Promega

かわら版

2017年 春号

Promega

KAWARABAN

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、プライマリー細胞不要！
T細胞活性化バイオアッセイ
三頁、タンパク質の部分変性を回避！
新たなタンパク質消化法
四～五頁、代謝物質をプレートリーダーで高速解析！
六頁、RT-qPCR + レポーターアッセイで
1 + 1 = 3 ⁉
七頁、野外トランスクリプトーム研究を支える
Maxwell® RSC 自動核酸精製装置

プロメガ株式会社

プライマリー細胞不要！ T 細胞活性化バイオアッセイ

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。

第四回目は「T Cell Activation Assays（T 細胞活性化アッセイ）」のお話です。

①そもそも T Cell Activation とは？

PD-1/PD-L1 チェックポイント阻害に代表されるがん免疫療法では、T 細胞活性化を抑制する機構の解除を目的としています。またがん免疫チェックポイント阻害に続くターゲットとして、積極的に T 細胞活性化を起こすパスウェイの活性化に期待が寄せられています。

ところで、そもそも T 細胞活性化（T Cell Activation）とはどのような現象をさすのでしょうか？詳しい説明は免疫学の教科書に譲りますが、非常にシンプルに定義すると「抗原の T 細胞受容体（TCR）刺激により IL-2 が産生されること」と言えます。この TCR から IL-2 産生（＝ IL-2 プロモーター活性化）につながるシグナル経路は複数ありますが、重要なものの一つが NFAT 経路です。カルシウムシグナルの転写因子として有名な NFAT は Nuclear factor of activated T-cells の略であり、もともと T 細胞活性化に深い関わりのある分子なのです。IL-2 プロモーターには NFAT シグナルを受け取る NFAT-RE とそれ以外のシグナル経路の刺激を受け取る領域があり、NFAT 経路は主に TCR/CD3 複合体を介して活性化され、TCR の co-receptor である CD28 を介したシグナルはそれ以外の領域を活性化することが分かっています。このメカニズムを再現した製品 T Cell Activation Bioassays では、主に TCR/CD3 経路の解析に使える NFAT レポーターを組込んだタイプ（図 1A）と、CD28 など他のシグナル経路の解析にも使える IL-2 プロモーターのレポーターを組込んだタイプ（図 1B）の 2 つを用意しました。

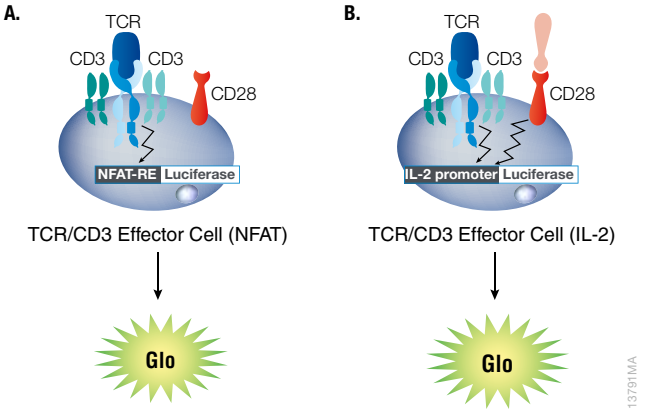


図 1. T Cell Activation Bioassay のアッセイ原理

この 2 つの使い分けは、解析対象シグナルが NFAT シグナル以外の経路に関与するかどうかをもとに考えます。例えば TCR/CD3 経路をブロックする PD-1/PD-L1 の解析には NFAT レポータータイプが使えますが、CD28 経路をブロックする CTLA-4 の解析には IL-2 プロモーター全長を持つ IL-2 レポータータイプが必要です。PD-1/PD-L1 のようにどちらも使える場合はシグナルが強い NFAT レポータータイプが使いやすいでしょう（図 2）。

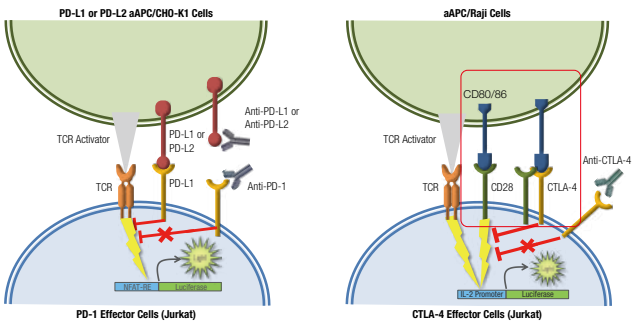


図 2. 2 つのタイプの使い分け

② T Cell Activation Bioassay アプリケーション

Anti-CD3 といった普通のモノクローナル抗体による T 細胞活性化の解析はもちろん、Abatacept（CTLA-4 R と IgG-Fc のキメラタンパク質）のような遺伝子組換え融合タンパク質や、Blinatumomab（CD3 と CD19 に結合する二重特異性抗体）などの評価に使用したアプリケーションもあります（技術ポスター：www.promega.co.jp/asy_search.html より“二重特異性抗体”で検索）。

しかしこのような使い方では、Jurkat がもともと持っている分子を介したアッセイしかできません。Jurkat が持っていない因子や変異遺伝子の解析などにも幅広く使いたい。そんな声に対応するため、**実はこのアッセイ、細胞増殖権利付きモデル（Cell Propagation Model, CPM）をご購入いただければ自由に細胞を改変できる**のです。つまり自分のターゲットとなる受容体を発現させたり、疾患原因となる遺伝子を欠損させたり、プローブとなるような分子を組込んだりすることで、自由にアッセイをデザインできるようになりました。これは今までのプロメガのバイオアッセイとは大きく違う特長です。細胞を改変したアッセイの一例として、キメラ抗原受容体（Chimeric Antigen Receptor, CAR）発現 T 細胞（CAR-T）アッセイをご紹介します。

CAR は腫瘍抗原に特異的なモノクローナル抗体可変領域の軽鎖（VL）と重鎖（VH）を直列に結合させた単鎖抗体（scFv）を N 末端側に、CD3ζ鎖を C 末端側に持つキメラタンパク質の総称です（図 3）。CAR を発現させた T 細胞は scFv 領域で腫瘍抗原を認識した後、その認識シグナルを引き続き CD3ζ鎖を通じて T 細胞内に伝達します。さらに T 細胞活性化を増強するため、scFv と CD3ζ鎖の間に共刺激分子（CD28、4-1BB のドメイン）を組み込んでいます。図 3 は CAR の構造と CAR 発現 NFAT エフェクター細胞でのアッセイデータです。

