

2016年秋号

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、Nanoluc[®] つてすこい[™]..
多彩なアプリケーション

三頁、エピジエネティック制御タンパク質の
『ライブセル解析ツール』

四頁、発光法によるレドックス細胞アッセイ

五頁、ADCC 発光レポーターバイオアッセイを用いた
抗TNF α 抗体医薬品および抗ウイルスワクチン
の評価

六頁、RNAsを簡便に合成！
今、注目される in vitro 転写システム

七頁、自動核酸精製装置 Maxwell[®] RSC Instrument を用いた
肺がんでの臨床応用のアプリケーション

NanoLuc® ってすごい：多彩なアプリケーション

近年、遺伝子改変やゲノム解析・タンパク質発現解析技術・検出装置の急速な発展により、さまざまな状況下で目的分子の挙動を捉えることができるようになってきました。さらに、生きた細胞を用いて生理現象を“ありのまま”解析したいというニーズも高まっており、これに応える技術や手法の開発も活発化しています。これまで発光酵素ルシフェラーゼは感度の高さからレポーター酵素として広く利用されてきました。プロメガではさらに生命科学研究に有効なツールとして、高感度であると同時に分子量も小さい NanoLuc® を開発しました。ここでは NanoLuc® の特性と、様々なアプリケーションへの応用の可能性についてご紹介します。

NanoLuc® の特性

NanoLuc® は深海エビ(トゲオキヒオドシエビ) 由来のルシフェラーゼで、発光レポーターとして最適なパフォーマンスを発揮するために改変された分子量の小さな発光酵素 (19 kDa) です。この NanoLuc® は新規基質 furimazine を用いて、ホタルルシフェラーゼ(Fluc) やウミシイタケルシフェラーゼ (Rluc) より約 150 倍明るい高レベルの発光を長時間維持します (図 1)。低分子量・高発光値により、応用可能なアプリケーションが広がると同時に、少ない分子数で十分な発光シグナルが得られるため、より生体システムに近い細胞内環境での実験を行うことができます。

非常に高い発光レベル

- ホタルルシフェラーゼ (luc2) よりも 80 倍 ~ 240 倍のシグナル (細胞内発現)
- 高感度：正確な生体内イベントを検出可能

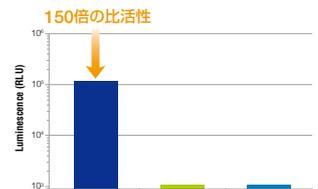


図 1. ルシフェラーゼ酵素 3 種類 (50 attomoles) からの発光測定

非常に小さいレポーター分子 (19kDa)

- ホタル/ウミシイタケルシフェラーゼや GFP よりも小さい分子量
- 遺伝子やタンパク質サイズに制約がある用途にも対応 (例：ウイルスパッケージング、タンパク質融合)

高い安定性

- 幅広い実験条件に適用 (温度、pH 他)
- 化合物ライブラリースクリーニングでの疑陽性を低減

新しいアプリケーションへの応用

発光強度が高く、分子量の小さな NanoLuc® ルシフェラーゼは、従来の遺伝子発現解析を目的とした Genetic Reporter としてだけでなく、タンパク質安定性試験、タンパク質間相互作用 (PPI; NanoBRET™, NanoBIT™) 等のタンパク質レベルでの解析を目的とした Protein Reporter としての利用も可能です。特に、分子量の小ささは従来のホタルルシフェラーゼにおける分子量の大きさが問題となる場合に有効です。

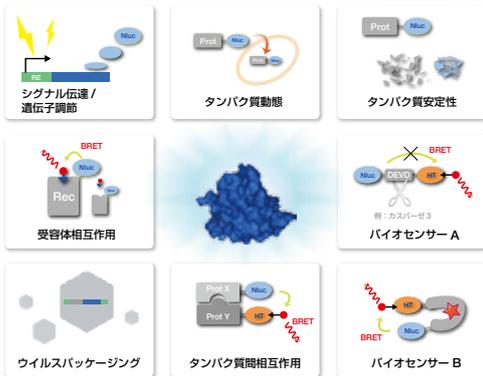


図 2. NanoLuc® の幅広いアプリケーション

関連製品

製品名	サイズ	カタログ番号	定価 (¥)	特別価格 (¥)
NanoLuc® 関連製品				
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
NanoLuc® ベクター (coincidence vector を除く)	各種	—	73,000	58,000
pGL4 ホタルベクター	各種	—	73,000	58,000
トランスフェクション試薬				
FuGENE® HD Transfection Reagent, Trial ※初回限り (1 回のみ)	0.2ml	E2313	—	2,000
ViaFect™ Transfection Reagent ※初回限り (1 回のみ)	0.2ml	E4983	—	2,000

PC プロメガクラブ対象製品です。

“ゲノム編集技術” との親和性も抜群です

NanoLuc® は Fluc, RLuc よりも約 150 倍明るいので、低レベル発現での検出が可能となり、生理的レベルに近い分子濃度でイベントを検出できる可能性を示唆しています。また、内在レベルで発現する NanoLuc® 融合体による、ハイスループットスクリーニングにも応用可能です。また、ゲノム編集技術を用いて、特定疾患パスウェイの研究標的となるタンパク質との NanoLuc® 融合体の作製も行われ、内在レベルの発現変化を感度良く測定することにも成功しています。さらに特定のタンパク質との NanoLuc® 融合体を発現する改変細胞株も市販されています (X-MAN™ NanoLuc® Reporter Cell Lines, Horizon Discovery)。

