

高発光・長持続性ルシフェラーゼアッセイシステム:Emerald Lucシステムを用いた転写因子NFκBの活性化の解析

東洋紡績(株) 敦賀バイオ研究所 浅井 友実

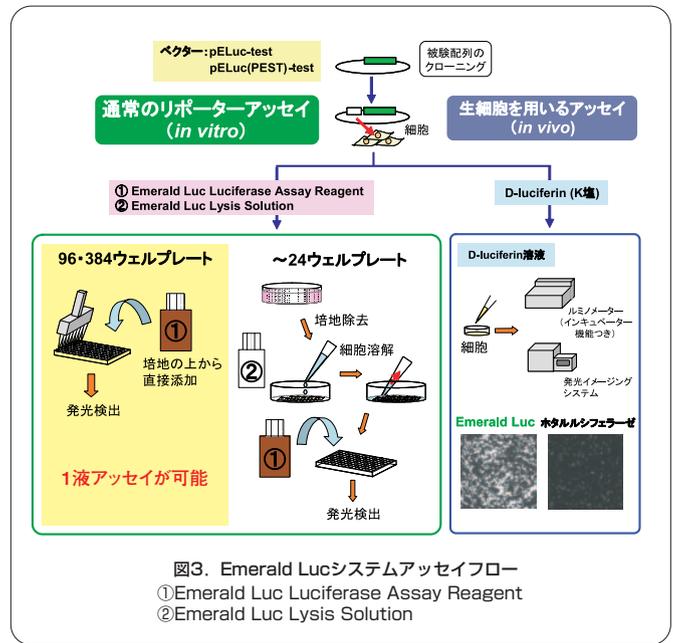
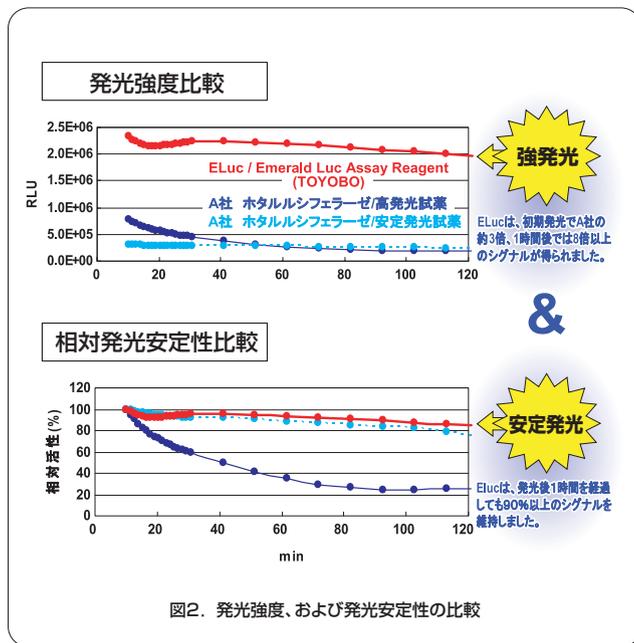
はじめに

Emerald Lucシステムは、ブラジル産ヒカリコメツキムシ由来のルシフェラーゼを採用したリポーターアッセイシステムです。ホタルルシフェラーゼを用いるシステムに比べ、*in vitro*、*in vivo*、いずれのアッセイにおいても安定した高いシグナルを得ることができます(図2、図3)。化合物探索におけるHTS(*in vitro*アッセイ)や、生細胞における発現の時間変動解析(*in vivo*アッセイ)などに有用です。

転写因子NFκBは、炎症性サイトカインTNF-αをはじめ様々な刺激によって活性化され、免疫反応や炎症反応などに関与する種々の遺伝子の発現を制御していることが知られています。活性化の詳細に関しては、細胞質のNFκB/IκBが、刺激を受けることにより解離し、NFκBが核内へ移行し、様々な遺伝子の発現をオンするメカニズムが提唱されています(図4)。本稿では、本システムを用いたNFκB活性化における阻害剤アッセイ、および*in vivo*イメージングへの応用についてご紹介いたします。



