



# A Rapid-Fire Solution

## Rapid Response™ Reporter Vectorのご紹介

By Brian D. Almond, Ph.D., Alex Zdanovsky, Ph.D., Marina Zdanovskaia, M.S., Dongping Ma, Ph.D., Pete Stecha, B.S., Aileen Paguio, M.S., Denise Garvin, M.S., and Keith Wood, Ph.D., Promega Corporation

### アブストラクト

転写活性の急速な変化に対するホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼレポーターの応答性を高めるために、我々はタンパク質またはタンパク質/mRNAの分解配列を持つ不安定型ルシフェラーゼレポーターを構築しました。これらのRapid Response™ レポーターの半減期は60%以上短縮されています。そのため、転写率の急速な変化に対して迅速でより高い度合いで応答します。その結果、レポーター発現の最大誘導率到達時間が最大75%短くなるため、2次的影響に起因するアーティファクトの発生リスクを低減すると考えられました。

各定量測定において、レポーターの寿命を0にまで低下させ、異なる転写率の集積を完全に排除することが理想的です。アッセイを行う時点の転写率のみが細胞内のレポータータンパク質の蓄積を表していることとなります。残念ながら、寿命が0であることは、同時に蓄積量も0であることを示すため、レポーターを測定することはできません。そのため寿命を短縮することで、アッセイで検出可能な量のレポーターを維持します。このような場合、感度の高い発光アッセイは有用であるといえます。他のレポーター技術に比べ、測定可能なシグナルを減少させることなく、ルシフェラーゼレポーターの細胞内での安定性を飛躍的に低下させることができます。高い感度が得られるルシフェラーゼアッセイだからこそより劇的なレポーターのダイナミズムを観察できるのです。

不安定化ルシフェラーゼレポーターをコードする Rapid Response™ Reporter Vectorにより最大誘導率に達する時間が短くなり、ポジティブとネガティブな結果の判別を容易にします。また、2次的影響のリスクを低減する可能性があります。

### 不安定化されたレポーターのデザイン

Rapid Response™レポーターを開発するにあたって、応答率、シグナルの度合いへの影響について数多くのタンパク質やmRNA分解配列を評価しました。また、これらの分解配列の最適な配置（例：N末端、C末端）についてもテストしました。PESTタンパク質分解配列(1)からなる配列と1つのmRNA分解配列（ARE）と2つのタンパク質分解配列（CL1, PEST）(2-5) から構成される配列の2つが選ばれました。2種類のレポーター分解配列構成が選べるベクターを利用できることで、研究者の研究デザインに適した応答率およびそれにともない低下するシグナル強度を選択できます。

### イントロダクション

ホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼレポーターは、その感度の高さや柔軟性、簡便性により細胞生物学や創薬アプリケーションで転写活性のモニタリングに広く利用されています。さらに、ルシフェラーゼレポーター本来の安定性が比較的低いため（タンパク質半減期約3時間）、転写の挙動は迅速に現れます。しかし、レポーターの応答性は、潜在的な転写イベントにより数時間遅れることも事実です。我々は、レポーターのパフォーマンスをさらに向上させるために、優れた発現挙動を示すRapid Response™ Reporter Vectorを開発しました。これらのベクターには、ルシフェラーゼ遺伝子にタンパク質またはタンパク質/mRNA分解配列を遺伝子上で融合させて作製した不安定化ホタルまたはウミシイタケルシフェラーゼレポーターがコードされています。分解効率が增加することにより、これらの不安定レポーターは急速な転写イベントに対して迅速に応答し、しばしばその応答の度合いも大きくなりました。

