

2016年夏号

Promega

KAWARABAN

かわらばん

プロメガは
発光テクノロジーで
創薬、がん研究を
サポートします。

二頁、免疫子エックポイントをレポーターで
定量 PD-1/PD-L1

三頁、グルコースの取込みとエネルギー代謝

四頁、エビジエネティクス酵素の発光アッセイ

五頁、NanoLuc[®] について...
より高感度なレポーターアッセイ

六頁、実験をすすめるための Rentamax 活用術

七頁、細胞内タンパク質相互作用の高感度バイオセンサー
FRET & BRET の活用
高感度検出装置 GloMax[®] Discover System

免疫チェックポイントをレポーターで定量 PD-1/PD-L1

抗体医薬に代表されるバイオ医薬品の研究開発が加速しています。このセクションでは、抗体医薬の研究・評価試験のうち従来法の問題を新たな技術で克服したアッセイや、従来法では対応できなかった新しいニーズに応えるアッセイをシリーズでご紹介していきます。

バイオ医薬プロジェクト第二回目は今一番ホットなターゲットの一つ、抗 PD-1/PD-L1 抗体の新しい評価法とその他の免疫チェックポイントアッセイを取り上げます。

PD-1/PD-L1 経路はもともと正常組織を免疫反応から保護するためのチェックポイントの一つであり、過剰な T 細胞活性化をコントロールする経路です。T 細胞に発現している PD-1 と、抗原提示細胞の PD-L1 が結合すると T 細胞は抑制され、活発な免疫反応が妨げられます。がん細胞はこの経路を利用し、自ら PD-L1 を発現することにより T 細胞の攻撃から逃れています。従って中和抗体などにより PD-1/PD-L1 経路をブロックすれば、がん細胞近辺の T 細胞が活性化されてがんを攻撃・除去することができるのです。

このメカニズムに基づき、抗 PD-1/PD-L1 ブロック抗体はこれまで①抗体結合アッセイ、②プライマリー T 細胞活性化アッセイ(細胞増殖、サイトカイン放出、細胞表面マーカー検出)、などの方法で評価されてきました。しかし①の抗体結合アッセイは機能アッセイではないという問題があり、また②の T 細胞活性化アッセイはプライマリー T 細胞を使うためアッセイが煩雑で結果のバラつきが大きく、スクリーニングや安定した抗体評価に使えないという問題がありました。

この問題を克服するため、プロメガではレポーターアッセイを応用した PD-1/PD-L1 Blockade Bioassay を開発しました。PD-1/PD-L1 経路による T 細胞活性化抑制機構は、主に NFAT シグナル経路の抑制を介したメカニズムであることが分かっていたため、NFAT シグナル経路をレポーター検出するアッセイを構築しました。T 細胞の代わりに NFAT レポーターと PD-1 タンパク質を発現する Jurkat 細胞を使用し、抗原提示細胞 (artificial antigen presenting cells, aAPC) として PD-L1 を発現させた CHO-K1 細胞を使用することで、プライマリー細胞を調製する煩雑さや結果の不安定さを克服しています (図 1)。

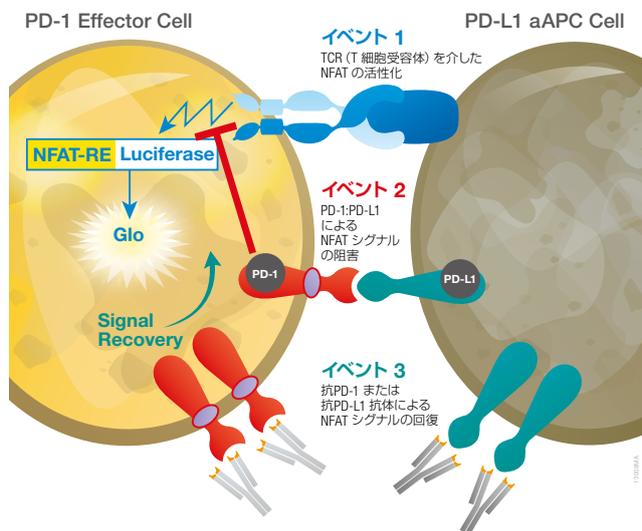


図 1. 免疫チェックポイント遮断アッセイの概要

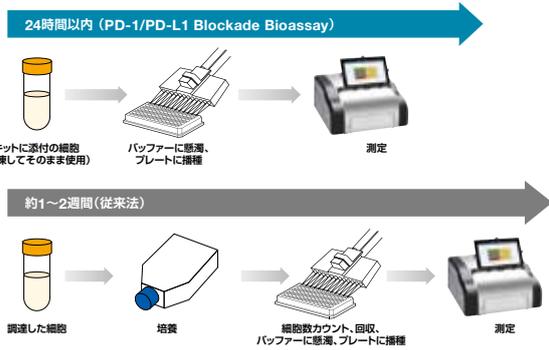


図 2. 従来 1-2 週間かかっていたプロトコルが大幅に簡便化され、早ければ 1 日で結果が出る

また ADCC Reporter Bioassay 開発などで培ったノウハウをもとに細胞培養が不要な Thaw-and-Use フォーマットを採用し、より簡便かつ安定なアッセイプロトコルにしました。これにより従来はプライマリー T 細胞の調製から 1 週間以上かかっていたアッセイを、たった 1 日半で終わることができます (図 2)。また HTS にも適したフォーマットであるため、抗体のほかにも PD-1/PD-L1 をブロックするペプチドや化合物のスクリーニングも容易に実施できます (図 3)。

