

## MultiReporter Assay System -Tripluc®- ベクターシリーズ 多色ルシフェラーゼベクター SLO/SLR TA Cloning Kitを用いたプロモーター解析方法のご紹介

東洋紡績(株) 敦賀バイオ研究所 浅井 友実



### はじめに

TAクローニングは特別なプライマーを用いることなく、制限酵素等の処理も必要としないので、PCR産物を効率的にクローニングする方法として広く普及しております。弊社では、このTAクローニング技術をプロモーター解析にもご利用いただくべく、MultiReporter Assay System -Tripluc®- SLO/SLR TA Cloning Kitとしてご提供しております。さらに、MultiReporter Assay System -Tripluc®- SLO/SLR TA Cloning Kit for KODは、高フィデリティ酵素としての特性上平滑末端産物を生じやすく、TAクローニングを苦手とするKODシリーズにおいても、高フィデリティ性を活かし、さらにTAクローニングを可能にするように工夫されたキットです。

一方、プロモーター領域の単離や解析には、従来、S1マッピング法、5'-RACE法によるmRNAの5'-UTR域(転写開始点近傍)の同定、さらにはこの配列をプローブとしたゲノムDNAライブラリーのスクリーニングといった手法が用いられてきました。これらの手法は煩雑な作業が必要で、多種類の遺伝子プロモーターを解析するには非常な労力を要します。

近年、ヒトゲノムプロジェクトにより決定されたヒトゲノム配列、およびNEDOの主導下で行われた「完全長cDNA構造解析計画」により蓄積された転写開始点に相当する5'末端情報をもとに、mRNA転写開始点データベースDBTSS (<http://dbtss.hgc.jp/index.html>) が公開されています。今後、転写制御やシグナル伝達などのプロセスを解析していく上で、このようなデータベースの公開配列をプロモーター領域候補として利用していくことは効果的な手法のひとつとなるものと考えられます。このような手法を進めていく上で、MultiReporter Assay System -Tripluc®- SLO/SLR

TA Cloning Kitは、解析の効率性をさらに向上させるものと期待しております。

本稿では、複数の遺伝子プロモーター候補をDBTSS公開配列をもとにMultiReporter Assay System -Tripluc®- SLR TA Cloning Kit for KODを用いてクローニングし、培養細胞で転写活性を確認した例をご紹介します。

### 方法

#### 1. プロモーター候補配列の検索およびクローニング

今回は、表1に示すハウスキープ遺伝子として知られる10個の遺伝子について、DBTSSの情報より、RefSeqの5'末端を基点に-1400bp~+100bpおよび-500bp~+100bpの領域をプロモーター候補配列として抽出し、その5'末端、3'末端に相補的なプライマーを設計しました(図1)。

PCRは、Jurkat細胞より抽出したGenomic DNAを鋳型として、High fidelity hot start PCR酵素KOD -Plus-を用いて行いました。PCR増幅の成否結果は表1に記載します。

続いて、PCR増幅が認められたサンプルについて、MultiReporter Assay System -Tripluc®- SLR TA Cloning Kit for KODのプロトコルに従い、精製処理を行わずにA-attachment Mixを用いて3'末端にdAを付加し、pSLR-Tとライゲーション反応を行いました。その反応液を用いてコンピテントセルDH5αへ導入し、翌日、コロニーダイレクトPCRを行い、目的産物が挿入されたポジティブクローンを単離しました。これらポジティブクローンを培養し、プラスミドを精製しました。

#### 2. 培養細胞へのトランスフェクションおよびルシフェラーゼ活性の測定

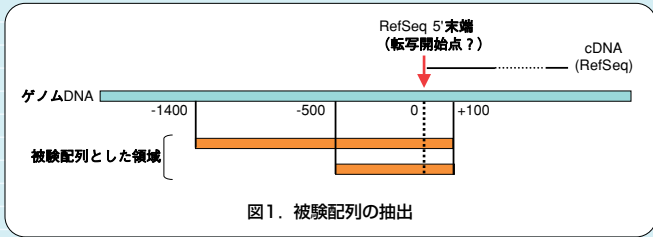
接着細胞であるHeLa S3細胞は前日、24ウェルプレートに $0.75 \times 10^5$  cells播種しました。浮遊細胞であるJurkat細胞はトランスフェクションの前に、24ウェルプレートに $5 \times 10^5$  cells (0.5ml/1ウェル) ずつ播種しました。被験配列を挿入したSLRベクター0.475 μg、pSLG-SV40 control (Code No. MRV-201) 0.025 μgを混合し、市販の試薬を用いてトランスフェクションし、37°C、24時間インキュベートしました。