当初 マウスオルニチンデカルボキシラーゼのC末端領域から単離されたPEST(1)は、リジン(K)、アルギニン(R)、ヒスチジン(H)など正に荷電した残基に挟まれた複数のプロリン(P)、グルタミン酸(E)、セリン(S)、スレオニン(T)残基を含む40個のアミノ酸から構成されています。酵母から単離された18個のアミノ酸から成るCL1配列は、タンパク質の分解率を増加させることが示されました(2)。mRNA分解配列AREは、AU-rich repeats(ARE)から構成される *Herpesvirus saimiri* small nuclear RNAの3'非翻訳領域に由来します。AREは多くの初期応答遺伝子の3'非翻訳領域に存在し、mRNAの分解促進作用を示します(3-5)。

### 応答率の向上

レポーターの不安定化がどのようにして急速な転写イベントに対する応答性を高めたのか？レポーターアッセイを行う場合、細胞内に蓄積された総レポータータンパク質に対して測定が行われます。この蓄積は、タンパク質とmRNAの両方の安定性に規定される細胞内でのレポーター寿命に関連します。この寿命の間に転写率が変化する場合、蓄積したレポーターは異なる転写率の集積を反映しています。タンパク質寿命が長くなれば、より多くの異なる転写率の集積プールがレポーターアッセイに利用されます。この集積過程は転写ダイナミクスの変化に対する“吸収効果”があり、転写率変化の検出をより困難にします。これは、レポーターの寿命を低下させ、異なる転写効率の集積プールを減少させることにより緩和することができます。このレポーター挙動の改善により遺伝子発現のアップレギュレーションおよびダウンレギュレーションの両方を観察することができます。

発現効率を増加させるために、ルシフェラーゼレポーター遺伝子およびタンパク質分解配列のコドン哺乳動物システムでの使用に含わせて最適化しました。Rapid Response™ Reporter Vectorに存在するhRluc遺伝子は、プロメガのSynthetic *Renilla* Luciferase Reporter Vectorに認められるものと同じです。さらに、Rapid Response™レポーターの信頼性を向上させるために、ホタル、ウミシイタケルシフェラーゼレポーター遺伝子およびCL1、PESTタンパク質分解配列に存在する既知のコンセンサス転写因子結合サイトの多くを意図的に除去しました。この結果得られた改変レポーター遺伝子をhLuc+およびhRluc、タンパク質分解配列をhCL1およびhPESTとして表しました。ARE mRNA分解配列は翻訳されないため、改変操作を加えませんでした。

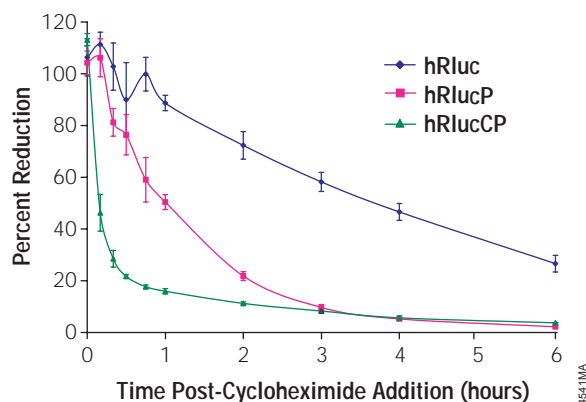


図1. ウミシイタケベースのRapid Response™ レポーターにおけるレポーター半減期の低下  
レポーターの半減期を決定するためにRapid Response™ レポーターおよびコントロール改変ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子をpGL3-Control Vector (カタログ番号E1741) にクローニングし、CHO細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション24時間後、シクロヘキシミド (終濃度100µg/ml) を各ウェルに添加した。特定の時点で細胞を回収し、Renilla Luciferase Assay System (カタログ番号E2810) で相対発光ユニットを決定した。

