

2017年 夏号

Promega

KAWARABAN

プロメガ
テクノロジーで
創薬、がん研究を
サポートします。

二〜三頁、

発現タンパク質検出法に革命！
〜極小の発光タグでありのままのタンパク質機能解析を〜

四頁、アポトーシス & ネクローシスを
リアルタイムに一発測定

五頁、ターゲットエンゲージメントが切り拓く
キナーゼ標的創薬

六頁、プレートリーダー論…
プロメガが求め、磨き上げる、真のスペック

七頁、遺伝子関連検査を支える
核酸自動抽出装置 Maxwell® RSC, FFPE 編

発現タンパク質検出法に革命！

～極小の発光タグでありのままのタンパク質機能解析を～

近年、生きた細胞を用いて生理現象を“ありのまま”検出したいというニーズが高まっており、特にライブセルでの実験系、ゲノム編集によるタンパク質の機能解析など、より内在的な解析法が求められています。プロメガは抗体を用いることなくこれまで実現が難しかった“生きたまま”の細胞でもタンパク質量が可能な画期的な発光タグシステムを開発しました。HiBiT system は 11 アミノ酸のペプチドタグと、それに結合する相補的な NanoLuc® ルシフェラーゼ断片と基質を用いた発光法によって目的タンパク質を検出する技術です。すでに実用化されているタンパク質検出タグとして、アフィニティータグ (His、c-Myc、FLAG 等) や GFP 等の蛍光タンパク質が知られていますが、簡便性、親和性、アプリケーション、ランニングコストの面で長所と短所があるため、実験により使い分ける必要がありました。HiBiT system はタンパク質量に関して、これらいずれの点においても高い性能を持ち、これまで難しいとされた様々な実験系を実現できる世界初の新規発光タグシステムです。

- 生細胞で“生きたまま”タンパク質量が可能 (生細胞アッセイ)
- 小さなタグ (11 アミノ酸) : ウィルスゲノム挿入やゲノム編集への応用
- 抗体不要で迅速・簡便に溶液中、プロットングメンブレン上のタンパク質量が可能 (細胞溶解アッセイ)

HiBiT 開発までの道のり

2012 年、プロメガはより明るく小さい新規のルシフェラーゼとして NanoLuc® ルシフェラーゼを開発しました。これにより従来のレポーター遺伝子アッセイの高感度化だけでなく、タンパク質レポーターとして新たなアプリケーションにも展開できるようになりました。

2015 年、大小 2 つの NanoLuc® 断片の相補性を利用した NanoBiT® System をタンパク質間相互作用の解析ツールとして開発しました。この技術により、これまで難しかった生細胞でのタンパク質間相互作用を高感度に定量できるようになりました。開発の過程で大きな断片である Large BiT (LgBiT) [約 18kDa] と相補性を持つ小さなペプチド断片 (11 アミノ酸) をスクリーニングし、最も親和性の低い断片 (Kd=190 μM) を Small BiT (SmBiT) として NanoBiT® に採用しました。さらに、最も高い親和性を有するペプチド (Kd=700 pM) を HiBiT と名づけ、発現タンパク質を高感度に検出するための発光タグとして様々なアプリケーションについて検討を行いました。

アルファテスターのご協力

HiBiT は不可能を可能にする新しいタンパク質検出方法として広範な用途への利用が考えられ、多くの方にテスターとしてご意見を賜りました。日本国内でも 30 名以上のテスターの方に種々のテスト実験をして頂き、頂いたフィードバックをもとに製品開発の参考にさせて頂きました。そのうちの 3 名のテスター参加者への導入エピソードをご紹介します。

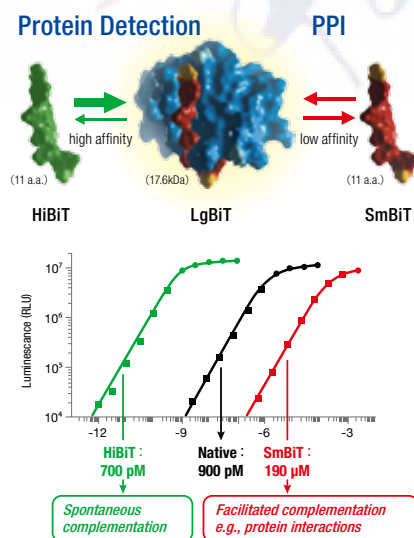


図 1. スクリーニングより得られたペプチドと LgBiT との親和性



レポーターのウィルスゲノムへの導入

大阪大学微生物病研究所 分子ウイルス分野 福原崇介 先生

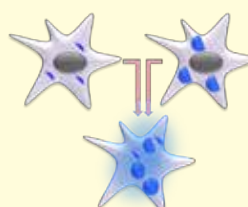
福原先生はハイスループットなスクリーニング系構築のための、様々なウイルスを利用した変異ウイルスレポーター作製を研究しておられました。問題点として、小型ウイルスでは Firefly などの大きなルシフェラーゼの挿入は困難であるという点がありました。そんな中、小型のレポーターとして NanoLuc® をご使用頂き、C 型肝炎ウイルスなどの小型ウイルスへの導入が可能であることを検証頂いておりました。さらに今回、ペプチドレベルまで最小化した HiBiT をご紹介し、これまでレポーターの挿入が不可能であった多くのウイルスにレポーターの導入が可能になるとの声を頂き、検証して頂いております。



ハイスループットかつ“生きたまま”の分泌タンパク質量

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 システム発生・再生医学研究分野 松島隆英 先生

松島先生はこれまで分泌タンパク質の細胞外での定量に様々な手法を検討されておりました。ELISA assay や質量分析の手法では相性のよい抗体が必要、また HTS に向かないなどの問題がありました。そこで、NanoLuc® 融合タンパク質を用いた実験系をご紹介し、特に HTS での簡便な実験系ができるようになりました。さらに今回 HiBiT をご紹介し、より内在的な解析のための CRISPR-Cas9 system によるゲノム編集が可能になり、培養細胞だけでなく最終的には究極的な“生きたまま”の実験系であるマウス in vivo 解析へと展開して頂いております。



