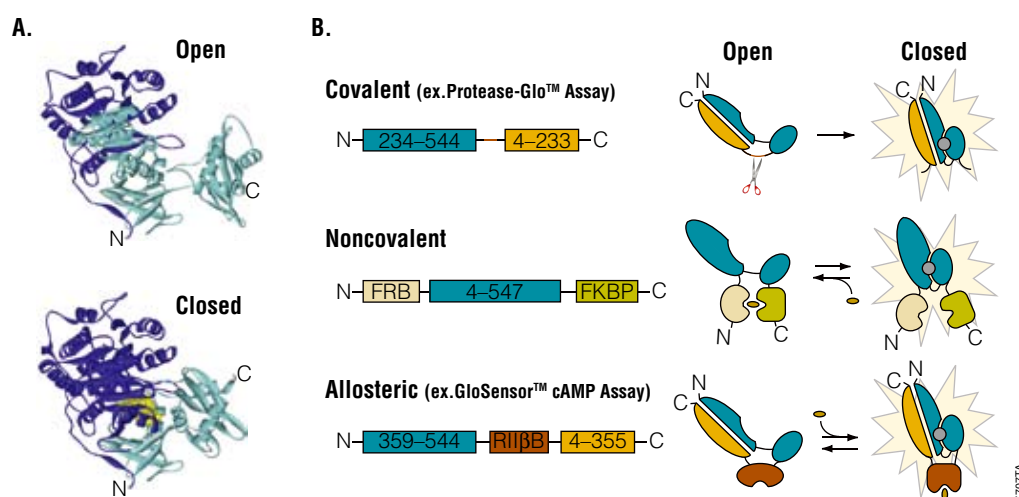
GloSensor™ Technology

感度、ダイナミックレンジに優れたルシフェラーゼ改変バイオセンサー

遺伝子改変により作成されたタンパク質バイオセンサーは、リアルタイムで細胞内の事象を観察できる優れたツールとして、GFPを利用したFRETベースの方法などが用いられています。しかし、このような蛍光法によるアプローチでは検出できる応答性が低く（最大でも2倍程度）、定量性に問題があります。

GloSensor™テクノロジーはバイオセンサーの感度、応答ダイナミクス（20倍以上の応答倍率）を向上させるためにホタルルシフェラーゼの改変により開発された新規なバイオセンサーです。

ホタルルシフェラーゼは61kDaの単量体酵素で、Mg, ATP, 酸素分子の存在下でホタルルシフェリンを酸化すると同時に光を発生させます。ルシフェラーゼの結晶構造は2つのドメインがヒンジ状の領域で繋がっており、基質が結合するとそのヒンジ部分が回転し、2つのドメインを近づけます。このヒンジ構造の変化を制限あるいは調節する戦略を採用し、新しいバイオセンサーを設計しました。



ホタルルシフェラーゼを用いたバイオセンサーの設計戦略

A. 基質非存在下でのホタルルシフェラーゼ（オープン構造）または結合状態のルシフェリル - アデニル酸反応中間体アナログとルシフェラーゼとの分子モデル（クローズド構造：アナログを黄色で示す）触媒サイクルにおいて、ルシフェラーゼのsmall C末端ドメイン（441-544 残基）はlarge N末端ドメインに向かって回転 / 転移すると予測される。オープン構造での 4-233 残基および 234-544 はそれぞれ紫および水色で示す。クローズド構造での 4-355 残基および 359-544 はそれぞれ紫および水色で示す。**B.** ルシフェラーゼバイオセンサーの作成に使用した3つの設計戦略の模式図。Covalent（共有結合による近接阻害型）：野生型のN末端とC末端をプロテアーゼ切断サイトを含むポリペプチドを挟んで接合することにより、クローズド構造への移行を阻害。Noncovalent（非共有結合による近接阻害型）：ラパマイシン存在下におけるポリペプチド FRB および FKBP12 のヘテロダイマー形成によるクローズド構造への移行を阻害。Allosteric（アロステリック型）：分析対象物が結合するドメインの構造変化により発光シグナルが調節される。例：R11βBへのcAMP結合による発光シグナルの増加。（Fan, F. *et al.* (2008) *ACS Chem. Biol.* 3, 346-51. より許可を得て転載）

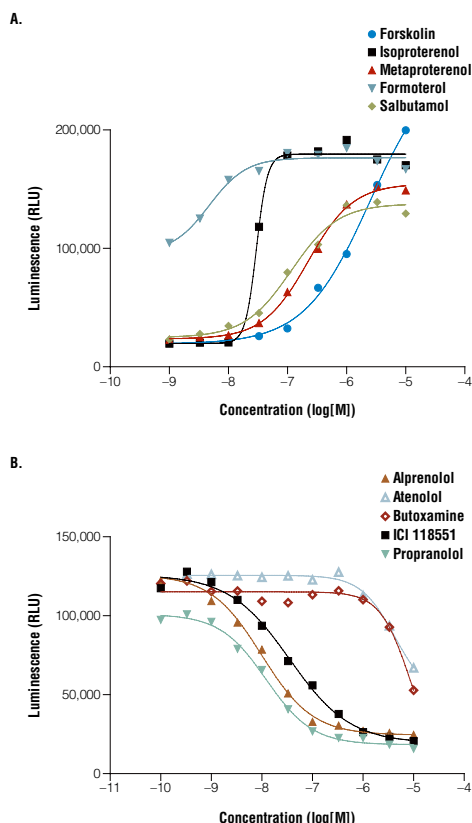
cAMP Assay (Cell-Based Assay)