### 不安定化レポーターの半減期の低下

レポーターの半減期を決定するために新しいルシフェラーゼ遺伝子をpGL3-Control Vector (カタログ番号E1741) にクローニングし、CHO細胞にトランスフェクションしました。トランスフェクション24時間後、シクロヘキシミド (終濃度100µg/ml) を添加しました。特定の時点で細胞を回収し、Luciferase Assay SystemおよびRenilla Luciferase Assay Systemを用いて相対発光ユニットを決定しました。PEST分解配列が含まれることによりhRlucPの半減期は3時間から約1時間になり、半減期が>60%短縮されました。CL1, PESTおよびAREの付加は、半減期に最も大きく影響しました。hRlucCPの半減期は、80%以上短縮され0.4時間になりました (図1)。ホタルルシフェラーゼベースのRapid Response™ レポーターでも同様の結果が得られました (データ未掲載)。

### 反応までの時間が短縮し、その度合いも増加

不安定化ホタルルシフェラーゼおよび不安定化ウミシイタケルシフェラーゼをコードするそれぞれ2つのベクター、合計4つのRapid Response™ Reporter Vectorがご利用いただけます (図2)。pGL3(R2.1)- BasicおよびpGL3(R2.2)- Basic Vectorには、ホタルルシフェラーゼがコードされており、それぞれhLucP+およびhLucCP+遺伝子を含んでいます。同様に、phRG(R2.1)- BasicおよびphRG(R2.2)- Basic Vectorには、ウミシイタケルシフェラーゼがコードされており、それぞれhRlucPおよびhRlucCP遺伝子が含まれます (図2)。

レポーターの安定性を低下させたことによる最大誘導到達時間の短縮化について調べるために、複数のCRE (cAMP response element) を含むDNA断片をRapid Response™ Vectorにクローニングし、HEK293細胞にトランスフェクションしました。細胞を内在性アドレナリン受容体のアゴニスト、イソプロテレノール ハイドロクロライド (ISO) で誘導し、ルシフェラーゼ発現を測定しました。不安定化ウミシイタケレポーター (hRlucPまたはhRlucCP) の発現に対する最大誘導到達時間はhRlucコントロールに比べ短縮されていました。hRlucコントロールは8時間で最大誘導に達したのに対して、hRlucCPおよびhRlucPではそれぞれ3時間と4.5時間でした (図3, パネルA)。

不安定化ホタルルシフェラーゼレポーターの最大誘導到達時間は同様に短縮化されました。コントロールホタルルシフェラーゼ (hLuc+) の最大誘導到達時間が6時間であったのに対し、不安定化レポーター (hLucCP+およびhLucP+) の最大誘導時間はそれぞれ1.5および3時間でした (図3, パネルB)。

最大誘導到達時間の短縮に加え、不安定化レポーターにより、反応の度合いも増加しました。ウミシイタケベースのRapid Response™ レポーターでは反応性の度合いを67%以上増加させました (図3, パネルA)。ホタルベースのRapid Response™ レポーター (hLucP+およびhLucCP+) では102%以上増加させました (図3, パネルB)。

#### Increased Protein Degradation

Vector	Reporter Gene	Gene Design
phRG(R2.1)-Basic	<i>hRlucP</i>	Renilla Luciferase   hPEST
pGL3(R2.1)-Basic	<i>hLucP+</i>	Firefly Luciferase   hPEST

#### Increased Protein and mRNA Degradation

Vector	Reporter Gene	Gene Design
phRG(R2.2)-Basic	<i>hRlucCP</i>	Renilla Luciferase   hCL1   hPEST   ARE
pGL3(R2.2)-Basic	<i>hLucCP+</i>	Firefly Luciferase   hCL1   hPEST   ARE

図2. Rapid Response™ レポーター遺伝子の構成

Rapid Response™ レポーターは不安定化されているため、レポーターアッセイにおける光の強度は減少します(図4)。この低下は、使用する細胞株や不安定化レポーター、トランスフェクションされた細胞がステイブルまたはトランジェントの違いによっても変動します。ステイブルに発現する細胞株の場合、単離された最も明るい細胞(細胞あたりで最大の相対発光ユニットを示すもの)のいくつかはRapid Response™ レポーターを発現するものでした(データ未掲載)。他の不安定化されたレポーターでも同様の結果が観察されています(6, 7)。光強度の低下が顕著であるかどうか、アッセイ感度の点からも評価する必要があります。ホタルおよびウミシイタケの発光アッセイでは非常に低いバックグラウンドシグナルしか生じないので、通常ほとんどの実験条件でRapid Response™ レポーターの感度は充分です。