図1. Assay reagent外観

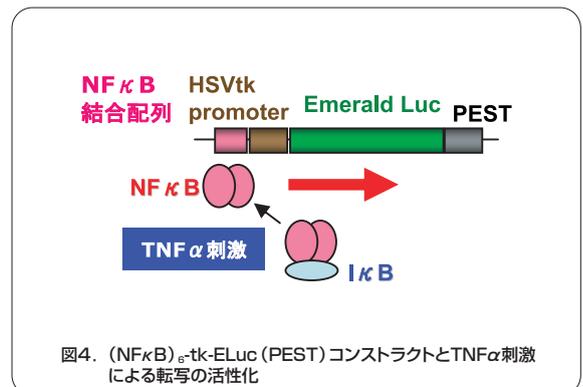


NFκBリポーターベクターの構築

方法

転写因子NFκBの活性化をモニターするリポーターとして、HSVtk promoter配列の上流にNFκBの結合配列を付加したコンストラクトを作製しました。具体的には、被験配列挿入用ベクターpELuc (PEST)-test (Code No.ELV-201)を用いて、Emerald Luc (ELuc) 遺伝子の上流にHSVtkプロモーターを、さらにその上流にNFκB結合配列(5'-CGGA AAGTCCA-3' (1)、6コピー)を挿入することによって、(NFκB)₆-tk-ELuc (PEST)を構築しました(図4)。

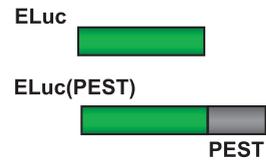
また、対照実験用として、同様にAP1結合配列(5'-ATGAGTCAA-3' (1)、6コピー)をHSVtkプロモーターの上流に挿入した(AP1)₆-tk-ELuc (PEST)を構築しました。



一口メモ

Emerald Lucシステムのプロモーター挿入用ベクターとしてpELuc-test, pELuc (PEST) -testを販売しております。Emerald Luc (ELuc)は細胞内で非常に安定なルシフェラーゼです。ELuc (PEST)はルシフェラーゼの細胞内寿命を短くするために、ルシフェラーゼのC末端にPEST配列と呼ばれるタンパク質分解促進配列を付加しています。シグナル強度の高い検出を行うにはpELuc-testを、時計遺伝子のリズム解析などの動的な変動の検出にはpELuc (PEST) -testのご利用をお薦めします。詳細はUpload vol.85 p1,2または弊社ウェブサイトをご覧ください。

*Emerald Luc遺伝子について、特許出願中。



NFκBリポーターを用いたin vitroアッセイ(TNFα刺激による活性化と阻害剤による阻害実験)

Ammonium Pyrrolidinedithiocarbamate (APDC)は、TNFα、LPS、PMA、酸化ストレスなどによって誘導されるNFκB活性化を選択的に阻害し、他の転写因子AP-1、SP-1、Oct-1の活性化は阻害しないことが知られています。

ここでは、NFκBの活性化におけるAPDCの阻害活性を、96ウェルプレートを用いるin vitroアッセイ系を用いて測定しました。また対照として、同様にAP-1活性化に対する影響を評価しました。

方法

96ウェル白色不透明プレートにHeLa細胞を播種し、Lipofectamine™ 2000を用いて、(NFκB)₆-tk-ELuc (PEST)、および(AP1)₆-tk-ELuc (PEST) プラスミドをそれぞれトランスフェクションしました(24時間)。培地はDMEM/10%FCSを使用しました。

NFκB活性化に対するTNFα濃度依存性を調べた実験では、(NFκB)₆-tk-ELuc (PEST) をトランスフェクションしたHeLa細胞に、0.001、0.01、0.1、1、10ng/ml TNFαを加え、6時間インキュベートした後、測定を行いました。

APDCによる阻害実験では、(NFκB)₆-tk-ELuc (PEST) または (AP1)₆-tk-ELuc (PEST) をトランスフェクションしたHeLa細胞に0.5mM、1mMのAPDCを加え、1.5時間インキュベートし、続いて、1ng/ml TNFαまたは0.1μM PMAを加え、さらに6時間インキュベートした後、測定を行いました。

ルシフェラーゼアッセイは、培地が入ったままの状態、細胞に培地と等量のEmerald Luc Luciferase Assay Reagent (Code No. ELA-101)を加え、振とう機で軽く振とうしながら10分間インキュベートし、プレートリーダーARVO_{MX} (パーキンエルマー社)で発光を測定しました。

結果及び考察

図5は、(NFκB)₆-tk-ELuc (PEST) を導入したHeLa細胞を各TNFα濃度で刺激し、発現したルシフェラーゼの活性を測定したものです。各条件n=2で実施し、平均値と測定値のバラツキをプロットしています。この結果から、NFκBの活性化が、TNFα濃度依存的に増大する様子を確認できました。

図6は、NFκBもしくはAP1結合配列を有するそれぞれのプラスミドを導入したHeLa細胞をそれぞれ各濃度のAPDCで前処理し、続いて、未処理(-)、TNFα、PMAで刺激した後、発光強度を測定した結果です。結果、NFκBはTNFα、PMAのいずれの刺激によっても活性化され、APDC添加によって阻害されました。一方、AP1の活性化はPMA刺激に対してのみ認められ、APDC処理による阻害は認められませんでした。