翌日、ルシフェラーゼ活性を検出試薬「MultiReporter Assay System -Tripluc®- Detection Reagents」と色分離機能付チューブ測定用ルミノメーター「カラフルックアナライザー™」を用いて測定しました。この際、接着細胞であるHeLa S3細胞は培地を除去後そのままLysis Solutionを添加することによって細胞を溶解しましたが、浮遊細胞であるJurkat細胞については培養液をマイクロチューブに移し、3,000rpmで5分間遠心した後、上清を除去し、Lysis Solutionを添加することによって細胞を溶解しました。

表1. プロモータークローニングを実施した遺伝子とプライマー

(1) O、XはPCR増幅の有無を示します。

Gene Name	Symbol	cDNA RefSeq. No.	Target length	Forward Primer	Reverse Primer	PCR (1)
β-actin	ACTB	NM_001101	1.5 kb	ACACCTACTACGCGCTGCAAAAGAGC	GAGCCGCTGCCCCGGTCGCTGCG	O
			0.6 kb	ACTCCATGCCCCCAAGAGCTC		O
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPD	NM_002046	1.5 kb	GGTCAGGGACTGGAGTCTGTGGGT	GCCTTCAGCCGCTCCCTAGCCTCCC	O
			0.6 kb	ACCGCAGAGCCTCGAGGAGAAG		O
α-tubulin	K-ALPHA-1	NM_006082	1.5 kb	TGTATGCAAAATTTGATTTTGAATC	AAAGCAGCCGGGAGCCGCACGGCTT	O
			0.6 kb	CACCTGCCTTAAAGGAAGCTGAG		O
ubiquitin C	UBC	NM_021009	1.5 kb	TTTTTCAGTTGGTAGCCTCTTTTTTC	CGAAAGCCCCGGCCAGCCAGCAGC	X
			0.6 kb	GTCAGGAGGGAGGGGAGGGAGAC		O
ribosomal protein S3	RPS9	NM_001013	1.5 kb	CGAGCTGTGGAGACAGACCATCGC	ATTCTCGAAGGGTCTCCGCGGGGT	O
			0.6 kb	AAGTTCTCCCTACTTCTCAGG		O
ribosomal protein L13	RPL13	NM_000977	1.5 kb	CATGCGCCACCACGCCAGCTTTTT	CCGCGTTGGCTGAAGCCGCCAGGCCG	X
			0.6 kb	CCAGCAATGTTCTAAATGGATG		O
aminolevulinic acid, synthase 1	ALAS1	NM_199166	1.5 kb	ACTCTGTCTCAACAACAACAAC	GTCCAAACGAAACGCTCGTTGC	O
			0.6 kb	GCTGAGTGTCCCGCTTCTTCCG		O
Endonuclease G, precursor	endoG	NM_004435	1.5 kb	CTTATTTTCCTTAAAGGAAAAAAAATG	CCCTTCCACTCACAACACTGC	X
			0.6 kb	GGCGCATGCTGTAAATCCAGC		O
peroxisomal biogenesis factor 19	PEX19	NM_002857	1.5 kb	TTAGCTACCTTACAGCAGGGGG	CTATGGGCTCTTACTTTCCAG	O
			0.6 kb	TTGAACCCGGGAGGCCAAGGCTG		O
tyrosine 3-hydroxylase	YWHAZ	NM_003406	1.5 kb	TTCTTTCTGCTACTGAAGTTTTC	AGGTTTGAGGGACGTCGTAGTC	O
			0.6 kb	AAACCCACTAAAAATAACTGCTC		O
SV40	SV40	pSLR-SV40 control				
negative	negative	未挿入プラスミド (pSLR-T)				



結果及び考察

今回、PCR増幅を試みた20個のターゲットのうち、17個において増幅が認められました。PCR増幅が認められなかったターゲットについては、プライマー配列の問題、ゲノムDNA中の繰り返し配列や相同性の高い配列の存在等の影響などが考えられますので、プライマー設計部位を変更して再度PCR増幅を試みる必要があります。

実際に2種類の細胞系を用いた各被験配列のプロモーター活性の評価結果について、ルシフェラーゼ活性を測定し色分離算出されたデータを図2、3に示します。ここでは、各サンプルにおいて内部標準として添加したSLG値に対するSLR値の割合を算出し、プロットしています。