筋芽細胞の細胞融合の定量化

名古屋大学 医学部保健学科 理学療法学専攻 亀高 諭 先生

亀高先生は骨格筋が再生する際に見られる筋芽細胞の融合現象の定量化の手法を探しておられました。細胞融合のモニタリングにはこれまで GFP や RFP などの蛍光タンパク質が一般的でした。2 つの細胞にそれぞれの蛍光タンパク質を発現させ、細胞融合によりそれらが merge し、ダブルポジティブな細胞をイメージングにより細胞融合を評価する系です。ただしこの手法は基本的にはイメージングでの定量であるため、定量性やスループットに限界がありました。今回 HiBiT をご紹介したところ、細胞融合により発光定量ができる点に注目頂き、これまで実現できなかった細胞融合の定量化手法としてご検討頂くことになりました。

9 月の NanoLuc® ユーザー講演会では、上記 3 名のテスターの先生に HiBiT を利用した研究についてご発表頂く予定です。

詳細および参加登録については最終ページをご覧ください。

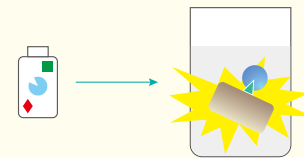
HiBiT の特徴とアプリケーション

HiBiT システムのベースとなる HiBiT は大きさがわずか 11 アミノ酸であり、高い親和性 ($K_d = \text{約 } 1 \text{ nM}$) で LgBiT と結合して NanoLuc[®] を再構成し、強い発光を生じます。この非常に明るい光により過剰発現させることなく内在レベルで発現する目的タンパク質の定量化が可能であり、CRISPR 等のゲノム編集技術と組み合わせて内在ローカスにこの HiBiT タグを埋め込むことで実質的にあらゆるタンパク質の発現をモニタリングすることができます。また、SDS-PAGE で分離した HiBiT タグ付きタンパク質をブロットングし、LgBiT を含む検出試薬を添加するだけでフェムトグラムレベルの感度でタンパク質を検出することができます。さらに、細胞を溶解することなく HiBiT タグタンパク質の細胞表面発現、膜受容体の内在化、また分泌タンパク質を数分で測定することもできます。シンプルな 1 回試薬添加のアッセイプロトコルなのでハイスループットアプリケーションにも最適です。

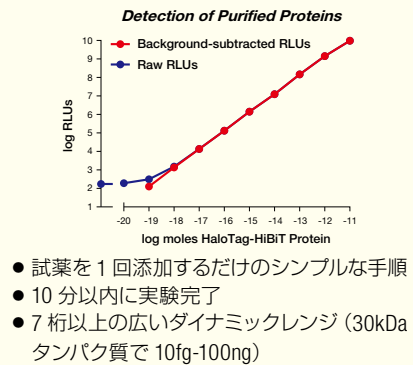
1

細胞ライセートのタンパク質量

HiBiT Lytic Assay



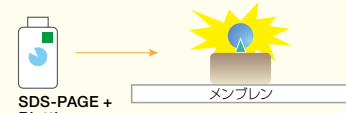
目的タンパク質に HiBiT を付加し、細胞内で発現させ、細胞溶解成分を含む試薬 (LgBiT、NanoLuc[®] 基質を供給) を添加して発光測定する。



2

ブロットングメンブレン上でのタンパク質量

HiBiT Blotting



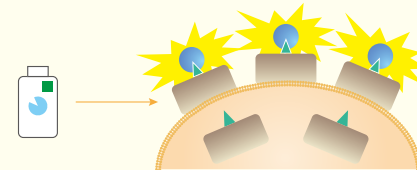
● 試薬を 1 回添加するだけのシンプルな手順
● 30 分以内に実験完了
● 抗体不要・特異的: シグナルは HiBiT と LgBiT の結合でのみ検出
→ 非特異的バンドは検出されない

HiBiT 付加タンパク質を発現させた細胞を溶解し、SDS-PAGE 泳動、メンブレン転写する。メンブレンに LgBiT および NanoLuc[®] 基質を含む試薬を添加し、目的タンパク質をバンドとして検出する。

3

生細胞の膜タンパク質、分泌タンパク質の定量

HiBiT Extracellular Assay



出フォーマットにより、受容体の細胞内移行、受容体のリサイクリング、タンパク質分泌、細胞膜移行をリアルタイムで測定可能。

アプリケーション例

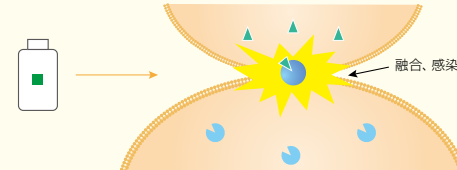
● GPCR 受容体の生細胞での内在化定量

HiBiT を付加したタンパク質として発現した膜タンパク質・分泌タンパク質等を細胞を生かしたまま定量する。検出試薬に含まれる LgBiT は細胞膜非透過性なので細胞表面のタンパク質または細胞外への分泌タンパク質のみ検出できる。シンプルな添加・検

4

細胞内タンパク質会合による細胞融合、ウイルス感染の検出

HiBiT Intracellular Assay



※本アプリケーションでは2つの細胞にそれぞれLgBiT、HiBiTを発現させる。

応用することにより、内在性ゲノム、ウイルスゲノム中の遺伝子のマーカーとして利用可能。

アプリケーション例

● ウイルス感染あるいは複製 (極小 HiBiT がウイルスゲノムへの挿入に好適)
● 細胞融合
● アクセプター細胞への Exosome デリバリー
● 生細胞での細胞内タンパク質の定量

2 種類の細胞あるいは細胞とウイルスなどの組み合わせで、それぞれの細胞に LgBiT、HiBiT を発現させ、それらが融合すると自発的に会合し、基質添加により発光定量する。挿入配列の長さに制限のあるウイルスゲノムや CRISPR-Cas9 によるゲノム編集に

細胞溶解アッセイ

生細胞アッセイ

キーポイント

- ✓ **明るい** ⇒ 高輝度 NanoLuc[®] の発光
- ✓ **シンプル** ⇒ 抗体不要、標準的なルミノメーター
- ✓ **小さなタグ (11 アミノ酸)** ⇒ 対象タンパク質への影響が最小限、ゲノム編集に最適