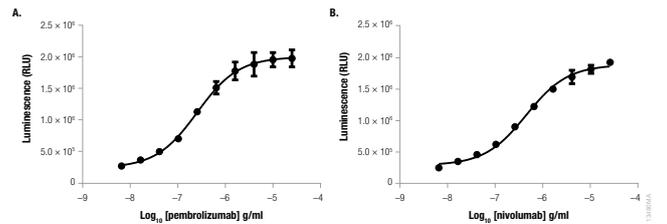


図 3. 抗 PD-1 抗体医薬品での力価測定

PD-L1 aAPC/CHO-K1 細胞を播種し、16-20 時間インキュベーションした。PD-1 エフェクター細胞とペンブロリズマブ (パネル A) またはニボルマブ (パネル B) の濃度を変えて添加し、37°C で 6 時間インキュベーションした後、Bio-Glo™ Reagent を加え、GloMax® Discover System を用いて測光した。データは GraphPad Prism® Software を用いて 4PL curve にフィッティングさせた。EC₅₀ 値はそれぞれ 0.25 μg/ml (ペンブロリズマブ; パネル A) および 0.44 μg/ml (ニボルマブ; パネル B)。データは thaw-and-use の細胞を用いて取得した。

プロメガではこの他にも T 細胞活性化をベースとした免疫チェックポイントアッセイを多数開発しています。もう一つの PD-1 リガンドである PD-L2 のアッセイをはじめ、CTLA-4、TIGIT/CD155 などの Co-inhibitory アッセイ、GITR、CD40、4-1BB、OX40 などの Co-stimulatory アッセイが開発済みであり、今後も新たなターゲットや既存ターゲットのコンビネーションアッセイを開発していく予定です。

ここでご紹介した免疫チェックポイントアッセイ以外にも、プロメガでは抗体医薬品開発をサポートする画期的な製品を次々に開発しています。次回の記事をお楽しみに!

抗体をズバッと断片化! IdeS、IdeZ

抗体の構造解析を行っている方、抗体を効率よく切断できる IdeS や IdeZ プロテアーゼはご存知ですか?

抗体はサイズが大きいためそのままの解析が難しい反面、トリプシンなどの消化に耐性があり、分析者を困らせてきました。お困りの方、ぜひ一度 IdeS や IdeZ をお試しください。IdeS はトリプシンやペプシンと異なり、抗体の特定部位を高効率で切断する酵素です (図 4)。IdeZ は IdeS では切断できなかったマウス IgG2a や IgG3 も切断できる改良型で、さらに汎用性を高めた製品です。

品質管理試験では ADCC、ADCP アッセイで測定できる抗体力価と並んで、抗体の物性解析も重要です。IdeS、IdeZ で物性解析もワンランクアップさせましょう。

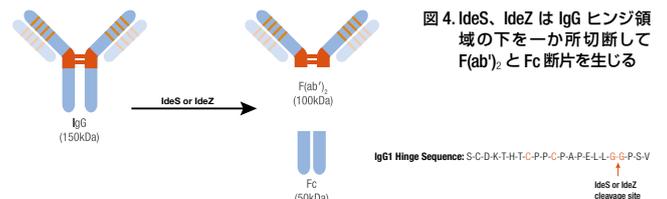


図 4. IdeS、IdeZ は IgG ヒンジ領域の下を一か所切断して F(ab)₂ と Fc 断片を生じる

関連製品

	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
免疫チェックポイントアッセイ			
PD-1/PD-L1 Blockade Bioassay	1 kit	J1250	151,000
	5 kit	J1255	680,000
抗体断片化			
	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
IdeZ Protease, Frozen	2000 u	V8342	86,000
IdeS Protease, Frozen	2000 u	V7512	81,000

Ⓜ キャンペーン対象製品: 詳細については 8 ページをご覧ください。

グルコースの取込みとエネルギー代謝

糖尿病やがんなどの種々の疾患において、細胞内の代謝経路が大きく変化していることが明らかになっており、疾患特異的な代謝経路が有用な治療標的となりうると考えられています。プロメガでは細胞内の様々なシグナル経路やシグナル因子を測定する技術を提供しており、このセクションでは新たに登場した代謝経路を標的としたアッセイシステムを紹介いたします。

発光テクノロジーによるグルコース取り込み活性評価

生体を構成する細胞において、グルコースは主要なエネルギー源の1つです。これまで放射性標識、蛍光または吸光により取り込み活性の測定が行われてきましたが、従来法では感度やバックグラウンドなどに問題がありました。これらの問題点を改善すべく、プロメガでは発光での測定アッセイ **Glucose Uptake-Glo™ Assay** を開発しました。従来法と同じく、蓄積された 2-デオキシグルコース-6-リン酸 (2DG6P) を発光シグナルに変換することでグルコースの取り込み能を評価します。さらにプロトコルも見直し、**細胞の洗浄がほぼ不要の Add to Measure プロトコル**により、**簡便な測定が可能**になりました (図 1)。

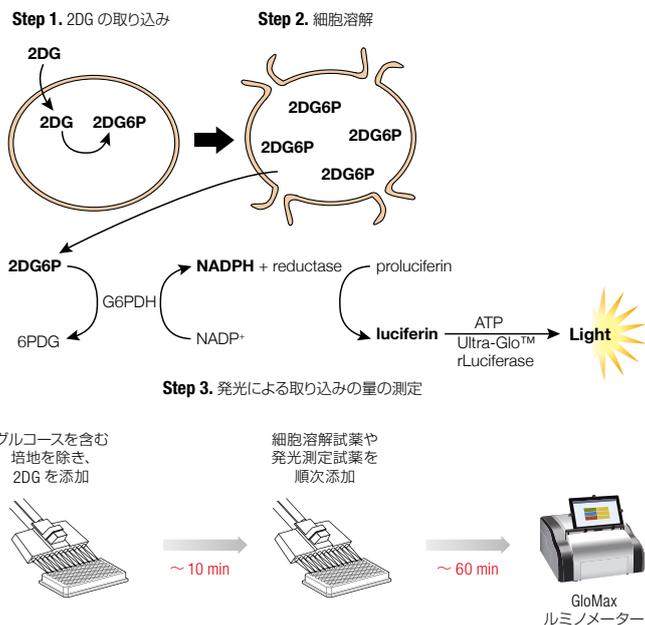


図 1. Glucose Uptake-Glo™ アッセイの概要と手順

グルコース類似体 2-デオキシグルコース (2-DG) を細胞に取り込ませ、グルコースの取り込み量を発光シグナルに変換して評価する (上図)。プロトコルが大幅に簡便化され、約 70 分で測定結果が取得可能 (下図)