GloSensor™ cAMP Assay

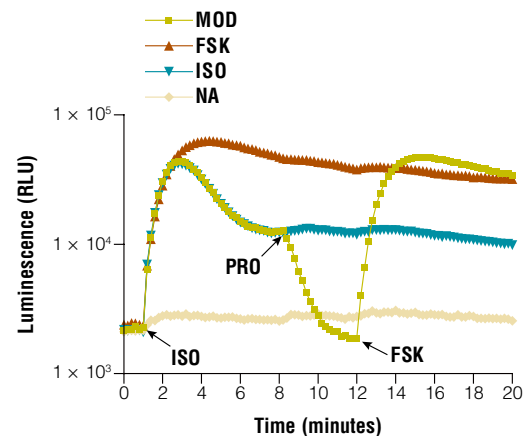
組換えルシフェラーゼ センサーによる直接的なcAMPアッセイ

GloSensor™ cAMP Assay は、GloSensor™ 技術をベースにした新しいアッセイ法で細胞内の cAMP レベルをリアルタイムに測定できる新しいアプローチを提供します。cAMP は $G\alpha_s$ および $G\alpha_i$ タンパク質を介した GPCR のシグナル伝達に關与する重要なセカンドメッセンジャーです。ホタルルシフェラーゼの内部に cAMP 結合タンパク質の一部を挿入するための遺伝子改変が施されています。cAMP が結合すると、構造が変化して発光量が増加します。この生細胞アッセイは cAMP を通じたシグナル伝達のカイネティクスやモジュレーションの研究に最適です。選択した細胞株で標的受容体およびバイオセンサーを一過性に発現させて GloSensor™ cAMP Assay を行います。また、バイオセンサーと受容体を安定に発現する細胞株を調製して実施することもできます。プロトコルはシンプルで、細胞を GloSensor™ cAMP Reagent で事前に約 2 時間平衡化します。その後、特異的なアゴニスト/アンタゴニストあるいは活性未知の化合物で処理し、10~30 分後に発光を測定します。それ以外に試薬を添加したり、手作業は不要です。

- ・ **シンプルなおアッセイ** : HTS や uHTS (例: 384 ウェル形式) に理想的な 0 ステップアッセイ
- ・ **リアルタイムの測定** : 処理後約 15 分で細胞内の cAMP レベルを検出
- ・ **より生体反応に近いデータ** : 細胞溶解を伴わない生細胞アッセイによるカイネティックなデータ取得

GloSensor™ cAMP Assay を用いた $G\alpha_s$ 共役受容体の測定

GloSensor™ cAMP HEK293 Cell Line を内在性の β 2- アドレナリン作動性受容体に対するアゴニストまたはアンタゴニストを様々な濃度で処理した。パネル A. 細胞をアゴニストで処理、パネル B. 細胞を 1 μ M メタプロテレノール存在下アンタゴニストで処理。実験は製品に添付される Technical Manual #TM076 に従い実施した。



アロステリック cAMP バイオセンサー

生細胞 (37°C) におけるシグナルのカイネティクスと可逆性。cAMP バイオセンサーを一過性に発現する HEK293 細胞を 10mM イソプロテレノール (ISO) または 10mM フォルスコリン (FSK) それぞれ単独で処理した。変調を加える細胞は、10 μ M ISO, 10 μ M プロプラノール (PRO) および 10 μ M FSK で連続的に処理した (n=3) Fan, F. et al. (2008) ACS Chem. Biol. 3, 346-51. より許可を得て転載した。

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
GloSensor™ cAMP Assay			
ベクターおよび安定発現細胞株			
pGloSensor™-20F cAMP Plasmid	20 μ g	E1171	100,000
GloSensor™ cAMP HEK293 Cell Line	2 バイアル	E1261	800,000
アッセイ試薬			
GloSensor™ cAMP Reagent	1 vial (25mg*)	E1290	50,000
	1 vial (250mg*)	E1291	230,000

プロメガ資料: www.promega.co.jp/lit/glosensor.html

* 25mg は 384 ウェル形式で 817 ウェル分

※製品購入における注意点: GloSensor™ cAMP Assay の使用は非営利組織 (大学、公的研究機関など)、営利組織にかかわらず、ライセンスプログラムの内容 (www.promega.co.jp/license/) をご確認頂く必要があります。

Protease Assay (in vitro Assay)

