

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

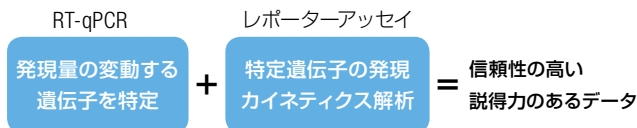
RT-qPCR 法は内在性の遺伝子発現量を定量できるという特長があります。RT-qPCR の問題点として、実験の過程での RNA の分解、逆転写反応や PCR 反応による酵素的な artifact、プライマーおよびプローブの特異性の差、また指数関数的な PCR データによる誤差の拡大等が挙げられ、タンパク質発現量を正確に反映できているか疑問であるという声を多く耳にします。一方で、レポーターアッセイはレポータープラスミドを細胞に導入する点で、外来的な実験手法となりますが、発光量測定による転写・翻訳されたルシフェラーゼ酵素の直接的な定量であるため、**対象のプロモーター活性やシグナル応答を高い再現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

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います。

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。



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)。

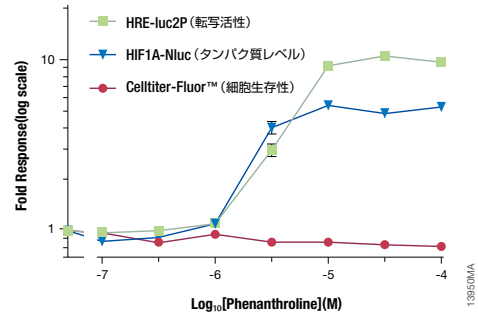


図 1. HEK293 細胞のフェントロリン処理による用量反応

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用意いただけます。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-κB	NF-κB RE	NF-κB
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