

UPLOAD

T O Y O B O B I O C H E M I C A L S



KOD SYBR® qPCR Mix
→本誌p.7~10に詳細記事がございます。

UPLOAD100号発刊にあたって

SPECIAL REVIEW

3 極限環境微生物とその利用

Brand-New item

7 高効率リアルタイムPCR用マスターミックス キャンペーン
KOD SYBR® qPCR Mix

11 Emerald Lucリポーターアッセイシステム用1液検出試薬
Emerald Luc Luciferase Assay
Reagent Neo

TECHNICAL REVIEW

12 Emerald Lucを用いたスプリットルシフェラーゼによる
タンパク質相互作用検出系の構築と
GPCRリガンドスクリーニングアッセイへの応用

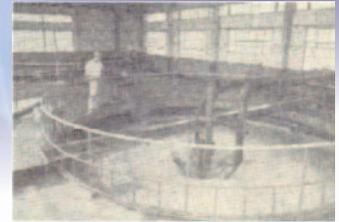


2013 January
VOL. 100

UPLOAD100号発刊にあたって

ご愛読いただいております弊社情報誌「UPLOAD」は記念すべき100号を迎えました。また昨年、東洋紡は会社創立130年、及び研究用試薬事業を開始してから30年という節目の年でもありました。弊社は1882年に繊維事業から出発し、1952年に生化学関連研究に着手、1982年に診断薬用酵素開発で培った技術を用いて制限酵素の販売を開始しました。これが、現在の研究用試薬事業の基点となり、現在に至っています。振り返ってみますと、1953年にワトソン・クリックがDNAの二重らせんモデルを提唱してから現在に至るめまぐるしい進歩の中、弊社も時代の流れに沿った形で様々な製品をお客さまに提供して参りました。

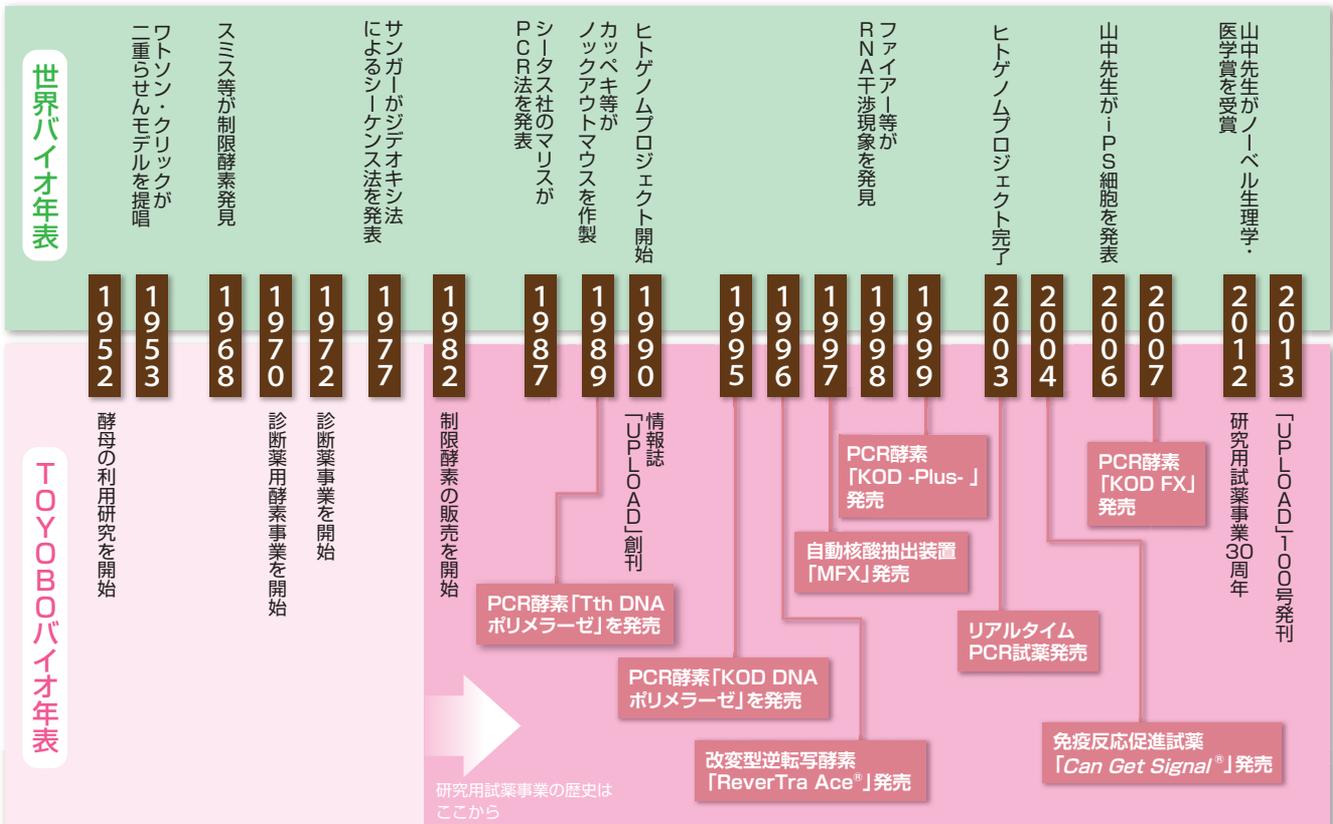
その中、新製品を中心としてお客さま方に弊社の商品を分かりやすく紹介しようという趣旨で産まれたのが情報誌「UPLOAD」でした。情報をアップロードするという言葉は今でこそ一般化していますが、創刊した1990年当時はインターネットもほとんど普及していない時代でした。



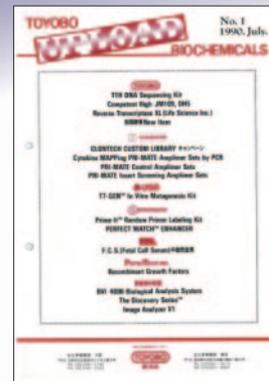
研究を始めた当時の酵母培養槽



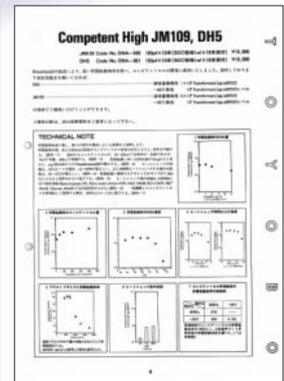
敦賀バイオ研究所(現在)



それでは少し創刊当時を振り返ってみることにします。
 創刊号では今でも販売を継続していますコンピテントセルが新製品として掲載されていました。コンピテントセルは未だに良く使用する試薬の一つです。そのあたりの事情はあまり変わっていないようです。



UPLoAD創刊号(1990年7月号)



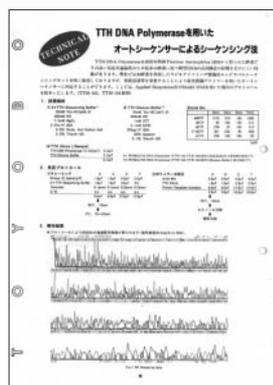
コンピテントセルの記事
 UPLoAD創刊号(1990年7月号)

この当時はバイオの黎明期で2か月に一回情報誌を発刊していました。内容を覗いてみると、当時需要が増していたシーケンシングに関する情報が多かったようです。

下左の写真は当時取り扱っていたUSB社のSequenase[®]を使ったシーケンシングの紹介記事です。当時、この酵素を使ってシーケンス反応を行い、A, G, T, Cとそれぞれについて電気泳動した後に、オートラジオグラフィーによって得られたラダーを解析



USB社Sequenase[®]の記事
 (1990年9月号)



Tth DNAポリメラーゼをオートシーケンサーに応用した事例紹介
 (1990年9月号)

する方法が主流でした。ラジオアイソトープを使わなくてはならず、本当に面倒な実験でした。シーケンス用ゲルの作り方もそれぞれコツがあり、どれくらい読めるかもそれにかかっていたような記憶があります。その後オートシーケンサーが発売され、バンドを読む必要がなくなり、本当に便利になりました。写真右は弊社が開発したTth (*Thermus Thermophilus*) DNAポリメラーゼをオートシーケンサーに応用した事例の紹介記事です。当時、オートシーケンサーはあまり普及していませんでしたが、その後の、キャピラリーを用いたシーケンサーの登場で一気に広がりました。

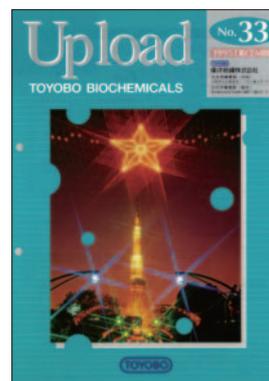
そのほか、当時、クローニングといえばライブラリー、発現解析といえばノーザンブロットでした。それに関連した商品も数多く紹介させていただいていました。

1995年の33号になると表紙はフルカラーになります。この号の目玉はKOD DNAポリメラーゼです。

当時は何と言ってもTaq DNAポリメラーゼが主流でしたが、正確性が悪く、クローニングに苦労していました。その中、発売されたのがKOD DNAポリメラーゼでした。Taq DNAポリメラーゼは、好熱細菌由来でFamily Aに分類され、いわゆる校正活性(3'→5'エキソヌクレアーゼ活性)は備わっていません。一方、KODはArchaea由来のFamily Bに分類されるポリメラーゼであり、校正活性を有し優れた正確性を示すため、クローニングなどに大変有利です。

KODの名前の起源は、鹿児島県の小宝島に由来しますが、当時、King of DNAポリメラーゼとして販促していたことを思い出します(右写真)。

そのKODも、お客さま方の要望にお応えする形で、1999年にKOD-Plus-、2007年にKOD FXなどの改良品を開発、ここ数年もNeoシリーズを発売するなど、現在も進化を続けています。



UPLoAD 33号
 (1995年12月号)



KOD DNAポリメラーゼ新発売
 (1995年12月号)

今号で紹介しました、コンピテントセル、Tth DNAポリメラーゼ、及びKOD DNAポリメラーゼはすべて日本の先生方からご指導を受けたり、菌株を分与いただいた経緯があります。これらの商品は日本発の試薬として、海外へも販売され、世界中のライフサイエンス研究の発展を支援しています。

今後、ライフサイエンス研究は再生医学の進展などとともに益々発展していく分野であると考えられます。弊社といたしましては益々皆様のお役に立てる製品を開発して参る所存です。今後とも変わらぬご愛顧を宜しくお願いいたします。