発光テクノロジーの代謝アッセイへの応用

Glucose Uptake-Glo™ Assay で培った技術をさらに他の代謝産物や栄養成分の測定アッセイに応用しました。これまでに乳酸、グルタミン、グルタミン酸などを発光シグナルに変換して測定することに成功しています (図 2)。この技術を活用した例として、図 3 に代謝経路の変化を観察した結果を示しました。細胞では酸素が欠乏するとミトコンドリアでの代謝反応に進まず、解糖系が働きます。乳酸は解糖系の最終生成物であり、分泌された乳酸は解糖系の活性化の指標となります。2つの乳がん細胞株を低酸素条件下で培養したところ、MCF7 細胞では低酸素条件下において乳酸の分泌量が増加している結果が得られ、解糖系への代謝経路の変化が観察されました。一方で、MDA-MB-231 細胞は低酸素誘導因子 HIF1 が高発現しており、恒常的に解糖系が亢進しているため、代謝経路の変化は観察されませんでした。

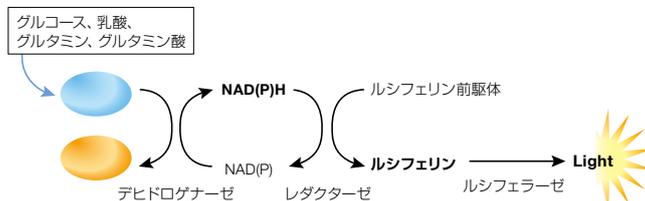


図 2. プロメガの代謝アッセイの測定プラットフォーム

代謝産物や栄養成分に対する特異的デヒドロゲナーゼとレダクターゼを用いた方法により、代謝産物・栄養成分を発光シグナルに変換して測定。

MDA-MB-231 細胞のように、がん細胞では正常細胞と比較し、種々の代謝経路に異常がみられることが明らかになっており、有用な治療標的の1つとして捉えられています。プロメガのシンプルな発光測定法は**バラつきも最小限に抑えられており**、疾患特異的な代謝経路を標的とした化合物の**ハイスループットスクリーニングにも最適**です。

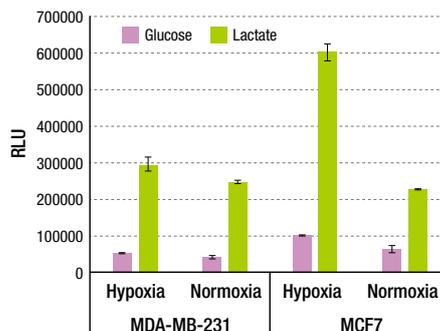


図 3. 発光テクノロジーを用いた代謝シフトの解析

乳がん細胞株 MDA-MB-231 細胞と MCF7 細胞を通常酸素分圧下 (約 20% O₂) および低酸素条件下 (3% O₂) でそれぞれ培養し、細胞内グルコース量と分泌された乳酸量を比較した。MCF7 細胞では低酸素条件下で培養することにより、乳酸の産生量が亢進し、解糖系への代謝シフトが観察された。一方で、MDA-MB-231 細胞では代謝経路の変化は観察されていない。

キーポイント

- ✓ **高感度** ⇒ 従来法の蛍光や吸光よりも高感度。RI 法とも同等の感度。
- ✓ **RI 不要! スムーズな測定プロトコル** ⇒ 細胞の洗浄がほぼ不要。Add to Measure の簡単プロトコル
- ✓ **マルチアッセイへの応用** ⇒ 同一ウェル内で細胞生存性試験が実施可能

最後に

ここで紹介した Glucose Uptake-Glo™ Assay の他にもプロメガでは、代謝経路を標的とした薬剤の評価・創薬をサポートする製品を開発中です。また、同一細胞サンプルを用いたマルチプレックス解析が可能な組み合わせを多数構築しています。例えば、細胞内の ATP により生細胞を測定する CellTiter-Glo® や還元能から生細胞を測定する RealTime-Glo™ とのマルチプレックス解析を行っており、1枚のプレートからルミノメーターだけで、代謝産物や栄養成分の測定アッセイと生細胞アッセイが実施可能になっています。詳細については弊社 Web サイトを参照いただくか直接お問い合わせください。

関連製品

	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
グルコースの取込み量測定			
Glucose Uptake-Glo™ Assay	5 ml	J1341	63,000
	10 ml	J1342	110,000
	50 ml	J1343	440,000
CellTiter-Glo® 2.0 Assay	10 ml	G9241	15,000
	100 ml	G9242	59,000
RealTime-Glo™ MT Cell Viability, 100	100 回分	G9711	20,000
	10 × 100 回分	G9712	97,000

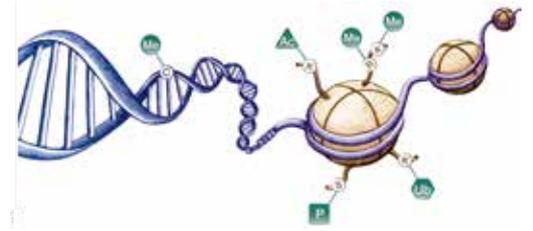
⑤ **キャンペーン対象製品**：詳細については 8 ページをご覧ください。

⑥ **プロメガクラブ対象製品**です。詳細については 8 ページをご覧ください。

アッセイキット	測定用途	カタログ番号
Glucose Detection assay	細胞内グルコース量の測定	お問合せ下さい
Lactate Detection assay	細胞内乳酸量の測定	お問合せ下さい
Glutamate Detection assay	細胞内グルタミン酸量の測定	お問合せ下さい
Glutamine Detection assa	細胞内グルタミン量の測定	お問合せ下さい

エピジェネティクス酵素の発光アッセイ

ゲノム解読完了後の重要なテーマとして急速に発展したエピジェネティクス研究により、がんを始めとする多くの疾患にエピジェネティクス異常が関与していることが分かってきました。現在ではエピジェネティック制御の関連分子は重要な創薬ターゲットとして注目を集めており、ヒストンアセチル化制御にかかわるヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤をはじめ、ヒストンメチル化・脱メチル化酵素やそれらの制御因子をコントロールする薬剤の開発が急ピッチで進められています。ここではエピジェネティック制御タンパク質のうち、メチル化・アセチル化関連の酵素アッセイをご紹介します。