## 薬理学的結果との合致

Rapid Response™ レポーターの反応が、生理的条件下で用いた場合の非不安定化型レポーターと同様であることを示すために、CRE、neo および *hLuc+*、*hLucP+*、*hLucCP+* のいずれかを含むベクターをHEK293細胞にトランスフェクションしました。ネオマイシンにより選別した後、ルシフェラーゼを安定に発現するクローンを単離しました。ISOの濃度を上げながら細胞をインキュベーションし、ISO添加後2、4、6時間後にルシフェラーゼ活性についてテストしました(図5)。*hLucP+* および *hLucCP+* の最も早い時点(2時間)のデータは、*hLuc+* の6時間の時点のデータと非常に類似していました。ISOの用量反応曲線の類似性は、細胞による同様の薬理学的反応を示していました。

ルシフェラーゼレポーターの不安定化により、我々は最大誘導到達時間を短縮化し、ホジティブとネガティブの結果における判別能力を向上させ、2次的影響によるリスクを低減しました。今までのところ、この実験では転写率と細胞内生理イベントとの間の相互作用は不変性を維持していました。

## 結論

Rapid Response™ レポーター技術は、タンパク質またはタンパク質/mRNA分解配列の付加により不安定化されたホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼレポーターにより構成されています。これらの不安定化レポーターは、転写率の変化に対する応答性が早くなると共にその度合いも大きくなります。Rapid Response™ レポーターの急速な応答率は、一過性の細胞内イベントとそれに対する応答との連動性を高め、実験結果に干渉する2次のイベントに関するリスクを低減します。急速な応答率は、スクリーニングアプリケーションにおけるアッセイのスループットを増加させることができます。これらの改良はレポーター発現と連動する生理的条件に影響を与えません。