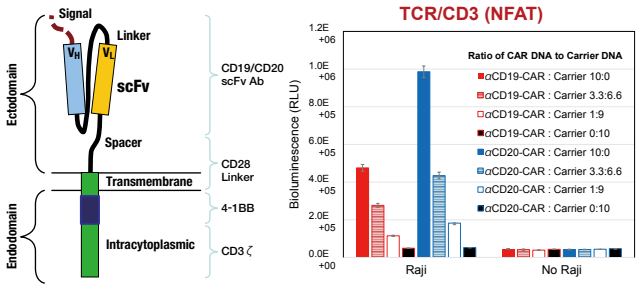


図 3. 抗 CD19 または抗 CD20 キメラ抗原受容体（CAR）構造と T Cell Activation Bioassay データ
左：CAR の構造。
右：TCR/CD3 Effector Cells（NFAT）に抗 CD19-CAR または抗 CD20-CAR ベクターを一過性に導入し、Raji 細胞と反応させた。導入した発現ベクター量依存的にシグナルが得られている。

今回ご紹介した T Cell Activation Bioassay は ADCC Reporter Bioassay をはじめ、多くのプロメガバイオアッセイのベースとなったアッセイです。このアッセイ、他のバイオアッセイとは違って細胞増殖権利付きモデル（Cell Propagation Model, CPM）をご購入いただければ、お好きなタンパク質を組込んだり、逆にノックアウトしたりと自由に改変できる点も見逃せません。次々出てくる免疫療法ターゲットをいち早く解析するためにも、アッセイ構築ベースとしてラボに常備いただきたい製品です。

関連製品

製品名		カタログ番号	価格（¥）
T Cell Activation Bioassay	（NFAT）	J1621	85,000
	（NFAT）5X	J1625	385,000
	（NFAT）, Propagation Model	J1601	お問合せ下さい
T Cell Activation Bioassay	（IL-2）	J1651	85,000
	（IL-2）5X	J1655	385,000
	（IL-2）, Propagation Model	J1631	お問合せ下さい

タンパク質の部分変性を回避！ 新たなタンパク質消化法

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。

第五回目は「ペプチドマッピング」のお話です。

バイオ医薬品の多くが抗体やホルモンなどのタンパク質製剤です。タンパク質製剤の品質管理ではタンパク質一次構造の解析が重要項目の一つであり、この解析法の一つにペプチドマッピング（ペプチドマップ法）があります。ペプチドマッピングとは、タンパク質を化学的または酵素的に消化してペプチド断片化し、ペプチド単位で検討する方法です。アミノ酸配列をはじめとする様々な情報が得られるため、特に酵素消化による断片化プロトコールはバイオ医薬品の品質評価法として広く使用されており、アメリカ、EU、日本の 3 者間で国際調和が検討されているテーマの一つです。

ただし現状では解決すべき問題もあります。そのうちの一つがタンパク質分解中にアミノ酸残基の脱アミド化やジスルフィド結合スクランブリングといった**変性**が起こってしまうことです。これらの問題はタンパク質品質評価を困難にさせ、長い間タンパク質解析担当者を悩ませてきました。この問題を解決すべく、プロメガは脱アミド化やジスルフィド結合スクランブリングを最低限に抑えられるタンパク質酵素消化システム **AccuMap™ Low pH Protein Digestion kit** を開発しました。

①タンパク質脱アミド化の抑制

タンパク質が脱アミド化されると、主にアスパラギン残基がアスパラギン酸またはイソアスパラギン酸に変換されます（図 1 左）。この反応が起きると、もともとアスパラギン酸だったのか、サンプル調製中に変換されたのか見分けがつかなくなり、アミノ酸配列決定に大きな影響を与えます。この脱アミド化はアルカリ性条件で起こりやすいため、アルカリ性条件で反応させるトリプシン消化ステップが原因の一つでした。脱アミド化を最低限に抑えるためには酸性条件下でトリプシン処理すればよいのですが、酸性ではトリプシン活性が低下してしまい断片化が不十分になるジレンマがありました。**プロメガはこの問題を解決するため様々な検討を行い、酸性条件下ではトリプシンのリジン残基切断効率のみが低下し、アルギニン残基の切断活性には影響がないことを突き止め**、酸性条件下でも活性を保つ特別な Lys-C と組合せることにより脱アミド化を起こさず効率よくペプチド断片化できる手法を開発しました（図 1 右）。

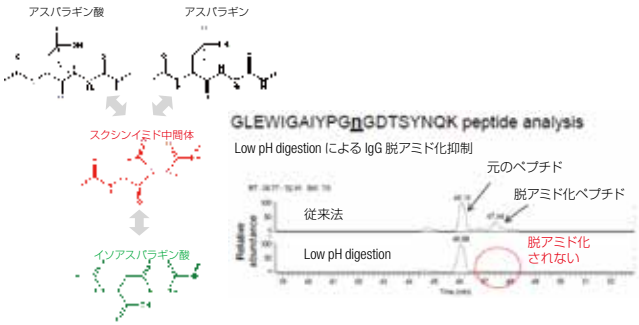


図 1. 脱アミド化メカニズム（左）と Low pH digestion による脱アミド化抑制（右）

②ジスルフィド結合スクランブリングの抑制

脱アミド化と並んで大きな問題となっているのがジスルフィド結合スクランブリングです。

ジスルフィド結合は適切な三次元構造を確立･維持するのに重要であり、タンパク質製剤などの機能維持に非常に重要です。このためジスルフィド結合の位置を決定することはタンパク質構造解析上重要な項目です。しかし、ペプチド断片化処理ステップにおいては、ネイティブなジスルフィド結合が開裂するだけでなく、しばしば本来とは異なる位置で結合を形成してしまいます。これがジスルフィド結合スクランブリングと呼ばれる現象であり、タンパク質のシステイン残基数が増加するにつれて飛躍的に解析が困難になります。たとえばシステイン残基 8 個を含むタンパク質の場合、対を形成しうるジスルフィド結合の組合せが計 105 個あります。抗体医薬品としては最も多いヒト IgG1 やヒト化 IgG1 にはジスルフィド結合を形成しうるシステイン残基が 28~32 個あると言われており、組合せはより複雑になります。

