

MultiReporter Assay System -Tripluc®- を用いた転写因子AP1、NFκB活性化の同時解析

東洋紡績（株） 敦賀バイオ研究所 浅井 友美

はじめに

MultiReporter Assay System -Tripluc®- (以下Tripluc®システム)は、緑色 (SLG)、橙色 (SLO)、及び赤色 (SLR) の3色のルシフェラーゼを用いるマルチリポーターアッセイシステムです。1色を内部標準として、残りの2色を用いて、2種の被験配列 (プロモーターなど) の転写活性の評価を同時に行うことができます。このアッセイ系を用いることにより、2種の被験配列の活性に関する厳密な比較が可能になります。

転写因子AP-1、NFκBは、ともに広範な生命現象に重要な役割を果たすことが知られています。そのため、炎症性刺激や酸化ストレス応答、発ガン、分化、アポトーシスなどにおいて、これら転写因子の活性化を並行して評価することが多く行われています。

本稿では、MultiReporter Assay System -Tripluc®-を用いて、これら転写因子の活性化、あるいは阻害剤の効果を同時にモニターした例をご紹介します。

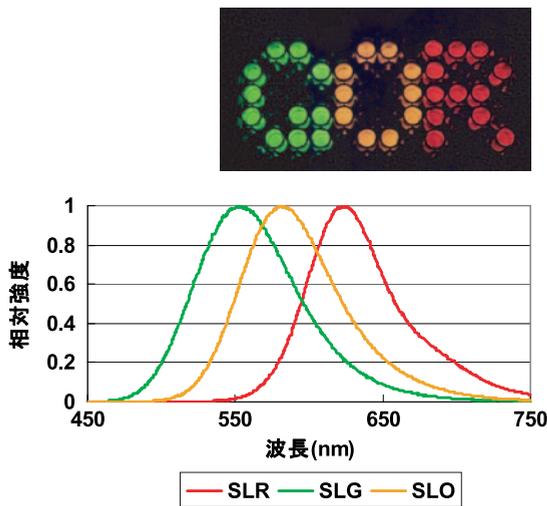


図1. SLG、SLO、SLRの発光と発光スペクトル

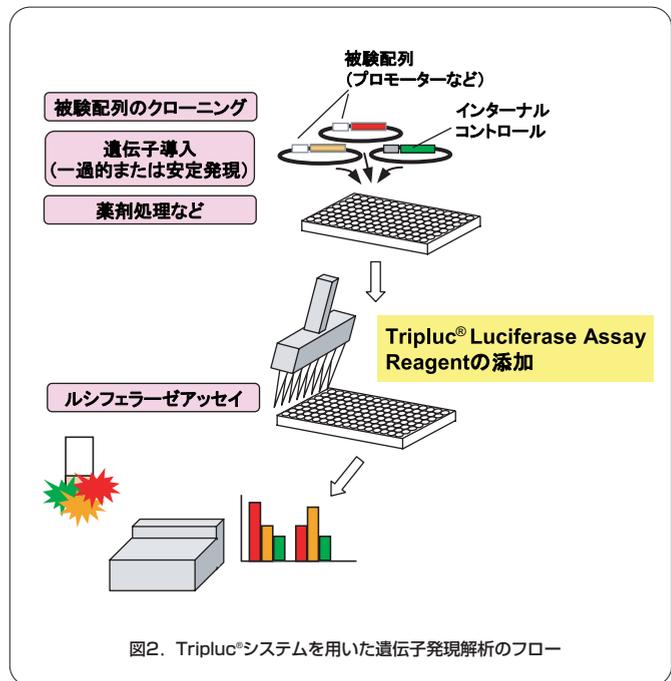


図2. Tripluc®システムを用いた遺伝子発現解析のフロー

方法

1. リポーターコンストラクトの構築

pSLO-test (Code No. MRV-102)、pSLR-test (Code No. MRV-103) の各ルシフェラーゼ遺伝子の上流にHSVtkプロモーターを挿入し、そのさらに上流にAP1結合配列 (5'-ATGAGTCAA-3', 6コピー)、NFκB結合配列 (5'-CGGAAAGTCCA-3', 6コピー) をそれぞれ挿入した、pAP1-SLO、pNFκB-SLRを構築しました。