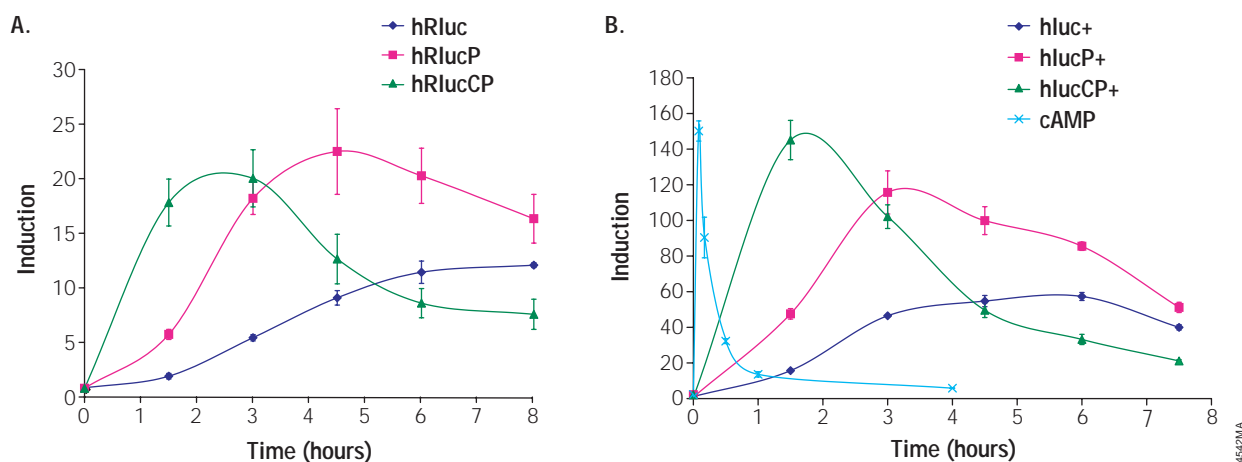


図3. Rapid Response™ レポーターの最大誘導到達時間

最大誘導を決定するために複数のCRE (cAMP Response Element) を含むDNA断片を4種類のRapid Response™ Reporter Vectorおよび*hLuc+*または*hRluc*レポーター遺伝子を含むpGL3-Basic Vector (カタログ番号E1751) にクローニングした。CREを含むこれらのベクターをHEK293細胞へトランジェントにトランスフェクションした。24時間後、レポーター遺伝子を発現させるためにトランスフェクションした細胞を100μM RO (RO-20-1724) および1μM ISO (イソプロテノールハイドロクロライド) で処理した。RO (100μM) のみを加えたウェルのサブセットを非誘導コントロールとした。細胞を回収、溶解し、以下のようにアッセイした。パネルA. ウミシイタケベースのレポーターを含む細胞は、ルシフェラーゼ活性測定のために*Renilla* Luciferase Assay System (カタログ番号E2810) を用いた。パネルB. ホタルベースのルシフェラーゼレポーターを含む細胞は、ルシフェラーゼ活性測定のためにLuciferase Assay System (カタログ番号E1500) を用いた。また、cAMPを分析するためにCorrelate-EIA Directed cyclic AMP assay (Assay Designs, Inc) を利用した。すべてのケースで、誘導したウェルから得た相対発光ユニットの値を非誘導ウェルからの値で割ったものを誘導倍率として算出した。