ヒストンアセチル化・脱アセチル化酵素アッセイ

2006年にポリノスタット (SAHA) が最初のヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤として米国で承認されたのを皮切りに、ヒストンアセチル化制御酵素をターゲットとした創薬ブームが起こりました。脱アセチル化を担う HDAC はヒトでは 11 種類が報告されており、Class I (1, 2, 3, 8)、Class II (4, 5, 6, 7, 9, 10)、Class IV (11) に分類されています。ポリノスタットは汎 HDAC 阻害剤であるため、次世代 HDAC 阻害剤としてより選択性の高い化合物の探索が続けられています。

プロメガが提供する HDAC-Glo™ Assay (図 1) はこのような阻害剤探索にぴったりのアッセイです。

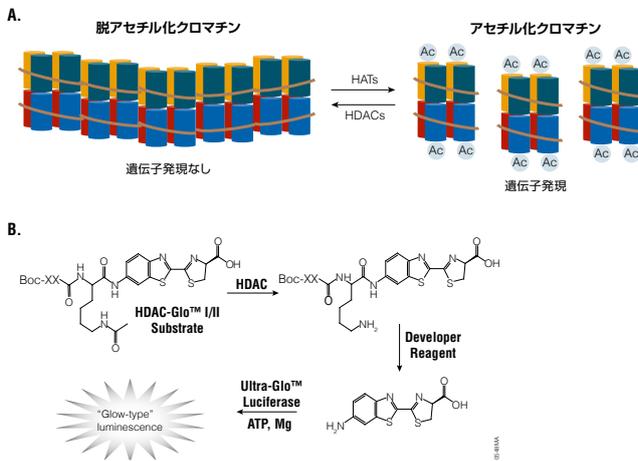


図 1. HDAC と測定原理
パネル A. HDAC およびヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT)。パネル B. HDAC-Glo™ I/II Assay の反応は 1 種類の試薬の添加により起こる。

DNA、ヒストンメチル化・脱メチル化酵素アッセイ

今ホットなターゲットは何と言っても DNA やヒストンのメチル化・脱メチル化酵素です。主にタンパク質を修飾するアセチル化と異なり、メチル化はタンパク質だけでなく DNA も制御します。必然的に酵素の数も多く、新しい酵素の阻害剤やより選択性の高い阻害剤を求めて各国の製薬メーカーや研究所が新薬開発にしのぎを削っています。

このニーズに応え、プロメガはこの 4 月にメチル化酵素アッセイ **MTase-Glo™ Methyltransferase Assay** を発売しました。メチル化酵素は数が多いものの、反応機序は DNA・タンパク質メチル化酵素で共通しており、いずれも代謝産物として S-アデノシルホモシステイン (SAH) を産生します。MTase-Glo™ は SAH を測定することによりすべてのメチル化酵素活性を測定することができます (図 2)。

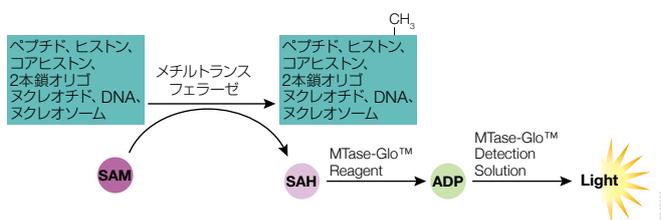


図 2. MTase-Glo™ アッセイ原理

メチル化酵素と合わせて脱メチル化酵素も重要です。

プロメガでは、2 種類のヒストン脱メチル化酵素のうち、Jumonji C-domain を含む脱メチル化酵素 (JHDM) の活性測定に使用できる Succinate-Glo™ を開発しました (図 3)。JHDM は代謝産物としてコハク酸 (Succinate) を産生することを利用し、コハク酸定量によって JHDM 活性を測定するアッセイです。



図 3. Succinate-Glo™ アッセイ原理

ここでは酵素アッセイに焦点を当てましたが、他の分野と同様エピジェネティクス研究でも生細胞で解析できるライブセルアッセイが求められています。特に多様な制御タンパク質や DNA の相互作用は生細胞で解析することが重要であり、プロメガは生細胞解析の強力なツールも開発しています。こちらは紙面を改めてご紹介する予定です。お楽しみに！

MTase-Glo™ アッセイ論文

Methyltransferase-Glo: a universal, bioluminescent and homogenous assay for monitoring all classes of methyltransferases

Epigenomics (2016) 8(3), 321–339.

<http://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/epi.15.113>

Characterization of the histone methyltransferase PRDM9 using biochemical, biophysical and chemical biology techniques

Biochem. J., Jul 2014; 461: 323 - 334.

<http://www.biochemj.org/content/461/2/323>

Quantitative profiling of the activity of protein lysine methyltransferase SMYD2 using SILAC-based proteomics

Mol. Cell. Proteomics, Mar 2016; 15: 892 - 905.

<http://www.mcponline.org/content/early/2016/01/10/mcp.M115.053280.abstract>

関連製品

	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
メチル化酵素測定			
MTase-Glo™ Methyltransferase Assay	400 回分	V7601	85,000
	2000 回分	V7602	320,000
脱アセチル化酵素測定			
HDAC-Glo™ I/II Assay	10 ml	G6420	77,000
HDAC-Glo™ Class IIa Assay	10 ml	G9560	77,000
HDAC-Glo™ 2 Assay	10 ml	G9590	77,000
脱メチル化酵素測定			
Succinate-Glo™	お問い合わせ下さい		
バイサルファイト処理 & 精製			
MethylEdge™ Bisulfite Conversion System	50 回分	N1301	40,000