最後に、今回は特集の一環としまして、KOD DNAポリメラーゼ開発において多大なるご指導をいただきました今中忠行先生に総説をご執筆いただいております。大変分かりやすい解説になっておりますので、是非、ご一読ください。

極限環境微生物とその利用

立命館大学 生命科学部 教授 今中 忠行

生物の分類

生物を分類する基準として、永らく①形や大きさなどの形態学的基準と、②基質や生産物など代謝的特徴をふまえた生理学的基準が用いられてきたが、遺伝子工学の発展をもとに16S rRNA(真核生物では18S rRNA)などの特定遺伝子の塩基配列を比較する③遺伝学的基準が採用され現在に至っている。現在のすべての生物は細菌、始原菌、真核生物の3つのドメインに分けられる(図1)(1)。もちろん細菌、始原菌は原核生物であり、始原菌から真核生物が進化してきたと考えられている。また生命の源流は超好熱菌であり一般的に高温、嫌氣的条件下で生育する特徴をもつ。

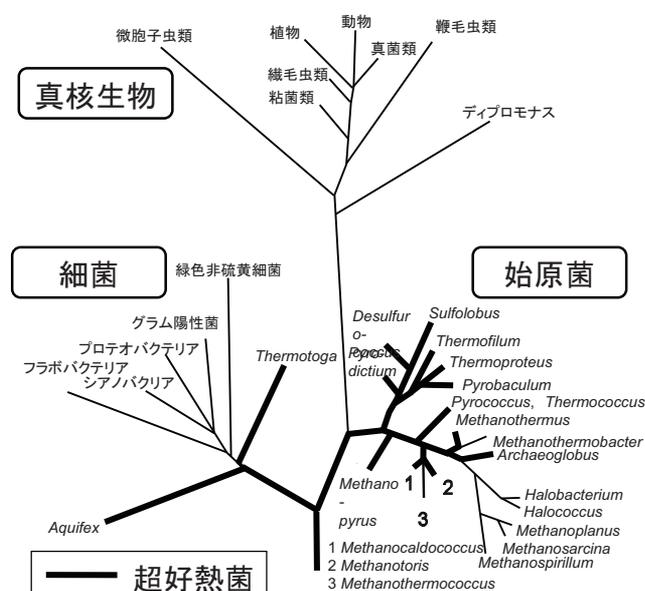


図1. 全生物の進化系統樹

好熱菌の発見

1980年代前半、ドイツのK. Stetterらを中心に100℃以上でも生育する微生物が分離された(2)。その後も高温環境で生育する微生物の分離が続けられているが、これらは既存の好熱菌よりさらに高い温度域で生育することから超好熱菌(hyperthermophile)と呼ばれている。

現在、超好熱菌とは、一般に90℃以上で生育する微生物、あるいは至適生育温度が80℃以上の微生物として定義されている。すでにこの定義に当てはまる微生物は100種以上分離・同定されており、122℃が今までの生育最高温度として報告されている(3)。

超好熱菌は、二つの観点からとくに注目を集めている。一つは超好熱菌が進化系統樹の源流に位置するので、生物進化の流れを理解するために重要であること。もう一つは、それらが生産するタンパク質が高い耐熱性あるいは好熱性を示すという点で、従来の酵素と比べて広い温度範囲で長期間使用可能なことから、新しい技術開

発や産業プロセスへの応用が期待できることである(4)。

われわれは、鹿児島県小宝島の硫気坑から100℃でも生育できる超好熱始原菌*Thermococcus kodakaraensis* KOD1(図2)を分離し、多くの耐熱性酵素について検討してきた。ここでは、耐熱性DNAポリメラーゼの利用について述べてみたい。

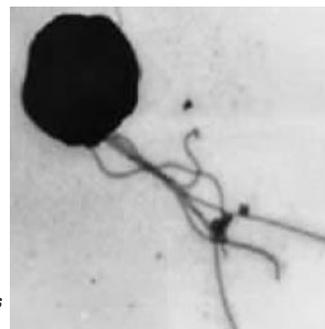


図2. *Thermococcus kodakaraensis* KOD1の電子顕微鏡写真

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法の開発

シータス社のK. MullisがPCR法を開発(5)してから四半世紀が経った。簡単に遺伝子の特定領域を100万倍以上に増幅できるこの技術は、微量遺伝子の検出など生命科学の研究に不可欠な技術であるだけでなく、法医学、親子鑑定、環境中の微生物モニタリング、食品工場での雑菌汚染の早期発見など応用面でも幅広く利用されている。彼はこの業績が認められて1993年にノーベル賞を受賞している。PCR法の概略を示したのが図3である。①まず95℃程度の高温で二本鎖DNAを一本鎖に解離(変性)させ、②その後55~60℃でプライマー(別途化学合成した相補的オリゴヌクレオチド)を結合させ(このプロセスを「アニーリング」という)、③最後に60~72℃でDNA鎖の伸長反応が進む。この3つの工程を25~30回繰り返すことにより試料DNAを指数関数的に増幅させることができる。厳密に言えば、両末端が整った目的一本鎖断片が生じるのは2サイクル目を終了した時点でであり、3サイクル目から目的二本鎖断片が指数関数的に増えることになる。最終的に電気遊動で単一バンドが目視できるまでに増幅(100倍以上)されることになる。開発当初は大腸菌のDNAポリメラーゼが使われていたが、高温処理が含まれているためサイクル毎に酵素を添加する必要があった。この煩雑さから逃れるために、耐熱性のDNAポリメラーゼが利用されるようになったのである。

PCRをうまく行うためには、サイクル数、温度、時間、プライマー、緩衝液など、それぞれについて最適な条件を検討する必要がある。おおよその指標として、DNA増幅が認められない場合には、アニーリング温度を下げる、反応時間を延ばす、熱変性時間を長くするなどの方法が有効である。

一方、目的のDNA以外の非特異的な増幅が認められる場合には、アニーリング温度を上げる、合成時間を短くする、プライマーのデザインを変更する(繰り返し配列を避ける)などの方法が有効である。これらの方法でも改善が認められない場合には、緩衝液中のMgイオン濃度を変化させる(1~6mM)とよい結果が得られる場合がある。

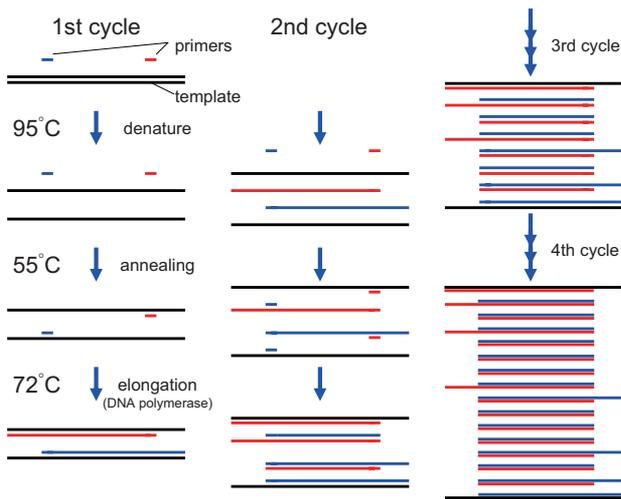


図3. PCR法の実際

DNAポリメラーゼの種類

PCRは優れた遺伝子増幅方法であるが、前述のように増幅が認められない、あるいは非特異的増幅などのトラブルはもちろんのこと、反応速度や正確性などにおいて改善すべき点も多く残されている。

反応条件の至適化だけでなく、酵素であるDNAポリメラーゼを改良する試みも多くなされてきた。PCR用酵素として使用されているDNAポリメラーゼは、細菌由来のPol I型酵素と、始原菌由来DNAポリメラーゼを含む α 型酵素に大きく分けることができる。

Taq DNAポリメラーゼに代表されるPol I型酵素は、DNA合成活性が高いが、校正機能としての3'→5'エキソヌクレアーゼ活性がない場合が多く、増幅の際の正確性に問題がある。

α 型酵素は強い3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有しており、正確な増幅反応をおこなえるが一般的に伸長活性は低い場合が多い。したがって目的に応じた酵素の使用が望ましい。

KOD1株の耐熱性DNAポリメラーゼとその特性

好熱菌の酵素なら耐熱性が高いはずであると考え、シータス社が *Thermus aquaticus* のポリメラーゼをTaqポリメラーゼとして最初に商品化した。しかしこのTaqポリメラーゼは伸長反応の速度は速いが、エキソヌクレアーゼ活性が低いため校正機能が弱く、忠実度（正確性）が悪いという欠点がある。そこで *Thermus* よりさらに高温（90℃以上）で生育する超好熱菌が探索され、始原菌（アーキア）に属する *Pyrococcus furiosus* の酵素（Pfuポリメラーゼ）が商品化された。この酵素は、Taqポリメラーゼと比較して、耐熱性は高く忠実度も良いのだが、合成速度が遅いという欠点があった。

そこで私たちは、新たに超好熱菌を自然界から分離し、より良質のポリメラーゼを探索することにした。鹿児島県小宝島の硫気坑から超好熱性始原菌を分離し、*Thermococcus kodakaraensis* KOD1と名付けた(6,7)。本菌のDNAポリメラーゼ（KODポリメラーゼ）遺伝子の構造(8)を図4に示す。ポリメラーゼ構造遺伝子の中にin frameで2つのインティンが含まれていた(9)。この遺伝子が転写・翻訳されて大きなポリペプチドが合成され、自発的に折りたたまれた際にタンパク質スプライシングが起こり、2つのエンドヌクレアーゼが生じる。その時に、ポリメラーゼ部分(3つの赤色のペプチド部分)が自動的に連結され正常なKODポリメラーゼが生成

されることが判明した。そこで、赤色の3つの遺伝子部分のみを連結させた(2つのエンドヌクレアーゼ部分を除去した)ポリメラーゼ遺伝子を構築し、以後の実験に供した。この遺伝子を宿主である大腸菌内でクローニングし、大量発現させた後、菌体を破碎し、高温処理をすれば、ほとんどのホストたんぱく質は熱変性して沈殿し、耐熱性のポリメラーゼは溶解したままなので、精製が容易である。このあとイオン交換カラムクロマトグラフィーにかければ、ほぼ純品の酵素が得られる。

