

高発光型ルシフェラーゼ(Emerald Luc)を用いた、イメージングによるプロモーターアッセイ

オリンパス株式会社 研究開発センター 基礎技術部

はじめに

ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応を用いた遺伝子発現のプロモーターアッセイは、発光計測における高い信号/ノイズ比、広いダイナミックレンジ、定量性などの特性から、ルミノメーターを用いたフォトンカウント法によって行われています。この方法では、測定対象からの総発光量を計測するだけですので、画像としての情報は得られません。プロモーター領域を決定するようなアッセイでは、この測定で十分ですが、発生過程における遺伝子の発現パターンと形態形成の様子や、神経細胞とグリア細胞など異種の細胞が混在する場合の複数のプロモーターアッセイでは、細胞や組織を培養しながらイメージングで解析する必要があります。

高発光型ルシフェラーゼのEmerald Luc (ELuc)は、ブラジル産ヒ

カリコメツキムシに由来し、これまでのホタルルシフェラーゼに比べ、生細胞において安定で強い発光が観察されます。よって、このルシフェラーゼを用いることにより、生細胞での発光イメージングが容易に行えるようになりました。

cAMPは細胞内セカンドメッセンジャーとして、細胞外からのシグナルを核内に伝える重要な役割を果たしています。cAMP濃度が上昇するとcAMP依存性プロテインキナーゼが活性化され、転写因子であるCRE-Binding proteinがリン酸化されてcAMP Response Element (CRE)に結合し、一群の標的遺伝子の転写が誘導されます。ここでは、CREに制御されたELucを用いたイメージングによるプロモーターアッセイをご紹介します。

方法

(1) cAMP Response Element (CRE) アッセイ

pELuc (PEST) 遺伝子の5'上流にCRE、HSVtkプロモーターを配置したプラスミドを構築し、HeLa細胞にトランスフェクションしました。このプラスミドで発現されるELucのC末端にはPEST配列が付加されており、細胞内での半減期が短縮されるため変動する現象のモニターに適しています。細胞の観察は、培養液にルシフェリン (0.5mM) を添加し、Forskolin (10 μ M) で刺激後、発光イメージングシステムLUMINOVIEW (オリンパス社) を用いて行いました。撮影条件は、露出時間は5分、10分間隔で18時間撮影としました。

(2) Emerald Lucによる細胞内局在の観察

ELuc (PEST) のN末端に核移行シグナル (NLS)、もしくは小胞体シグナル (Calreticulin) を有するプラスミド、及びELucのC末端にペルオキシ局在化シグナルを有する発現プラスミドを構築しました。これらのプラスミドをHeLa細胞にトランスフェクション

して一晩培養後、培養液にルシフェリン (0.5mM) を添加して、LUMINOVIEWにて観察しました。露出時間は、それぞれ1分 (核局在)、2分 (小胞体局在)、5分 (ペルオキシソーム局在) としました。



図1. 発光イメージングシステム LUMINOVIEW (LV200)、オリンパス社製

結果及び考察

(1) cAMP Response Element (CRE) アッセイ

図2は、刺激後1時間および7時間後の発光画像です。図3は、図2右中で任意に選択した10細胞 (領域) の発光強度の時間変化をグラフ化したものです。図4は、これら10細胞の平均の発光強度を表しています。Forskolin刺激によるCREの応答は、1時間後には画像で撮れるほどになり、約4時間後にピークを迎え、徐々に回復しました。図4に示すように、各細胞の平均の発光強度変化は、これまでのルミノメーターによる結果と一致しますが、画像で各細胞について解析してみると、全ての細胞が同じような応答をしているわけではないことが分かりました。本システムでは、それらの細胞に注目して、細胞周期や分化の程度などを追跡して解析するこ

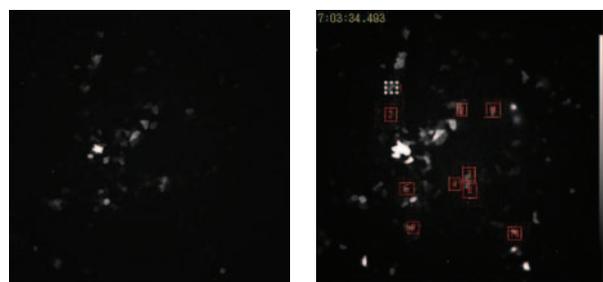
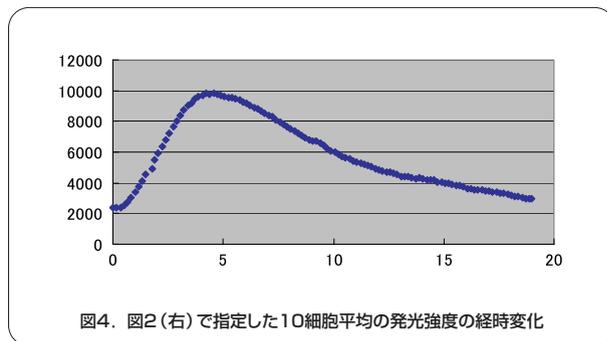
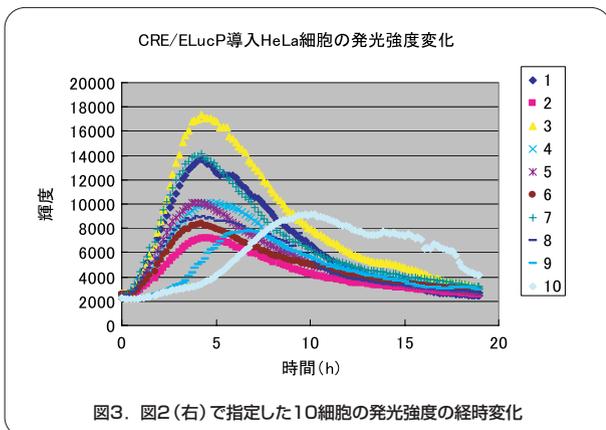