HiBiT システムは **9 月! 堂々発売スタート!!**

詳細については弊社までお問合せください。

アポトーシス & ネクローシスをリアルタイムに一発測定

細胞が増殖するのか、それとも細胞死が起こるのか…細胞に起こる現象を調べることは、遺伝子機能の解析や創薬開発などの研究における初期ステップの1つです。これまでに種々のマーカーを用いて、細胞の増殖やプログラムされた細胞死（アポトーシス）を評価・測定する手法が開発されています。アポトーシスマーカーであるカスパーゼのアッセイ法は操作性もシンプルであり、スクリーニングなどの用途に最適ですが、細胞内の酵素を測定するために細胞を溶解するエンドポイントアッセイであり、最も活性の高いタイミングを事前に見極める必要がありました。Annexin V を利用した測定方法は細胞表面に起こる変化を捉えているため細胞を破壊せずにアポトーシスの形成過程（細胞死メカニズム）を詳細に観察するためにはきわめて有用です。今回プロメガが開発した発光 Annexin V アッセイは、従来のフローサイトメトリーによる検出法で抱えていた簡便性、スループットなどに関わる問題を解決すると同時に経時的な観察を可能にしたアポトーシスアッセイの決定版とも言えるツールです。

アポトーシスと Annexin V

アポトーシスは不要な細胞や老化した細胞、異常な細胞を取り除く、分子機構に制御された細胞死です。DNA のフラグメント化やミトコンドリア膜電位の変化などがアポトーシスの特徴として知られており、アポトーシスの検出マーカーに活用されています。細胞膜の内側に存在するリン脂質、フォスファチジルセリン (PS) もその1つです。

PS は細胞膜の内側のみに局在しますが、アポトーシスが起こると PS は細胞膜の外側に露出ようになります。Annexin V はカルシウムイオン依存的に PS に強く結合するリン脂質結合タンパク質です。Annexin V の特性を活用し、初期アポトーシスの検出に利用されています。

発光法を用いた Annexin V・PS の検出

従来法では蛍光標識した Annexin V と、細胞膜非透過性の DNA 結合蛍光色素を用いて、アポトーシスとネクローシスをフローサイトメトリーを使って評価しています。アポトーシス初期には PS を介して結合した蛍光 Annexin V により標識された細胞が検出されます。後期アポトーシスでは、細胞膜の完全性が失われるため、より強い Annexin V の標識がなされるのに加え、DNA 結合蛍光色素が細胞膜を透過し、DNA に結合することで蛍光シグナルを発するようになります。

フローサイトメトリーを使用するメリットの1つとして、細胞集団中の生細胞、アポトーシス、ネクローシスの細胞の割合を出せる点があります。その一方で、フローサイトメーターでの測定ではサンプル調製が煩雑・スループット性が低いというデメリットがあります。

従来法のデメリットを改善するため、プロメガは得意の発光測定技術を活用し、Annexin V をプレートリーダーで測定可能にしました。図 1 にはその原理を示しています。

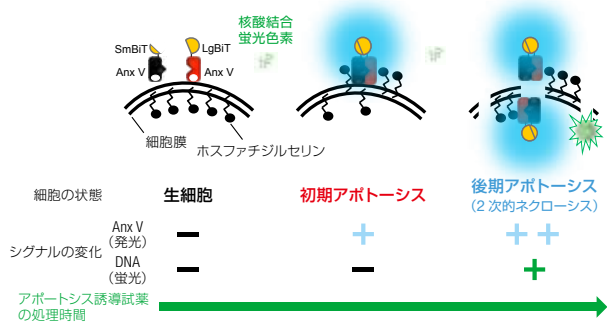


図1. Real-time™ Glo Annexin V Apoptosis Assay の原理

プロメガは、NanoLuc® をもとに開発した NanoBiT® の各タグと Annexin V の融合タンパク質 (SmBiT-AnxV および LgBiT-AnxV) を合成しました。これら融合タンパク質を試薬としてアポトーシスを起こした細胞に振りかけると、細胞膜外に露出した PS と SmBiT-AnxV / LgBiT-AnxV が結合、PS との結合を介して AnxV が重合し、SmBiT : LgBiT が接合、NanoLuc® の酵素活性が回復します。すなわち、Annexin V と PS の結合を発光シグナルにて評価します。また、細胞膜非透過性の DNA 結合色素も加える事で、従来法と同じく後期アポトーシスも同時に解析することが出来ます。

(NanoBiT® については、かわら版 2016 年春号をご覧ください: www.promega.co.jp/pdf/kawara_1604_p2.pdf)

経時的なアポトーシスの評価・測定

プロメガは Annexin V 検出技術を発光アッセイに応用して従来法よりも高感度・低バックグラウンド測定を可能にただでなく、アポトーシスの経時変化を追跡できるリアルタイムアッセイを実現しました。アポトーシスの評価では測定タイミングが重要なファクターであり、従来法

では複数のサンプルを用意し、最適なタイムポイントを見出す必要がありました。

プロメガの Annexin V の発光測定では、**試薬を添加するのみで、細胞を培養した状態で経時的にアッセイできるため、1枚のプレートから多くの情報を引き出す事が可能**です〔アポトーシス + ネクローシス〕× 経時変化〕。

図2にはアポトーシス誘導を行い、経時的に Annexin V の測定を行った例を示しました。Annexin V の発光シグナルの増加の後に、DNA 結合試薬の蛍光シグナルの増加が観察されており、1枚のプレートから最適な測定タイミングや細胞死の作用機序を調べる事が可能です。

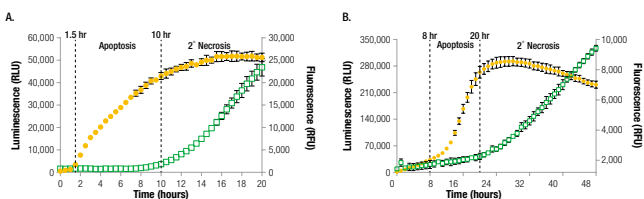


図2. 経時的なアポトーシス / ネクローシスアッセイ

DLD-1 細胞を 400 ng/mL rhTRAIL (パネル A)、K562 細胞を 1.1 μM Bortezomib (パネル B) でそれぞれ処理してアポトーシスを誘導した。検出試薬を加えたタイミングを 0hr とし、各点線は Annexin V 検出試薬 (発光: ●) と DNA 結合試薬 (蛍光: □) のシグナルが検出され始めたタイミングを示す。