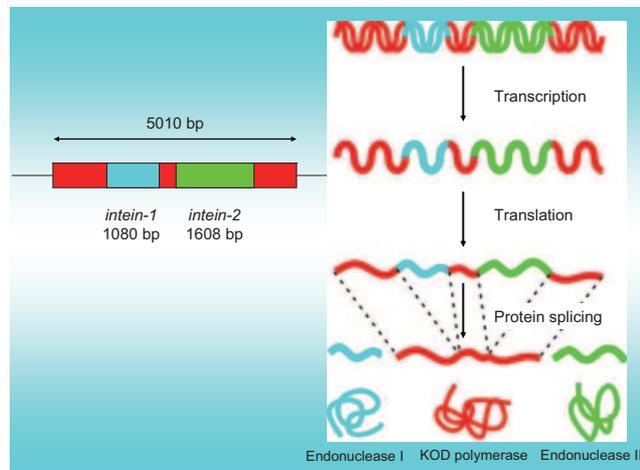


図4. KOD1株のDNAポリメラーゼ遺伝子

KODポリメラーゼについて、PCRに使う場合の諸特性を他の市販されている酵素と比較したのが図5である。本酵素は、より長く、より速く伸長反応が進み、最も忠実度が高い（正確な）という三冠王の酵素であることが明らかになった(10,11)。

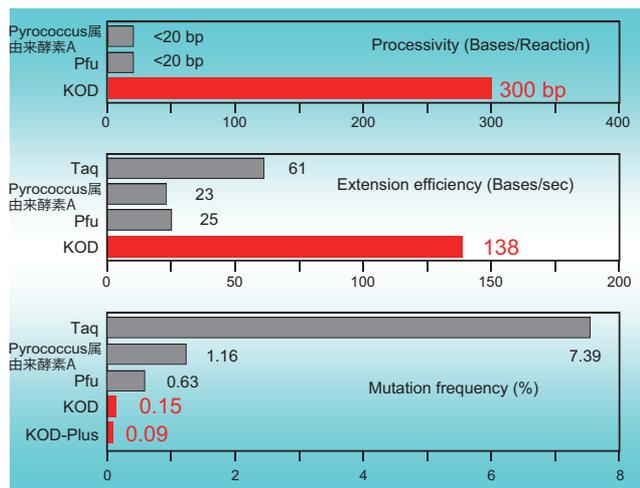


図5. KOD DNAポリメラーゼのPCRにおける性能比較

DNAポリメラーゼの立体構造

KODポリメラーゼの結晶が得られたので、X線回折によりこの立体構造を決定した(図6)(12,13)。ポリメラーゼ活性領域を示したのが図7である。活性中心は3つのアスパラギン酸で構成されており、その近傍にはリジンやアルギニンの正荷電アミノ酸が壁を成している。DNA合成反応の基質は負荷電のヌクレオシド三リン酸であるから、正荷電の壁の方へ容易に近づくことができ、局部的に基質濃度が高くなるために、反応が早く進むのであろう。エキソヌクレアーゼ活性領域を示したのが図8である。この図のフォークポイントには7つのアルギニン残基がある。他の同種酵素で7つあるも

のはまだ見つかっていない。DNAは当然負に荷電しているから、正に荷電しているアルギニンとはうまく認識し合って長いDNA合成が可能になっているものと考えられる。またこのアルギニンの一つを他のアミノ酸に置換すると忠実度が低下するので、正確性も7つのアルギニン残基のお陰であろう。また酵素の立体構造に基づいて、ポリメラーゼ活性と校正機能の協働作用を論じることができるのも構造生物学の利点であろう(14)。

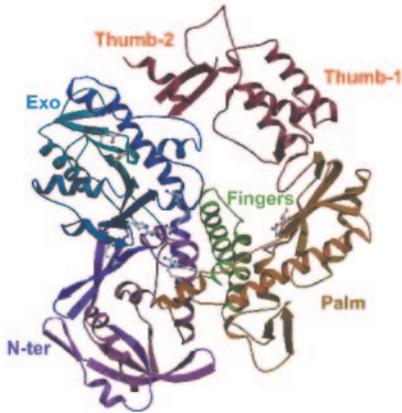


図6. KOD DNAポリメラーゼの立体構造

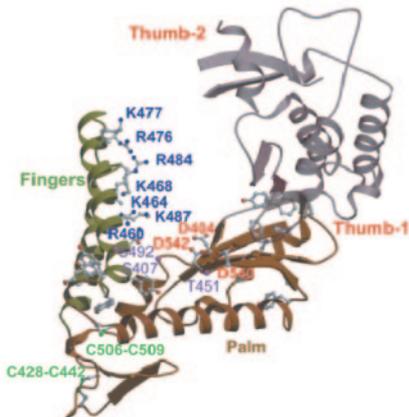


図7. KOD DNAポリメラーゼのポリメラーゼ領域

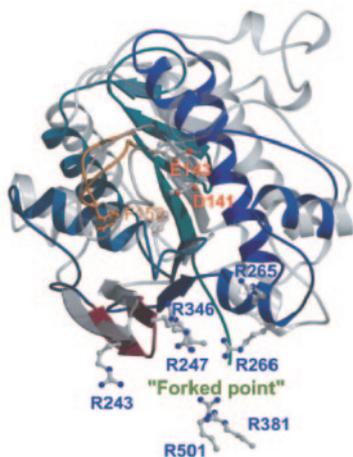


図8. KOD DNAポリメラーゼのエクソヌクレアーゼ領域

ホットスタートPCR

通常のPCRを行うと、最初の昇温時にどうしてもミスマッチプライマーのアニーリングやプライマーダイマーが生じてしまい、目的外のDNA断片が増幅されることがある。そこで、最初の昇温時にDNAポリメラーゼの活性をマスクし、高温になってからPCRがスタートするようにすれば、上述の問題を回避することができる。これがホットスタートPCRである(図9)。

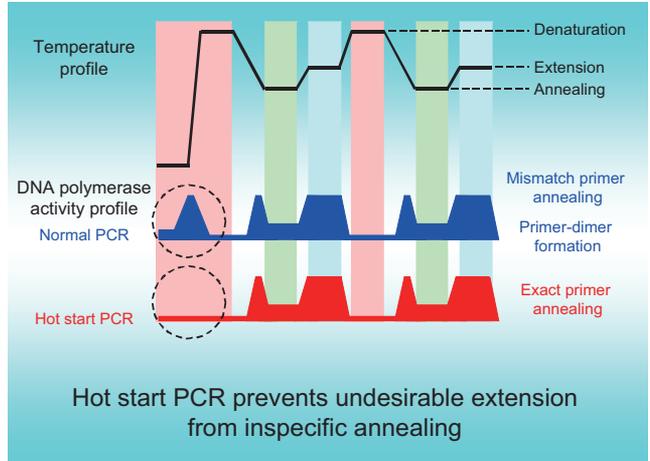


図9. ホットスタートPCRの特性

われわれはまず抗DNAポリメラーゼモノクローナル抗体を作製し、その中から酵素活性を阻害する抗体を選択することにした。まず精製したKODポリメラーゼを用いてマウスを免疫し、その脾臓細胞(抗体を生産することができるが、増殖し続けることができない)と、抗体は作れないが増殖し続けることができる癌細胞を融合させ、抗体産生能力があり増殖することができるハイブリドーマを16株得た(15)。それぞれが独自のモノクローナル抗体を生産するので、それらがポリメラーゼ活性を阻害するかどうかを調べた。特に阻害度が強力な2種の抗体が得られたので、それらについてエピトープ解析を行った。すなわち、抗体が抗原タンパク質のどの位置に結合しているのかを調べたのである。3G8抗体はDNAポリメラーゼ活性を示す保存領域に結合し、βG1抗体は3'→5'エキソヌクレアーゼ活性の保存領域に結合することが明らかになった。2つの抗体を同時に添加すると、低温域ではポリメラーゼ活性をほぼ完全に阻害し、高温域になるとマウス由来のタンパク質であるため熱変性してポリメラーゼからはずれて酵素活性が回復する(図10)。商品化したキット(KOD-Plus-)には、これらのモノクローナル抗体が添加されている。

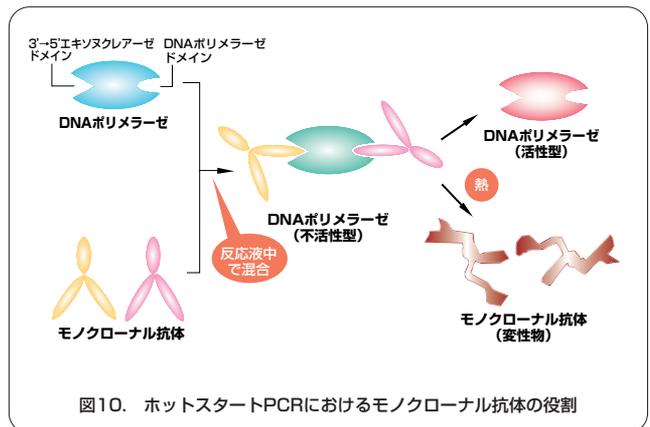


図10. ホットスタートPCRにおけるモノクローナル抗体の役割

KOD FXの凄さ

KODポリメラーゼの特性はいろいろな人からも指摘されてきた。例えば理化学研究所の林崎氏は、いろいろな生物種の遺伝子を紙に浸み込ませたDNA bookを作られたが、そこからPCRで遺伝子増幅できるのはKODポリメラーゼだけであるといわれた。また感染症研究所で出されている病原菌の検出マニュアルの中で、わざわざKODポリメラーゼでPCRを行うように記載されている例もある。さらには最近では、高性能PCR試薬としてKOD FXが開発され、東洋紡(株)から発売されている。その特徴は、①高い成功率、②抜群の増幅効率、③優れた伸長性(増幅可能鎖長)、④高い正確性、である。さらにこの酵素は、血液、マウス睾丸ライゼート、植物抽出液などの天然試料についてDNAを抽出することなく、そのままPCRにかけることが可能である。また通常はDNAを抽出しがたい酵母やカビなどのコロニーPCRも簡単に行えるし、GC含量が90%以上のプライマーを使用してもPCRが可能である。このような特徴は他の酵素では不可能であるため、多検体試料を高速処理するために必要な自動化などの場合には、その有用性が際立つことであろう。