Ⓢ キャンペーン対象製品：詳細については 8 ページをご覧ください。

Ⓜ プロメガクラブ対象製品です。詳細については 8 ページをご覧ください。

NanoLuc[®] ってすごい! : より高感度なレポーターアッセイ

レポーターアッセイのニーズは、実験対象の広がりに伴い、より高感度、より簡便な系が求められています。近年は希少なプライマリー細胞や iPS 細胞での検出での使用例が多くなり、より高感度なアッセイシステムが必要とされています。プロメガはタンパク間相互作用 (PPI) 等のタンパクレベルでの解析を目的とした **Protein Reporter** と、遺伝子発現解析を目的とした **Genetic Reporter** の 2 つのレポーターシステムをご用意しております。今回は **Protein Reporter** として、PPI 解析システムである NanoBRET[™]、NanoBIT[®] をご紹介しました。今回は特に **Genetic Reporter** について、新しく開発した Nano-Glo[®] Dual-Luciferase[®] Reporter Assay に焦点を当ててご紹介致します。

従来の Dual アッセイに比べて高い発光値

新しい Nano-Glo[®] Dual-Luciferase[®] Reporter Assay は一つのウェルから、NanoLuc[®] luciferase とホタルルシフェラーゼの 2 つを検出することができます。NanoLuc[®] Luciferase は、従来のホタルルシフェラーゼに比べ 150 倍以上明るいルシフェラーゼです。図 1 で従来の Dual-Glo[®] Luciferase Assay および Dual-Luciferase[®] Reporter Assay における各ルシフェラーゼと発光値を比較しています。Dual-Glo[®] Luciferase Assay のホタルルシフェラーゼの発光値に比べ、Nano-Glo[®] Dual-Luciferase[®] Reporter Assay の NanoLuc[®] の発光値は、飛躍的に高くなっています。ルシフェラーゼの発光値が高いことにより、これまで見えていなかったシグナル、例えばトランスフェクション効率が低い細胞、またシグナルレベルが低く、バックグラウンドに埋もれていたシグナルを検出できるようになります。また、従来の Dual-Glo[®] Luciferase Assay と同じように、培地に直接試薬を加える簡便なプロトコルで実験を行うことができます。さらに、従来の Dual-Luciferase[®] Reporter Assay に匹敵する発光値が得られますので、**簡単なプロトコル、インジェクターを使った操作が不要**になります。

各種ルシフェラーゼアッセイとの発光比較

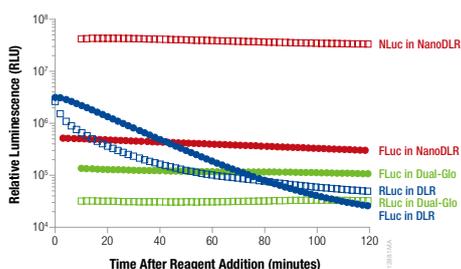


図 1. NanoDLR[™] アッセイのより明るく安定な発光特性

NanoDLR[™] アッセイのより明るく安定な発光特性 TK-RLuc (ウミシイタケ) : TK-FLuc (c ホタル) : キャリア DNA または TK-NLuc (NanoLuc[®]) : TK-FLuc : キャリア DNA をそれぞれ 1:1:8 の割合で HEK293 細胞にトランスフェクションし、NanoDLR[™]、DLR[™] または Dual-Glo[®] Dual-Luciferase[®] Assay System を用いて測定した。同じプロモーターでルシフェラーゼを発現させた場合、NanoDLR[™] Assay により測定した NLuc レポーターで最も明るい長時間発光シグナルが得られ、Fluc レポーターも十分明るい長時間発光シグナルが得られた。

安定かつ高い応答性の NanoLuc[®] Luciferase

NanoLuc[®] Luciferase の特長の一つとして、高い安定性が挙げられます。図 2 では細胞内でのホタルおよび NanoLuc[®] Luciferase の安定性を示しております。NanoLuc[®] はホタルルシフェラーゼに比べ、長時間高い安定性を保持しています。その一方で、タンパク質分解配列 PEST を付加した場合、より速やかに分解されます。この高い安定性と迅速な分解は、データの安定性あるいは応答性の高さに直結します。また、細胞種によらず安定したデータが得られますので、これまでのような、細胞種によりデータが得られないという問題が解消されます。

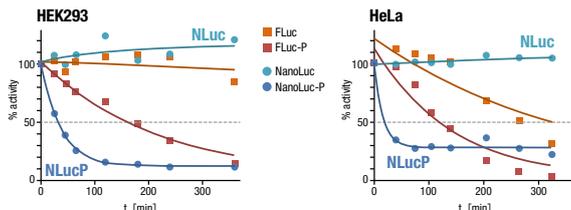


図 2. 細胞内における NanoLuc[®] およびホタルルシフェラーゼの安定性の比較

細胞内での各種ルシフェラーゼの安定性を評価した。HEK293 細胞に各種ルシフェラーゼ NLuc、NLucP、FLuc、FLucP を一過的に恒常発現させ、シクロヘキシミドの添加によりタンパク合成をブロックしてからの発光値の変化を示す。

シクロヘキシミドの添加によりタンパク合成をブロックしてからの発光半減期

Cell line	FLuc	FLucP	NLuc	NLucP
HEK-293	>6 h	2.0 ± 0.4 h	>6 h	18 ± 11 min
HeLa	3.8 ± 1.3 h	1.4 ± 0.2 h	>6 h	20 ± 6 min
U2OS (n=1)	>6 h	2.8 h	>6 h	36 min

※ FLucP および NLucP はタンパク質分解配列 PEST を付加し、応答性を向上させるためのベクターです。

スクリーニングに最適な NanoLuc[®] レポーター

NanoLuc[®] Luciferase は、レポーターアッセイを用いた化合物スクリーニングに適しています。従来のホタルルシフェラーゼはその発光反応に ATP を必要とする一方で、NanoLuc[®] Luciferase は ATP を必要としないので、発光反応に対する影響が最小限に抑えられます。また、温度や pH の変化に対して広い範囲で耐性があります (*ACS Chem. Biol.*, 2012, 7 (11), pp 1848–1857)。さらにプロメガは、ルシフェラーゼと化合物が直接相互作用して生じる偽陽性をあらかじめ検出するシステムを開発しました。pNLCol Vectors は次世代の Coincident ベクターシステムで、同じ mRNA 転写物からホタルルシフェラーゼ (luc2) と PEST 不安定化ドメインが融合した NanoLuc[®] (NlucP) の両方を発現します。これにより 2 つのルシフェラーゼに対する化合物との相互作用プロファイルが得られます (図 3)。化合物のハイスループットスクリーニングで使用すれば、どちらか片方のルシフェラーゼと化合物との直接相互作用による偽陽性が、両方のルシフェラーゼで同様の反応を示す真の陽性と区別することができますので、デュアルアッセイを行うことにより偽陽性のヒット率が下がります。また、1 次スクリーニングを NanoLuc[®] で、2 次スクリーニングをデュアルで行うことにより、偽陽性を振るい落とすことができます (8 ページ参照)。