ジスルフィド結合スクランブリングもアルカリ性条件で起こりやすいため、脱アミド化抑制と同じく酸性条件でサンプル処理すれば大幅に抑制できます（図 2）。

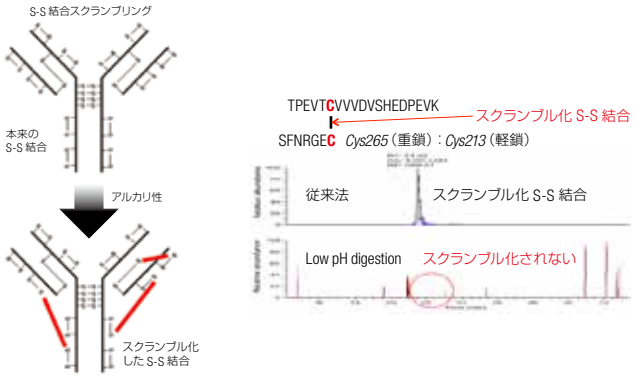


図 2. ジスルフィド結合スクランブリング

③酸化防止およびその他の条件検討

脱アミド化、ジスルフィド結合スクランブリングに次いで、メチオニン残基の酸化もペプチドマッピング解析に悪影響を与えます。プロメガでは様々な脱酸素剤を検討し、もっとも酸化防止効果が高かったものを Oxidation Suppressant としてキットに添付しています。

また酵素反応条件を酸性に最適化するため、タンパク質変性ステップや還元アルキル化ステップの条件もすべて最適化しており、ペプチドマッピング解析サンプル調製全ステップをカバーするプロトコールを開発しました。解析したいタンパク質と AccuMap™ Low pH Protein Digestion kit だけ用意すれば、ペプチドマッピングの悩みは解決します！お困りの方はぜひ一度お試しください。

短時間でも優れた消化を示す Rapid Digestion Kit

サンプルが届いたら、とにかくすぐに結果がほしい！という方には Rapid Digestion Kit がお勧めです。

サンプルを化学的に変性させるのではなく、熱変性させることにより大幅な時間短縮が可能になりました。これまで一晩かかっていた酵素消化ステップがたったの 30 分で終了します！

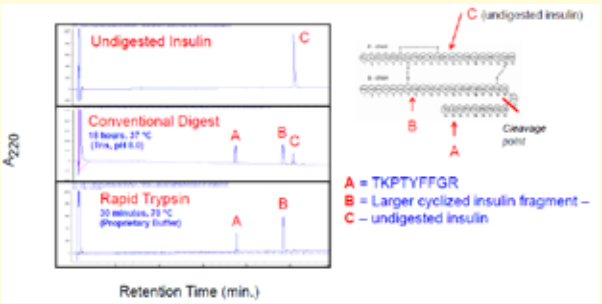


図 3. Rapid Digestion Kit によるインシュリンの消化

抗体の構造解析に必須の IdeS や IdeZ プロテアーゼはご存知ですか？

※ IdeS や IdeZ はかわら版 2016 年夏号をご覧ください▶ http://www.promega.co.jp/pdf/kawara1607_p2.pdf

関連製品

製品名	サイズ	カタログ番号	価格（¥）
AccuMap™ Low pH Protein Digestion kit	—	—	お問合せ下さい
Rapid Digestion Kit - Trypsin	100 µg	VA1060	35,000
Rapid Digestion Kit - Trypsin/Lys-C	100 µg	VA1061	53,000

代謝物質をプレートリーダーで高速解析!

細胞は周囲を取り巻く環境に適応するために細胞内のシグナル経路や代謝経路を変化させ、生存・分化・増殖といった運命決定を行っています。近年では癌細胞や細胞分化の過程でエネルギー代謝に変化が現れることが明らかとなり、創薬や再生医療の分野で新たな標的としてエネルギー代謝が注目を集めています。プロメガでは細胞の多様な応答性を細胞内外の酵素や代謝物を指標として簡便、高感度に測定するアッセイ技術を数多く開発してきました。今回はエネルギー代謝の主要なマーカーであるグルタミン、グルタミン酸、グルコース、乳酸を高感度な発光法で検出できる新たなアッセイシステムをご紹介いたします。

エネルギー代謝アッセイへの注目の高まり

幹細胞はその多能性を維持するために、解糖系に依存した代謝特性を示す一方、分化段階が進むにつれてミトコンドリアでの酸化的リン酸化の活性が高まり、代謝経路が移っていく事が知られています (Int. J. Mol. Sci. 2016, 17, 253)。昨今、がん領域で注目を浴びている免疫系においても、代謝経路の変化はホットなトピックであり、T 細胞の分化の際には解糖系からミトコンドリアでの代謝への変化が起きるといわれています (Nature Reviews, 2016, 16, 553)。

また代謝産物がエピジェネティックな制御に関与したり、脳・神経組織のように代謝産物が神経伝達物質として働くことも知られています (Cell Metabolism, 2016, 23, 27-47、Neuron, 2015, 86, 883-901)。

細胞周囲の代謝産物量の変化、細胞内の代謝経路の評価は今後、重要なアッセイの1つになっていくでしょう。

発光でのエネルギー代謝産物の測定

これまで、生体反応に関わっている様々な代謝産物を解析するには煩雑な MS 解析、HPLC、RI などの技術が必要となり、ボトルネックとなっていました。

このような背景を受けて、プロメガでは発光法でエネルギー代謝産物を測定する技術を開発しています。図 1 にはグルコース·乳酸·グルタミン·グルタミン酸の測定原理の概要を示しています。各測定対象に特異的なデヒドロゲナーゼがルシフェリン前駆体を還元することにより発光反応に必要なルシフェリンを生成するため、各産物の濃度に比例した発光を生じます。発光シグナルはルミノメーターで簡便に測定できるため、高価な機器の導入や煩雑な準備を行う必要はありません。また特殊な前処理を行う必要はなく、試薬の添加・混合のみで測定することができます。加えて、この技術は細胞内の測定だけではなく、細胞外 (培養上清) サンプルや組織サンプル、血液 (体液) サンプルにも対応可能です (図 1)。

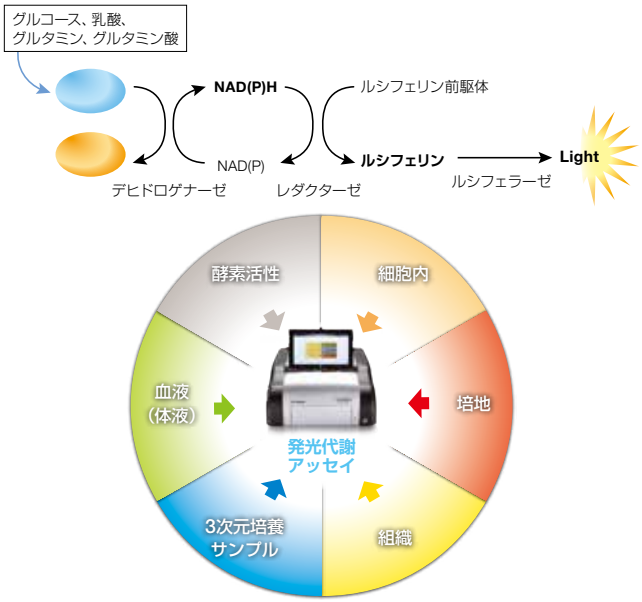


図 1. (上図) グルコース、乳酸、グルタミン、グルタミン酸 測定の原理。
(下図) 代謝産物測定アッセイで対応可能なサンプル例 。

培養上清や分化誘導した細胞を使ったアプリケーション

この技術を使って培養上清中の代謝産物の経時的な変化を測定したアプリケーションを図 2 に示しました。一般的な細胞株では増殖の際にグルコースとグルタミンを細胞内に取り込み、代謝産物として乳酸とグルタミン酸を培地中に放出します。

