

## 蛍光および化学発光レポーターの生細胞での同時使用によるNF $\kappa$ Bシグナル伝達必須因子の解析

クロンテック (株) 細胞生物学グループ

化学発光Ready-To-Glow™ Secreted Metridia Luciferaseレポーターシステムを用いてTNF- $\alpha$ によるNF $\kappa$ B応答エレメントの活性化を検出し、それと同時に蛍光ZsGreen Proteasome Sensorを組み合わせて用いてプロテアソーム活性を検出しました。この組み合わせアッセイにより、TNF- $\alpha$ で誘導されるNF $\kappa$ B依存性シグナル伝達にはプロテアソームの活性が必要であることを実証しました。これらの蛍光および発光レポーターのシグナルの測定にはMolecular Devices社のSpectraMax M5マルチモードマイクロプレートリーダーのマルチ検出能を利用し、細胞溶解を行わずに、96ウェルプレートの同じウェルで2つのレポーターを全く同じ状態で測定することができました。

### NF $\kappa$ Bの核への移行はプロテアソームの活性に影響される

プロテアソームは巨大なタンパク質複合体で、ユビキチンを介する様式でタンパク質を短いペプチドに分解します。遺伝子の転写、細胞周期の進行、DNA修復、細胞分化、ウイルス感染、発がんなどのプロセスで重要な役割を果たしています (1)。プロテアソーム活性は、NF $\kappa$ Bによる転写の制御に関与します。すなわち、TNF- $\alpha$ 刺激によってNF $\kappa$ Bが活性化されるためには、I $\kappa$ Bがリン酸化されプロテアソームで分解されなければなりません。

プロテアソームによる分解が阻害されると、NF $\kappa$ Bの活性化は阻害されます (2-3)。しかし、プロテアソーム活性とNF $\kappa$ B依存性シグナル伝達を同じサンプルで同時にモニターすることはこれまで不可能でした。

### ZsGreen プロテアソームセンサー

Living Colors HEK 293 ZsGreen Proteasome Sensor Cell Line (製品コード 631535) は、プロテアソーム活性を簡便かつ非侵襲的に検出できる細胞株です (4)。この細胞株は、野生型ZsGreen蛍光タンパク質 (5) とプロテアソーム標的配列 (6) の融合タンパク質 (ZsProSensor-1) をコードするProteasome Sensor Vector (製品コード 632425) をHEK 293細胞に安定トランスフェクションして得られたものです。通常、この細胞内で生成したZsProSensor-1は急速に分解されます。しかし、プロテアソームの機能が阻害されると、ZsProSensor-1は急速に蓄積し、蛍光プレートリーダーまたはフローサイトメトリーで容易に検出されます (4, 7-8)。このプロテアソーム活性は、Molecular Devices社のSpectraMax M5プレートリーダーの定量モードで測定することができます (8)。

### 分泌型Metridiaルシフェラーゼ

クロンテックのReady-To-Glow Secreted Luciferaseレポーターは、化学発光基質を用いる酵素レポーター分子で、配列を最適化し、ヒトでの使用頻度の高いコドンに変換したカイアシ類の海洋微生物Metridia longa由来の分泌型ルシフェラーゼ遺伝子を利用しています (9)。分泌型Metridiaルシフェラーゼレポーターは、均一な生細胞培養液の状態でシグナル伝達経路の性質を調べるのに理想的です。強いシグナル強度と安定性を示し、酵素系を利用しているため高感度です (9-10)。このアッセイ系はダイナミックレンジが広いので、通常、サンプルを希釈する必要はありません (11)。

### SpectraMax M5 マルチモードプレートリーダー

SpectraMax M5 マルチプレートリーダーは卓上型のデュアルモノクロメーター、マルチ検出装置で、専用のシングルモード・リーダーと同様な定量能を持っています。この装置は5つの検出モード (UV~可視光吸収、蛍光強度、時間分解蛍光、蛍光偏光、および発光) をもっています (12)。