CRISPR/Cas9 システムでの活用例

お客様の声

岐阜大学工学部化学・生命工学科
准教授 大橋憲太郎先生



GRP78 (78 kDa Glucose-regulated protein) は小胞体に局在する分子シャペロンで、タンパク質のフォールディングや小胞体輸送、カルシウム恒常性の調節、ミスフォールドされたタンパク質を分解するためのターゲティングなどに関係している。大橋准教授のグループは CRISPR/Cas9 system を用いて、HEK293 細胞株ゲノム中の GRP78 の N 末端 coding region に NanoLuc® をノックインしたセルラインを作製した。このセルラインを用いて、GRP78 の内在的なプロモーター活性の測定を行い、各種小胞体ストレス誘発因子に対して応答することを確認した。NanoLuc® ベースの CRISPR/Cas9 システムは目的遺伝子の内在的なプロモーター活性の評価に有用なツールであることが示された。

Oh-hashi, Kentaro, *et al.* "Application of NanoLuc® to monitor the intrinsic promoter activity of GRP78 using the CRISPR/Cas9 system." *Genes to Cells* (2016)

大橋先生の声

従来のホタルルシフェラーゼと比べて非常に高活性を有する NanoLuc® を GRP78 のシグナルペプチド下流に CRISPR/Cas9 system を用いてノックインすることにより、一部は細胞外に放出され、培養液中の活性でも検出できます。したがって、NanoLuc® をノックインした細胞を 96-well プレート上で一定期間培養した後に、僅かな培養液を用いるだけでポジティブクローンを選別出来ます。今回のような場合、従来のように細胞溶解液を調製する必要がないので簡便なセレクションが可能です。本研究では小胞体局在性シャペロン GRP78 遺伝子を対象としましたが、ゲノム編集技術と組み合わせることで、興味深い多くの遺伝子への応用が期待できます。

プロメガのトランスフェクション 試薬

プロメガではレポーターアッセイ、ゲノム編集実験に最適なトランスフェクション試薬をご用意しております。

ViaFect™：浮遊細胞や幹細胞由来の細胞株などトランスフェクションが難しいとされる細胞でも優れた効率を示します。

FuGENE® HD：10,000 報以上の論文実績があり、広範な細胞株に適した非リポソーム試薬です。

プロメガクラブ会員には大特価でサンプルサイズをご提供!

プロメガクラブについては www.promega.co.jp/promegaclub.html をご覧ください。

エピジェネティック制御タンパク質の『ライブセル解析ツール』

エピジェネティック制御にかかわるタンパク質は、主に DNA やヒストンをメチル化・アセチル化修飾する「ライター」酵素、これらの修飾を除去する「イレイサー」酵素、そして DNA・ヒストンの修飾部位と結合する「リーダー」タンパク質が知られており、これらが相互作用しながらエピジェネティックな制御機構を支えています。このうち「ライター」と「イレイサー」は酵素であるため、前回ご紹介したような精製酵素アッセイや細胞を用いた活性調節化合物の探索、解析が進められてきました (HDAC 阻害剤ポリノスタット [SAHA] など)。一方、酵素ではない「リーダー」タンパク質は解析手法が少なく、特にライブセルでの解析やスクリーニングに適した方法がありませんでした。本稿ではタンパク質間相互作用を検出する最新の NanoBRET™ 法によるエピジェネティック制御タンパク質のライブセル解析ツールをご紹介します。

エピジェネティック制御因子のライブセルタンパク質間相互作用解析

酵素活性を持たないタンパク質の解析手法として特にライブセルでのタンパク質相互作用解析は非常に有効な手段です。研究レベルでのタンパク質相互作用解析は FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) の系が良く使われますが、細胞自身や薬剤の自家蛍光がバックグラウンドとなり、十分な定量性が得られません (かわら版夏号 p7)。この問題を解決するために優れた定量性に定評のある発光アッセイの利点を生かして、FRET のドナーの蛍光物質をルシフェラーゼにした BRET (Bioluminescence RET) に期待が寄せられました。しかしもともと低い発光シグナルの一部のエネルギーだけが転移した BRET シグナルは更に小さく、高感度な装置でも検出が難しい系となってしまうました。

この状況を一変させたのが、プロメガの非常に明るい NanoLuc® を利用した NanoBRET™ システムです。従来の BRET で問題だったシグナルの低さは NanoLuc® によって改善され (図 1)、また細胞や薬剤のもつ蛍光の影響がなく、発光法の特長である高い定量性があります。

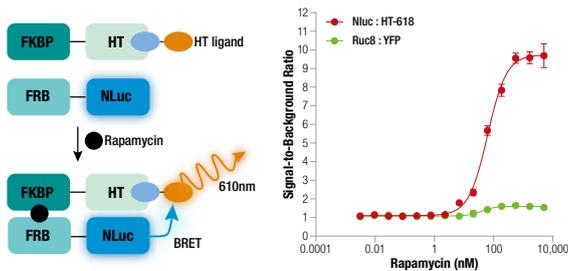
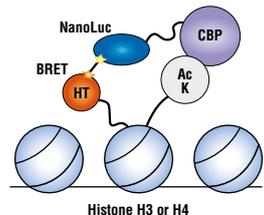


図 1. NanoBRET™ システムと従来法 BRET の比較
ベクターを導入した細胞内で発現した NLuc 融合タンパク質 (FRB-NLuc) と低分子蛍光 618 リガンドが結合した HT (HaloTag®) 融合タンパク質 (FKBP-HT) が近接すると BRET が起こる (この系ではラパマイシンの添加により FRB: FKBP の相互作用が促進: 左図)。低分子蛍光 618 リガンドはタンパク質発現後に細胞へ添加する細胞透過性の蛍光試薬。FKBP-YFP と FRB-Rluc8 による BRET システムとのデータ比較 (右図)。

この NanoBRET™ システムを用いることにより、これまで解析が難しかった生細胞での全長タンパク質を用いたタンパク質相互作用の解析が可能になりました。

図 2 にヒストンのアセチル化部位に結合するプロモドメインタンパク質の一つ、CBP とヒストンの NanoBRET™ アッセイ模式図を示しました。CBP は約 260kDa の巨大なタンパク質であり、従来の方法では全長 CBP とヒストンの相互作用を検出することは困難とされてきました。そのため CBP のプロモドメイン (BD) のみを使用して CBP-ヒストン結合阻害剤が探索され、SGC-CBP-30 が見つかったのですが、実はこの化合物は全長 CBP とヒストンの結合は阻害しないことが分かりました (図 3)。