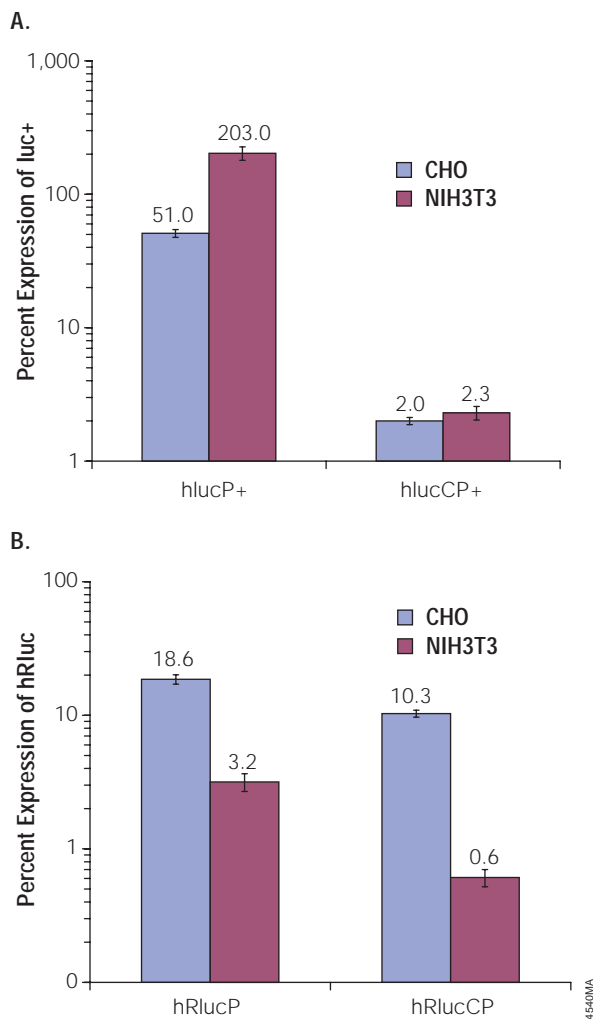


図4. CHOおよびNIH3T3細胞におけるRapid Response™ レポーターの発現  
pGL3-Control Vector (カタログ番号E1741) に存在する luc+ 遺伝子は、hLucP+, hLucCP+, hRluc, hRlucP, hRlucCPのいずれかのレポーター遺伝子で置換した。作製されたベクターおよびpGL3-Control Vectorはそれぞれ第2のレポーター (トランスフェクションコントロール) とともにCHOおよびNIH3T3細胞にコトランスフェクションした。パネルAおよびBで使用されたトランスフェクションコントロールはそれぞれphRL-TK (カタログ番号E6241) とpGL3-Control (カタログ番号E1741) Vector。トランスフェクション24時間後、Passive Lysis Buffer (カタログ番号E1941) を用いて細胞を採取し、Dual-Luciferase® Assay System (カタログ番号E1910) を用いて相対発光ユニットを決定した。相対発光ユニットはトランスフェクションコントロールで補正した。ルシフェラーゼ酵素の蓄積に対する不安定化配列の影響は、コントロールに対する%として示した。パネルA: CHOおよびNIH3T3細胞にトランスフェクションした luc+ (pGL3-Control Vector) に対する hLucP+ または hLucCP+ の発現%。パネルB: CHOおよびNIH3T3細胞にトランスフェクションした hRluc に対する hRlucP または hRlucCP の発現%。

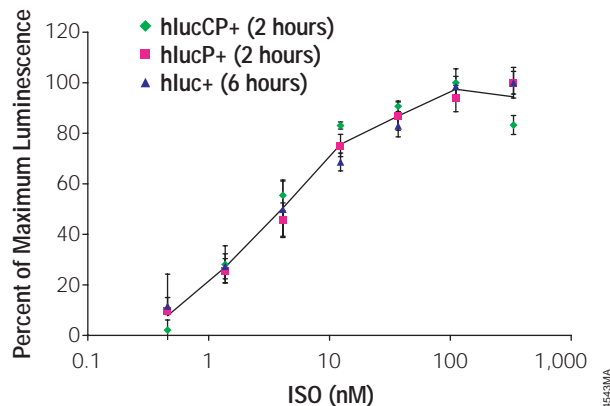


図5. Rapid Response™ レポーターの薬理的作動薬のプロファイル  
CRE, neoおよびhLuc+, hLucP+, hLucCP+ のいずれかを含むベクターを用いてステイブルに発現するHEK293細胞を作製した。96ウェルプレートに細胞を播種し、様々な濃度のイソプロテノールハイドロクロライド (ISO) で2, 4, 6時間インキュベーションした。コントロール用のウェルは未処理。インキュベーション後、Bright-Glo™ Luciferase Assay System (カタログ番号E2610) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。3つのデータセットの平均値を直線で結んだ。

#### 参考文献

- Rogers, S., Wells, R. and Rechsteiner, M. (1986) *Science* **234**, 364–8.
- Gilon, T., Chomsky, O. and Kulka, R.G. (1998) *EMBO J* **17**, 255–68.
- Fan, X.C., Myer, V.E. and Steitz, J.A. (1997) *Genes Dev.* **11**, 2557–68.
- Lagnado, C.A., Brown, C.Y. and Goodall, G.J. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 7984–95.
- Zubiaga, A.M., Belagco, J.G. and Greenberg, M.E. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 2219–30.
- Corish, P. and Tyler-Smith, C. (1999) *Protein Engineering* **12**, 1035–40.
- Li, X. *et al.* (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 34970–5.

#### プロトコル

- ◆ *Rapid Response™ Reporter Vectors Technical Manual #TM242*, Promega Corporation. ([www.promega.com/tbs/tm242/tm242.html](http://www.promega.com/tbs/tm242/tm242.html))

#### 製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格( ¥ )
pGL3(R2.1)-Basic Vector	20µg	E6431	48,000
pGL3(R2.2)-Basic Vector	20µg	E6441	48,000
phRG(R2.1)-Basic Vector	20µg	E6451	48,000
phRG(R2.2)-Basic Vector	20µg	E6461	48,000