この結果、APDCの阻害はNFκBに特異的なものであることが確認でき、従来報告されている薬剤の効果をEmerald Lucシステムを用いたリポーターアッセイにおいても再現することができました。

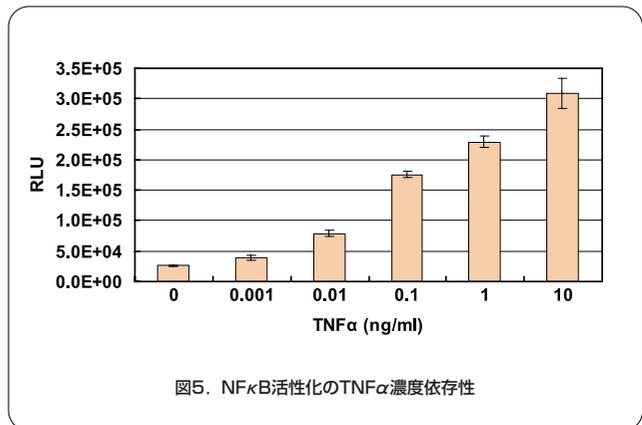


図5. NFκB活性化のTNFα濃度依存性

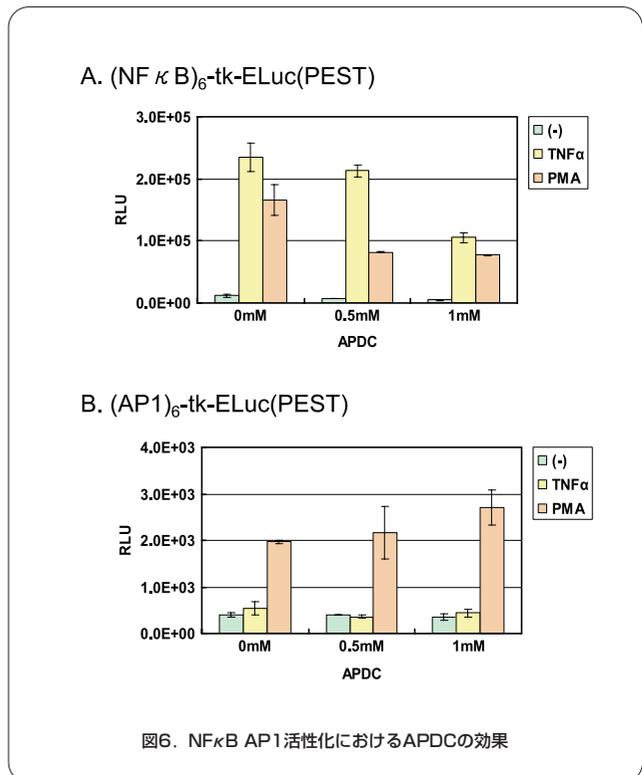


図6. NFκB AP1活性化におけるAPDCの効果

NFκBリポーターを用いた*in vivo*アッセイ(TNFα刺激のリアルタイム計測、シングルセルイメージング)

ルシフェラーゼ遺伝子を導入した細胞をルシフェリンを含む培地で培養することによりルシフェリンが細胞へ浸透し、発光を生じます。*in vivo*アッセイにおける、リアルタイム測定では、この発光を光電子増倍管が組み込まれた測定装置で連続モニターします。

また、細胞を対象とした発光イメージング解析では、個々の細胞の動態を検出することが可能です。この技術を利用することによって、個々の細胞の遺伝子発現を経時的にモニターでき、さらに、遺伝子発現の細胞間での同期、細胞間の相互作用や情報伝達などの解析が可能となります。

ここでは、リアルタイム計測と発光イメージングの事例をご紹介します。

方法

35mmディッシュにHeLa細胞を播種し、Lipofectamine™ 2000を用いて、(NFκB)₆-tk-ELuc (PEST) プラスミドをトランスフェクションしました。翌日、10ng/ml TNFα、0.5mM D-luciferinを添加して、下記2つの連続モニターを実施しました。培地はDMEM/10% FCSを使用しました。

- ①細胞培養機能搭載ルミノメーターKronos (アトー社)
3分ごとに10秒間の積算測定を20時間実施
- ②発光イメージングシステムLV200 (オリンパス社)
露光:2分間、インターバル:10分間、倍率:20倍で、20時間実施