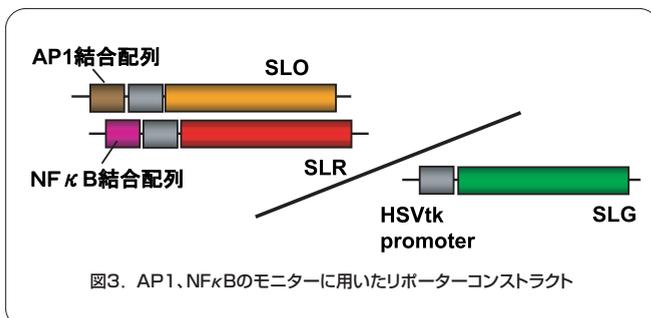


図3. AP1、NFκBのモニターに用いたリポーターコンストラクト

2. トランスフェクション

96ウェル白色不透明プレート (ナルジェ・ヌンク社、Code No. 136101) にHeLa S3細胞を1ウェルあたり 2×10^4 cells (100μl DMEM+10% FBS) 播種し、24時間培養しました。翌日、1ウェルあたり、0.09μg pAP1-SLO、0.02μg pNFκB-SLR、及びインターナルコントロールとして0.09μg pSLG-HSVtk control (Code No. MRV-301) を混合し、さらに0.5 μl Lipofectamine™ 2000 (インビトロジェン社) と混合した後、細胞に添加しました。また、各ルシフェラーゼのフィルター透過率を設定するために、pSLG-SV40 control (Code No. MRV-201)、pSLO-SV40 control (Code No. MRV-202)、pSLR-SV40 control (Code No. MRV-203) をそれぞれ0.2μgトランスフェクションしました。この細胞を37℃、5% CO₂ 下で24時間インキュベートしました。

3. アッセイ

PMAによる活性化試験では、トランスフェクションを行った細胞の培養液を除去し、0、1、10、100nMのPMAを含む培地

100μlを加え、5時間インキュベートしました。

阻害剤アッセイでは、トランスフェクションを行った細胞の培養液を除去し、グラフに示された濃度の化合物を含む培地100μlを加え、10分間インキュベートした後、さらに1mMのPMAを含む培地10μlを加え、5時間インキュベートしました。

ルシフェラーゼアッセイは、細胞培養液をそのまま、等量(100μl)のTripluc® Luciferase Assay Reagentを加えて

10分間インキュベートした後、パーキンエルマー社ARVOMxにセットし、光学フィルター①660nm:半値幅100nm (Filter3)、②595nm:60nm (Filter2)、③波長510nm:半値幅60nm (Filter1)存在下でそれぞれ、2sec/ウェルで測定しました。透過率設定用のサンプルについてはさらに、フィルター非存在下で全光を測定しました。

結果及び考察

透過率設定サンプルから、それぞれのルシフェラーゼのフィルター透過率(例えばFilter1透過率は、Filter1測定値/Filter非存在下測定値)を決定しました。続いて、試験ウェルの測定値から各ルシフェラーゼの活性値を算出しました。SLO、SLRの活性値をインターナルコントロールとしたSLGの活性値で割り返し(SLO/SLG、SLR/SLG)、サンプル間の標準化を行いました。N=3の平均値を算出し、SLO/SLG、SLR/SLGについて、それぞれPMAによる刺激処理や阻害剤処理のないサンプルの値を1として相対活性をグラフにプロットしました。

その結果、AP-1、NFκBの活性化において、PMAに対する濃度依存性が認められました(図4A)。阻害剤に対しては、AP-1、NFκBの活性化いずれもプロテインキナーゼCの阻害剤であるRo-32-0432、BDM 1 (Bisindolylmaleimide 1)については濃度依存的な阻害が認められましたが、チロシンキナーゼ阻害剤であるAG1478については有意な阻害は認められませんでした(図4B上)。PMAによる活性化はプロテインキナーゼCを介して成立しますので、その効果を適切に評価できたといえます。

