



Enhanced Response Dynamics for Transcription Analysis Using New pGL4 Luciferase Reporter Vectors

新しいpGL4 ルシフェラーゼレポーターベクター使用による転写解析の応答性ダイナミクスの向上

By Brad Swanson, Ph.D., Frank Fan, Ph.D., And Keith Wood, Ph.D., Promega Corporation

アブストラクト

本稿では、一過性および安定性トランスフェクション実験に適した、遺伝子発現に関連する生理的なパスウェイの研究を加速させる新しいpGL4 Luciferase reporter vectorを紹介します。

イントロダクション

DNA配列である応答エレメント (RE) の活性を測定するレポーター遺伝子アッセイは、転写因子の特異的な活性化を誘導する細胞内シグナリング経路を調べる上で有用です。ルシフェラーゼは、その特長である広いダイナミックレンジや高い感度、定量の容易さ、内在活性の欠如などにより、応答エレメントの研究やハイスループットな薬剤スクリーニングおよびターゲットの検証などのアプリケーションに理想的なレポーターとして利用されています (1)。pGL4ベクターは、哺乳動物細胞での発現を向上させるために行われたレポーター遺伝子のコードンの最適化や転写ダイナミクスに対して迅速に反応するレポーター遺伝子の導入、安定細胞株作製を容易にする哺乳動物用選択マーカーの付加などレポーター遺伝子技術に幾つもの利点が付加されました (2)。応答エレメントの活性を分析する際に最適な結果を得るためには、応答エレメントによるレポーター遺伝子の誘導 (ダイナミックレンジ) が高レベルで、なおかつ基底活性 (バックグラウンド) を低く維持させる必要があります。

本稿で紹介するpGL4ベクターの新しいシリーズ (pGL4.23~pGL4.28) には、一過性または安定性トランスフェクション実験の両方において高いダイナミックレンジで応答エレメントの活性検出を補助する最小限プロモーターが含まれています。これらのベクターでは、基底発現を低レベルに維持し、応答エレメントが活性化されると高レベルのルシフェラーゼ発現が起こります。また、我々は、最小限プロモーターと組み合わせたcAMP応答エレメント (CRE) またはNFAT-応答エレメントおよび *luc2P* 合成ホタルルシフェラーゼレポーター遺伝子を有するpGL4.29およびpGL4.30ベクターを導入しました。これら最小限プロモーターと応答エレメントを含むベクターは、応答エレメント活性の研究やハイスループットスクリーニングに要求される良質な一過性トランスフェクションアッセイおよび安定性レポーター細胞株の開発を加速させることができます。

発現の最適化、オフターゲット応答の低減および迅速な転写効率変化の検出

pGL4ベクターは、最適なルシフェラーゼ発現、オフターゲット応答の抑制、転写ダイナミクスに対する迅速な応答を可能にするために開発されました。これまで、pGL4ベクターを用いた応答エレメント活性分析のためのアッセイには、最適なレポーター発現を行うための目的応答エレメントとプロモーター両方のクローニングが必要でした。この新しい最小限プロモーターpGL4ベクターにはルシフェラーゼ発現のバックグラウンドレベルを低く維持するTATA Boxと最小限プロモーター配列が含まれています。レポーターアッセイの応答キネティクスは迅速に反応するルシフェラーゼの使用により最適化することができます。安定性レポーター細胞株はハイグロマイシンB 選択マーカーを含むベクターの使用により作製することができます。表1に新しいpGL4ベクターの特長をまとめています。このベクターシリーズで提供されるオプションにより、良質な一過性のトランスフェクション/安定性細胞株によるレポーターアッセイを構築するために目的の応答エレメントをベクターに組み込み、カスタマイズすることが可能になりました。

最小限プロモーターpGL4ベクターの開発にあたり、我々は最小限プロモーターと汎用されるヘルペスシンプレックスウイルスチミジンキナーゼ (HSV-TK) の一部の活性を比較し、どちらが非誘導状態のルシフェラーゼを低く抑えつつ高いダイナミックレンジを示すかを見極めました。この分析には、CREと最小限プロモーターまたはHSV-TKプロモーターの一部を*luc2P*レポーター遺伝子上流にクローニングしたpGL4レポーターベクターを用いました。これらのベクターとウミシイタケルシフェラーゼコントロールベクター pGL4.74 (カタログ番号E6921) をコトランスフェクションしたHEK 293細胞をイソプロテレノールで内在受容体より誘導しました。ルシフェラーゼ活性はDual-Luciferase® Reporter Assay System (カタログ番号 E1960) を用いて定量しました。図1の結果は、最小限プロモーターベクター (pGL4.24-CRE) がHSV-TK プロモーターベクター (pGL4.11-CRE-TK) よりも非常に高い誘導値を示しています。最大誘導時点 (4時間) のホタルルシフェラーゼレポーター活性を分析した結果、HSV-TKプロモーターを持つベクターに比べて誘導時のルシフェラーゼ発現が同等レベルを維持する一方で最小限プロモーターベクターの非誘導時におけるルシフェ