肺がん細胞株の A549 細胞を異なる細胞数で播種し、3 日間培養を続け、各タイムポイントで培養上清を回収しました。各サンプルは希釈して発光アッセイのタイミングまで凍結保存し、最後のサンプリング後に発光アッセイを行いました。

細胞数および培養日数に依存してグルコースとグルタミンの減少が観察され、その一方で、培地中の乳酸とグルタミン酸量の増加が観察されました。グルコースとグルタミンが細胞内に取り込まれ、代謝産物の放出がなされた結果を反映しています。

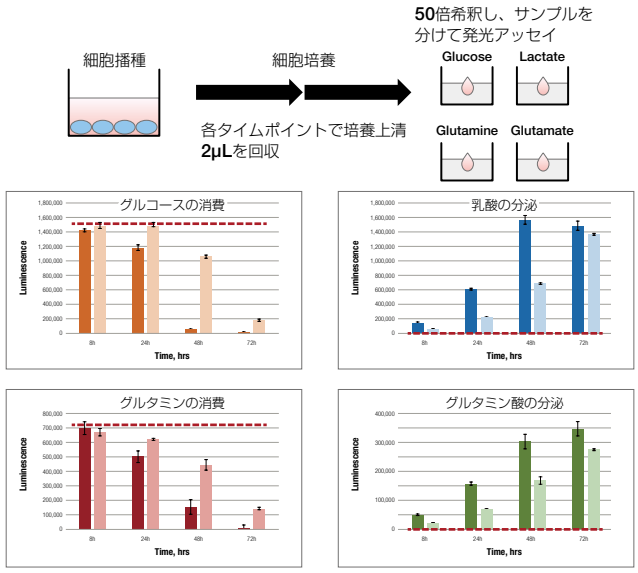


図 2. 培養上清を用いた、各代謝産物の経時的測定

各代謝産物のグラフにおいて、濃い棒グラフは 15,000 細胞の条件を示し、薄い棒グラフは 5,000 細胞の条件を示す。また、赤い点線は培地のみの測定値を示す。培地は DMEM, 5mM glucose, 2mM glutamine, 10% dialyzed serum を使用した。

図 3 にはマクロファージ様に分化誘導した細胞を用いた例を示しました。マクロファージには大きく分けて M1 型と M2 型と呼ばれる 2 つのサブグループが存在し、M1 型は炎症の惹起、M2 型は抗炎症反応に関与すると言われています。また、M1 型は解糖系が亢進している事が明らかになっています。

ヒト単球細胞株 THP-1 細胞を分化誘導し、各サブグループの代謝活性を評価したところ、M1 型ではグルコースの取り込み量と乳酸の分泌量が亢進している結果が観察されました。このような分化誘導による代謝活性の評価にも対応可能です。

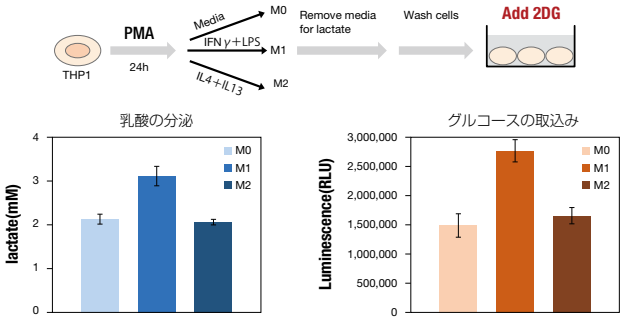


図 3. T 細胞における代謝活性の比較

THP-1 細胞を PMA で刺激し、マクロファージ様に分化誘導した。その後、M1 型は IFN γ +LPS 刺激にて、M2 型は IL4+IL13 刺激にて分化誘導した。その後、培養上清中の乳酸量 (左グラフ) およびグルコースの取り込み量の評価 (右グラフ) を行った。

※ Glucose Uptake はかわら版 2016 年夏号をご覧ください▶ http://www.promega.co.jp/pdf/kawara1607_p3.pdf

マルチプレックスアッセイへの対応

分化誘導や化合物刺激の後に、細胞の代謝を調べたい場合、化合物処理や分化誘導が細胞にダメージを与えてしまったり、生存性に影響を及ぼしてしまい、アッセイ結果に影響が出てしまう事はありませんか？特に図 3 のような分化誘導をおこなったサンプルや生体由来の細胞、未分化な細胞といった貴重なサンプルには、出来る限り1つの実験で複数のパラメーターが取得できる実験が望ましいのではないでしょうか？

プロメガではマルチプレックスアッセイ（同一のサンプルに対して、複数パラメーターを取得するアッセイ）にて、より精度の高いデータを取得する実験を推奨しており、様々な組み合わせの事例があります。

図 4 は細胞内のグルタミン酸量の測定と合わせて、生存細胞数と細胞内 ATP 量を測定したアプリケーションです。まず、生細胞の還元能を指標とした RealTime-Glo™アッセイまたは生細胞に特異的なプロテアーゼ活性を測定する CellTiter-Fluor™ 蛍光アッセイで生細胞を測定しました。次に細胞ライセートを調製し、その一部を用いたグルタミン酸量の測定や CellTiter-Glo® アッセイを用いて生細胞由来の ATP を 測定しています。貴重なサンプルでのアッセイにおいて余すところなくデータを取得することができます。