実施例につきましては、オンラインUpload vol.99をご覧ください

参考文献

- 1) 工学系のための生化学 左右田健次・今中忠行・谷澤克行 編著 化学同人 2012
- 2) Stetter K: *Nature*, **300**, 258-260 (1982)
- 3) Takai K, Nakamura K, Toki T, Tsunogai U, Miyazaki M, Miyazaki J, Hirayama H, Nakagawa S, Nunoura T, Horikoshi K: *Prod. Natl. Acad. Sci. USA*, **105** (31), 10949-10954 (2008)
- 4) 跡見晴幸, 今中忠行: *生化学* **75**, 561-575 (2003)
- 5) Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **51** (Pt 1), 263-273 (1986)
- 6) Morikawa M, Izawa Y, Rashid N, Hoaki T, Imanaka T: *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 4559-4566 (1994)
- 7) Atomi H, Fukui T, Kanai T, Morikawa M, Imanaka T: *Archaea*, **1**, 263-267 (2004)
- 8) Takagi M, Nishioka M, Kakihara H, Kitabayashi M, Inoue H, Kawakami B, Oka M, Imanaka T: *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 4504-4510 (1997)
- 9) Nishioka M, Fujiwara S, Takagi M, Imanaka T: *Nucleic Acids Res.*, **26**, 4409-4412 (1998)
- 10) Nishioka M, Mizuguchi H, Fujiwara S, Komatsubara S, Kitabayashi M, Uemura H, Takagi M, Imanaka T: *J. Biotechnol.*, **88**, 141-149 (2001)
- 11) Imanaka T, Takagi M: *J. Chin. Inst. Chem, Engrs.* **32**, 277-288 (2001)
- 12) Hashimoto H, Matsumoto T, Nishioka M, Yuasa T, Takeuchi S, Inoue T, Fujiwara S, Takagi M, Imanaka T, Kai Y: *J. Biochem.*, **125**, 983-986 (1999)
- 13) Hashimoto H, Nishioka M, Fujiwara S, Takagi M, Imanaka T, Inoue T, Kai Y: *J. Mol. Biol.*, **306**, 469-477 (2001)
- 14) Kuroita T, Matsumura H, Yokota N, Kitabayashi M, Hashimoto H, Inoue T, Imanaka T, Kai Y: *J. Mol. Biol.*, **351**, 291-298 (2005)
- 15) Mizuguchi H, Nakatsuji M, Fujiwara S, Takagi M, Imanaka T: *J. Biochem.*, **126**, 762-768 (1999)



経歴

1967年 大阪大学工学部醸酵工学科卒業
1969年 同大学院工学研究科醸酵工学専攻修士課程修了
1969年 同大学院工学研究科醸酵工学専攻博士課程中退
1973年 工学博士
1989年 大阪大学工学部教授
1996年 京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻教授
2004~2005年 第46次南極地域観測隊員
2008年 京都大学名誉教授(現職)
2008年 立命館大学生命科学部生物工学科教授(現職)

日本醸酵学会斉藤賞、日本生物工学会論文賞、日本生物工学会生物工学賞、有馬啓記念バイオインダストリー協会賞、日本化学会賞、環境バイオテクノロジー学会賞受賞、紫綬褒章受章
アメリカ微生物学アカデミーフェロー、20期・21期日本学術会議会員、日本化学会フェロー

高効率リアルタイムPCR用マスターミックス KOD SYBR® qPCR Mix

発売記念
キャンペーン
50%off

NEW

■期間：2013年1月15日～2013年3月29日（ご注文分）

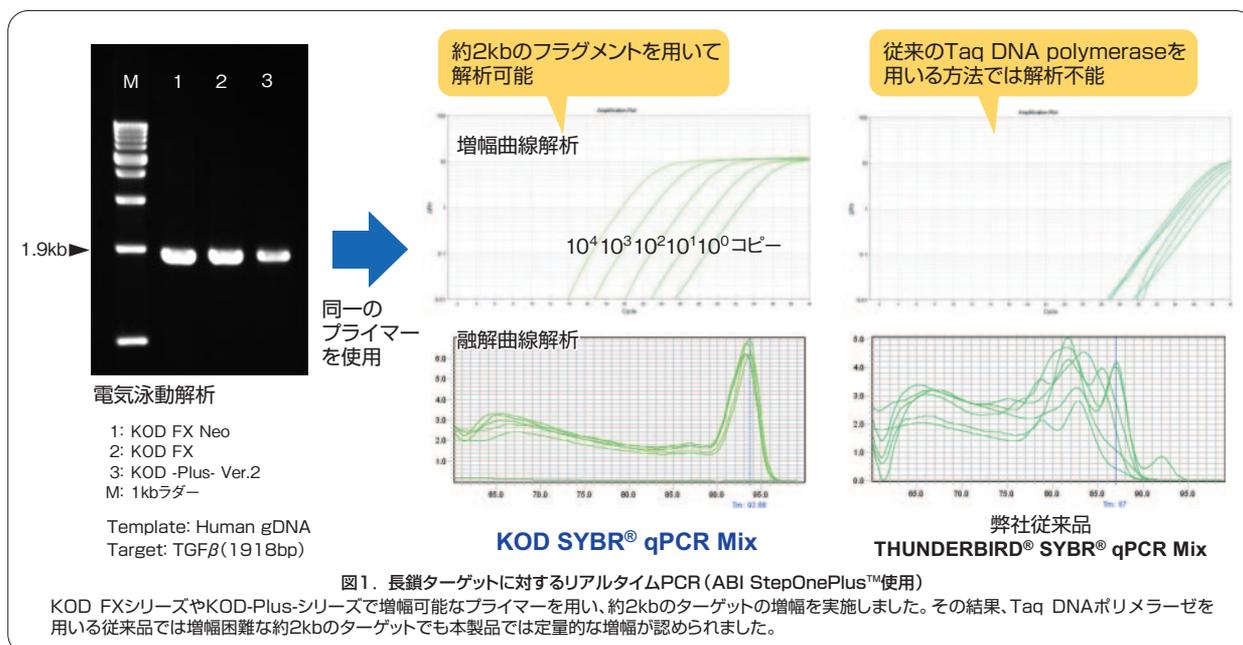
融解曲線解析によるマルチプレックスPCR解析などに最適。

KOD SYBR® qPCR Mixは、KOD DNA polymerase (KOD) を使用したSYBR® Green I 検出系によるリアルタイムPCR用マスターミックスです。3'→5'エキソヌクレアーゼ活性（校正活性）を除去したKOD exo(-) DNA polymeraseと最適化されたバッファー条件を組み合わせることで、KODの『優れた合成能』や『クルード成分の阻害を受けにくい』という性質を最大限に発揮し、様々な用途で安定したリアルタイムPCR解析が可能になりました。

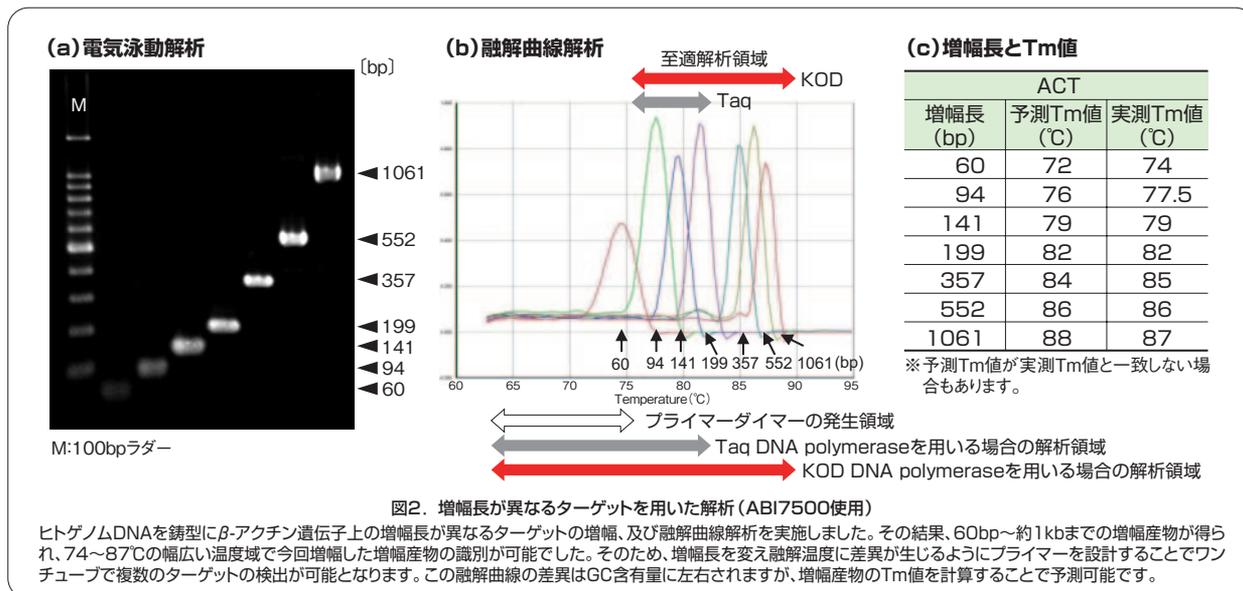


特長1 長鎖ターゲット（～2kb）に対応

KOD FXやKOD -Plus- シリーズなどの通常のPCR用に設計したプライマーをそのままご使用頂けます。長鎖ターゲットでも増幅できるためプライマーの選択幅を格段に広げることができます。



2kbまでの様々なターゲット長を選択できるため、幅広い融解曲線解析が可能です。プライマーダイマーの発生領域（短鎖領域）を外して増幅領域を選べるため、エンドポイントアッセイでの多型解析、マルチプレックスPCR解析などに有利です。