表1. 最小限プロモーター および応答エレメントを含むpGL4 Vectorの特長

ベクター	マルチクローニング領域	レポーター遺伝子	応答配列	哺乳動物選択マーカー
pGL4.23 [<i>luc2</i> /minP]	Yes	<i>luc2</i>	No	None
pGL4.24 [<i>luc2P</i> /minP]	Yes	<i>luc2P</i>	No	None
pGL4.25 [<i>luc2CP</i> /minP]	Yes	<i>luc2CP</i>	No	None
pGL4.26 [<i>luc2</i> /minP/Hygro]	Yes	<i>luc2</i>	No	Hygromycin B
pGL4.27 [<i>luc2P</i> /minP/Hygro]	Yes	<i>luc2P</i>	No	Hygromycin B
pGL4.28 [<i>luc2CP</i> /minP/Hygro]	Yes	<i>luc2CP</i>	No	Hygromycin B
pGL4.29 [<i>luc2P</i> /CRE/Hygro]	No	<i>luc2P</i>	CRE	Hygromycin B
pGL4.30 [<i>luc2P</i> /NFAT-RE/Hygro]	No	<i>luc2P</i>	NFAT-RE	Hygromycin B

* *luc2*: 合成ホタルルシフェラーゼ遺伝子; *luc2P*および*luc2CP*: PEST (*luc2P*)またはCL1およびPEST (*luc2CP*) の各分解配列を含むRapid Response™ ホタルルシフェラーゼ遺伝子。

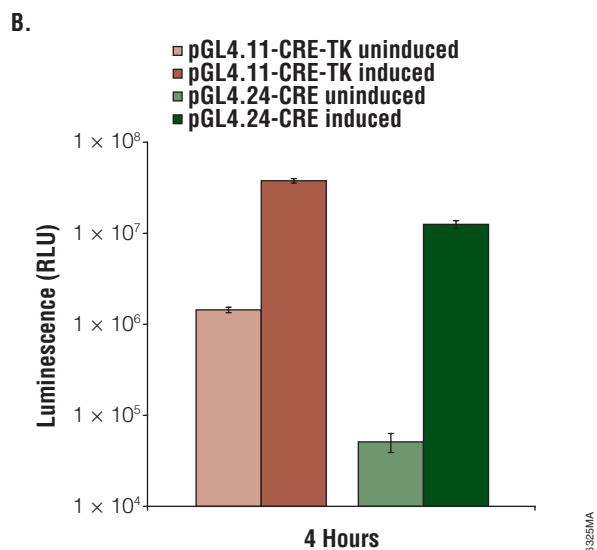
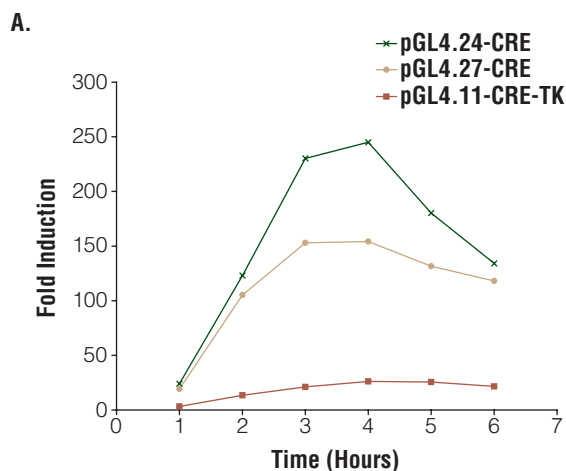


図1. CREによる活性化にともなう最小限プロモーターレポーターベクターからの高レベルなルシフェラーゼ発現誘導

パネルA. *luc2P*レポーター遺伝子上流にCREおよびHSV-TK プロモーターの一部を含むpGL4.11 (pGL4.11-CRE-TK)、CREを含むpGL4.24 (pGL4.24-CRE) またはCREを含むpGL4.27 (pGL4.27-CRE) をpGL4.74[*hRluc/TK*] ウミシイタケルシフェラーゼコントロールベクターとともにHEK293細胞に一過性にトランスフェクションした。24時間後、内在する受容体を活性化させるために1 μ M イソプロテノールを添加してレポーター遺伝子の発現を誘導した。非誘導細胞および誘導細胞はホスホジエステラーゼ阻害剤 Ro20-1724 100 μ Mで処理した。サンプルは6時間にわたり1時間ごとにPassive Lysis Buffer (カタログ番号 E1941) で溶解し、Dual-Luciferase® Reporter Assay System (カタログ番号 E1960) およびGloMax™ 96 Microplate Luminometer (カタログ番号 E6501) を用いてホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定した。CREを欠如した親ベクターではイソプロテノールによる刺激後でもレポーター遺伝子の誘導は認められなかった(データ未掲載)。