Protease-Glo™ Assay

任意の認識配列に対するプロテアーゼ活性を発光検出

Protease-Glo™ Assayは、発光検出により高感度、迅速にプロテアーゼ活性を検出するアッセイシステムです。本アッセイは遺伝子改変したホタルルシフェラーゼタンパク質、GloSensor™ タンパク質がベースになっており、このバイオセンサーの一部がプロテアーゼにより分解されると発光酵素として活性化します。GloSensor™ 遺伝子はpGloSensor™ 10F Linear Vectorに組み込まれており、ユニークなNheIおよびBglII 制限酵素サイトよりプロテアーゼ認識配列をコードするオリゴヌクレオチドをクローニングします。作成されたプラスミドはTNT® Systemを用いて in vitro 転写/翻訳されます。発現した標的プロテアーゼの認識サイトを有するGloSensor™ タンパク質は目的のプロテアーゼにより切断され、発光シグナルを生じます。プロテアーゼ活性は、キットに付属のBright-Glo™ Luciferase Assay を用いてプロテアーゼ+/−を比較することで決定します。

バイオセンサーの作製



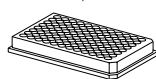
プロテアーゼ認識配列をコードする
オリゴヌクレオチドを設計

pGloSensor™-10F Linear Vector上の
GloSensor™-10F 遺伝子に
オリゴヌクレオチドをクローニング

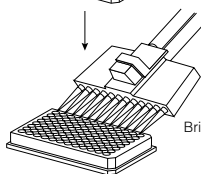


無細胞タンパク質発現系で
GloSensor™ タンパク質を合成

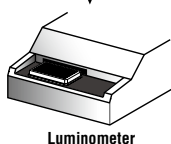
プロテアーゼアッセイ



基質である GloSensor™ タンパク質を用いた
プロテアーゼ反応 (±プロテアーゼ) を調製



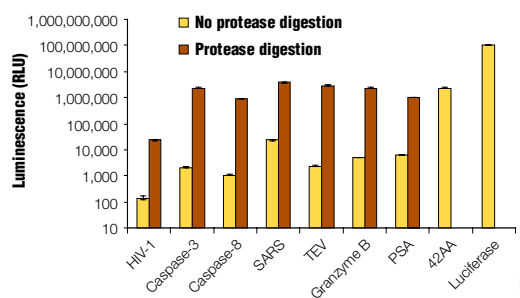
Bright-Glo™ Assay Reagent を添加



発光測定

Luminometer

Protease-Glo™ の操作概要



プロテアーゼ消化による GloSensor™ の活性化例

7 種類のプロテアーゼに対応する認識配列を組み込んだ GloSensor™ プラスミドを調製した。これらのプラスミドは TNT® SP6 High Yield Protein Expression System を用いて 25℃、2 時間 転写 / 翻訳反応を行い、no-DNA コントロールも並行して行った。反応液に対応するプロテアーゼと混和し、30℃、1-2 時間インキュベーションした後、一部を Bright-Glo™ Luciferase Assay に供した。

製品名 サイズ カタログ番号 価格 (¥)

Protease-Glo™ Assay

アッセイシステム

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
Protease-Glo™ Assay	1 キット	G9451	180,000

内容 :

- pGloSensor™-10F Linear Vector
- Oligo Annealing Buffer
- Nuclease-Free Water
- TNT® SP6 High-Yield Wheat Germ Master Mix
- Bright-Glo™ Assay Buffer
- Bright-Glo™ Luciferase Assay Substrate
- pGloSensor™-10F[TEV] Control Plasmid
- Rapid Ligation Buffer, 2X
- T4 DNA Ligase
- ProTEV Protease
- ProTEV Buffer, 20X
- DTT, 100mM
- Protocol

ベクター

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
pGloSensor™-10F Linear Vector	1.0µg	G9461	100,000

プロメガ資料 : www.promega.co.jp/lit/proteasesglo.html

※本システムで使用するオリゴヌクレオチドの設計には www.promega.com/techserv/tools/proteasesglo/ をご利用ください。アミノ酸 1 文字記号でプロテアーゼ認識配列を入力するだけで、最適なオリゴヌクレオチド配列を設計します。

※製品購入における注意点 : Protease-Glo™ Assay の使用は非営利組織 (大学、公的研究機関など)、営利組織にかかわらず、ライセンスプログラムの内容 (www.promega.co.jp/license/) をご確認ください必要があります。

日本語 Web site : www.promega.co.jp

テクニカルサービス • Tel. 03-3669-7980 / Fax. 03-3669-7982 • E-Mail : prometec@jp.promega.com

プロメガ株式会社

本 社 〒103-0011
東京都中央区日本橋大伝馬町14-15 マツモトビル
Tel. 03-3669-7981 / Fax. 03-3669-7982

大阪事務所 〒532-0011
大阪市淀川区西中島6-8-8 花原第8ビル704号室
Tel. 06-6390-7051 / Fax. 06-6390-7052

※製品の仕様、価格については2008年12月現在のものであり予告なしに変更することがあります。

販売店 :