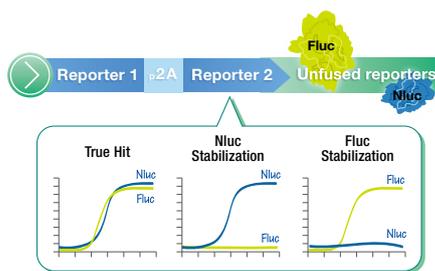


図 3. タンデムレポーターを用いたスクリーニングにおける偽陽性の簡便な検出

タンデムレポーターベクターは、同じ mRNA 転写産物よりホタルルシフェラーゼと分解配列をつけた NanoLuc[®] ルシフェラーゼを発現する。2 つのレポーターはリボソームスキップ機構を引き起こす短い P2A 配列により 2 つの未融合の可溶性ルシフェラーゼに分離されるため、より正確な化合物プロファイルの作成が可能となる。

お客様の声
東京大学医科学研究所 感染遺伝学
柴田 琢磨 先生
レポーター DNA 量の希釈系列を製作し、最適な導入条件を検討しました。



- 従来のホタルルシフェラーゼを利用した Luciferase Assay System では、高濃度のレポータープラスミドの条件下では誘導倍率が低下することから至適条件の検討が必要でした。またシグナルの活性化が見られる実験条件が限られていた為、実験間および実験者によりデータがバラついていました。
- ホタルルシフェラーゼから NanoLuc[®] に変えることにより、広いレンジのレポータープラスミド量で同等の誘導を検出でき、データが安定するようになりました (図 4)。

レポーター DNA 量に関わらず一定の誘導倍率が得られ、トランスフェクション効率や手技の違いによらず、安定した結果が得られるようになった。

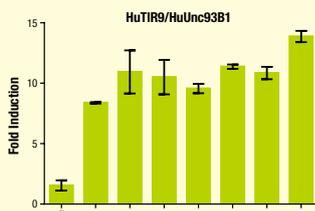


図 4. レポーター DNA 量に依存しない安定した誘導倍率

HEK293 細胞に pNL3.2.NF-κB-RE Vector (各濃度) およびヒト Toll like receptor 9/ヒト Unc93B1 発現ベクターを導入し、一定量の誘導剤を添加した際のレポーター活性を Nano-Glo[®] Dual-Luciferase[®] Reporter Assay で測定し、その Fold Induction を示した。レポーターベクターの濃度によらず、同等な誘導を示していることが分かる。

関連製品については 8 ページをご覧ください。

実験をすすめるための RentaMAX 活用術

RentaMAX とは？

RentaMAX はプロメガの GloMax® プレートリーダー / Maxwell® RSC 自動精製装置を、無償で一定期間お貸出しするプログラムで、試薬 / 機器の両面からのサポート・コンサルティングも行います。本サービスは皆様にご好評をいただいております。研究の効率的な遂行や新規の実験系の立ち上げ時の検討など様々な場面で役立っております。

今回は、実際に RentaMAX を活用されている先生方の利用方法や RentaMAX のメリットをお届けします。



植物からの RNA 自動精製
Maxwell® RSC Instrument
東京大学
生物生産工学研究センター
環境保全工学研究室 准教授
岡田 憲典 先生



先生のお悩みごと

イネの葉身から RNA 抽出を行っており、サンプルの凍結粉砕の操作だけで、12 サンプルあたり約 40 分の時間を費やさねばならない。その後の RNA 抽出の工程においても、劇物指定のフェノール系有機溶媒を用いて、1 時間以上の付ききりの作業が必要となっている。有機溶媒を用いた RNA 抽出試薬では、遠心操作後のピペティングによる水相の分取が求められるが、それによるサンプルロスやコンタミの危険性があり、RNA 分解が進む恐れがあることを懸念している。現在の RNA 抽出の問題点をまとめると以下ようになる。

問題点

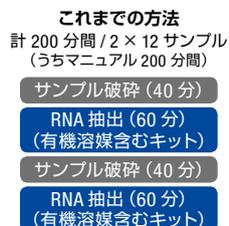
- 長時間の拘束時間 (サンプル破砕 40 分 + RNA 抽出 1 時間)
- 有機溶媒 (フェノール) の使用による、安全性と廃棄の問題
- ピペティング操作が多く、RNA 分解の懸念
- 個人間のテクニックの差 (qPCR のリファレンス値がばらつく)
- 多糖類の残存による、純度の低下

RentaMAX で解決!

RNA 抽出は全自動なので、作業はサンプル破砕だけになりました。Maxwell® RSC で RNA 抽出している間に、次のランのためのサンプル破砕をすることで、スルーブットが上がり、ほかの実験をすることができました。Maxwell® RSC のキットでは劇物指定の有機溶媒を使っていないので、試薬の管理、廃棄も簡単でした。同時に、遠心機の問題も解決です。

改善点

- 作業時間を 60% 以上削減 (サンプル破砕のみ)
- 有機溶媒不使用のため、安全性向上
- 遠心機も不使用
- 全自動抽出機のため、個人間のテクニックの差はなし
- 高い洗浄効率の磁性体ビーズ方式で夾雑物の除去効率を劇的に改善