パネルB. パネルAにおける4時間後のpGL4.24-CRE Vectorから得られた高い誘導倍率が非誘導時の低いルシフェラーゼ活性によることを示していた。誘導倍率は、誘導サンプルで標準化したルシフェラーゼ活性の平均値(ホタルRLU/ウミシイタケルRLU)を非誘導細胞の標準化したルシフェラーゼ活性の平均値で割った値($n=5$; 標準偏差は棒グラフ中央のバーで示した)。

ラーゼ活性レベルが低く抑えられていることから高い誘導倍率が得られることが分かりました(図1、パネルB)。最適化したルシフェラーゼ発現とともにこの最小限プロモーターの低い基底活性をpGL4 Vectorに導入した結果、広いダイナミックレンジと高い感度を有する優れたレポーターベクターが完成しました。

CREおよびNFAT-RE pGL4 Vectorを用いたGPCRパスイの研究

pGL4.29[*luc2P*/CRE/Hygro] およびpGL4.30[*luc2P*/NFAT-RE/Hygro] Vectorは、最小限プロモーターの上流にそれぞれCREまたはNFAT-REが組み込まれています。アゴニストにより受容体が活性化すると、CREまたはNFAT-REを含む遺伝子が多くのGPCRにより活性化されるため、GPCRシグナル経路を分析する研究者にとってCREおよびNFAT-REレポーターアッセイは特に興味を集める方法になっています。G α_s 共役GPCRはCREを有する遺伝子を、G α_q 共役受容体はNFAT-REを含む遺伝子を活性化します(1, 3)。最小限プロモーターにより非誘導時のルシフェラーゼ発現が抑えられ、最適化されたpGL4 Vectorのレポーター発現が可能となり、pGL4.29およびpGL4.30 Vectorは広いダイナミックレンジで高レベルのレポーター遺伝子発現が誘導できるようになりました。両方のベクターは、迅速なアッセイキネティクスを示す*luc2P*レポーター遺伝子を含み、安定細胞株作製を容易にするハイグロマイシンB選択マーカーを有しています。これらの優れた改良により、pGL4レポーターファミリーの利点を最低限の労力でご自身のセルベースGPCR薬剤開発プラットフォームに取り入れることができます。また、一過性のトランスフェクションアッセイにも非常に良く適しています。

pGL4.29およびpGL4.30レポーターベクターを含有するHEK293細胞を用いた一過性のトランスフェクションアッセイでは、誘導後のルシフェラーゼ発現で広いダイナミックレンジを示しました(図2)。pGL4.29をトランスフェクションしたHEK293細胞を100 μ Mフォルスコリンで5時間誘導した結果、420倍の誘導を示しました。同様の実験でpGL4.30をトランスフェクションしたHEK293では1 μ M イオノマイシンおよび10ng/ml PMAで17時間誘導するとルシフェラーゼ活性が60倍に増加しました。誘導されたルシフェラーゼ発現で得られる広いダイナミックレンジと高い発光は、ハイスループットスクリーニングで望まれる高密度アッセイでこれらのベクターが非常に適していることを裏付けています。

これらのベクターを用いて作製された安定細胞株は、pF9A CMV *hRluc*-neo Flexi® target expression vectorで目的の標的GPCRを安定に発現させることによりさらにカスタマイズすることができます(4; 図3)。これら2重にトランスフェクションした安定細胞株は、pF9A vectorより目的の標的GPCRとウミシイタケルシフェラーゼ(内部標準として)の両方を安定に発現します。ホタルルシフェラーゼと並行してウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定することにより、ホタルルシフェラーゼレポーター活性を標準化し、変則的なサンプルを見つけ出すことができます。この多重アッセイはシングルレポーターアッセイを凌ぐ利点を提供します。