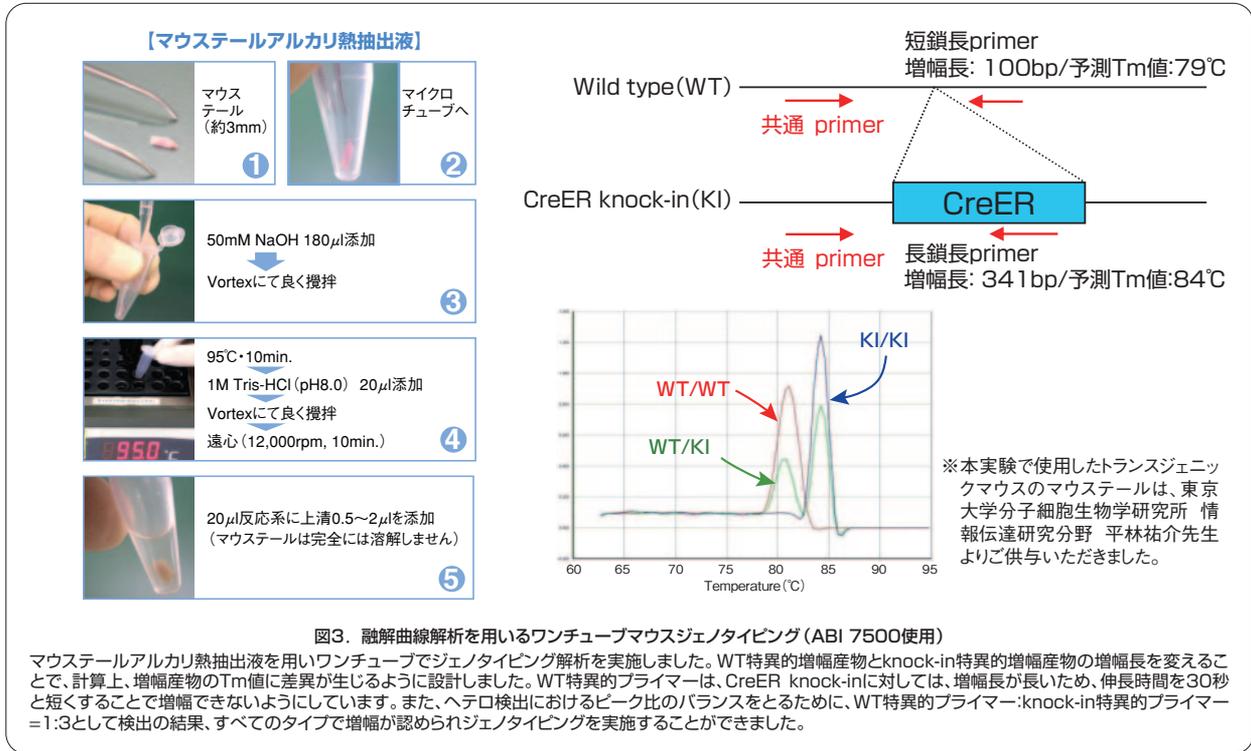


特長2 クールドサンプルを用いるエンドポイント解析に対応

植物ライセート、血液、マウステールアルカリ熱抽出液などのクールドサンプルを用いて直接検出することができます。SYBR® Green I アッセイを応用することで、煩雑だった多型解析やSNP解析を簡便化することができます。

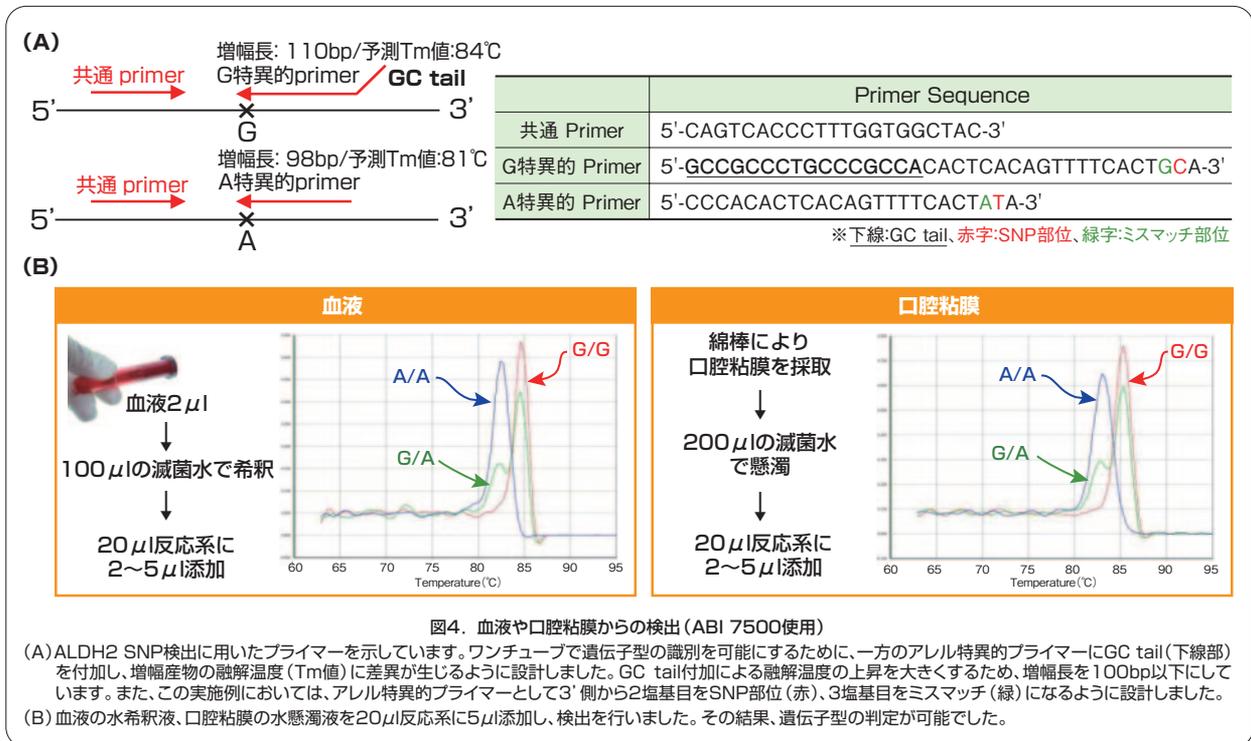
①増幅長多型を用いるジェノタイピング解析

2つの増幅産物の増幅長を変え、Tm値に差異が生じるようにプライマーを設計するだけでワンチューブでマウスのジェノタイピングを行うことができます(特長1参照)。



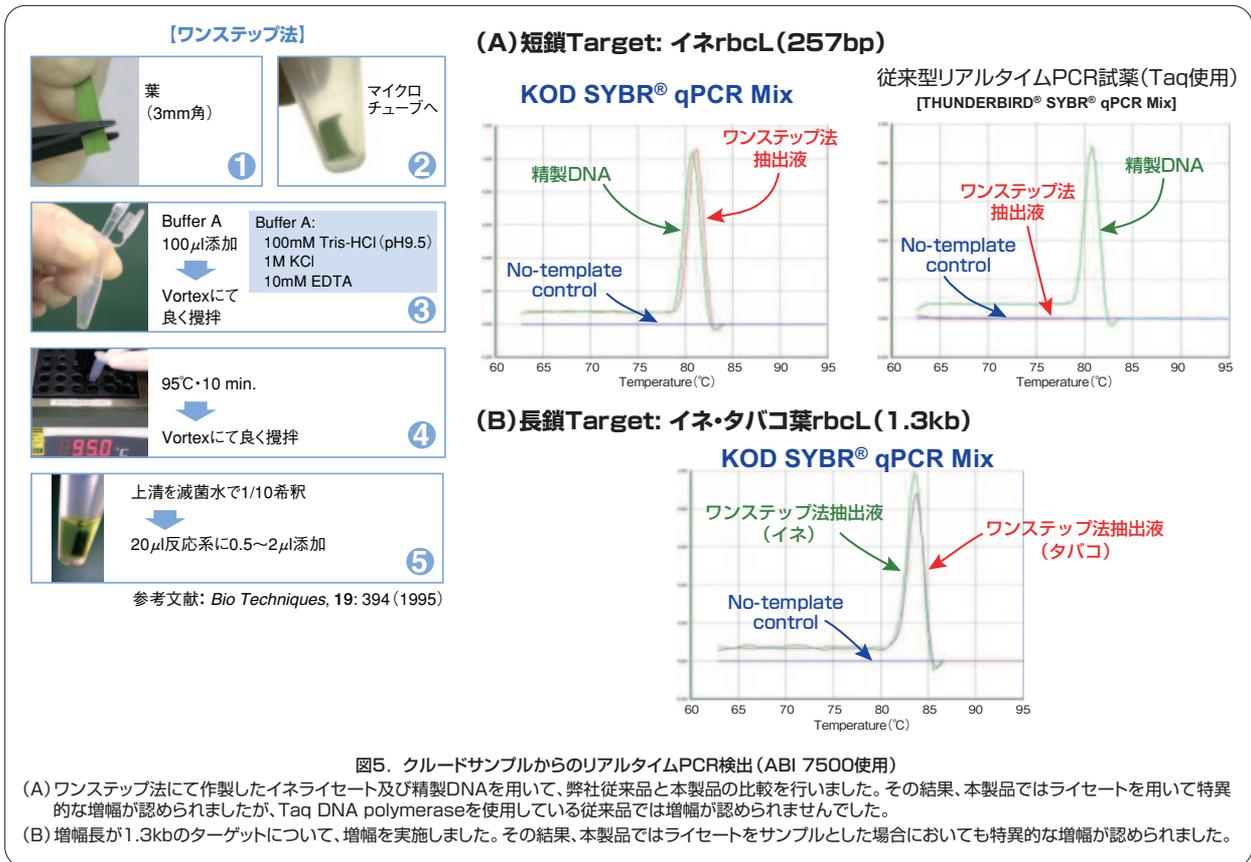
②ASP (Allele specific primer) -PCRを用いるSNP (Single nucleotide polymorphism) 解析

一方のプライマーの5'末端にGC tailを付加することにより、同サイズのターゲットの識別を融解曲線解析により行うことができます。様々な原理のASP-PCRに应用可能です。以下では、3'末端から2塩基目にSNP部位、3塩基目にミスマッチ部位となるように設計し、解析を行いました。