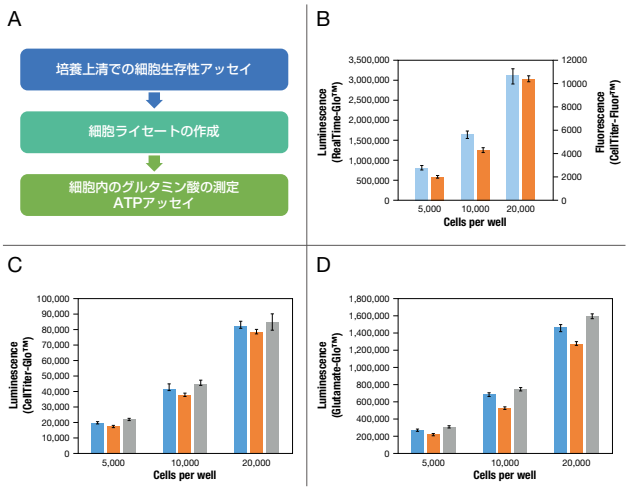


図 4. グルタミン酸量の測定アッセイのマルチプレックス例

A549 細胞を各細胞数で well に播種し、生存細胞、細胞内グルタミン酸量、ATP 量の測定を行った。

A. アッセイの概要と流れ

B. 培地中での生細胞試験（青色のバー：RealTime-Glo™）と、蛍光法での生細胞試験（オレンジ色のバー：CellTiter-Fluor™）

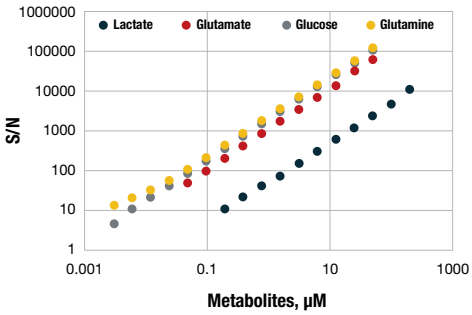
C. 調製した細胞ライセートに含まれる ATP 量を CellTiter-Glo® 2.0 Assay にて測定（青色のバー：RealTime-Glo™）実施後の細胞（オレンジ色のバー：CellTiter-Fluor™）実施後の細胞（グレーのバー：未処理の細胞）

D. 調製した細胞ライセートに含まれるグルタミン酸量を Glutamate-Glo™ Assay にて測定（上記と同様）

最後に

図 2 や 4 の例のように、プロメガの発光アッセイではわずか数μ L のサンプルからでも測定を行う事が可能です。図 5 に各アッセイの測定レンジを示しました。この発光アッセイ法は pico mol レベルからの検出が可能であり、測定レンジも広いため従来の蛍光法では解釈が困難な実験結果を明瞭に示すことができます。

この他、様々なアプリケーション例を開発中であり、iPS 細胞 由来の分化細胞や分化誘導した脂肪様細胞、T 細胞の代謝活性評価なども行っています。詳細は弊社 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。



測定サンプル	検出下限	直線性	S/B 比
Lactate	100nM (5pmol/50 µl)	Up to 200 µM	>240
Glucose	5nM (0.25pmol/50 µl)	Up to 50 µM	>1000
Glutamine	5nM (0.25pmol/50 µl)	Up to 50 µM	>1000
Glutamate	5nM (0.25pmol/50 µl)	Up to 50 µM	>500

図 5. 乳酸・グルコース・グルタミン・グルタミン酸の測定レンジ

キーポイント

- ☑ **簡単な測定プロトコル・高価な機器不要** ➡ Add to Measure の簡単なホモジニアスアッセイでルミノメーターで測定可能！
- ☑ **頑強で高感度なアッセイ** ➡ バックグラウンドの低い発光測定で、幅広いレンジでの測定が可能！
- ☑ **様々なサンプルでの応用例** ➡ 培養細胞に加え、組織や体液サンプルの例もあり。もちろんマルチプレックスアッセイにも対応！

参考文献

- Donna Leippe et al. J Biomol Screen 2016 Nov. 1087057116675612.
- A Cacace and P Sonveaux et al. Oncogene, 1–11., 2016

関連製品

Assay kit	測定用途	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Lactate-Glo™ Assay	乳酸量の測定（発光）	5 ml	J5021	74,000
Glucose-Glo™ Assay	グルコース量の測定（発光）	5 ml	J6021	67,000
Glutamate-Glo™ Assay	グルタミン酸量の測定（発光）	5 ml	J7021	74,000
Glutamine/Glutamate-Glo™ Assay	グルタミンとグルタミン酸量の測定（発光）	5 ml	J8021	80,000
CellTiter-Glo®2.0 Assay	生細胞測定（ATP・発光）	10 ml (100 回分)	G9241	15,000
CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay	生細胞測定（生プロテアーゼ・蛍光）	10 ml (100 回分)	G6080	17,000
RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay	生細胞測定（還元能・発光）	100 回分	G9711	20,000
Glucose Uptake-Glo™ Assay	グルコース取り込み能の測定（発光）	5 ml (50 回分)	J1341	63,000

「機器がないから…」⬅ 大丈夫です、ご相談ください！

RentaMax : ルミノメーター貸出しプログラム
本稿でご紹介した発光法によるエネルギー代謝アッセイはルミノメーター(ルシフェラーゼアッセイでおなじみ発光測定装置）で測定することができます。ルミノメーターを利用できない場合は弊社の GloMax ルミノメーターをお貸出しいたします（詳細については **www.promega.co.jp/rentamax/** をご覧ください）。プロメガの試薬 & 検出装置の組み合わせで最適なアッセイパフォーマンスが得られます。詳細はお気軽にお問い合わせください。

RentaMAX はプロメガのルミノメーター / 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。

代謝アッセイも

プロメガ のルミノメーターが最適！

- ☑ 超高感度
- ☑ クロストークゼロ
- ☑ スーパーワイドダイナミックレンジ

プロメガ　NanoLuc®　検索

RT-qPCR + レポーターアッセイで 1 + 1 = 3 !?

生命現象や細胞内の作用機序を真に理解するためには、外的な実験操作を最小限にし、細胞にもともと存在する**内在性**タンパク質およびそれらによるシグナルパスウェイの機能や挙動を解析するという方向性が重要になってきます。近年は CRISPR などのゲノム編集技術を利用した内在性の遺伝子発現解析、あるいは単一細胞レベルでの解析のニーズが高まっており、より**高感度**な検出システムが必要とされています。現在、遺伝子発現解析実験には RT-qPCR 法やレポーターアッセイが広く用いられていますが、各々メリットとデメリットがあるため 1 つの手法だけでは十分な発現解析データが得られない場合があります。今回はこれら 2 つの実験手法の組み合わせにより、より信頼性の高い実験結果を示すことができることをご紹介します。さらに、その効果が 10 倍にも 100 倍にもなる、プロメガの新しいルシフェラーゼレポーター NanoLuc® をご紹介します。

レポーターアッセイと RT-qPCR の違い

遺伝子発現解析実験にはレポーターアッセイや RT-qPCR 法が広く用いられています。それぞれ解析対象が異なり、また各々特徴および、メリット・デメリットがあります。