Annexin V に付加した NanoBiT® の発光は非常に強くプレートリーダーで高感度にアッセイすることができますが、さらにその発光強度によりオリンパス社 LV-200 を用いた発光イメージングにより初期アポトーシスの様子を観察することができます。

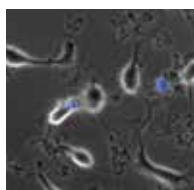


図3. LV200を用いた Annexin V の発光イメージング

HeLa 細胞にスタウロスポリン (終濃度 1 μM) を添加し、アポトーシスを誘導した。添加 2.5 時間 (左図) および 5 時間 (右図) の代表的な像を示す。LV200 (Olympus) にてイメージングを行い、位相差と発光の像を重ねあわせた。<オリンパス社秋吉様の御厚意によりデータ提供>

最後に

今回紹介した Annexin V に加え、カスパーゼの活性化もアポトーシスの主要なマーカーとしてよく使用されています。Annexin V のシグナルが上がってきたタイミングでカスパーゼの活性評価を行うマルチアッセイも可能です。プロメガには発光でカスパーゼの活性を測定する技術もあります。Annexin V とカスパーゼ活性の同時評価についてもお気軽にお問い合わせください。

キーポイント

- ✓ **簡単な測定プロトコル** ➡ Add to Measure の簡単プロトコル・最大 48 時間までの経時的なアッセイが可能。
- ✓ **フローサイトメーター不要** ➡ 発光測定と蛍光測定に対応したプレートリーダーにて簡便に測定可能! Throughput も格段にアップ!
- ✓ **様々なサンプルでの応用例** ➡ 通常の 2 次元培養サンプルに加え、3 次元培養サンプルや共培養アッセイ (CTL アッセイ) にも応用可能。

RealTime-Glo™ Annexin V Assay については 7 月末発売予定

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay (アポトーシス & ネクローシス デュアルアッセイ)	100 回分	JA1011	80,000
	1000 回分	JA1012	400,000
RealTime Glo™ Annexin V Apoptosis Assay (アポトーシス シングルアッセイ)	100 回分	JA1000	68,000
	1000 回分	JA1001	340,000
Caspase-Glo® 3/7 Assay (アポトーシス: カスパーゼ 3/7 アッセイ)	10 ml (100 回分)	G8091	75,000

ターゲットエンゲージメントが切り拓くキナーゼ標的創薬

近年のブロックバスターは多くが抗体医薬をはじめとするバイオ医薬品になっているとはいえ、キナーゼや GPCR は創薬ターゲットとして魅力がある分子です。実際に、2016 年 2 月の時点で開発中の低分子性抗がん剤のうち 68% がキナーゼ阻害剤であり、特にチロシンキナーゼファミリーをターゲットとしたものが多いという報告 (1) もあり、創薬ターゲットとしてキナーゼが重要であることが分かります。特定の酵素やキナーゼファミリーに特異性が高い化合物の探索だけでなく、新たな阻害剤評価法や評価項目も出てきており、様々なキナーゼ解析手法がとられるようになってきました。ここでは、キナーゼ阻害剤解析や探索においてプロメガが提供する多様な解析法をご紹介します。

(1) 分子標的薬開発 (2016 年 2 月時点) scads.jfcr.or.jp/db/table.html

キナーゼ阻害剤スクリーニング

キナーゼアッセイは RI 標識したリン酸を使う方法、リン酸化タンパク質特異的抗体を使う方法、基質リン酸化の電荷の違いにより検出する方法など、様々なアッセイ法が考案されてきました。プロメガはすべてのキナーゼに共通の基質である ATP に着目し、反応前後の ATP 量を比較することでキナーゼ活性を測定する Kinase-Glo[®] を開発、のちにこれを改良して反応生成物の ADP を検出する ADP-Glo[®] を開発しました(図 1)。

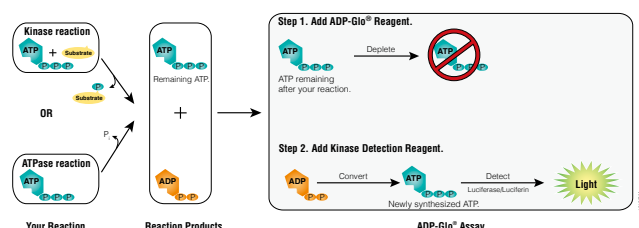


図 1. ADP-Glo[®] アッセイ原理

ATP や ADP を検出する手法により、これまでは RI アッセイ以外では難しかった全長タンパク質、糖や脂質のような分子を標的基質とするキナーゼアッセイを、ペプチドを基質とするキナーゼと同様にアッセイできるという大きな長があります(図 2)。またキナーゼ反応後の残存 ATP を検出する Kinase-Glo[®] に比べ、反応生成物である ADP を検出する ADP-Glo[®] は非常に高感度であり、活性の弱いキナーゼや少ない酵素量でも高感度なアッセイができるようになりました。ルミノメーターさえあれば測定できる簡便さから、基礎研究から HTS まで幅広く使用されています。特に HTS では、擬陽性が少ないロバストなアッセイ系として高く評価されてきました。

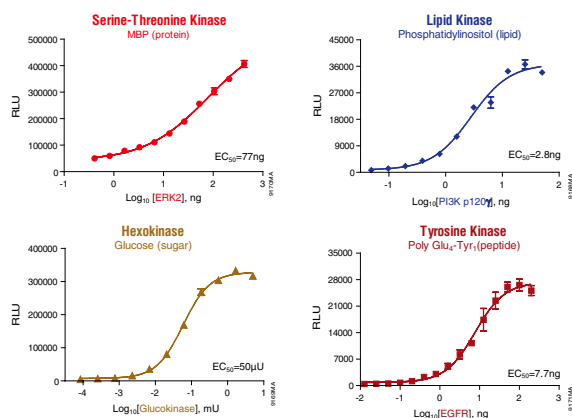


図 2. 様々な基質の ADP-Glo[®] アッセイデータ事例 タンパク (ERK2)、ペプチド (EGFR)、脂質 (PI3K)、糖 (Glucose)