生体内の CBP はもちろん全長タンパク質ですので、実際に薬として使えるかどうかはやはり全長タンパク質で評価することが重要です。また NanoBRET™ システムで新しい阻害剤を評価した論文もすでに多数報告されています。

図 2. NanoBRET™ による Histone - CBP 結合検出

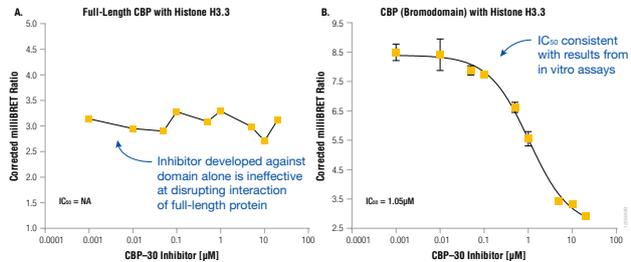


図 3. CBP の構造および全長 CBP / CBP プロモドメイン-ヒストン結合における阻害剤の効果

エピジェネティック制御因子のライブセルにおける“化合物相互作用解析”

ところで、セルフリーアッセイで見つけた阻害剤はどのような手法で解析していますか? IC₅₀ やタンパク質との解離定数 (Kd) を測定するだけでよいのでしょうか? 近年、薬剤の有効性に標的タンパク質との結合の非平衡状態での結合-解離が影響すること、特に Residence time (滞留時間) が重要な指標となることが明らかになってきました。また、単なるタンパク質との結合・解離速度だけでなく膜透過速度やプロドラッグの場合は細胞内での代謝速度も合わせて検討する必要があり、ここでもセルフリーアッセイからライブセルアッセイへとニーズがシフトしています。ライブセルでの Residence time 測定に有用なのが、BRET を用いた細胞内蛍光標識化合物結合試験 (Target Engagement、図 4) です。Target Engagement では BRET シグナルの増加速度によりタンパク質と化合物の解離速度が分かります。

図 4 では、HDAC1-NanoLuc® 融合タンパクを発現させた細胞にあらかじめ、SAHA、Mocetinostat、FK228 処理を行い、洗浄後に Tracer (SAHA 誘導体) を添加して BRET を測定しました。HDAC1 との解離が速ければ BRET シグナルが速く増加します。SAHA は Tracer 添加 20 分後にほぼプラトーに達しました。これは Tracer の膜透過時間と一致しており、SAHA の早い解離を示しています。一方、Mocetinostat は解離が遅いものとして報告されていますが、BRET シグナルもゆっくりと増加しています。また、プロドラッグである FK228 は、Mocetinostat よりもさらにゆっくりとした解離が観察されました。FK228 はがん細胞に対してゆっくりと長く生理活性を示すことが知られており、NanoBRET™ の結果もこの性質に一致したものとなっています。

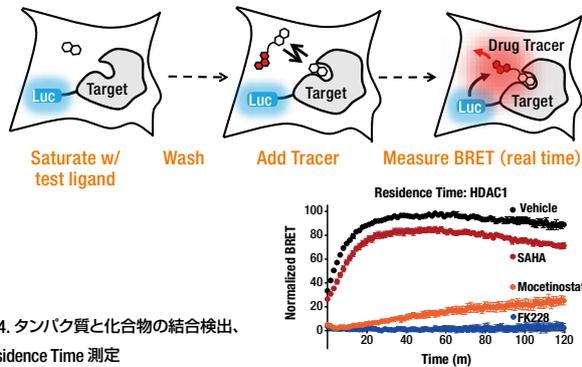


図 4. タンパク質と化合物の結合検出、Residence Time 測定

前回に続き、今回はライブセルでのアッセイに焦点を当てました。エピジェネティクス研究は発展がめざましい分野の一つであり、今後も新たなターゲットが続々と見つかることでしょう。プロメガも独自テクノロジーを生かした新たなアッセイを提供し続けます。次なる新テクノロジーをお楽しみに!

今ならエピジェネティクス関連タンパク質を含むペアセット

47 種を特別価格でご提供! (2016 年 12 月 22 日まで)

詳しくは www.promega.co.jp/kawarabancamp/ をご覧ください。

エピジェネティクス関連キット 100 種以上!

プロメガでは 100 近いエピジェネティクス関連タンパク質ペアのアッセイが構築済みなのですぐにアッセイを始められます (QR コードよりご覧ください)。

*関連する論文など詳細についてはお問合せください。



発光法によるレドックス細胞アッセイ

好気性生物は酸素を用いた代謝機構により、基質の酸化反応から大きなエネルギーを得ています。その一方で、好気性生物は酸化ストレスに曝されるという宿命を背負っており、進化の過程で様々な防御機構を発達させてきました。細胞内の酸化還元状態のバランスの乱れは、細胞の老化や疾患発症などにつながると考えられており、たとえば、Navdeepら (Current Biology, 2014) は H₂O₂ により NFκB 経路や MAPK 経路の活性化が誘導され発がんに関与することや、酸化ストレスが幹細胞の自己複製能や分化に関与していることを述べています。ここでは幅広い研究分野にて注目されている細胞内の酸化還元に関する因子を発光にて測定する技術を紹介いたします。

発光テクノロジーによる活性酸素種と還元物質の測定

活性酸素種 (ROS) である過酸化水素 (H₂O₂) は細胞の ROS・酸化ストレスレベルを評価する指標の1つです。対して、グルタチオンは細胞内での還元物質であり、活性酸素種の除去を行っています。プロメガではこれらの因子を発光にて測定する技術を確立しており、その測定原理を図1に示しました。