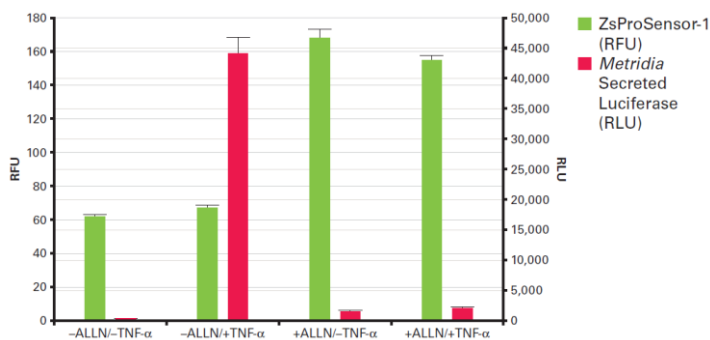
データの収集、解析および管理はSoftMax Proソフトウェアで行うことができます。このソフトウェアの機能はMolecular Devices社のすべてのマイクロプレートリーダーに装備され、クロスプレート解析やカスタム計算を行うことができます (13)。Ready-To-Glowを用いるプロトコールは、このソフトウェアのプルダウンメニューから直接見ることができます。

## プロテアソームの状態とNFκB依存性シグナル伝達の測定

プロテアソーム活性とNFκB依存性シグナル伝達との関連性を調べるために、NFκB 応答エレメントによって駆動されるReady-To-Glow secreted *Metridia* ルシフェラーゼをコードするレポーターベクター (Ready-To-Glow™ NFκB Secreted Luciferase Reporter) をProteasome Sensor Cell Lineに一過性にトランスフェクトしました。プロテアソーム活性の測定にはZsGreenの蛍光を利用し、TNF-α添加時のNFκBによるNFκB応答エレメントの転写活性化の測定には*Metridia* ルシフェラーゼによる発光を利用しました。Proteasome SensorおよびReady-To-Glowアッセイはともに生細胞でアッセイすることができ、またSpectraMax M5 マルチプレートリーダーは蛍光と化学発光モードの両方で機能するため、同じウェルの同じ細胞で測定を行いました。

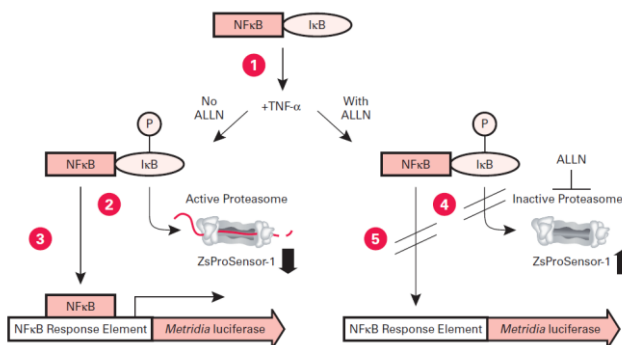
レポーターをトランスフェクトした細胞に、プロテアソーム阻害物質ALLN (50 μM) の存在下または非存在下で、TNF-α (25 ng/ml) を添加しました。ZsGreen蛍光シグナルにより細胞内のプロテアソーム活性を測定し、次に*Metridia* ルシフェラーゼの基質を同じウェルに加え、化学発光シグナルを測定しました。

ALLNの非存在下では、ZsGreenの蛍光が低レベルでしか観察されませんでした。このことは、プロテアソームは活性状態にあり、ZsProSensor-1タンパク質を分解していることを示唆しています。ALLN非存在下の細胞にTNF-αを添加すると、培養上清中に高レベルの*Metridia* ルシフェラーゼ活性が検出されました。このことは、NFκB応答エレメントが活性化され、分泌型*Metridia*ルシフェラーゼの発現を駆動していることを示唆しています (図1)。



**図1. TNF-αによるNFκBの活性化にはプロテアソームの活性が必要である**  
ALLNの非存在下かつTNF-αの存在下でのみ、高レベルの*Metridia*ルシフェラーゼ・シグナルが観察された。ALLNによりプロテアソームが不活性化されると (ZsProSensor-1の蛍光が増加すると)、NFκBシグナル伝達経路はTNF-αによる刺激に効率よく応答できない。ALLN = N-acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal。

しかし、ALLNの存在下で細胞をTNF-αで処理すると、高レベルのZsGreenの蛍光が観察されました。このことは、プロテアソームが不活性化されていることを示唆しています。TNF-αで刺激しても、*Metridia* ルシフェラーゼ活性は低レベルでしか観察されませんでした。このことは、NFκBがあまり活性化されていないことを示唆しています (図1)。これらの結果から、TNF-αで誘導されるNFκB依存性のシグナル伝達にはプロテアソームの活性が必須であることが実証されました (図2)。