また、より簡便にキナーゼ阻害剤を研究できるよう、174 種のキナーゼについて精製キナーゼ・基質・反応バッファーをセット化した Kinase Enzyme System を用意しました (KES リスト www.promega.com/a/kinase/)。

キナーゼのプロファイリング

キナーゼをターゲットにした創薬では、特異性の高い化合物を見つけた、また見つけた化合物が他のキナーゼファミリーと反応するかどうか調べたい、というニーズが高まっています。このようキナーゼファミリーにおけるプロファイル解析系は自作するのは容易ではありません。受託サービスという方法もありますが、受託サービスには様々なメリットがある一方、ちょっとやってみたい場合には利用しにくく、また化合物を外部に出不せない場合は利用できません。ADP-Glo[®] Kinase Enzyme System をキナーゼファミリーごと、またはヒトの Kinome を代表する

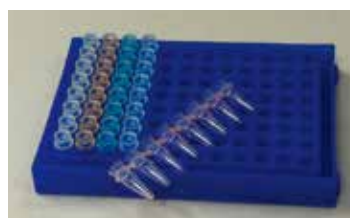


図 3. Kinase Selectivity Profiling System の酵素・基質ストリップ

パネルにまとめてセット化した Kinase Selectivity Profiling System は、自分で簡単にキナーゼプロファイリングをしたいというニーズに応える製品です。各酵素と基質はチューブストリップに分注されており、使用する際に希釈して混合するだけで理想的なキナー

ゼ活性が得られるよう調製済みです。特定ファミリーでの簡単なチェックから Kinome 全体の本格的なプロファイリングまで、柔軟に使い分けできるのも魅力の一つです。

細胞内での薬剤結合活性および滞留時間測定 (ターゲットエンゲージメント)

近年はターゲットからの解離が遅く、より長く効果を発揮する阻害剤を目指した開発が行われています。キナーゼ阻害剤においても同様に滞留時間 (Residence time) 測定のニーズが高まっています。また創薬ターゲットとして有望なチロシンキナーゼ型受容体ファミリーは膜貫通型キナーゼであり、これまでは全長タンパク質でのアッセイが難しく、阻害剤スクリーニングでは精製した活性ドメインのみ使用することが一般的でした。かわら版号 (www.promega.co.jp/pdf/kawara_1610_p3.pdf) でご紹介した TE アッセイ (Target Engagement Assay [細胞内蛍光標識化合物結合試験]) を利用すれば、従来法では解析が困難であった膜貫通型キナーゼやサイズの大きなキナーゼについても生細胞内におけるキナーゼ結合活性および滞留時間の測定を簡便に行うことができます。また、TE アッセイでは Type I 阻害剤の他、Type II やアロステリック阻害剤の評価もできることが分かっています。図 4A は様々なタイプの阻害剤による Kinase Tracer と Abl キナーゼ結合阻害実験例です。Type I 阻害剤の Dasatinib、Type II 阻害剤の Imatinib と Ponatinib、Type III かつアロステリック阻害剤である GNF2 を評価したところ、全タイプの阻害剤において Kinase Tracer の結合阻害活性が観察されました。また、結合阻害活性が報告されているキナーゼ阻害活性ともよく相関し、Dasatinib や Ponatinib では GNF2 や Imatinib に比べて強い活性を示しました。

これらの滞留時間を測定したところ、第一世代の Imatinib は添加後数十分でプラトーに達しており比較的解離が早いことを示していますが、第二世代の Dasatinib や Bafetinib、さらに第三世代の Ponatinib は非常に滞留時間が長く、非常にゆっくりとした解離が観察されています(図 4B)。簡便に滞留時間を測定できる TE アッセイが強力なツールになることは間違いありません。

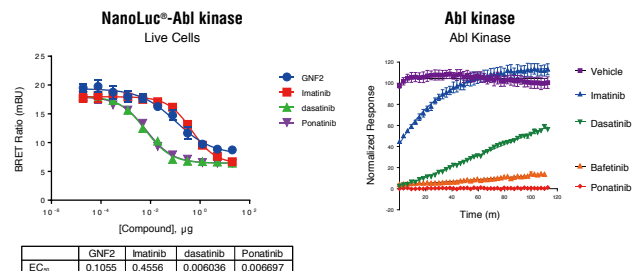


図 4A. Type I, II 阻害剤と ATP 非拮抗型阻害剤 図 4B. 各阻害剤の滞留時間

キナーゼの TE アッセイは現時点でヒトキノーム全体のうち 120 種以上の全長キナーゼ解析システムを構築済みであり、カタログ製品化に先立ち先行販売しております。ご興味がある方は是非お問合せ下さい (E-メール: prometec@jp.promega.com)。

プレートリーダー論： プロメガが求め、磨き上げる、真のスペック

マイクロプレートを用いたアッセイに多く用いられる測定法として、吸光度、蛍光、発光を用いた方法が一般的です。それぞれの測定技術は、試薬および装置の発展のもと、それらを最大限利用することにより、使いやすいものになります。ルシフェラーゼを用いた発光の場合、本来は発光時間が一瞬であったものを長時間光らせるという工夫が試薬の大きな発展であり、また装置はより高感度の測定が可能な検出器を利用することなどが挙げられます。

プロメガが考える優れた検出システムとは？

- **優れた装置** ▶ 最適化が不要で、すぐに信頼できる正確なデータが得られること
- **優れた試薬** ▶ サンプルに影響を与えず、より簡単に多くの情報が得られること