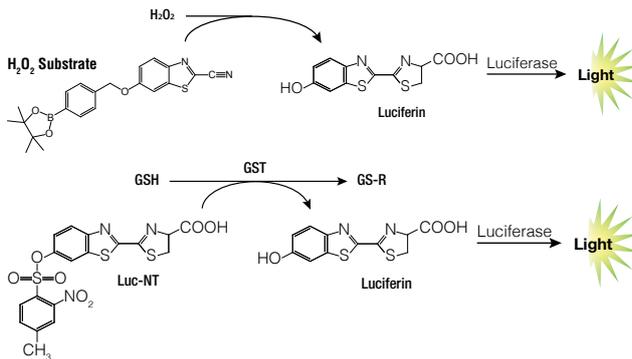


図1. 活性酸素種と還元物質の測定原理

(上図) H₂O₂ の測定法では、H₂O₂ とルシフェリン前駆体が反応し、ルシフェリンを生成。H₂O₂ 量を発光シグナルに変換して測定する。

(下図) グルタチオンの測定法では、グルタチオン S 転フェラーゼ (GST) を用いて、ルシフェリン前駆体と還元型グルタチオン (GSH) を反応させ、ルシフェリンを生成。GSH 量を発光シグナルに変換して測定する。

発光での測定メリットとして ROS アッセイのハイスループットスクリーニング (HTS) での比較の例をご紹介します。表1に LOPAC-1280 を用いて、ROS-Glo™ Assay と西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 法とを実際に比較した結果を示しました。75% 阻害を示す化合物数を比較すると HRP 法では系に影響が見られた化合物が 7.1% もありました。それに対し、ルシフェラーゼの発光を用いた ROS-Glo™ Assay では 0.5% でした。HRP は発光強度が弱く、発光の減衰が速いなどの欠点があり、さらに HRP に対する阻害効果が偽陽性の原因となるなどの問題点があります。プロメガの H₂O₂ 測定法では①ルシフェリン前駆体が H₂O₂ とまず反応する、②化合物の影響を受けにくい改良型ルシフェラーゼ Ultra-Glo™ Luciferase を使用しているなどの工夫がなされており、偽陽性が少なく、スクリーニングなどの薬効評価に威力を発揮します。

	ROS-Glo™ Assay		HRP 法	
	化合物の数	LOPAC に占める割合 (%)	化合物の数	LOPAC に占める割合 (%)
スクリーニングに用いた化合物数	1,280		1,280	
インヒビター: 活性 75% 以下	6	0.5	91	7.1
インヒビター: 活性 50% 以下	3	0.2	67	5.2
アクチベーター: 活性 150% 以上	2	0.2	0	0

表1. ROS-Glo™ H₂O₂ と一般的な HRP 法 (蛍光) の偽陽性率の比較

10μM H₂O₂ を各 well に加え、LOPAC-1280 を添加した際のシグナルへの影響を、ROS-Glo™ Assay と HRP 法を比較した。

以上細胞株レベルでの測定例でしたが、組織レベルでの酸化還元状態を検討したい場合にはグルタチオン測定法、GSH-Glo™ Assay がお勧めです。様々な細胞株や組織での測定報告がありますので、詳細はプロメガ HP のサイテーションリストをご覧ください。

www.promega.jp/resources/tools/citations/

関連製品

製品名	測定用途	サイズ	カタログ番号	定価 (¥)	特別価格 (¥)
ROS-Glo™ H ₂ O ₂ Assay	過酸化水素 (H ₂ O ₂) の測定	10ml	G8820	69,000	55,200
GSH-Glo™ Glutathione Assay	還元型グルタチオン (GSH) の測定	10ml	V6911	69,000	55,200
GSH/GSSG-Glo™ Assay	還元型および酸化型グルタチオン (GSH, GSSG) の測定	10ml	V6611	90,000	72,000
NAD/NADH-Glo™ Assay	NAD, NADH の測定	10ml	G9071	90,000	72,000
NADP/NADPH-Glo™ Assay	NADP, NADPH の測定	10ml	G9081	90,000	72,000

※期間限定プロメガクラブキャンペーン対象製品 ※期間: 2016年10月11日~12月22日

発光テクノロジーによる NAD・NADP の測定

ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) および、そのリン酸化型 NADP はともに生体内の酸化還元反応の補酵素として関与する重要な分子です。これらの分子もまた細胞内の代謝の状態や酸化還元状態を示す指標の1つです。

これまで、ELISA・HPLC などの煩雑な方法での測定がなされてきましたが、プロメガではこれらの分子種も簡便に測定できるよう、試薬の添加のみで測定できるようにデザインし、改良した測定法を確立しました。図2には一例として、NAD/NADH の測定原理を示しました。さらに、作製したライセートに対して酸やアルカリで前処理を行うことにより、片方の分子種を分解することで、酸化型・還元型それぞれの量や比率を測定することも可能です。

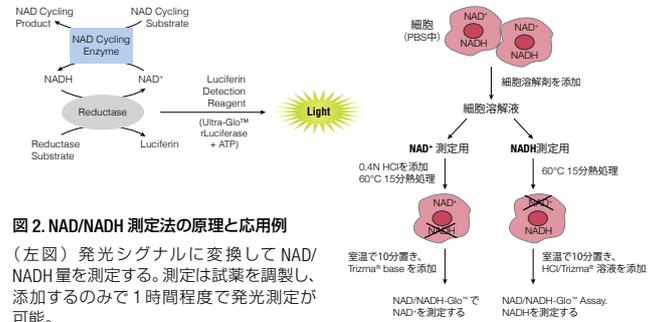


図2. NAD/NADH 測定法の原理と応用例

(左図) 発光シグナルに変換して NAD/NADH 量を測定する。測定は試薬を調製し、添加するのみで1時間程度で発光測定が可能。

(右図) 細胞株、組織、菌などのライセートサンプルに前処理を加えることにより、NAD, NADH (もしくは NADP, NADPH) をそれぞれ分けて測定可能

キーポイント

- ✓ **頑強なアッセイ** ⇒ 化合物の影響を受けにくいアッセイデザインと改良型 Luciferase を使用
- ✓ **簡単な測定プロトコル** ⇒ Add to Measure の簡単プロトコル
- ✓ **様々な生物種での応用例** ⇒ 哺乳動物細胞株に加え、組織やバクテリアの例もあり。もちろんマルチプレックスアッセイにも対応!