RentaMAX の活用

こちらの研究室では、3 ~ 4 週の期間で、数日間の RentaMAX をご利用いただいております。サンプルをストックし、100 検体程度になったところで、随時お申し込みをいただいております。したいときにすぐ実験できないというもどかしさは感じつつも、優位点を考えて、いつも RentaMAX を使っていますとのお話いただきました。このもどかしさの改善のために、機器の購入をすでにご検討いただいております。

先生から一言

劇物指定の試薬を用いない安全で均一な RNA 抽出。失敗も少なく、実はコストパフォーマンスもよい。多検体の実験の際には特に威力を発揮。



発光レポーターアッセイ
GloMax® 20/20 Luminometer
武庫川女子大学
スポーツ健康科学部
玉村 禎宏 先生



先生のお悩みごと

軟骨細胞の分化や形成の仕組みの解明のために、樹立細胞株や初代培養コンドロサイト (軟骨産生細胞) にルシフェラーゼ遺伝子 (or レポーター) とともに Wnt や TGF β などを共発現させ、転写調節因子の研究を行っている。当施設にプレートタイプのマルチリーダーを所有しているが、発光測定が非常に悪く、ダイナミックレンジも狭いため、ルシフェラーゼ遺伝子を利用したレポーターアッセイに不向きであることが分かった。ルシフェラーゼを用いた発光技術は、ノイズが低く、高感度であり、最も優れたレポーター遺伝子であることは理解しているが、実験に使うことができなかった。

問題点

- ルシフェラーゼ遺伝子を利用したレポーターアッセイをしたいが、高感度のルミノメーターがない
- 予算申請しているが、購入できるのは、早くても次年度

RentaMAX で解決!

Dual-Luciferase® Reporter Assay System の測定のために、GloMax® 20/20 Luminometer を RentaMAX で利用しています。GloMax® 20/20 Luminometer はシングルチューブ対応ルミノメーターなので、本体を置いて、電源ケーブルをつなぐだけで、簡単に使い始めることができます。低バックグラウンドかつ高感度であり、安定した結果が得られるので、とても助かっています。

改善点

- レポーターアッセイを行い、転写制御因子の解析を進めることができた。



RentaMAX の活用

玉村先生には、複数種類のコンストラクトを作成できた際に、RentaMAX をお申し込みいただき、数か月おきにご利用いただいております。学内に分子生物学の実験を行っている研究室が少ないため、ほかの研究室に借りに行ったり、充実した共通機器室がありません。このため、RentaMAX はレポーターアッセイができる唯一の手段でした。

先生から一言

すでにシグナル応答配列がクローニングされたレポーターベクターを購入することができるので、レポーターアッセイを始めるための敷居はあまり高くないように思います。また、ルシフェラーゼ自体も進化しており、高い発光量かつ非特異的な影響を受けにくい NanoLuc® が発売されています。立ち上げ時には、ルミノメーターを RentaMAX で借りることができるので、あきらめずに一度レポーターアッセイを始めてみてはいかがでしょうか。



RentaMAX のお申込みについては
www.promega.co.jp/rentamax/
をご覧ください。

細胞内タンパク質相互作用の高感度バイオセンサー FRET と BRET の活用 高感度検出装置 GloMax® Discover System



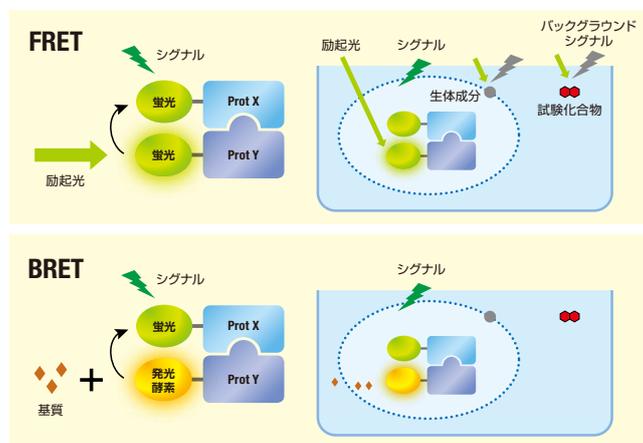
京都大学大学院
生命科学研究所
生体制御学医学研究科
病態生物医学 教授
松田 道行 先生

イントロダクション:

タンパク質相互作用解析は、個々のタンパク質機能だけでなく細胞内タンパク質ネットワーク、さらには細胞内プロセスを解明する上で重要な研究手法です。共免疫沈降 (Co-IP: Co-immunoprecipitation) 法、プルダウンアッセイ法、ファーウェスタンブロットリング法、表面プラズモン共鳴法など従来より様々なタンパク質相互作用解析法が開発されてきました。しかし、これらの方法の多くは細胞を破壊してタンパク質を取り出すため、生体内での真の相互作用を反映したものとは言えません。そのため、生きた真核細胞内でタンパク質相互作用をリアルタイムに観察できる手法の開発が強く求められてきました。このような要望に対するブレイクスルーとして期待される手法が FRET および BRET です。

今回ご登場いただく松田道行先生は、蛍光による生体イメージング技術の第一人者であり、蛍光技術を利用した研究ツールの開発に尽力されています。また、松田先生はこれまで開発されてきた FRET を応用した化合物スクリーニングについても検討されてきました。しかし、FRET 特有のいくつかの問題から新たに発光技術を基にした BRET を導入されました。本稿では蛍光を知り尽くした松田先生に FRET と BRET のメリット / デメリットならびに BRET を導入する際の重要な点についてお聞きしました。

タンパク質相互作用の研究ツール FRET および BRET とは……



FRET を用いた化合物スクリーニングでの問題

これまで開発してきた FRET を応用した化合物スクリーニング (上図) を検討しましたが、いくつかの問題が生じました。1つは、FRET では励起光を生細胞に照射するため、**細胞自身からの自家蛍光**も検出してしまふという問題です。また、細胞だけでなく、**スクリーニングにかける化合物自身が持つ自家蛍光**も多く、100 サンプルに1つ程度の高い頻度で強い自家蛍光が観察されました。これは、顕微鏡ベースの測定でも同様であり、検出装置側で対応することは困難でした。そこで、FRET と類似の技術で、励起不要の BRET を用いたアッセイ系の開発を検討しました。