	RT-qPCR	発光レポーターアッセイ
測定対象	mRNA	転写活性
解析目的	複数遺伝子の発現プロファイリング / 相対的発現比較 (**どの遺伝子**が動くのか?)	単遺伝子の発現 カイネティクス (特定の遺伝子または シグナル経路が**どの程度**動くのか [ex. IC_{50}, EC_{50}])
情報の内在性	○	△
artifact	△ RNA 精製 逆転写反応 プライマー配列 PCR 反応	○ トランスフェクション 発光反応
情報取得のタイミング	細胞溶解時 (RNA 精製)	細胞溶解時 または経時的 (生細胞)
補正方法	ハウスキーピング遺伝子	2nd レポーター

RT-qPCR 法は内在性の遺伝子発現量を定量できるという特長があります。RT-qPCR の問題点として、実験の過程での RNA の分解、逆転写反応や PCR 反応による酵素的な artifact、プライマーおよびプローブの特異性の差、また指数関数的な PCR データによる誤差の拡大等が挙げられ、タンパク発現量を正確に反映できているか疑問であるという声を多く耳にします。一方で、レポーターアッセイはレポータープラスミドを細胞に導入する点で、外来的な実験手法となりますが、発光量測定による転写・翻訳されたルシフェラーゼ酵素の直接的な定量であるため、**対象のプロモーター活性やシグナル応答を高い再現性で定量できます。**

しかも transient な transfection 技術を用いることにより、わずかな期間で容易にデータを得ることができます。

レポーターアッセイで RT-qPCR のデータを補強

RT-qPCR の問題点を補強する形でレポーターアッセイの実験を併用する手法が、多くの論文で用いられています。例えば、京都大学　山中伸弥教授のノーベル医学生理学賞の受賞理由となった論文[1]では、得られた iPS 細胞の評価のため、各種 ES マーカー遺伝子の semi-qPCR を実施し、さらにこの中で代表的な ES マーカー Oct3/4 および Nanog のプロモーターのレポーターアッセイで詳細な解析を行い、より定量性の高いデータを示してます。

このように、RT-qPCR で得られた発現解析結果に加え、さらに詳細なプロモーターおよびシグナル解析をレポーターアッセイで行うことにより、より定量的かつ説得力のあるデータを示すことができます。

RT-qPCR　　レポーターアッセイ

発現量の変動する遺伝子を特定 ＋ 特定遺伝子の発現カイネティクス解析 ＝ **信頼性の高い説得力のあるデータ**

1) Kazutoshi Takahashi and Shinya Yamanaka, Cell 126, 663–676, 2006

RT-qPCR + NanoLuc® レポーターで 1 + 1 = 300 ?!

プロメガはこのレポーターアッセイの用途を飛躍的に広げる、より高感度で定量性の高い NanoLuc® Luciferase (Nluc) を開発しました。NanoLuc® は深海エビ (*Oplophorus gracilirostris*) 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 (19kDa) です。また、従来のホタルルシフェラーゼ (Fluc) に比べ、100 倍以上の発光値を示すので、これまで検出が難しかったより微小なシグナルの検出や標的タンパク質の遺伝子と融合させることによりタンパク質レベルの発現解析 (タンパク質レポーター) が容易になります (図 1)。

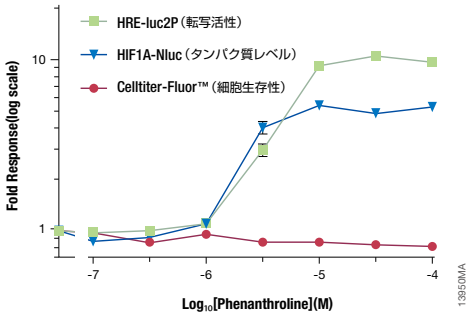


図 1. HEK293 細胞のフェナントロリン処理による用量反応

CellTiter-Fluor™により細胞生存性を蛍光測定した後、HIF1A-Nluc 融合タンパク質および低酸素応答配列を含むレポーターベクターより発現したホタルルシフェラーゼを NanoDLR™アッセイで測定した (本実験で使用したベクター、アッセイ試薬を特価でご利用いただけます。詳細については 8 ページをご覧ください)。

実験技術の進歩により、初代培養細胞や単一細胞レベルでの解析、ゲノム編集によるエンドジニアスな解析など高感度での検出が求められています。新しい Nluc はこのような最先端の実験手法に完全に適応する次世代型の発光レポーターです。

NanoLuc® レポーターの活用例

お客様の声

京都府立医科大学　中央研究室 RI センター
研究教授　勝山 真人先生

1960 年代に我が国で多発した亜急性脊髄視神経末梢神経障害 (スモン) はキノホルムによる薬害ですが、その発症メカニズムは未だ不明です。私は培養神経系細胞株を用い、キノホルムによって起こる遺伝子発現の変化を調べています。

DNA チップを用いた網羅的解析で、キノホルムが VGF という痛みに関わるペプチドの前駆体の発現を誘導することがわかっていたのですが、VGF 遺伝子のプロモーター解析をきっかけに、転写因子 c-Fos の発現誘導を介する現象であることを見出しました[2]。NanoLuc® の系を用いたのですが、ホタルルシフェラーゼの系よりも発光検出器での測定値が高く、より信頼性の高いデータが得られたと記憶しています。以降はずっと NanoLuc® の系を愛用しています。

2) Masato Katsuyama, *et al.* "Clioquinol Increases the Expression of VGF, a Neuropeptide Precursor, Through Induction of c-Fos Expression" Journal of Pharmacological Sciences 124, 427-432, 2014

NanoLuc® シグナルベクターおよび関連製品を特別価格でご提供！
以下のシグナルパスウェイ解析用のシグナルベクター (非カタログ品を含む) およびその他の NanoLuc® 関連試薬の特別価格については本誌最終ページ (8ページ) をご覧ください。

転写因子	応答エレメント	シグナル経路
GPCR シグナル伝達経路		
CREB	CRE	cAMP / PKA
NFAT	NFAT RE	カルシウム / カルシニウリン
ELK / SRF	SRE	MAP / ERK
SRF	SRF RE	RhoA
AP1	AP1 RE	MAPK / JNK
ストレスシグナル伝達経路		
Nrf2	ARE	酸化ストレス
p53	p53 RE	DNA 損傷
ATF6	ATF6 RE	小胞体ストレス
ATF4	ATF4 RE	小胞体ストレス
MTF1	MRE	重金属ストレス
Hif1 α	HRE	低酸素
AhR	XRE	生体異物ストレス
AP1	AP1 RE	MAPK / JNK
各種シグナル伝達経路		
NF- κ B	NF- κ B RE	NF- κ B
STAT1 : STAT2	ISRE	INF- α
STAT3 : STAT3	SIE	IL-6
SMAD3 : SMAD4	SBE	TGF- β
STAT5 : STAT5	STAT5 RE	IL-3
STAT1 : STAT1	GAS RE	JAK / STAT1 IFN- γ
	C / EBP RE	複数経路
TCF-LEF	TCF-LEF RE	Wnt
Myc : Max	Myc	Myc