最後に

ここで紹介した NAD/NADH-Glo™, NADP/NADPH-Glo™ はかわら版夏号で紹介した Glucose Uptake アッセイなどの測定原理の基礎になっており、この技術をベースに種々の代謝産物の測定法の開発が進められています。また細胞株ベースでのアッセイのみならず、組織サンプルやバクテリアなどの応用例もありますので、詳細については弊社 Web サイトを参照いただくか、お気軽にお問い合わせください。

ADCC 発光レポーターバイオアッセイを用いた抗 TNF 抗体医薬品および抗ウイルスワクチンの評価

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。第三回目は ADCC Reporter Bioassay の利用例として、抗 TNF α 抗体医薬品の評価用 mTNF α CHO-K1 Target Cells、およびマウス ADCC Reporter Bioassay を用いた抗ウイルスワクチン評価についてのお話です。

mTNF α CHO-K1 Target Cells

抗 TNF α 抗体医薬は第一世代の Remicade (Infliximab, EU では 2015 年 2 月に期限切れ、アメリカでは 2018 年 9 月)、Humira (Adalimumab, アメリカで 2016 年 12 月、EU で 2018 年) がここ数年で相次いで特許切れになり、現在バイオシミラー開発競争が激しく繰り広げられています。Remicade のバイオシミラーは一足先に日本国内でも承認され、すでに上市されています (インフリキシマブ BS 点滴静注用、日本化薬)。

これら抗 TNF α 抗体の作用機序は、可溶性 TNF α (sTNF α) や膜結合型 TNF α (mTNF α) への結合等により TNF α の生理活性を中和することとされていますが、Remicade や Humira においては他にも mTNF α に結合することにより TNF α 産生細胞にアポトーシスを誘導する作用や、抗体依存性細胞傷害 (ADCC) や補体依存性細胞傷害 (CDC) を引き起こす作用も報告されており、これらは特にクローン病や潰瘍性大腸炎における薬効の一つと考えられています。このためバイオシミラーの承認申請時にも mTNF α を介した活性の有無を調べるよう求められていますが、mTNF α 発現細胞株は入手が難しいのが問題点でした。プロメガではこのニーズに応えて mTNF α 安定発現 CHO-K1 細胞を開発し、カスタム品での供給を開始しました。

通常 TNF α は膜結合型として発現し、細胞表面でプロテアーゼ (TNF-converting enzyme, TACE) に切断されて sTNF α が放出されます。そのためプロメガの mTNF 安定発現株では、TNF α を膜上にとどめるため TACE が切断できない mTNF α 変異体を使用しました。この細胞株は ADCC Reporter Bioassay のターゲット細胞として使用できます。図 1 に細胞およびアッセイの模式図と、Remicade (Infliximab) および Humira (Adalimumab) でのアッセイ結果を示しています。プロトコルも確定しており、これまで困難だった mTNF α を介する ADCC 活性の測定も抗体さえあればすぐに結果を出せるようになりました。

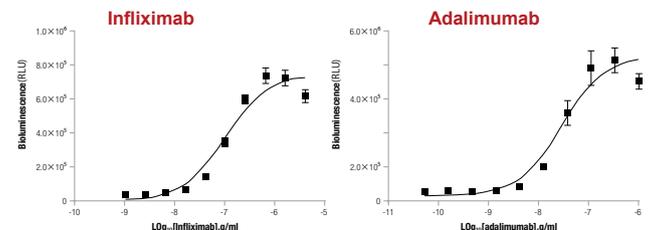
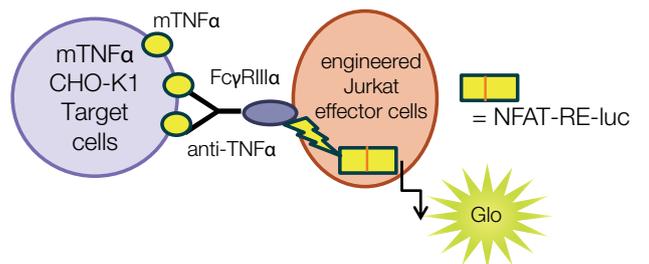


図 1. mTNF α Target cells でのアッセイ模式図および Infliximab, Adalimumab のデータ

Murine Fc γ RIV ADCC Reporter Bioassay

インフルエンザのシーズンが近づいてきました。そろそろワクチン接種する方もいらっしゃるのではないのでしょうか？現在のワクチン接種で誘導される抗ウイルス抗体は主に中和抗体ですが、中和抗体の弱点はウイルス抗原がわずかに変異するだけで反応しなくなるため、ほぼ毎年新たにワクチン接種が必要なことです。

実は ADCC 活性を調べたいというニーズは、抗体医薬品だけでなくワクチン開発の分野でも高まりつつあります。ワクチン接種によって産生さ

れた抗体の中には ADCC 活性を示すものも含まれており、1970 年代後半にはすでにこのような抗インフルエンザウイルス抗体の存在が報告されていました (① *Infect. Immunol.* 1978 **20**: 640–645. ② *J. Immunol.* 1977 **119**: 2100–2106. ③ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979 **76**: 4622–4626)。驚くべきことに、ADCC 活性を示す抗体はインフルエンザウイルスの亜型に関係なく A 型ウイルス全般と反応し、これに感染した細胞を除去できると報告されています (*J. Immunol.* 2014; **193** (2) :469–475)。このため ADCC 活性を持つ抗体を優先的に誘導できる新しいタイプのワクチン開発に焦点があてられています。