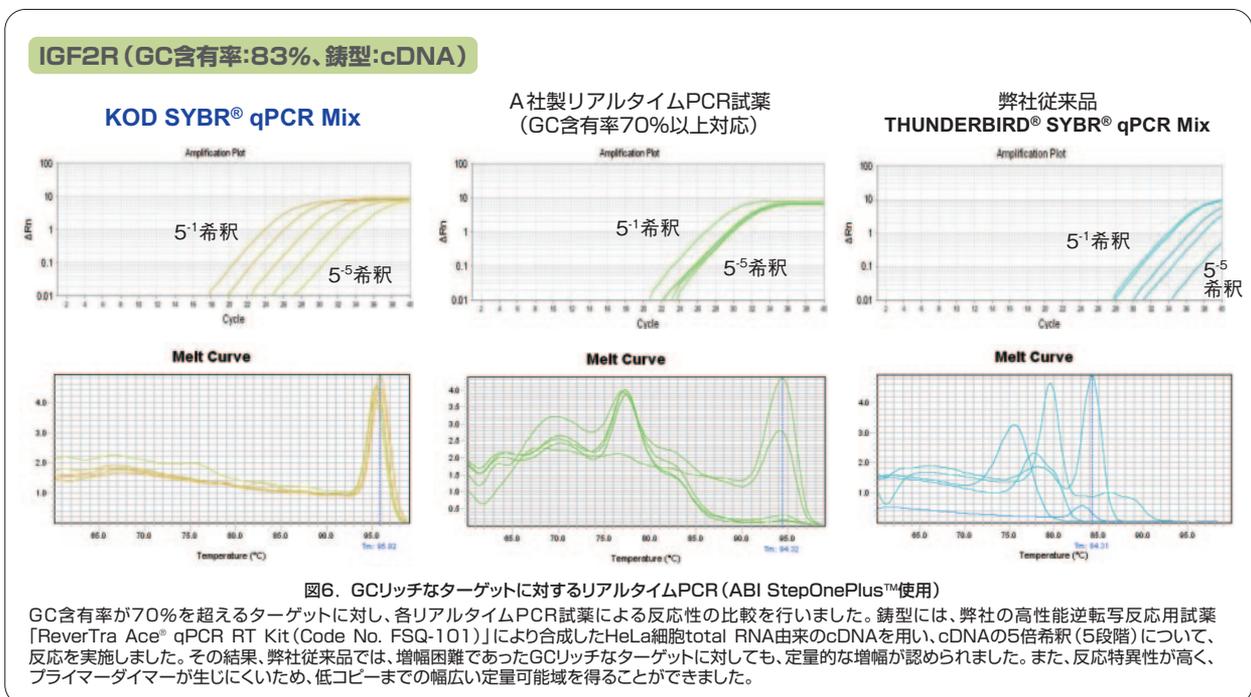
③ クールドサンプル中のターゲットの検出

従来品のTaq DNA polymeraseを使用したリアルタイムPCR試薬では増幅困難であったクールドサンプルにおいても解析が可能となりました。



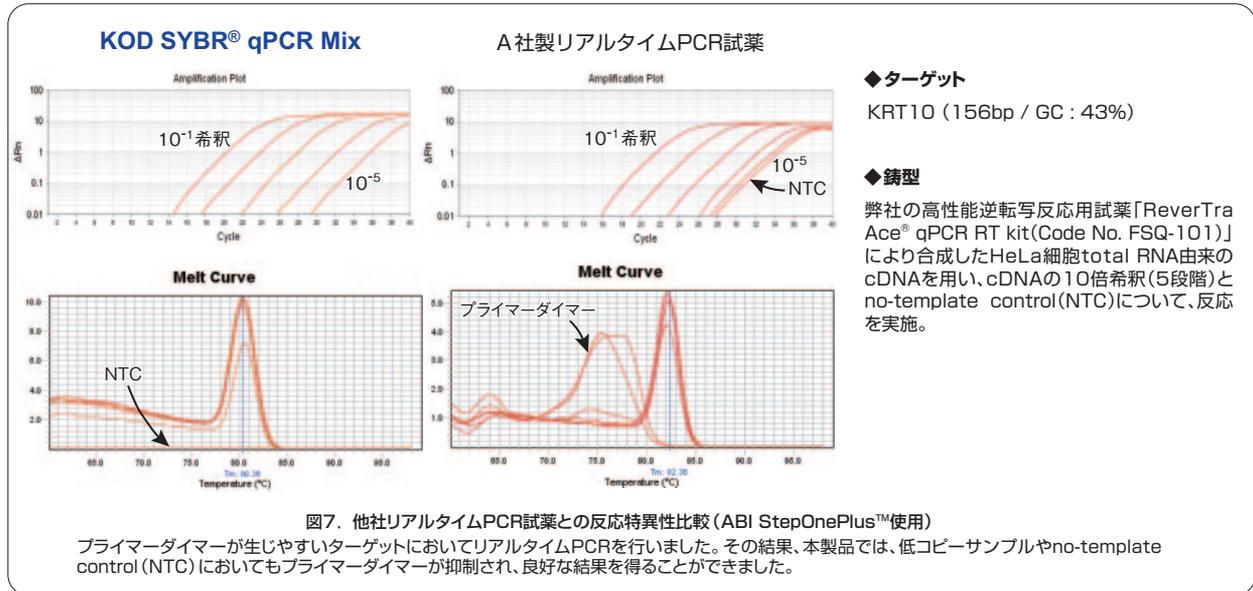
特長3 GC含有率が70%を超えるターゲットに強い

従来品では困難であったGC含有率が70%を超えるターゲットにおいても、定量的な増幅が認められます。



特長4 高い特異性

プライマーダイマーなどの非特異的の反応を抑えることで、低コピー域までの幅広い定量が可能です。また、弊社リアルタイムPCR用cDNA合成キット「ReverTra Ace® qPCR RTシリーズ」を併用することで安定した検出を得ることができます。



特長5 様々な機器に対応

ブロックタイプの機器 (Fast Modelにも対応) のほか、ガラスキャピラリーを用いる高速サイクラーにも対応しています。また50×ROX reference dyeが別添付されているため、パッシブリアレンスを必要とする機器においても各機器に適したROX濃度でご使用頂けます。

【対応可能機器例】

機 器	ROX最終濃度 (添加量)
Applied Biosystems 7000, 7300, 7700, 7900HT, StepOne™, StepOnePlus™	1X (1/50量)
Applied Biosystems 7500, 7500Fast, Agilent Technologies Mx3000P, Mx3005P, Mx4000	0.1X (1/500量)
Roche社製機器 (LightCycler® 2.0, LightCycler® Nanoなど)、 Bio-Rad社製機器 (MiniOpticon™, CFX96 Touch™など)、BioFlux Line Geneなど	不要

■キャンペーン期間：2013年1月15日～2013年3月29日 (ご注文分)

品名および内容	包 装	保存温度	Code No.	通常価格	キャンペーン価格
KOD SYBR® qPCR Mix ・KOD SYBR® qPCR Mix ・50×ROX reference dye	1ml×1本 (40回用)	-20℃	QKD-201T	¥9,800	対象外
	1.67ml×3本 (200回用)	-20℃	QKD-201	¥32,000	¥16,000

※50×ROX reference dyeがマスターミックスとは、別添付されています。
※包装欄に記載の反応回数は、50μl反応時のものです。容量は、KOD SYBR® qPCR Mixのみ示しています。

関連商品 ウィンターキャンペーン対象品 2012年11月26日～2013年3月22日 (ご注文分)

品 名	包 装	保存温度	Code No.	通常価格	キャンペーン価格
リアルタイムPCR用cDNA合成キット ReverTra Ace® qPCR RT Kit	200回用	-20℃	FSQ-101	¥38,000	¥22,800
リアルタイムPCR用cDNA合成キット 完全プレミックスタブ ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix	200回用	-20℃	FSQ-201	¥38,000	¥19,000
リアルタイムPCR用cDNA合成キット 完全プレミックスタブ (ゲノムDNA除去試薬付き) ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover	200回用	-20℃	FSQ-301	¥40,000	¥20,000

※包装欄に記載の反応回数は、10μl反応時のものです。

Emerald Lucリポーターアッセイシステム用1液検出試薬 Emerald Luc Luciferase Assay Reagent Neo

NEW

ルシフェラーゼアッセイ用試薬の発光強度がアップしました。

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Emerald Lucを用いたリポーターシステムです。Emerald Lucルシフェラーゼは、ホタルルシフェラーゼと比べ、安定で強い発光が特長です。

本試薬は従来のEmerald Luc Luciferase Assay Reagentの長持続性の特長を活かしながら、さらに発光強度を向上させた発光試薬です。

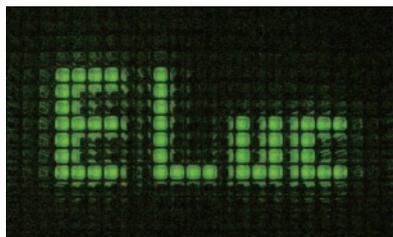
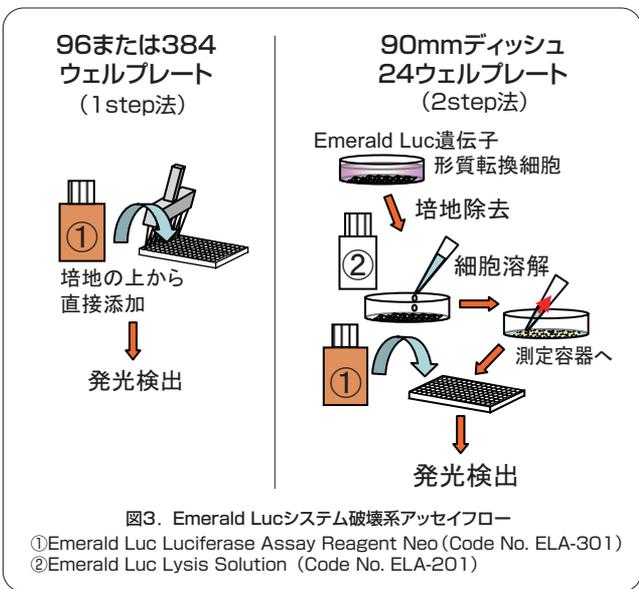


図1. Emerald Lucの発光



図2. 製品外観



特長1 高い発光強度

- 従来品の約1.4倍の高い発光シグナルが得られます。微弱なシグナルを示すサンプルの検出にお勧めします。使用方法は従来品と同様です。

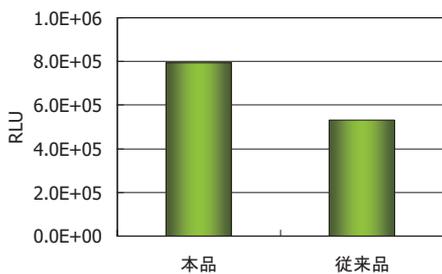


図4. 従来品との発光強度比較

96ウェルプレートに播種したHeLa S3細胞にSV40プロモーター下にELuc遺伝子を連結したプラスミドをトランスフェクションし、翌日、培地はそのまま、等量(100μl)の発光試薬を添加し、5分後に発光を測定しました。

特長2 長い発光持続性

- 発光試薬添加後、1時間経過しても8割以上の発光が認められます。

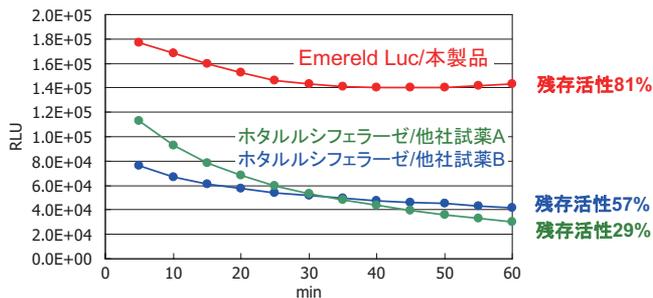


図5. ホタルルシフェラーゼ検出系との比較

96ウェルプレートに播種したHeLa細胞にSV40プロモーターに連結されたEmerald Luc遺伝子、ホタルルシフェラーゼ遺伝子をトランスフェクションし、翌日、それぞれの発光試薬を加え、5分後より5分間隔で発光を測定した。