野外トランスクリプトーム研究を支える Maxwell® RSC 自動核酸精製装置

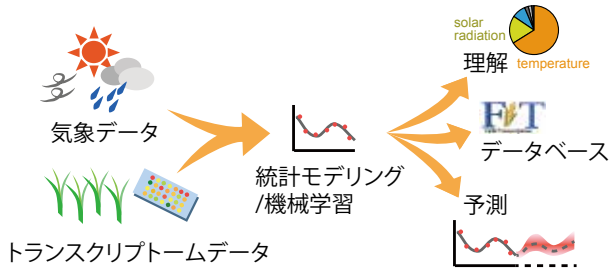
龍谷大学農学部
植物生命科学科
講師　永野惇先生

イントロダクション：

分子生物学の多くの研究は、実験室で育てた生物を材料として行われています。しかしながら、生物は野外環境において生育し、進化してきました。いうまでもなく、野外環境では複数の環境要因が同時に、かつ複雑に変化します。これは、コントロールされたシンプルな環境である実験室とは大きく異なった環境です。そのため、実験室で取られたデータだけでは野外における実際の生物のふるまいを理解することは困難であり、分子生物学を現実の諸問題解決に十分生かすことができていない原因になっています。そこで我々のグループでは、野外環境下で多数のサンプルからトランスクリプトームデータを取得し、それらのデータと気象データを合わせて統計モデリングを行うことで、この問題に挑んでいます。例えば、水田のイネを用いた研究では、気温などの環境要因へのトランスクリプトームの応答を定量的に明らかにするとともに、栽培期間の任意のタイミングでのトランスクリプトームを気象データから予測することを可能としました（図1、Nagano *et al.*, (2012), Cell）。

Maxwell® RSC Instrument とキットの利用法：

野外では環境要因が複雑に変動し、それを人間が制御することはできません。そのため、統計的手法を駆使したデータ解析を行うために**数百から数千サンプルのデータ**を取得することが必要です。また、野外で得られる**サンプルは多くの場合、実験室と比べて不均質**なものとなります。このようなサンプルから安定的に RNA の抽出を行うために、我々の研究室では Maxwell® RSC Instrument を用いています。多検体を処理するためのシステムは、マニュアルの 96 ウェルフォーマットのものなど他にもありますが、サンプルが不均質なため 96 サンプルの準備に時間がかかり、技術補佐員の方の勤務時間に収まらないなどの問題がありました。 **Maxwell® RSC Instrument** では、一度に処理できるのは 16 サンプルですが、その分、**柔軟な運用が可能**で、重宝しています。また、**自動化**されているため、マニュアルで抽出していたころと比べて、**失敗が減り、非常に安定した収量**が得られるようになりました。



Nagano *et al.*, (2012) Cell

図 1. 野外トランスクリプトームデータと気象データのモデル化
これによって実際の野外環境下における環境応答をトランスクリプトームレベルから理解できる。また、任意の気象条件下のトランスクリプトームの予測が可能となる。

今後の展開：

野外トランスクリプトーム研究をさらに拡張していくために、さまざまな技術開発に取り組んでいます。例えばこれまでに、低コストでハイスループットな RNA-Seq システムや、トランスクリプトームデータと気象データとの統計モデリングのための計算ライブラリを確立してきました（Iwayama *et al.*, (2017), Bioinformatics）。今後はこれらを活用して、野外と実験室をつなぐ研究を進めていきたいと考えています。

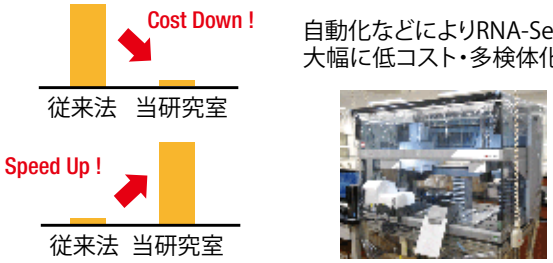


図 2. RNA-Seq ライブラリ調製の低コスト・多検体化

共同研究先での利用：

我々の研究室では、RNA-Seq だけでなく、WGS や GBS(ddRAD-Seq) といった様々な NGS 解析のライブラリ調製を多検体化しており、多くの研究室と共同研究を行っています。共同研究先で対象としている生物は、植物のみならず動物、真菌、細菌など多岐にわたっており、中には**核酸抽出が困難なサンプルもしばしば含まれます。**プロメガでは**条件検討サービス**や**機器の一時的な貸し出しサービス**などがあるため、あまり分子生物学を得意としていない共同研究先にも導入を勧めやすいと感じています。実際、Maxwell® RSC Instrument は、**分子生物学実験に慣れていない学生などでも NGS 解析グレードの核酸を安定的に抽出できる**ので、いくつかの共同研究先でも利用されるようになりました。

関連製品

製品名	サイズ	カタログ番号	価格（¥）
Maxwell® RSC Instrument	1 台	AS4500	2,800,000
Maxwell® RSC Plant RNA Kit	48 回分	AS1500	39,000

あなたの研究を進める

難しいサンプル検討サービス開始！

植物・土壌細菌など困難なサンプルの核酸抽出を無償で検討いたします。

難しいサンプルからの核酸精製検討サービスについての詳細、お問合せは
promega.formstack.com/forms/muzusample をご覧ください

特別価格で研究力が上がる！

細胞アッセイビッグバン レベルアップキャンペーン

2017年 4月10日～ 6月23日 受注分まで

細胞の生死

細胞生存性 / 毒性のエンドポイント & リアルタイムアッセイ

製品名	サイズ	カタログ番号	価格（¥）	特別価格（¥）
リアルタイムアッセイ				
RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay	100 回分	G9711	20,000	14,000
CellTox™ Green Cytotoxicity Assay	10 ml	G8741	16,000	9,600
エンドポイントアッセイ				
CellTiter-Glo® 2.0 Assay	10 ml	G9241	15,000	9,000
CellTiter-Glo® 3D Cell Assay	10 ml	G9681	16,000	11,200
CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay	10 ml	G6080	17,000	10,200

