

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

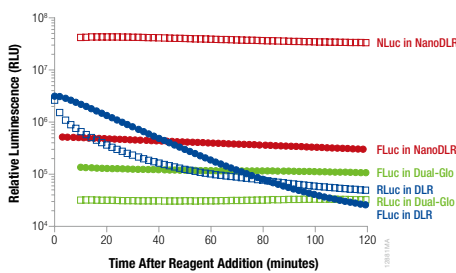


図 1. NanoDLR™ アッセイのより明るく安定な発光特性

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。

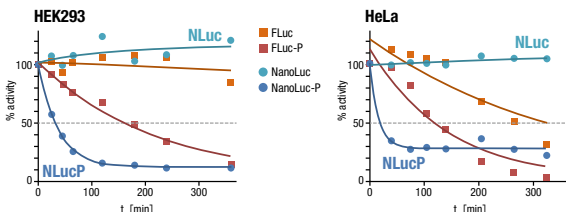


図 2. 細胞内における NanoLuc® およびホタルルシフェラーゼの安定性の比較

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)。

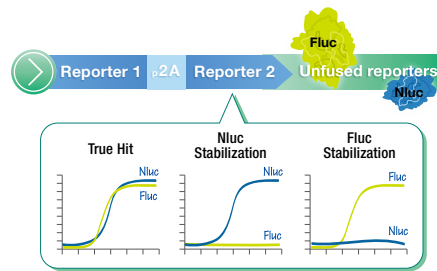


図 3. タンデムレポーターを用いたスクリーニングにおける偽陽性の簡便な検出

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。

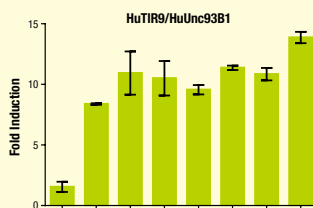


図 4. レポーター DNA 量に依存しない安定した誘導倍率

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。