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格
Emerald Lucリポーターアッセイシステム用1液検出試薬 Emerald Luc Luciferase Assay Reagent Neo	10ml×1本	-80℃	ELA-301	¥17,000

*96ウェルプレートの場合、10mlは100反応(約1枚分)に相当します。

販売中止

関連商品

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格
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
Emerald Lucリポーターアッセイシステム用1液検出試薬 Emerald Luc Luciferase Assay Reagent	10ml×1本	-80℃	ELA-101	¥15,000
Emerald Lucシステム細胞溶解剤 Emerald Luc Lysis Solution	100ml×1本	-20℃	ELA-201	¥9,000

Emerald Lucを用いたスプリットルシフェラーゼによるタンパク質相互作用検出系の構築とGPCRリガンドスクリーニングアッセイへの応用

株式会社Probe X 三浦 研二

はじめに

ルシフェラーゼリポーターアッセイは、*in vitro*アッセイ、セルベースアッセイ、*in vivo*イメージングなどに幅広く応用可能な基盤技術として発展を続けています。東洋紡が販売するEmerald Lucリポーターアッセイシステムは、発光強度が強くしかも長時間安定な発光を得ることができる特長があります。このたび、ProbeXではこのEmerald Lucを用いたスプリットルシフェラーゼによるタンパク質相互作用検出システムを開発し、販売を開始しました。スプリットルシフェラーゼとは、ルシフェラーゼ分子を2つの分子に分割（スプリット）し活性を失わせたものです。それらが再会合すると活性が復元することを利用し、時空間レベルでタンパク質相互作用を検出することができます。

1. Emerald Lucを用いたスプリットルシフェラーゼの構築

スプリットルシフェラーゼを構築する場合は、 β -ガラクトシダーゼのような他のタンパク質相補型システムと異なり、スプリット位置に重なりを持たせることが必要であることが知られています。しかし、強い発光を得るための最適な切断位置については詳細な知見がありませんでした。そこで、ProbeXではEmerald Lucについて種々の切断位置でスプリットした分子を作製し、網羅的な解析を行いました（文献1）。N-末端側分子として、1から406番目のアミノ酸までの分子をはじめとして一つずつアミノ酸を伸ばして、1から417番目のアミノ酸までの12種類の長さの異なる分子を発現する遺伝子を構築しました。また、C-末端側分子として、389番目のアミノ酸からC-末端までをはじめとして、やはり一つずつアミノ酸の長さを変えて413番目までのアミノ酸から

C-末端までの25種類の長さの異なる分子を発現する遺伝子を構築しました。そして、相互作用するタンパク質として、N末端側分子とFKBP、C末端側分子とFRBの融合タンパク質を発現するDNAをそれぞれ作製しました。これらの全ての組み合わせ全300通りをHEK293細胞にトランスフェクションし、ラバマイシン刺激によりFKBPとFRBの相互作用を惹起し、スプリットルシフェラーゼが会合して示す発光強度を測定しました（図1）。その結果、N末端側1-415アミノ酸（以後Emerald Luc-Nとします）C末端側394-542アミノ酸（以後Emerald Luc-Cとします）の組み合わせが最も強い発光を与えることがわかりました（図2）。

このEmerald Luc-NとEmerald Luc-Cのそれぞれについて、目的のタンパク質との融合タンパク質を発現させるベクターを構築しました（図3）。これらを用いることにより、様々なタンパク質の相互作用を検出する系を構築することができるようになりました。

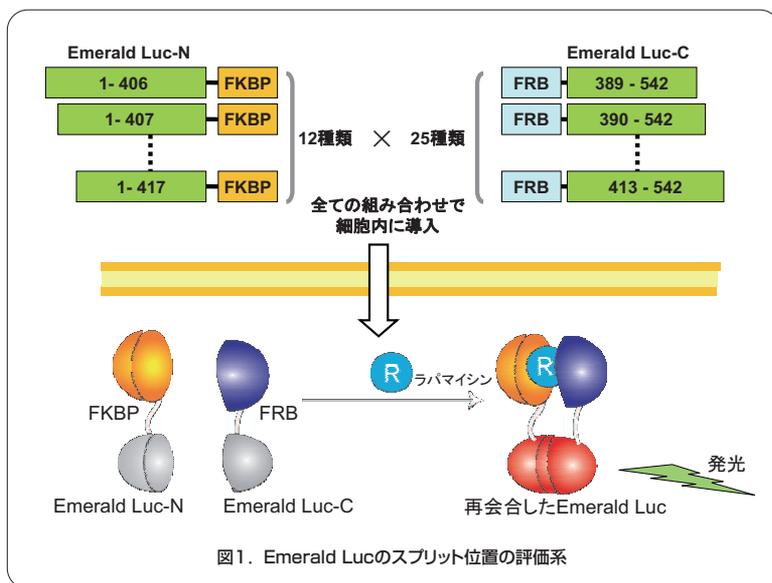


図1. Emerald Lucのスプリット位置の評価系

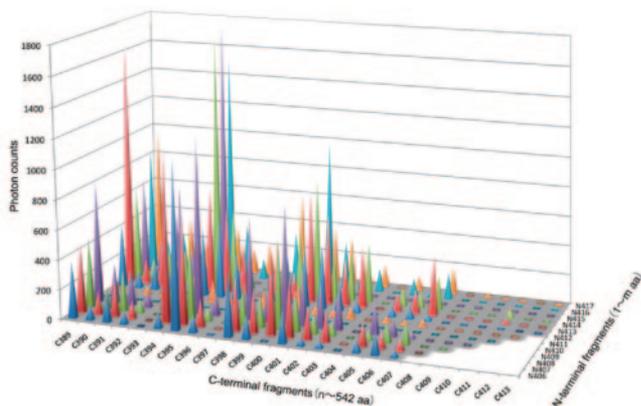


図2. Emerald Luc各種スプリット位置の組合せによる発光量（文献1より引用）

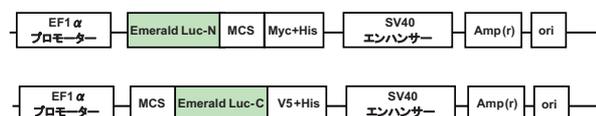


図3. スプリットルシフェラーゼ融合タンパク質発現用DNAコンストラクト

2. GPCRリガンドアッセイ系への応用

GPCRは様々な生体内のシグナル伝達に関与し、創薬の標的分子として注目を集めています。GPCRは細胞外ドメインにリガンドが結合すると細胞内ドメインにβ-アレスチンが結合しシグナルが伝達されます。ProbeXでは、このGPCRとβ-アレスチンの相互作用とスプリットルシフェラーゼを組み合わせたGPCRリガンドアッセイ系を構築しました(文献1)。図4に示すように、目的とするGPCRのC末端にEmerald Luc-Cを融合した遺伝子、およびβ-アレスチンのN末端にEmerald Luc-Nを融合した遺伝子を作製して、両者を同時に細胞内に発現させます。この細胞にリガンドを添加すると、GPCRとβ-アレスチンの相互作用によりスプリットルシフェラーゼが再会合し、発光が起こります。SSTR2についてのアッセイ系を構築し、リガンドとしてソマトスタチンを添加したところ、濃度に対して用量依存性の曲線を描くことができました(図5)。また、抗体組織染色法により分子の分布を調べると、リガンド刺激前のGPCR+Emerald Luc-C分子は細胞膜に、Emerald Luc-N+β-アレスチン分子は細胞質にそれぞれ分布していましたが、リガンド添加により細胞質にあったEmerald Luc-N+β-アレスチンは細胞膜に集まること観察されました。また、その後、GPCRが細胞質に移行することも観察されました(図6)。これはルシフェラーゼ融合タンパク質を利用したアッセイ系がGPCR-β-アレスチン複合体の生体内の挙動を反映していることを示唆しています。

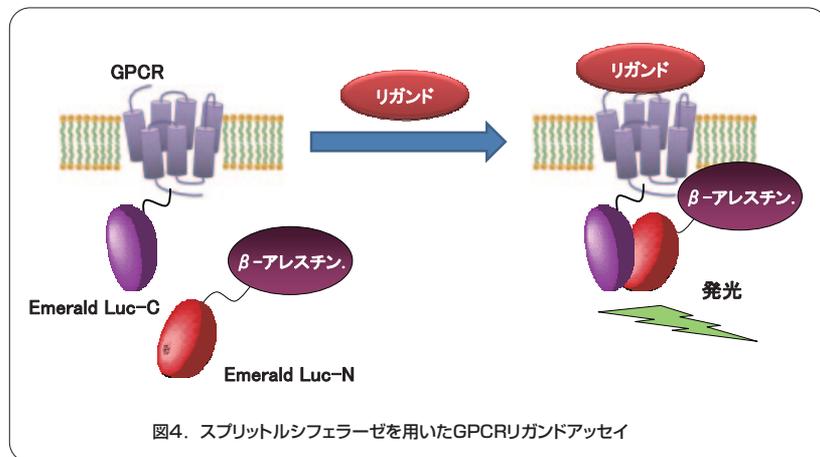


図4. スプリットルシフェラーゼを用いたGPCRリガンドアッセイ

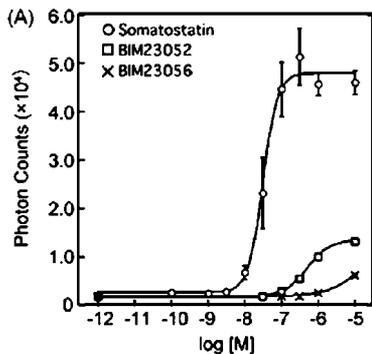


図5. SSTR2に対するソマトスタチンの用量反応曲線(文献1より引用)