カスパーゼ 3/7 発光エンドポイントアッセイ

製品名	サイズ	カタログ番号	価格（¥）	特別価格（¥）
Caspase-Glo® 3/7 Assay	2.5 ml	G8090	21,000	12,600

NanoLuc® テクノロジー（強発光・低分子の発光レポーター）

NanoBiT® タンパク質：タンパク質相互作用発光アッセイ

製品名	サイズ	カタログ番号	価格（¥）	特別価格（¥）
NanoBiT® PPI MCS Starter System	1 システム	N2014	180,000	108,000
NanoBiT® PPI Flexi® Starter System	1 システム	N2015	180,000	108,000

※クローニングベクター（MCS［制限酵素サイト］または Flexi®［Flexi® クローニング］）、アッセイ試薬、コントロールなどが含まれます。

NanoLuc®/ ホタルルシフェラーゼデュアルレポーターアッセイ

製品名	サイズ	カタログ番号	価格（¥）	特別価格（¥）
Nano-Glo® Dual-Luciferase®/pNL 1.1.TK Bundle	1 セット	N1521	80,000	40,000
Nano-Glo® Dual-Luciferase®/pNL1.1 PGK Bundle	1 セット	N1531	80,000	40,000
Nano-Glo® Dual-Luciferase®/pGL4.54[luc2/TK] Bundle	1 セット	N1541	80,000	40,000
Nano-Glo® Dual-Luciferase®/pGL4.53[luc2/PGK] Bundle	1 セット	N1551	80,000	40,000
Nano-Glo® Dual-Luciferase® ReporterAssaySystem（デュアル）	10 ml	N1610	39,000	31,000
Nano-Glo® LuciferaseAssay（シングル）	10 ml	N1110	23,000	18,000

※ Bundle は表示のベクターとデュアルアッセイ試薬のセット品。

エネルギー代謝

グルコース取込み発光アッセイ

製品名	サイズ	カタログ番号	価格（¥）	特別価格（¥）
Glucose Uptake-Glo™ Assay	5 ml	J1341	63,000	44,100

NAD(P)H 発光アッセイ

製品名	サイズ	カタログ番号	価格（¥）	特別価格（¥）
NAD/NADH-Glo™ Assay	10 ml	G9071	90,000	63,000
NADP/NADPH-Glo™ Assay	10 ml	G9081	90,000	63,000

NanoLuc® シグナルベクター

製品名	サイズ	製品番号	価格（¥）	特別価格（¥）
pNL [NlucP/NFAT-RE/Puro] Vector	20 µg	—	非カタログ品	78,000
pNL [NlucP/NFAT-RE/Hygro] Vector	20 µg	—	非カタログ品	78,000
pNL [NlucP/CRE/Hygro] Vector	20 µg	—	非カタログ品	78,000
pNL [NlucP/p53-RE/Hygro] Vector	20 µg	—	非カタログ品	78,000
pNL [NlucP/ATF6-RE/Hygro] Vector	20 µg	—	非カタログ品	78,000
pNL [NlucP/ATF4-RE/Hygro] Vector	20 µg	—	非カタログ品	78,000
pNL [NlucP/MRE/Hygro] Vector	20 µg	—	非カタログ品	78,000
pNL [NlucP/HRE/Hygro] Vector	20 µg	—	非カタログ品	78,000
pNL [NlucP/GAS-RE/Hygro] Vector	20 µg	—	非カタログ品	78,000
pNL [NlucP/ISRE/Hygro] Vector	20 µg	—	非カタログ品	78,000
pNL [NlucP/SIE/Hygro] Vector	20 µg	—	非カタログ品	78,000
pNL [NlucP/STAT5-RE/Hygro] Vector	20 µg	—	非カタログ品	78,000
pNL [NlucP/AP1-RE/Hygro] Vector	20 µg	—	非カタログ品	78,000
pNL [NlucP/CEBP-RE/Hygro] Vector	20 µg	—	非カタログ品	78,000
pNL [NlucP/MycMax-RE/Hygro] Vector	20 µg	—	非カタログ品	78,000
pNL[NlucP/ARE/Hygro] Vector	20 µg	—	非カタログ品	78,000
pNL[NlucP/SRE/Hygro] Vector	20 µg	—	非カタログ品	78,000
pNL[NlucP/SRF/Hygro] Vector	20 µg	—	非カタログ品	78,000
pNL[NlucP/SBE/Hygro] Vector	20 µg	—	非カタログ品	78,000
pNL [NlucP/TCF/LEF-RE/Hygro] Vector	20 µg	—	非カタログ品	78,000
pNL [NlucP/XRE/Hygro] Vector	20 µg	—	非カタログ品	78,000
pNL3.2.NF-B-RE [NlucP/NF-B-RE/Hygro] Vector	20 µg	N1111	73,000	51,100

上記シグナルベクターの注文方法については promega.formstack.com/forms/nvect2017 をご覧ください。

低酸素ストレスシグナル検出用

製品名	サイズ	カタログ番号	価格（¥）	特別価格（¥）
pGL4.42[luc2P/HRE/Hygro] Vector	20 µg	E4001	73,000	51,100
pNLF1-HIF1a [CMV/neo] Vector System	20 µg	N1381	73,000	51,100

NanoLuc ユーザー講演会：NanoLuc® の無限の可能性

NanoLuc® は従来のルシフェラーゼよりも非常に明るく（ホタルの 100 倍以上）、分子量が小さい（19kDa）という大きな特長により、ホタルルシフェラーゼを用いたレポーター実験を改善するだけでなく、タンパク質レポーターとして新たな可能性が広がっています。細胞内タンパク質の挙動を調べるための高感度 / 極小の発光タグとしてタンパク質の安定性・分解、タンパク質間相互作用［NanoBRET™ ,NanoBiT®］）の実験等に利用され、さらにはタンパク質レベルの簡便な発現解析や高速タンパク質ブロッティング検出［HiBiT™］などが開発されています。今回は発売から 4 年を経過して、NanoLuc® テクノロジーをご利用いただいている先生方を講師にお招きし、研究成果をご講演いただきます。また、本社より開発責任者 Frank Fan も参加いたしますので NanoLuc® に関する最新技術などもお聞きいただけます。

東京会場: 9 月 13 日（水）／秋葉原 富士ソフトアキバプラザ【13:30 開演予定】 **大阪会場**: 9 月 15 日（金）／大阪千里 千里ライフサイエンスセンター【13:30 開演予定】

事前登録

セミナー参加希望の方は以下のサイトより事前登録をお願いいたします。

promega.formstack.com/forms/nlucseminar2017

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2017年3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