今回は発光アッセイを最大限に利用するために有効な、高感度、ワイドダイナミックレンジ、低クロストークについて考えます。

「高感度」について

プロメガの発光試薬はどのルミノメーターでも測定できるように発光シグナルを大きくするように設計されていますが、試薬側の改良に限界があるのも事実です。典型的なものがレポーターアッセイであり、細胞内タンパク質の発現検出を得意とするルシフェラーゼレポーターと蛍光レポーター GFP をプレートリーダーで測定するとルシフェラーゼの感度の良さがわかります(右図)。しかし、感度の高いレポーターを選択しても細胞数、トランスフェクション効率などにより発現量自体が少なければ試薬の性能ではカバーできない場合もあります。このような場合でも高感度な検出装置であれば結果を得ることができますが、低感度装置では十分なシグナルが得られないため実験条件の見直しに時間を割かなければなりません。プロメガはこのような問題を回避するために、フォトンカウンティング法を採用し、高感度化を実現しました。

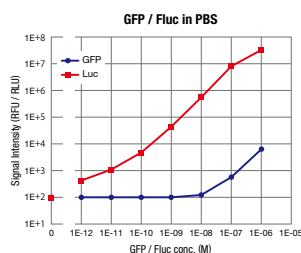


図 1. GFP と Fluc の発光強度の比較
GFP および Fluc の PBS 溶液を GloMax® で測定した。GloMax® 以外の装置でも同様の結果を得た。

「ワイドダイナミックレンジ」について

新しいアッセイ系のため発光量が予想以上に高く検出限界を超えてしまうなど、先の「高感度」とは逆のケースを考えます。このような場合はアッセイを見直すのが一般的ですが、ダイナミックレンジが狭い装置では Gain を変えることにより測定を可能にする方法もあります。Gain の変更は一見良さそうですが、実験を変更する度に Gain を調整する必要があります。また、装置によっては、最大発光ウェルを指定して Gain をアジャストすることにより測定しますが、実際には指定したウェルより高発光量のウェルがあると検出上限を超え、そのウェルは諦めるか、再度 Gain 調整しなければならないなど煩わしさがあります。プロメガのルミノメーターでは高発光量時には電流測定法、微量検出時には最高感度が得られるフォトンカウンティング法を併用し、ダイナミックレンジ8桁以上を実現しました。ダイナミックレンジの広い測定器なら発光量の高いサンプルを希釈したり、機器の調整などを行うことなくすぐに測定することが可能なのです。

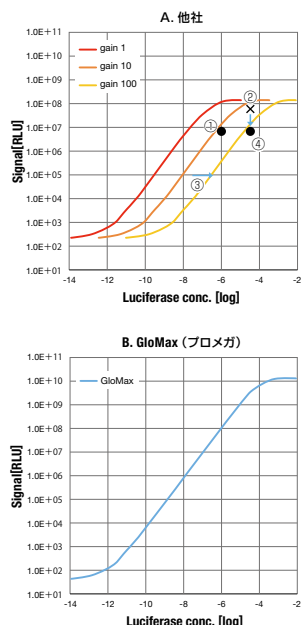


図 2. GloMax® のダイナミックレンジと他社装置のゲイン調整イメージ

パネル A. ユーザー指定の最大発光ウェル①に合わせて gain を 10 (オレンジ) に設定、測定上限を超えるウェル②が存在した場合、Gain を 100 に変更③することによりウェル②が測定範囲内に入り測定ができる④。パネル B. GloMax® は 8 桁以上のダイナミックレンジがあり、Gain 調整の必要がありません。

長時間発光 (グロータイプ)

を生じる試薬が開発され、ハイスループットスクリーニングに適した高感度アッセイとして幅広い用途に使われるようになりましたが、測定していない隣のウェルの光までも測定してしまうクロストークというグロータイプ発光特有の問題も同時に生まれました(右図)。プロメガではこれを装置側で防ぐためにドームマスキング/デュアルマスキング方式を開発し、クロストークを最小限に抑えることに成功しました。クロストークは左右上下斜めの少なくとも 8 ウェルからの影響があり、これを計算で補正することは容易ではありません。そういったことから、クロストークの少ない装置を用いることはとても重要です。

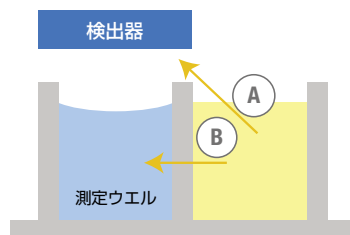


図 3. クロストークの説明
A. 隣のウェルから直接検出器に届くクロストーク
B. plate の壁を通して測定ウェルを光らせるクロストーク

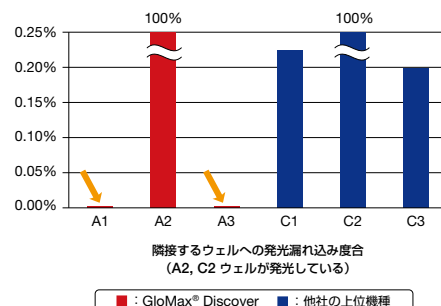


図 4. プロメガのマスキングシステムによるクロストークの低減

お客様の
声

RentaMAX で機械選びの大切さを実感

東京大学大学院 農学生命科学研究科
応用生命化学専攻 栄養化学研究室
小島 拓哉 先生



種々の遺伝子断片を組み込んで、いざレポーターアッセイを行っても、必ずしも期待通りの結果が得られず、頭を抱えてしまうことが今までに多々ありました。何が問題か、コンストラクト?、使用している細胞?、トランスフェクション効率?、などと逐一検証し、期待される(?) 結果に結びつくよう試行錯誤しましたが、大元、ルミノメーターの性能に関しては、頭の片隅に追いやって使用しておりました。

こうした中で、RentaMAX を通じて GloMax® Discover を使用する機会を得、これは試しにと、なかなか再現性が得られなかったアッセイ系を再検討した結果、微量な差異を再現性良く検出することが出来ました。今までの再検証に掛かった時間を嘆くとともに、GloMax® を用いたアッセイ結果から次への検証を進める実験が組める、ちょっとしたワクワク感も得られ、機械選びはやはり大切だなと実感した次第です。

ダイナミックレンジが広い事、発光、蛍光、吸光測定への対応性、欲を言えば切りがなくなりますが、一台でこれらの点をカバーする GloMax® Discover の利便性は、新たなアッセイ系を組み立てる際にとても有効であり、実験を進める上で賢い選択になると思われます。ということで新たな実験を進めたいと思います。