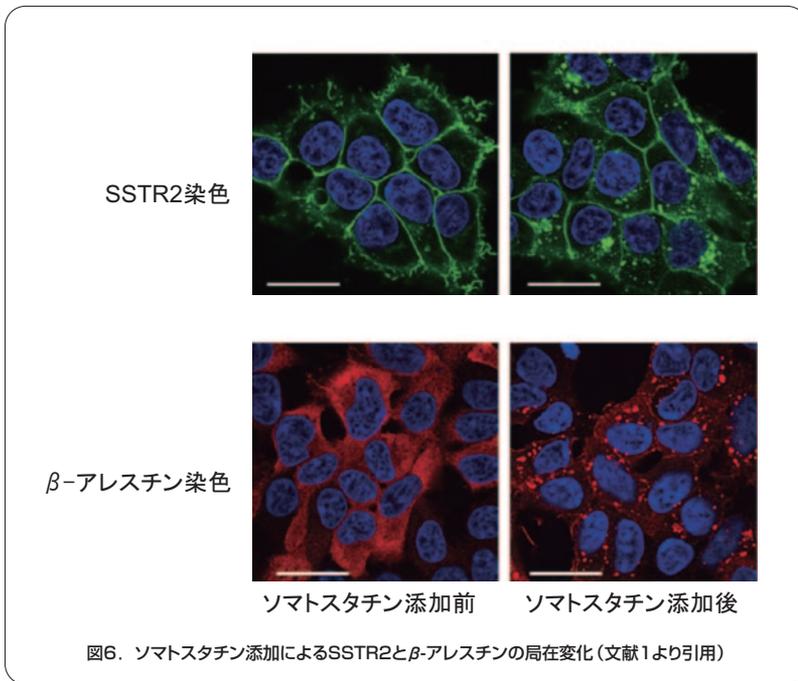


図6. ソマトスタチン添加によるSSTR2とβ-アレスチンの局在変化(文献1より引用)

3. ハイスループットスクリーニング系への応用

このGPCRリガンドアッセイ系をハイスループットスクリーニング(HTS)に適用するため、発光試薬とアッセイプロトコルの開発をおこないました。より高いS/B比を得るため、持続的に強い発光を可能とする試薬を東洋紡の協力を得て開発しました。すなわち、スプリットルシフェラーゼは、その発光強度に対する添加成分の影響が野生型ルシフェラーゼとは異なるため、スプリットルシフェラーゼ専用に成分調整を行ったSPLIT GLOW Cell Assay Reagentを開発しました。本試薬の発光は90分以上持続し(図7)、多数の検体を処理する場合でも、プレート内およびプレート間のバラツキを抑えることができます。また、96ウェルプレートに対応したプロトコルの最適化を行いました。この結果、ADBR2およびSSTR2のリガンドアッセイ系においていずれも、Z'が0.75以上となり、HTSに適用できることが示唆されました(表1)。

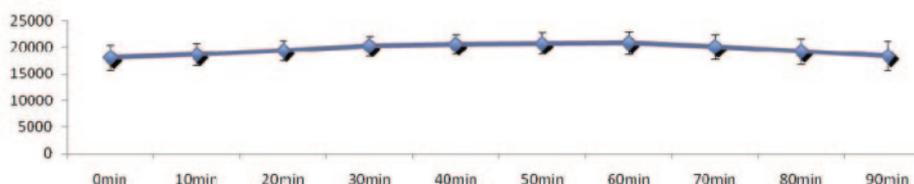


図7. SPLIT GLOW Cell Assay Reagentの発光持続性

表1. スプリットルシフェラーゼを用いたGPCRリガンドアッセイの性能

	シグナル値			Z'	
	平均	標準偏差	CV (%)		
SSTR2	陰性	1,072	132	12.3	0.77
	陽性	87,300	6,344	7.3	
ADRB2	陰性	510	67	13.1	0.78
	陽性	47,433	3,318	7.0	

4. ProbeXのスプリットルシフェラーゼタンパク質相互作用アッセイ系サービス

ProbeXでは種々のGPCRについてリガンドアッセイ用安定発現細胞株をご用意しております(表2)。ほとんどの細胞でS/B比は40以上となっており安定的にアッセイを行っていただけます。その他のGPCRについても、ProbeXにて安定発現細胞株の作製を受託いたします。また、GPCR-リガンドアッセイ系以外にも、Hif1 α およびHif1 β の会合のような細胞質タンパク質同士の相互作用検出などで実績があります。ご希望のアッセイ系を作製いたしますので、是非ご相談ください。

表2. ProbeXのGPCRリガンドアッセイ用安定発現細胞株

GPCR	Class	S/B	
		ARRB1	ARRB2
ADCYAP1R1	Gs	42.8	—
ADRA2A	Gi	—	11.8
ADRB2	Gs	74.4	71.9
AGTR1	Gq	271.0	9.8
AGTRL1	Gi	117.2	90.5
CCKBR	Gq	—	46.0
EDG1	Gi	47.5	32.4
EDG3	Gi	—	41.9
ENDRA	Gq	107.2	44.5
ENDRB	Gq	45.2	46.2
OPRM1	Gi	982.2	52.1
SSTR2	Gi	166.8	105.5

おわりに

ルシフェラーゼによる発光をリポーターとする検出系は、蛍光をリポーターとする検出系と異なり励起光を必要とせず、また長波長の光を利用できることから、*in vivo*イメージングにも適しています。ProbeXではスプリットルシフェラーゼタンパク質相互作用アッセイを*in vivo*イメージングに適用する取り組みも行っています。今後も本アッセイ系は多様な分野での活用が期待されています。

文献

1. N.Misawa, A.K.M. Kafi, M. Hattori, K. Miura, K. Masuda and T. Ozawa, *Anal. Chem.*, **82**, 2552-2560 (2010)

お問い合わせ先 株式会社 ProbeX
 東京都文京区本郷4丁目1番4号 コスモス本郷ビル4F
 tel : 03-5842-3204
 mail : info@probex.jp

高効率リアルタイムPCR用マスターミックス

KOD SYBR® qPCR Mix

新発売

50%offキャンペーン

【期間:2013年1月15日~
2013年3月29日(ご注文分)】

ロングターゲット クールドサンプル 難配列

KOD FXやKOD -Plus- シリーズなど、通常のPCRで設計したプライマーをそのまま用いてSYBR® Green Iアッセイを行うことができます。融解曲線解析を用いて、マウス睾丸ライセートからのワンチューブでのジェノタイプ解析などを行うことができます。

⇒本誌p7-10に詳細記事がございます。

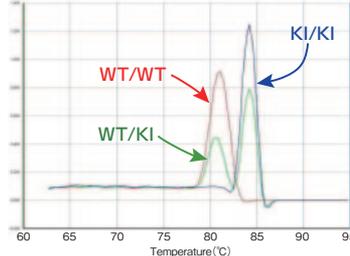
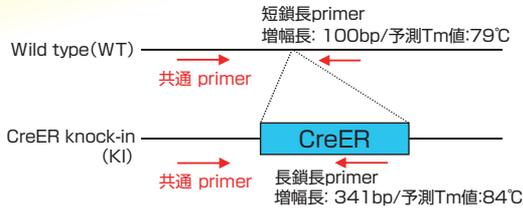


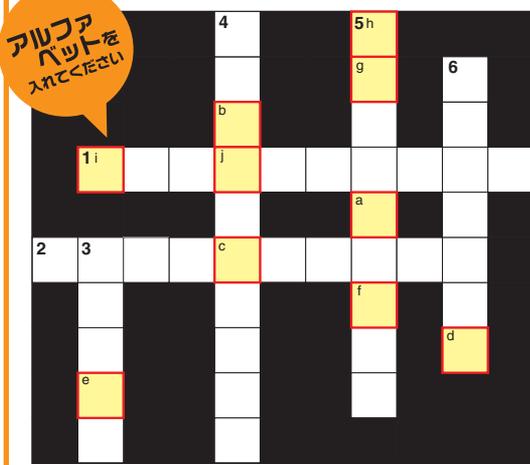
図. 融解曲線解析を用いるワンチューブマウスジェノタイプ解析 (ABI 7500使用)

マウス睾丸アルカリ熱抽出液

- ① マウス睾丸 (約3mm)
- ② マイクロチューブへ
- ③ 50mM NaOH 180μl添加
Vortexにて良く攪拌
- ④ 95°C・10min.
1M Tris-HCl (pH8.0) 20μl添加
Vortexにて良く攪拌
遠心 (12,000rpm, 10min.)
- ⑤ 20μl反応系に上清0.5~2μlを添加 (マウス睾丸は完全には溶解しません)

バイオ・クロスワードパズル ~代謝編~

プレゼント付き



ミノカギ

タテのカギ

1. アセチルCoAから、テルペノイドやステロイド合成の出発物質であるイソペンテニルニリン酸およびジメチルアリルニリン酸を合成する生合成反応経路。_____ Pathway。
2. グルコースがピルビン酸にまで分解されること。1モルのグルコースから正味2モルのATPが合成されます。嫌気状態でも起こりうる代謝系の代表的なものです。
3. 光合成の初期の過程であり、光のエネルギーを利用して水が酸素に変換されるとともに、二酸化炭素の還元に必要なNADPHとATPをつくり出します。_____ reaction。
4. ゲノム (genome) は細胞内の全遺伝子 (gene+ome) を指しますが、この言葉は細胞内の酵素が産生する全代謝物質を指します。
5. ATPやNADH、NADPHなどの構成成分の一つとして、エネルギー輸送や生合成系などに広く関与する重要な物質です。遺伝物質としても欠かせない成分の一つです。
6. 糖質および脂質の代謝障害により、体内のケトン体が異常に増え、臨床症状を呈する状態を言います。

【以下の選択肢の中から選んでください】

PHOTO GLYCO DARK LIGHT KETOSIS AEROBIC CITRIC ELECTRON
SALVAGE ANABOLISM METABOLISM CATABOLISM GLYCOLYSIS
ADENOSINE MEVALONATE METABOLOME NICOTINAMIDE TRICARBOXYLIC

バイオクロスワードパズルの解答に加え、UPLOADのアンケート(下記クイズコーナーに記載)にご回答いただいた方から抽選で、5名様に2,000円分の図書カードをご進呈いたします。

ご応募はこちらから

1 弊社ウェブサイト
(www.toyobo.co.jp/bio)

2 読者のコーナー

3 クイズコーナー

※ご応募期間 2013年1月22日~2013年3月29日

http://www.toyobo.co.jp/seihin/xr/lifescience/tech/reader/quiz/index.html

TOYOBO

ANNIVERSARY 130TH

東洋紡株式会社

◆◆納期・注文に関するお問合せ◆◆

ライフサイエンス事業部(大阪)

〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目2番8号
TEL.06-6348-3786 FAX.06-6348-3833
E-mail order_lifescience@toyobo.jp

ライフサイエンス事業部(東京)

〒141-8633 東京都品川区東五反田二丁目10番2号
東五反田スクエア
TEL.03-6422-4819 FAX.03-6422-4951
E-mail order_lifescience@toyobo.jp

◆◆製品内容・技術に関するお問合せ◆◆

テクニカルライン

TEL.06-6348-3888 FAX.06-6348-3833
開設時間: 9:00~12:00 13:00~17:00
(土・日・祝を除く)

E-mail tech_osaka@toyobo.jp
[URL] http://www.toyobo.co.jp/bio

PCRは東洋紡