

GloMax プレートリーダーでちょい足しデュアルルシフェラーゼアッセイ (タンパク質レベル、転写活性 & 細胞生存性試験のマルチアッセイ)

概要

- 簡便なタンパク質レベル、転写活性、細胞生存性のマルチアッセイ
- デュアルルシフェラーゼアッセイの新しい利用法
- GloMax® Discover のデュアル自動インジェクターによりマルチアッセイを効率化

はじめに

デュアルレポーターアッセイは、同じ細胞サンプル中に発現する複数のレポーター酵素またはレポーター融合タンパク質を測定することにより細胞内の有用な情報を簡便にモニタリングすることができます。一般的なデュアルレポーターアッセイの実験フォーマットでは、片方のルシフェラーゼを転写活性に応じて発現する実験レポーターとして使用し、もう片方は恒常的プロモーターを用いた内部コントロールとして実験データを補正することによりデータの質を向上させます。Nano-Glo® Dual-Luciferase® Reporter (NanoDLR™) Assay System は、シンプルなプロトコル (添加→測定→添加→測定) で同じサンプルに含まれる NanoLuc® ルシフェラーゼ (Nluc) およびホタルルシフェラーゼ (Fluc) を高感度に連続して測定することができます。従来のホタルとウミシイタケルシフェラーゼによるデュアルアッセイシステムに比べ、第一レポーター (ホタル) の消光効果の向上と第二レポーター (NanoLuc®) の高い発光レベル (図 1) により NanoDLR™ はより高感度で正確な測定が可能となり、2 つのルシフェラーゼを実験レポーターとして使用するアプリケーションへの応用が広がりました (標的タンパク質存在量 [NanoLuc®] + 転写応答または 2 つの転写応答)。この場合、第 3 の細胞情報として細胞生存マーカーを測定することはレポーターアッセイに細胞の健全性に関する情報を加えることができるため、化合物の毒性によるレポーター活性の低下などを考慮にいたった正確な分析が可能になります。

デュアルレポーターによるタンパク質量および転写活性の測定

本稿では、同じウェルで 2 つの実験レポーターと細胞生存性を組合わせたマルチアッセイについてご紹介いたします。発光強度の高い NanoLuc® ルシフェラーゼであれば、調節タンパク質などシグナル経路上流のタンパク質に融合させてタンパク質の存在量を測定することができ、これとホタルルシフェラーゼをレポーターとした転写活性測定を組合わせたデュアルルシフェラーゼアッセイを行うことができます。細胞のストレス応答では、重要な調節タンパク質の安定性の変化、それに続く下流の転写調節をとまいません。多くの応答経路では、重要な転写因子の濃度および局在性は厳密に制御されています (表 1)。例えば、基底条件下での低酸素誘導因子-1A (HIF1A) はユビキチンを介した分解によって低レベルに保たれています。低酸素条件下になると、ユビキチン化は大幅に抑制され、核内で HIF1A が蓄積されるため、さまざまな遺伝子の転写が活性されます。NanoLuc® ルシフェラーゼの小ささと明るい光はタンパク質レベルの変化を測定するための融合パートナーとして理想的です。NanoLuc® アッセイが高感度であることは、タンパク質の発現量が低く、より生理的なレベルでも測定でき、生物学的関連性の高い結果が得られることを意味します。さらに、化合物に対する毒性プロファイリングを得るために細胞ストレスに応答する 2 つの応答配列 HSE (熱ショック) と ARE (酸化ストレス) による転写活性の変化についても実験をおこないました。

細胞生存試験の追加

NanoDLR™ 発光測定はさらに CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay を用いた蛍光法による細胞生存性試験とのマルチアッセイを行うことができ、1 つのサンプルからより完全な細胞応答プロファイルを得ることができます。このアッセイでは生細胞に由来する生プロテアーゼ活性により基質が蛍光産物に変換され、これが生細胞の数に比例します。このアッセイは細胞溶解剤を含む NanoDLR™ 試薬を添加する直前に行います。GloMax® Discover はマルチプレックスアッセイおよびインジェクターベースのプロトコルを簡略化し、タイムコース実験を簡便に行うことができます。