**図2. TNF-αで誘導されるNFκB依存性のシグナル伝達にはプロテアソームの活性が必要である**  
細胞質中のNFκBはIκBの結合によって不活性化されている。NFκBが核に移行してシグナル伝達を開始する (3) ためには、TNF-αによる誘導によってIκBがリン酸化され (1)、プロテアソームによって分解されなければならない (2)。また、ペプチドALLNによってプロテアソームが阻害されると (4)、IκBは分解されず、NFκBは核に移行できない (5)。プロテアソームの状態 (活性状態か不活性状態か) は、細胞内のZsProSensor-1のレベルを測定することにより調べることができる。

## 結語

Proteasome SensorとReady-To-Glowシステムを組み合わせて使用することにより、生細胞の単一培養液で、TNF- $\alpha$ 誘導によりNF $\kappa$ Bが転写を開始するためにはプロテアソームの活性が必要であることを突き止めることができました（図2）。このように、I $\kappa$ Bのリン酸化と解離が起こりさえすればNF $\kappa$ B依存性のシグナル伝達が進行するという従来の考え方は不完全であることがわかりました。

SpectraMax M5 マルチプレートリーダーとそれに付随するSoftMax Proソフトウェアを用いるにより、ZsGreenの蛍光を測定した後すぐにMetridialルシフェラーゼ基質を同じウェルに加え、生じた化学発光を測定することができました。同じ装置と同じソフトウェアで同じ細胞からの蛍光と発光シグナルを両方読み取ることができるため、プロテアソーム活性と、TNF- $\alpha$ で誘導されるNF $\kappa$ B依存性シグナル伝達を同時に検出することができました（図1）。

これまでのマルチプレックスアッセイのデザインは、(a)異なる蛍光タンパク質を同時に用いて生細胞アッセイを行う方法と(b)異なるルシフェラーゼを同時に用いて細胞溶解してアッセイする方法に限られていました。しかし、Metridialルシフェラーゼは細胞溶解を必要としない分泌型レポーターであるため、我々は蛍光レポーターと発光レポーターを初めて同時使用することができ、両者の利点を組み合わせた均一系の生細胞アッセイを開発することができました。同じウェルで蛍光および化学発光・生細胞アッセイを同時に行える方法は、巧妙なアッセイ法の開発に新たな道を拓くものです。

## 謝辞

技術的な助言を頂いたMolecular Devices社（現在はMDS Analytical Technologies社の一部門）のCathy Olsen氏に感謝いたします。

## 参考文献

1. Adams, J. (2002) *Trends Mol. Med.* **8**(4 Suppl):S49–S54.
2. Haas, M. *et al.* (1998) *J. Leukocyte Biol.* **63**(3):395–404.
3. Sun, L. and Carpenter, G. (1998) *Oncogene.* **16**(16):2095–2102.
4. Proteasome Sensor Vector. (April 2003) *Clontechiques XVII*(2):14.
5. Matz, M. V. *et al.* (1999) *Nature Biotech.* **17**(10):969–973. Erratum in *Nature Biotech.* **17**(12):1227.
6. Li, X. *et al.* (1998) *J. Biol. Chem.* **273**(52): 34970–34975.
7. Living Colors Cell Lines. (April 2004) *Clontechiques XVII*(2):14.
8. Measurement of proteasome inhibition in live cells in Molecular Devices microplate fluorometers. (2006) *SpectraMax Application Note*. Molecular Devices.
9. Ready-To-Glow™ Secreted Luciferase System. (July 2006) *Clontechiques XXI*(2):12–13.
10. Ready-To-Glow™ Dual Secreted Reporter System. (October 2006) *Clontechiques XXI*(3):1.
11. Detection Limit and Linear Range of Ready-To-Glow Secreted Metridia Luciferase Determined on the Molecular Devices SpectraMax L. (July 2007) *Clontechiques XXII*(3):20–21.
12. SpectraMax M5/M5e multi-detection reader: A five-mode microplate reader with three-mode cuvette port. *Molecular Devices Data Sheet* (2006).
13. SoftMax Pro software: The industry standard in microplate data analysis. *Molecular Devices Data Sheet* (2006).

## 製品ガイド

- ▶ プロテアソームセンサーベクター
- ▶ 分泌型レポーター（Metridia ルシフェラーゼ）による生細胞アッセイ