また、APDC (Ammonium Pyrrolidinedithiocarbamate)はNFκB活性化の選択的な阻害剤として知られる化合物ですが、実際に特異的な阻害を観察することができました(図4B下)。

まとめ

このたびMultiReporter Assay System -Tripluc®-に1液アッセイ試薬Tripluc® Luciferase Assay Reagentが加わり、マルチウェルフォーマットによる多検体アッセイが簡便になりました。Tripluc®システムではインターナルコントロール用とは別に2つのリポーター評価が可能ですので、2つのターゲットを、全く同じタイミング、同じ細胞条件下で比較することができます。このため、特に細胞内におけるクロストークやネットワーク解析などを目的としたご研究、あるいはそれらをベースにした化合物スクリーニングにおいて、より厳密な測定・評価を行っていただけるツールであるといえます。

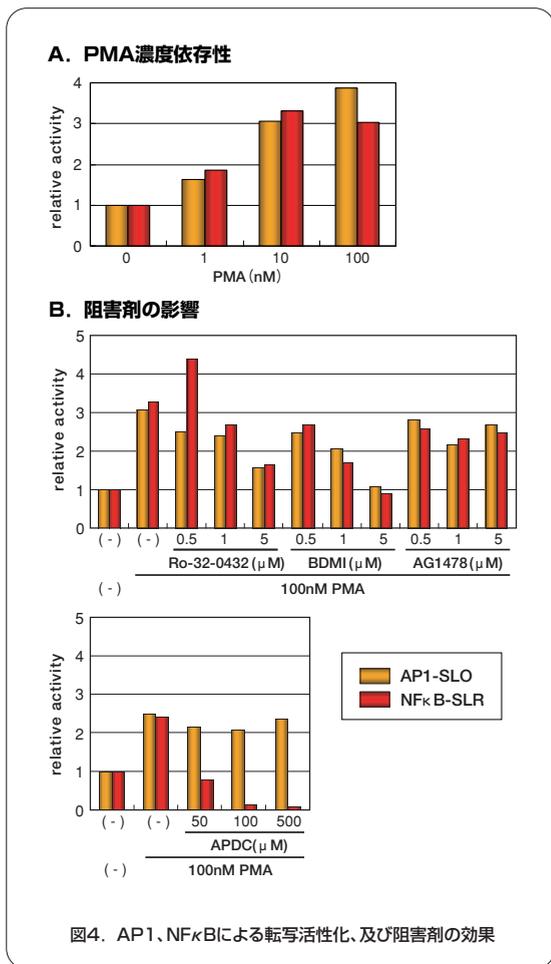


図4. AP1、NFκBによる転写活性化、及び阻害剤の効果

この他、多色分離のための演算については、Upload vol.83 p.7(弊社ウェブサイトをご覧ください)にご紹介しておりますので、あわせてご参照ください。また、Microsoft® Excelを用いた演算シートを弊社ウェブサイト(www.toyo.co.jp/bio)に掲載しておりますので、ご活用ください。

品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格
MultiReporter Assay System -Tripluc®-発光試薬 Tripluc® Luciferase Assay Reagent	10ml 10ml×5	-80℃	MRA-301 MRA-301X5	¥23,000 ¥97,000
プロモーター挿入用ベクター pSLG-test	20μg	-20℃	MRV-101	¥80,000
プロモーター挿入用ベクター pSLO-test	20μg	-20℃	MRV-102	¥80,000
プロモーター挿入用ベクター pSLR-test	20μg	-20℃	MRV-103	¥80,000
SV40コントロールベクター pSLG-SV40 control	20μg	-20℃	MRV-201	¥80,000
SV40コントロールベクター pSLO-SV40 control	20μg	-20℃	MRV-202	¥80,000
SV40コントロールベクター pSLR-SV40 control	20μg	-20℃	MRV-203	¥80,000
HSVtkコントロールベクター pSLG-HSVtk control	20μg	-20℃	MRV-301	¥80,000

*ベクターに関しては別途セット販売をしております。詳しくは、弊社までお問い合わせください。

上記の商品につきましては、特許の関係上、ご購入の際には別途申込書を提出していただきます。企業の方のご購入に関しては、別途ライセンスが必要です。詳しくは弊社までお問い合わせください。