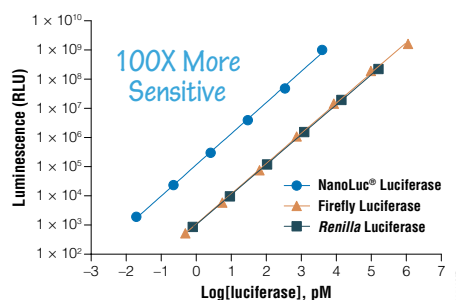


図 1. 各ルシフェラーゼの発光レベルの比較

NanoLuc® はホタルまたはウミシイタケルシフェラーゼよりも約 100 倍の発光レベルを示す。

表 1. パスウェイ活性化に応じて変化する主要なシグナル調節タンパク質の細胞内寿命

標的タンパク質	T _{1/2} 通常時 (分)	T _{1/2} 誘導時 (分)	誘導因子
HIF1 α	50	200-250	低酸素
I κ B α	100	5	TNF αおよびその他の炎症性サイトカイン
p53	20	300-400	遺伝毒性ストレス (UV/ 化株物質による DNA ダメージ, 他)
Nrf2	10-15	30-40	酸化ストレス
β - カデニン	<60	>200	Wnt
FOXO	>300	<60	成長因子
PDCD4	300	<60	インシュリン/PI3K
c-Jun	<60	>200	ストレス
c-Myc	20	300-400	ストレス
c/EBP	<60	>300	LiCl

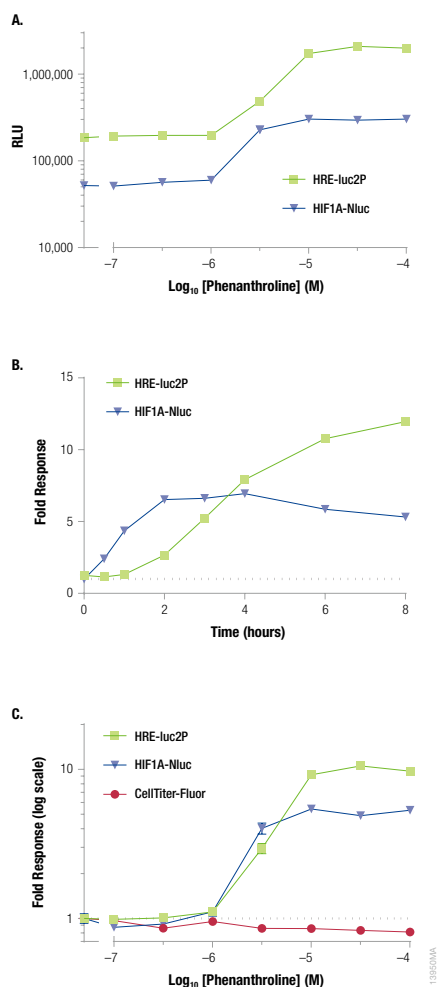


図 2. HEK293 細胞のフェナントロリンによる処理後の用量反応とタイムコース

パネル A: 単一の時点における用量反応では、フェナントロリン濃度依存的な HIF1A-Nluc 融合タンパク質の蓄積およびレポーター遺伝子 luc2P によって測定される低酸素応答の活性化が示された。パネル B: 100 μ M フェナントロリンの添加後の経時的なレポーター測定値を未処理細胞と比較した発光の倍率変化としてプロットした。タイムコース実験では、HIF1A の蓄積とそれに続く核内転写活性化との間に生じる遅れが明示されています。パネル C: 細胞を CellTiter-Fluor™ 試薬とともにインキュベートし、NanoDLR™ アッセイを行う前に蛍光を測定することにより、NanoDLR™ に細胞生存率測定を追加したマルチプレックスアッセイを実施した。この時点での CellTiter-Fluor™ 測定では高濃度のフェナントロリンで若干の毒性を示した。エラーバーは 6 回反復実験の SEM を表す。