しかし、このようなワクチンをどうやって見つけたいいのでしょうか？ワクチン開発にはマウスモデルが使われますが、マウスは血液量が少ないため従来の ADCC アッセイのエフェクター細胞である初代 NK 細胞 (PBMC など) を必要量採取することができません。ここで活躍するのが、プロメガが開発したマウス ADCC Reporter Bioassay です。ワクチン候補で免疫したマウスの血清を採取し、マウス ADCC Reporter Bioassay で ADCC 活性の強さを調べれば、効率的に ADCC 活性を持つ抗体を産生できるワクチン候補を簡単にスクリーニングできます。マウス ADCC Reporter Bioassay はヒト ADCC Reporter Bioassay の Effector cells を改変し、抗体と結合する Fc γ 受容体をマウスの Fc γ RIV に置き換えたアッセイです (図 2)。ヒト用キットと同じ簡便なプロトコルでありながら、①マウスの *in vivo* と *in vitro* の結果をシームレスに解析できる、②ヒトとマウスでの効果と同じアッセイプラットフォームで比較ができる、という大きなメリットがあります。

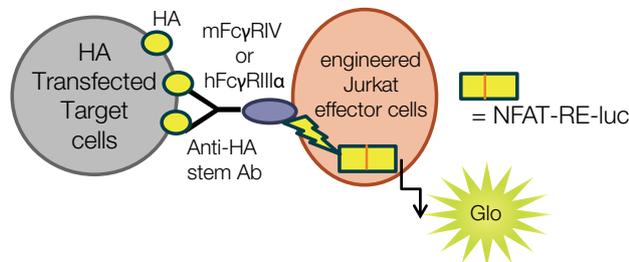


図 2. 抗インフルエンザ HA ワクチンの ADCC 活性評価

近い将来、インフルエンザワクチンは数年に 1 回接種するだけになるかもしれません。インフルエンザにかかりやすい方はどうぞ期待！

ここでご紹介した ADCC ベースのアッセイの他にも、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。次回の記事もお楽しみに！

今回ご紹介したバイオアッセイについての詳細は弊社までお問合せください。

コラム ウェブセミナーも要チェック！

以下のタイトルのウェビナーが 7/12、9/27 に開催されました。

- 処理容量を自由に換えられるマグネットビーズ法による抗体濃縮の効率化
Streamline Your Antibody Enrichment Using Scalable Magnetic Bead-Based Chemistries
- 免疫療法を加速させる免疫チェックポイントバイオアッセイ。
Immune Checkpoint Bioassays Power Combination Immunotherapy

以下よりウェビナーの記録やファイル、今後の予定をご覧いただけます。

Promega Webinars

検索

www.promega.jp/resources/webinars/

RNA を簡便に合成！ 今、注目される *in vitro* 転写システム

ファージ RNA ポリメラーゼベース (T7 /SP6) の *in vitro* 転写システムで合成された RNA は *in vitro* 翻訳やトランスフェクション、マイクロインジェクションによるタンパク質発現実験やウイルス RNA 実験などに利用されてきました。近年では iPS/ES 細胞のリプログラミングや分化誘導の実験やゲノム編集におけるガイドとしてさらに様々な用途に用いられています。

In vitro 転写は T7 や SP6 RNA プロモーターを有するベクターがあれば比較的簡単に RNA を大量調製することができます。また *in vitro* 転写反応にキャップアナログを付加することで翻訳の効率が飛躍的に向上します。プロメガの RiboMAX™ システムはこれまでに 1,000 件以上の利用実績のある信頼された RNA 合成システムです。



アプリケーション紹介

mg オーダーの RNA 合成とクリーンナップ

RiboMAX™ Large Scale RNA Production System

In vitro 転写反応により合成された RNA にはフリーのヌクレオチド、タンパク質、DNA などが含まれており、下流の実験を妨げる可能性があります。近年は iPS や ES 細胞へのトランスフェクションを行うために 1 度に多くの RNA を必要とするケースが多くなりました。RiboMAX™ Large Scale RNA Production System による大量の RNA 合成と PureYield™ RNA Midiprep System による RNA 精製により mg レベルの高純度な RNA を取得することができます。PureYield™ RNA Midiprep System は 200base から 20kb のインタクトな RNA を精製することができるシリカメンブレン技術を採用したキットでフェノール：クロロフォルム抽出やアルコール沈殿も不要です。*in vitro* 転写反応を標準的な 20μl 反応から 100–1,000μl にスケールアップし、PureYield™ と組み合わせることで大量の RNA 合成と精製を行います。

また、Vac®-Man Manifold (吸引装置) を用いればより簡便・迅速に RNA をクリーンナップすることができます。

詳細については以下をご覧ください。

www.promega.jp/resources/pubhub/purify-rna-transcribed-in-vitro-using-the-pureyield-rna-midiprep-system/



CRISPR/Cas9 で利用する sgRNA の合成にも利用いただけます！

Wei W, Xin H, Roy B, Dai J, Miao Y, Gao G (2014) Heritable Genome Editing with CRISPR/Cas9 in the Silkworm, *Bombyx mori*. PLoS ONE 9 (7) : e101210.