BRET を用いた化合物スクリーニングでの問題

BRET を用いた化合物スクリーニングを検討しました。BRET は FRET とは異なり、強力な励起光を照射する必要が無いために、バックグラウンドを極めて低く抑えることができますが、いくつかの弱点をクリアする必要があります。BRET は励起光としての役割を生物発光に代えているため、発光量が弱く十分な蛍光量が得られない場合があるという点です。近年では生物発光技術の進化により、その発光強度は飛躍的上昇していますが、一般的なランプを用いた励起光に比べると生物発光による励起の強度は低くならざるを得ません。この問題は、検出装置側のスペック (高感度な発光検出および励起光としての生物発光を遮断するフィルター) により解決することができます。

問題の解決

BRET に対応するスペックのプレートリーダーを各社比較検討したところ、プロメガ社の GloMax® Discover System は他の BRET/FRET を検出できる大がかりなプレートリーダーとは異なり、コンパクトでありながらフィルターを装備した超高感度かつ広いダイナミックレンジを有するため実験に最適な機器であることを確認することができ、採用にいたしました。GloMax® Discover System を用いて、BRET によるアッセイ系を無事に構築することができ、Preliminary な実験では化合物による影響も認められませんでした。これから GloMax® Discover System を用いた BRET アッセイにより本格的に化合物をスクリーニングする予定です。

まとめ

- タンパク質相互作用の測定は、細胞内で何が起っているのか知るために重要な情報を得ることができる。
- FRET/BRET は、従来法とは異なり、生きた細胞内でのタンパク質相互作用を観察できる点で非常に優れた実験手法である。
- FRET は、サンプルである低分子化合物の自家蛍光のみならず、細胞に内在性の自家蛍光があり、プレートリーダーを用いたアッセイには適していない。
- BRET はスペックの合ったルミノメーター (フィルター、超高感度、広いダイナミックレンジ) が必要だが、FRET における自家蛍光の問題を排除することができ、生細胞でタンパク質相互作用をアッセイできる。

その他の BRET と FRET のそれぞれの優位点

- | | |
|------|--|
| BRET | <ul style="list-style-type: none"> • 励起光不要による高い S/N 比 • 強い励起光による光毒性がない • プレートリーダーに励起光のシステムが不要 |
| FRET | <ul style="list-style-type: none"> • 基質が不要な高時空間分解能イメージング • 蛍光タンパク質の種類が豊富 |

関連製品

	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
GloMax® Discover System / 本体 (発光・蛍光・吸光 [UV/可視光])	1台	GM3000	4,600,000
GloMax® Dual Injectors with Pumps (デュアルインジェクター)	1セット	GM3030	900,000

- マニュアル不要の直感操作 (大型タブレット PC 付属)
- プロメガの各種アッセイプロトコールをインストール済み
- 高感度と広いダイナミックレンジで確実な検出を
感度: 3×10^{-21} moles ルシフェラーゼ
レンジ: > 9 桁
- 細胞のアッセイに最適な機能を搭載
- NanoBRET™ / BRET やマルチアッセイなどに対応



プロメガクラブキャンペーン

プロメガクラブ会員の方を対象としたキャンペーンで、ご注文にはプロメガクラブ会員 ID が必要です。
様々な特典をご利用いただけるプロメガクラブは以下より簡単にお申込みいただけ、
会員 ID はすぐにメールにてお届けいたします。

プロメガクラブ: www.promega.co.jp/promegaclub.html



かわら版掲載製品期間限定キャンペーン

期間: 2016年7月11日~9月30日受注分まで



製品名	サイズ	カタログ番号	定価 (¥)	特別価格 (¥)
3 Glucose Uptake-Glo™ Assay	5 ml	J1341	63,000	44,100
2 PD-1/PD-L1 Blockade Bioassay	1 kit	J1250	151,000	120,800
2 IdeZ Protease, Frozen	2000 u	V8342	86,000	60,200
4 MTase-Glo™ Methyltransferase Assay	400 回分	V7601	85,000	59,500
4 HDAC-Glo™ I/II Assay, 10ml	10 ml	G6420	77,000	53,900
4 HDAC-Glo™ Class IIa Assay, 10ml	10 ml	G9560	77,000	53,900
4 HDAC-Glo™ 2 Assay, 10ml	10 ml	G9590	77,000	53,900
5 pNLCol1[luc2-P2A-NlucP/Hygro] Vector	20 µg	N1461	100,000	70,000
5 pNLCol2[luc2-P2A-NlucP/minP/Hygro] Vector	20 µg	N1471	100,000	70,000
5 pNLCol3[luc2-P2A-NlucP/CMV/Hygro] Vector	20 µg	N1481	100,000	70,000
5 pNLCol4[luc2-P2A-NlucP/PGK/Hygro] Vector	20 µg	N1491	100,000	70,000



一押し! プロメガクラブ対象製品

プロメガクラブ対象品の中から本かわら版に関連する製品をご紹介します。
その他会員対象製品は上記 URL を参照ください。



製品名	サイズ	カタログ番号	定価 (¥)	特別価格 (¥)
CellTiter-Glo® 2.0 Assay	10 ml	G9241	15,000	9,000
Nano-Glo® Luciferase Assay	10 ml	N1110	23,000	18,000
Nano-Glo® Dual-Luciferase® Reporter Assay/pNL1.1.TK Bundle	1 セット	N1521	80,000	40,000
Nano-Glo® Dual-Luciferase® Reporter Assay/pNL1.1.PGK Bundle	1 セット	N1531	80,000	40,000
Nano-Glo® Dual-Luciferase® Reporter Assay/pGL4.54 [luc2/TK] Bundle	1 セット	N1541	80,000	40,000
Nano-Glo® Dual-Luciferase® Reporter Assay/pGL4.53 [luc2/PGK] Bundle	1 セット	N1551	80,000	40,000
Nano-Glo® Dual-Luciferase® Reporter Assay System	10 ml	N1610	39,000	31,000
MethylEdge™ Bisulfite Conversion System	50 回分	N1301	40,000	20,000

日本語 Web site : www.promega.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2016年7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