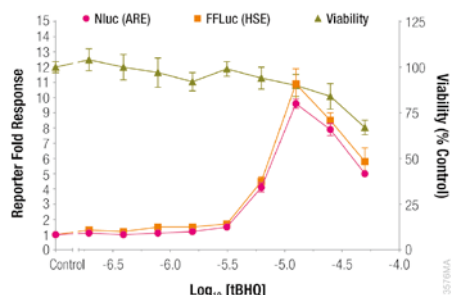


図 3. 同一サンプルより得られた細胞生存性、抗酸化応答性 (ARE) および熱ショック応答性 (HSE) の測定

HepG2 に pNL [NlucP/ARE/Hygro] および pGL4.41 [luc2P/HSE] をトランスフェクションし、tBHQ で処理した。O/N インキュベーションした後、CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay で細胞生存性を測定した後、さらに HSE および ARE 応答性を NanoDLR™ Assay で測定した。

結論

ストレス応答経路の多くの転写因子は分解によりその活性が制御されており、下流の転写活性とともに同じシグナル経路上のパスウェイポイントを調べることは生物学的理解を深めます。また、化合物による毒性プロファイリングを調べるために 2 種類のストレス応答を分析することは化合物の毒性スクリーニングなどに有用です。Nano-Glo® Dual Luciferase Reporter (NanoDLR™) Assay を使用して、NanoLuc® 融合タンパク質によるタンパク質蓄積と luc2P レポーター遺伝子上流の制御プロモーター上の転写因子活性の組み合わせまたは 2 種類の制御プロモーターを用いたデュアルシフェラーゼアッセイを行いました。フェナントロリン処理後のタイムコース実験では、HIF1A 転写因子の蓄積と下流の転写活性化との間にタイムラグが生じていることが示されました。また、tBHQ 添加によるストレス分析ではヒートショック (HSE) および抗酸化 (ARE) 応答配列を強く活性化しました。

さらに、NanoDLR™ で両方のレポーターを実験レポーターとして使用する場合には、テスト化合物によって引き起こされる毒性モニタリングに細胞生存性試験を追加することは有用で、発光アッセイと CellTiter-Fluor™ Assay の蛍光アッセイをマルチプレックス化することで実現できます。GloMax® のデュアルインジェクターを使用することで、試薬の追加と測定を自動化できます。図 2 のように化合物の用量反応をアッセイする場合、タイムポイントごとにインキュベーターからプレートを取り出してルミノメーターにセットする、といったアッセイフォーマットを飛躍的に単純化できます。2 つの実験レポーターと細胞生存性を組み合わせたマルチプレックスアッセイは 1 つのサンプルより得られる情報量を飛躍的に増加させます (図 3)。

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				
Nano-Glo® Dual-Luciferase®/pNL 1.1.TK Bundle	1 セット	N1521	80,000	56,000
Nano-Glo® Dual-Luciferase®/pNL1.1 PGK Bundl	1 セット	N1531	80,000	56,000
Nano-Glo® Dual-Luciferase®/pGL4.54 luc2/TK	1 セット	N1541	80,000	56,000
Nano-Glo® Dual-Luciferase®/pGL4.53 [luc2/PGK] Bundle	1 セット	N1551	80,000	56,000
デュアルアッセイ試薬				
Nano-Glo® Dual-Luciferase® Reporter Assay	10 ml	N1610	40,000	28,000
細胞生存試験				
CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay	10 ml	G6080	17,500	12,250
トランスフェクション				
FuGENE® HD Transfection Reagent	1 ml	E2311	65,000	45,500
ViaFect™ Transfection Reagent	0.75 ml	E4981	60,000	42,000
レポーターベクター				
pGL4.42 [luc2P/HRE/Hygro] Vector	20 μ g	E4001	73,000	51,100
pNL1-HIF1a [CMV/neo] Vector System	20 μ g	N1381	73,000	51,100
pGL4.41 [luc2P/HSE/Hygro] Vector	20 μ g	E3751	73,000	51,100

*2019 年 8 月 23 日受注分まで

上記以外のルシフェラーゼレポーターベクターについてはこちらの選択ガイドをご覧ください。



レポーター実験を始めたい方は
“なにになーに” が超おすすめ!

www.promega.co.jp/naninani/

- ・レポーターアッセイってなにになーにに？
- ・トランスフェクションってなにになーにに？
- ・細胞認証ってなにになーにに？
- ・細胞生存性アッセイってなにになーにに？
- ・NanoLuc ってなにになーにに？

最新号 ルミノメーターってなにになーにに？