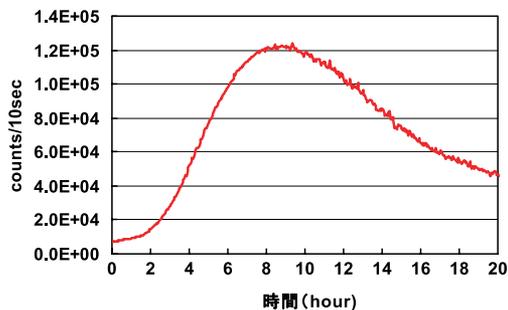


図7. NFκB活性化のリアルタイム計測
TNFα添加後の経過時間毎の発光強度の推移を示します。

結果及び考察

図7に①の計測による経時変化、図8に②のモニターによる3時間おきの細胞の発光像を示します。

この結果、TNFα添加によるNFκBの活性化の様子は、細胞集団で評価した場合も個々の細胞レベルで評価した場合にも同様に、TNFα添加9時間前後まで活性化が進み、その後減衰していくことが確認できました。

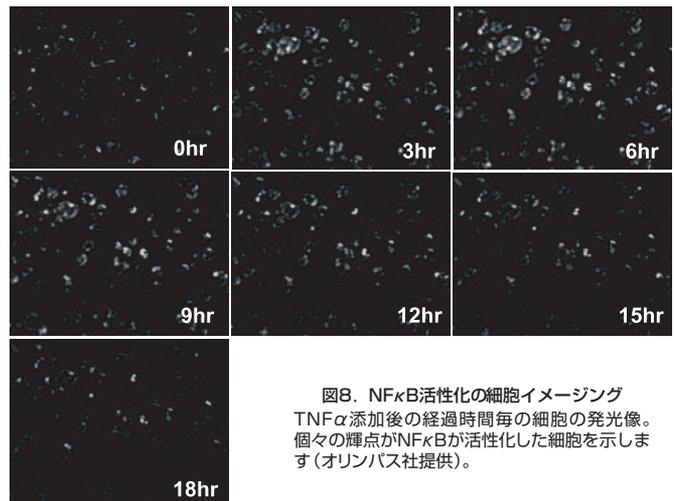


図8. NFκB活性化の細胞イメージング
TNFα添加後の経過時間毎の細胞の発光像。個々の輝点がNFκBが活性化した細胞を示します(オリンパス社提供)。

まとめ

Emerald Lucシステムでは、*in vitro*から*in vivo*まで多様なアッセイが可能です。*in vitro*アッセイ系については、Upload vol. 86 p.3に「AP1応答及び阻害剤効果の検出」例をご紹介しますので、あわせてご覧ください(弊社ウェブサイト(www.toyobo.co.jp/bio)にてご覧いただけます)。

品名	包装	保存温度	Code No.	価格
Emerald Lucシステム破壊系発光試薬 Emerald Luc Luciferase Assay Reagent*	10ml	-80℃	ELA-101	¥14,000
	100ml		ELA-102	¥78,000
Emerald Lucシステム細胞溶解剤 Emerald Luc Lysis Solution**	100ml	-20℃	ELA-201	¥8,000
D-luciferin (カリウム塩)	20mg	-20℃	MRL-101	¥24,000
	100mg		MRL-102	¥92,000
Emerald Lucプロモーター挿入用ベクター pELuc-test***	10μg	-20℃	ELV-101	¥35,000
Emerald Luc-Short lifeタイプ-プロモーター挿入用ベクター pELuc (PEST) -test***	10μg	-20℃	ELV-201	¥35,000

*96ウェルプレートの場合、Emerald Luc Luciferase Assay Reagent 10mlは100反応、100mlは1,000反応に相当します。

**Emerald Luc Lysis Solutionは希釈の必要がなく、そのまま使用いただけます。

***ヒカリコメツキムシ由来ルシフェラーゼ遺伝子を含むベクターは、弊社にて特許出願した技術です。当ベクター (Emerald Luc Vector Code No.:ELV-101,ELV-201)の使用において、弊社の検出用試薬 (Emerald Luc Luciferase Assay Reagent Code No.: ELA-101, ELA-102, ELA-201, D-Luciferin Code No.: MRL-101, MRL-102)を用いる場合は、営利・非営利団体に関らず、ライセンス契約は必要ございません。営利団体で弊社の検出用試薬を用いない場合は、ライセンス契約が必要となります。製品にライセンスポリシーが添付されておりますので、開封前に必ずご確認ください。ご不明な点は弊社までお問い合わせください。

2007年9月28日までにご注文いただいた方でご希望の方に、プロモーター挿入用ベクターを無償サービスいたします。申し込み方法等の詳細に関しましては、弊社webサイト(www.toyobo.co.jp/bio)のキャンペーンコーナーをご覧ください。