「低クロストーク」について

フラッシュタイプのルシフェラーゼアッセイ試薬を使いやすくするために、



RentaMAX プログラムを通じて、プロメガのルミノメーターのパフォーマンスをすぐに体験いただけます。

RentaMax

検索

遺伝子関連検査を支える 核酸自動抽出装置 Maxwell® RSC, FFPE 編



日本大学 医学部
腫瘍病理学
中西陽子 先生

イントロダクション

一般的に抽出された組織検体は、病理診断のため、ホルマリン固定・パラフィン包埋の処理を経て、FFPE として加工されます。近年では、病理診断で使用した FFPE を材料とした遺伝子検査が増加しています。FFPE は調達しやすく、かつ比較的安定的に保存できる検体であることから、病理診断後も長期間保存されていることが多く、新たな検査のたびに組織を採取する必要がなくなるなど、研究目的としても有用なサンプルとして広く利用されるようになりました。

このように、遺伝子検査のためのサンプルとして FFPE の価値が再認識されると同時に、メーカーからも様々な FFPE 専用の核酸抽出キットが発売され、誰でも比較的簡単に核酸を精製することができるようになりました。しかし、FFPE から核酸を抽出する手順において、脱パラフィン処理、脱クロスリンキング処理など煩雑な前処理プロトコルや、実験者の技量によるばらつきに悩んでいる方も多く存在します。本稿ではこれらの諸問題を解決する自動核酸抽出装置 Maxwell® RSC Instrument を用いた RNA の抽出例について日本大学の中西先生にご執筆いただき、FFPE 対応 DNA 抽出キットの特性についてもご紹介いたします。

RNA 抽出：FFPE 検体から自動抽出した RNA を用いた融合遺伝子の検出

これまでホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 検体は、固定の影響から分子生物学的解析には不向きな検体と言われてきました。しかし、患者さんから採取される組織検体のほとんどは FFPE として扱われます。FFPE は、形態情報だけではなく治療法とその効果や予後など、患者さん個々の臨床情報を有する貴重な医療資源となるので、FFPE を用いた遺伝子実験の成功は、標的遺伝子の臨床的意義についての検討に必須です。さらに、レーザーマイクロディセクション (LMD) 法を用いて標的細胞や組織だけを回収すれば、組織や細胞の形態と、分子の状態をより厳密にリンクさせた解析が可能となります。研究レベルでの RNA 解析は、マイクロアレイや定量 RT-PCR 法による発現定量解析が主体となるかと思われていますが、臨床の場においての RNA 解析は、特に腫瘍の鑑別診断に重要な融合遺伝子の検出に用いられます。臨床現場での遺伝子解析は、作業の標準化や精度管理の点からも、機械化、自動化の普及が望まれます。

今回、四肢に発生する骨軟部腫瘍の中で 3 番目に多く、SYT (SS18) -SSX 融合遺伝子が責任遺伝子として同定されている滑膜肉腫症例の FFPE を対象として、Maxwell® を用いた RNA の自動抽出を行い、同融合遺伝子の検出を行いました (図 1, 2)。SYT (SS18) -SSX 融合遺伝子の迅速な検出は治療法の決定や予後予測のための鑑別診断に有用であることが示されました。

NGS の普及によって、FFPE からの DNA、RNA 解析は患者さんの個別化治療の実践や新規治療薬の開発にますます必須となってくると考えられます。解析の Key となる Pre-analytic phase とされる検体処理が、解析方法の進歩に追従していくことが求められます。

DNA 抽出：FFPE 検体からの DNA 抽出キットの使い分け

Maxwell® には、FFPE から DNA を抽出するキットが 2 種類用意されています。右表に示すように、それぞれのキットには主に前処理において大きな違いがあります。Maxwell® RSC DNA FFPE Kit - PKK, Custom (カタログ番号 AX2500) では、FFPE をそのまま Proteinase K 反応液に加え、70℃で一晩インキュベーションした後にこの溶解液を Maxwell® 専用カートリッジに加えるだけです (脱パラフィン処理・脱クロスリンキング処理不要)。前処理が飛躍的に簡略化された本キットは、多くの FFPE からルーチンに DNA 抽出を行い、TaqMan 法やサンガーシークエンスのような PCR による変異解析を目的とする研究者の方々に最適です。一方、Maxwell® RSC FFPE DNA Kit (カタログ番号 AS1450) は、脱パラフィン処理・脱クロスリンキング処理などの前処理を必要とします。これらの前処理により高品質な DNA を高収量で得ることができます。このキットでは、FFPE の処理において、キシレンのような有害な有機溶剤は不要なため、より安全にご使用いただけます。このように抽出された高純度かつ高収量の DNA は、NGS を始めとするあらゆるアプリケーションに適合します。

関連製品

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
Maxwell® RSC Instrument	1 式	AS4500	2,800,000
Maxwell® RSC RNA FFPE Kit	48 回分	AS1440	41,000
Maxwell® RSC DNA FFPE Kit - PKK, Custom	48 回分	AX2500	41,000
Maxwell® RSC DNA FFPE Kit	48 回分	AS1450	41,000

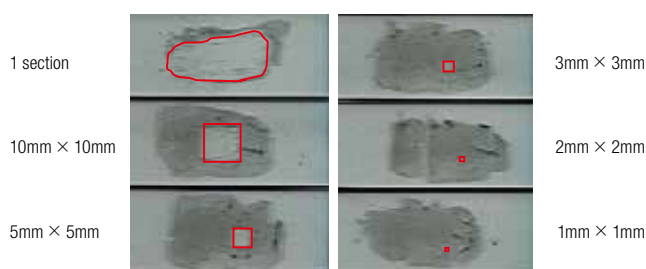


図 1. FFPE から回収したサンプルの大きさ

日常的に病理で薄切される切片の厚さは 4 μm です。この切片を脱パラフィンして、図のように大きさを覚えて腫瘍細胞をメスで削り取って回収しました。チューブに入れて、前処理を行います。腫瘍細胞含有量を増やすためには、切片の状態を脱パラフィンを行ってから標的の組織や細胞を回収すると前処理の手間も減り一石二鳥です。特に RNA の解析では検査対象となる腫瘍組織や腫瘍細胞のみを回収することは重要で、標的の領域が図の赤枠のように大きければ LMD でなくてもメスで十分に回収可能です。