長鎖 RNA のハイスピード 合成

T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System

in vitro 転写は RNA ウイルスゲノムを合成するための最も一般的な方法の 1 つであり、現在ワクチン開発などに応用されているリバースジェネティクス法は *in vitro* で完全長 RNA の合成をベースとして確立されました。しかし、非常に長いゲノムを有する RNA ウイルスのゲノム RNA の合成は非常に困難です。T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System は従来の RiboMAX™ よりも短時間で効率的に RNA を合成することができます (ただし、キャップの付加には推奨しません)。T7 RNA ポリメラーゼプロモーターおよび完全長 HCoV cDNA 27.3kb を含むワクシニアウイルスベクターより T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System を用いて *in vitro* 転写反応を 10 分から 2 時間行い 27.3kb の長鎖 RNA を合成しており、10 分でも一定量の RNA が得られています。

詳細については以下をご覧ください。

www.promega.jp/en/resources/pubhub/enotes/t7-ribomax-express-generation-of-27kb-in-vitro-transcripts-in-minutes/

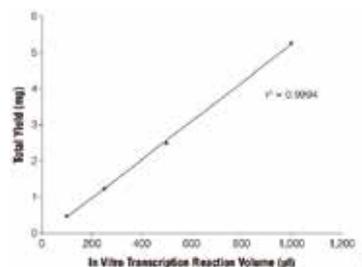


関連製品

製品名	サイズ	カタログ番号	定価 (¥)	特別価格 (¥)
RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-SP6	50 回分	P1280	40,000	32,000
RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7	50 回分	P1300	40,000	32,000
T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System	50 回分	P1320	50,000	40,000
PureYield™ RNA Midiprep System	10 回分	Z3740	17,000	13,600
	50 回分	Z3741	80,000	64,000

Ⓜ 期間限定プロメガクラブキャンペーン対象製品 ※期間限定：2016 年 10 月 11 日～12 月 22 日

プロメガクラブについては www.promega.co.jp/promegaclub.html をご覧ください。



RNA 合成反応液量と RNA 収量の関係

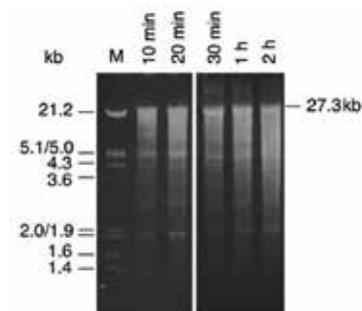
RNA 合成反応溶液 1ml から最大 5mg RNA のクリーンアップが可能



◀ PureYield™ RNA Midiprep System で精製した合成 RNA 各サンプルより 1μl を電気泳動 (1.2% アガロースゲル) した。添加した RNA のほとんどを回収した。A: 精製前の転写反応液 (+DNase 処理後)。B: 精製後の溶出液サンプル。



▲ Vac-Man® による PureYield™ RNA Midiprep System の吸引処理



RNA 合成反応のタイムコース▲
27.3kb HCoV cDNA を含むベクターをテンプレートとして、T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production を用いて RNA 合成した。10min, 20min, 30min, 1h, 2h 後のサンプルを 1% アガロースゲルで電気泳動した。

自動核酸精製装置 Maxwell® RSC Instrument を用いた 肺がんでの臨床応用のアプリケーション



自治医科大学
内科学講座
呼吸器内科学部門 教授
萩原弘一先生

個々の患者の遺伝的な違いなどを踏まえながら、患者ごとに最適な治療を施す「テーラーメイド医療」が広く受け入れられてきています。分子標的薬の奏功に関わる遺伝子変異の研究データは長年にわたり蓄積され、薬効に関連する遺伝子解析を事前に行うことで、患者ごとに薬剤の奏功を診断できる「コンパニオン診断」も普及してきました。また、近年では医薬品とともにコンパニオン診断薬が同時に販売されるケースも増えています。

プロメガの Maxwell® RSC Instrument は、細胞診検体、FFPE (ホルマリン固定パラフィン包埋切片)、末梢血など様々な臨床検体からのゲノム DNA や total RNA の精製にご利用いただいています。

その中から、自治医科大学 呼吸器内科学部門 萩原教授より、肺がんでの臨床応用のアプリケーションについてご説明いただきました。

イントロダクション:

分子標的薬が肺癌臨床に導入され10年余になる。患者検体中の遺伝子変異を検索することで、薬剤の抗腫瘍効果を予測することが可能のため、臨床検体での遺伝子変異検索は日常的な手技となった。遺伝子変異を検索するために、患者から採取される癌検体は多種にわたるが、組織検体・細胞診検体・血漿検体を主たる検体として取り扱っている。組織検体が標準とされるが、組織検体を全患者から採取するのは容易でない。

たとえば、初発肺癌が肺の末梢に発生した場合、内視鏡による擦過細胞検体が重要なサンプルになる。また、肺癌が血行性に脳など深部臓器に転移した場合(図1)、頭蓋内のため、組織を採取することは困難であり、ccfDNAが転移薬の遺伝子変異を知る唯一のサンプルになる。

これらの事例のように、すべての肺癌患者に適切な治療を行うために、どのような種類のサンプルからでも遺伝子検査が行えるようにしたいと考えている。

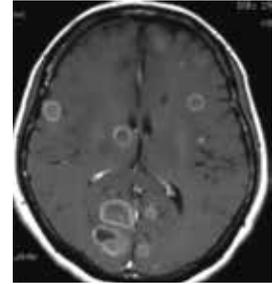


図1. 肺癌多発性脳転移
肺癌の多発性脳転移患者の頭部 CT
白くリング状に映し出された部分が
脳転移病巣。

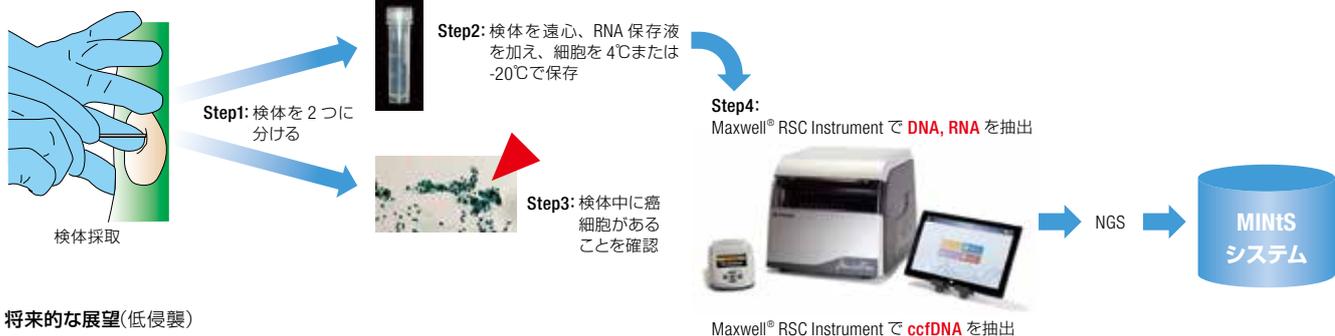
Maxwell® RSC Instrument とキットの利用法:

我々は、臨床で使用されている全ての分子標的薬の標的遺伝子を、次世代シーケンサーで検索する包括的遺伝子変異検査システム (MINTs システム) を開発している。患者から採取しやすい細胞診検体を用いて、すでに700検体を処理し、データベース化を行っている。この解析において、ゲノム DNA および total RNA の抽出は、Maxwell® RSC instrument とそのキットで行っている。当初、臨床検体からの total RNA の抽出は困難と考えていたが、検体採取直後に検体を遠心し、RNA 保存液中で保存し、Maxwell® RSC simplyRNA Cells Kit で total RNA を抽出したところ、ほぼ100%の患者で良好な品質の total RNA が得られ驚いている。同様に、Maxwell® RSC Cell DNA Purification Kit を用いたゲノム DNA 抽出においても、安定的に良質なゲノム DNA を得ることができている。当科において、煩雑で根気の必要なゲノム DNA および total RNA 抽出に Maxwell® RSC instrument は欠かせないツールとなっている。

今後の展開:

細胞診検体で良好な成績を上げている MINTs システムを、ccfDNA にも応用する検討を始めている。ccfDNA の抽出にも Maxwell® RSC instrument を用いているが、手動的に市販の ccfDNA 抽出キットを用いた場合の数倍の収量があり、DNA 品質も良好なことは嬉しい誤算であった。患者から採取する血漿量を減らせることは、患者に優しい医療を提供するために重要である。今後、ccfDNA のさらなる臨床応用を目指し、研究を進めていきたい。

現在の解析の流れ



将来的な展望(低侵襲)



図2. 細胞診検体からのゲノム DNA および total RNA 抽出のスキーム
気管支鏡で採取される気管支洗浄液、気管支擦過液、さらに胸水、髄液などからも良好な検体が得られる。検体中の癌細胞の病理学的確認は重要である。少量の血漿より ccfDNA を抽出・分析できれば患者の負担の少ない医療につながる。

関連製品

製品名	サイズ	カタログ番号	定価(¥)
Maxwell® RSC Instrument	1台	AS4500	2,800,000
Maxwell® RSC simplyRNA Cells Kit	48回分	AS1390	39,000
Maxwell® RSC Cell DNA Purification Kit	48回分	AS1370	41,000
Maxwell® RSC ccfDNA Plasma Kit	48回分	AS1480	96,000

機器貸出プログラム
RentaMAXで
体験してみませんか?
www.promega.co.jp/rentamax

超お買得!

ポンプだけ買うより安い

大好評につき期間延長 2016年12月22日 まで

吸引法スタートアップセットキャンペーン

これで吸引法がすぐできる!



吸引法はより簡便、迅速です!



セット 1

ゲルからの切り出し & PCR 産物精製セット
(カタログ番号 JKC003)

通常価格
¥161,000

→ ¥70,000

試薬として Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (50 回分) を含みます。その他ゲル切り出し用グッズ (x-tracta™ Gel Extractor 25 個)、吸引装置用小物 Vacuum Adapter (20 個) が付属します。

セット 2

プラスミド ミニプレップセット
(カタログ番号 JKC004)

通常価格
¥155,000

→ ¥70,000

試薬として Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System +Vacuum Adapters (50 回分) を含みます。

セット 3

プラスミド ミディ & マキシプレップセット
(カタログ番号 JKC005)

通常価格
¥178,000

→ ¥80,000

試薬は PureYield™ Plasmid Midiprep System (4 回分)、PureYield™ Plasmid Maxiprep System (2 回分) が含まれます。その他吸引装置用小物 Eluator™ Vacuum Elution Device (4 個) が付属します。

第 39 回

日本分子生物学会年会 バイオテクノロジーセミナー(ランチョンセミナー)のご案内
プロメガの最新の発光技術をご紹介しますセミナーを開催いたします。

“発光アッセイテクノロジーによる細胞内代謝産物の高感度測定および新規 PCA テクノロジー”

プログラム No.: 2BT16

日付: 12月1日(木) 11:55~12:45

会場: 第16会場(パシフィコ横浜 会議棟 5F 501)

●細胞内エネルギー代謝の高感度モニタリングを可能にする新しいアプローチ

がんや糖尿病など様々な疾患において細胞内の代謝経路が大きく変化することが知られており、代謝産物や代謝酵素を分析するためのアッセイは標準または疾患状態下に細胞内で要求される代謝を理解するための強力なツールです。がん研究などの分野で注目されている重要な細胞内代謝物(例: グルコース、乳酸、グルタミン、グルタミン酸および NAD(P)/NAD(P)H) を高感度に検出する発光アッセイ法をご紹介します、より精度・情報量を得るためのマルチプレックスアッセイの利点についてもお話しいたします。

●新規 タンパク質断片相補アッセイ HiBiT™ テクノロジー

従来のホタルルシフェラーゼ (60kDa) と比較して小さく (19kDa)、明るい (100 倍以上) NanoLuc® はこれまで利用されてきたレポーターアッセイだけでなく細胞内分子間相互作用定量システムとしてその用途を広げられました。細胞内分子間相互作用に利用された親和性の低い NanoLuc® の C 末短鎖ペプチド SmBiT と残りの LgBiT からなるタンパク質断片相補アッセイ (PCA) をさらに発展させ、高親和性の HiBiT-LgBiT ペアを作成することによりあらたな利用法が期待できます。本セミナーでは、HiBiT を用いた新規 PCA をそのユニークなアプリケーションと合わせてご紹介いたします。

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10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