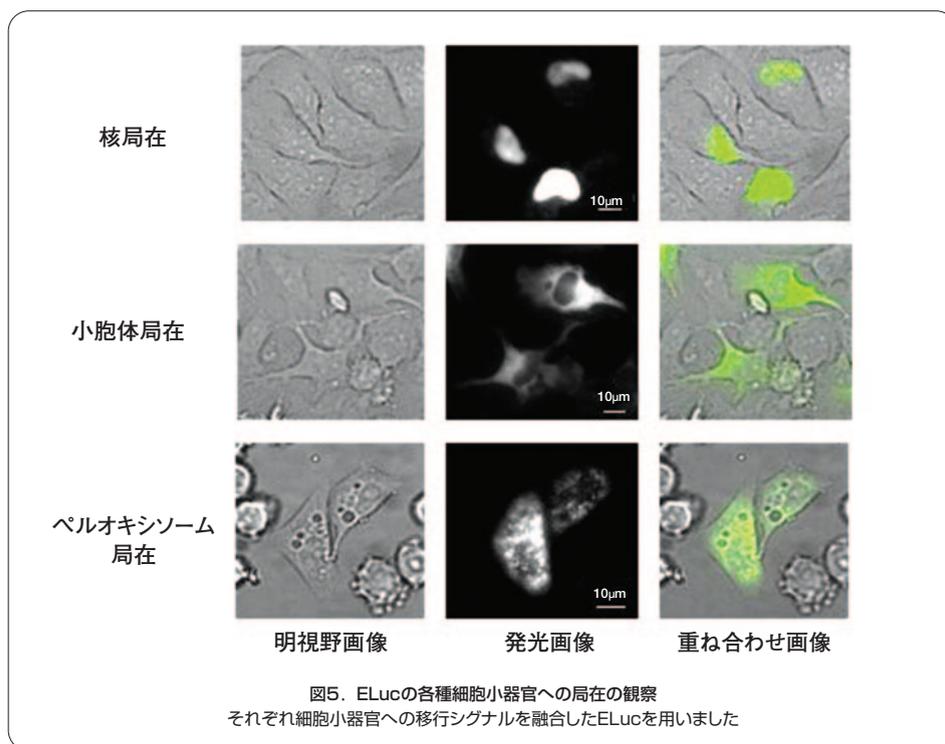
図2. CREイメージングアッセイ
左: 刺激1時間後の発光画像
右: 刺激7時間後の発光画像。任意の10細胞の領域を指定

とも可能です。このように、ELuc等のルシフェラーゼを用いてイメージングによるプロモーターアッセイを行うことによって、シグナル伝達からその後の下流の遺伝子発現までを1細胞ごと効率的に追跡できることがわかりました。



(2) Emerald Lucによる細胞内局在化の観察

高発光型のルシフェラーゼを用いることによって、緑色蛍光タンパク(GFP)のように細胞内での局在を観察することが可能でした(図5)。細胞内局在が観察できれば、細胞質と核の間のシグナル移行と、その下流に当たる遺伝子発現のデータを組み合わせた1細胞レベルでの実験なども可能になります。また、発光観察は、蛍光観察のような励起光を必要としないので、細胞へのダメージが少なく長期間のモニターにも適しているとも言えます。



関連商品

品名	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
D-luciferin (カリウム塩)	20mg 20mg×5	-20℃	MRL-101	¥24,000
			MRL-101X5	¥92,000

*本製品を弊社の検出用試薬 (Emerald Luc Luciferase Assay Reagent Code No.; ELA-101、102、D-Luciferin Code No.; MRL-101、101X5) を用い、研究目的で使用する場合はライセンス契約の手続きはございません。弊社以外の検出用試薬を用いる場合や、研究目的以外で使用する場合は、ライセンス契約が必要です。製品にライセンスポリシーが添付されていますので、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。