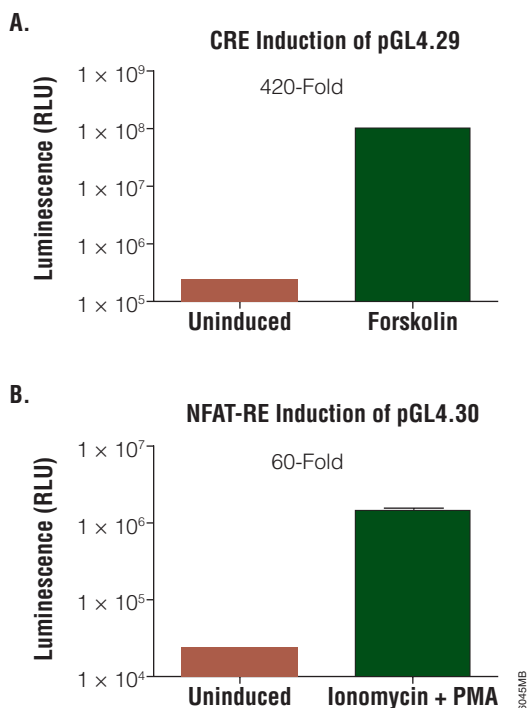


図2. HEK293細胞に一過性にトランスフェクションしたpGL4.29[*Luc2P*/CRE/Hygro]およびpGL4.30[*Luc2P*/NFAT-RE/Hygro] Vectorからの高レベルなレポーターの誘導

96ウェルプレートフォーマットでpGL4.29 (パネルA) およびpGL4.30 (パネルB) Reporter VectorをHEK293細胞へ一過性にトランスフェクションした。24時間後、pGL4.29をトランスフェクションした細胞には100μM フォルスコリンを添加して5時間、pGL4.30をトランスフェクションした細胞には1μM イオノマイシン + 10ng/ml PMAを添加して17時間にわたりレポーター遺伝子発現を誘導した。非誘導対照として、pGL4.29およびpGL4.30をトランスフェクションした細胞の両方を等量のDMSO (ピークル) で処理した。ルシフェラーゼ活性はBright-Glo™ Luciferase Assay System (カタログ番号 E2610) を用いて測定した。棒グラフ上に示された数値は各ベクターについての誘導倍率で、誘導ウェルから得られたRLUを非誘導ウェルのRLUで割って算出した (n=15; 標準偏差は棒グラフ中央のバーで示した)。

まとめ

この最小限プロモーターや特異的な応答エレメントを組み込んだ新しいpGL4ベクターにより、応答エレメントの分析を行う上でよりシンプルで優れたツールを研究者に提供します。特異的な応答エレメントの機能が明らかになれば、RNAiの効果や特異的なcDNA発現のモニタリング、ハイスループットスクリーニングによるリード化合物の同定をセルベースアッセイへ容易に移行させることができます。

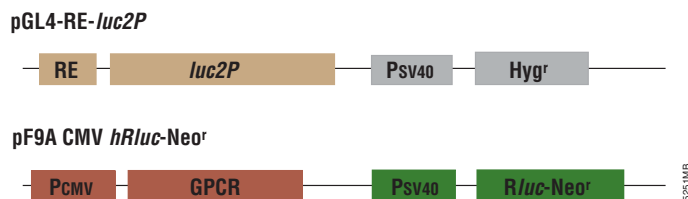


図3. デュアルレポーターによるGPCRアッセイで使用した2つのプラスミドのダイアグラム

RE, 応答エレメント/*luc2P*, PEST配列 (プロリン、グルタミン酸、セリン、スレオニン) により不安定化したホタルルシフェラーゼ; Psv40, SV40プロモーター; Hyg^r, ハイグロマイシン耐性遺伝子; PCMV, CMVプロモーター; R/*luc-Neo*^r, ウミシイタケルシフェラーゼ-ネオマイシン耐性遺伝子融合配列。PEST配列は迅速に分解するタンパク質に関連する。

参考文献

- Dinger, M.C. and Beck-Sickinger, A.G. (2004) *In: Molecular Biology in Medicinal Chemistry*, 73-94.
- Paguio, A. et al. (2005) *Promega Notes* **89**, 7-10.
- Hill, S.J. et al. (2001) *Curr. Opin. Pharmacol.* **1**, 526-32.
- Paguio, A. et al. (2006) *Cell Notes* **16**, 22-5.

プロトコル

- ◆ pGL4 Luciferase Reporter Vectors Technical Manual #TM259
www.promega.com/tbs/tm259/tm259.html

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
pGL4.23[<i>luc2</i> /minP] Vector	20 μg	E8411	58,000
pGL4.24[<i>luc2P</i> /minP] Vector	20 μg	E8421	58,000
pGL4.25[<i>luc2CP</i> /minP] Vector	20 μg	E8431	58,000
pGL4.26[<i>luc2</i> /minP/Hygro] Vector	20 μg	E8441	58,000
pGL4.27[<i>luc2P</i> /minP/Hygro] Vector	20 μg	E8451	58,000
pGL4.28[<i>luc2CP</i> /minP/Hygro] Vector	20 μg	E8461	58,000
pGL4.29[<i>luc2P</i> /CRE/Hygro] Vector	20 μg	E8471	58,000
pGL4.30[<i>luc2P</i> /NFAT-RE/Hygro] Vector	20 μg	E8481	58,000

CREおよびNFAT-REを含むpGL4ベクターを導入した安定細胞株 GloResponse™ Cell Lineについては24ページをご覧ください。