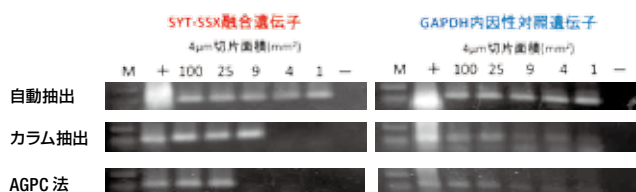


図 2. FFPE から回収したサンプルの大きさおよび抽出法の違いによる RT-PCR の結果の比較
吸光度で RNA を定量するとフェノール混入の影響が、AGPC (acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction) 法が最も RNA 回収量が多く見られました。しかし、実際に RT-PCR を行ってみると、今回試したピース法による自動抽出が、標的融合遺伝子転写産物を含めて最も良く抽出できていることが示されました。ただし、断片化の影響も考慮し、PCR 産物が 100-150 bp 程度になるようなプライマー設計も必要です。定量 RT-PCR でも同様の結果が得られています。

2 つの FFPE DNA 抽出キットの特徴比較

製品名	DNA FFPE Kit - PKK, Custom	DNA FFPE Kit
カタログ番号	AX2500	AS1450
DNA 収量	低い	高い
前処理の工程	極めて簡単	一般的
推奨の用途	主に PCR や qPCR	NGS を含む全てのアプリケーション
収量 (ng)	5 μm × 4 枚あたり	5 μm × 1 枚あたり
肝臓	304	50-500
脾臓	414	1,500-2,250
脳	193	100-200

Maxwell® RSC

RentaMAX

機器貸出プログラム

RentaMAXで自動精製を体験してみませんか?

www.promega.co.jp/rentamax

プロメガの提案力で皆様の研究を

レベルアップ LevelUp キャンペーン

レベルアップ製品を今ならどなたでも特別価格!

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(¥)
デュアルアッセイ試薬 + コントロールベクターセット				
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
試薬 (シングルまたはデュアル)				
Nano-Glo® Luciferase Assay	10 ml	N1110	23,000	18,000
Nano-Glo® Dual-Luciferase® Reporter Assay System	10 ml	N1610	39,000	31,000

タンパク質相互作用解析

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

トランスフェクション

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)	特別価格(¥)
困難な細胞用試薬				
ViaFect™ Transfection Reagent	0.75 ml	E4981	59,000	41,300
	2 × 0.75 ml	E4982	95,000	66,500
siRNA および DNA 共用試薬				
MultiFectam	2 × 0.33 mg	ETF2000	22,000	11,000
	6 × 0.33 mg	ETF5000	55,000	27,500

HaloTag® によるタンパク質標識

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)	特別価格(¥)
蛍光標識リガンド				
HaloTag® TMR Ligand	15 µl	G8252	51,000	35,700
HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand	15 µl	G1002	51,000	35,700
HaloTag® Oregon Green® Ligand	15 µl	G2802	51,000	35,700
フルタウン & 精製				
HaloTag® Mammalian Pull-Down System	24 回分	G6504	64,000	44,800
HaloLink™ Resin	5 ml (settled resin 1.25 ml)	G1912	34,000	23,800

好評につき
第2弾

期間: 2017 年 7 月 10 日 ~ 9 月 25 日

特価

キャンペーン

レベルアップアンケート &
プレゼントはこちらから
www.promega.co.jp/2017quest/

※当選者の発表は 10 月以降の賞品発送を
もって代えさせていただきます。



DNA & RNA 精製

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)	特別価格(¥)
RNA 精製				
Reliaprep™ RNA Cell Miniprep System	50 回分	Z6011	32,000	25,600
Reliaprep™ RNA Tissue Miniprep System	50 回分	Z6111	34,000	27,200
Reliaprep™ FFPE Total RNA Miniprep System	100 回分	Z1002	92,000	64,400
Reliaprep™ miRNA Cell and Tissue Miniprep System	50 回分	Z6211	45,000	31,500
DNA 精製				
Reliaprep™ gDNA Tissue Miniprep System	100 回分	A2051	51,000	35,700
Reliaprep™ Blood gDNA Miniprep System	100 回分	A5081	45,000	31,500
Reliaprep™ FFPE gDNA Miniprep System	100 回分	A2352	47,000	32,900

プラスミド精製

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)	特別価格(¥)
PureYield™ Midi & Maxi Pump Set	1 セット	JKC005	178,000	80,000
Welch Vacuum Pump, for Japan Electrical	1 台	A6724	90,000	70,000

RT & qPCR

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)	特別価格(¥)
インターカレーター法				
GoTaq® qPCR Master Mix	200 回分	A6001	51,000	25,500
	1000 回分	A6002	211,000	105,500
GoTaq 2-Step RT-qPCR System	50RT/200qPCR 反応分	A6010	62,000	31,000
GoTaq® 1-Step RT-qPCR System	200 回分	A6020	75,000	37,500
プローブ法				
GoTaq® Probe qPCR Master Mix	200 回分	A6101	19,000	9,500
	1000 回分	A6102	79,000	39,500
GoTaq® Probe 2-Step RT-qPCR System	50RT/200qPCR 反応分	A6110	38,000	19,000
GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System	200 回分	A6120	61,000	30,500

In vitro 転写 (RNA 合成)

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)	特別価格(¥)
T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System	50 回分	P1320	50,000	30,000
RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7	50 回分	P1300	40,000	28,000
Ribo m ⁷ G Cap Analog	10 A ₂₅₄ Unit	P1711	28,000	19,600

※ RNA のキャッピングにはカタログ番号 P1300 と P1711 をご利用ください。
(カタログ番号 P1320 でのキャッピングは推奨いたしません)

参加登録
受付中

8 人の日本人研究者が語る **NanoLuc® の無限の可能性**

セミナーの要旨・登録は www.promega.co.jp/lecture/

セミナーを 100 倍楽しく聞かために [あなたの研究室まで NanoLuc® の基礎をご説明に伺います!](http://www.promega.co.jp/onsite_seminar/)
www.promega.co.jp/onsite_seminar/



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