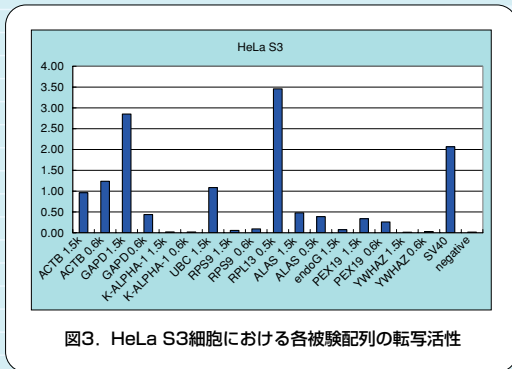
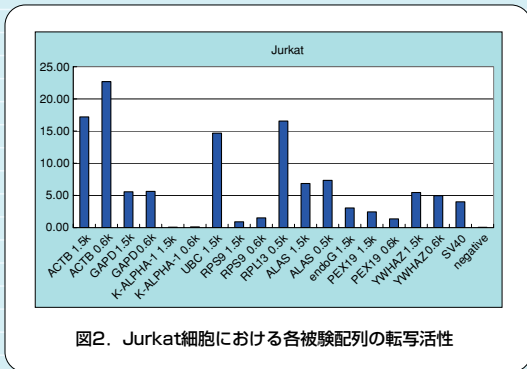
個々のプロモーターの様子を見てみますと、例えば、Jurkat細胞ではACTBプロモーターの転写活性が強く認められることが分かり

ます。この他、GAPDについては1.5kb、0.6kbに被験配列いずれも同等の活性が認められるのに対し、HeLa S3細胞では1.5kbにより強い活性が認められますので、HeLa S3細胞中に存在する転写因子に関するエレメントが上流域に存在する可能性が考えられます。K-ALPHA-1については今回選択した領域にはプロモーター活性がありませんでしたので、評価領域を広げる必要があります。あるいは今回の検討ではRefSeqを基点としておりますので、オリゴキャップ法で得られたcDNAの5'末端を基点にすることでプロモーター活性を有する領域を取得できるかもしれません。KICIPについてはHeLa S3細胞においては転写活性が検出できませんでしたが、Jurkat細胞では比較的大きな活性が認められましたので、Jurkat細胞に存在する転写因子に関するエレメントが存在する可能性が考えられます。

本稿では、MultiReporter Assay System -Tripluc®-SLO/SLR TA Cloning Kitをご利用いただくことによって、複数の遺伝子プロモーターの転写制御を効率的に比較できることが示されました。

ご関心あるファミリーに属する複数の遺伝子の転写制御を解析したい場合、あるいは一つの遺伝子について複数の被験配列あるいは異なる配列部位の転写活性を比較評価したい場合など、本キットを用いることによ

って効率的に実験を進めていただくことができるのではないのでしょうか。是非、一度MultiReporter Assay System -Tripluc®-SLO/SLR TA Cloning Kitシリーズをお試しください。



品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格
MultiReporter Assay System -Tripluc®- <b>SLO TA cloning kit for KOD</b> pSLO-T 2×Ligation Buffer T4 DNA Ligase 10×A-attachment Mix	20回用	-20℃	MRT-201	¥69,000
MultiReporter Assay System -Tripluc®- <b>SLR TA cloning kit for KOD</b> pSLR-T 2×Ligation Buffer T4 DNA Ligase 10×A-attachment Mix	20回用	-20℃	MRT-202	¥69,000
MultiReporter Assay System -Tripluc®- <b>SLO TA cloning kit</b> pSLO-T 2×Ligation Buffer T4 DNA Ligase	20回用	-20℃	MRT-101	¥65,000
MultiReporter Assay System -Tripluc®- <b>SLR TA cloning kit</b> pSLR-T 2×Ligation Buffer T4 DNA Ligase	20回用	-20℃	MRT-102	¥65,000
MultiReporter Assay System -Tripluc®- <i>in vitro</i> アッセイ用試薬 <b>Detection Reagents</b> 細胞溶解剤 (Lysis Solution) 発光基質 (Assay Reagent)	100回用*	-80℃	MRA-101	¥30,000
色分離機能付チューブ測定用ルミノメーター <b>カラフルックアナライザー™</b>	1式	-	CLX-101	¥1,350,000

関連商品

品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格	2004~2005 総合カタログ
高正確性PCR用酵素 <b>KOD -Plus-</b>	200U×1本*	-20℃	KOD-201	¥30,000	1-10
MultiReporter Assay System -Tripluc®- <i>in vivo</i> アッセイ用試薬 <b>D-luciferin</b> (カリウム塩)	20mg*	-20℃	MRL-101	¥24,000	-

\* : この印のついた製品には、上記以外に他の容量でも販売しております。詳しくは、弊社までお問い合わせください。