

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

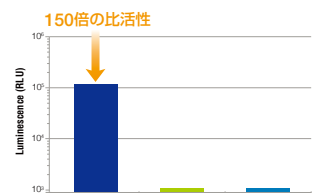


図 1. ルシフェラーゼ酵素 3 種類 (50 attomoles) からの発光測定

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応 (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。

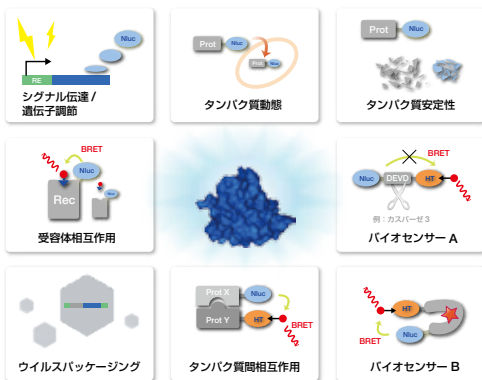


図 2. NanoLuc® の幅広いアプリケーション

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 倍明るいため、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。